

Fenotipado de plantas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) utilizando un sistema de análisis de imágenes digitales

Jorge Rojas; Cecilia Ugarte; Julio Vargas; Esther Rojas

Centro de Biotecnología y Nanotecnología Agropecuario y Forestal (CByNAF)
Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias - Universidad Mayor de San Simón

E mail: rojasbeltran@hotmail.com

Resumen. La quinua es la especie cultivada que mayor expansión mundial tiene en este momento. Como para muchas especies, actualmente se conoce la secuencia del genoma de la quinua. Sin embargo, para que la información genética sea útil, ésta debe relacionarse con el ambiente, ya que la interacción de los dos originará el fenotipo correspondiente. Con la euforia de los estudios de los genomas se ha descuidado al fenotipo. Actualmente esto se está corrigiendo, empero, la falta de herramientas y métodos apropiados para el fenotipado, a menudo obstaculizan estos estudios, haciendo que el fenotipado sea el *cuello de botella* en muchas investigaciones. A pesar de que los softwares de fenotipado han tenido un avance importante en los últimos años, su uso no es generalizable a todas las especies vegetales ni adaptable a requerimientos específicos. Entre los descriptores de la planta de quinua y sus parientes silvestres, existen varios de ellos que pueden ser deducidos de una imagen. Tal es el caso del tipo de crecimiento, la altura de planta, descriptores del tallo, hojas, ramas, panoja, semilla, etc. Mediante este estudio, se ha puesto a punto un sistema fácil, económico y preciso de procesamiento de imágenes 2D, para estudios de diversidad genética y otros para la quinua. Este sistema presenta muchas ventajas con relación a los métodos clásicos de fenotipado.

Palabras clave: Diversidad genética; Software; Descriptores fenotípicos.

Summary: Phenotyping of quinoa plants (*Chenopodium quinoa* Willd.) using a digital image analysis system. Quinoa is the cultivated species that has the greatest global expansion at this time. As for many species, the quinoa genome sequence is currently known. However, for genetic information to be useful, it must be related to the environment, since the interaction of the two will originate the corresponding phenotype. With the euphoria of genome studies, the phenotype has been neglected. Currently, this is being corrected, however, the lack of appropriate tools and methods for phenotyping often impede these studies, making phenotyping the *bottleneck* in many researches. Despite the fact that phenotyping software has had an important advance in recent years, its use is neither suitable to all plant species nor adaptable to specific requirements. Among the descriptors of quinoa plant and its wild relatives, there are several of them that can be deduced from an image. Such is the case of the type of growth, plant height, stem descriptors, leaves, branches, panicles, seed, etc. Through this study, an easy, economic and accurate 2D image processing system has been developed for studies of genetic diversity and others for quinoa. This system has many advantages in relation to traditional methods of phenotyping.

Keywords: Genetic diversity; Software; Phenotypic descriptors.

Introducción

Gracias a los modernos métodos de secuenciación del ADN, se ha generado una inmensa cantidad de datos de secuencias de genomas de diferentes especies. Se sabe que el fenotipo es la expresión del genotipo en un ambiente determinado.

Por lo tanto, para que la información genética sea útil, esta debe relacionarse con el ambiente, ya que la interacción de los dos originará el fenotipo correspondiente. Por fenotipado, fenotipificación o caracterización fenotípica (morfológica), se entiende el proceso de determinación del fenotipo específico de un organismo biológico, mediante un procedimiento específico. En otras palabras, es la técnica que se utiliza para determinar el fenotipo de un organismo y poder diferenciarlo del resto.

En las últimas décadas, se ha dado mucho énfasis a al componente genético de los organismos. Inicialmente, las investigaciones se enfocaron en el estudio de la función de cada gen en particular y se desarrollaron métodos de transgénesis para sobre expresión, silenciamiento de genes y obtención de bancos de mutantes. Actualmente se hace más énfasis en estudios a nivel genómico. Estos esfuerzos a nivel genético no fueron correspondidos de manera paralela a nivel del fenotipo, lo cual ha llevado a ocasionar lo que se conoce como “*phenotype gap*” o brecha fenotípica (Verslues *et al.* 2006; Mifflin 2000; Quero *et al.* 2013).

El fenotipado y su posterior relación con el genotipo, es útil en diferentes disciplinas de la biología, como la fisiología, la botánica, la genética cuantitativa, la genética de poblaciones, etc.

Lamentablemente, la falta de herramientas y métodos apropiados para el fenotipado a menudo obstaculizan estos estudios, haciendo que el fenotipado sea el *cuello de botella* en muchas investigaciones (Cobb *et al.* 2013, Bolgera *et al.* 2017).

Sin embargo, los informáticos y los biólogos han estado desarrollando softwares para realizar el fenotipado a partir de imágenes (Pridmore *et al.* 2012). Actualmente existen numerosos softwares que permiten el fenotipado específico, el desarrollo del meristemo (Fernandez *et al.* 2010), la reconstrucción tridimensional de raíces (Mairhofer *et al.* 2013), etc.

También se han desarrollado softwares de tratamiento de imágenes en 2D más generales; entre otros:

⇒ Digimizer:

<https://www.digimizer.com/>

⇒ Golden Ratio:

<http://markuswelz.de/software2/index.html>

⇒ Image Measurement:

(<http://www.imagemasurement.com/en/>)

⇒ Image J

(<https://imagej.nih.gov/ij/>)

A pesar de que los software de fenotipado han tenido un avance importante en los últimos años (Rascher *et al.* 2011), su uso no es generalizable a todas las especies vegetales ni adaptable a requerimientos específicos.

Así, a nuestro conocimiento, no hay trabajos de fenotipado de plantas de quinua utilizando sistemas de análisis de imágenes digitales para estudios de diversidad genética y otros.

Entre los descriptores de la planta de quinua y sus parientes silvestres (Bioversity International 2013), existen varios de ellos que pueden ser deducidos de una imagen. Tal es el caso del tipo de crecimiento, el hábito de crecimiento, la altura de la planta, descriptores del tallo, hoja, ramas, panoja y semilla, etc. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue el de poner a punto un sistema fácil, económico y preciso de procesamiento de imágenes 2D, para estudios de diversidad genética y otros en quinua

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron 3 variedades de quinua: *Jacha Grano*, *Blanquita* y *Kurmi*. Estas variedades fueron sembradas en predios de la *Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias* de la *Universidad Mayor de San Simón*, en un diseño de bloques completos al azar.

Los terrenos se prepararon con un arado de discos, para remover el suelo y de esa manera quebrar y soltar la tierra. Luego, se uniformizó el terreno con una rastra. Finalmente, se realizó el surcado a una distancia entre surcos de 0.6 m. La siembra se realizó a chorro continuo. Se realizaron todas las labores culturales recomendadas para la quinua.

Obtención de imágenes digitales de las plantas de quinua

Se seleccionaron cuatro plantas al azar de cada repetición. Estas plantas fueron fotografiadas con una cámara fotográfica digital de 16.1 mega píxeles. Para fotografiar las plantas, se utilizó un fondo blanco con un reticulado de 1 cm². Los fondos reticulados tuvieron una dimen-

sión de 2 m de alto por 1 m de largo, de manera que la planta entera esté sobre el fondo reticulado. Se sacaron las fotos tratando de evitar sombra.

Análisis de imágenes

Las imágenes fueron analizadas utilizando el software Digimizer versión 4.6.1 de MedCalc Software bvba[®]. Digimizer es un software gratuito, muy flexible y simple, que es muy útil para analizar imágenes. Este software es compatible con Windows y se basa en asignar un número de píxeles a una longitud conocida que se le asigna con la unidad de medida correspondiente. Luego, en base a esta correspondencia, Digimizer puede medir diferentes dimensiones, como longitudes, ángulos, perímetros, áreas, etc.

Con las imágenes obtenidas, se analizaron 24 descriptores de la planta, tanto cualitativos como cuantitativos. Los descriptores analizados fueron:

- Tipo de crecimiento
- Hábito de crecimiento
- Altura de planta
- Forma del tallo principal
- Diámetro del tallo principal
- Color del tallo principal
- Presencia de estrías
- Color de las estrías
- Presencia de ramificaciones
- Número de ramas primarias
- Posición de las ramas primarias
- Forma de la hoja
- Borde de la hoja
- Número de dientes en la hoja
- Longitud del peciolo
- Longitud máxima de hoja
- Ancho máximo de hoja
- Color del peciolo
- Color de la lámina foliar
- Color de panoja a madurez fisiológica
- Forma de la panoja
- Longitud de la panoja
- Diámetro de la panoja
- Densidad de la panoja

También se validó en sistema para características de grano. Los datos fueron tabulados en una hoja de cálculo para análisis estadísticos posteriores.

Construcción de dendogramas

Los datos de los descriptores de planta, fueron utilizados para construir un dendograma, utilizando la distancia de Gower y el método de ligamiento promedio UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Para esto se utilizó en software MVSP[®].

Resultados y discusión

Obtención de imágenes digitales de las plantas de quinua. La Figura 1 muestra las fotografías tomadas con fondo reticulado para las variedades *Blanquita*, *Jacha Grano* y *Kurmi*.

El reticulado permite determinar con precisión distintas dimensiones de la planta. También es posible determinar el color de diferentes características, presencia de estrías, forma de la panoja, presencia de ramas, etc.

Las ampliaciones del tallo, de las ramas y de las hojas, han permitido medir diferentes descriptores para estos contextos.

Análisis de imágenes. En la Figura 2 se observa diferentes descriptores medidos con el programa Digimizer. Se midieron longitudes, como la altura de la planta, diámetro del tallo principal, longitud del pecíolo, longitud máxima de la hoja, ancho máximo de la hoja, longitud de la panoja y diámetro de la panoja.

En el caso de la longitud de pecíolo, Digimizer tiene una ventaja con relación a las medidas que se pueden hacer en campo, porque permite medir el recorrido del pecíolo, sin importar si es recto o curvo.

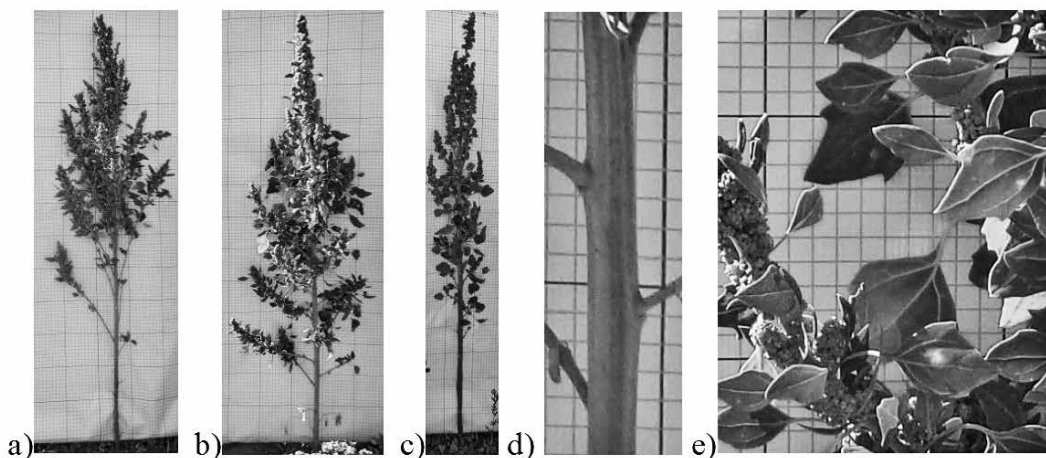


Figura 1. Fotografías con fondo reticulado de las variedades a) *Blanquita*, b) *Jacha Grano* y c) *Kurmi*. d) Ampliación del tallo y ramas de la variedad *Jacha Grano*. e) Ampliación de las hojas de la variedad *Jacha Grano*

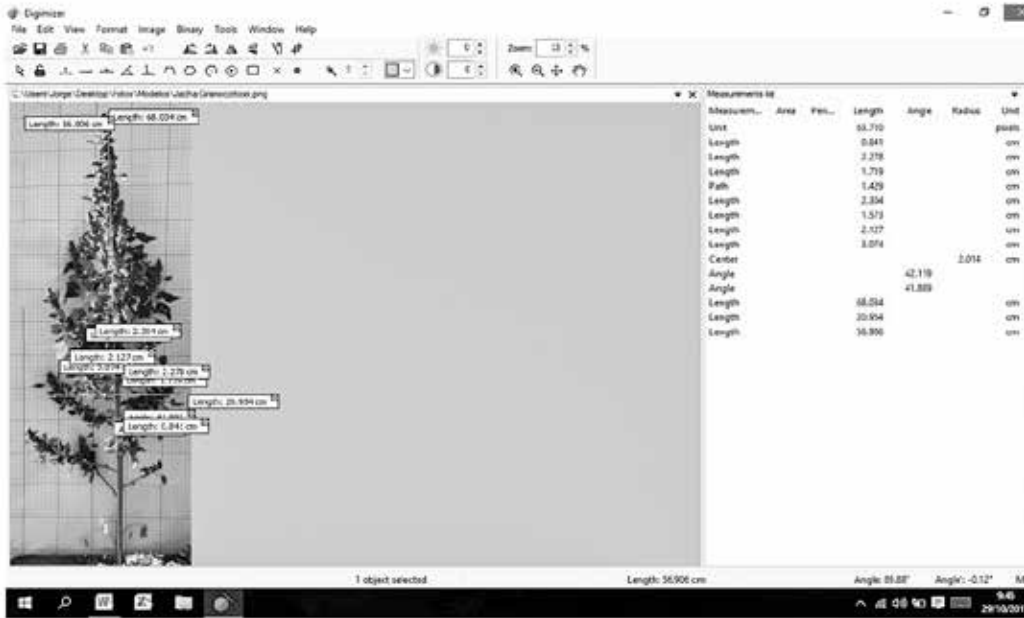


Figura 2. Medidas realizadas a diferentes descriptores de la quinua con el software Digim�zer

(A la derecha de la figura se encuentran los datos obtenidos de las medidas realizadas)

Sobre la figura también se pueden determinar otros descriptores, como el tipo de crecimiento, hábito de crecimiento, forma de tallo principal, color del tallo principal, presencia de estrías, color de las estrías, presencia de ramificación, número de ramas primarias, posición de las ramas primarias, forma de la hoja, borde de la hoja, número de dientes en la hoja, color del peciolo, color de la lámina foliar, color de la panoja en la madurez fisiológica, forma de la panoja y densidad de la panoja. Es importante mencionar que la calidad y el tamaño de la imagen son cruciales en este cometido.

En este estudio se ha trabajado con imágenes de 16.1 megapíxeles, lo que ha permitido hacer ampliaciones de calidad para analizar descriptores, como la forma de tallo principal, color del tallo principal, presencia de estrías, color de las

estrías, forma de la hoja, borde de la hoja, número de dientes en la hoja, color del peciolo y color de la lámina foliar.

Si bien en este estudio no se utilizó una paleta de colores, se recomienda fotografiar incluyendo la misma, para una mejor determinación de los colores.

Construcción de dendogramas

Para validar la coherencia de los datos obtenidos, es decir, si los datos obtenidos permiten discriminar las tres variedades, se calcularon las distancias con el método de Gower para los veinte y cuatro individuos analizados (ocho por variedad). En base a estas distancias se construyó un dendodograma con el método UPGMA. Los resultados se muestran en la Figura 3.

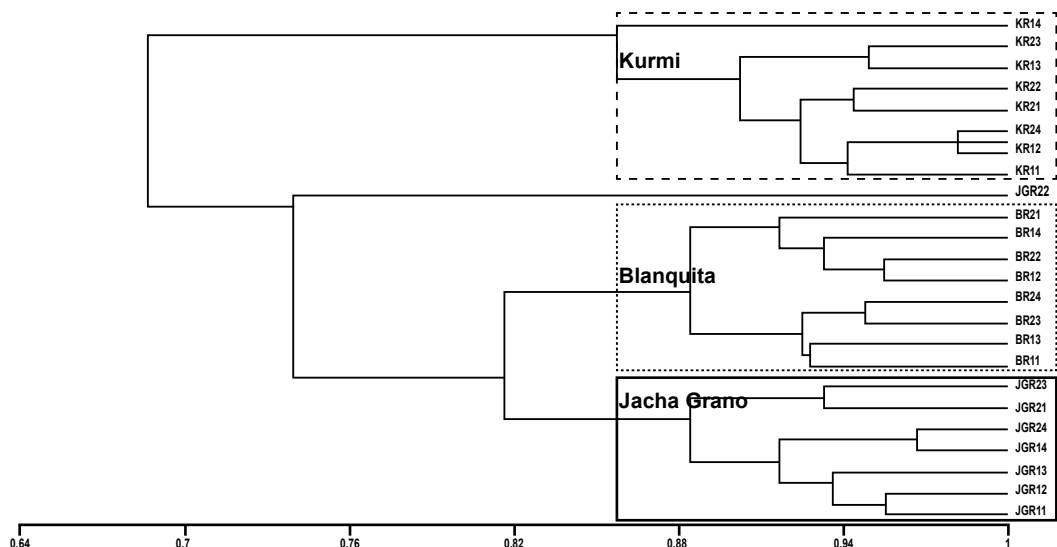


Figura 3. Dendrograma construido utilizando la distancia de Gower el método de ligamiento promedio UPGMA, utilizando en software MVSP

(Se tomaron 4 plantas por repetición, así, la KR14 corresponde a la variedad Kurmi, repetición 1 y planta 4).

La Figura 3 muestra que las diferentes plantas de una variedad, a pesar de ser distintas entre ellas, tienden a agruparse. Se observa, que los grupos de variedades están bien separados. Solo una planta de *Jacha Grano*, la JGR22, no está en ningún grupo. Observando la fotografía de la planta, se ha establecido que esta ha desarrollado un fenotipo bastante desviado del fenotipo estándar de esta variedad. Este fenómeno es frecuente en la caracterización morfológica, es por eso que se deben procesar al menos 10 individuos por accesión, para luego sacar un promedio. En la figura se puede observar que las variedades *Blanquita* y *Jacha Grano*, están genéticamente más próximas con relación a la *Kurmi*.

Como muestra la Figura 4, con el programa Digimizer también se pueden determinar distintos parámetros del grano, como el diámetro, el radio, el perímetro y el área. El área de un grano de quinua de esta variedad es 0.041 cm^2 , el perímetro

0.75 cm y el radio 0.141 cm. Se ha medido el diámetro de grano de 10 semillas. Los datos generados pueden ser fácilmente trasladados a una planilla electrónica de cálculo, para hacer los análisis estadísticos. El diámetro promedio calculado de los 10 granos medidos es de 2.47 mm, que es una cifra próxima al promedio de grano reportado para esta variedad, que es de 2.6 mm.

Mediante este estudio, se ha puesto a punto un sistema fácil, económico y preciso de procesamiento de imágenes 2D, para estudios de diversidad genética y otros para la quinua.

Este sistema presenta muchas ventajas. Solo se debe tomar imágenes digitales de calidad en campo, utilizando un reticulado a escala u otro sistema que permita determinar dimensiones y otros parámetros.

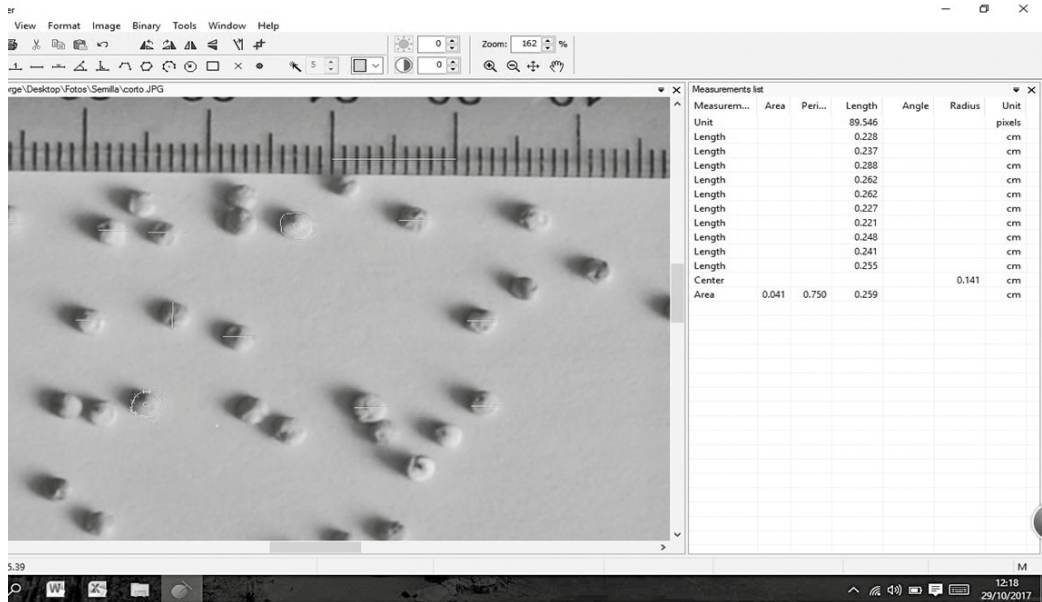


Figura 4. Medidas realizadas al diámetro, radio, perímetro y área de granos de quinua de la variedad *Jacha Grano*, con el software Digimizer.

(A la derecha de la figura se encuentran los datos obtenidos de las medidas realizadas)

Luego el tratamiento de las imágenes se realiza cómodamente con la ayuda de un software, como Digimizer. De esta manera se puede tratar grandes cantidades de datos de manera confortable, precisa y reproducible.

Se ha demostrado en este estudio que los datos son comparables a los datos que pueden ser obtenidos por métodos clásicos (medidas en campo, en laboratorio, etc.), e incluso, en muchos casos, pueden ser más precisos y reproducibles, porque se puede revisar las veces necesarias todas las medidas realizadas.

Aún queda trabajar más para automatizar el tratamiento de las imágenes. Por ejemplo, con un sistema que determina automáticamente diferentes dimensiones del objeto, esto para eliminar el trabajo manual de medida.

Sin embargo, con lo que se tiene, se reemplaza o reduce significativamente el trabajo laborioso de caracterización de campo y laboratorio.

En un futuro, se trabajará con sistemas de 3D, a fin de no solamente obtener medidas de descriptores, sino estudiar cinéticas de desarrollo de la planta.

Referencias citadas

- Bioversity International, FAO, INIAF y FIDA. 2013. Descriptores para quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. Bioversity International. Roma, Italia. 56 p.
- Bolgera M., Schwackea R., Gundlachb H., Schmutzerc T., Chenc J., Arendc D., Oppermann M., Weisec S., Langec M., Fiorania F., Spannaglb M., Scholzc U., Mayerb K., Usadela B. 2017. From plant ge-

- nomes to phenotypes. *Journal of Biotechnology*. 261: 46–52.
- Cobb J., De Clerck G., Greenberg A., Clark R., Mc'Couch S. 2013. Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype-phenotype relationships and its relevance to crop improvement. *TAG Theor Appl Genet*. 126:867–887.
- Fernandez R., Das P., Mirabet V., Moscardi E., Traas J., Verdeil J., Malandain G., Godin C. 2010. Imaging plant growth in 4d: Robust tissue reconstruction and lineaging at cell resolution. *Nat Methods*. 7(7):547–553.
- Mairhofer S., Zappala S., Tracy S., Sturrock C., Bennett M., Mooney S., Pridmore T. 2013. Recovering complete plant root system architectures from soil via X-ray mu-Computed Tomography. *Plant Methods*. 9(8):1–7.
- Miflin B. 2000. Crop improvement in the 21st century. *Journal of Experimental Botany*. 51(342): 1-8.
- Pridmore T., French A., Pound M. 2012. What lies beneath: underlying assumptions in bioimage analysis. *TRENDS Plant Sci*.17(12):688–692.
- Quero G., Borsani O., Gutiérrez L., Melchiorre M., Monza J., Lascano R. 2013. Sistemas de fenotipado para la evaluación de las respuestas al estrés salino en Lotus. *Agrociencia Uruguay*. Versión on-line. ISSN 2301-1548. vol.17 no. 1.
- Rascher U., Kuhn A., Matsubara S., Martin L., Merchant A., Metzner R., Blossfeld S., Fiorani F., Jahnke S., Jansen M., Müller-Linow M., Nagel K., Pieruschka R., Pinto F., Schreiber C., Temperton V., Thorpe M., Van Dusschoten D., Van Volkenburgh E., Windt C., Schurr U. 2011. Non-invasive approaches for phenotyping of enhanced performance traits in bean. *Functional Plant Biology*. 38 (12): 968-983.
- Verslues P., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*. 45(4): 523-539.

Trabajo recibido el 1 de junio de 2017 - Trabajo aceptado el 7 de diciembre de 2017

Agradecimientos: Los autores agradecen al Proyecto de Investigación Aplicada para la Adaptación al Cambio Climático (PIA-ACC) por el apoyo financiero para realizar esta investigación.