UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE
CARTAGENA

E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Desarrollo de un sistema de fenotipado
basado en visión artificial para el estudio
de la cinética de crecimiento de plantas

D. Fernando Pérez Sanz

2019

Desarrollo de un sistema de fenotipado basado en visión artificial para el estudio de la cinética de crecimiento de plantas

Tesis doctoral presentada por Fernando Pérez Sanz dentro del
Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas en Investigación
y Desarrollo Agrario y Alimentario

Dirigida por los Doctores

Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

Pedro Javier Navarro Lorente

Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria

ETS de ingeniería Agronómica

Universidad Politécnica de Cartagena

2019

**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE
TESIS DOCTORAL POR EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS**

D. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines y D. Pedro J Navarro Lorente, directores de la Tesis doctoral “Desarrollo de un sistema de fenotipado basado en visión artificial para el estudio de la cinética de crecimiento en plantas”

INFORMAN:

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por D/Dª. Fernando Pérez Sanz, dentro del Programa de Doctorado Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, dando mi conformidad para que sea presentada ante el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado para ser autorizado su depósito.

La rama de conocimiento en la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- X Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 12 de noviembre de 2018

EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS

MARCOS|EGEA|
GUTIERREZ
CORTINES

Firmado digitalmente por MARCOS|
EGEA|GUTIERREZ CORTINES
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=MARCOS|EGEA|GUTIERREZ
CORTINES, serialNumber=
givenName=MARCOS, sn=EGEA
GUTIERREZ CORTINES,
ou=Ciudadanos, o=ACCV, c=ES
Fecha: 2018.11.14 15:18:27 +01'00'

Fdo.: Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

PEDRO JAVIER|
NAVARRO|
LORENTE

Firmado digitalmente
por PEDRO JAVIER|
NAVARRO|LORENTE
Fecha: 2018.11.14
11:22:09 +01'00'

Fdo: Pedro J. Navarro Lorente

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

D/D^a. Francisco Artés Hernández, Presidente/a de la Comisión Académica del Programa de Doctorado Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, “Desarrollo de un sistema de fenotipado basado en visión artificial para el estudio de la cinética de crecimiento en plantas”, ha sido realizada, dentro del mencionado Programa de Doctorado, por D/D^a. Fernando Pérez Sanz, bajo la dirección y supervisión del Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines.

En reunión de la Comisión Académica, visto que en la misma se acreditan los indicios de calidad correspondientes y la autorización del Director/a de la misma, se acordó dar la conformidad, con la finalidad de que sea autorizado su depósito por el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- X Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 14 de noviembre de 2018

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA

Firmado digitalmente
por FRANCISCO DE
ASIS|ARTES|
HERNANDEZ

Fdo: Francisco Artés Hernández

Por su paciencia y comprensión,

a Mariajo.

A mis padres y hermana.

Agradecimientos

Son muchas las personas a las que seguro, tengo algo que agradecerles en la vida. Unas cuantas a las que les debería agradecer que su influencia, de una u otra manera, me haya llevado a la consecución de este trabajo. Pero sólo unas pocas a las que ahora mismo recuerdo mencionar en estos agradecimientos. Al resto, les pido disculpas, no os sintáis agraviados, es mi mala cabeza.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, el Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines y el Dr. Pedro J. Navarro Lorente, por confiar en mí, darme la posibilidad de trabajar con ellos y poner a mi disposición los medios de que disponían. Con este trabajo, pierdo dos directores de tesis, pero espero ganar dos compañeros de trabajos y publicaciones.

También quiero dar las gracias a las compañeras y compañeros del laboratorio, especialmente a Victoria, Marta, Claudio y Raquel, por echarme una mano en las cuestiones y dudas –sobre todo administrativas– que he tenido estos años.

No puedo dejar de mencionar en estos agradecimientos a Marisa Rubio de la EINDOC. Siempre dice que no le de las gracias, que es su trabajo, aún así no siempre nos encontramos con alguien amable y dispuesto a ayudar.

A todos aquellos profesores que a lo largo de mi vida académica me han dejado huella.

A mis padres, por inculcarme siempre lo importante que era estudiar, y por su esfuerzo para que lo hiciese. A mi hermana, por su apoyo y confianza, siempre apostó por que siguiese estudiando.

Por último y más importante, quiero agradecer a Mariajo su apoyo incondicional y sin límites, su enorme paciencia y su actitud positiva ante todo, que ha conseguido limar un poco –no mucho– mi negatividad. Quiero agradecerle también que haya sido mi primera y más estricta revisora. Por todo ello y mucho más, gracias.

Resumen

El creciente aumento demográfico a nivel mundial, está provocando la necesidad de incrementar la producción agrícola. Científicos y productores buscan obtener variedades genéticas más productivas, resistentes y menos exigentes en cuanto a consumo de recursos se refiere. Los avances tecnológicos de las últimas décadas, ha permitido de una forma rápida y económica, la obtención de multitud de nuevas líneas genéticas. Es necesario, además, validar –fenotipar– esas nuevas líneas y comprobar que su comportamiento fenotípico se ajusta a lo esperado en función del genotipo creado.

Sin embargo, el gran cuello de botella de todo este proceso, se produce precisamente en el fenotipado de las líneas. El ritmo de generación de nuevas variedades ha estado superando con creces nuestra capacidad para identificar sus fenotipos. En los últimos años, el desarrollo del fenotipado de alto rendimiento –High Throughput Phenotyping o HTP– ha logrado que se acorten esas distancias, gracias en parte al creciente interés mostrado por grandes multinacionales y gobiernos.

El fenotipado basado en visión artificial es un método no invasivo en la mayoría de los casos, tiene multitud de configuraciones posibles en función de los objetivos planteados, cada vez es más asequible gracias al abaratamiento de la tecnología y es multiescala, pudiendo ser implementado desde una pequeña cámara de cultivo hasta grandes extensiones agrícolas.

Por todo ello, este trabajo plantea el desarrollo de un sistema de fenotipado basado en visión artificial, para ser implementado en una cámara de cultivo, con el objetivo último de estudiar la cinética de crecimiento de diferentes líneas genéticas –silvestres y transgénicas–.

Este sistema no solo incluye dispositivos y el desarrollo de software de

control, sino también la implementación de metodologías de procesamiento de imágenes y análisis del crecimiento. Así, en esta tesis se presenta un método de segmentación de hojas sobre fondo de sustrato, mediante la creación de vectores de características basados en espacios de color –Red, Green, Blue– o en transformadas Wavelet –Near infrared–, como base para entrenar clasificadores de aprendizaje automatizado. En ambos casos se obtienen unos rendimientos de clasificación cercanos al 100 % para el conjunto de imágenes probadas.

Por otro lado, la aplicación del sistema al estudio del crecimiento de distintos ejemplares de *Antirrhinum majus* y de *Petunia x hybrida*, ha permitido implementar una metodología de modelización –Generalized Additive Models–, que facilita el estudio de las curvas de este crecimiento y permite determinar parámetros como tasa máxima y media de crecimiento.

El empleo de los sistemas de fenotipado basado en visión artificial, muestran un gran potencial para el estudio de respuestas hasta ahora poco conocidas, fruto de cambios genómicos y epigenéticos producidos en las plantas. Finalmente, sería deseable, dirigir esfuerzos económicos y humanos hacia un campo que puede aportar no sólo conocimiento científico, sino también soluciones a nivel agroalimentario.

Abstract

The growing world population is causing the need to increase crop production. Scientists and farmers are seeking to obtain genetic varieties that are more productive, stress resistant and less demanding in terms of resource consumption. The technological advances of recent decades have made it possible to obtain a multitude of new genetic lines rapidly and economically. It is also necessary to validate these new lines and check whether their phenotypic behaviour complies with what is expected according to the genotype created.

However, the bottleneck of this process occurs precisely in the phenotyping of the lines. The rate of generation of new varieties has been greatly outpacing our ability to identify their phenotypes. In recent years, the development of the High Throughput Phenotyping (HTP) has been able to shorten these distances, due to the growing interest shown by corporations and governments.

Computer vision-based phenotyping is a noninvasive method in most cases. It has a multitude of possible configurations depending on the objectives set. It is becoming more affordable thanks to the lower cost of technology and is multiscale, and can be implemented from a small cultivation chamber to large agricultural areas.

Therefore, this work proposes the development of a phenotyping system based on computer vision, to be implemented in a growth chamber, with them main aim of studying the growth rate of different genetic lines –wild type and transgenic–.

This system not only includes devices and the development of control software, but also the implementation of image processing methodologies and growth analysis. Thus, in this thesis I present a method of segmentation of

leaves over substrate background, by creating feature vectors based on color spaces –Red Green Blue– or Wavelet transforms -Near Infrared –, as a basis for training machine learning classifiers. In both cases, classification yields of close to 100 for the set of tested images.

On the other hand, the application to the study of the growth of different lines of *Antirrhinum majus* and *Petunia x hybrida*, has allowed the implementation of a modelling methodology –Generalized Additive Models–, which facilitates the study of the growth curves and allows the determination of parameters such as maximum and mean growth rates.

The application of phenotyping systems based on artificial vision, shows a great potential for the study of uncharacterized germplasm, as a result of genomic and epigenetic changes produced in plants. Finally, it would be desirable to focus economic and human efforts towards a field that can provide not only scientific knowledge, but also solutions for the agriculture and food industry.

Abreviaturas

ANN Artificial Neural Networks

API Application Programming Interface

ATP Adenosine TriPhosphate

AUC Area Under Curve

CAI Cellulose Absorption Index

CARI Chlorophyll Absorption Ratio Index

CCD Charged couple device

CIg Coloration Index Green

CIr Coloration Index Red

CMOS Complementary metal oxide semiconductor

CNN Convolutional Neural Networks

CPU central processing unit

CT Computer Tomography

DLAI Difference 1725/970 Difference Leaf Area Index

DP Deep Learning

DWSI Disease Water Stress Index

DWT Discrete wavelet transform

FAIR Findable, Accessible, Interoperable, Re-usable

GAM Generalized Additive Models

GI Greenness Index

GNDVI Green Normalized Difference Vegetation Index

GPIO General Purpose Input/Output

GUI Graphical User Interface

GxE Gene environment interaction

HDL High Definition LIDAR

HMM Hidden Markov Models

HoG Histogram of Oriented Gradients

HPF High Pass Filter	MCARI Modified Chlorophyll Absorption in Reflectance Index
HRXCT High Resolution X Computer Tomography	MDF Medium Density Fibre-board
HSV Hue, Saturation, Value	ME Misclassification Error
HTP High throughput phenotyping	ML Machine Learning
I/O Input/output	MRI (Magnetic Resonance Imaging)
IR Infrared	MSV Multi stereo vision
JSON Javascript Object Notation	MTD Maximum Temperature Difference
kNN k Nearest Neighbor	NBC Naïve Bayes Classifier
KSF Kernel Smoothing Functions	NDVI Normalized difference vegetation index
L*a*b* Lightness and chromatic axis green/magenta (a) and blue/yellow (b)	NGP New generation phenotyping
LCA Lignin Cellulose Absorption Index	NIR Near infra red
LED Light Emitting Diode	NLI Non-Linear Index
LIDAR Laser Imaging Detection and Ranging	NTDI Normalized Difference Tillage Index
LOOV leave-out one cross validation	OSAVI Optimized Soil Adjusted Vegetation Index
LPF Low Pass Filter	PCA Principal Component Analysis
LWVI Normalized Difference Leaf Water VI 1	PET Positronic Emission Tomography

PWI Precipitable Water Index

QTL Quantitative trait locus

RAM Random Access Memory

RF Radio Frequency

RGB Red, green, blue

ROI Region of interest

RT Real Time

SATA Serial Advanced Technology Attachment

SIFT Scale Invariant Features

SSD Solid State Disk

SURF Speeded-Up Robust Features

SVM Support Vector Machine

TDI Time delay integration

ToF Time of flight

USB Universal Serial Bus

UV Ultra violet

WT Wild Type

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	III
Abstract	V
Abreviaturas	IX
I Introducción y estado del arte	1
1 Introducción	3
1.1 Estructura del documento	5
2 Objetivos	1
2.1 Metodología	2
3 Fenotipado y reloj circadiano	5
3.1 Fenotipado de plantas	5
3.2 Fenotipado basado en visión artificial	8
3.3 El reloj circadiano en plantas	10
4 Dispositivos de captura	15
4.1 Introducción	15
4.2 Adquisición de imágenes	17
4.2.1 Sistemas de visión Mono-RGB	18
4.2.2 Estereovisión	20
4.2.3 Sistemas multi e hiperspectrales	21

4.2.4 Cámaras ToF	23
4.2.5 Tecnología LIDAR	25
4.2.6 Termografía e imágenes de fluorescencia	31
4.2.7 Imágenes de tomografía	32
5 Análisis de imágenes	37
5.1 Introducción	37
5.2 Preprocesado de imagen	38
5.3 Segmentación de imagen	39
5.4 Extracción de características	41
5.5 Aprendizaje automatizado	43
6 Antecedentes	55
6.1 Introducción	55
6.2 Sistema de fenotipado. Primera generación	57
6.2.1 Sistema de captura de imagen	57
6.2.2 Sistemas de iluminación	58
6.2.3 Unidad de procesamiento de imagen	58
6.2.4 Ventajas e inconvenientes	59
II Métodos y resultados	61
7 Sistema de fenotipado basado en visión artificial	63
7.1 Características de la cámara de cultivo	64
7.2 Subsistema de captura	65
7.3 Subsistema de iluminación	67
7.4 Subsistema de control	68
7.4.1 Ordenador central	69
7.4.2 Panel electrónico de control	69
7.4.3 Integración del hardware	71
7.4.4 Software de control	73
7.4.5 Funcionalidad del software de control	75

8	Aprendizaje automático basado en visión artificial	83
8.1	Imagen y espacios de color	84
8.2	Desarrollo del algoritmo	86
8.2.1	Extracción de muestras	87
8.2.2	Generación del modelo	87
8.2.3	Validación del algoritmo	94
8.3	Resultados y discusión	95
8.3.1	LOOCV	96
8.3.2	Curvas ROC	96
8.4	Error de segmentación	98
9	Estudio de líneas silenciadas en genes del reloj	105
9.1	Modelos aditivos generalizados	105
9.2	Silenciamiento de <i>LHY</i> en <i>Antirrhinum majus</i>	110
9.2.1	Especímenes y configuración	110
9.2.2	Resultados y discusión	111
9.3	Silenciamiento de <i>ZTL</i> en <i>Petunia x hybrida</i>	114
9.3.1	Especímenes y configuración	114
9.3.2	Resultados y discusión	115
III	Conclusiones Finales	119
10	Conclusiones y trabajos futuros	121
10.1	Conclusiones	121
10.2	Trabajos futuros	124
11	Publicaciones y contribuciones a congresos	127
	Bibliografía	156

Índice de figuras

3.1	Flujo de operaciones ideal en un sistema de fenotipado masivo	7
3.2	Esquema general del reloj circadiano de <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
3.3	Papel de ZTL en la regulación del reloj	13
4.1	Flujo de procesos general en fenotipado de plantas basado en visión artificial. A lo largo de los capítulos 4 y 5	16
4.2	Cámara RGB de tipo industrial empleada en visión artificial	19
4.3	Cámara básica de estéreo visión	21
4.4	a) Cuerpo de cámara hiperespectral. b) Reconstrucción de imagen hiperespectral	23
4.5	Esquema de diferentes espectros empleados para fenotipado y las cámaras asociadas. Los nombres de los índices se pueden encontrar en la tabla 4.2	24
4.6	a) Cámara ToF para desarrollo. b) Esquema de funcionamiento de una cámara ToF	25
4.7	a) Sensor LIDAR. b) Nube de puntos capturados por un sensor LIDAR 3D HDL	27
4.8	a) Cámara térmica. b) Cámara de fluorescencia c) Imagen de fluorescencia de la clorofila dentro de los cloroplastos (Licencia CC. Autor Dietzel65)	33
4.9	Imagen de termografía computerizada (CT) mostrando un sistema radicular (cortesía de Pacific Northwest National Laboratory.)	34
5.1	Ejemplos de tipos de segmentación	38

6.1	Número de publicaciones en la Web Of Science (WOS) por año, relacionadas con los términos <i>plant phenotyping & image analysis</i> y <i>plant phenotyping & computer vision</i>	56
6.2	Dispositivos de captura día/noche. Sobre ellos panel LED NIR	57
6.3	Panel LED para iluminación diurna	58
6.4	Diferencia de alineamiento de las imágenes diurna y nocturna .	59
7.1	Esquema de la disposición de los sistemas de la cámara de cultivo.	64
7.2	Configuración de la cámara de cultivo para imágenes cenitales.	65
7.3	Configuración de la cámara de cultivo para imágenes cenitales.	66
7.4	Disposición de los fotodiodos en un CCD de mosaico de Bayer.	67
7.5	Subsistemas de iluminación.	68
7.6	Prototipo de sistema de control con tarjeta Arduino izquierda y tarjeta de relés a la derecha	70
7.7	Módulos de control	71
7.8	Detalle de las conexiones entre los distintos dispositivos del sistema de fenotipado	72
7.9	Esquema de la estructura del software de control	75
7.10	Interfaz gráfica. Pestaña <i>Image Control</i>	77
7.11	Interfaz gráfica. Pestaña <i>Time Snapshot Control</i>	79
7.12	Interfaz gráfica. Pestaña <i>Environment Control</i>	80
7.13	Interfaz gráfica. Pestaña <i>Summary</i>	82
8.1	Construcción de vector de características para imágenes en color	88
8.2	Progresión del algoritmo de la transformada en el primer nivel de descomposición	90
8.3	Resultado de aplicar transformadas de Wavelet a dos niveles de descomposición	91
8.4	Selección de muestras para calcular el vector de características	100
8.5	Resultados de las curvas ROC para imágenes RGB	101
8.6	Resultados de las curvas ROC para imágenes NIR	102
8.7	Resultados de la segmentación de imágenes RGB con kNN . .	103
8.8	Resultados de la segmentación de imágenes NIR basada con SVM	104

9.1	Representación de medidas discretas correspondientes al crecimiento de la flor de <i>Antirrhinum majus</i>	106
9.2	Diferentes modelos de ajuste sobre medidas discretas	109
9.3	Esquema de los ciclos día/noche 12/12 de iluminación y captura en <i>Antirrhinum majus</i>	111
9.4	Curvas de crecimiento de 3 flores WT y 3 flores <i>iRNA:AmLHY</i> de <i>Antirrhinum majus</i>	112
9.5	Esquema con la configuración de los ciclos día/noche 8/16 de iluminación y captura en <i>Petunia x hybrida</i>	115
9.6	Curvas de crecimiento de 1 flor WT y 1 flor <i>iRNA:PhZTL</i> de la línea 3 de <i>Petunia x hybrida</i>	116
9.7	Curvas de crecimiento de 1 flor WT y 1 flor <i>iRNA:PhZTL</i> de la línea 10 de <i>Petunia x hybrida</i>	116
9.8	Curvas de movimiento de flores de <i>Petunia</i>	118

Índice de tablas

4.1 Lista de librerías de visión y procesamiento de imagen	20
4.2 Índices de vegetación y aplicaciones	28
4.2 Índice de vegetación y aplicaciones (cont.)	29
4.2 Índice de vegetación y aplicaciones (cont.)	30
5.1 Lista de librerías de ML	44
5.2 Procedimientos en análisis de imagen	47
5.2 Procedimientos en análisis de imagen (cont.)	48
5.2 Procedimientos en análisis de imagen (cont.)	49
5.2 Procedimientos en análisis de imagen (cont.)	50
5.2 Procedimientos en análisis de imagen (cont.)	51
5.2 Procedimientos en análisis de imagen (cont.)	52
5.2 Procedimientos en análisis de imagen (cont.)	53
8.1 Parámetros empleados en la implementación de ML	94
8.2 Errores obtenidos con LOOCV aplicado a las distintas combi- naciones de algoritmos y configuraciones	96
8.3 Tabla de valores de las AUC	97
8.4 Redimiento obtenido en la clasificación de imágenes	99
9.1 R^2 de los modelos de ajuste	108
9.2 Valores de crecimiento en WT y <i>iRNA:AmLHY</i>	113
9.3 Valores de crecimiento en WT y <i>iRNA:PhZTL3</i>	115
9.4 Valores de crecimiento en WT y <i>iRNA:PhZTL10</i>	117

Parte I

Introducción y estado del arte

Capítulo 1

Introducción

Según algunas estimaciones, para el año 2050 será necesario duplicar la producción agrícola mundial, para poder cubrir las necesidades previstas para toda la población del planeta [1]. Alcanzar este objetivo va a suponer un importante reto para los productores, que precisarán aumentar el rendimiento de los cultivos a razón de un 2,4% al año, actualmente es de un 1,3%. Los continuos avances tecnológicos ofrecen a los productores una potencial mejora del fondo genético disponible. Sin embargo, los intentos por explotar todo el potencial de las nuevas herramientas y técnicas moleculares, se ven parcialmente limitadas por nuestra capacidad para fenotipar y validar esas variedades “mejoradas” [2, 3].

Desde mucho tiempo antes de que se descubriese la existencia del DNA, los agricultores ya practicaban la mejora genética –sin saberlo– basada en la selección fenotípica. El desarrollo de variedades mejoradas, dependía de la habilidad para identificar la mejor variación genética. Esto era un proceso eficaz, pero no eficiente. Hoy día, los científicos necesitan tener la capacidad de poder fenotipar un gran número de líneas con rapidez y poder identificar la mejor progenie en términos de producción, resistencia y requerimientos de recursos [4].

La manera más razonable de satisfacer las demandas de identificación y validación de cientos de líneas transgénicas, mutantes o variabilidad natural sólo puede ser hecha a través de datos fenotípicos de gran dimensionalidad o fenómica –por homología con la genómica– [5]. Este enfoque puede ayudar

a predecir complejos rasgos que son relevantes para la planta y proporcionar explicaciones sobre por qué determinados genotipos destacan en un entorno específico [6].

En los últimos años ha habido un creciente interés por las plataformas de fenotipado de alto rendimiento (High Throughput Phenotyping o HTP) [7]. Debido al coste de grandes infraestructuras de HTP, se han establecido diversas redes internacionales con la intención de aunar esfuerzos y producir una investigación con repercusión [6]. La mayor parte de estos consorcios están auspiciados por grandes multinacionales de la industria alimentaria, junto con institutos de investigación públicos. Algunos de los más conocidos son European Plant Phenotyping Network (EPPN), Food and Agriculture COST Action FA1306, International Plant Phenotyping Network (IPPN), Australian Phenomics Network (APN), the German Plant Phenotyping Network (DPPN), U.K. Plant Phenomics Network (UKPPN) o North American Plant Phenotyping Network (NAPPN).

El desarrollo de las técnicas de alto rendimiento en las últimas décadas, ha permitido ahondar en el conocimiento de un regulador de procesos biológicos vitales en las plantas, como es el reloj circadiano, de maneras que antes eran impensables. Las herramientas han ido mejorando continuamente, aumentando el rendimiento y reduciendo los costes [8]. A pesar de ello, estamos lejos todavía de tener un completo conocimiento sobre el funcionamiento del reloj. Se sabe que éste se sincroniza por estímulos externos como luz roja y azul [9, 10], temperatura [11] y fitohormonas [12], sin embargo, no se conocen los mecanismos de regulación [8], ni de qué manera afecta a procesos como la cinética de crecimiento de las plantas.

Por todo ello, en este trabajo se propone una nueva herramienta de fenotipado, orientada principalmente al estudio de la cinética de crecimiento, desarrollando software, hardware y procedimientos algorítmicos que permitan mejorar el conocimiento sobre la complejidad funcional y reguladora del reloj, y quizá dar un paso más hacia una “agronomía traslacional” que nos permita trasladar los conocimientos adquiridos gracias a investigaciones científicas realizadas sobre especies modelo, a la mejora de la producción agrícola.

1.1. Estructura del documento

Este documento está dividido en tres partes, articuladas en una serie de capítulos. La parte I ofrece una revisión bibliográfica sobre aquellos aspectos relevantes para esta tesis y se plantean los objetivos a alcanzar. La parte II describe las aportaciones realizadas fruto del trabajo de esta tesis. Cada aportación describe la metodología empleada, los resultados obtenidos y una discusión de los mismos. La parte III desarrolla las conclusiones finales, una discusión general final, algunos trabajos futuros surgidos como consecuencia de esta tesis y un listado de publicaciones y contribuciones a congresos.

La parte I está constituida por los 6 primeros capítulos. El capítulo 1, en el que está incluido este texto, proporciona una breve introducción a la tesis y la organización de la misma.

El capítulo 2 describe los objetivos planteados en esta tesis.

El capítulo 3 hace un repaso general a los conceptos de fenotipo, genotipo y fenotipado. Muestra, además, un visión conceptual del fenotipado basado en visión artificial y de la organización a grandes rasgos del reloj circadiano en plantas.

En el capítulo 4 se ofrece una visión general del estado del arte de los dispositivos de captura más empleados en el fenotipado de plantas, así como numerosos ejemplos de uso.

El capítulo 5, muestra una panorámica general de los diferentes procedimientos y algoritmos empleadas en el procesamiento de imágenes aplicadas al campo del fenotipado de plantas a través de una estructura de apartados que simula un flujo de trabajo “ideal”.

El capítulo 6 describe brevemente un sistema de fenotipado que sirvió de inspiración para el desarrollo del que se describe en esta tesis.

La parte II está formada por 3 capítulos. El capítulo 7 describe todo el proceso de desarrollo del sistema: desde la integración de todos los componentes hardware, hasta el desarrollo del software de control.

En el capítulo 8 se presenta una metodología desarrollada para la automatización de la segmentación de objetos en imágenes capturadas por el sistema de fenotipado. Dicha metodología varía si se trata de imágenes RGB

o imágenes en escala de grises procedentes del sensor infrarrojo.

El capítulo 9, último de este bloque, describe una serie de experimentos en los que se ha aplicado el sistema de fenotipado y modelo matemático de ajuste, para estudiar posibles variaciones en la cinética de crecimiento de plantas silvestres y mutantes del reloj circadiano.

Finalmente, la parte III consta de dos capítulos. El capítulo 10 donde se incluyen las conclusiones finales y una discusión general, así como posibles vías de trabajo futuro abiertas a consecuencia de esta tesis, y el capítulo 11 donde se relacionan publicaciones y otras contribuciones.

Tras estos capítulos de encuentran las referencias bibliográficas consultadas en este trabajo.

Capítulo 2

Objetivos

El objetivo fundamental de esta tesis, es el desarrollo y validación de un sistema de fenotipado basado en visión artificial, que permita automatizar, en la medida de lo posible, el estudio del crecimiento de plantas, su cinética, así como cualquier otro rasgo fenotípico medible a través de un sistema de captura de imágenes configurable. Para alcanzar este objetivo se han definido una serie de tareas:

- Diseño e implementación de los elementos físicos (hardware) que componen el sistema.
- Desarrollo del software de control y configuración del sistema.
- Desarrollo de una metodología de segmentación y clasificación de imágenes de plantas, basada en aprendizaje automatizado. Distinguiendo si se trata de imágenes RGB o imágenes en escala de grises.
- Validación de la metodología de segmentación y clasificación mediante su aplicación a un conjunto de imágenes obtenidas por el sistema de fenotipado.
- Aplicación del sistema de fenotipado sobre individuos de diversas especies tanto silvestres como transgénicos con genes del reloj circadiano silenciados, para el estudio del crecimiento de flores.

- Aplicación de los modelos aditivos generalizados, sobre las medidas de crecimiento obtenidas, como herramienta de modelización del desarrollo del órgano a lo largo del tiempo.

2.1. Metodología

La metodología propuesta para la consecución de los objetivos planteados, se basa en el estudio del estado del arte, el desarrollo e implementación de los sistemas y metodologías propuestas y su validación mediante una serie de aplicaciones.

- Estudio del estado del arte:
 - Estudio de los diferentes sistemas de fenotipado y tipos de dispositivos empleados, así como el objetivo de aplicación de cada tipología de dispositivo.
 - Estudio de las metodologías y algoritmos más utilizados en el procesamiento y extracción de información de imágenes procedentes de sistemas de fenotipado.
 - Estudio de las ventajas e inconvenientes encontrados en el sistema de fenotipado de primera generación en el que se ha inspirado esta tesis.
- Desarrollo del sistema de fenotipado:
 - Selección de los dispositivos de iluminación y captura que mejor se adapten a los objetivos para los que se plantea desarrollar el sistema.
 - Selección y configuración de los sistemas electrónicos necesarios para la integración de todos los dispositivos del sistema.
 - Selección de la plataforma de programación más adecuada para el desarrollo del software que permita el control sobre los dispositivos.
- Desarrollo de una metodología de segmentación y clasificación:

-
- Selección e implementación de algoritmos de aprendizaje automatizado descritos en la literatura, de forma que se generen modelos de clasificación.
 - Validación de los algoritmos mediante la aplicación de los modelos de clasificación sobre grupos de imágenes seleccionadas.
 - Aplicación del sistema de fenotipado al estudio del crecimiento:
 - Obtención de especímenes silvestres y transgénicos de *Antirrhinum majus* y *Petunia x hybrida*.
 - Acondicionamiento de los especímenes en la cámara de cultivo, donde se encuentra instalado el sistema de fenotipado.
 - Realización de ciclos de grabación sobre las plantas con diferentes configuraciones de iluminación.
 - Procesamiento de las imágenes y obtención de los datos de crecimiento de interés.
 - Modelización del crecimiento mediante la implementación de modelos aditivos generalizados.

Capítulo 3

Fenotipado y reloj circadiano en plantas

3.1. Fenotipado de plantas

Los conceptos de fenotipo y genotipo fueron acuñados por el científico danés Wilhelm Johannsen a principios del siglo XX [13]. Medio siglo después de los experimentos de Gregor J. Mendel basados en la herencia de rasgos o características, y en plena disputa entre las ideas que Darwinistas y Lamarkianos mantenían sobre la evolución, Johannsen realizó una serie de experimentos relacionados con la herencia del tamaño de la semilla de judías [14]. Los resultados de estos experimentos le llevaron a la siguiente conclusión acerca de los conceptos de fenotipo y genotipo [15]:

Todos los “tipos” de organismos, distinguibles mediante inspección directa o sólo mediante métodos más precisos de medición o descripción, pueden caracterizarse como “fenotipos”. Ciertamente los fenotipos son cosas reales; los “tipos” de organismos que aparecen (no sólo aparentes) son una y otra vez los objetos de la investigación científica. Todos los fenómenos típicos en el mundo orgánico son *eo ipso* fenotípicos, y la descripción de las miríadas de fenotipos en cuanto a formas, estructuras, tamaños, colores y otros caracteres de los organismos vivos ha sido el principal objetivo de la historia natural, -que siempre fue una ciencia de carácter esencialmente morfológico-descriptivo [...]. Por lo tanto, podemos definir adecuadamente esta concepción como una “concepción del fenotipo” en oposición a la “concepción del genotipo”.

(Wilhelm Johannsen, 1911)

Desde entonces, el término fenotipo se ha utilizado para describir una amplia gama de rasgos en todos los grupos de seres vivos. El genotipo, el entorno y su mutua interacción, tienen influencia cuantitativa sobre algunas características, de una manera compleja y dinámica [7]. Las respuestas fenotípicas son resultado de una gran cantidad de procesos, funciones y estructuras que cambian durante el crecimiento y desarrollo de la planta (o cualquier otro organismo) dando lugar a resultados fisiológicos y morfológicos observables y cuantificables [16].

En los años 60, el término fenotipado comenzó a utilizarse, para referirse al conjunto de metodologías y protocolos empleados en determinar el crecimiento y arquitectura del organismo, así como su composición, con exactitud y precisión. Esta caracterización puede llevarse a cabo a diferentes escalas, desde un órgano hasta una población completa. Por tanto, el propósito del fenotipado es producir una descripción de las propiedades anatómicas, fisiológicas, y bioquímicas de la planta [16].

En los últimos 25 años, la secuenciación clásica ha dado paso a nuevas técnicas de secuenciación a gran escala. La que se denominó -y aún se denomina- secuenciación de la siguiente generación (next generation sequencing) ha supuesto un paso adelante importante [7] en el campo de la mejora vegetal, así

como en la genética cuantitativa. Esta rápida y masiva generación de información, requiere a su vez de sistemas, que permitan realizar de forma rápida cientos o miles de medidas, con el objetivo de seleccionar a los individuos “superiores” en términos de productividad o economía y de identificar las regiones del genoma que controlan esos rasgos de interés, estableciendo pues la conexión de genotipo-fenotipo [14] (Fig. 3.1).

Figura 3.1: En un sistema ideal de fenotipado masivo, se parte de una fuente genética vegetal (germoplasma) que interesa ser caracterizada (fenotipada). Es necesario desarrollar en primer lugar un entorno de cultivo donde se puedan controlar los parámetros ambientales requeridos según los objetivos del experimento. Este sistema debe tener implementado además un subsistema que permita la toma de datos o medidas de forma automatizada. Estas medidas o datos deben poder ser procesados y analizados automáticamente también. Finalmente, todos los datos, tanto en crudo como analizados debe poder ser almacenados e integrados con información existente sobre el entorno con el fin de poder detectar e interpretar las interacciones gen - entorno (G x E) y modelar las respuestas fenotípicas.

La distancia que separa capacidad de caracterizar genotipos y la de identificar y caracterizar sus correspondientes fenotipos, es uno de los mayores problemas actuales en el estudio vegetal en general [17, 18]. A pesar del avance

que se ha experimentado en los últimos 5-10 años en el campo del fenotipado vegetal, sigue siendo éste un cuello de botella, que obstaculiza el progreso tanto de la investigación orientada al conocimiento, como a la aplicación [7, 18], siendo necesario por consiguiente, un mayor y más rápido desarrollo de las técnicas y métodos de fenotipado masivo.

3.2. Fenotipado basado en visión artificial

El desarrollo en automatización y robótica, la aparición de nuevos sensores y el desarrollo de nuevas técnicas de imagen (software y hardware), ha proporcionado un amplio rango de aplicaciones tanto a nivel de investigación en laboratorio, como de sistemas de monitorización en entornos de producción hortofrutícola [7].

Tal como se ha descrito en el apartado anterior (Fig. 3.1), para analizar las interacciones gen x entorno (G x E) y modelar las respuestas fenotípicas, el esquema general del fenotipado de plantas incluye un diseño experimental, cuantificación de las medidas e interpretación de los resultados. En el diseño experimental se deben considerar diferentes condiciones de crecimiento, infraestructuras que faciliten el crecimiento, monitorización de las condiciones ambientales y sistemas que permitan la obtención de información –medidas– de forma no invasiva [19].

La visión artificial o visión por computador –del inglés *computer vision*– es un campo muy activo en áreas tan diversas como la navegación, la automatización industrial o el diagnóstico médico. Muchas de las técnicas desarrolladas en estas disciplinas para la adquisición y procesamiento de imagen pueden ser aplicadas al fenotipado de plantas [20]. Sin embargo, el fenotipado de plantas muestra una serie de particularidades que hacen necesario el desarrollo de adaptaciones de las tecnologías existentes, o incluso el desarrollo de nuevas técnicas. Los movimientos de nutación debidos al crecimiento, movimientos relacionados con los ritmos circadianos, el empleo de iluminaciones específicas para favorecer el crecimiento –aunque no la captura de imagen–, la mayor reflectancia a longitudes de onda fuera del espectro visible o la necesidad de disponer de sensores capaces de detectar la emisión en longitudes de onda

concretos, son algunas de estas particularidades que hacen que sea difícil la aplicación directa de las tecnologías existentes.

Estas particularidades y la diversa naturaleza de los rasgos fenotípicos que pueden resultar objeto de estudio, hacen que la variedad de dispositivos de captura de imagen y de algoritmos de análisis sea elevado. El principal condicionante para emplear un tipo de dispositivo u otro, es el rango de longitudes de onda en el que se desea trabajar y el tipo de estructura vegetal que se desea estudiar. Desde los dispositivos que trabajan en el espectro visible –los más comunes– hasta los infrarrojos (IR), ultravioletas o hiperspectrales (Cap. 4).

En cuanto a los algoritmos de análisis, algunos requieren del usuario para proporcionar entradas manuales de puntos de selección, otros son semiautomáticos o incluso automáticos. Algunos son simples como las típicas segmentaciones de imágenes basadas en espacios de color y umbralización de los niveles de intensidad del píxel, hasta métodos de extracción de características más complejos como los basados en transformadas de Wavelet (Cap. 5).

Como se puede deducir, el fenotipado basado en visión artificial es algo más complejo que el simple hecho de “hacer fotografías”. La cuantificación de un fenotipo, supone ser capaces de medir el resultado de la interacción de la luz con la planta, la cual refleja, absorbe y transmite fotones de diferente manera y en diferente cuantía según la parte de la planta de que se trate. Por ejemplo, la clorofila absorbe fotones principalmente en la región del espectro del azul y el rojo, el agua de los tejidos refleja bien la radiación IR, y la celulosa absorbe fotones entre los 2200 y 2500 nm –IR cercano– [19].

Se podría decir, en definitiva, que el fenotipado de plantas basado en visión artificial, es la obtención de medidas sobre parámetros fisiológicos, de crecimiento, de desarrollo y de cualquier otra característica de la planta, a través de un proceso lo más automatizado posible y que no afecte –o lo haga con el menor impacto– al desarrollo de la planta [20], con el objetivo último de obtener la cuantificación de un rasgo asociado a la expresión génica [19].

3.3. El reloj circadiano en plantas

La supervivencia de muchos organismos en la Tierra, depende en gran medida del aprovechamiento que hagan las plantas de la energía solar, el agua, los nutrientes y el CO_2 para su propio crecimiento. Este crecimiento se produce gracias a la conversión de energía lumínica en energía química, que ocurre fundamentalmente en las hojas [21]. Se ha comprobado que el crecimiento de hojas y otros órganos de la planta ocurre en ciclos rítmicos de 24 horas, hecho que no es sorprendente, pues las alternancias entre el día y la noche afecta profundamente a las reacciones metabólicas de los organismos [22, 23].

Esta alternancia entre el día y la noche, produce una serie de cambios rítmicos en determinados parámetros físicos, como son la luz y la temperatura. La hipótesis más aceptada actualmente, tras el estudio de cianobacterias, hongos, plantas y animales, es que existe un evolucionado mecanismo endógeno, capaz de mantener sincronizados determinados procesos con esos cambios ambientales cíclicos. Esto permite la anticipación de estos procesos en los organismos, conforme a un futuro previsible [24].

La sincronización de los organismos vivos con el entorno no solo es importante para el control de procesos internos como demanda energética o crecimiento, sino también para la expresión de rasgos que permiten la interacción con otras especies. Las plantas, como otros organismos, integran las señales del entorno a través del reloj circadiano.

El reloj circadiano de las plantas ha sido ampliamente estudiado en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* [25]. Este reloj está formado por un conjunto de genes, que forman varios bucles interconectados vía activación y represión transcripcional y post-traducciona [26]. Esos bucles se denominan bucle diurno, bucle central y bucle nocturno (Fig. 3.2) en función de cuándo los mRNA de los genes del reloj muestran su mayor expresión [27].

El modelo actual propone la entrada de señales ambientales al reloj vía elementos discretos. Las señales ambientales exógenas incluyen luz y temperatura [28, 29, 30, 31]. Las respuestas del reloj a las señales ambientales que lo estimulan son de dos tipos. El primero es la auto-coordinación a nivel transcripcional y post-traducciona [32]. El segundo corresponde a una serie

Figura 3.2: Esquema general del reloj circadiano de *Arabidopsis thaliana*

de rasgos que, de manera directa o indirecta, son controlados por el reloj. Esto incluye división celular y expansión [33], metabolismo primario [34], respuesta a estrés abiótico [35], almacenamiento de proteínas [36], producción de biomasa [37, 38], orientación y movimiento de la flor y emisión de volátiles [39, 40, 41].

Los dos procesos celulares que dirigen el crecimiento, proliferación y expansión, están bajo el control directo del reloj circadiano. El crecimiento controlado de los hipocotilos y la expansión posterior de las hojas es el resultado de un control directo sobre la expansión celular por parte del reloj [42]. Los genes *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4* y *5* (*PIF4* y *PIF5*) son transcripcionalmente reprimidos por el complejo nocturno del reloj que comprende a *EARLY FLOWERING 3* (*ELF3*), *ELF4* y el gen de la familia

MYB –reguladores de la diferenciación celular– *LUX ARRHYTHMO* (*LUX*) [43]. Los niveles de citoquininas involucrados en la proliferación celular, la correcta sincronización de la expresión génica del ciclo celular y la sincronización y duración de la fase S están todas bajo regulación circadiana [37, 33].

La familia de proteínas que incluyen a ZEITLUPE (ZTL), FLAVIN BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX (FKF) Y LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) forman parte del reloj e integran las señales luminosas en *Arabidopsis* [44, 45, 46]. Estas proteínas unen un flavin mononucleótido vía dominio LOV y actúan como receptores de luz azul. Además del dominio LOV, comparten un dominio F-box y una secuencia KELCH repetitiva en el C-terminal. Esta pequeña familia de proteínas que comparte papeles en el control del reloj y en la transición a la fase de crecimiento en *Arabidopsis*, está presente en plantas superiores pero ausente en algas [47]. La proteína ZTL es estabilizada por GIGANTEA (GI) en presencia de luz azul [48]. Tanto ZTL como LKP2 pueden también unirse a proteínas de la familia del regulador de pseudorespuesta (PSEUDORESPONSE REGULATOR) con el objetivo de degradarlos [49, 50, 51]. Esta interacción de ZTL/LKP2/FKF como receptores de luz, acoplados a la degradación selectiva de proteínas del reloj permite el funcionamiento éste a lo largo del día (Fig. 3.3).

Figura 3.3: Papel de ZTL en la regulación del reloj. En presencia de luz azul, ZTL interacciona con GI y también forma un complejo con Heat Shock Protein 90 (HSP90). Esta interacción estabiliza a ZTL previniendo su interacción con TOC1 o PRR5. Esto permite que tanto TOC1 como PRR5 se acumulen al final de la tarde. Los complejos FKF1-GI y LKP2-GI parecen tener un papel similar. Durante la fase de oscuridad, ZTL (y presumiblemente FKF1 y LPK2) interactúan con TOC1 y PRR5 y las degradan a través de la ruta del proteosoma [52].

Capítulo 4

Dispositivos de captura

4.1. Introducción

El desarrollo de sistemas automáticos para monitorizar grandes extensiones de diferentes formaciones vegetales –bosques, matorral, cultivos, etc.–, comenzó hace más de 25 años, con la implementación del índice de vegetación de la diferencia normalizada (NDVI) en imágenes procedentes de satélite, dentro del campo de la teledetección [53]. Probablemente fue la piedra angular para el desarrollo de métodos automáticos para el análisis de crecimiento vegetal, estimación de biomasa y estado sanitario de la vegetación [54].

Desde entonces, el enorme avance de la tecnología, ha incrementado de forma exponencial nuestra capacidad para obtener datos de sistemas biológicos. La capacidad de estimar la cantidad de clorofila a partir de imágenes de satélite ha permitido, por ejemplo, determinar el estado de salud, predecir el momento óptimo de siembra o como hacer una estimación de la productividad en grandes extensiones como por ejemplo Burkina Faso, las grandes praderas canadienses o la cuenca del Indo en Pakistán [55, 56, 57, 58].

Es por esto, que la teledetección ha sido el campo tecnológico fundamental, donde comenzaron a asentarse las bases del conocimiento sobre la adquisición y análisis de imágenes para el estudio vegetal. Posteriormente, hubo desarrollo de dispositivos de fenotipado a nivel local, cuyo su origen se encuentra en tecnologías como la termografía infrarroja, empleada para detectar la apertura de estomas, o medir el estrés hídrico de las plantas [59, 60, 61].

La obtención de datos cuantitativos a partir de imágenes, ha permitido el estudio del desarrollo radicular [62, 63, 64], lo que ha conducido a la identificación de un germoplasma resistente al estrés abiótico en cultivos de cereales [65] o al desarrollo de un completo sistema de información sobre la especie modelo como *Arabidopsis thaliana* [66] y su estudio fenotípico a gran escala.

Dos aspectos importantes a considerar en los sistemas de fenotipado basados en visión artificial, son el tipo de imagen adquirida y como procesarla.

En este capítulo, se va a tratar acerca de los dispositivos de adquisición de imagen más habituales empleados en sistemas de fenotipado. Lo diferentes métodos de procesamiento aplicados a las imágenes en este tipo de sistemas será tratado en el siguiente capítulo (Cap. 5).

Figura 4.1: Flujo de procesos general en fenotipado de plantas basado en visión artificial. A lo largo de los capítulos 4 y 5

4.2. Adquisición de imágenes

La adquisición de imágenes es un proceso mediante el cual se obtiene una representación digital de una escena. Esta representación se conoce como imagen, y su elemento básico es el píxel –del inglés picture elements–. Los dispositivos electrónicos empleados para capturar la escena son conocidos como sensores de imagen. Las dos tecnologías más extendidas aplicadas a los sensores de imagen son: dispositivos de carga acoplada (Charged Couple Device o CCD) y la de semiconductor complementario de óxido metálico (Complementary Metal Oxyde Semiconductor o CMOS). Un haz de luz de una determinada longitud de onda es capturada por diminutos sensores analógicos, que adquieren mayor o menor carga dependiendo de la cantidad de luz incidente. A continuación, esas señales son amplificadas, filtradas, realzadas mediante hardware específico. Finalmente una óptica adecuada y un formato de imagen específico, completa todo lo necesario para obtener un dispositivo de captura de imágenes.

Los elementos mencionados anteriormente constituyen la principal unidad en los sistemas de visión artificial, la cámara. El retardo en el tiempo de integración (Time Delay Integration o TDI) es un modo de captura de imágenes que puede ser implementado tanto en CCD [67] como en CMOS [68] que mejora considerablemente los sistemas de adquisición de imágenes. TDI se emplea en aplicaciones que exigen la capacidad de operar en condiciones extremas de iluminación requiriendo simultáneamente alta velocidad y alta sensibilidad, como ocurre en supervisión, clasificación y teledetección –en observación atmosférica o de vegetación– [68].

Las tecnologías mencionadas, CCD, CMOS y TDI confieren características únicas que definen el tipo de dato que el dispositivo proporciona. Hay diferencias fundamentales en los tipos de rendimiento que los diferentes sensores ofrecen. En los últimos años la tecnología CMOS ha superado a los CCDs en la mayoría de aplicaciones con imágenes visibles. Los sensores CCD producen menos ruido y generan imágenes de mayor calidad, con una mayor profundidad de color debido al mayor rango dinámico –coeficiente entre saturación de los píxeles y el umbral por debajo del cual no captan señal–. Sin embargo

los sensores CMOS son más rápidos en el procesamiento de imágenes, necesitan menos energía gracias a su arquitectura hardware, permiten procesar una región de interés (ROI) en el propio dispositivo y son más baratos que los CCD. Además gracias a los avances tecnológicos la calidad de imagen de los CMOS está muy cerca actualmente de los CCDs. A estas características se le puede añadir que el empleo de TDI sobre cualquiera de los sensores aumenta las prestaciones en términos de velocidad y umbral de iluminación [69]. Los últimos desarrollos tecnológicos en este sentido, muestran que la tendencia de los fabricantes como IMEC –líder mundial en componentes nanoelétricos– es fusionar en un mismo dispositivo TDI con CCD y CMOS [70] y se espera que en un futuro cercano esta tecnología pueda ser aplicada al fenotipado de alto rendimiento (HTP).

Aunque el campo de la adquisición de imágenes está ampliamente desarrollado en la literatura, en esta revisión se ha realizado una clasificación de los sistemas de adquisición en 7 grupos de dispositivos, por ser los más empleados en el fenotipado de especies vegetales.

4.2.1. Sistemas de visión Mono-RGB

Estos sistemas están formados por un conjunto de lentes, un sensor, un hardware específico y una interfaz de entrada y salida (I/O). Dependiendo de si el sensor está implementado como una línea de píxeles, se pueden clasificar como cámaras lineales –escáneres– o cámaras matriciales. La mayor parte de los dispositivos de fenotipado están basados en sistemas de visión mono o rojo/verde/azul (RGB). Es una tecnología muy popularizada, con una enorme oferta de dispositivos con un amplio rango de prestaciones.

Existen numeroso ejemplos de sistemas de fenotipado basados en mono y RGB. Algunos incluyen Smart tools para la predicción y mejora del rendimiento de los cultivos, un prototipo de fenotipado automático para el estudio de plantas de pimienta en invernadero. El sistema emplea múltiples cámaras RGB para obtener dos tipos de características: aquellas derivadas de la reconstrucción 3D de la cobertura vegetal y características estadísticas derivadas directamente de las imágenes RGB [71]. En una aproximación diferente, se han empleado dos cámaras en el interior de una cámara de cultivo para la

medida de crecimiento en *Petunia*, *Antirrhinum* y *Opuntia* [72]. Un sistema compuesto por dos cámaras con ópticas de distinta focal montadas sobre un soporte que permite un movimiento en los tres ejes, ha sido empleado sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana*. La rotación de las muestras, situada en placas de petri perpendicularmente a la visual de las cámaras, permite determinar la respuesta a la flexión gravitrópica en las raíces y su posterior cuantificación [73]. Recientemente se han desarrollado sistemas HTP-RGB para la identificación de locus de carácter cuantitativo (Quantitative trait locus o QTL) relacionados con el rendimiento de líneas recombinantes de maíz [74], lo que demuestra el enorme impacto de estas aproximaciones en las ciencias fenómicas.

Este tipo de sensores tienen una excelente resolución espacial y temporal. Actualmente se pueden encontrar desde dispositivos con resoluciones de hasta 50 Megapíxeles –alta resolución espacial–, como otros con resoluciones temporales de hasta 1000 imágenes por segundo. Son además, sistemas de bajo coste comparados con otras tecnologías. En general, son portables, lo que los hace idóneos para gran variedad de proyectos, desde sistemas en cámaras de cultivo de reducidas dimensiones a grandes extensiones de cultivo. Finalmente, existe una enorme variedad de software para realizar procesamiento de imagen (Tab. 4.1).

Figura 4.2: Cámara RGB de tipo industrial empleada en visión artificial

Los sistemas basados en mono-RGB permiten la cuantificación de coberturas vegetales [75], así como el cálculo de suficientes índices de vegetación como para cubrir la mayor parte de propósitos en cuanto a medidas cuantitativas de clorofila. La principal desventaja de estos sistemas está causada por el solapamiento de los órganos de la planta durante las fases de crecimiento y nutación, esto junto con la posición relativa de los órganos respecto del

Librerías de visión – link –	Lenguaje
OpenCV	C++, Python, Java, C#
EmguCV	Multilenguaje
PlantCV	Python
Scikit-image	Python
Bioimagerools , bayesimages , edci , DRIP , dpmixsim , raster , ...	R
Cimg	C++
Simplecv	Python
Fastcv	C++
Ccv	C
Vxl	C++
BoofCV	Java
OpenIMAJ	Java
JavaCV	Java

Tabla 4.1: Lista de librerías de visión y procesamiento de imagen

dispositivo, hace especialmente compleja la cuantificación. Además, estos dispositivos se ven afectados por variaciones de iluminación cuando se utilizan en el exterior. La tendencia en estos ambientes es utilizar sistemas mono-RGB en combinación con otros, como los sistemas de detección y alcance de imágenes láser (Laser Imaging Detection and Ranging o LIDAR) tratados más adelante, imágenes térmicas o añadiendo nuevas bandas o filtros que permitan la segmentación de regiones concretas del espectro [76, 77].

4.2.2. Estereovisión

Los sistemas de estereovisión intentan corregir las deficiencias de los mono-RGB en la medición de distancias. La arquitectura de la estereovisión emula el comportamiento del ojo humano empleando dos sistemas de mono visión. Básicamente, después de localizar un punto en dos sistemas monovisión, es posible calcular la distancia del punto al sistema. Las imágenes producidas se denominan mapas de profundidad [78]. Estos sistemas han sido utilizados por Biskup et al [79] para la obtención de características estructurales en coberturas vegetales. La reconstrucción 3D se ha utilizado con éxito para obtener modelos tridimensionales de plantas, demostrando el potencial de esta

aproximación [80, 81]. Una simple cámara RGB montada sobre un robot móvil ha sido empleado como sistema autónomo de fenotipado 3D en cultivos de vid. El sistema captura imágenes de manera secuencial y éstas son utilizadas para reconstruir una nube de puntos tridimensional de toda la hilera de vides [82]. Otros ejemplos de aplicación como la reconstrucción 3D masiva de hojas de colza mediante el empleo de 2 cámaras [83] o el desarrollo de segmentación de malla 3D aplicado al estudio del crecimiento del algodón [84] demuestra el potencial y la utilidad de estos sistemas.

La principal ventaja de estos sistemas es su simplicidad; dos cámaras son suficientes para obtener un mapa de profundidad. La estereovisión, ha evolucionado a la multi estereovisión (Multi stereo vision o MSV), un término general que agrupa una serie de técnicas que usan la estéreo correspondencia con más de dos imágenes. Esta tecnología ha encontrando su lugar de aplicación dentro del fenotipado de plantas [85], ya que comparado con otros sistemas como LIDAR o la tomografía, el coste de adquisición de MSV es significativamente inferior [86]. Los sistemas de estereovisión tienen algunas debilidades: están afectados por cambios en la iluminación de la escena, necesitan sistemas computacionales de alto rendimiento para poder aplicar los algoritmos de estereo correspondencia y son relativamente pobres en resolución [87]. Todas estas limitaciones se ven incrementadas en entornos exteriores donde la segmentación de la imagen tiene una dificultad añadida.

Figura 4.3: Cámara básica de estéreo visión

4.2.3. Sistemas multi e hiperspectrales

Las cámaras multispectrales e hiperspectrales se han empleado en numerosos campos de la ciencia y aplicaciones industriales [88, 89, 90, 91, 92, 93]. La principal diferencia que distingue a las señales multispectrales de la hiperspectrales es la resolución espectral [94]. Las cámaras multispectrales

son dispositivos capaces de capturar imágenes dentro de un número discreto de bandas espectrales.

Con las mejoras tecnológicas, en la última década se ha logrado aumentar el número de bandas. Actualmente, los principales fabricantes ofrecen cámaras multispectrales de entre 3 y 25 bandas incluyendo los canales visibles RGB, infrarrojo cercano (NIR), ultravioleta (UV) o un conjunto personalizable de bandas, y la tendencia es seguir incrementando el número de bandas ofertadas [95]. Como se ha mencionado anteriormente, las bandas espectrales no son continuas en los sistemas multispectrales, de manera que para 1 píxel se obtiene un vector de información con tantos elementos como bandas registradas. Por contra, los sistemas hiperespectrales registran la señal de manera continua en el rango del espectro para el que se han diseñado, pudiendo alcanzar resoluciones espectrales de unos pocos nanómetros de longitud de onda. En este caso, para cada píxel se obtiene una firma digital que puede contener varios cientos de bandas dentro del rango específico [96].

Tradicionalmente ambos sistemas se han empleado en el campo de la tele-detección, y con la llegada y auge de la fenómica el número de aplicaciones se ha visto incrementado. En un ejemplo de aplicación, un sistema multispectral fue empleado para mejorar las imágenes originales para el reconocimiento de frutos [97]. Aquí, los autores del trabajo fusionaron las imágenes en color originales con infrarrojo, utilizando transformadas discretas *wavelet* de Daubechies (Daubechies DWT). De esta manera la información aportada por la imagen infrarroja –cuarta banda– permite mejorar la información aportada por las tres bandas visibles (RGB) que conforman la imagen original.

El uso de cámaras hiperespectrales se ha incrementado enormemente en los experimentos de fenotipado, puesto que permiten identificar respuestas fisiológicas, respuestas a patologías o pesticidas de manera no invasiva. Empleando imágenes hiperespectrales se desarrolló un sistema para identificar patógenos en hojas de cebada (*Hordeum vulgare*) empleando modelos probabilísticos [98]. En esta misma línea, se implementó un sistema hiperespectral en un microscopio para determinar cambios espectrales a nivel celular en la hoja de cebada en las reacciones de resistencia contra el mildium (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, isolate K1) [99]. En la figura 4.5 puede verse una descripción de

Figura 4.4: a) Cuerpo de cámara hiperespectral. b) Reconstrucción de imagen hiperespectral

las diferentes longitudes de onda y las combinaciones empleadas en cámaras multiespectrales e hiperespectrales.

En la tabla 4.2 puede verse un resumen de usos de distintas combinaciones. Se espera que en un futuro cercano aumente el número de sistemas de fenotipado que implementen este tipo de cámaras a medida que se abaraten los costes. Una cuestión crucial será el análisis de los datos, ya que cada nueva banda que se añade, aumenta la exigencia computacional para su tratamiento.

4.2.4. Cámaras ToF

Las cámaras en tiempo de vuelo (Time of Flight o ToF) han sido de los últimos tipos de dispositivos en incorporarse al fenotipado automático de plantas [100]. Este tipo de cámaras tienen como principio general la medida de la distancia entre el objeto y la cámara, de manera que el valor de cada píxel no es un valor de intensidad luminosa como el caso de las cámaras vistas anteriormente, sino un valor de distancia. Esta distancia es calculada midiendo el tiempo que tarda una señal infrarroja (NIR) emitida desde la propia cámara en volver a ésta después de ser reflejada por el objeto. Esto permite una precisa reconstrucción tridimensional del objeto de interés.

La integración de sistemas de estereovisión acoplados a sistemas ToF ha permitido aumentar el rendimiento de la segmentación de imágenes para ob-

Figura 4.5: Esquema de diferentes espectros empleados para fenotipado y las cámaras asociadas. Los nombres de los índices se pueden encontrar en la tabla 4.2

tener estimaciones de áreas foliares [101]. Las cámaras ToF generan mapas de profundidad que junto a las imágenes en color, permiten obtener modelos tridimensionales de las hojas. Si estos sistemas son montados sobre brazos robóticos, la automatización del sistema será completa [102]. Esto supone una enorme ventaja sobre los métodos manuales de análisis, donde el factor humano juega un papel negativo debido a los errores cometidos por imprecisiones de medida, fatiga visual, etc. Estos sistemas se han empleado igualmente con éxito en la reconstrucción de las arquitecturas QTL de los brotes de *Sorghum* mediante su reconstrucción 3D [103].

Las cámaras Kinect de Microsoft son sistemas de adquisición de imágenes de bajo coste diseñadas para los videojuegos y pueden sin embargo, ser utili-

zadas para la caracterización y seguimiento de parámetros fenotípicos [104]. Estas cámaras están compuestas por un proyector de infrarrojos y una cámara que genera una cuadrícula a partir de la cual se puede determinar la ubicación de un objeto cercano en un espacio 3D [105]. Este sistema se ha podido implementar para medir la estructura y tamaño de dos especies típicas de los pastizales californianos [106].

Los dispositivos ToF tienen un enorme potencial en la cuantificación tridimensional de la arquitectura de brotes y hojas, sin embargo, para su correcto desempeño requieren el desarrollo de algoritmos de segmentación específicos [107] y una correcta calibración para la tipología de datos que generan.

Figura 4.6: a) Cámara ToF para desarrollo. b) Esquema de funcionamiento de una cámara ToF

4.2.5. Tecnología LIDAR

La tecnología de detección y alcance de luz (LIDAR) fue desarrollada en los años 70 en el campo de la teledetección para el seguimiento y monitorización de la superficie de la Tierra [108]. LIDAR emplea un haz de láser pulsado para medir la distancia entre la fuente de luz y el objeto, calculando el tiempo desde la emisión del pulso hasta la detección del mismo tras su reflexión. El principio es similar al de los dispositivos ToF, cambiando la tipología de la luz. Esto crea una nube de puntos donde cada punto contiene 3 coordenadas $-x,y,z-$ lo que permite la reconstrucción 3D del objeto [109, 110]. La ventaja de esta tecnología es que permite la adquisición de imágenes en distancias desde miles de kilómetros hasta unos centímetros, demostrando la versatilidad de los dispositivos. Montados sobre satélites son empleados para medir

la cobertura vegetal, altura, área, volumen, biomasa, etc. [111, 112, 113].

Recientemente, los sistemas LIDAR se han utilizado en vuelos tripulados y no tripulados para la estimación de la dinámica de la biomasa de bosques de coníferas en conjunción con imágenes del satélite Landsat [114]. A nivel del suelo, se han aplicado a la detección y discriminación del maíz frente a las malas hierbas [115], también se han empleado LIDAR de corto alcance en sistemas de fenotipado HTP en cultivos de algodón [116] o de tomate a través de reconstrucción 3D [117]. Es posible realizar seguimiento y monitorización de cultivos mediante sistemas de corto alcance –del orden de centímetros– montados sobre soportes robóticos [75]. Además, combinando dispositivos de este tipo con resolución milimétrica junto con técnicas de triangulación, es posible obtener una estimación de medidas de crecimiento e incluso reconstruir estructuras vegetales tridimensionales [118].

Por tanto, como se puede inferir de estos ejemplos, el uso de diferentes dispositivos LIDAR tiene un amplio abanico de posibilidades en el fenotipado de plantas. Hasta hace relativamente poco tiempo, los dispositivos LIDAR aplicados al fenotipado de plantas, han presentado algunos inconvenientes como son la ausencia de imágenes en color, el excesivo tiempo necesario para obtener la nube de puntos, baja precisión en fenotipado masivo, ruido generado por viento, lluvia, insectos o pequeñas partículas del aire y la necesidad de un calibrado.

Los recientes avances sugieren que el uso de la tecnología LIDAR podría resolver algunas de las exigencias que plantean las tecnologías ligadas al fenotipado de nueva generación (New Generation Phenotyping o NGP) [109]. Un novedoso avance ha sido el desarrollo de instrumentos LIDAR multiespectrales capaces de medir distancias a través de diferentes longitudes de onda y obtener nuevos índices de vegetación –ver tabla 4.2 [119, 120]– o medir parámetros arbóreos [121]. La adopción masiva de la tecnología LASER por parte de los fabricantes de vehículos autónomos, ha fomentado el desarrollo de LIDAR 3D de alta definición (High Definition LIDAR o HDL) con capacidades de tiempo real (Real Time o RT). Estos nuevos HDL son capaces de generar 1.3 millones de puntos por segundo con una precisión de 2 cm y distancias de hasta 120 metros [122]. Estos dispositivos abren la puerta a un

tipo de fenotipado en tiempo real tanto para cultivos en invernadero como en exterior.

(a)

(b)

Figura 4.7: a) Sensor LIDAR. b) Nube de puntos capturados por un sensor LIDAR 3D HDL

Tabla 4.2: Lista de índices de vegetación y aplicaciones

Índice	Rango (nm)	Aplicaciones
CAI – Índice de absorción de celulosa	2200-2000	Cuantificación de ambientes mixtos tierra-planta [123], Estimación de biomasa no fotosintética [124]
LCA – Índice de absorción lignina-celulosa	2365-2145	Efecto de restos de cultivos sobre la composición y mineralogía del suelo [125]
NTDI – Índice de cultivo por diferencia normalizada	2359-1150	Utilizado para identificar cobertura de residuos vegetales en cultivos convencionales. [126]
LWVI-1 – Diferencia agua/hoja VI 2	1094-893	Identificación de variedades de caña de azúcar [127]
DLAI – Diferencia de índice de superficie foliar	1725-970	Se emplea para estimar el área foliar basado en mediciones en el visible e infrarrojo cercano [128]
PWI – Índice de agua en plantas	970-902	Estimación del contenido de agua y estudio de las características del espectro de la cobertura vegetal y estado de crecimiento [129][130]
NLI – Índice de vegetación no lineal	1400-780	Medición del contenido de agua en las hojas de la planta. En combinación con otros índices puede detectar la interacción de bioquímicos como proteína, nitrógeno, lignina, celulosa, azúcar y almidón [131]

continúa en la página siguiente

Tabla 4.2: Lista de índices de vegetación y aplicaciones (cont.)

Índice	Rango (nm)	Aplicaciones
DWSI – Índice de enfermedad por estrés hídrico	1657-547	Predecir la presencia de mosquitos larvales en los humedales [132] y detectar la enfermedad de la roya [133]
NDVI – Índice de vegetación de diferencia normalizada	800-670	Medición de variaciones significativas en la actividad fotosintética y en la duración de la estación de crecimiento en diferentes latitudes [134]
MCARI – Índice de absorción de la clorofila modificada	700-670	Estudio de parámetros biofísicos de la vegetación así como factores externos que afectan a la reflectancia de la cobertura [135]
GI – Índice de verdor	670-550	caracterización de estado del nitrógeno en maíz [136]
CARI – Ratio de absorción de la clorofila	700-500	Estimación de la concentración de pigmentos fotosintéticos en la vegetación [137]
GNDVI – Índice de vegetación de diferencia normalizada en el verde	800-550	Proporciona información importante para la toma de decisiones en explotaciones agrícolas [138] y para la identificación del contenido de clorofila y de nitrógeno en tejidos [139]
OSAVI – Índice de vegetación optimizado ajustado al suelo	800-670	Medición con alta sensibilidad a las variaciones de contenido de clorofila y muy resistente a las variaciones del índice de superficie foliar y ángulo cenital solar. [140]

continúa en la página siguiente

Tabla 4.2: Lista de índices de vegetación y aplicaciones (cont.)

Índice	Rango (nm)	Aplicaciones
CI r – Índice de coloración del rojo	780-710	Cartografía de los ecosistemas de dunas costeras y marismas salinas [141]
CI g – Índice de coloración del verde	780-550	Caracterización del estado de degradación del suelo por erosión [142]

4.2.6. Termografía e imágenes de fluorescencia

La termografía es una tecnología que está ampliamente utilizada en tele-detección y en fenotipado de plantas [143, 144, 145, 59]. Estas cámaras son capaces de adquirir imágenes en longitudes de onda en el rango de los 3000 nm a los 14000 nm [146] realizando una conversión de la energía irradiada por los objetos en valores de temperatura una vez calibrado respecto a la temperatura ambiental.

Las plantas abren sus estomas en respuesta a señales ambientales y al reloj circadiano dependiendo del tipo de metabolismo fotosintético que tengan [147, 9]. Esta apertura/cierre estomático provoca cambios de los niveles de evapotranspiración que puede ser medida mediante termografía [148] y cuantificada a diferentes escalas: a nivel de hoja, individuo completo, cultivo e incluso una región completa. El estrés hídrico y el manejo de la irrigación son dos campos de interés agrícola donde la termografía puede ser aplicada [149, 150, 59, 151]. Por otro lado, mediante esta técnica se pueden detectar cambios locales de temperatura, debidos a infecciones por parte de patógenos o debido a mecanismos de defensa [152]. Oerke et al. [153] obtuvieron una correlación entre la máxima diferencia de temperatura (Maximum Temperature Difference o MTD) de hojas de manzana con los distintos estadios de desarrollo de la sarna del manzano (*Venturia inaequalis*) empleando para ello termografía digital infrarroja.

La imagen de fluorescencia se ha utilizado en numerosos experimentos, su principio de basa que en la luz ultravioleta (UV) en el rango de los 340-360 nm es reflejada por diferentes partes/compuestos de la planta como longitudes de onda discreta [19]. Los primeros experimentos con fluorescencia reflejada permitieron identificar mutantes de la síntesis de fenilpropanoide en *Arabidopsis* [154]. Los ácidos cinámicos emiten en el rango del verde-azulado – 440-520nm–, mientras que la fluorescencia de la clorofila emite en el rojo y rojo lejano – 690-740 nm–. Éste es un parámetro importante ya que puede ser utilizado como indicador de diferentes procesos biológicos como el reloj circadiano o la salud vegetal [60, 155, 156]. Mediante un sistema de fluorescencia UV y una cámara convencional, con filtro pasa-banda UV que elimina cualquier otra longitud de onda, se ha podido identificar cambios en la ab-

sorbancia relacionados con la polinización [157]. La fluorescencia multicolor combina las emisiones de la clorofila y algún metabolito secundario para determinar la salud de la planta a través de tejidos foliares [158].

La termografía es una herramienta inestimable para la monitorización de genotipos –fenotipado– y detección de enfermedades en plantas [159] donde todos los especímenes estén bajo estrictas condiciones control. La temperatura ambiental, el viento, la radiación solar, ángulo de las hojas o el follaje son algunos de los factores que pueden afectar a la calidad de las imágenes. Las nuevas generaciones de cámaras termográficas tratan de solventar los problemas ocasionados por variaciones temporales en las condiciones ambientales, o aspectos relativos al ángulo de visión, distancia, sensibilidad y reproducibilidad de las medidas [151].

Tanto las imágenes termográficas como las de fluorescencia captan imágenes de un sólo componente –canal– por lo que son en principio sencillas de procesar. Una simple segmentación basada en umbrales –thresholding segmentation– puede ser suficiente. La combinación de imágenes térmicas y de fluorescencia requieren, sin embargo, métodos de análisis más sofisticados, como los basados en redes neuronales, aunque esto es una solución actualmente emergente [158].

4.2.7. Imágenes de tomografía

La resonancia magnética (Magnetic Resonance Imaging o MRI) es una técnica de imagen, que como la mayoría de técnicas de imagen es no invasiva, y hace uso de la radio frecuencia (Radio Frequency o RF) emitida por los campos magnéticos para reconstruir imágenes tomográficas [160]. Tradicionalmente, la MRI se ha aplicado en la investigación de estructuras anatómicas del cuerpo –especialmente el cerebro– tanto sanas como enfermas [161]. En plantas, puede ser utilizadas para visualizar estructuras internas y metabolitos. Este método tiene un gran potencial para el seguimiento de procesos biológicos *in vivo* [162]. La MRI ha permitido cartografiar el desarrollo de los sistemas radiculares a lo largo del tiempo en plantas de judía [163], visualizar la distribución de la humedad durante el desarrollo del arroz [164] y analizar la presencia de agua durante el proceso de maduración de los granos de

Figura 4.8: a) Cámara térmica. b) Cámara de fluorescencia c) Imagen de fluorescencia de la clorofila dentro de los cloroplastos (Licencia CC. Autor Dietzel65)

cebada [165].

La tomografía por emisión de positrones (Positronic Emission Tomography o PET) es una modalidad de MRI empleada en medicina nuclear que permite diagnosticar y determinar en estadio de las enfermedades para su tratamiento [166]. Karve et al. [167] presentaron un estudio sobre la fijación del carbono del CO_2 a través de la fotosíntesis en grandes extensiones de sorgo –*Sorghum bicolor*–. El estudio concluyó que los escáneres PET comerciales podrían ser empleados de manera fiable no solo para la medida de la fijación de carbono en plantas sino también para estudiar la dinámica de procesos de fotoasimilación. La tomografía computerizada de rayos-X (Computer tomography-rX o CT-rX) hace uso de los rayos-X para producir imágenes tomográficas de áreas específicas del objeto escaneado. El proceso de atenuación de los rayos-X junto con una rotación y un movimiento axial del objeto permite reconstruir imágenes tridimensionales [19]. Se ha estimado que un sistema de fenotipado de

alto rendimiento basado en CT-rX es 10 veces más eficiente que los operadores humanos, siendo capaz de detectar 1 sólo individuo mutante entre cientos de plantas en cultivo de arroz [168]. La remarcable capacidad de penetración de los rayos-X hace que esta tecnología sea una gran aliada para el fenotipado bajo tierra. Los estudios de los sistemas radiculares y su cuantificación ha sido un campo habitual de aplicación de la CT-rX [169, 170, 171, 172, 173].

Los nuevos desarrollos se dirigen hacia la reducción de la penetrabilidad y el aumento de la resolución de imagen de la CT-rX en el tejido de la planta utilizando el fosfotungstato como agente de contraste, debido a su capacidad de aumentar el contraste y la penetrabilidad de las muestras de espesor considerable [174].

Figura 4.9: Imagen de termografía computerizada (CT) mostrando un sistema radicular (cortesía de Pacific Northwest National Laboratory.)

MRI, PET y CT son técnicas disponibles para la detección de objetos en 3D. La MRI y la PET son dos tecnologías de exploración no destructivas y no invasivas que se han aplicado en estudios vegetales para adquirir información estructural en 3D [175]. La adquisición de datos de RMI y PET requiere mucho tiempo, y es necesario continuar con el desarrollo de herramientas informáticas que permitan analizar los datos y obtener resultados fisiológicamente interpretables [146]. La CT-rX de alta resolución (High Resolution X Computer Tomography o HRXCT) promete ser la tomografía no invasiva más ampliamente utilizada en el estudio de sistemas biológicos vegetales. HRXCT proporcionará datos 3D a una resolución suficiente para el análisis detallado los rasgos morfológicos *in vivo* y a resolución celular para muestras *ex vivo* [175]. La tendencia en cuanto al desarrollo de los dispositivos será el

aumento de la resolución de las imágenes, el aumento de los campos de visión y la portabilidad de los dispositivos [176].

Capítulo 5

Análisis de imágenes

5.1. Introducción

Uno de los métodos clásicos de extracción de información de la imagen es mediante un proceso de segmentación. El objetivo de la segmentación es extraer los componentes de la imagen que son de interés, es decir, localizar y distinguir los objetos o regiones relevantes de la imagen respecto del fondo de la misma o de otros objetos irrelevantes. De esta forma se obtendrá una imagen particionada en regiones con un significado o categoría. Estas regiones significativas pueden ser definidas simplemente de manera binaria como primer plano y fondo (Fig. 5.1 a), o bien mediante la selección de un número individual de componentes correspondientes a diferentes objetos o categorías (Fig. 5.1 b).

(a) Segmentación binaria

(b) Segmentación por categorías

Figura 5.1: Ejemplos de tipos de segmentación

La creación de las regiones seleccionadas de interés se realiza en base a características de la imagen tales como color – espacios color –, radiación espectral – índices de vegetación –, detección de bordes, similitud con los vecinos [177], o combinaciones de ellas que son integradas a través de procedimientos de aprendizaje automatizado (Machine Learning o ML) [122]. En ocasiones, es necesario el preprocesado de la imagen con el fin de obtener una segmentación significativa.

5.2. Preprocesado de imagen

El preprocesado de imágenes es un aspecto muy importante en el análisis de imágenes. El objetivo es mejorar el contraste y eliminar ruido con el fin de realzar los objetos de interés de una imagen dada [178]. Este proceso puede ser extremadamente útil para mejorar la calidad de las características a extraer y el análisis posterior de la imagen. El preprocesado puede incluir operaciones tan simples como recorte de imagen o mejora del contraste, hasta otras significativamente más complejas, tales como reducción de la dimensionalidad vía análisis de componentes principales (Principal Component Analysis o PCA) o técnicas de clasificación mediante agrupamientos –*clustering*– [179].

Se han propuesto [180] protocolos de preprocesado aplicado al fenotipado

de plantas con los siguientes procedimientos: conversión de la imagen a escala de grises, aplicar un filtro de mediana, binarizar la imagen y detección de bordes. Se ha desarrollado un método similar para identificar plantas bajo condiciones de iluminación variables [181], que comprende la conversión a escala de grises, binarización, suavizado de la imagen y aplicación de un filtro de detección de bordes. En un estudio comparativo para analizar enfermedades en hojas, se ha visto que la ecualización del histograma de la imagen ha sido el método que mejores resultados ha dado en imágenes de color convertidas a escala de grises [182]. A pesar de esto, se ha comprobado que para la identificación de patógenos en hojas da mejores resultados trabajar con imágenes RGB que en escala de grises [183].

No se puede afirmar de forma concluyente que un método de preprocesado sea mejor que cualquier otro. La calidad y tipo de imagen son fundamentales en la selección del método más adecuado. Sin embargo, lo que si se puede asegurar es que es un paso básico que puede, no sólo mejorar el posterior análisis de la misma, sino también hacerlo posible en algunas ocasiones.

En esta revisión del estado del arte sobre los métodos de procesamiento y análisis se ha observado una carencia generalizada de la descripción de estos pasos, algo que no debería ocurrir en orden al cumplimiento de los nuevos estándares de documentos científicos de: disponibilidad, accesibilidad, interoperatividad y reutilización (Findable, Accessible, Interoperable, Re-usable o FAIR) [184].

5.3. Segmentación de imagen

Como se ha mencionado anteriormente, la segmentación es el núcleo central del procesamiento de imagen en el fenotipado de plantas basado en visión artificial. La segmentación permite el aislamiento e identificación de objetos de interés de la imagen y su papel principal es lograr distinguir estos objetos del fondo de la imagen o de otros objetos irrelevantes para el estudio [185]. Los objetos de interés se definen mediante similitudes internas de los píxeles, basadas en parámetros tales como textura, color o estadísticos [186] entre otros.

Uno de los algoritmos más simples de visión es la segmentación por umbralización. Se basa en la creación de grupos de píxeles en escala de grises en función de su nivel de intensidad inicial, separando así el fondo de la imagen de los objetos de interés. Esta metodología ha sido utilizada por una aplicación móvil –ApLeaf– con el objetivo de identificar plantas a partir de sus hojas [187].

El método de *Otsu* [188] es un algoritmo de segmentación que busca el umbral que minimice la varianza ponderada dentro de cada clase [178]. Este conocido método en el campo de la visión artificial, se ha aplicado para eliminar el fondo de las imágenes en un sistema que registra y realiza reconocimiento automático de plantas [189], pudiendo ofrecer imágenes de alto contraste de forma automática [190]. Este sistema tiene como debilidad que puede subestimar la señal de entrada provocando subsegmentación. Por otro lado es un algoritmo más lento que otros algoritmos de umbralización [178].

La transformación de *Watershed* [191] es un algoritmo muy popular en segmentación. Trata a la imagen como una superficie topográfica inundada donde se incluyen una serie de regiones semilla –regiones de interés– generalmente añadidas por el usuario. Esto genera una imagen de gradientes donde las crestas representan zonas en las que los bordes son muy aparentes –bordes fuertes–, haciendo que la segmentación se detenga en esos bordes [177]. Se ha utilizado en identificación de ratios de crecimiento [192], reconocimiento de hojas parcialmente ocultas [88], delimitado de copas de árboles [193] y segmentación de hojas [194].

Grabcut [195] es un algoritmo de segmentación basado en *graph cut* [196]. Se basa en la teoría de grafos para abordar el problema de la separación de un objeto del fondo. El usuario debe marcar un área rectangular –cuadro delimitador– alrededor del objeto de interés, definiendo así el límite exterior del rectángulo como fondo [197]. Este algoritmo se ha probado en la extracción de árboles de una figura, obteniendo sólo éxito cuando los fondos eran muy simples [198]. Más recientemente, *Grabcut* se ha implementado en un protocolo para reconocimiento de plantas con información multivariante –contorno de hojas, contorno de flores, etc.– [199]. *Grabcut* pierde precisión e incluso llega a fallar con fondos complejos, aunque en fondos sencillo tiene

una alta precisión [198, 189].

El algoritmo *Snakes* es un tipo especial dentro del grupo de algoritmos de contorno activo [200]. Es un método de ajuste de líneas –*Splines*– para abrir o cerrar bordes dentro de una imagen. Estos métodos se han utilizado en reconocimiento facial, segmentación del iris del ojo y análisis de imágenes médicas. Dentro del campo del fenotipado de plantas, existen procedimientos en los que los contornos activos se han empleado dentro de un protocolo donde partiendo de un vector de características compuesto por datos de intensidad de color y textura, y un conocimiento previo de la planta incorporado mediante un modelo mixto Gausiano que han servido para proporcionar una segmentación inicial. Sobre esta segmentación inicial se han aplicado los contornos activos obteniendo mucha mayor precisión [201].

Los contornos activos se han aplicado en reconocimiento de plantas a través de las flores [202], mediante un procedimiento basado en una combinación del algoritmo propuesto por Yonggang y Karl [203] y el modelo de contornos activos sin bordes [204]. Si bien el trabajo propuesto por Minervini et al. [201] parece dar resultados significativamente mejores comparado con los resultados de Suta et al. [202], el empleo de imágenes con fondos naturales podría relacionarse con las diferencias de resultados obtenidos. Por tanto, un problema a la hora de comparar algoritmos y procedimientos radica en diferencias en el fondo de la escena.

5.4. Extracción de características

La extracción de características constituye, junto con la segmentación, uno de los pilares básicos, en la identificación y clasificación de objetos basada en visión artificial. Una característica de una imagen, es información que puede ser utilizada para resolver un problema específico de visión. Las características extraídas de una imagen se disponen en lo que se conoce como *vector de características*. La construcción de un vector de características hace uso de una amplia variedad de métodos para identificar los objetos de una imagen. Las principales características son: bordes, valores de intensidad de píxeles [71], geometrías [205], texturas [201, 206], transformaciones de la imagen como la

transformada de Fourier [207], o la de Wavelet [97, 208] o combinaciones de píxeles de diferentes espacios de color [122]. El objetivo final de la extracción de características es alimentar a un conjunto de clasificadores y/o algoritmos de aprendizaje automatizado (ML) (Sec. 5.5).

Iyer-Pascuzzi et al. presentaron una plataforma de fenotipado automático basada en análisis de imagen con el objetivo de identificar los genes responsables de la arquitectura del sistema radicular. Los autores emplearon un conjunto de 16 características estadísticas, geométricas, y de forma obtenidas de 2297 imágenes de 118 individuos, tales como mediana, y máximo número de raíces, longitud total de la raíz, perímetro, profundidad, entre otras [209].

Existen además, una variedad de algoritmos para generar detectores y descriptores de características invariantes. Este tipo de algoritmos aseguran la detección de puntos de interés de forma estable sin afectarse por cambios de escala o rotación. Esto es crucial cuando es necesaria una calibración de la cámara en aplicaciones de concordancia (*matching*), como ocurre en las reconstrucciones 3D, donde se requiere la generación de un conjunto de puntos concordantes entre imágenes que sirven como puntos de referencia para dicha reconstrucción. Además, estos detectores y descriptores invariantes permiten la identificación de puntos de interés incluso cuando hay cambios de escalas, traslaciones o iluminación no controlada, un problema común en el fenotipado de plantas.

Algunos de los más conocidos algoritmos de este tipo son: *The Scale Invariant Features* (SIFT) [210], *Speeded-Up Robust Features* (SURF) [211], y *the Histogram of Oriented Gradients* (HoG) [212]. Estos algoritmos usados tradicionalmente para extraer características en visión artificial se han extendido al campo del fenotipado de plantas. Wei et al. [213] presentaron un método que detectaba automáticamente la floración en arrozales. El método utiliza como descriptor escala-invariante, un conjunto de “palabras visuales” [214, 215].

SIFT se ha utilizado en combinación con estereo-imágenes e imágenes de ToF en un procedimiento de fenotipado automático. Este sistema crea una nube de puntos de profundidad que permite identificar las hojas de pimienta en invernadero [101].

SIFT y SURF han sido, además, testados en la detección de características

locales invariantes con el fin de obtener un modelo 3D de la planta a partir de múltiples estereo-imágenes [216].

Un entorno de trabajo basado en HoG ha permitido obtener una cantidad considerable de datos fenotípicos de vides, utilizando vectores de características compuestos por información de color [217].

Hasta el momento, la extracción de características ha sido una tarea ardua y compleja, que requiere testar un gran número de algoritmos a tal efecto y un número aún mayor de combinaciones entre ellos. Esta tarea requiere por su parte la participación de expertos en diferentes áreas. Finalmente, el éxito en la identificación de los objetos no va a depender tanto de la robustez del clasificador, como de la robustez de los datos.

5.5. Aprendizaje automatizado

La cantidad de datos generados en las configuraciones de las actuales plataformas fenotípicas y previsiblemente el aumento de estos datos que se generarán en plataformas que están por llegar, ha provocado la necesidad de tener que recurrir al uso de aproximaciones estadísticas basadas en aprendizaje automatizado (Machine Learning o ML). ML se viene aplicando en las últimas décadas a multitud de campos de la investigación [218, 219, 220]. Puesto que el fenotipado de plantas basado en visión puede generar terabytes de información, las herramientas de ML pueden proporcionar un buen marco de trabajo para el análisis de datos. En la tabla 5.1 se puede encontrar una colección de librerías y paquetes de ML para diferentes lenguajes. Una de las ventajas de ML es la posibilidad de explotar grandes conjuntos de datos para identificar patrones utilizando combinaciones de factores en lugar de tener que realizar análisis de forma independiente [179].

Un modelo predictivo de regresión se ha empleado con éxito para fenotipar hojas de *Arabidopsis sp.* basado en características geométricas como conjunto de entrenamiento [205]. El uso específico de una determinada longitud de onda juega un papel clave en el tipo de dato obtenido. En este sentido, las cámaras hiperespectrales pueden llegar a ser una herramienta muy útil. Sin embargo, la cantidad de información aportada por estas cámaras puede enorme, haciendo

Librerías ML/DL – link –	Lenguaje
MICE, rpart, Party, CARET, randomForest, nnet, e1071, KernLab, igrph, glmnet, ROCR, tree, Rweka, earth, klaR, Keras, Estimators	R
Scikit-learn Tensorflow Scikit-image Theano Pylearn2 NuPIC Caffe PyBrain	Python
Weka Spark Mallet JSAT ELKI Java-ML	Java
Accord Multiboost Shogun LibSVM mlpack Shark MLC++	C#, C++, C

Tabla 5.1: Lista de librerías de ML

necesario el uso de ML. La conjunción de imágenes hiperespectrales junto con imágenes térmicas y ML permite la detección de estrés en hojas causado por el hongo *Alternaria sp.* en *Brassica sp.*. La mejor clasificación se obtiene calculando la derivada segunda sobre las imágenes hiperespectrales junto con una red neuronal de propagación inversa [221], permitiendo de esta manera la identificación de las zonas de la hoja infectadas por el hongo.

Un concepto actual derivado de ML es el llamado aprendizaje profundo (Deep Learning o DL), este paradigma de aprendizaje comprende una serie de algoritmos dirigidos a modelar con un alto nivel de abstracción. Esto permite el desarrollo de conceptos complejos a partir de otros más simples, acercándonos así al concepto de inteligencia artificial (Artificial Intelligence o AI) [222]. Las redes neuronales convolucionales (Convolutional Neural Networks o CNN) son un ejemplo de aplicación de DL derivado de las redes neuronales artificiales (Artificial Neural Networks o ANN). Este tipo de redes multicapa esta compuesto por un conjunto de neuronas que trabajan de manera convolucional –las neuronas simples de un perceptrón son sustituidas por procesadores en matriz que realizan operaciones 2D– reduciendo el proceso de muestreo, terminando con una capa de neuronas perceptrón para la clasificación final [223].

Recientemente se ha implementado una CNN para la clasificación e identificación de diferentes partes de plantas [224], obteniendo simultáneamente la clasificación y localización, mejorando significativamente los métodos actuales. También se ha implementado una CNN para la detección de ataques de patógenos [225], y a pesar de que el periodo de entrenamiento fue computacionalmente muy exigente, requiriendo varias horas de *clusters* de CPUs, la fase de clasificación fue, sin embargo, realizada en menos de 1 segundo [225].

Aunque los tiempos de entrenamiento son aún elevados, DL es un paso adelante en ML y tiene un enorme potencial ya que permite el manejo y análisis de datos producidos en experimentos fenómicos. Sin embargo, este tipo de algoritmos requieren alimentarse con gran cantidad de datos de entrenamiento, para obtener unos resultados aceptables.

Hablando en términos generales respecto a ML y DL, las pruebas directas son la mejor manera para determinar qué algoritmo es superior a otro, sin

embargo hay varios ejemplos que pueden servir como guía para una aproximación inicial [179, 226, 227]. Como regla general, los métodos discriminativos como la máquina de soporte de vectores (Support Vector Machine o SVM), redes neuronales artificiales (ANN) y los k-vecinos más próximos (k Nearest Neighbor o kNN) dan los mejores resultados en grandes conjuntos de datos etiquetados –clasificación supervisada– [179]. Los métodos generativos como Naive Bayes (NBC), los modelos mixtos gaussianos (Gaussian Mixture Models o GMM) y los modelos ocultos de Markov (Hidden Markov Models o HMM) dan mejores resultados para conjuntos de datos más reducidos tanto etiquetados como no etiquetados –clasificación no supervisada–. El uso de otros algoritmos de clasificación no supervisada como k-means, puede ayudar a identificar características inesperadas en los datos. Como se ha mencionado anteriormente, el preprocesado de los datos desempeña un papel fundamental, de forma que su ausencia puede comprometer la calidad de los resultados obtenidos.

En la tabla 5.2 se ha incluido un resumen de los procesos implicados en fenotipado de plantas basado en visión artificial, incluyendo sensores, preprocesado, segmentación, extracción de características y algoritmos de ML empleados.

Tabla 5.2: Lista de procedimientos de análisis de imagen en fenotipado de plantas según el tipo de sensor

Dispositivo	Preprocesado	Segmentación	Extracción Características	Algoritmo ML
Mono-RGB	<ul style="list-style-type: none">• Filtrado homomórfico para minimizar problemas de iluminación en exteriores [228]• Filtrado y ecualizado de histograma en detección de enfermedades de plantas [182]	<ul style="list-style-type: none">• Diversos índices de vegetación aplicados a segmentación [178]• Índice NDVI para segmentación binaria [228]• Detección de bordes mediante redes neuronales [229]• Algoritmo HSV [230]	<ul style="list-style-type: none">• Descriptores Fourier, momentos Zernike [229]• Transformadas <i>Wavelet</i>, parámetros estadísticos y características geométricas [122]• Reconstrucción de imágenes 3D con SIFT y SURF a partir de múltiples imágenes RGB [216]• Histograma de color, Transformada <i>Fast Fourier</i> y <i>Wavelet</i> [192]	<ul style="list-style-type: none">• ANN para detección de enfermedades en plántones [231]• SVM para detección de hojas infectadas por virus [232]• Modelo mixto Gausiano para detectar estrés biótico [233]• kNN para identificar hojas enfermas [234]• ANN probabilísticas y algoritmos genéticos [229]• <i>Random Forest</i> para analizar QTL [235]

continúa en la página siguiente

Tabla 5.2: Lista de procedimientos de análisis de imagen en fenotipado de plantas según el tipo de sensor (cont.)

Dispositivo	Preprocesado	Segmentación	Extracción Características	Algoritmo ML
Estereovisión	<ul style="list-style-type: none">• Procedimiento general de preprocesado [236]• Rectificación de imagen basada en SIFT y transformación epipolar [81]• Estereo-calibración en cuantificación de hoja [74]• Simple conversión de RGB a escala de grises [237]• Alineado y estimación de profundidad [81, 238]	<ul style="list-style-type: none">• Método Otsu y regiones de crecimiento [237]• SVM para eliminar fondo [238]	<ul style="list-style-type: none">• Graph-cut y correlación local [239]• SURF para estereo coincidencia [237]• Estereo-imágenes + térmicas + PCA para características locales y globales [238]• Valores de intensidad y estadísticos básicos [240]	<ul style="list-style-type: none">• SVM para identificar enfermedades en hojas [238]• Clasificador para detectar déficit de humedad en suelo [240]

continúa en la página siguiente

Tabla 5.2: Lista de procedimientos de análisis de imagen en fenotipado de plantas según el tipo de sensor (cont.)

Dispositivo	Preprocesado	Segmentación	Extracción Características	Algoritmo ML
Multi-perispectral	<ul style="list-style-type: none">• Filtro Savitzky-Golay: elimina ruido, suaviza image [98, 241]• Filtro Gaussiano: elimina ruido [98]	<ul style="list-style-type: none">• NDVI 705/750+705)nm [242]	<ul style="list-style-type: none">• Valor medio de píxel para obtener reflectancia media [242]	<ul style="list-style-type: none">• Cascada de técnicas de minería de datos para detectar enfermedades en hojas [243]• Bayes, regresión logística, <i>random Forest</i> y árboles de decisión en detección de estrés biótico [221]• kNN para detección de enfermedades en hojas [234]• PCA y regresión por mínimos cuadrados para predecir concentraciones de agua, micro y macro nutrientes [242]

continúa en la página siguiente

Tabla 5.2: Lista de procedimientos de análisis de imagen en fenotipado de plantas según el tipo de sensor (cont.)

Dispositivo	Preprocesado	Segmentación	Extracción Características	Algoritmo ML
ToF	<ul style="list-style-type: none">• Corrección del error de diatancia causado por la luz solar [100]• Calibración previa a la fusión de profundidad e información de color [101, 102]• Eliminación de puntos artificiales con filtro estadístico [106]• Eliminación de distorsión de las lentes [244]	<ul style="list-style-type: none">• Combinación de segmentación jerárquica de color y ajuste cuadrático [102]• Algoritmo de regiones más estables para segmentación de objetos sobre fondo [107]• Eliminación del fondo por simple umbralización [244]	<ul style="list-style-type: none">• SIFT, transformada de Hough y algoritmos RANSAC para la extracción de características relevantes [244]	

continúa en la página siguiente

Tabla 5.2: Lista de procedimientos de análisis de imagen en fenotipado de plantas según el tipo de sensor (cont.)

Dispositivo	Preprocesado	Segmentación	Extracción Características	Algoritmo ML
LIDAR	<ul style="list-style-type: none">• RANSAC para detectar fondos planos [245]• Reducción de ruido filtrando nubes de puntos basados en desviación [246]	<ul style="list-style-type: none">• Clasificación por agrupamiento para detectar plantas individuales [245]	<ul style="list-style-type: none">• Características estadísticas de reflectancia y geometría [245]• Histograma de superficie en detección de órganos de plantas [247]	<ul style="list-style-type: none">• ANN para medida del índice de superficie vegetal (GAI) [248]• ANN, SVM, regresión logística para identificación de plantas [245]• Modelos lineales generalizados en modelos de riqueza vegetal [249]• SVM como clasificador de alta fiabilidad [247]

continúa en la página siguiente

Tabla 5.2: Lista de procedimientos de análisis de imagen en fenotipado de plantas según el tipo de sensor (cont.)

Dispositivo	Preprocesado	Segmentación	Extracción Características	Algoritmo ML
Termografía/ Flourescencia	<ul style="list-style-type: none"> • Alineado con estereo imágenes – en combinación con éstas – [240, 238] • Normalización mediante índices térmicos [250] • Recorte de imágenes anómalas de conjuntos de imágenes [251] 	<ul style="list-style-type: none"> • Segmentación automática algoritmo ChopIt [251] • Umbralización comparando imágenes color con imágenes de fluorescencia (Fv/Fm) [252] 	<ul style="list-style-type: none"> • Combinado con imágenes térmicas, obtención de características locales y globales mediante uso de PCA y análisis de covarianza [238] 	<ul style="list-style-type: none"> • SVM para identificar enfermedad en hojas [238] • SVM y clasificador Gaussianiano para detectar déficit de humedad [240] • Análisis de la varianza – no ML propiamente – para analizar diferentes estados hídricos [250] • ANN y SVM para detectar deficiencias de zinc mediante flourescencia [253]

continúa en la página siguiente

Tabla 5.2: Lista de procedimientos de análisis de imagen en fenotipado de plantas según el tipo de sensor (cont.)

Dispositivo	Preprocesado	Segmentación	Extracción Características	Algoritmo ML
MRI/ Tomografía	<ul style="list-style-type: none">• Transformadas de Fourier 2D y 3D [254]• Filtro de mediana, binarización, relleno de huecos, eliminación de pequeñas áreas, filtro morfológico de erosión [168]• Recorte y realzado de contraste [255]	<ul style="list-style-type: none">• Umbralización por histograma para binarizar la imagen [255]	<ul style="list-style-type: none">• Características de intensidad, características de textura de Haralik, patrones binarios locales, características de textura intensidad de Gabor [255]	<ul style="list-style-type: none">• Aprendizaje supervisado con ANN, distancias de Mahalanobis, análisis discriminante lineal y cuadrático para detectar fronteras [255]

Capítulo 6

Antecedentes

6.1. Introducción

En el capítulo 3 sección 3.3, se ha mencionado cómo la rotación de la Tierra impone cambios rítmicos en ciertos parámetros como la luz y la temperatura, que a su vez, afectan profundamente a la expresión génica de determinados componentes del reloj circadiano. Este reloj es fundamental para que procesos celulares y del desarrollo, se sucedan de una manera rítmica. Movimientos de hojas, emisión de volátiles, crecimiento, fotosíntesis o niveles de almidón son sólo algunos de los muchos procesos así regulados.

Se han realizado esfuerzos sustanciales para dilucidar las funciones e interacciones entre los genes que componen el reloj. Y se han logrado importantes avances, empleando sistemas de visión que registran la actividad promotora en los genes a través de la actividad Luciferasa, una enzima oxidativa que transforma la luciferina en oxiluciferina con consumo de ATP y emisión de luz [256].

Los sistemas de visión para medir el crecimiento vegetal son interesantes, pues ofrecen flexibilidad a la hora de diseñar diferentes configuraciones de adquisición de imágenes de los especímenes objeto de estudio [72]. El crecimiento vegetal sigue un patrón rítmico, influenciado supuestamente por el metabolismo fotosintético [257]. Monocotiledóneas y dicotiledóneas muestran diferencias en la manera en que luz y temperatura continuas afectan al crecimiento de las hojas [258].

Aunque es relativamente conocido el mecanismo de crecimiento de hojas y tallos, no es tan conocida la cinética de ese crecimiento. Por otro lado, el conocimiento sobre el desarrollo de otros órganos como las flores es prácticamente nulo [72].

Por este motivo, desde el año 2011 el grupo de investigación del Departamento de Genética perteneciente al Instituto de Biología Vegetal (IBV) de la UPCT, en colaboración con el grupo de Visión Artificial de la División de Sistemas e Ingeniería Electrónica de la misma universidad, decidieron desarrollar un sistema de fenotipado basado en visión artificial para el estudio del crecimiento en plantas mutantes del reloj circadiano.

Fruto de esa colaboración, en el año 2012 vio la luz [72] un sistema de fenotipado –primera generación–, en un intento de abordar el reto de mejorar el conocimiento acerca de cómo la alteración de ciertos genes del reloj, podría afectar al crecimiento de distintos órganos de las plantas. Todo ello en un contexto temporal, donde los sistemas de visión aplicados al fenotipado de plantas era una disciplina emergente (Fig. 6.1).

Figura 6.1: Número de publicaciones en la Web Of Science (WOS) por año, relacionadas con los términos *plant phenotyping & image analysis* y *plant phenotyping & computer vision*

6.2. Sistema de fenotipado. Primera generación

6.2.1. Sistema de captura de imagen

El dispositivo de captura está compuesto por dos cámaras CCD de bajo coste –SONY XC-75CE– montadas una sobre otra en planos paralelos con las ópticas centradas en un eje vertical (Fig. 6.2). Una de ellas está configurada para capturar imágenes diurnas y la segunda para para el periodo nocturno. La resolución de ambas cámaras es de 768 x 576 píxeles en escala de grises –8 bits–.

La interfaz entre la cámara y el dispositivo de grabación se ha implementado vía capturador de imágenes –Matrox Meteor II–. Ambas cámaras se han equipado con la misma óptica –lentes c-mount con distancia focal de 12 mm a f1.4– para evitar disparidad de imágenes entre el día y la noche. La cámara diurna dispone de un filtro polarizador para evitar reflejos a causa de la intensa iluminación aportada por el panel. La cámara nocturna, por su parte, no tiene implementado ningún filtro para incrementar la sensibilidad en el espectro del infrarrojo cercano (NIR).

Figura 6.2: Dispositivos de captura día/noche. Sobre ellos panel LED NIR

6.2.2. Sistemas de iluminación

Se ha empleado una iluminación estándar utilizada en agricultura y diseñada para mejorar el crecimiento. Comprende dos paneles de diodos emisores de luz (Light-Emitting Diode o LED) que emiten a diferentes longitudes de onda dependiendo del periodo de grabación –día/noche–. El panel que emite durante el día (Fig. 6.3) está compuesto por una matriz de LEDs con longitudes de onda específicas para activar los fotosistemas I y II de la planta. El panel nocturno (Fig. 6.2), está compuesto igualmente por una matriz de LEDs que emiten en el NIR –948nm–.

Figura 6.3: Panel LED para iluminación diurna

6.2.3. Unidad de procesamiento de imagen

Esta unidad está desarrollada empleando las librerías de Matrox Imaging Library 9.0. con dos módulos de software diferenciados: control de imagen y análisis de imagen.

El módulo de control está encargado de configurar el sistema de captura y de iluminación. Debe establecer los parámetros de grabación –intervalos de captura, duración de los periodos de día y de noche, etc.–. Otro cometido de este sistema es la calibración de las imágenes, algo necesario al emplear dos cámaras en dos planos diferentes.

El módulo de análisis de imágenes, entra en funcionamiento una vez que la captura ha terminado. Este módulo permite al usuario procesar las imágenes y extraer la información relevante necesaria para analizar crecimiento y movimiento de órganos aéreos –hojas, tallos y flores–. Este software permite obtener medidas de características morfológicas, como área, longitud, ángulo o perímetro y otras medidas indirectas como compacidad, vector de movimiento o velocidad de crecimiento.

6.2.4. Ventajas e inconvenientes

El uso de dos cámaras para poder grabar durante el día y la noche sin la necesidad de iluminar durante ambos periodos a la planta es algo destacable, sin embargo esto además de aumentar el coste de la inversión respecto a los sistemas de una sola cámara, supone un esfuerzo extra, al tener que calibrar todas las imágenes del día y la noche. Por otro lado, se hace muy complicado alinear perfectamente las dos cámaras respecto un eje vertical (Fig. 6.4).

La resolución de las cámaras aunque aceptable, es quizá insuficiente cuando se trata de detectar variaciones de crecimiento de milímetros en la planta.

El sistema de iluminación LED diurno proporciona una iluminación suficientemente buena para favorecer el crecimiento vegetal. Sin embargo, es una iluminación con una alta intensidad y excesiva tonalidad rosada que en determinadas circunstancias puede dificultar la segmentación de las imágenes.

Figura 6.4: En esta figura se observa el desplazamiento que hay entre la imagen nocturna (a) y la diurna (b). Ambas imágenes han sido tomadas en un lapso de tiempo de 10 min.

Parte II

Métodos y resultados

Capítulo 7

Sistema de fenotipado basado en visión artificial

El fenotipado de plantas en el campo, tiene la ventaja de poder estudiar a los individuos dentro de sus condiciones ambientales naturales. Sin embargo, esto a su vez tiene la desventaja de que las plantas están sujetas a crecimientos estacionales [20], la falta de control sobre las condiciones ambientales, hace que los experimentos puedan sufrir gran variabilidad en cuanto a los parámetros, y por tanto sean difíciles de reproducir en iguales condiciones.

Si bien un sistema de fenotipado de interior puede resultar menos natural, por contra, permite un control preciso sobre las condiciones ambientales, una replicación de los experimentos bajo las mismas condiciones y un mayor control sobre el funcionamiento de los dispositivos que conforman el sistema.

A pesar de la variedad de plataformas, herramientas y software existente, en este capítulo se presenta el desarrollo de un sistema de fenotipado basado en visión artificial, altamente configurable y no invasivo para la planta, para el seguimiento del crecimiento en intervalos de tiempo muy cortos, del orden de minutos.

Partiendo de la idea básica del sistema de fenotipado [72] descrito en el capítulo anterior (Cap. 6), se ha rediseñado el sistema con la intención de mejorar aquellos puntos en los que la antigua configuración adolece.

Se ha implementado un nuevo dispositivo de captura de imagen, nuevos sistemas de iluminación, un nuevo panel electrónico de control, y se ha desa-

rollado un nuevo software *ad hoc* para el control de todos los sistemas.

7.1. Características de la cámara de cultivo

El sistema de fenotipado ha sido instalado en una cámara de cultivo visible, aislada térmicamente del exterior ubicada en el sótano de edificio del Instituto de Biología Vegetal (IBV) de la Universidad Politécnica de Cartagena. Dicha cámara mantiene una temperatura constante gracias a un equipo de climatización convencional cuya temperatura es controlada por un panel electrónico situado en el exterior de la cámara. La cámara tiene unas dimensiones de 160 cm de ancho x 500 cm de largo y 300 cm de alto, un total de 8,0 metros cuadrados. En ella se han instalado unos paneles de aluminio desmontables, a diferentes niveles, que conforman unas estructuras con unas dimensiones de 900 x 400 x 700 mm (largo, fondo, altura entre paneles), donde se sitúan todos los elementos que constituyen el sistema de visión, así como los diferentes especímenes vegetales objeto de estudio (Fig. 7.1).

Figura 7.1: Esquema de la disposición de los sistemas de la cámara de cultivo.

Esta disposición, donde el dispositivo de visión se fija sobre un soporte articulado –trípode o brazo articulado– se ha concebido principalmente para capturar imágenes desde una posición frontal al espécimen, aunque permite cierto grado de libertad a la hora de ajustar la distancia y el ángulo. Para poder realizar capturas a especímenes con hojas en forma de roseta basal, como es el caso de ejemplares de *Arabidopsis thaliana* en estadios tempranos de crecimiento, se ha realizado una modificación. Mediante un tablero de fibras de densidad media (MDF) de 3 mm de espesor, se ha construido un soporte con forma de arco situado sobre la planta, al que se le han practicado orificios tanto en posición cenital a la planta como en diferentes ángulos, lo que permite la obtención de imágenes desde diversas posiciones (Fig. 7.2).

Figura 7.2: Configuración de la cámara de cultivo para imágenes cenitales.

7.2. Subsistema de captura

El subsistema de captura está formado por aquel o aquellos dispositivos que permiten la obtención de información, generalmente en forma de imagen, del objeto de estudio de interés. En este caso se ha elegido como dispositivo una cámara de visión artificial de tipo industrial modelo JAI®AD-130 GE. Este dispositivo multispectral, tiene dos sensores basados en la tecnología CCD, auto-intercambiables mediante un prisma interior. Uno de ellos RGB –multicanal 24 bits– que captura imágenes en el espectro visible (Fig. 7.3) con picos de máxima respuesta en 460nm, 540nm y 600nm aproximadamente

—para los colores azul, verde y rojo respectivamente—. El otro sensor es monocanal —8 bits—, capaz de capturar imágenes en escala de grises en la banda del IR con un pico de máxima respuesta aproximadamente en 800nm (Fig. 7.3).

Figura 7.3: Configuración de la cámara de cultivo para imágenes cenitales.

Uno de los sensores CCD es capaz de captar imágenes en el espectro visible. Este sensor posee los fotodiodos dispuestos en lo que denomina filtro o mosaico de Bayer. Este tipo de CCD tiene un 50 % de fotodiodos verdes un 25 % rojos y otro 25 % azules. Interpolando cada cuatro fotodiodos (2 verdes, 1 rojo y 1 azul) se obtiene un píxel de color. La razón de emplear más fotodiodos verdes que rojos o azules, radica en la mayor sensibilidad del ojo humano para captar el color verde que el rojo o el azul. Generalmente la disposición de los fotodiodos suele ser una fila rojo-verde-rojo-verde... y la siguiente verde-azul-verde-azul... y así sucesivamente (Fig. 7.4).

La resolución de las imágenes obtenidas es de 1296 (horizontal) x 966 (vertical) píxeles por canal para el sensor RGB, e idéntica resolución en monocanal —escala de grises— para el sensor IR. Se trata, por tanto de obtener imágenes de calidad superior a las obtenidas con los dispositivos descritos en

Figura 7.4: Disposición de los fotodiodos en un CCD de mosaico de Bayer.

el capítulo anterior (Cap. 6) cuya resolución era de 768 x 576 píxeles.

La comunicación con el subsistema de control y/o con el ordenador central, puede realizarse mediante un conector de tipo *HIROSE* de 12 pines, por el que además de ser alimentada, puede enviar y/o recibir información del dispositivo. Cuenta además con dos puertos Gigabyte Ethernet –uno para cada sensor– de alta velocidad que, mediante el interfaz estándar de comunicación *GigE Vision Interface*, permite controlar los parámetros de la cámara y el disparo de la misma. Este último es el sistema que se ha utilizado en este trabajo para mantener la comunicación entre el dispositivo y el ordenador central.

Finalmente, la óptica empleada ha sido un objetivo con montura C-mount, con una distancia focal de 50 mm, apertura de f1.4 y enfoque manual.

7.3. Subsistema de iluminación

El diseño del subsistema de iluminación se ha realizado atendiendo a dos objetivos. En primer lugar, proporcionar a la planta unas condiciones de iluminación que favorezcan su crecimiento y la segunda, obtener imágenes durante la noche sin alterar la fase oscura de la planta. Para lograr este doble propósito, se han establecido dos periodos de iluminación: periodo diurno y periodo nocturno. El subsistema de iluminación está compuesto por dos paneles de diodos emisores de luz (LED) que permiten llevar a cabo el proceso de captura de imagen al tiempo que proporcionan luz con una precisa combinación de longitudes de onda para favorecer el desarrollo de la planta [259].

El panel LED empleado para el periodo diurno, está compuesto por 90

LEDs que emiten en cinco longitudes de onda diferentes, con picos de emisión en los 290nm –luz ultravioleta (UV)–, en los 450nm y 460nm –luz azul–, en 630nm y 660 nm –luz roja–. Este panel LED tiene una potencia de 50 vatios (Fig. 7.5a). Es un panel usado comunmente para el crecimiento de plantas en cultivos de interior. La combinación de estas longitudes de onda proporciona una iluminación con un tono de apariencia rosado intenso (Fig. 7.2b).

El panel LED empleado para el periodo nocturno, está compuesto por una barra de 132 LEDs NIR– dispuestos en 3 filas de 44 LEDs– con emisión en la longitud de onda de los 840nm (Fig. 7.5b). Este panel está sincronizado con el subsistema de iluminación gracias al software de control. De esta forma, el panel LED NIR es activado 3 segundos antes de captura la imagen en el periodo nocturno y desactivado 3 segundos después. Asegurando así, la iluminación IR en el momento de la captura. En base a esto, el intervalo de tiempo mínimo para capturar una imagen en el periodo nocturno es de 6 segundos y el máximo de 24 horas.

(a) Panel LED diurno

(b) Panel LED NIR

Figura 7.5: Subsistemas de iluminación.

7.4. Subsistema de control

El subsistema de control, está formado por todos aquellos componentes hardware y software necesarios para mantener el funcionamiento de la cámara de cultivo. Dentro de éste se incluye: el panel electrónico de control, el ordenador central que integra y controla todo el sistema y el software de control,

desarrollado a medida de los componentes del sistema y de la aplicación que se quiere hacer de éste.

7.4.1. Ordenador central

El ordenador central, es un PC de tipo industrial (PC-I), donde la carcasa de aluminio actúa como un gran disipador, la fuente de alimentación es externa, lo que supone menor calentamiento interior, y carece además de ventilador de la CPU, evitando la posibilidad de avería de partes móviles y por tanto aumentando la robustez y fiabilidad de un ordenador que tiene que trabajar en unas condiciones de humedad y temperatura poco aconsejables para un PC convencional. Está equipado con un procesador de 4 núcleos, 4 Gigabytes de memoria RAM y disco duro de estado sólido (SSD) de 64 Gigabytes que permite un intercambio de información con el subsistema de captura más rápido que mediante discos SATA. Así mismo, dispone de numerosos puertos de entrada/salida (GigaE, SATA, USB, Serial). Se ha instalado un sistema operativo Ubuntu, que es una distribución basada en *GNU/Linux* de 64 bits.

7.4.2. Panel electrónico de control

El nexo de unión entre el ordenador central con los dispositivos periféricos como el subsistema de iluminación, se realiza a través del panel electrónico de control.

En un principio, se ha realizado un prototipo de control mediante un módulo Arduino, que consta de un pequeño microchip programable en su propio lenguaje de programación *arduino* basado en *wiring*. Consta de numerosos pines de entrada y salida analógicos y digitales que lo hacen adecuado para control de dispositivos electrónicos. Este microcontrolador ha sido conectado a una tarjeta de relés¹ que a su vez actúa activando o desactivando de manera selectiva los distintos componentes conectados a él –p.e iluminación– según las órdenes enviadas desde el microcontrolador (Fig. 7.6). A pesar de que este sistema es relativamente sencillo y muy económico de implementar, se ha op-

¹Relé: dispositivo electromagnético que puede ser estimulado por una corriente de bajo voltaje para actuar como interruptor en un circuito de alto voltaje

tado por una versión más eficiente y fiable. En esta implementación los relés no están optoacoplados lo que supone un riesgo de sobrecargar el circuito de bajo voltaje. Por otro lado, tener que programar el microcontrolador supone comunicar el software de control general con el del propio microcontrolador. Esto supone una cierta ralentización en la comunicación.

Figura 7.6: Prototipo de sistema de control con tarjeta Arduino izquierda y tarjeta de relés a la derecha

Finalmente se ha optado por sustituir la tarjeta Arduino por un módulo USB GPIO que consta de 8 canales de entrada/salida digitales y 6 entradas analógicas. Esta tarjeta electrónica puede ser controlada directamente por el programa principal sin necesidad de programación adicional (Fig. 7.7a).

Por otro lado, la tarjeta de relés mencionada anteriormente ha sido sustituida por una con relés optoacoplados. En su interior unos fototransistores actúan como fotointerruptores aislando el circuito de alto voltaje del de bajo voltaje. Es necesaria una fuente de alimentación externa de 12 voltios que le permitan abrir o cerrar los relés del circuito de alto voltaje (Fig. 7.7b).

Para el control de la iluminación, se han utilizado dos canales de salida de la tarjeta electrónica, uno para actuar sobre el panel LED RGB y el otro sobre el panel LED NIR mediante los relés a los que están conectados.

Todo el sistema de control se ha montado sobre una base de polietileno fijada a su vez al cuadro de conexiones de la cámara de cultivo (Fig. 7.7c).

Figura 7.7: Módulos de control

7.4.3. Integración del hardware

Al comienzo de la fase diurna de grabación, el software envía una orden a través del puerto USB del PC-I conectado a la tarjeta USB GPIO para activar el pin 0. Este pin, que está conectado a la tarjeta de relés –relé número 1–, envía una señal que cierra el correspondiente relé y por consiguiente activa la iluminación diurna –solar LED–. Al finalizar la fase diurna, siguiendo el mismo circuito, se envía otra señal que abre el relé apagando la iluminación.

Durante la fase nocturna, toda la iluminación está apagada. En esta fase, 3 segundos antes de que se produzca la captura de una imagen, desde el PC-I se envía una orden al pin 1 del módulo USB-GPIO, que cierra el relé número 4, encendiendo la iluminación LED NIR. Transcurrido ese tiempo, el dispositivo de captura se dispara y se obtiene una imagen. Tres segundos más tarde, se envía una nueva orden para abrir el relé y desconectar el LED NIR.

El control del dispositivo de captura se realiza a través de dos puertos Gigabit Ethernet, uno para cada sensor. El software de control, envía al dispositivo los parámetros de ajuste, según la configuración establecida y es el encargado de decidir y ordenar tanto el sensor que debe activarse –RGB o IR–, como el momento en que debe ser capturada una imagen. Finalmente, la imagen es transferida al PC-I donde es nombrada en función de la fecha y hora a la que ha sido tomada.

La figura 7.8 se muestra un esquema de la conexión de los diferentes elementos de sistema.

Figura 7.8: Detalle de las conexiones entre los distintos dispositivos del sistema de fenotipado

7.4.4. Software de control

Para controlar los diferentes elementos del sistema de fenotipado, se ha desarrollado un software con interfaz gráfica que permite con gran flexibilidad configurar los diferentes parámetros de grabación y periodos de iluminación.

El software de control se ha programado en C/C++² por dos motivos fundamentales: por un lado, la interfaz de desarrollo de aplicaciones (Application Programming Interface o API) del dispositivo de grabación está desarrollada en este C++, además es un lenguaje compilado de alto rendimiento que proporciona rapidez y fiabilidad.

La interfaz gráfica de usuario (graphical user interface o GUI) se ha realizado empleando el software *GLADE*³, una aplicación de entorno gráfico, que permite al usuario el diseño de la estructura no operativa de la aplicación mediante elementos gráficos. Una vez diseñada la vista de la aplicación, ésta puede ser exportada a un fichero de lenguaje de marcas (xml), para posteriormente ser importada en la aplicación final del usuario mediante la librería *GtkBuilder*⁴. Esta librería lee las etiquetas xml, convirtiéndolas en objetos y/o elementos gráficos tales como botones, cuadros de diálogo, ventanas emergentes o menús desplegables entre otros. A continuación se muestra un fragmento del código xml generado por *GLADE* para la creación de la interfaz gráfica.

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!-- Generated with glade 3.16.1 -->
<interface domain="parameter">
  <requires lib="gtk+" version="3.10"/>
  <object class="GtkAdjustment" id="adjustment1">
    <property name="upper">593</property>
    <property name="step_increment">1</property>
    <property name="page_increment">10</property>
  </object>
  <object class="GtkDialog" id="dialog1">
    <property name="can_focus">False</property>
```

²<http://www.stroustrup.com/>

³<https://glade.gnome.org/>

⁴<https://developer.gnome.org/gtk3/stable/GtkBuilder.html>

```

<property name="type_hint">dialog</property>
<child internal-child="vbox">
  <object class="GtkBox" id="dialog-vbox1">
    <property name="can_focus">False</property>
    <property name="orientation">vertical</property>
    <property name="spacing">2</property>
    <child internal-child="action_area">
      ...

```

Una vez importada la librería por el programa principal, es necesario dotar de funcionalidad a los diferentes elementos gráficos –botones, despleables, radio botones, etc.–, para ello se ha hecho uso de la librería *GTK+*⁵ que proporciona a través de sus clases y métodos todo el entorno necesario para proporcionar operatividad a la aplicación. Esta librería, como el resto de las mencionadas tiene una arquitectura basada en programación orientada a objetos de C++, lo que supone la perfecta integración con el resto del proyecto.

Finalmente, para el control del sistema de iluminación a través de la tarjeta controladora, se ha hecho uso de la librería *termios*⁶, que proporciona control sobre puertos serie de comunicación asíncronos, esto permite la implementación de un protocolo de comunicación entre el software y la tarjeta controladora a través del puerto USB.

Con el fin de facilitar la depuración del código y poder reutilizar parte de éste en futuras aplicaciones, el programa se ha dividido en 8 ficheros que contienen la declaración y definición de las funciones necesarias para el control de diferentes partes del sistema. Tras la compilación queda todo integrado en un único ejecutable (Fig. 7.9).

- ArtVis.cpp ⇒ Importa los elementos de la GUI, inicializa variables y controla el bucle principal de ejecución.
- AVfunction.h y .cpp ⇒ Ficheros con la declaración (.h) y definición (.cpp) de funciones que controlan los eventos principales del sistema.

⁵<https://developer.gnome.org/gtk3/>

⁶<http://man7.org/linux/man-pages/man3/tcsetattr.3.html>

- AVserial.h y .cpp ⇒ Ficheros con la declaración y definición de las funciones que controlan el puerto serie.
- Jai.h y .cpp ⇒ Ficheros para el control del dispositivo de grabación
- ArtVis.xml ⇒ Fichero xml con las etiquetas que definen los elementos que va a contener la GUI.

Figura 7.9: Esquema de la estructura del software de control

7.4.5. Funcionalidad del software de control

El software que controla todos los elementos del sistema de fenotipado, se ha programado como una aplicación con interfaz gráfica con la finalidad de que resulte más intuitiva para el usuario final. Está constituida por una ventana con cuatro pestañas. Cada una de ellas agrupa las funcionalidades relacionadas de una manera lógica.

En la parte inferior de la ventana y común a todas las pestañas, se sitúa una barra de progreso que indica de manera visual el estado en que se encuentra el ciclo de grabación. Por debajo de ésta, se ha reservado un espacio que aporta información sobre el estado de los ajustes que se están realizando (Figs. 7.10,7.11,7.12,7.13).

Image Control

Esta pestaña (Fig. 7.10) está diseñada para permitir al usuario configurar los parámetros básicos de la cámara y comprobar el funcionamiento de distintos componentes manualmente.

Más específicamente, los sensores RGB o el NIR del dispositivo, puede ser activados o desactivados (*Shift CCD*). También es posible (*Test light*) activar y desactivar manualmente los sistemas de iluminación.

Pueden ajustarse los siguientes parámetros: ganancia (*Gain Raw*) para ambos sensores, ajuste de los canales RGB (*RGB Adjust*), autobalance de blancos (*Auto White Balance*), tiempo de exposición (*Exposure Time*).

Finalmente, en la parte inferior se encuentran una serie de botones que permiten visualizar en vivo lo que el dispositivo está captando con los ajustes que hay definidos (*View Image*), cerrar dicha ventana (*Close View*), guardar manualmente una imagen en disco (*Save Image*) y cerrar la aplicación (*Close*).

Figura 7.10: Interfaz gráfica. Pestaña *Image Control*

Time Snapshot Control

La siguiente pestaña de la aplicación (Fig. 7.11) está destinada a la programación de los horarios de los periodos de captura con el sensor RGB y NIR así como los intervalos de disparo.

Es necesario indicar la fecha de inicio (*Begin Date*) y la fecha fin (*End Date*) de la grabación. El sistema se asegura que no es posible indicar una

fecha fin anterior a la de inicio, si no, la grabación por si misma no finalizaría nunca. El intervalo de tiempo entre capturas (*Snapshot interval*) se controla mediante un deslizador que puede ajustarse para periodos desde una imagen cada 10 segundo a una cada 24 horas.

El horario de inicio y fin para realizar grabaciones con el sensor RGB (*Visible CCD*) se configura mediante dos “*spinners*” que permiten ajustar hora-minuto de comienzo y hora-minuto fin. Igual que ocurría con las fechas, el sistema controla que la hora de fin no pueda ser anterior a la de inicio.

Tras ajustar el horario del sensor RGB, automáticamente aparece (*Near-IR CCD*) el horario para la grabación del sensor NIR, ya ajustada para completar un periodo de 24 horas.

Finalmente, un botón aplicar (*Apply*) hace efectivos estos ajustes al sistema.

Environment Control

Esta pestaña permite configurar parámetros relacionados con algunas condiciones ambientales de la cámara de cultivo (Fig. 7.12).

Concretamente es posible ajustar el horario de activación y desactivación (*Daylight on/off time*) de la iluminación correspondiente al periodo diurno del ciclo de grabación. Lo más usual, es hacer coincidir este horario con el fijado en la pestaña anterior para la activación del sensor RGB. De otra manera, se podría estar activando el sensor RGB en periodos donde el sistema de iluminación diurno no esté activado y por el contrario se podría estar iluminando a la planta cuando se active el sensor NIR. Sin embargo, el hecho de que el sistema de grabación y el de iluminación se puedan configurar de manera independiente, dota de mayor flexibilidad al sistema de fenotipado.

Finalmente, en esta pestaña hay disponibles dos controles deslizantes (*Day temperature* y *Night temperature*) que permiten potencialmente ajustar la temperatura de los periodos diurno y nocturno. Actualmente este parámetro está controlado por el equipo de climatización que se encuentra conectado a su propio panel. Sin embargo, la aplicación está preparada para poder controlar la temperatura en caso de que se quiera hacer funcionar el sistema en instalaciones con equipo de climatización sin panel de control propio.

Artificial Vision System - UPCT

Image Control | Time Snapshot Control | Environment Control | Summary

Begin Date

Open calendar 26/4/2015

End Date

Open calendar 26/4/2015

Right start date

Snapshot interval

74

15 min (900 secs)

Visible CCD

hour min

Start time 8 - + 0 - +

Stop time 22 - + 0 - +

UTC time format

Near-IR CCD

Start time: 22 Hrs: 1 Min

Stop time: 7 Hrs: 59 Min

Right start/stop time

✓ Apply

Fetching system parameters...OK

Figura 7.11: Interfaz gráfica. Pestaña *Time Snapshot Control*

Summary

La última pestaña de la aplicación se ha diseñado para que sirva no sólo como un resumen de los parámetros configurados en las pestañas anteriores, si no también que permita guardar los parámetros del experimento y poder recuperarlos para reproducir otro experimento en iguales condiciones.

Consta de una gran ventana de texto central (*Parameters summary*) don-

Figura 7.12: Interfaz gráfica. Pestaña *Environment Control*

de figuran los parámetros configurados en formato parámetro-valor separados por punto y coma.

En la parte superior de izquierda a derecha se han situado: un botón (*Retrieve*) que recupera y muestra en el visor los parámetros del sistema, un botón (*Load*) que permite cargar desde un archivo de texto los parámetros guardados anteriormente, un botón (*Save*) con el que se pueden guardar los

ajustes en un archivo de texto y por último un botón (*JSON*) que permite convertir la estructura de parámetros separados por punto y coma en una estructura con formato “notación de objeto de JavaScript” (*JSON*) útil para intercambio de información o si desea hacer llegar los parámetros de ajuste a la aplicación desde un equipo remoto.

En la parte inferior de la pestaña se han situado dos controles. El primero de ellos (*Apply parameters*) transfiere al sistema los parámetros que hayan podido ser cargados al visor, y el segundo de ellos (*Run*) ejecuta los parámetros y pone en marcha el sistema conforme a lo establecido.

Figura 7.13: Interfaz gráfica. Pestaña *Summary*

Capítulo 8

Aprendizaje automatizado basado en visión artificial para segmentación automática de plantas

Los sistemas de visión artificial se han empleado para estudiar diferentes aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal tales como desarrollo de la raíz [175], crecimiento de hojas [260], flores y tallos [19] o plántulas [261].

Un reto importante de la adquisición de imágenes es el efecto que pueden tener diferentes longitudes de onda sobre fotoreceptores moleculares de la planta, especialmente en periodos nocturnos. Para evitar esto, se hace necesario el empleo de cámaras especiales y una iluminación de con luz IR durante un breve espacio de tiempo en los periodos en los que la planta no debe ser iluminada [19, 262].

El fenotipado de plantas con roseta basal, tales como *Arabidopsis thaliana*, puede llevarse a cabo con cámaras cenitales que capturan imágenes en intervalos de tiempo [263]. Sin embargo, para plantas más grandes o cuando lo que se busca es fenotipar en paralelo ramos de varios individuos, se requiere que la cámara esté en posición lateral [72]. Para esta situación o cuando se requiere una reconstrucción tridimensional de la imagen, se recurre habitualmente a una combinación de cámaras o al movimiento de las mismas [80].

A pesar de que el desarrollo del hardware requiere un conocimiento multidisciplinar, el auténtico cuello de botella reside en el análisis de las imágenes. Idealmente las imágenes deberían poder ser analizadas automáticamente. El número de imágenes a procesar cuando se monitorizan poblaciones, o se hacen estudios de cinética de crecimiento, pueden ser de miles. El proceso de segmentación de imágenes, consiste en hacer una partición de los diferentes elementos de una imagen. Es el proceso básico que permite de alguna manera la cuantificación de los datos, bien mediante recuento de número de píxeles, o determinando fronteras o bordes de un objeto [264]. La segmentación debe ser capaz de discriminar entre el fondo de la imagen y las regiones definidas de interés para el estudio.

El desarrollo de la inteligencia artificial basada en ML ha supuesto un importante avance en el desarrollo de software para el análisis procedente de diferentes ómicas y la modelización [265]. Se pueden encontrar numerosos ejemplos que incluyen SVM en la secuenciación genómica con datos de Illumina [266], kNN para la localización de proteínas [267], o el uso de clasificadores bayesianos en la reconstrucción de árboles filogenéticos [268]. Además, el ML se ha empleado de forma extensiva en análisis de imágenes aplicado a la biología vegetal y la agricultura [269, 270].

Este capítulo describe el desarrollo de una metodología basada en aprendizaje automatizado (ML) y visión artificial para el procesamiento automático de imágenes obtenidas por el sistema de fenotipado descrito en el capítulo precedente (Cap. 7). Para ello, se han acomodado en la cámara de cultivo, plantones de pequeño tamaño. Las imágenes del periodo nocturno han requerido luz IR. Como algoritmos de ML se han utilizado los k-vecinos más próximos (kNN), un clasificador bayesiano (NBC) y una máquina de soporte de vectores (SVN). Cada algoritmo se ha utilizado con diferentes *kernels* y han sido entrenados con datos crudos y con dos tipos de normalización.

8.1. Imagen y espacios de color

Una imagen digital puede entenderse como una matriz bidimensional de píxeles, donde se distribuye de manera discreta la radiancia captada por el

sensor. Por ejemplo, una imagen con resolución de 1024 x 768 píxeles, es una matriz con 1024 columnas y 768 filas, en la que cada píxel –celdilla de esa matriz– está representado por un valor o un conjunto de valores [271, 272]. Estos valores son el resultado de la abstracción matemática de una representación específica de los colores de la imagen conocida como espacio de color [273].

Existen multitud de espacios de color, uno de los más comunes y populares es RGB, donde cada color está representado por una tripleta de valores de 0-255 –en una imagen de 8 bits– que representan la cantidad de rojo, verde y azul. Un problema del RGB, es que no está diseñado para modelar la luminosidad. En teoría, la luminosidad está relacionada con R, G y B, sin embargo, en la práctica es más adecuado separar los valores de color de los de luminosidad. El espacio de color de tono, saturación y valor (Hue, Saturation, Brightness o HSV) es más adecuado pues define el color mediante el tono y saturación y la luminosidad/brillo por el valor [272]. CIE L*a*b* es un espacio de color que supone una aproximación a la percepción humana del color, consigue separar la luminosidad –L*– del color, representado éste como gradiente entre el verde y el rojo –a*– y como un gradiente entre el amarillo y el azul –b*–. Este sistema de representación, permite ajustar eficientemente de manera independiente luminosidad y color [274].

La conversión del espacio de color RGB de la imagen original al espacio CIE L*a*b* puede realizarse mediante las siguientes expresiones (8.1)-(8.5).

El primer paso es convertir el espacio RGB a coordenadas cromáticas XYZ

$$sRGB \in [0, 255]$$

$$V_{RGB} = \frac{sRGB}{255} \quad (8.1)$$

$$V_{RGB} = \begin{cases} \left(\frac{V_{RGB} + 0,055}{1,055} \right)^{2,4} & \text{si } V_{RGB} > 0,04045, \\ \frac{V_{RGB}}{12,92} & \text{en otro caso} \end{cases} \quad (8.2)$$

$$V_{RGB} = V_{RGB} \cdot 100 \quad (8.3)$$

$$\begin{aligned} X &= V_R \cdot 0,4124 + V_G \cdot 0,3576 + V_B \cdot 0,1805 \\ Y &= V_R \cdot 0,2126 + V_G \cdot 0,7152 + V_B \cdot 0,0722 \\ Z &= V_R \cdot 0,0193 + V_G \cdot 0,1192 + V_B \cdot 0,9505 \end{aligned} \quad (8.4)$$

a continuación se convierten las coordenadas XYZ a CIE L*a*b*

$$\begin{aligned} V_X &= X/Ref_X \quad \text{donde } Ref_X = 95,047 \text{ según D65} \\ V_Y &= Y/Ref_Y \quad \text{donde } Ref_Y = 100 \text{ según D65} \\ V_Z &= Z/Ref_Z \quad \text{donde } Ref_Z = 108,883 \text{ según D65} \end{aligned}$$

$$V_{XYZ} = \begin{cases} V_{XYZ}^{1/2} & \text{si } V_{XYZ} > 0,008856, \\ (7,787 \cdot V_{XYZ}) + \frac{16}{116} & \text{en otro caso} \end{cases} \quad (8.5)$$

y finalmente

$$CIEL* = (116 \cdot V_Y) - 16$$

$$CIEa* = 500 \cdot (V_X - V_Y)$$

$$CIEb* = 200 \cdot (V_Y - V_Z)$$

8.2. Desarrollo del algoritmo

La grabación de imágenes durante periodos de 24 horas genera dos tipo de imágenes: imágenes NIR durante el periodo nocturno de grabación e imágenes

RGB durante el periodo diurno. Con el objetivo de obtener una segmentación automática, se ha diseñado un protocolo de aprendizaje automatizado, para clasificar los objetos de las imágenes del experimento en dos grupos: órganos, concretamente hojas y fondo. Este protocolo que comprende tres fases –extracción de muestras, generación del modelo y validación del algoritmo– es diferente es su primera fase dependiendo de si se trata de imágenes color (RGB) o escala de grises (NIR).

8.2.1. Extracción de muestras

Durante la primera fase del algoritmo, se selecciona un conjunto de muestras representativas formadas por una matriz de $k \times k$ píxeles para cada clase. Puesto que el tamaño de las imágenes es de 1024×768 píxeles, se ha optado por tamaños de regiones de 1×1 , 16×16 , 32×32 , 64×64 o 128×128 píxeles. El tamaño final dependerá del tamaño y morfología del órgano a clasificar y del periodo de grabación –día/noche–. Durante el día se ha empleado regiones de un sólo píxel y durante la noche regiones más grandes que el tamaño del píxel para aumentar la información obtenida del canal IR.

8.2.2. Generación del modelo

Vectores de características

Un vector de características, normalmente, está compuesto por una amplia variedad de diferentes tipos de características. Las más utilizadas suelen ser características relativas al valor de intensidad del píxel [275], a la geometría [276] y texturas [277, 278] –estadísticos de características de primer y segundo orden–. También se obtienen vectores de características aplicando transformaciones sobre las imágenes tales como las de Fourier, Gabor y Wavelet [279]. Las imágenes en color están formadas por 3 canales: rojo (R), verde (G) y azul (B). Como resultado, la cantidad de información obtenida de un píxel se multiplica por 3 y el número de posibles combinaciones y transformaciones sobre la imagen se incrementan.

Se han aplicado dos tipos de técnicas para obtener vectores de características, dependiendo si la imagen fue capturada durante el día –RGB– o durante

la noche –NIR–. Para constituir los vectores de características de las imágenes RGB, previamente se han probado diversos espacios de color: RGB –espacio primario–, HSV –espacio porcentual– y CIE $L^*a^*b^*$ –espacio de luminosidad/gradientes de color– [280]. Se ha constatado que la utilización de un sólo espacio de color produce resultados pobres.

Para mejorar el rendimiento de la clasificación, se ha incrementado el número de características, se han probado combinaciones con RGB, CIE $L^*a^*b^*$, y HSV, encontrando que los mejores resultados se obtienen con RGB y CIE $L^*a^*b^*$. Por tanto, se han construido vectores de características constituidos por los correspondientes valores de estos espacios de color para cada píxel. En el caso de las imágenes NIR, se han generado vectores de características obtenidos como resultado de aplicar transformadas de Wavelet con base Haar, a dos niveles de descomposición.

Vector de características en imágenes de color

El vector de características de las imágenes de color está compuesto por 6 elementos extraídos de los dos espacios de color –RGB y CIE $L^*a^*b^*$ –. Se han seleccionado aleatoriamente un gran número de píxeles de cada clase para construir el vector. Las clases definidas han sido: clase “órgano” píxeles verdes y clase “fondo” píxeles blancos (Fig. 8.1). Es necesario convertir el espacio RGB a CIE $L^*a^*b^*$ para obtener esa información (Sec. 8.1).

Figura 8.1: Construcción de vector de características para imágenes en color. Izquierda imagen con píxeles sobre la clase “órgano” –verde–, y sobre la clase “fondo” –blanco–. Derecha muestra una tabla con los vectores de los primeros 20 píxeles de la clase “órgano”

Vector de características en imágenes NIR

Las transformadas discretas de Wavelet (DWT) generan un conjunto de valores formados por los coeficientes de Wavelet. Siendo $f(x, y)$ una imagen de tamaño $M \times N$, cada nivel de descomposición de Wavelet está formado por la convolución de la imagen $f(x, y)$ con dos filtros: un filtro de paso bajo (LPF) y un filtro de paso alto (HPF). Las diferentes combinaciones de esos filtros dan como resultado cuatro imágenes descritas como LL, LH, HL y HH. En un primer nivel de descomposición se producen cuatro subimágenes o bandas: una imagen suavizada llamada *aproximación*, $f_{LL}^{(1)}(x, y)$ y tres subimágenes de detalle, $f_{LH}^{(1)}(x, y)$, $f_{HL}^{(1)}(x, y)$ y $f_{HH}^{(1)}(x, y)$, que representan el detalle *horizontal*, *vertical* y *diagonal* respectivamente.

Hay diversos tipos de funciones que pueden utilizarse, como la de Haar, Daubechies, Coiflet, Meyer, Morlet y Bior, dependiendo del problema específico que se desee identificar [281, 282]. En la figura 8.2 se muestra la progresión del algoritmo de la transformada Wavelet en el primer nivel de descomposición.

Para este trabajo se ha calculado un vector de características basado en transformadas Wavelet con base de Haar [283] formado por cuatro elementos: máximo, mínimo, media y entropía de Shannon de los coeficientes de Wavelet calculados en las subimágenes horizontal, vertical y diagonal a dos niveles de descomposición (8.6), (8.7), (8.8), (8.9), (8.10). Se ha eliminado la subimagen aproximación debido a que es una representación diezmada de la imagen original.

$$f_{1,...,6} = \max \left\{ f_{HL}^{(l)}(x, y), f_{HH}^{(l)}(x, y), f_{LH}^{(l)}(x, y) \right\}, \forall l = 1, 2 \quad (8.6)$$

$$f_{7,...,12} = \min \left\{ f_{HL}^{(l)}(x, y), f_{HH}^{(l)}(x, y), f_{LH}^{(l)}(x, y) \right\}, \forall l = 1, 2 \quad (8.7)$$

$$f_{13,...,18} = \text{mean} \left\{ f_{HL}^{(l)}(x, y), f_{HH}^{(l)}(x, y), f_{LH}^{(l)}(x, y) \right\}, \forall l = 1, 2 \quad (8.8)$$

Figura 8.2: Progresión del algoritmo de la transformada en el primer nivel de descomposición

$$f_{19,\dots,24} = shannon \left\{ f_{HL}^{(l)}(x, y), f_{HH}^{(l)}(x, y), f_{LH}^{(l)}(x, y) \right\}, \forall l = 1, 2 \quad (8.9)$$

La entropía de Shannon se calcula según la fórmula

$$f_s^{(l)} = - \sum_{i=1}^{M/2^l} \sum_{j=1}^{N/2^l} p(w_{ij}) \log_2(p(w_{ij})) \quad (8.10)$$

Donde l representa el valor del nivel de descomposición de la Wavelet, s las subimágenes (LL, HL, LH, HH creadas en la descomposición de Wavelet, y

w_{ij} representa los coeficientes (i, j) de Wavelet localizados en la subimagen- s al nivel de descomposición l . p representa la probabilidad de ocurrencia del coeficiente w_{ij} . El vector de características se obtiene de aplicar las ecuaciones (8.6),(8.7),(8.8),(8.9),(8.10) a cada región en dos niveles de descomposición con base de Haar. Como resultado se obtiene un vector de 24 elementos $(f_1, \dots, f_{24})$ por cada región de tamaño $k \times k$.

En la figura 8.3 se muestra un ejemplo sobre flores de un ejemplar de Petunia, de las imágenes que se obtienen al aplicar las transformadas de Wavelet a dos niveles de descomposición.

Figura 8.3: Resultado de aplicar transformadas de Wavelet a dos niveles de descomposición. (a) Imagen original, (b) Primer nivel de descomposición sobre imagen original. Las 4 subimágenes obtenidas corresponden de izquierda a derecha y de arriba a abajo con: horizontal (LH), aproximación (LL), vertical (HL) y diagonal (HH). (c) Segundo nivel de descomposición aplicado sobre la aproximación del primer nivel. Las 4 subimágenes corresponden con las mismas descritas en (b).

Proceso de clasificación

En este trabajo se han utilizado tres algoritmos de aprendizaje automatizado: kNN, NBC y SVM. Los algoritmos elegidos pertenecen al tipo de clasificadores supervisados. Estos algoritmos requieren de una fase previa de entrenamiento antes de ejecutar el proceso de clasificación propiamente dicho.

kNN es un clasificador no paramétrico que permite la clasificación de objetos en un espacio multidimensional. Después de haber sido entrenado, kNN asigna un nuevo objeto a una clase determinada dependiendo de la clase a la que pertenezcan sus vecinos más próximos. La métrica para calcular la dis-

tancia a los vecinos puede ser variable. La más común es la distancia euclídea aunque existen otras muchas, como la distancia de Hamming, Minkowski, Mahalanobis o Manhattan basadas en distancias métricas y otras basadas en similitudes como covarianzas, correlaciones, índice de Jacard, etc. La implementación de kNN requiere la asignación de un valor entero k . Este es el parámetro que representa en número de vecinos usados para tomar la decisión sobre la clase a la que asignar la nueva observación. La óptima determinación del valor de k permitirá que el modelo se ajuste correctamente a futuros datos [284]. Es recomendable utilizar datos normalizados cuando se utilizan este tipo de clasificadores, para evitar que variables de valores altos, tengan más peso que otras sobre el clasificador.

NBC es un clasificador probabilístico basado en métodos bayesianos. Concretamente se basa en el teorema de la probabilidad condicionada de Bayes para calcular, sobre el conjunto de datos de entrenamiento, la probabilidad observada de cada clase en función de los valores de las características. Una vez entrenado el clasificador, cuando es utilizado sobre nuevos datos sin etiquetar –sin asignar a ninguna clase–, utiliza esas probabilidades para determinar la clase más probable a la que debería ser asignada la nueva observación. Al ser un clasificador que trabaja con probabilidades no es necesaria la normalización de los datos.

SVM es un algoritmo de clasificación supervisada donde dado un conjunto de datos de entrenamiento etiquetados, el algoritmo calcula la frontera que divide a los datos de las diferentes categorías y categoriza nuevas observaciones. El objetivo de SVM es crear una frontera denominada hiperplano, que conduce a particiones homogéneas de los datos a ambos lados de la frontera. SVM puede ser extendido a problemas donde los datos no son linealmente separables mediante el empleo de diferentes funciones de transformación denominadas funciones *kernel*. SVM puede adaptarse a casi cualquier tarea de aprendizaje incluyendo la clasificación y predicción, obteniendo mejores resultados generalmente cuando se aplica normalización sobre los datos.

En este trabajo se han utilizado tanto los datos “crudos” como normalizados con dos tipos de normalización sobre los vectores de características: dn0 –sin normalización–, dn1 –normalización mediante la media y la desviación

típica– y dn2 –normalización mediante la moda y la desviación típica–. El espacio de características de cada clase esta compuesto por una matriz de tamaño $m \times n$ (8.11).

$$f_{ij}^{nC} = \begin{bmatrix} f_{11}^1 & \dots & f_{1n}^1 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ f_{m1}^1 & \dots & f_{mn}^1 \\ & \vdots & \\ f_{11}^{nC} & \dots & f_{1n}^{nC} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ f_{m1}^{nC} & \dots & f_{mn}^{nC} \end{bmatrix} \quad \forall i = 1, \dots, m; j = 1, \dots, n; nC = 1, 2 \quad (8.11)$$

Donde la fila i representa al vector de características i de una clase concreta formado por n características. m representa el número de vectores que caracterizan una clase concreta y nC el número de clases en el espacio de características.

El espacio de características normalizado F_{ij}^{nC} , dependiendo del tipo de normalización –dn0, dn1, dn2– es calculada como se muestra en la ecuación (8.12)

$$F_{ij}^{nC} = \begin{bmatrix} \frac{f_{11}^1 - st_1}{st_2} & \dots & \frac{f_{1n}^1 - st_1}{st_2} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{f_{m1}^1 - st_1}{st_2} & \dots & \frac{f_{mn}^1 - st_1}{st_2} \\ & \vdots & \\ \frac{f_{11}^{nC} - st_1}{st_2} & \dots & \frac{f_{1n}^{nC} - st_1}{st_2} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{f_{m1}^{nC} - st_1}{st_2} & \dots & \frac{f_{mn}^{nC} - st_1}{st_2} \end{bmatrix} \rightarrow \begin{cases} dn0 & \begin{cases} st_1 = 0 \\ st_2 = 1 \end{cases} \text{ rawdata} \\ dn1 & \begin{cases} st_1 = mean(f_{ij}^{nC}) \\ st_2 = StdDes(f_{ij}^{nC}) \end{cases} \\ dn2 & \begin{cases} st_1 = mean(f_{ij}^{nC}) \\ st_2 = StdDes(f_{ij}^{nC}) \end{cases} \end{cases} \quad (8.12)$$

Con el fin de obtener un mejor resultado en el proceso de clasificación, los diferentes algoritmos han sido probados con distintos parámetros de configuración. kNN se ha probado con distancia euclídea y distancia de Minkowski,

Configuration	kNN	NBC	SVM
Método	Euclídea, Min-kowski	Gauss, KSF	Lineal, cuadrática
Normalización	dn0, dn1, dn2	dn0	dn1, dn2
Validación	LOOCV, ROC	LOOCV, ROC	LOOCV, ROC
Clases	2	2	2

Tabla 8.1: Combinación de parámetros, normalizaciones y validaciones empleados con los diferentes algoritmos de ML

ambos con los tres tipo de normalización. NBC se ha probado con funciones de Gauss y Kernel suavizado (Kernel Smoothing Functions o KSF) con datos sin normalizar. Por último, SVM se ha probado con funciones *kernel* lineales y cuadráticas con los tres tipo de normalización. Todos los clasificadores se han entrenado para dos clases “órgano” y “fondo”.

En todos los métodos expuestos, se ha aplicado la validación cruzada excluyendo uno (leave-out one cross validation o LOOV) para medir el error del clasificador. Básicamente el método LOOCV extrae una observación del conjunto de datos de entrenamiento y construye el clasificador con el resto. A continuación, evalúa el error al clasificar la observación que ha quedado fuera. Esta operación se repite para todas las observaciones del conjunto. Finalmente, LOOCV calcula la media de los errores y se obtiene la medida de cómo el modelo ajusta los datos. Este método permite comparar los resultados de los diferentes algoritmos, siempre que se apliquen al mismo conjunto de datos. La tabla 8.1 resume los diferentes parámetros de configuración de los algoritmos.

8.2.3. Validación del algoritmo

Con el fin de validar el funcionamiento del sistema de fenotipado descrito en el capítulo 7 y el algoritmo de segmentación desarrollado, se han procedido a alojar en la cámara de cultivo especímenes de *Antirrhinum majus* y *Antirrhinum linkianum* para su grabación. El dispositivo de captura se ha situado en posición cenital sobre las plantas objeto de estudio. El panel LED de día ha quedado situado sobre las plantas junto a la cámara, mientras que el panel NIR LED ha quedado a 45° de la vertical.

La adquisición de datos ha tenido lugar durante un periodo de 6 días. Se han obtenido imágenes cada 10 min durante el día y la noche, fijando unos ciclos de luz oscuridad de 12:12 horas. Durante el ciclo nocturno el panel NIR LED ha sido encendido un total de 6 segundos en cada captura de imagen –3 segundos antes y 3 segundos después de cada captura–.

En este experimento se han obtenido un total de 864 imágenes, 432 imágenes en color procedentes del sensor RGB, que posteriormente han sido transformadas al espacio de color CIE L*a*b* y otras 432 imágenes en escala de grises procedentes del sensor NIR. Para cada grupo de imágenes –RGB y NIR–, se han seleccionado un subconjunto de 50 imágenes *ground truth*¹ que han sido segmentadas manualmente por personal experto. De estas 50 imágenes se han obtenido 1200 muestras de tamaño 1 x 1 píxel que se ha empleado para entrenar a los algoritmos de ML en la clasificación de las imágenes RGB. De un segundo grupo de 50 imágenes *ground truth* NIR se han tomado otras 1200 regiones de 32 x 32 píxeles, que han sido utilizadas para entrenar a los algoritmos de ML en la clasificación de las imágenes NIR. En ambos casos se han seleccionado 600 submuestras pertenecientes a la clase “órgano” y otras 600 pertenecientes a la clase “fondo” (Fig. 8.4).

8.3. Resultados y discusión

Se han evaluado los resultados de la fase de entrenamiento de los algoritmos con LOOCV y mediante curvas de características operativas del receptor (Receiver Operating Characteristic o ROC) sobre el conjunto de datos de entrenamiento obtenido de las imágenes RGB y NIR. LOOCV y ROC se han aplicado a los diferentes algoritmos y configuraciones mostradas en la tabla 8.1. Esto permite seleccionar el algoritmo óptimo para aplicarse a cada tipo de imagen dependiendo de si fue capturada durante el día o durante la noche. Una vez determinado éste para cada tipo de imagen, se ha empleado la métrica de clasificación errónea [284] –*miss-classification*– para evaluar el desempeño final de la implementación de los algoritmos de ML.

¹Terminología empleada en diversas áreas para referirse a la verdad empírica de algo

8.3.1. LOOCV

En la tabla 8.2 se muestran los errores obtenidos de aplicar LOOCV a los dos tipos de imágenes. En ambos grupos, el mínimo error obtenido ha sido por el modelo predictivo generado por kNN. La normalización de datos basada en la media –dn1– produce, así mismo, los mejores resultados en ambos casos. El máximo error se obtiene con el clasificador NBC con los dos kernel KSF y Gauss respectivamente.

	Clasificador	kNN		NBC		SVM	
	Norm.	Euclídea	Minkowski	Gauss	KSF	Lineal	Cuadrática
Color	dn0	0.0283	0.0433	0.0750	0.0758	-	-
	dn1	0.0242	0.0467	-	-	0.0533	0.0383
	dn2	0.0243	0.0433	-	-	0.0667	0.0450
NIR	dn0	0.0288	0.0394	0.0356	0.0319	-	-
	dn1	0.0169	0.0281	-	-	0.0326	0.0319
	dn2	0.0288	0.0394	-	-	0.0344	0.0325

Tabla 8.2: Errores obtenidos con LOOCV aplicado a las distintas combinaciones de algoritmos y configuraciones

8.3.2. Curvas ROC

Se ha realizado una segunda evaluación del rendimiento de los algoritmos de ML utilizando curvas ROC. Este tipo de representación está concebida para comparar la sensibilidad² frente a $1 - \text{especificidad}$ ³ a varios niveles de umbralización [285]. La figura 8.5 permite comparar los resultados obtenidos entre los distintos algoritmos.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{TP}{TP + FN} \quad (8.13)$$

²Ratio de verdaderos positivos TP frente al total de positivos(8.13)

³1 - ratio de verdaderos negativos TN frente al total de negativos (8.14)

$$Especificidad = \frac{TN}{TN + FP} \quad (8.14)$$

El área bajo la curva (Area Under Curve o AUC), normalmente, es utilizada en ML para comparar la efectividad de modelos estadísticos. Este área corresponde con la integral de la curva ROC entre 0 y 1. Puede interpretarse como la probabilidad de que se clasifique una observación positiva y una negativa escogidas al azar correctamente[286, 287].

En la figura 8.5 muestra las curvas ROC para las imágenes en color (RGB). Los valores más altos de AUC se han obtenido para kNN con distancia euclídea. Respecto al tipo de normalización, se han obtenido resultados similares con los datos sin normalizar –dn0– y los datos normalizados basados en la moda –dn2– (Tab. 8.3).

La figura 8.6 muestra las curvas ROC calculadas sobre el conjunto de imágenes NIR. Se ha podido observar que los mejores resultados se han obtenido con el clasificador SVM con función cuadrática y con los datos normalizados basado en la media –dn1–. En la tabla 8.3 se recogen los valores de las AUC obtenidos de todas las curvas ROC mostradas en las figuras 8.5 y 8.6.

	Clasificador	kNN		NBC		SVM	
	Norm.	Euclídea	Minkowski	Gauss	KSF	Lineal	Cuadrática
Color	dn0	0.9984	0.9974	0.9542	0.9778	-	-
	dn1	0.9979	0.9976	-	-	0.9622	0.9875
	dn2	0.9984	0.9974	-	-	0.0.9496	0.9886
NIR	dn0	0.9987	0.9979	0.9877	0.9963	-	-
	dn1	0.9975	0.9993	-	-	0.9867	1.000
	dn2	0.9987	0.9979	-	-	0.9868	0.9932

Tabla 8.3: Valores de las AUC obtenidas para las curvas ROC calculadas en este trabajo

En ambos casos –RGB y NIR– después del proceso de clasificación, se ha llevado a cabo un post-procesado de la imagen que ha consistido en operaciones morfológicas –dilatación y erosión– para suavizar y un filtro de área para eliminar ruido y pequeñas partículas de la imagen. Las imágenes segmentadas

han sido combinadas con sus respectivas originales a modo de máscara par obtener el resultado final (Figs. 8.7, 8.8).

8.4. Error de segmentación

La medida del error obtenido por una clasificación errónea (Misclassification Error o ME) está calculada como un porcentaje de los píxeles de “fondo” –o de “órgano”– que están incorrectamente clasificados como “órgano” o viceversa. El error se puede calcular mediante la ecuación (8.15), donde B_{GT} “fondo verdadero” –*Background Ground-Truth*– y O_{GT} “órgano verdadero” –*Object Ground-Truth*–, representan las imágenes manualmente clasificadas que contienen los correctos fondos y órganos. B_T –*Background Test*– y O_T –*Object Test*– representan las imágenes a evaluar que han sido automáticamente clasificadas. Las imágenes se comparan píxel a píxel. En los casos donde el píxel test coincide con el patrón, el error de clasificación será cero y por tanto la eficacia de segmentación es máxima.

$$ME = \frac{|B_{GT} \cap B_T| + |O_{GT} \cap O_T|}{|B_{GT}| + |O_{GT}|} \quad (8.15)$$

Finalmente, el rendimiento de la implementación de los algoritmos se obtiene de acuerdo a la siguiente expresión (8.16):

$$\eta = 100 \cdot (1 - ME) \quad (8.16)$$

La tabla 8.4 muestra las medias de los valores calculados después de segmentar las 50 imágenes “ground-truth” de cada grupo con el algoritmo óptimo –kNN y SVM– seleccionados en la subsección sección anterior 8.3.2.

El rendimiento obtenido de la segmentación automática de las imágenes muestra porcentajes muy altos de acierto en ambos clasificadores (Tab.8.4). Ha sido necesario aumentar la complejidad de los vectores de características en las imágenes NIR –empleando transformadas de Wavelet– para obtener unos resultados similares a los obtenidos con las imágenes RGB. Esto es

Clasificador	kNN	SVM
Rendimiento	99,311 %	99,342 %

Tabla 8.4: Rendimiento obtenido de la segmentación automática de las imágenes, medido como porcentaje medio de imágenes correctamente clasificadas.

posiblemente algo esperado, puesto que las imágenes RGB contienen tres veces más información que las imágenes NIR.

Figura 8.4: De las 864 imágenes obtenidas, se han seleccionado 50 RGB y 50 NIR. Sobre esta selección se ha realizado para el caso de RGB un muestreo de 600 píxeles sobre fondo de la escena y 600 sobre hoja –órgano–. En el caso de las imágenes NIR el muestreo se ha realizado con 600 cuadrículas de 32 x 32 píxeles sobre el fondo y otras 600 cuadrículas iguales sobre hoja.

Figura 8.5: Resultados de las curvas ROC para imágenes RGB. (a) kNN con distancia euclídea y normalizaciones dn0, dn1, dn2; (b) kNN con distancia de Minkowski y normalizaciones dn0, dn1 y dn2; (c) NBC con kernels de Gauss y KSF y normalización dn0; (d) SVM con kernels lineal y cuadrático y normalizaciones dn1 y dn2

Figura 8.6: Resultados de las curvas ROC para imágenes NIR. (a) kNN con distancia euclídea y normalizaciones dn0, dn1, dn2; (b) kNN con distancia de Minkowski y normalizaciones dn0, dn1 y dn2; (c) NBC con kernels de Gauss y KSF y normalización dn0; (d) SVM con kernels lineal y cuadrático y normalizaciones dn1 y dn2

Figura 8.7: Resultados de la segmentación de imágenes RGB basada en el clasificador kNN en diferentes estadios de crecimiento. La columna de la izquierda muestra cuatro imágenes color originales. La segunda columna presenta los resultados de la segmentación con kNN, distancia euclídea y sin normalización –dn0–. La tercera columna, es el resultado final, tras aplicar post-procesado y enmascarado sobre imagen original.

Figura 8.8: Resultados de la segmentación de imágenes NIR basada en el clasificador SVM en diferentes estadios de crecimiento tomadas durante la noche. La columna de la izquierda muestra cuatro imágenes originales en escala de grises. La segunda columna presenta los resultados de la segmentación con SVM, con kernel cuadrático y normalización basada en la media $-dn1-$. La tercera columna, es el resultado final, tras aplicar post-procesado y enmascarado sobre imagen original.

Capítulo 9

Aplicación al estudio de líneas silenciadas en genes del reloj

Dos procesos fundamentales que dirigen el crecimiento de las plantas, división y expansión celular, están bajo el control del reloj circadiano [33]. Este reloj, como se ha dicho, es regulado por las señales rítmicas que generan la alternancia entre el día y la noche.

En este capítulo se describen una serie de experimentos, cuyo objetivo es aplicar el sistema de fenotipado al seguimiento de especímenes silvestres (wild type o WT) y transgénicos silenciados del reloj circadiano, y comprobar cómo puede afectar al crecimiento una alteración en uno de los elementos del reloj.

9.1. Modelos aditivos generalizados aplicados al estudio del crecimiento de plantas

Del estudio del crecimiento de plantas mediante sistemas de visión artificial, se obtiene en un primer momento, información en forma de un conjunto de imágenes a lo largo de todo el ciclo de grabación. Cada imagen es utilizada para obtener una serie de parámetros de interés, como puede ser: longitud de la flor, ángulo de ésta, longitud de tallo, área de la hoja, etc. La representación gráfica de cualquiera de las medidas referidas al crecimiento, da como resultado una representación discretizada a lo largo del tiempo (Fig. 9.1).

Aunque esta representación, bien sea mediante puntos o líneas puede dar idea de la manera en que se está produciendo el crecimiento, no aporta información precisa de éste. Puede ser útil conocer la tasa máxima de crecimiento a lo largo de todo el periodo, en un rango del periodo determinado, o poder comparar el crecimiento de órganos de distintos individuos. Para obtener esta información, se recurre a la aproximación de esta representación a un modelo de ajuste, que reproduzca lo más fielmente posible el crecimiento.

Figura 9.1: Representación de medidas discretas correspondientes al crecimiento de la flor de *Antirrhinum majus*

El modelo de ajuste más sencillo de implementar y describir es el modelo lineal. Tiene como ventaja su facilidad de interpretación e inferencia. Sin embargo, en ocasiones es limitado a la hora de modelar comportamientos algo más complejos [285].

Otros modelos más sofisticados pretenden solventar las limitaciones de los modelos lineales. Estos modelos incluyen los modelos polinomiales como extensión de los lineales, las funciones escalonadas, regresión mediante splines ¹, splines suavizados, regresión local y los modelos aditivos generalizados (Generalized Additive Models o GAM) [288].

¹Curva diferenciable definida en porciones mediante polinomios

Básicamente un modelo lineal viene dado por la expresión:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \epsilon_i$$

donde ϵ_i es el término error, x_i el predictor y β_n los parámetros del modelo. La extensión a un modelo polinomial implica añadir tantos términos como grados tenga el polinomio, quedando la expresión del modelo de la siguiente forma:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \beta_2 x_i^2 + \beta_3 x_i^3 + \cdots + \beta_d x_i^d + \epsilon_i$$

Finalmente, un modelo aditivo generalizado proporciona un entorno de trabajo general que extiende los modelos lineales estándar, permitiendo añadir funciones no lineales a cada variable. La forma más natural de extender estos modelos lineales de manera que se permitan relaciones no lineales entre la variable respuesta y las predictoras, consiste en remplazar cada componente lineal por una función no lineal. El modelo, por tanto, podría ser escrito como:

$$y_i = \beta_0 + f_1(x_{i1}) + f_2(x_{i2}) + \cdots + f_p(x_{ip}) + \epsilon_i.$$

$$= \beta_0 + \sum_{j=1}^p f_j(x_{ij}) + \epsilon_i$$

El modelo se denomina aditivo, porque cada término es calculado independientemente y a continuación se añaden en conjunto todas las contribuciones.

Los GAMs permiten ajustar funciones no lineales, pueden ser empleados con un sólo predictor o múltiples predictores y potencialmente, pueden realizar predicciones más precisas. Además, al ser un modelo aditivo puede examinarse el efecto de un predictor individualmente mientras se mantienen fijas las demás variables [285, 288, 289].

El método más habitual para medir la bondad de ajuste de un modelo de regresión, es mediante el coeficiente de determinación (R^2) y su variante R^2 ajustado –corregido por el tamaño muestral y el número de predictores–. El coeficiente de determinación viene dado por suma de cuadrados del error y la suma de cuadrados total según la siguiente expresión:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum (y - \bar{y})^2}$$

Donde y corresponde a los valores de la variable respuesta, $\bar{y}$ el valor medio de dicha variable y $\hat{y}$ son los valores estimados del modelo –valores respuesta estimados–. Finalmente, la expresión del R^2 ajustado quedará como:

$$R_{adjust}^2 = 1 - \frac{(1 - R^2)(N - 1)}{N - p - 1}$$

Siendo N el tamaño de la muestra y p el número de variables predictoras. Éste toma valores entre 0 y 1, siendo 1 un ajuste perfecto. En la tabla 9.1 se muestran los valores de R^2 ajustado correspondientes a los modelos mostrados en la figura 9.2. Como se puede observar GAM con un 96 % muestra un mejor ajuste seguido por el modelo de regresión local polinomial (loess) y el modelo de regresión polinomial global. Finalmente el modelo lineal aporta el peor ajuste de los cuatro, para este conjunto de datos.

	Lineal	Polinomial	Polinomial local	GAM
R_{ajust}^2	0.6017	0.9259	0.9404	0.9601

Tabla 9.1: Coeficientes de determinación correspondiente a cuatro modelos de ajuste

Por todo ello, en este trabajo se han empleado los GAMs como modelos de ajuste de las curvas de crecimiento, de forma que permitan interpretar y comparar estas representaciones discretas de diferentes individuos. En la figura 9.2 se muestra el resultado de aplicar diferentes modelos sobre la misma curva de crecimiento de una flor de *Antirrhinum majus*.

Figura 9.2: Diferentes modelos de ajuste sobre medidas discretas de crecimiento: (a) Un modelo lineal básico proporciona un pobre ajuste sobre una representación discretizada del crecimiento como la de la imagen. (b) Un ajuste polinomial de grado 3 mejora considerablemente el ajuste y podría ser suficiente en algunos casos. (c) El modelo de regresión polinomial local proporciona un ajuste satisfactorio en la mayor parte de los casos. (d) GAM proporciona un ajuste mucho más preciso que cualesquiera de los otros modelos.

9.2. Silenciamiento del gen *LATE ELONGATED HYPOCOTYL*, *AmLHY* de *Antirrhinum majus*

9.2.1. Especímenes y configuración

En este experimento, se han empleado ejemplares de *Antirrhinum majus* (boca de dragón). Perteneciente a la familia *Plantaginaceae*, es una familia con cerca de 2000 especies, muchas de ellas de importancia comercial por su uso ornamental. Los *Antirrhinum* son plantas bianuales o perennes, con base algo leñosa de crecimiento ascendente y recto. Poseen inflorescencias en racimos y corola de hasta casi 5 cm y polinización entomófila [290].

Los especímenes seleccionados han sido una línea silvestre *Antirrhinum majus Sippe50* y uno transgénico iRNA:AmLHY27.

El sistema de grabación se ha dispuesto con el dispositivo de captura en posición frontal a las plantas. Se ha realizado un ciclo de grabación día/noche 12h/12h (Fig. 9.3), capturando imágenes cada 10 minutos durante un periodo de 8 días y 7 horas. Finalmente se ha obtenido un total de 1195 imágenes. Por consiguiente, durante las 12 horas del periodo diurno, el LED RGB está activado ininterrumpidamente mientras que durante las 12 horas del periodo nocturno hay oscuridad total y sólo se activa el LED NIR los instantes –6 segundos– necesarios para capturar la imagen.

Una vez finalizado el ciclo de grabación, se obtienen medidas mediante un procedimiento semiautomatizado, en el que una serie de scripts Bash y R [291], se encargan de preprocesar las imágenes, leerlas secuencialmente, produciendo una espera entre imágenes, hasta que el analista marque los puntos de medida y automáticamente se guardan las coordenadas de los puntos y calcula los parámetros de interés –longitud y ángulo de la flor–. A pesar de que las imágenes han sido obtenidas cada 10 minutos, se han tomado medidas cada 2 horas, ya que la variación de la longitud es casi inapreciable en periodos muy cortos. Las medias se han obtenido de 3 flores WT y 3 flores *iRNA:AmLHY27*,

Figura 9.3: Esquema de los ciclos día/noche 12/12 de iluminación y captura en *Antirrhinum majus*

desde el comienzo de su desarrollo hasta la apertura de la última flor.

9.2.2. Resultados y discusión

A partir de las medidas obtenidas, se han elaborado las curvas de crecimiento de las 6 flores estudiadas –3 de individuos WT y 3 de transgénicos–. Los resultados muestran un efecto del silenciamiento de *AmLHY* sobre la velocidad de crecimiento de las flores (Fig. 9.4).

La tasa máxima promedio alcanzada por *iRNA:AmLHY* (0.204) ha sido aproximadamente el 56 % de la obtenida por sus hermanas no transgénicas (0.342). El crecimiento máximo ha sido en *iRNA:AmLHY*, en promedio (24.5), el 77,28 % de la obtenida por las flores de WT (31.7). Finalmente, el área bajo la curva promedio, ha alcanzado en *iRNA:AmLHY* (2676) un 53,8 % el valor de sus hermanas WT (4974). Todo ello con datos obtenidos a partir de los GAMs con valores de ajuste entre un 96,3 % y un 99,6 % (Tab. 9.2).

Por lo que se ha podido analizar, la duración del periodo de crecimiento de la flor ha sido similar en WT y en *iRNA:AmLHY27* lo que podría indicar que la modificación de este componente del reloj circadiano estaría afectando más a la velocidad de crecimiento de las flores que a la duración del mismo.

El tamaño de los órganos laterales de una planta, son el resultado de una combinación de división celular y expansión. Distintos mutantes que afectan a estos procesos en *Antirrhinum*, muestran que el crecimiento del pétalo puede estar afectado por diversos genes lo que indica una compleja coordi-

Figura 9.4: Curvas de crecimiento de 3 flores WT y 3 flores *iRNA:AmLHY* de *Antirrhinum majus*

nación [292]. Es sabido que el reloj circadiano controla la expansión celular, por lo que consideramos que los parámetros florales que se ven especialmente

afectados por el silenciamiento de *LHY* son altamente dependientes de este proceso de expansión.

Estos resultados difieren de los encontrados en solanáceas, pues parece que la regulación de *LHY* no afecta al tamaño floral en *Nicotiana* o *Petunia* [293, 41].

Tipo	Tasa máx.	Tasa media	Crecimiento máx.	Área	Adj.R ²
A.majus	0.407	0.097	32.757	5476.230	0.9633489
A.majus	0.204	0.075	27.340	4550.974	0.9805851
A.majus	0.414	0.128	34.883	4894.821	0.9898629
<i>iRNA:AmLHY</i>	0.180	0.112	26.202	2660.451	0.9957992
<i>iRNA:AmLHY</i>	0.180	0.087	20.425	1762.711	0.9945613
<i>iRNA:AmLHY</i>	0.252	0.112	26.951	3604.088	0.9756074

Tabla 9.2: Resultados de crecimiento de diferentes flores WT y *iRNA:AmLHY*. La tasa máxima indica el punto donde la velocidad de crecimiento alcanza su máxima velocidad. La tasa media es la media de las derivadas a lo largo de la curva. Crecimiento máximo es el valor máximo en mm alcanzado por la flor. Área indica la integral de la curva (área bajo la curva) y $Adj.R^2$ es el coeficiente de bondad de ajuste del modelo.

La sincronización de la división y la expansión celular juegan un papel clave en el desarrollo de la planta. Tanto la duración del periodo de crecimiento, como la tasa de crecimiento determinan el tamaño final de un órgano. Nuestro análisis fenotípico de la flor de *Antirrhinum* muestra que el periodo de crecimiento no está controlado por *AmLHY*, mientras que la tasa de crecimiento se reduce sustancialmente. Cabe concluir que la tasa de crecimiento, dependiente de división y expansión celular se ve positivamente regulada por *AmLHY*. Esta hipótesis requeriría de pruebas adicionales a nivel histológico y/o molecular.

9.3. Silenciamiento del gen *ZEITLUPE*, *PhZTL* de *Petunia x hybrida*

9.3.1. Especímenes y configuración

Se han seleccionado ejemplares WT y transgénicos para ZTL del híbrido de *Petunia x hybrida*. Pertenecientes a la familia *Solanaceae*, una gran familia de enorme interés ornamental y alimentario, pues incluye además del mencionado género *Petunia sp.*, otros como el género *Nicotiana sp.* o el género *Solanum sp.* Las petunias, son plantas herbáceas anuales o perennes de tallo pubescente pegajoso, hojas sésiles o pecioladas y flores generalmente blancas y perfumadas situadas en las axilas de las hojas superiores, fruto en cápsula y polinización básicamente entomófila [294].

Se han utilizado tres líneas de petunia del fondo genético W115 Mitchell. Una línea azigota no transgénica –WT– y dos líneas independientes *iRNA:PhZTL* (*iRNA:PhZTL3* y *iRNA:PhZTL10*) que expresa una construcción de RNAi cuya función es silenciar al gen *PhZTL*.

El sistema de fenotipado descrito en el capítulo 7, se ha configurado, al igual que en el caso de *A.majus* con el dispositivo de captura en posición frontal. Se han tomado imágenes cada 10 min. durante 5 días y 16 horas en el caso de la línea 3 y de 3 días para la línea 10, obteniendo un total de 816 y 444 imágenes respectivamente.

Los sistemas de iluminación, se han configurado de manera que el LED RGB –que simula periodo diurno– permanece encendido durante 8 horas. Durante este periodo sólo el CCD RGB del sistema de captura es activado, por consiguiente el periodo nocturno se prolonga 16 horas (Fig. 9.5).

Siguiendo el mismo procedimiento explicado en la sección anterior (Sec. 9.2.1), se ha realizado similar procesamiento de imágenes y automatización en el sistema de obtención de datos. Para el análisis, se han seleccionado imágenes en intervalos de una hora para la línea 3 y de dos horas para la línea 10.

Figura 9.5: Esquema con la configuración de los ciclos día/noche 8/16 de iluminación y captura en *Petunia x hybrida*

9.3.2. Resultados y discusión

El silenciamiento de ZTL causa un incremento en el tiempo de floración comparada con la no transgénica [295], que en el caso de *Petunia* puede oscilar entre 3 y 7 semanas. Se ha analizado el crecimiento de la flor hasta el momento de su apertura. Los datos muestran una tendencia que pone de manifiesto que las flores transgénicas de *PhZTL* son ligeramente más pequeñas que sus hermanas silvestres con un mismo tiempo de crecimiento. Las diferencias no son lo suficientemente significativas como para poder concluir que el silenciamiento del gen afecte claramente a la longitud del tubo floral. En la línea 3 esa diferencia es más evidente (Fig. 9.6). El crecimiento máximo en la flor transgénica es un 63,1 % el crecimiento máximo de WT, con una tasa media de crecimiento a lo largo del periodo de un 71 % el de su hermana WT. Finalmente la flor WT alcanzó una longitud de algo más de 57mm frente a los casi 40mm de la flor transgénica (Tab. 9.3).

Tipo	Tasa máx.	Tasa media	Crecimiento máx.	Área	Adj.R2
Ph WT	0.870	0.380	57.478	3609.446	0.999
iRNA:PhZTL3	0.549	0.271	39.545	2335.422	0.998

Tabla 9.3: Resultados de crecimiento de diferentes flores WT y *iRNA:PhZTL3*.

La línea 10, sin embargo, no muestra unas diferencias tan claras entre ambas flores (Fig. 9.7). La tasa máxima de crecimiento es tan sólo un 30 %

Figura 9.6: Curvas de crecimiento de 1 flor WT y 1 flor *iRNA:PhZTL* de la línea 3 de *Petunia x hybrida*

superior en la flor WT frente a la transgénica, mientras que la tasa de crecimiento media supera la variedad transgénica a la silvestre en un 0,06 %. Por último, el tamaño final de las flores antes de su apertura, muestra una diferencia de algo más de 2 mm a favor del individuo silvestre (Tab. 9.4).

Figura 9.7: Curvas de crecimiento de 1 flor WT y 1 flor *iRNA:PhZTL* de la línea 10 de *Petunia x hybrida*

A pesar de que el tiempo de floración se retrase de 3 a 7 semanas en individuos en los que existe silenciamiento de PhZTL, una vez iniciado el desarrollo floral, no parece mostrar una diferencia en la duración del periodo de crecimiento. Puesto que las diferencias en el tamaño de la flor no son claramente significativas, consideramos que debe existir una compleja impli-

Tipo	Tasa máx.	Tasa media	Crecimiento máx.	Área	Adj.R2
Ph WT	1.136	0.409	61.235	3557.612	0.999
iRNA:PhZTL3	0.871	0.435	59.000	3231.599	0.997

Tabla 9.4: Resultados de crecimiento de diferentes flores WT y *iRNA:PhZTL10*.

cación de diferentes genes involucrados en el control del crecimiento de las flores o mecanismos que compensen la ausencia de expresión de PhZTL y aseguren el desarrollo de los órganos reproductores de la planta, algo vital para la supervivencia de la especie.

Se ha analizado el ángulo del eje longitudinal de las flores respecto a la horizontal, como parámetro relacionado con la polinización, que en *Nicotiana attenuata* es regulado por NaZTL [41]. En este caso, tanto silvestre como transgénico tienen un patrón similar de movimiento de la flor. En la línea 3 las flores transgénicas tienen siempre un mayor ángulo que sus hermanas silvestres (Fig. 9.8 a). En el caso de la línea 10, no se observa un patrón claro, salvo en la tercera noche (Fig. 9.8 b). Se puede observar en ambos casos, una vez que las plantas han sido introducidas en la cámara de cultivo y sometidas a nuevas condiciones de iluminación y temperatura, necesitan un periodo de adaptación de entre 2-3 días hasta que el movimiento de las flores se vuelve rítmico. Probablemente sea ese el motivo por el que los ejemplares de la línea 10 no llega a observarse ritmicidad, salvo el final del periodo de grabación –tercer día–.

Figura 9.8: Curvas de movimiento de flores de Petunia. (a) Línea 3 y WT. Se observa un patrón similar en ambas plantas aunque con mayor variación de ángulo en la variedad trasgénica. (b) Línea 10 y WT tienen en común la ausencia de un patrón de movimiento

Parte III

Conclusiones Finales

Capítulo 10

Conclusiones y trabajos futuros

10.1. Conclusiones

El fenotipado de plantas se muestra como una disciplina de suma importancia para la validación de nuevas líneas genéticas, más productivas y rentables, necesarias para satisfacer la creciente demanda de alimentos que requiere la población mundial. Los avances tecnológicos y científicos, con el desarrollo de ciencias ómicas, como la genómica, ha abierto una brecha entre nuestra enorme capacidad de producir nuevas líneas genéticas, y nuestra capacidad para fenotipar dichas líneas. El desarrollo en los últimos años del fenotipado de alto rendimiento, está consiguiendo acotar esta distancia. Son muchos los sistemas de fenotipado desarrollados en los últimos años. Cada uno con unas características específicas orientadas a la consecución de un objetivo concreto. Sistemas basados en tomografía para el estudio del desarrollo radicular, sistemas basados en termografía para medir evapotranspiración, sistemas 3D para estimación de biomasa, etc. A pesar de ello, son escasos los sistemas reportados en la literatura que aborden el estudio de la cinética de crecimiento de las plantas.

El objetivo principal de esta tesis ha sido el desarrollo de un sistema de fenotipado basado en visión artificial que facilite el estudio del crecimiento en términos absolutos y en términos de velocidad, de plantas silvestres y plantas con genes silenciados del reloj circadiano. Este sistema no solo incluye infraestructura, sino también metodología de análisis a distintos niveles.

En este trabajo se ha diseñado e implementado una configuración de hardware que permite capturar imágenes de plantas de forma totalmente configurable y automatizada. El sistema muestra un desempeño de manera fiable en condiciones de humedad y temperatura poco adecuadas para la mayoría de dispositivos electrónicos de uso común. Esto se ha logrado gracias a la selección de componentes de uso habitualmente industrial, desarrollados para trabajar en condiciones extremas.

El software se ha desarrollado de forma modular, de esta manera, permite con modificaciones de sólo una pequeña parte del código, un cambio del dispositivo de captura, para adaptarlo a nuevas necesidades que puedan surgir. El hecho de estar programado en C++ tiene el inconveniente de tener que compilarlo específicamente para la plataforma informática donde se va a ejecutar, sin embargo, es un lenguaje altamente eficiente, lo que hace que maneje con fluidez el flujo de datos y órdenes entre los diferentes dispositivo del sistema.

Uno de los principales problemas en el fenotipado de plantas, es la segmentación de las imágenes con el objetivo de aislar y clasificar de forma específica las partes de la planta objeto de estudio. Existen multitud de algoritmos relacionados con la visión artificial y desarrollados para tal fin. La problemática encontrada en este trabajo ha sido proporcionar una metodología que permita la segmentación de imágenes con una iluminación particular –adecuada para favorecer el crecimiento vegetal, pero muy poco adecuada para la captura de imágenes–. Por otro lado, el hecho de capturar imágenes durante el día con unas condiciones de iluminación y durante la noche con otras, hace que el abordaje del problema sea más complejo. Por ello, se ha desarrollado una metodología de segmentación inicialmente diferente, según se trate de un tipo de imagen u otro. La validación de estos métodos, en ambos casos, gracias a la combinación de un procedimiento específico de obtención de vectores de características y la aplicación de algoritmos de aprendizaje automatizado, ha dado resultados muy satisfactorios con rendimiento cercano al 100 % en la segmentación de hojas teniendo como fondo el sustrato y cámara en posición cenital.

El desarrollo del sistema ha permitido realizar diferentes ciclos de graba-

ción, durante varios días de manera ininterrumpida, capturando imágenes en intervalos muy cortos de tiempo –entre 10-15 min–. Se han realizado ciclos de grabación con especímenes de *Antirrhinum majus* tanto silvestres como transgénicos –*iRNA:AmLHY*– y con especímenes de *Petunia x hybrida* silvestres y transgénicas –*iRNA:PhZTL3* y *iRNA:PhZTL10*–. En todos los casos, mediante la medición semiautomática de la longitud de las flores –y el ángulo en el caso de *Petunia*– se ha podido obtener información acerca del crecimiento de los ejemplares, así cómo la posible diferencia de este crecimiento entre individuos silvestres y transgénicos del reloj circadiano.

Como resultado de la medición de las flores en intervalos de tiempo, se obtiene información discreta sobre su crecimiento. Para poder conocer datos como tasa máxima de crecimiento, tasa media, crecimiento máximo, etc., es necesario modelizar este crecimiento. En este trabajo se han aplicado modelos aditivos generalizados –GAM– para realizar esta modelización. Estos GAM han mostrado unos porcentajes de ajuste al crecimiento muy altos, por encima del 95 %, lo que demuestra su utilidad para este tipo de información donde la falta de linealidad impide el empleo de modelos más simples. Esto ha permitido realizar comparaciones de la cinética de crecimiento entre ejemplares del mismo experimento, en términos de tasa máxima y media de crecimiento.

A pesar de que la literatura muestra que existen claras diferencias en el tamaño y tiempo de floración de individuos silvestres y mutantes del reloj –más pequeños y con un tiempo más largo de floración estos últimos–, el hecho de no haber encontrado grandes diferencias en la velocidad y tiempo de crecimiento de las flores, hace plantearse la necesidad de realizar más experimentos donde se establezcan diferentes condiciones ambientales –fundamentalmente iluminación y temperatura–, para comprobar si la ausencia de una significativa diferencia de crecimiento es debida a mecanismos intrínsecos de compensación –factor genético–, a una gran influencia del entorno sobre la regulación del crecimiento –factor epigenético– o a una combinación de ambos.

El sistema de fenotipado ha mostrado, en general, ser una herramienta útil para el desempeño de las tareas para las que fue concebido. El sistema de iluminación, aunque muy adecuado para el desarrollo vegetal es muy poco adecuado para el análisis de imágenes. La tonalidad que genera y la conta-

minación que se produce en la escena a causa de los reflejos causados por el fondo, hacen altamente complejo automatizar totalmente el análisis. Por otro lado, los movimientos de los órganos de estudio debido al crecimiento –nutación– y a otros tropismos, hace que en ocasiones se produzcan solapamiento entre órganos, lo que dificulta su posterior medida. Se podría solventar el problema mediante la instalación de más dispositivos de captura en diversos ángulos, sin embargo esto aumentaría el coste del sistema y la complejidad del análisis.

10.2. Trabajos futuros

Como fruto de los trabajos realizados en esta tesis, han surgido nuevas vías de experimentación, nuevas preguntas que responder y algunos inconvenientes que solventar.

Una de las preguntas surgidas, ha sido cómo puede afectar al crecimiento diferentes iluminaciones con distintas combinaciones de longitudes de onda, o cuál es la necesidad mínima de intensidad lumínica necesaria –ahorro energético– para el correcto desarrollo de la planta. El empleo de paneles led configurables a nivel de longitud de onda e intensidad dentro del sistema de fenotipado, podría dar respuesta a estas cuestiones.

Por otro lado, para solventar el problema surgido por la contaminación de la imagen a consecuencia de la iluminación actual, se ha planteado la posibilidad de implementar un dispositivo de captura en el infrarrojo exclusivamente, con filtro en el visible para eliminar la influencia de esta luz.

Más allá de las cuestiones e inconvenientes surgidos, existen otras inquietudes que no se han podido abordar hasta la fecha. El empleo, de sistemas hiperspectrales, puede abrir la puerta para el desarrollo de una metodología que nos permita descubrir, por ejemplo, la dinámica de crecimiento de una infección sobre un órgano o la concentración de determinados metabolitos como resultado de un tratamiento específico.

Finalmente, la aplicación de la visión artificial al fenotipado de plantas es un campo de enormes posibilidades, donde sería deseable una mayor inversión en recursos materiales y humanos, que permitan aumentar nuestro

conocimiento sobre el complejo funcionamiento de plantas, tan importantes para la supervivencia de la mayoría de las especies del planeta.

Capítulo 11

Publicaciones y contribuciones a congresos

Publicaciones JCR

- Navarro, P. J., Pérez, F., Weiss, J. & Egea-Cortines, M. Machine Learning and Computer Vision System for Phenotype Data Acquisition and Analysis in Plants. *Sensors* (Basel). 16, 641 (2016).
- Perez-Sanz, F., Navarro, P. J. & Egea-Cortines, M. Plant phenomics: An overview of image acquisition technologies and image data analysis algorithms. *Gigascience* 6, (2017).

Contribuciones a congresos

- Egea Gutiérrez-Cortines, M., Ruiz Hernández, V., Terry López, M., Pérez Sanz, F. & Navarro Lorente, Pedro J. Weiss, J. Genetic and environmental factors affecting scent and volatile production. in 6th World gene Conv. 2015. Theme More Adv. more Heal. more Saf. Quingdao (2015).
- Pérez-Sanz, F., Navarro Lorente, P., Weiss, J. & Egea-Cortines, M. Identification of clock dependent and independent developmental processes using automated phenotyping. in Int. Plant Algal Phenomics Meet. Praha (2015)

- Weiss, J., Terry-lópez, M., Pérez-sanz, F., Ruíz-hernández, V., Navarro, J., Muhlemann, J., Dudareva, N. & Egea-cortines, M. Interplay of continuous and circadian processes during flower development. in 11th Int. Congr. Plant Mol. Biol. 138–139. Iguazú (2015).
- Navarro Lorente, P. J., Pérez Sanz, F., Weiss, J. & Egea Cortines, M. Development of artificial vision systems for automatics phenotyping. in XII Reun. Biol. Mol. plantas. Oviedo (2016).
- Navarro, P. J., Pérez Sanz, F., Weiss, J. & Egea-Cortines, M. Desarrollo de un sistema de fenotipado para el estudio cinético de crecimiento en sistemas biológicos. in II Simp. Nac. Ing. Hortícola. Autom. y TICs en Agric. (eds. Díaz, F. R. & Soria, M. B.) 21. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Almería (2016).
- Pérez Sanz, F., Weiss, J., Egea-Cortines, M. & Navarro, P. J. Desarrollo de una herramienta software para el control de un sistema de fenotipado basado en visión artificial. in II Simp. Nac. Ing. Hortícola. Autom. y TICs en Agric. (eds. Díaz, F. R. & Soria, M. B.) 9, 64 Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Almería (2016).
- Navarro, P. J., Pérez Sanz, F., Weiss, J. & Egea-Cortines, M. Machine learning for leaf segmentation in NIR images based on wavelet transform. in II Simp. Nac. Ing. Hortícola. Autom. y TICs en Agric. (eds. Díaz, F. R. & Soria, M. B.) 20 Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Almería (2016).
- Egea Gutiérrez-Cortines, M., Weiss, J., Ruiz Hernández, V., Terry López, M., Pérez Sanz, F. & Navarro Lorente, P. J. When petals become petals: diel components of petals function. in Flower Dev. Work. Padua (2017).
- Egea Cortines, M., Weiss, J., Terry, Marta I Pérez Sanz, F., Ruiz Hernández, V., Díaz Galián, V. & Navarro Lorente, P. J. Circadian regulation of lateral organ development. in X Jornadas Genética e Biotecnol. Vila Real (2018).

Bibliografía

- [1] Tilman, D., Balzer, C., Hill, J. & Bafort, B. L. From the Cover: Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 20260–20264 (2011).
- [2] Phillips, R. L. Mobilizing Science to Break Yield Barriers. *Crop Science* **50**, S-99–S-108 (2010).
- [3] Cabrera-Bosquet, L., Crossa, J., von Zitzewitz, J., Serret, M. D. & Luis Araus, J. High-throughput Phenotyping and Genomic Selection: The Frontiers of Crop Breeding Converge. *Journal of Integrative Plant Biology* **54**, 312–320 (2012).
- [4] Araus, J. L., Serret, M. D. & Edmeades, G. O. Phenotyping maize for adaptation to drought (2012).
- [5] Lobos, G. A. *et al.* Editorial: Plant Phenotyping and Phenomics for Plant Breeding. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2181 (2017).
- [6] Camargo, A. V. & Lobos, G. A. Latin America: A Development Pole for Phenomics. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1729 (2016).
- [7] Fiorani, F. & Schurr, U. Future Scenarios for Plant Phenotyping. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 267–291 (2013).
- [8] Tindall, A. J. *et al.* A comparison of high-throughput techniques for assaying circadian rhythms in plants. *Plant Methods* **11**, 32 (2015). [arXiv:62](#).
- [9] Somers, D. E. Clock-associated genes in Arabidopsis: A family affair. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **356**, 1745–1753 (2001).
- [10] Devlin, P. F. Cryptochromes Are Required for Phytochrome Signaling to the Circadian Clock but Not for Rhythmicity. *Plant Cell* **12**, 2499–

- 2510 (2000).
- [11] Gould, P. D. The Molecular Basis of Temperature Compensation in the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant Cell* **18**, 1177–1187 (2006).
 - [12] Hanano, S., Domagalska, M. A., Nagy, F. & Davis, S. J. Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes to Cells* **11**, 1381–1392 (2006).
 - [13] Johannsen, W. Ueber Erbllichkeit in Populationen und in reinen Linien Ein Beitrag zur Beleuchtung schwebender Selektionsfragen. *Verlag von Gustav Fischer in Jena* **69**, 149–150 (1903).
 - [14] Walter, A., Liebisch, F. & Hund, A. Plant phenotyping: From bean weighing to image analysis (2015).
 - [15] Johannsen, W. The Genotypic Conception of Heredity (1911). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](https://arxiv.org/abs/1011.1669v3).
 - [16] Guo, Q. & Zhu, Z. Phenotyping of Plants. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–15 (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2014).
 - [17] Houle, D., Govindaraju, D. R. & Omholt, S. Phenomics: The next challenge (2010).
 - [18] Ubbens, J. R. & Stavness, I. Deep Plant Phenomics: A Deep Learning Platform for Complex Plant Phenotyping Tasks. *Frontiers in Plant Science* **8** (2017).
 - [19] Li, L., Zhang, Q. & Huang, D. A review of imaging techniques for plant phenotyping (2014).
 - [20] Fahlgren, N., Gehan, M. A. & Baxter, I. Lights, camera, action: High-throughput plant phenotyping is ready for a close-up (2015).
 - [21] Dornbusch, T., Michaud, O., Xenarios, I. & Fankhauser, C. Differentially Phased Leaf Growth and Movements in Arabidopsis Depend on Coordinated Circadian and Light Regulation. *The Plant Cell* **26**, 3911–3921 (2014).
 - [22] Yazdanbakhsh, N., Sulpice, R., Graf, A., Stitt, M. & Fisahn, J. Circadian control of root elongation and C partitioning in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell and Environment* **34**, 877–894 (2011).
 - [23] Farré, E. M. The regulation of plant growth by the circadian clock. *Plant Biology* **14**, 401–410 (2012).

- [24] Hogenesch, J. B. & Ueda, H. R. Understanding systems-level properties: Timely stories from the study of clocks (2011).
- [25] Staiger, D., Shin, J., Johansson, M. & Davis, S. J. The circadian clock goes genomic (2013).
- [26] Pokhilko, A. *et al.* The clock gene circuit in Arabidopsis includes a repressilator with additional feedback loops. *Molecular Systems Biology* **8**, 574 (2012).
- [27] Más, P. Circadian clock signaling in Arabidopsis thaliana: From gene expression to physiology and development (2005).
- [28] Millar, A. J. Input signals to the plant circadian clock. In *Journal of Experimental Botany*, vol. 55, 277–283 (2004).
- [29] Jiao, Y., Lau, O. S. & Deng, X. W. Light-regulated transcriptional networks in higher plants (2007).
- [30] Wenden, B. *et al.* Light inputs shape the Arabidopsis circadian system. *Plant Journal* **66**, 480–491 (2011).
- [31] Chow, B. Y. *et al.* Transcriptional regulation of LUX by CBF1 mediates cold input to the circadian clock in Arabidopsis. *Current Biology* **24**, 1518–1524 (2014).
- [32] Kinmonth-Schultz, H. A., Golembeski, G. S. & Imaizumi, T. Circadian clock-regulated physiological outputs: Dynamic responses in nature (2013).
- [33] Fung-Uceda, J. *et al.* The Circadian Clock Sets the Time of DNA Replication Licensing to Regulate Growth in Arabidopsis. *Developmental Cell* **45**, 101–113.e4 (2018).
- [34] Farré, E. M. & Weise, S. E. The interactions between the circadian clock and primary metabolism (2012).
- [35] Marcolino-Gomes, J. *et al.* Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. *PLoS ONE* **9**, e86402 (2014).
- [36] Weiss, J. *et al.* Diel pattern of circadian clock and storage protein gene expression in leaves and during seed filling in cowpea (*Vigna unguiculata*). *BMC Plant Biology* **18**, 33 (2018).
- [37] Edwards, K. D. *et al.* Circadian clock components control daily growth activities by modulating cytokinin levels and cell division-associated

- gene expression in *Populus* trees. *Plant Cell and Environment* **41**, 1468–1482 (2018).
- [38] Ni, Z. *et al.* Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* **457**, 327–331 (2009).
- [39] Atamian, H. S. *et al.* Circadian regulation of sunflower heliotropism, floral orientation, and pollinator visits. *Science* **353**, 587–590 (2016).
- [40] Fenske, M. P. *et al.* Circadian clock gene LATE ELONGATED HYPOCOTYL directly regulates the timing of floral scent emission in *Petunia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 9775–9780 (2015).
- [41] Yon, F. *et al.* Silencing *Nicotiana attenuata* LHY and ZTL alters circadian rhythms in flowers. *New Phytologist* **209**, 1058–1066 (2016).
- [42] Covington, M. F., Maloof, J. N., Straume, M., Kay, S. A. & Harmer, S. L. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biology* **9**, R130 (2008).
- [43] Nusinow, D. A. *et al.* The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* **475**, 398–404 (2011).
- [44] Nelson, D. C., Lasswell, J., Rogg, L. E., Cohen, M. A. & Bartel, B. FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* **101**, 331–340 (2000).
- [45] Somers, D. E., Schultz, T. F., Milnamow, M. & Kay, S. A. ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* **101**, 319–329 (2000).
- [46] Schultz, T. F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M. & Kay, S. A. A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *The Plant cell* **13**, 2659–2670 (2001).
- [47] Linde, A.-M. *et al.* Early evolution of the land plant circadian clock. *New Phytologist* **216**, 576–590 (2017).
- [48] Kim, W. Y. *et al.* ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* **449**, 356–360 (2007).
- [49] Yasuhara, M. *et al.* Identification of ASK and clock-associated proteins

- as molecular partners of LKP2 (LOV kelch protein 2) in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2015–2027 (2004).
- [50] Kiba, T., Henriques, R., Sakakibara, H. & Chua, N.-H. Targeted Degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCFZTL Complex Regulates Clock Function and Photomorphogenesis in Arabidopsis thaliana. *THE PLANT CELL ONLINE* **19**, 2516–2530 (2007).
- [51] Baudry, A. *et al.* F-Box Proteins FKF1 and LKP2 Act in Concert with ZEITLUPE to Control Arabidopsis Clock Progression. *The Plant Cell* **22**, 606–622 (2010).
- [52] Ito, S., Song, Y. H. & Imaizumi, T. LOV domain-containing F-box proteins: Light-dependent protein degradation modules in Arabidopsis (2012).
- [53] Tucker, C. J. Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. *Remote Sensing of Environment* **8**, 127–150 (1979). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [54] Myneni, R. B., Keeling, C. D., Tucker, C. J., Asrar, G. & Nemani, R. R. Increased plant growth in the northern high latitudes from 1981 to 1991. *Nature* **386**, 698–702 (1997).
- [55] DeFries, R. S., & Townshend, J. G. R. NDVI derived land cover classifications at a global scale. *International Journal of Remote Sensing* **5**, 3567 – 3586 (1994).
- [56] Pettorelli, N. *et al.* Using the satellite-derived NDVI to assess ecological responses to environmental change (2005). arXiv:[0712.2063](#).
- [57] Mkhabela, M. S., Bullock, P., Raj, S., Wang, S. & Yang, Y. Crop yield forecasting on the Canadian Prairies using MODIS NDVI data. *Agricultural and Forest Meteorology* **151**, 385–393 (2011).
- [58] Groten, S. M. NDVI-crop monitoring and early yield assessment of burkina faso. *International Journal of Remote Sensing* **14**, 1495–1515 (1993).
- [59] Jones, H. G. Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2249–2260 (2002).
- [60] Chaerle, L. & Van Der Straeten, D. Seeing is believing: Imaging tech-

- niques to monitor plant health (2001).
- [61] Sirault, X. R. R., James, R. A. & Furbank, R. T. A new screening method for osmotic component of salinity tolerance in cereals using infrared thermography. *Functional Plant Biology* **36**, 970–977 (2009).
 - [62] Lobet, G., Pagès, L. & Draye, X. A Novel Image-Analysis Toolbox Enabling Quantitative Analysis of Root System Architecture. *Plant Physiology* **157**, 29–39 (2011).
 - [63] Galkovskyi, T. *et al.* GiA Roots: Software for the high throughput analysis of plant root system architecture. *BMC Plant Biology* **12**, 116 (2012).
 - [64] French, A., Ubeda-Tomas, S., Holman, T. J., Bennett, M. J. & Pridmore, T. High-Throughput Quantification of Root Growth Using a Novel Image-Analysis Tool. *Plant Physiology* **150**, 1784–1795 (2009).
 - [65] Golzarian, M. R. *et al.* Accurate inference of shoot biomass from high-throughput images of cereal plants. *Plant Methods* **7**, 2 (2011).
 - [66] Fabre, J. *et al.* PHENOPSIS DB: An Information System for Arabidopsis thaliana phenotypic data in an environmental context. *BMC Plant Biology* **11**, 77 (2011).
 - [67] Lepage, G., Bogaerts, J. & Meynants, G. Time-delay-integration architectures in CMOS image sensors. *IEEE Transactions on Electron Devices* **56**, 2524–2533 (2009).
 - [68] Yu, C., Nie, K., Xu, J. & Gao, J. A low power digital accumulation technique for digital-domain CMOS TDI image sensor. *Sensors (Switzerland)* **16**, 1572 (2016).
 - [69] Teledyne Dalsa. No Title.
 - [70] IMEC. Imec launches TDI, multispectral and hyperspectral sensors (2017).
 - [71] Van Der Heijden, G. *et al.* SPICY: Towards automated phenotyping of large pepper plants in the greenhouse. *Functional Plant Biology* **39**, 870–877 (2012).
 - [72] Navarro, P. J., Fernández, C., Weiss, J. & Egea-Cortines, M. Development of a configurable growth chamber with a computer vision system to study circadian rhythm in plants. *Sensors (Switzerland)* **12**, 15356–

- 15375 (2012).
- [73] Subramanian, R., Spalding, E. P. & Ferrier, N. J. A high throughput robot system for machine vision based plant phenotype studies. *Machine Vision and Applications* **24**, 619–636 (2013).
- [74] Zhang, X. *et al.* High-Throughput Phenotyping and QTL Mapping Reveals the Genetic Architecture of Maize Plant Growth. *Plant Physiology* **173**, 1554–1564 (2017).
- [75] Virlet, N., Sabermanesh, K., Sadeghi-Tehran, P. & Hawkesford, M. J. Field Scanalyzer: An automated robotic field phenotyping platform for detailed crop monitoring. *Functional Plant Biology* **44**, 143–153 (2017).
- [76] Deery, D., Jimenez-Berni, J., Jones, H., Sirault, X. & Furbank, R. Proximal Remote Sensing Buggies and Potential Applications for Field-Based Phenotyping. *Agronomy* **4**, 349–379 (2014).
- [77] Comar, A. *et al.* A semi-automatic system for high throughput phenotyping wheat cultivars in-field conditions: Description and first results. *Functional Plant Biology* **39**, 914–924 (2012).
- [78] Brown, M. Z., Burschka, D. & Hager, G. D. Advances in computational stereo (2003).
- [79] Biskup, B., Scharr, H., Schurr, U. & Rascher, U. A stereo imaging system for measuring structural parameters of plant canopies. *Plant, Cell and Environment* **30**, 1299–1308 (2007).
- [80] Nguyen, T. T., Slaughter, D. C., Max, N., Maloof, J. N. & Sinha, N. Structured light-based 3D reconstruction system for plants. *Sensors (Switzerland)* **15**, 18587–18612 (2015).
- [81] Klodt, M., Herzog, K., Töpfer, R. & Cremers, D. Field phenotyping of grapevine growth using dense stereo reconstruction. *BMC Bioinformatics* **16**, 143 (2015).
- [82] Rose, J. C. *et al.* Towards automated large-scale 3D phenotyping of vineyards under field conditions. *Sensors (Switzerland)* **16**, 2136 (2016).
- [83] Xiong, X. *et al.* A high-throughput stereo-imaging system for quantifying rape leaf traits during the seedling stage. *Plant Methods* **13**, 7 (2017).
- [84] Paproki, A., Sirault, X., Berry, S., Furbank, R. & Fripp, J. A novel

- mesh processing based technique for 3D plant analysis. *BMC Plant Biology* **12**, 63 (2012).
- [85] Nguyen, T. T., Slaughter, D. C., Maloof, J. N. & Sinha, N. Plant phenotyping using multi-view stereo vision with structured lights. In Valasek, J. & Thomasson, J. A. (eds.) *Proc.SPIE*, 986608 (International Society for Optics and Photonics, 2016).
- [86] Christian Rose, J., Paulus, S. & Kuhlmann, H. Accuracy analysis of a multi-view stereo approach for phenotyping of tomato plants at the organ level. *Sensors (Switzerland)* **15**, 9651–9665 (2015).
- [87] Schwartz, S. An overview of 3D plant phenotyping methods. *Phenospec. Smart Plant Analysis* (2015).
- [88] Lee, K. S., Cohen, W. B., Kennedy, R. E., Maier-sperger, T. K. & Gower, S. T. Hyperspectral versus multispectral data for estimating leaf area index in four different biomes. *Remote Sensing of Environment* **91**, 508–520 (2004).
- [89] Dozier, J. & Painter, T. H. Multispectral and Hyperspectral Remote Sensing of Alpine Snow Properties. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **32**, 465–494 (2004).
- [90] Adam, E., Mutanga, O. & Rugege, D. Multispectral and hyperspectral remote sensing for identification and mapping of wetland vegetation: A review (2010).
- [91] Qin, J., Chao, K., Kim, M. S., Lu, R. & Burks, T. F. Hyperspectral and multispectral imaging for evaluating food safety and quality (2013).
- [92] van der Meer, F. D. *et al.* Multi- and hyperspectral geologic remote sensing: A review (2012). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [93] P. M. Mehl, P. M., K. Chao, K., M. Kim, M. & Y. R. Chen, Y. R. Detection of Defects on Selected Apple Cultivars Using Hyperspectral and Multispectral Image Analysis. *Applied Engineering in Agriculture* **18**, 219 (2002).
- [94] Ferrato, L.-J. & Forsythe, K. W. Comparing Hyperspectral and Multispectral Imagery for Land Classification of the Lower Don River, Toronto. *Journal of Geography and Geology* **5** (2013). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).

- [95] Cubert. S 137 - ButterflEYE NIR - Cubert-GmbH.
- [96] Kise, M., Park, B., Heitschmidt, G. W., Lawrence, K. C. & Windham, W. R. Multispectral imaging system with interchangeable filter design. *Computers and Electronics in Agriculture* **72**, 61–68 (2010).
- [97] Li, P., Lee, S. H., Hsu, H. Y. & Park, J. S. Nonlinear fusion of multispectral citrus fruit image data with information contents. *Sensors (Switzerland)* **17**, 142 (2017).
- [98] Wahabzada, M. *et al.* Plant Phenotyping using Probabilistic Topic Models: Uncovering the Hyperspectral Language of Plants. *Scientific Reports* **6**, 22482 (2016).
- [99] Kuska, M. *et al.* Hyperspectral phenotyping on the microscopic scale: Towards automated characterization of plant-pathogen interactions. *Plant Methods* **11**, 28 (2015).
- [100] Klose, R., Penlington, J. & Ruckelshausen, A. Usability of 3D time-of-flight cameras for automatic plant phenotyping. *Bornimer Agrartechnische Berichte* **69**, 93–105 (2011).
- [101] Song, Y., Glasbey, C. A., Van Der Heijden, G. W., Polder, G. & Dieleman, J. A. Combining stereo and time-of-flight images with application to automatic plant phenotyping. In *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, vol. 6688 LNCS, 467–478 (Springer Berlin Heidelberg, 2011).
- [102] Alenyà, G., Dellen, B. & Torras, C. 3D modelling of leaves from color and ToF data for robotized plant measuring. In *Proceedings - IEEE International Conference on Robotics and Automation*, 3408–3414 (2011).
- [103] McCormick, R. F., Truong, S. K. & Mullet, J. E. 3D sorghum reconstructions from depth images identify QTL regulating shoot architecture. *Plant Physiology* **172**, pp.00948.2016 (2016).
- [104] Paulus, S., Behmann, J., Mahlein, A. K., Plümer, L. & Kuhlmann, H. Low-cost 3D systems: Suitable tools for plant phenotyping. *Sensors (Switzerland)* **14**, 3001–3018 (2014).
- [105] Specifications, A. Kinect for Windows Sensor Components and Specifications (2014).

- [106] Azzari, G., Goulden, M. L. & Rusu, R. B. Rapid characterization of vegetation structure with a microsoft kinect sensor. *Sensors (Switzerland)* **13**, 2384–2398 (2013).
- [107] Chéné, Y. *et al.* On the use of depth camera for 3D phenotyping of entire plants. *Computers and Electronics in Agriculture* **82**, 122–127 (2012).
- [108] Wang, G. & Weng, Q. Remote sensing of natural resources. In Wang, G. & Weng, Q. (eds.) *Remote Sensing of Natural Resources*, chap. Introducti, 580 (CRC Press, Boca Raton, 2013).
- [109] Lin, Y. LiDAR: An important tool for next-generation phenotyping technology of high potential for plant phenomics? (2015).
- [110] Vázquez-Arellano, M., Griepentrog, H. W., Reiser, D. & Paraforos, D. S. 3-D imaging systems for agricultural applications—a review (2016).
- [111] Chen, J. M. & Cihlar, J. Retrieving leaf area index of boreal conifer forests using landsat TM images. *Remote Sensing of Environment* **55**, 153–162 (1996).
- [112] Gwenzi, D., Helmer, E. H., Zhu, X., Lefsky, M. A. & Marcano-Vega, H. Predictions of tropical forest biomass and biomass growth based on stand height or canopy area are improved by Landsat-scale phenology across Puerto Rico and the U.S. Virgin Islands. *Remote Sensing* **9**, 123 (2017).
- [113] Kellndorfer, J. M. *et al.* Statistical fusion of lidar, InSAR, and optical remote sensing data for forest stand height characterization: A regional-scale method based on LVIS, SRTM, Landsat ETM+, and ancillary data sets. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* **115**, n/a–n/a (2010).
- [114] Badreldin, N. & Sanchez-Azofeifa, A. Estimating forest biomass dynamics by integrating multi-temporal Landsat satellite images with ground and airborne LiDAR data in the Coal Valley Mine, Alberta, Canada. *Remote Sensing* **7**, 2832–2849 (2015).
- [115] Andújar, D. *et al.* Discriminating crop, weeds and soil surface with a terrestrial LIDAR sensor. *Sensors (Switzerland)* **13**, 14662–14675 (2013).

- [116] Sun, S., Li, C. & Paterson, A. H. In-field high-throughput phenotyping of cotton plant height using LiDAR. *Remote Sensing* **9**, 377 (2017).
- [117] Hosoi, F., Nakabayashi, K. & Omasa, K. 3-D modeling of tomato canopies using a high-resolution portable scanning lidar for extracting structural information. *Sensors* **11**, 2166–2174 (2011).
- [118] Chaudhury, A. *et al.* Computer Vision Based Autonomous Robotic System for 3D Plant Growth Measurement. *2015 12th Conference on Computer and Robot Vision* 290–296 (2015).
- [119] Wallace, A., Nichol, C. & Woodhouse, I. Recovery of forest canopy parameters by inversion of multispectral LiDAR data. *Remote Sensing* **4**, 509–531 (2012).
- [120] Morsy, S., Shaker, A. & El-Rabbany, A. Multispectral LiDAR Data for Land Cover Classification of Urban Areas. *Sensors* **17**, 958 (2017).
- [121] Wallace, A. M. *et al.* Design and evaluation of multispectral LiDAR for the recovery of arboreal parameters. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* **52**, 4942–4954 (2014).
- [122] Navarro, P. J., Pérez, F., Weiss, J. & Egea-Cortines, M. Machine learning and computer vision system for phenotype data acquisition and analysis in plants. *Sensors (Switzerland)* **16**, 1–12 (2016).
- [123] Nagler, P. L., Inoue, Y., Glenn, E. P., Russ, A. L. & Daughtry, C. S. Cellulose absorption index (CAI) to quantify mixed soil-plant litter scenes. *Remote Sensing of Environment* **87**, 310–325 (2003).
- [124] Ren, H. R., Zhou, G. S., Zhang, F. & Zhang, X. S. Evaluating cellulose absorption index (CAI) for non-photosynthetic biomass estimation in the desert steppe of Inner Mongolia. *Chinese Science Bulletin* **57**, 1716–1722 (2012).
- [125] Serbin, G., Daughtry, C. S., Hunt, E. R., Reeves, J. B. & Brown, D. J. Effects of soil composition and mineralogy on remote sensing of crop residue cover. *Remote Sensing of Environment* **113**, 224–238 (2009).
- [126] Eskandari, I., Navid, H. & Rangzan, K. Evaluating spectral indices for determining conservation and conventional tillage systems in a vetch-wheat rotation. *International Soil and Water Conservation Research* **4**, 93–98 (2016).

- [127] Galvão, L. S., Formaggio, A. R. & Tisot, D. A. Discrimination of sugarcane varieties in Southeastern Brazil with EO-1 Hyperion data. *Remote Sensing of Environment* **94**, 523–534 (2005).
- [128] Price, J. C. & Bausch, W. C. Leaf area index estimation from visible and near-infrared reflectance data. *Remote Sensing of Environment* **52**, 55–65 (1995).
- [129] Zarco-Tejada, P., Berjon, a. & Miller, J. Stress Detection in Crops with Hyperspectral Remote Sensing and Physical Simulation Models. *Airborne Imaging Spectroscopy Workshop* 1–5 (2004).
- [130] Cai, J., Golzarian, M. R. & Miklavcic, S. J. Novel Image Segmentation Based on Machine Learning and Its Application to Plant Analysis. *Ijise* **1** (2011).
- [131] Gong, P., Pu, R., Biging, G. S. & Larrieu, M. R. Estimation of forest leaf area index using vegetation indices derived from Hyperion hyperspectral data. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* **41**, 1355–1362 (2003). arXiv:[PIIS0034-4257\(99\)00067-X](#).
- [132] Brown, H. E., Diuk-Wasser, M. A., Guan, Y., Caskey, S. & Fish, D. Comparison of three satellite sensors at three spatial scales to predict larval mosquito presence in Connecticut wetlands. *Remote Sensing of Environment* **112**, 2301–2308 (2008).
- [133] Apan, A., Held, A., Phinn, S. & Markley, J. Detecting sugarcane 'orange rust' disease using EO-1 Hyperion hyperspectral imagery. *International Journal of Remote Sensing* **25**, 489–498 (2004).
- [134] Tucker, C. J. *et al.* Higher northern latitude normalized difference vegetation index and growing season trends from 1982 to 1999. *International Journal of Biometeorology* **45**, 184–190 (2001).
- [135] Haboudane, D., Miller, J. R., Pattey, E., Zarco-Tejada, P. J. & Strachan, I. B. Hyperspectral vegetation indices and novel algorithms for predicting green LAI of crop canopies: Modeling and validation in the context of precision agriculture. *Remote Sensing of Environment* **90**, 337–352 (2004).
- [136] Pagani, A., Echeverría, H. E., Andrade, F. H. & Sainz Rozas, H. R. Characterization of corn nitrogen status with a greenness index under

- different availability of sulfur. *Agronomy Journal* **101**, 315–322 (2009).
- [137] Blackburn, G. A. Spectral indices for estimating photosynthetic pigment concentrations: A test using senescent tree leaves. *International Journal of Remote Sensing* **19**, 657–675 (1998).
- [138] Hunt, E. R. *et al.* Acquisition of NIR-green-blue digital photographs from unmanned aircraft for crop monitoring. *Remote Sensing* **2**, 290–305 (2010).
- [139] Bell, G. E. *et al.* Optical sensing of turfgrass chlorophyll content and tissue nitrogen. *HortScience* **39**, 1130–1132 (2004).
- [140] Haboudane, D., Miller, J. R., Tremblay, N., Zarco-Tejada, P. J. & Dextre, L. Integrated narrow-band vegetation indices for prediction of crop chlorophyll content for application to precision agriculture. *Remote Sensing of Environment* **81**, 416–426 (2002). arXiv:[NIHMS150003](#).
- [141] Timm, B. C. & McGarigal, K. Fine-scale remotely-sensed cover mapping of coastal dune and salt marsh ecosystems at Cape Cod National Seashore using Random Forests. *Remote Sensing of Environment* **127**, 106–117 (2012).
- [142] Parenteau, M., Bannari, A., El-Harti, A., Bachaoui, M. & El-Ghmari, A. Characterization of the state of soil degradation by erosion using the hue and coloration indices. *IGARSS 2003. 2003 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium. Proceedings (IEEE Cat. No.03CH37477)* **4**, 2284–2286 (2003).
- [143] Padhi, J., Misra, R. K. & Payero, J. O. Estimation of soil water deficit in an irrigated cotton field with infrared thermography. *Field Crops Research* **126**, 45–55 (2012).
- [144] Guillioni, L., Jones, H. G., Leinonen, I. & Lhomme, J. P. On the relationships between stomatal resistance and leaf temperatures in thermography. *Agricultural and Forest Meteorology* **148**, 1908–1912 (2008).
- [145] Kranner, I., Kastberger, G., Hartbauer, M. & Pritchard, H. W. Noninvasive diagnosis of seed viability using infrared thermography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 3912–3917 (2010).
- [146] Fiorani, F., Rascher, U., Jahnke, S. & Schurr, U. Imaging plants dynamics in heterogenic environments (2012).

- [147] Mallona, I., Egea-Cortines, M. & Weiss, J. Conserved and Divergent Rhythms of Crassulacean Acid Metabolism-Related and Core Clock Gene Expression in the Cactus *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiology* **156**, 1978–1989 (2011).
- [148] Costa, J. M., Grant, O. M. & Chaves, M. M. Thermography to explore plant-environment interactions (2013).
- [149] Zia, S. *et al.* Infrared Thermal Imaging as a Rapid Tool for Identifying Water-Stress Tolerant Maize Genotypes of Different Phenology. *Journal of Agronomy and Crop Science* **199**, 75–84 (2013).
- [150] Jones, H. G. *et al.* Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Functional Plant Biology* **36**, 978–989 (2009). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [151] Prashar, A. & Jones, H. Infra-Red Thermography as a High-Throughput Tool for Field Phenotyping. *Agronomy* **4**, 397–417 (2014).
- [152] Mahlein, A.-K. Plant Disease Detection by Imaging Sensors – Parallels and Specific Demands for Precision Agriculture and Plant Phenotyping. *Plant Disease* **100**, 241–251 (2016). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [153] Oerke, E. C., Fröhling, P. & Steiner, U. Thermographic assessment of scab disease on apple leaves. *Precision Agriculture* **12**, 699–715 (2011).
- [154] Chapple, C. An Arabidopsis Mutant Defective in the General Phenylpropanoid Pathway. *the Plant Cell Online* **4**, 1413–1424 (1992).
- [155] Gould, P. D. *et al.* Delayed fluorescence as a universal tool for the measurement of circadian rhythms in higher plants. *Plant Journal* **58**, 893–901 (2009). arXiv:[arXiv:1503.07998v1](#).
- [156] Sweeney, B. M., Prkzelin, B. B., Wong, D. & Govindjee. In vivo chlorophyll a fluorescence transient and the circadian rhythm of photosynthesis in *Gonyaulax polyedra*. *Photochemistry and Photobiology* **30**, 309–311 (1979).
- [157] Sheehan, H. *et al.* MYB-FL controls gain and loss of floral UV absorbance, a key trait affecting pollinator preference and reproductive isolation. *Nature Genetics* **48**, 159–166 (2016).
- [158] Pérez-Bueno, M. L., Pineda, M., Cabeza, F. M. & Barón, M. Multicolor

- Fluorescence Imaging as a Candidate for Disease Detection in Plant Phenotyping. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1790 (2016).
- [159] Fang, Y. & Ramasamy, R. P. Current and prospective methods for plant disease detection (2015).
- [160] Karl, W. C. Regularization in Image Restoration and Reconstruction. In BOVIK, A. L. (ed.) *Handbook of Image and Video Processing*, Communications, Networking and Multimedia, 183–202 (Academic Press, Burlington, 2005), second edi edn.
- [161] Zhang, Y., Wang, S., Sun, P. & Phillips, P. Pathological brain detection based on wavelet entropy and Hu moment invariants. *Bio-Medical Materials and Engineering* **26**, S1283–S1290 (2015).
- [162] Borisjuk, L., Rolletschek, H. & Neuberger, T. Surveying the plant's world by magnetic resonance imaging (2012).
- [163] Rascher, U. *et al.* Non-invasive approaches for phenotyping of enhanced performance traits in bean. *Functional Plant Biology* **38**, 968–983 (2011).
- [164] Horigane, A. K. *et al.* Visualisation of Moisture Distribution during Development of Rice Caryopses (*Oryza sativa* L.) by Nuclear Magnetic Resonance Microimaging. *Journal of Cereal Science* **33**, 105–114 (2001).
- [165] Glidewell, S. M. NMR imaging of developing barley grains. *Journal of Cereal Science* **43**, 70–78 (2006).
- [166] Converse, A. K. *et al.* Positron emission tomography (PET) of radio-tracer uptake and distribution in living plants: Methodological aspects. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **297**, 241–246 (2013).
- [167] Karve, A. A. *et al.* In vivo quantitative imaging of photoassimilate transport dynamics and allocation in large plants using a commercial positron emission tomography (PET) scanner. *BMC Plant Biology* **15**, 273 (2015).
- [168] Yang, W. *et al.* High-throughput measurement of rice tillers using a conveyor equipped with x-ray computed tomography. *Review of Scientific Instruments* **82**, 025102 (2011).
- [169] Tracy, S. R. *et al.* The X-factor: Visualizing undisturbed root architec-

- ture in soils using X-ray computed tomography. *Journal of Experimental Botany* **61**, 311–313 (2010).
- [170] Mooney, S. J., Pridmore, T. P., Helliwell, J. & Bennett, M. J. Developing X-ray computed tomography to non-invasively image 3-D root systems architecture in soil. *Plant and Soil* **352**, 1–22 (2012).
- [171] Metzner, R. *et al.* Direct comparison of MRI and X-ray CT technologies for 3D imaging of root systems in soil: Potential and challenges for root trait quantification. *Plant Methods* **11**, 17 (2015).
- [172] Lontoc-Roy, M. *et al.* Advances in the acquisition and analysis of CT scan data to isolate a crop root system from the soil medium and quantify root system complexity in 3-D space. *Geoderma* **137**, 231–241 (2006).
- [173] Perret, J. S., Al-Belushi, M. E. & Deadman, M. Non-destructive visualization and quantification of roots using computed tomography. *Soil Biology and Biochemistry* **39**, 391–399 (2007).
- [174] Staedler, Y. M., Masson, D. & Schönenberger, J. Plant Tissues in 3D via X-Ray Tomography: Simple Contrasting Methods Allow High Resolution Imaging. *PLoS ONE* **8**, e75295 (2013).
- [175] Dhondt, S., Vanhaeren, H., Van Loo, D., Cnudde, V. & Inzé, D. Plant structure visualization by high-resolution X-ray computed tomography (2010).
- [176] Brodersen, C. R. & Roddy, A. B. New frontiers in the three-dimensional visualization of plant structure and function. *American Journal of Botany* **103**, 184–188 (2016).
- [177] Wahid, H., Ahmad, S., Nor, M. A. M. & Rashid, M. A. *Prestasi kecekapan pengurusan kewangan dan agihan zakat: perbandingan antara majlis agama islam negeri di Malaysia*, vol. 51 (O'Reilly Media, Sebastopol, CA, 2017), 1st ed. edn. arXiv:[arXiv:1011.1669v3](https://arxiv.org/abs/1011.1669v3).
- [178] Hamuda, E., Glavin, M. & Jones, E. A survey of image processing techniques for plant extraction and segmentation in the field (2016).
- [179] Singh, A., Ganapathysubramanian, B., Singh, A. K. & Sarkar, S. Machine Learning for High-Throughput Stress Phenotyping in Plants (2016).
- [180] Wang, Z., Li, H., Zhu, Y. & Xu, T. Review of Plant Identification

- Based on Image Processing. *Archives of Computational Methods in Engineering* **24**, 637–654 (2017).
- [181] Bhagwat, R. & Dandawate, Y. Indian plant species identification under varying illumination and viewpoint conditions. In *Conference on Advances in Signal Processing, CASP 2016*, 469–473 (IEEE, 2016).
- [182] Thangadurai, K. & Padmavathi, K. Computer vision image enhancement for plant leaves disease detection. In *Proceedings - 2014 World Congress on Computing and Communication Technologies, WCCCT 2014*, 173–175 (IEEE, 2014).
- [183] Padmavathi, K. & Thangadurai, K. Implementation of RGB and grayscale images in plant leaves disease detection - Comparative study. *Indian Journal of Science and Technology* **9** (2016).
- [184] Allen, A. *et al.* Lightning talk: I solemnly pledge.^A manifesto for personal responsibility in the engineering of academic software. *CEUR Workshop Proceedings* **1686**, 160018 (2016).
- [185] Singh, V. & Misra, A. K. Detection of plant leaf diseases using image segmentation and soft computing techniques. *Information Processing in Agriculture* **4**, 41–49 (2017).
- [186] Krig, S. *Computer vision metrics: Survey, taxonomy, and analysis*, vol. 9781430259 (ApressOpen, 2014). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [187] Zhao, Z. Q. *et al.* ApLeaf: An efficient android-based plant leaf identification system. *Neurocomputing* **151**, 1112–1119 (2015).
- [188] Otsu, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* **9**, 62–66 (1979). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [189] Liu, J.-C. & Lin, T.-M. Location and Image-Based Plant Recognition and Recording System **6**, 898–910 (2015).
- [190] Chéné, Y. *et al.* Shape descriptors to characterize the shoot of entire plant from multiple side views of a motorized depth sensor (2016).
- [191] Vincent, L., Vincent, L. & Soille, P. Watersheds in Digital Spaces: An Efficient Algorithm Based on Immersion Simulations. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **13**, 583–598 (1991).
- [192] Patil, S., Soma, S. & Nandyal, S. Identification of Growth Rate of Plant

- based on leaf features using Digital Image Processing Techniques. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering Website: www.ijetae.com ISO Certified Journal* **3** (2013).
- [193] Barnes, C. *et al.* Individual tree crown delineation from airborne laser scanning for diseased larch forest stands. *Remote Sensing* **9**, 231 (2017).
- [194] Vukadinovic, D. & Polder, G. Watershed and supervised classification based fully automated method for separate leaf segmentation. In *COST FA 1306 -The quest for tolerant varieties-Phenotyping at plant and cellular level*, 2–3 (Gatersleben, 2015).
- [195] Rother, C., Kolmogorov, V. & Blake, A. "GrabCut": interactive foreground extraction using iterated graph cuts. In *ACM Transactions on Graphics*, vol. 23, 309 (2004). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [196] Boykov, Y. & Jolly, M.-P. Interactive graph cuts for optimal boundary & region segmentation of objects in N-D images. In *Proceedings Eighth IEEE International Conference on Computer Vision. ICCV 2001*, vol. 1, 105–112 (IEEE Comput. Soc, 2001). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [197] Sonka, M., Hlavac, V. & Boyle, R. *Image Processing, Analysis and Machine Vision* (CL Engineering, Toronto, 1993), 3 edn. arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [198] Wang, X. The GrabCut Segmentation Technique as Used in the Study of Tree Image Extraction. In Zhu, F. G. & Xijun (eds.) *Proceedings of the 2009 International Workshop on Information Security and Application (IWISA 2009)* (Academy Publisher, Qingdao, China, 2009).
- [199] Liu, J. C., Chiang, C. Y. & Chen, S. Image-based plant recognition by fusion of multimodal information. In *Proceedings - 2016 10th International Conference on Innovative Mobile and Internet Services in Ubiquitous Computing, IMIS 2016*, 5–11 (IEEE, 2016).
- [200] Kass, M., Witkin, A. & Terzopoulos, D. Snakes: Active contour models. *International Journal of Computer Vision* **1**, 321–331 (1988).
- [201] Minervini, M., Abdelsamea, M. M. & Tsafaris, S. A. Image-based plant phenotyping with incremental learning and active contours. *Ecological Informatics* **23**, 35–48 (2014).
- [202] Şuta, L., Bessy, F., Veja, C. & Vaida, M. F. Active contours: Application

- to plant recognition. In *Proceedings - 2012 IEEE 8th International Conference on Intelligent Computer Communication and Processing, ICCP 2012*, 181–187 (IEEE, 2012).
- [203] Shi, Y. & Karl, W. C. A real-time algorithm for the approximation of level-set-based curve evolution. *IEEE Transactions on Image Processing* **17**, 645–656 (2008). arXiv:[NIHMS150003](#).
- [204] Chan, T. F. & Vese, L. A. Active contours without edges. *IEEE Transactions on Image Processing* **10**, 266–277 (2001).
- [205] Pape, J.-m. & Klukas, C. Utilizing machine learning approaches to improve the prediction of leaf counts and individual leaf segmentation of rosette plant images. *Proceedings of the Computer Vision Problems in Plant Phenotyping (CVPPP)* 1–12 (2015).
- [206] Hrishikesh P., K. & Lokhande, S. S. Detection and Classification of Plant Leaf Diseases using ANN. *International Journal of Scientific & Engineering Research* **4**, 1777–1780 (2013).
- [207] Mouille, G., Robin, S., Lecomte, M., Pagant, S. & Höfte, H. Classification and identification of Arabidopsis cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant Journal* **35**, 393–404 (2003).
- [208] Guijarro, M., Riomoros, I., Pajares, G. & Zitinski, P. Discrete wavelets transform for improving greenness image segmentation in agricultural images. *Computers and Electronics in Agriculture* **118**, 396–407 (2015).
- [209] Iyer-Pascuzzi, A. S. *et al.* Imaging and Analysis Platform for Automatic Phenotyping and Trait Ranking of Plant Root Systems. *Plant Physiology* **152**, 1148–1157 (2010).
- [210] Lowe, D. G. Distinctive image features from scale-invariant keypoints. *International Journal of Computer Vision* **60**, 91–110 (2004). arXiv:[0112017](#).
- [211] Bay, H., Ess, A., Tuytelaars, T. & Van Gool, L. Speeded-Up Robust Features (SURF). *Computer Vision and Image Understanding* **110**, 346–359 (2008). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [212] Dalal, N. & Triggs, B. Histograms of oriented gradients for human detection. In *Proceedings - 2005 IEEE Computer Society Conference*

- on Computer Vision and Pattern Recognition, CVPR 2005*, vol. I, 886–893 (IEEE, 2005). arXiv:[9411012](#).
- [213] Guo, W., Fukatsu, T. & Ninomiya, S. Automated characterization of flowering dynamics in rice using field-acquired time-series RGB images. *Plant Methods* **11**, 7 (2015).
- [214] Venegas-Barrera, C. S. & Manjarrez, J. Patrones espaciales de la riqueza específica de las culebras *Thamnophis* en México. In *Revista Mexicana de Biodiversidad*, vol. 82, 179–191 (2011). arXiv:[arXiv:1210.1833v2](#).
- [215] Sivic & Zisserman. Video Google: a text retrieval approach to object matching in videos. In *Proceedings Ninth IEEE International Conference on Computer Vision*, 1470–1477 vol.2 (IEEE, 2003). arXiv:[1504.06897](#).
- [216] Santos, T. T. & De Oliveira, A. A. Image-based 3D digitizing for plant architecture analysis and phenotyping. *Workshop on Industry Applications* **2012**, 21–28 (2012).
- [217] Roscher, R. *et al.* Automated image analysis framework for high-throughput determination of grapevine berry sizes using conditional random fields. *Computers and Electronics in Agriculture* **100**, 148–158 (2014). arXiv:[1712.05647](#).
- [218] Wahid, H., Ahmad, S., Nor, M. A. M. & Rashid, M. A. *Prestasi kecakapan pengurusan kewangan dan agihan zakat: perbandingan antara majlis agama islam negeri di Malaysia*, vol. 51 (Packt Publishing, Birmingham, 2017), 1 edn. arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [219] Bowles, M. *Introduction to Machine learning with python* (O'Reilly Media, Sebastopol, 2015), 1 edn.
- [220] Baştanlar, Y. & Özuysal, M. Introduction to machine learning. *Methods in Molecular Biology* **1107**, 105–128 (2014). arXiv:[0904.3664v1](#).
- [221] Baranowski, P. *et al.* Hyperspectral and thermal imaging of oilseed rape (*Brassica napus*) response to fungal species of the genus *Alternaria*. *PLoS ONE* **10**, e0122913 (2015).
- [222] Schmidhuber, J. *Deep Learning*, vol. 10 (MIT Press, Boston, USA, 2015). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [223] Fukushima, K. Neocognitron: A self-organizing neural network model

- for a mechanism of pattern recognition unaffected by shift in position. *Biological Cybernetics* **36**, 193–202 (1980). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [224] Pound, M. & Townsend, A. J. Deep Machine Learning provides state-of-the-art performance in image-based plant phenotyping Deep Machine Learning provides state-of-the-art performance in image-based plant phenotyping. *bioRxiv* 053033 (2016).
- [225] Mohanty, S. P., Hughes, D. P. & Salathé, M. Using Deep Learning for Image-Based Plant Disease Detection. *Frontiers in Plant Science* **7**, 10 (2016). arXiv:[1604.03169](#).
- [226] Tsafaris, S. A., Minervini, M. & Scharr, H. Machine Learning for Plant Phenotyping Needs Image Processing (2016).
- [227] Naik, H. S. *et al.* A real-time phenotyping framework using machine learning for plant stress severity rating in soybean. *Plant Methods* **13**, 23 (2017).
- [228] Pajares, G., Ruz, J. J. & de la Cruz, J. M. Performance analysis of homomorphic systems for image change detection. In *Pattern Recognition and Image Analysis, Pt 1*, vol. 3522, 563–570 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2005).
- [229] Oluleye, B., Leisa, A., Jinsong, L. & Dean, D. On the Application of Genetic Probabilistic Neural Networks and Cellular Neural Networks in Precision Agriculture. *Asian Journal of Computer and Information Systems* **02**, 90–101 (2014).
- [230] Knoll, F. J., Holtorf, T. & Hussmann, S. Modified 3D time-of-flight camera for object separation in organic farming. 103351R (International Society for Optics and Photonics, 2017).
- [231] Pérez, A. J., López, F., Benlloch, J. V. & Christensen, S. Colour and shape analysis techniques for weed detection in cereal fields. *Computers and Electronics in Agriculture* **25**, 197–212 (2000).
- [232] Mokhtar, U., Ali, M. A. S., Hassanien, A. E. & Hefny, H. Identifying Two of Tomatoes Leaf Viruses Using Support Vector Machine. *Information Systems Design and Intelligent Applications* 771–782 (2015).
- [233] Casanova, J. J., O’Shaughnessy, S. A., Evett, S. R. & Rush, C. M. Development of a wireless computer vision instrument to detect biotic

- stress in wheat. *Sensors (Switzerland)* **14**, 17753–17769 (2014).
- [234] Bauer, S. D., Korč, F. & Förstner, W. The potential of automatic methods of classification to identify leaf diseases from multispectral images. *Precision Agriculture* **12**, 361–377 (2011).
- [235] Atkinson, J. A. *et al.* Combining semi-automated image analysis techniques with machine learning algorithms to accelerate large scale genetic studies. *GigaScience* (2017).
- [236] Ballabeni, A., Apollonio, F. I., Gaiani, M. & Remondino, F. Advances in image pre-processing to improve automated 3d reconstruction. In *International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences - ISPRS Archives*, vol. 40, 315–323 (2015).
- [237] Tsung-Shiang, H. An Improvement Stereo Vision Images Processing for Object Distance Measurement. *International Journal of Automation and Smart Technology* **5**, 85–90 (2015).
- [238] Raza, S. E., Prince, G., Clarkson, J. P. & Rajpoot, N. M. Automatic detection of diseased tomato plants using thermal and stereo visible light images. *PLoS ONE* **10**, e0123262 (2015).
- [239] Kazmi, W., Foix, S., Alenyà, G. & Andersen, H. J. Indoor and outdoor depth imaging of leaves with time-of-flight and stereo vision sensors: Analysis and comparison. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* **88**, 128–146 (2014).
- [240] Raza, S. E. A. *et al.* Automatic detection of regions in spinach canopies responding to soil moisture deficit using combined visible and thermal imagery. *PLoS ONE* **9**, e97612 (2014).
- [241] Mahlein, A.-K. *et al.* Plant disease detection by hyperspectral imaging: from the lab to the field. *Advances in Animal Biosciences* **8**, 238–243 (2017).
- [242] Pandey, P., Ge, Y., Stoerger, V. & Schnable, J. C. High Throughput In vivo Analysis of Plant Leaf Chemical Properties Using Hyperspectral Imaging. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1348 (2017).
- [243] Wahabzada, M. *et al.* Metro maps of plant disease dynamics-automated mining of differences using hyperspectral images. *PLoS ONE* **10**, e0116902 (2015).

- [244] Chattopadhyay, S., Akbar, S. A., Elfiky, N. M., Medeiros, H. & Kak, A. Measuring and modeling apple trees using time-of-flight data for automation of dormant pruning applications. In *2016 IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision, WACV 2016*, 1–9 (IEEE, 2016).
- [245] Weiss, U., Biber, P., Laible, S., Bohlmann, K. & Zell, A. Plant species classification using a 3D LIDAR sensor and machine learning. In *Proceedings - 9th International Conference on Machine Learning and Applications, ICMLA 2010*, 339–345 (IEEE, 2010).
- [246] Greaves, H. E. *et al.* Applying terrestrial lidar for evaluation and calibration of airborne lidar-derived shrub biomass estimates in Arctic tundra. *Remote Sensing Letters* **8**, 175–184 (2017).
- [247] Paulus, S., Dupuis, J., Mahlein, A. K. & Kuhlmann, H. Surface feature based classification of plant organs from 3D laserscanned point clouds for plant phenotyping. *BMC Bioinformatics* **14**, 238 (2013).
- [248] Liu, S. *et al.* Estimating wheat green area index from ground-based LiDAR measurement using a 3D canopy structure model. *Agricultural and Forest Meteorology* **247**, 12–20 (2017).
- [249] Lopatin, J., Dolos, K., Hernández, H. J., Galleguillos, M. & Fassnacht, F. E. Comparing Generalized Linear Models and random forest to model vascular plant species richness using LiDAR data in a natural forest in central Chile. *Remote Sensing of Environment* **173**, 200–210 (2016).
- [250] García-Tejero, I. F., Hernández, A., Padilla-Díaz, C. M., Diaz-Espejo, A. & Fernández, J. E. Assessing plant water status in a hedgerow olive orchard from thermography at plant level. *Agricultural Water Management* **188**, 50–60 (2017).
- [251] Deery, D. M. *et al.* Methodology for High-Throughput Field Phenotyping of Canopy Temperature Using Airborne Thermography. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1808 (2016).
- [252] Rousseau, C. *et al.* High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* **9**, 17 (2013).

- [253] Wetterich, C. B., Felipe de Oliveira Neves, R., Belasque, J., Ehsani, R. & Marcassa, L. G. Detection of Huanglongbing in Florida using fluorescence imaging spectroscopy and machine-learning methods. *Applied Optics* **56**, 15 (2017).
- [254] Hillnhütter, C., Sikora, R. A., Oerke, E. C. & Van Dusschoten, D. Nuclear magnetic resonance: A tool for imaging belowground damage caused by *Heterodera schachtii* and *Rhizoctonia solani* on sugar beet. *Journal of Experimental Botany* **63**, 319–327 (2012).
- [255] Donis-González, I. R., Guyer, D. E., Fulbright, D. W. & Pease, A. Postharvest noninvasive assessment of fresh chestnut (*Castanea* spp.) internal decay using computer tomography images. *Postharvest Biology and Technology* **94**, 14–25 (2014).
- [256] Millar, A. J., Carré, I. A., Strayer, C. A., Chua, N. H. & Kay, S. A. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* **267**, 1161–1163 (1995).
- [257] Gouws, L. M., Osmond, C. B., Schurr, U. & Walter, A. Distinctive diel growth cycles in leaves and cladodes of CAM plants: Differences from C3 plants and putative interactions with substrate availability, turgor and cytoplasmic pH. In *Functional Plant Biology*, vol. 32, 421–428 (2005).
- [258] Poiré, R. *et al.* Diel time-courses of leaf growth in monocot and dicot species: Endogenous rhythms and temperature effects. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1751–1759 (2010).
- [259] Sabzalain, M. R. *et al.* High performance of vegetables, flowers, and medicinal plants in a red-blue LED incubator for indoor plant production. *Agronomy for Sustainable Development* **34**, 879–886 (2014).
- [260] Tisné, S. *et al.* Phenoscope: An automated large-scale phenotyping platform offering high spatial homogeneity. *Plant Journal* **74**, 534–544 (2013).
- [261] Honsdorf, N., March, T. J., Berger, B., Tester, M. & Pillen, K. High-throughput phenotyping to detect drought tolerance QTL in wild barley introgression lines. *PloS one* **9**, e97047 (2014).
- [262] Barron, J. & Liptay, A. Measuring 3-D plant growth using optical flow. *Bioimaging* 1–10 (1997).

- [263] Aboelela, A., Liptay, A. & Barron, J. L. Plant Growth Measurement Techniques using Near-Infrared Imagery. *International Journal of Robotics and Automation* **20** (2005).
- [264] Spalding, E. P. & Miller, N. D. Image analysis is driving a renaissance in growth measurement. *Current opinion in plant biology* **16**, 100–4 (2013).
- [265] Navlakha, S. & Bar-Joseph, Z. Algorithms in nature: the convergence of systems biology and computational thinking. *Molecular systems biology* **7**, 546 (2011).
- [266] Kircher, M., Stenzel, U. & Kelso, J. Improved base calling for the Illumina Genome Analyzer using machine learning strategies. *Genome biology* **10**, R83 (2009).
- [267] Horton, P. & Nakai, K. Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proceedings / ... International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* **5**, 147–52 (1997).
- [268] Yousef, M. *et al.* Combining multi-species genomic data for microRNA identification using a Naive Bayes classifier. *Bioinformatics (Oxford, England)* **22**, 1325–34 (2006).
- [269] Tellaeche, A., Pajares, G., Burgos-Artizzu, X. P. & Ribeiro, A. A computer vision approach for weeds identification through Support Vector Machines. *Applied Soft Computing* **11**, 908–915 (2011).
- [270] Guerrero, J., Pajares, G., Montalvo, M., Romeo, J. & Guijarro, M. Support Vector Machines for crop/weeds identification in maize fields. *Expert Systems with Applications* **39**, 11149–11155 (2012).
- [271] Trussell, H. Color and Multispectral Image Representation and Display. In Bovik, A. (ed.) *Handbook of Image and Video Processing*, chap. 4.6, 337–353 (Academic Press, San Diego, 2001).
- [272] Oostendorp, N. Practical Computer Vision with SimpleCV. chap. 4-5, 2 (O'Reilly Media, Sebastopol, CA, 2012).
- [273] Joblove, G. H. & Greenberg, D. Color Spaces for Computer Graphics. In *ACM siggraph computer graphics*, vol. 12, 20–25 (ACM Press, New

- York, New York, USA, 1978). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [274] Foster, D. H. Color Appearance. In *The Senses: A Comprehensive Reference*, vol. 2, 119–132 (Academic Press, 2010).
 - [275] Fernandez, C. *et al.* Automated visual inspection system for the classification of preserved vegetables. In *Industrial Electronics, 2002. ISIE 2002. Proceedings of the 2002 IEEE International Symposium on*, vol. 1, 265–269 vol.1 (IEEE, 2002).
 - [276] Chen, Y. Q., Nixon, M. S. & Thomas, D. W. Statistical geometrical features for texture classification. *Pattern Recognition* **28**, 537–552 (1995).
 - [277] Haralick, R. M., Dinstein, I. & Shanmugam, K. Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* **SMC-3**, 610–621 (1973).
 - [278] Zucker, S. W. & Terzopoulos, D. Finding structure in Co-occurrence matrices for texture analysis. *Computer Graphics and Image Processing* **12**, 286–308 (1980).
 - [279] Bharati, M. H., Liu, J. J. & MacGregor, J. F. Image texture analysis: Methods and comparisons. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **72**, 57–71 (2004).
 - [280] Navarro, P. J., Alonso, D. & Stathis, K. Automatic detection of microaneurysms in diabetic retinopathy fundus images using the L*a*b color space. *Journal of the Optical Society of America A* **33**, 74 (2016).
 - [281] Ghazali, K. H., Mansor, M. F., Mustafa, M. M. & Hussain, A. Feature Extraction Technique using Discrete Wavelet Transform for Image Classification. In *2007 5th Student Conference on Research and Development*, 1–4 (IEEE, 2007).
 - [282] Mallat, S. G. A Theory for Multiresolution Signal Decomposition: The Wavelet Representation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **11**, 674–693 (1989). arXiv:[NIHMS150003](#).
 - [283] Arivazhagan, S. & Ganesan, L. Texture classification using wavelet transform. *Pattern Recognition Letters* **24**, 1513–1521 (2003).
 - [284] Lantz, B. *Machine learning with R : discover how to build machine learning algorithms, prepare data, and dig deep into data prediction techni-*

- ques with R* (Packt Publishing, 2015).
- [285] Hastie, T., Tibshirani, R. & Friedman, J. Elements. In *The elements of statistical learning: data mining, inference, and prediction*, chap. 1, 337–387 (Springer, 2009), 2 edn.
- [286] Bradley, A. P. The use of the area under the ROC curve in the evaluation of machine learning algorithms. *Pattern Recognition* **30**, 1145–1159 (1997).
- [287] Hand, D. J. Measuring classifier performance: A coherent alternative to the area under the ROC curve. *Machine Learning* **77**, 103–123 (2009).
- [288] James, G., Witten, D., Hastie, T. & Tibshirani, R. Moving Beyond Linearity. In G, C., S, F. & I, O. (eds.) *An introduction to statistical learning*, chap. 7, 265–286 (Springer, 2013), 7 edn.
- [289] Anderson-Cook, C. M. *Generalized Additive Models: An Introduction With R*, vol. 102 (Chapman and Hall/CRC, 2007), 2 edn. arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [290] Hudson, A., Critchley, J. & Erasmus, Y. The genus *Antirrhinum* (snapdragon): A flowering plant model for evolution and development. *Cold Spring Harbor Protocols* **3** (2008).
- [291] Team, R. D. C. & R Development Core Team, R. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2016). arXiv:[arXiv:1011.1669v3](#).
- [292] Delgado-Benarroch, L., Weiss, J. & Egea-Cortines, M. The mutants *compacta* ähnlich, *Nitida* and *Grandiflora* define developmental compartments and a compensation mechanism in floral development in *Antirrhinum majus*. *Journal of Plant Research* **122**, 559–569 (2009).
- [293] Fenske, M. P. *et al.* Circadian clock gene LATE ELONGATED HYPOCOTYL directly regulates the timing of floral scent emission in *Petunia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 9775–9780 (2015). arXiv:[arXiv:1408.1149](#).
- [294] Stehmann, J. R., Lorenz-Lemke, A. P., Freitas, L. B. & Semir, J. The genus *Petunia*. In Gerats, T. & Strommer, J. (eds.) *Petunia. Evolutionary, developmental and physiological genetics*, chap. 1, 1–28 (Springer, New York, New York, USA, 2009), 2 edn.

- [295] Kim, W.-Y. Independent Roles for EARLY FLOWERING 3 and ZEITLUPE in the Control of Circadian Timing, Hypocotyl Length, and Flowering Time. *PLANT PHYSIOLOGY* **139**, 1557–1569 (2005).