

# Mathematical methods to analyze growth and movement phenotypes

## Métodos matemáticos para analizar fenotipos de crecimiento y movimiento

M.V. Díaz-Galián<sup>1\*</sup>, F. Perez-Sanz<sup>2</sup>, J.D. Sanchez-Pagán<sup>3</sup>, J. Weiss<sup>1</sup>, M. Egea-Cortines<sup>1</sup>, P.J. Navarro<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Genética Molecular, Instituto de Biotecnología Vegetal, Edificio I+D+I, Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), Campus Muralla del Mar, 30202 Cartagena. Spain.

<sup>2</sup>Biomedical Informatic and Bioinformatic Platform, Biomedical Research Institute of Murcia, University Clinical Hospital 'Virgen de la Arrixaca', University of Murcia, 30120, Murcia. Spain.

<sup>3</sup>Ecología y Nuevas Tecnologías, Avda. Lorca 193, 30835 Sangonera la Seca, Murcia. Spain.

<sup>4</sup>Departamento de Tecnologías de la Información y las Comunicaciones, ETSIT, UPCT, Campus Muralla del Mar, s/n, 30202 Cartagena. Spain.

\*mariavictoria.diaz@edu.upct.es

### Abstract

Phenotyping using image analysis can be useful to measure both growth and organ movement. This study proposes a set of tools to analyse both features. Several species with different growth habits were used including *Antirrhinum majus*, *A. linkianum*, *Petunia x hybrida* and *Fragaria x ananassa*. These analyses revealed how different interpretations could be made depending on the mathematical method. The results indicated that different mathematical fits should be used and not only one as fits can show different information.

**Keywords:** plant growth; image acquisition; phenomics.

### Resumen

El fenotipado con análisis de imagen puede ser útil para medir tanto crecimiento como el movimiento de un órgano vegetal. Este estudio propone un conjunto de herramientas para analizar ambas características. Varias especies con diferentes patrones de crecimientos fueron usadas: *Antirrhinum majus*, *A. linkianum*, *Petunia x hybrida* y *Fragaria x ananassa*. Los análisis revelaron cómo diferentes interpretaciones pueden hacerse dependiendo del método de análisis. Los resultados indicaron que diferentes ajustes matemáticos deben ser utilizados y no solamente uno, pues podemos obtener una información más completa.

**Palabras clave:** crecimiento vegetal; adquisición de imagen; fenómica.

## 1. INTRODUCCIÓN

El movimiento vegetal ha sido algo ya estudiado por Darwin y otros científicos (1,2). Se pueden describir patrones diarios como resultado del reloj circadiano, así como de luz y temperatura, que modulan el movimiento y crecimiento vegetal (3–6). Sin embargo, hay otros procesos que dependen únicamente del fotoperiodo o termoperiodo. Todos estos fenómenos se han descrito con ajustes matemáticos simples como lineal, exponencial, etc (7).

Hoy en día es posible obtener datos fenotípicos a partir de la adquisición de imágenes. Dependiendo del fin que se quiera, se pueden usar diferentes tipos de cámaras, tales como cámaras 2D, 3D, monocromáticas, multiespectral o hiperespectrales (8). Además, es importante analizar previamente qué tipo de longitud de onda usar, la intensidad de la luz y el fondo a utilizar es mejor para lo que queremos captar (9).

En este trabajo, se analizó el crecimiento y movimiento en varias especies vegetales: *Antirrhinum majus*, *A. linkianum*, *Petunia x hybrida* and *Fragaria x ananassa*, las cuales tienen diferentes comportamientos en su crecimiento. Se estudió qué tipo de ajustes matemáticos se pueden realizar lineal, exponencial, logarítmico, polinomial o modelo aditivo generalizado (GAM) con el fin de obtener la mayor información posible.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se usaron 4 especies: *Antirrhinum* (10), *Petunia x hybrida* (11,12) y *Fragaria x ananassa* (13), sometiénolas a tres 3 fotoperiodos distintos Luz/Oscuridad: 12/12, 24/0 y 0/24 h. La temperatura en la cámara de cultivo fue de 23/18 °C (día/noche), estudiando los parámetros de movimiento y crecimiento en *Antirrhinum* y en *Fragaria x ananassa*, y de ángulo y velocidad de movimiento en *Petunia x hybrida*.

### 2.2 Adquisición de imagen

La cámara de cultivo fue equipada con una cámara infrarroja para la adquisición de imagen y un Sistema de control para los periodos luz/oscuridad. Todo ello esta descrito con detalle previamente (14). Se tomaron imágenes con intervalos de 10 a 60 min (15).

### 2.3 Análisis de imagen

Una vez obtenidas las imágenes, se marcaron los puntos, gracias a los cuales después se podían obtener las longitudes o velocidades, dependiendo de si nos centramos en la distancia entre puntos (coordenadas) o cómo evoluciona un punto a lo largo de las imágenes, es decir, del tiempo. Por ello, cada imagen era una muestra. Las coordenadas obtenidas se transformaron en distancias y/o velocidades para su trabajo posterior.

Se utilizó R version 3.5.3 y diversas librerías y paquetes de este: “imager”; “bmp”; “ggplot2”; “readr”; “boot”; “mgcv”; “MetaCycle”; and “DescTools”.

### 2.4 Análisis estadístico

Los test estadísticos necesarios fueron desarrollados. En concreto, se realizó un ajuste de los datos para ajustarse a las siguientes líneas de tendencia: lineal, exponencial, logarítmico, polinomial y GAM. Además, se llevó a cabo el algoritmo JTK-Cycle, un algoritmo estadístico no paramétrico para identificar y caracterizar variables cíclicas en grandes bases de datos. Por último, se realizó el área bajo la curva, que se obtiene con la integral de la curva obtenida.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Habitualmente se han usado ajustes lineales y polinomiales para datos de crecimiento (16), en la mayor parte lineales (17). Sin embargo, modelos mixtos y otros no lineales pueden ser mejores cuando el crecimiento no es lineal (7,18).

Se analizó la velocidad de movimiento de *A. linkianum* y *A. majus* y se demostró que la curva GAM es la mejor opción. Además, se observa que el patrón es diferente en ambas plantas, pues *A. linkianum* llegó a alcanzar 1,5 cm/h. Sin embargo, el crecimiento no era diferente y era de unos 4 mm/d.

En cuanto al movimiento de la *Petunia*, este parece estar controlado por el fotoperiodo pues en condiciones de luz u oscuridad continua mantiene la posición y no se mueve, lo que se observa en la Tabla 1 al descartarse la presencia de un ciclo de luz-oscuridad diario. De igual forma, el mejor ajuste fue GAM. Sin embargo, los datos son muy relevantes, sobre todo para las transiciones entre luz y oscuridad. Además, se analizó para ver si había un ritmo, y se demostró que el

movimiento era cíclico cada 24 h (Tabla 1), lo que indica un ciclo de día/noche. Esto, en contraposición con *Arabidopsis* (19), el crecimiento y el movimiento no están ligados.

Por último, se analizó el tallo de las hojas de la fresa y crecían de forma similar independientemente del fotoperiodo al que se les expuso. La curva GAM mostraba la mejor precisión para el crecimiento, mientras que para el movimiento eran necesarios los datos crudos (es decir, aquellos obtenidos directamente de las imágenes sin ningún análisis estadístico posterior) para la mejor compresión de los datos debido a su continuo cambio de posición. El hecho de que el crecimiento no varíe, puede indicarnos que podríamos utilizarlo en futuros estudios pues se podría identificar el estado de crecimiento en el que se encontrase (20,21).

#### 4. CONCLUSIONES

Es necesario buscar la apropiada curva de ajuste, dependiendo de lo que se quiera analizar. Esto permite comparar genotipos o condiciones de cultivo.

Usando el ajuste matemático, la información obtenida es mejor.

El mejor ajuste para el crecimiento es el GAM, mientras que, para el movimiento, la mejor opción son los datos crudos.

Los resultados de todas las plantas indican que es necesario un análisis exploratorio para determinar los patrones de crecimiento y movimiento.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el BFU 2017-88300-C2-1-R de J.W. y M.E.C., BFU 2017-88300-C2-2-R de P.J.N., CDTI 5117/17CTA-P de M.E.C., P.J.N. y J.D.S.P.

#### 6. REFERENCIAS

1. Darwin C. On the Movements and Habits of Climbing Plants. *Journal of the Linnean Society of London*. 1865;9(33-34):1-118.
2. Schaffner JH. Observations on the nutation of *Helianthus annuus*. *Botanical Gazette*. 1898;25(6):395-403.
3. Shim JS, Imaizumi T. Circadian clock and photoperiodic response in *Arabidopsis*: From seasonal flowering to redox homeostasis. *Biochemistry*. 2015;54(2):157-170.
4. Hecht V, Knowles CL, Schoor JKV, Liew LC, Jones SE, Lambert MJM, et al. Pea LATE BLOOMER1 is a GIGANTEA ortholog with roles in photoperiodic flowering, deetiolation, and transcriptional regulation of circadian clock gene homologs. *Plant Physiology*. 2007;144(2):648-61.
5. Annunziata MG, Apelt F, Carillo P, Krause U, Feil R, Koehl K, et al. Response of *Arabidopsis* primary metabolism and circadian clock to low night temperature in a natural light environment. *J Exp Bot*. 2018;69(20):4881-95.
6. Gould PD, Locke JCW, Larue C, Southern MM, Davis SJ, Hanano S, et al. The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*. 2006;18(5):1177-87.
7. Paine CET, Marthews TR, Vogt DR, Purves D, Rees M, Hector A, et al. How to fit nonlinear plant growth models and calculate growth rates: an update for ecologists. *Methods in Ecology and Evolution*. 2012;3(2):245-56.
8. Li L, Zhang Q, Huang D. A review of imaging techniques for plant phenotyping. *Sensors*. 2014;14(11):20078-111.
9. Perez-Sanz F, Navarro PJ, Egea-Cortines M. Plant phenomics: an overview of image acquisition technologies and image data analysis algorithms. *GigaScience*. 2017;6(11):1-18.
10. Ruiz-Hernández V, Hermans B, Weiss J, Egea-Cortines M. Genetic analysis of natural variation in antirrhinum scent profiles identifies benzoic acid carboxymethyl transferase as the major locus controlling methyl benzoate synthesis. *Frontiers in plant science*. 2017;8:27.
11. Koes R. Evolution and development of virtual inflorescences. *Trends in plant science*. 2008;13(1):1-3.
12. Bombarely A, Moser M, Amrad A, Bao M, Bapaume L, Barry CS, et al. Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. *Nature plants*. 2016;2(6):16074.

13. Shulaev V, Sargent DJ, Crowhurst RN, Mockler TC, Folkerts O, Delcher AL, et al. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature genetics*. 2011;43(2):109.
14. Navarro P, 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*. 2012;12(11):15356–75.
15. Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*. 2004;303(5660):1003–6.
16. Leister D, Varotto C, Pesaresi P, Niwergall A, Salamini F. Large-scale evaluation of plant growth in *Arabidopsis thaliana* by non-invasive image analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1999;37(9):671-8.
17. Golzarian MR, Frick RA, Rajendran K, Berger B, Roy S, Tester M, et al. Accurate inference of shoot biomass from high-throughput images of cereal plants. *Plant Methods*. 2011;7(1):2-2.
18. Chen D, Neumann K, Friedel S, Kilian B, Chen M, Altmann T, et al. Dissecting the Phenotypic Components of Crop Plant Growth and Drought Responses Based on High-Throughput Image Analysis. *The Plant Cell*. 2014;26:4636-55.
19. Dornbusch T, Michaud O, Xenarios I, Fankhauser C. Differentially phased leaf growth and movements in *Arabidopsis* depend on coordinated circadian and light regulation. *Plant Cell*. 2014;26(10):3911–21.
20. Harmer SL, Brooks CJ. Growth-mediated plant movements: hidden in plain sight. *Current opinion in plant biology*. 2018;41:89–94.
21. Bastien R, Meroz Y. The Kinematics of Plant Nutation Reveals a Simple Relation between Curvature and the Orientation of Differential Growth. *PLoS Comput Biol*. 2016;12(12):e1005238. <http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1005238>.

**Tabla 1.** Análisis de parámetros circadianos del movimiento de *Petunia hybrida* Mitchel usando MetaCycle.

Fotoperiodo	Periodo (h)	p-valor ajustado
12/12 h L/D	26	0,0461
24 h light	26	0,6317
24 h dark	24	1