

Analysis of growth kinetics of *Petunia sp.* using a computer vision based phenotyping system

Análisis de la cinética de crecimiento de *Petunia sp.* mediante un sistema de fenotipado basado en visión artificial

F. Pérez-Sanz^{1*}, J. Weiss¹, P.J. Navarro-Lorente², M. Egea-Cortines¹

¹Genética, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena 30202, España.

²DSIE, Universidad Politécnica de Cartagena, Campus Muralla del Mar, s/n. Cartagena 30202, España.

*fernando.perez8@um.es

Abstract

high throughput phenotyping in plants, is a major challenge to improve our understanding of how these biological systems work and to improve crop yields. Phenotyping systems are tools that can help improve our understanding in this field. In this work, we show the development of a system of computer vision based phenotyping system applied to the study of growth in *Petunia*'s flowers, showing its robustness and flexibility. As a result, it has been observed that, at the reproductive tissue level and based on the data analyzed, there are no significant differences in the growth rate of the *Petunia* flower.

Keywords: Circadian clock; plant phenotyping; computer vision.

Resumen

El fenotipado masivo de plantas es un importante reto para tanto para mejorar nuestra comprensión sobre el funcionamiento de estos sistemas biológicos como para la mejora del rendimiento de los cultivos. Los sistemas de fenotipado son herramientas que pueden ayudar a mejorar nuestra comprensión en este campo. En este trabajo mostramos el desarrollo de un sistema de fenotipado basado en visión artificial aplicado al estudio del crecimiento en flores de *Petunia*, mostrando su robustez y flexibilidad. Se ha podido observar que, a nivel de tejido reproductivo y en base a los datos analizados, no se observan diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de la flor de *Petunia*.

Palabras clave: Reloj circadiano; fenotipado de plantas; visión artificial.

1. INTRODUCCIÓN

Desde mucho antes de que se descubriese el DNA los agricultores ya hacían selección vegetal basada en fenotipos. Sin embargo, este proceso, aunque eficaz es lento. Hoy con la creciente demanda de alimentos a nivel mundial, se hace indispensable tener la capacidad de fenotipar y seleccionar con mayor rapidez y eficacia.

Por ello en los últimos años, la industria alimentaria junto con avanzados institutos de investigación como el Australian *Plant Phenomics Facility* (<http://www.plantphenomics.org.au/>), el *European Plant Phenotyping Network* (<http://www.plant-phenotyping-network.eu/>) o la *USDA* (<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>) entre otros están colaborando en el

desarrollo de plataformas de fenotipado, que faciliten el procesado de la ingente cantidad de información genética aportada por las actuales técnicas de genotipado de alto rendimiento (HTS). Además estas plataformas se emplean tanto para contrastar si el espécimen se comporta fenotípicamente tal como se espera por su genotipo [1, 2] como para ayudar a comprender determinados procesos o comportamientos biológicos.

La llegada de las llamadas tecnologías ómicas, ha supuesto un enorme cambio en la forma en el diseño experimental abriendo nuevas vías de conocimiento dentro del campo de la biología [3]. Una de las más recientes en aparecer dentro del campo del muestreo automático y masivo ha sido la fenómica, que comprende el conjunto de herramientas que ayudan a adquirir datos fenotípicos cuantitativos. Dentro de este grupo de herramientas, una de las más actuales se basa en la adquisición automática de imágenes basada en sistemas de visión artificial [4].

El reloj circadiano está constituido por una compleja red de genes presentes en la mayor parte de los organismos de la Tierra, que regula y les permite anticiparse y adaptarse de forma eficaz a los cambios cíclicos día/noche [5]. La sincronización de estos componentes del reloj con señales externas refuerza el funcionamiento rítmico del reloj, regulando procesos tales como la fotosíntesis, floración, niveles hormonales, etc. [6].

En este trabajo hemos desarrollado un sistema de fenotipado basado en visión artificial, flexible y robusto con el que se pretende estudiar la cinética del desarrollo de algunos órganos de la planta de forma no invasiva ni destructiva [7]. Se pretende determinar si existe en todos los casos, una relación directa entre el crecimiento y los ciclos día/noche entre individuos silvestres y transgénicos, con el fin de aportar algo más de conocimientos acerca del comportamiento fenotípico de mutantes del reloj.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2 Material biológico

Se han empleado ejemplares de dos líneas de *Petunia x hybrida*, una azigota no transgénica y otra que expresa una construcción de RNAi cuya función es silenciar el gen PhZTL. En la grabación se han medido dos flores PhZTL y una *wild type* (WT)

El sistema de adquisición (Fig. 1a y 1b) de datos está formado por 4 módulos descritos a continuación.

2.2 Subsistema de iluminación

El panel diurno está constituido por una combinación de cinco tipos de diodos de emisión de luz (LED) de diferentes longitudes de onda (UV-290, 450, 460, 630 y 660 nm), diseñado para favorecer el crecimiento de la planta (Fig. 1a).

El panel nocturno está compuesto por una barra de 132 LEDs que emiten en el infrarrojo cercano (850 nm), esta luz es activada durante 2-3 segundos, tiempo suficiente para disparar la cámara de visión (Fig. 1a).

Mediante esta combinación de luminarias se realizó un experimento luz/oscuridad de 14h./10h., periodo que se asemeja al que tenían las plantas cuando se cogieron del invernadero.

2.3 Subsistema de captura

Se ha empleado una cámara de visión artificial multispectral, que consta de dos sensores de dispositivo de carga acoplada (CCD). Uno es multicanal RGB de 24 bits que captura imágenes en espectro visible (para los ciclos diurnos) y otro monocanal, capaz de captar en el infrarrojo. Ambos con resolución de 1296 (h) x 966 (v) píxeles y comunicación Gigabyte Ethernet.

Tanto el sistema de captura como de iluminación están controlados mediante una interfaz gráfica de usuario de diseño propio y desarrollada en C/C++. A través de una tarjeta electrónica digital con 8 canales de entrada/salida y una tarjeta de relés optoacoplados. Un PC-industrial es el encargado de controlar todos los parámetros del sistema a través del puerto USB el sistema de iluminación y de dos puertos ethernet la cámara de visión.

2.4 Subsistema de procesado y análisis

Para el análisis de imágenes se ha empleado el paquete comercial Matrox Imaging Library ([MIL](#)). Es una aplicación orientada al análisis de imágenes médicas, visión artificial, análisis de vídeo, etc. Las librerías están disponibles para programar en C++, VisualBasic y VisualC++, alternativamente proporcionan una interfaz gráfica para el análisis y permite automatizar trabajos mediante *scripts* dentro de la propia interfaz.

El análisis estadístico de los resultados se ha realizado mediante el lenguaje de programación estadística [R](#).

Se ha realizado un ciclo de grabación de 146 horas aproximadamente hasta la apertura de las flores, obteniendo un total de 584 imágenes capturadas a intervalos de 15 minutos. Los parámetros que se han medido sobre la flor de Petunia, han sido la longitud a lo largo del eje longitudinal de la flor, área el centro de gravedad y el ángulo respecto a la horizontal.

A partir de ellos se han obtenido otros parámetros calculados como la tasa de crecimiento, definida como incremento de longitud por unidad de tiempo, o el vector de movimiento definido como la distancia del centro de gravedad en cada periodo respecto al periodo inicial.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema ha sido empleado para la realización de diversos test y experimentos, habiendo estado en funcionamiento ininterrumpido durante varias semanas, mostrando su robustez y flexibilidad.

Tras realizar test de Welch o ANOVA heterocedástica, para contrastar si existen diferencias significativas en cuanto a velocidad de crecimiento, no se han observado diferencias estadísticamente significativas. De la observación de las gráficas de variación de ángulo y vector de movimiento se desprende el paralelismo existente entre las curvas de cada individuo, algo que se evidencia especialmente en la gráfica del vector de movimiento (Fig. 2a y 2b). Como resultado de un análisis de series temporales de un WT con un ZTL, se ha podido observar un ligero desfase en el movimiento de las flores a favor de ZTL.

4. CONCLUSIONES

Los experimentos previos realizados en invernadero muestran diferencias fenotípicas importantes a nivel de crecimiento vegetativo y tiempo de floración, sin embargo, esas diferencias no se reflejan de forma significativa en la velocidad crecimiento y movimiento de la flor. Por tanto, debe existir una diferenciación a nivel de las señales por parte del reloj circadiano que difiera entre el tejido vegetativo y el reproductivo. El hecho de encontrar un pequeño desfase al analizar series temporales podría indicar que el silenciamiento de ZTL podría estar afectando a la sincronización del individuo con los ciclos día/noche. Pensamos, sin embargo, que es necesario realizar más experimentos con distintas líneas transgénicas con el fin de validar estas conclusiones preliminares.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis su interés, dedicación, consejos y críticas (siempre constructivas).

El trabajo realizado se enmarca dentro de los proyectos MICINN BFU-2013-45148-R y ViSel-TR (TIN2012-39279).

6. REFERENCIAS

- [1] Fiorani, F., Schurr, U. 2013. Future scenarios for plant phenotyping. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:267–91.
- [2] Weight, C., Parnham, D., Waites, R. 2008. LeafAnalyser: A computational method for rapid and large-scale analyses of leaf shape variation. *Plant J.* 53:578–586.
- [3] Fahlgren, N., Gehan, M. a, Baxter, I. 2015. Lights, camera, action: high-throughput plant phenotyping is ready for a close-up. *Curr. Opin. Plant Biol.* 24:93–99.
- [4] Deligiannidis, L., Arabnia, H., Emerging Trends in Image Processing, Computer Vision and Pattern Recognition, 1st ed., Morgan Kaufmann, Waltham, USA 2014.
- [5] Staiger, D., Shin, J., Johansson, M., Davis, S.J., 2013. The circadian clock goes genomic. *Genome Biol.* 14:208.
- [6] Nagel, D.H., Pruneda-Paz, J.L., Kay, S. a. 2014. FBH1 affects warm temperature responses in the Arabidopsis circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:14595–14600.
- [7] Navarro, P.J., Pérez, F., Weiss, J., Egea-Cortines, M. 2016. Machine Learning and Computer Vision System for Phenotype Data Acquisition and Analysis in Plants. *Sensors (Basel).* 16:641.



Figura 1. Configuración grabación cenital.

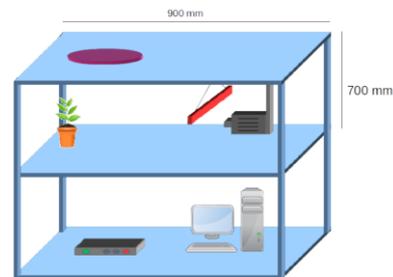


Figura 2. Esquema del sistema.

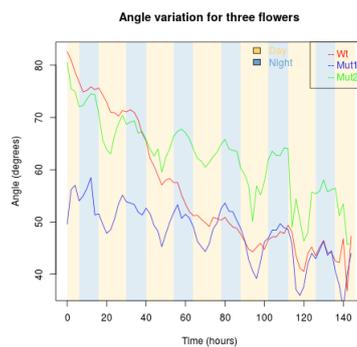


Figura 3. Variación del ángulo en el tiempo.

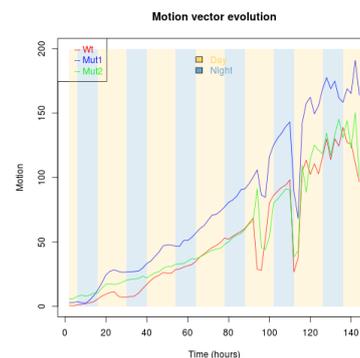


Figura 4. Variación del vector movimiento.