

Development of bioinformatics tools for phenotyping with artificial vision

Desarrollo de herramientas bioinformáticas para el fenotipado con visión artificial

M.V. Díaz-Galián^{1*}, P.J. Navarro², M. Egea-Cortines¹

¹Instituto de Biotecnología Vegetal, Edificio I+D+I, Campus Muralla del Mar 30202, Cartagena, (Murcia).

²DSIE, Plaza del Hospital s/n, Campus Muralla del Mar 30202, Cartagena (Murcia).

*mariavictoria.diaz@edu.upct.es

Abstract

High-throughput phenotyping with artificial vision is becoming central in biology. It provides information about non-appreciable characteristics. Furthermore, it is a non-invasive technique, with a low impact on the subject of study. We could discover the effect of mutations of circadian clock genes affecting growth speed of lateral organs, such as leaves, flowers and fruits. The main aim of my PhD would be the development of an automatic program of image analysis for plant phenotyping. Different plant materials are going to be studied (*Petunia*, *Antirrhinum majus*, *Arabidopsis* and strawberry) using the adequate bioinformatic tools (informatic languages such as Perl, Python, SQL or R); as well as a vision system, which will depend on the specific object of the experiment (infrared, RGB and hyperspectral) with a temperature and lightning control.

Keywords: Circadian clock; image processing; plant growth.

Resumen

El fenotipado de alta resolución mediante visión artificial está en pleno desarrollo, ya que nos permite obtener información de características no apreciables con otros métodos. Además, presenta ventajas como que es una técnica no invasiva, con un bajo impacto en el objeto de estudio. Con ella podríamos conocer el efecto de mutaciones en genes del reloj circadiano sobre la velocidad de crecimiento de los órganos laterales, como hojas, flores y frutos. El principal objetivo de mi doctorado sería el desarrollo de un programa automático de análisis de imagen para el fenotipado vegetal. Para ello se va a trabajar con distintos materiales vegetales (*Petunia*, *Antirrhinum majus*, *Arabidopsis* y Fresa) utilizando las herramientas bioinformáticas adecuadas (lenguajes informáticos como Perl, Python, SQL o R); así como un sistema de visión, que dependerá del objetivo específico del experimento (infrarrojo, RGB e hiperespectrales) con un control de temperatura e iluminación.

Palabras clave: Crecimiento vegetal; procesamiento de imágenes; reloj circadiano.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las técnicas ómicas están en pleno auge. Entre ellas se encuentra el análisis fenotípico, el cual es novedoso al poder obtener medidas no posibles con otras técnicas [1]. Centrándonos en las plantas, se puede estudiar el ángulo; la longitud; la velocidad de crecimiento y de movimiento de los distintos órganos (tallos, hojas y flores); la duración y dimensión de la apertura floral; estudio de fluorescencia de la clorofila u otros compuestos [1,2]. Además, hay que

tener en cuenta los cambios rítmicos en los parámetros físicos de temperatura e iluminación. Estos factores externos junto con los internos, genes, dan lugar al reloj circadiano que es el mecanismo por el que se coordinan cambios diarios en los comportamientos de la planta[3]. Sin embargo, esta técnica presenta dificultades por los cambios de posición que impiden la idónea toma de las medidas. Por ello, un reto de nuestros días es el desarrollo de software para la obtención de mediciones automáticas. [2,4,5]

En este trabajo se presentarán los resultados de *Antirrhinum majus* frente a *Antirrhinum linkianum*, donde se quería buscar diferencias en el patrón de movimiento, basándonos en evidencias apreciables en el fenotipo. Por otro lado, también se quería ver el efecto del cambio de fotoperiodo en las hojas de Petunia. Para ello, se trabajará en condiciones idóneas (12 horas de luz y 12 de oscuridad) y en 24 horas de luz u oscuridad. Por último, hay que comentar que los objetivos generales del doctorado son el desarrollo de programas automáticos de visión artificial para el fenotipado vegetal; la comparación de características fenotípicas en silvestres y mutantes, para genes involucrados en rutas de movimiento, crecimiento y/o floración; y el estudio de posibilidades de mercado

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para conseguir los objetivos propuestos se va a requerir de material vegetal, herramientas bioinformáticas y de una cámara para la realización de las imágenes.

2.1 Material vegetal

Dependiendo de las características propias de las plantas y de la información a obtener, se usará una visión lateral o aérea. Se va a trabajar con Petunia Mitchell (W115) [6], que pertenece a las Solanáceas y que tiene un crecimiento simpodial como la orquídea, tomate, pimiento, berenjena, etc; *Antirrhinum majus* 165E y su silvestre (*A. linkianum*) [7,8], por su crecimiento en espiga como el trigo; y la fresa, con un crecimiento en roseta como *Arabidopsis*, lechuga, etc.

2.2 Herramientas bioinformáticas

Se van a utilizar diferentes lenguajes informáticos como Perl, Python, SQL o R, según las necesidades. Además, se podría utilizar el sistema operativo Linux si las necesidades del estudio lo requieren. Actualmente se está haciendo uso de R-studio, gracias a las librerías de análisis de imagen “imager”, “bmp”, “imager” and “readr”. De igual forma, se está trabajando con el paquete MetaCycle [9], que tiene implementados los algoritmos ARSER, JTK_Cycle y Lomb-Scargle.

2.3 Cámara de visión

Durante el doctorado se trabajará con cámaras de infrarrojo, RGB e hiperspectrales, junto a los soportes necesarios para la correcta realización de las imágenes. Además, se tendrá un control de la temperatura y de la iluminación, las cuales podrán ser modificadas adaptándose a las condiciones idóneas de crecimiento del material vegetal o no, si lo que se busca es observar la respuesta a una condición de estrés.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como hemos comentado, uno de los problemas en la segmentación de las imágenes es el movimiento de las plantas. *A. linkianum* tiene un comportamiento rastrero, el cual no presenta

A. majus y por esta razón quisimos detectar la velocidad de movimiento de ambas, entre otros parámetros. Este movimiento se cuantificó con las medidas de desplazamiento del punto central de la planta (imágenes aéreas).

Como se puede observar en la Tabla 1, se confirma el mayor movimiento de *A. linkianum* al tener una media de velocidad mayor durante la noche, frente a *A. majus*. La relación entre ellas es de aproximadamente 2.33 veces más alto en *A. linkianum* frente a *A. majus*.

Por otro lado, intentamos estudiar el movimiento de plantas más grandes, usando *Petunia x hybrida* como modelo. Al observar las plantas se puede ver un patrón de apertura y cierre a lo largo del día en las hojas de la planta. Este movimiento podría ser circadiano. Consideramos que la hoja se podía dividir en tres zonas: peciolo; de peciolo a mitad de la hoja; y de la mitad de la hoja al final de la misma. En la Tabla 2 se muestran los resultados de la última sección al ser sometida a cambios en el fotoperiodo. La planta fue expuesta a condiciones de iluminación y oscuridad continua y a un fotoperiodo normal de 12 horas de luz y oscuridad.

Además, en la Tabla 2 se confirmó el patrón de apertura de las hojas durante periodos de iluminación y de cierre para los de oscuridad, lo que tiene un significado biológico puesto que durante las horas de luz la planta necesita captar la mayor cantidad de energía luminosa a través de sus receptores específicos [6,7]. El cambio de posición es una consecuencia del cambio de iluminación puesto que durante los fotoperiodos continuos (DD y LL) la desviación típica es menor indicando que hay una tendencia a permanecer en esos valores. Por esta razón, podría ser un movimiento circadiano [3].

4. CONCLUSIONES

La conclusión del experimento de *A. majus* y *A. linkianum* es que hay un patrón de movimiento distinto durante la noche entre los objetos de estudio. Por ello, habría que realizar estudios para saber si durante el día sucede lo mismo, así como investigaciones en campo para dilucidar si la causa es que *A. majus* es isogénica, mientras que *A. linkianum* no.

Mientras que para el estudio de *Petunia* se puede concluir que este movimiento está regulado muy fuertemente por la luz. Habría que estudiar la dinámica en cada etapa para obtener mayor información sobre el movimiento de las hojas.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto CDTI 5117/17CTA-P y PROYECTO BFU 2017 88300-C2-1-R

6. REFERENCIAS

[1] R. T. Furbank and M. Tester, "Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck," *Trends Plant Sci.*, vol. 16, no. 12, pp. 635–644, Dec. 2011.

[2] P. Navarro, F. Pérez, J. Weiss, and M. E.-C. Sensors, "Machine learning and computer vision system for phenotype data acquisition and analysis in plants," *sensors*, vol. 16, no. 5, p. 641, 2016.

[3] J. M. Gendron, J. L. Pruneda-Paz, C. J. Doherty, A. M. Gross, S. E. Kang, and S. A. Kay, "Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor.," *P NATL ACAD SCI USA*, vol. 109, no. 8, pp. 3167–72, Feb. 2012.

[4] P. Navarro, C. Fernández, J. Weiss, and M. E.-C. Sensors, "Development of a configurable growth chamber with a computer vision system to study circadian rhythm in plants," *sensors*, vol. 12, no. 11, pp. 15356–15375, 2012.

[5] F. Perez-Sanz and P. Navarro, "Plant phenomics: an overview of image acquisition technologies and image data

analysis algorithms,” *Gigascience*, vol. 6, no. 11, pp. 1–18, 2017.

[6] A. Z. Mitchell, M. R. Hanson, R. C. Skvirsky, and F. M. Ausubel, “Anther Culture of Petunia: Genotypes with High Frequency of Callus, Root, or Plantlet Formation,” *Z PFLANZENPHYSIOL*, vol. 100, no. 2, pp. 131–145, Nov. 1980.

[7] V. Ruiz-Hernández, B. Hermans, J. Weiss, and M. Egea-Cortines, “Genetic Analysis of Natural Variation in Antirrhinum Scent Profiles Identifies BENZOIC ACID CARBOXYMETHYL TRANSFERASE As the Major Locus Controlling Methyl Benzoate Synthesis,” *Front PLANT SCI*, vol. 8, p. 27, Jan. 2017.

[8] Z. Schwarz-Sommer *et al.*, “A molecular recombination map of *Antirrhinum majus*,” *BMC PLANT BIOL*, vol. 10, p. 275, Dec. 2010.

[9] G. Wu, R. C. Anafi, M. E. Hughes, K. Kornacker, and J. B. Hogenesch, “MetaCycle: an integrated R package to evaluate periodicity in large scale data,” *Bioinformatics*, vol. 32, no. 21, pp. 3351–3353, Nov. 2016.

[10] K. NOZUE and J. N. MALOOF, “Diurnal regulation of plant growth,” *PLANT CELL Env.*, vol. 29, no. 3, pp. 396–408, Mar. 2006.

[11] A. Wiese, M. M. Christ, O. Virnich, U. Schurr, and A. Walter, “Spatio-temporal leaf growth patterns of *Arabidopsis thaliana* and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle,” *NEW PHYTOL*, vol. 174, no. 4, pp. 752–761, Jun. 2007.

Tabla 1. Media de velocidad *A.linkianum* y *A.majus*.

Especie	Velocidad±desviación estándar (cm/h)
<i>A.linkianum</i>	0.70±0.43
<i>A.majus</i>	0.30±0.19

Tabla 2. Media del ángulo en los diferentes fotoperiodos en Petunia.

Fotoperiodo	Ángulo (°)
Normal (DL)	-19.63±62.56
Luz continúa (LL)	-50.65±22.41
Oscuridad continúa (DD)	62.29±24.82