

Aplicaciones genéticas de las técnicas de análisis de imagen

Nicolás Jouve, Angeles Cuadrado y Pilar Rubio.

28871 Alcalá de Henares (Madrid).

Introducción

Existen numerosos aspectos experimentales en Biología en los que el investigador ha de estudiar o interpretar imágenes. Estas se podrían definir como la apariencia visible que ofrecen los objetos de observación bajo el efecto de fenómenos ópticos. Los objetos de observación en Biología, y en particular en Genética pueden ser de la mas variada índole. Puede tratarse de estructuras componentes de la morfología general de un organismo, o sus cromosomas preparados por las más diversas técnicas citogenéticas, o moléculas o parte de moléculas, como proteínas, péptidos, isoenzimas, fracciones de ADN, etc., o productos derivados de síntesis producidos por técnicas específicas, amplificación de ADN por PCR, etc. El denominador común en las técnicas de observación, lo que a partir de ahora llamaremos análisis de imagen es la extracción de información para la verificación de un hecho o la materialización de una idea a través de la observación de un objeto.

Cuando hablamos de la observación de un objeto no estamos refiriéndonos necesariamente a formas o cuerpos distinguibles directamente con nuestro sentido de la vista. Cabe también hablar de imágenes latentes, ocultas, o si se prefiere “virtuales” que no se observan directamente, pero que potencialmente pueden tornarse en imágenes visibles mediante determinadas tecnologías.

Las imágenes de objetos de observación “visual” no siempre ofrecen la nitidez o la resolución necesaria para la captación del detalle que se desea estudiar o comparar. En numerosos casos el investigador ha de recurrir a otros métodos indirectos de análisis que eludan la observación directa, o puede tratar de mejorar las condiciones con que se presenta la imagen que desea analizar.

La necesidad de extraer toda la información posible de una imagen se acentúa cuando los objetivos de un experimento se han de apoyar en datos cuantitativos, medidas de estructuras, densitometría, niveles diferenciales de la manifestación de un carácter, etc.

Tanto para la observación cualitativa como para el estudio cuantitativo, desde hace ya varias décadas se ha abierto un campo de grandes posibilidades con los métodos de análisis de imagen asistidos por sistemas informáticos. Estos son capaces de “traducir” una imagen “visual” o “virtual” en lenguaje “digital”. El proceso de traducción implica una transferencia de cada detalle de la imagen original en términos de su posición espacial, intensidad y tipo de coloración. La capacidad de resolución, la velocidad con que se traduce una imagen real en otra digitalizada, las condiciones de tonalidad, contraste, nitidez, fondo, etc., y la rapidez con que puede ser analizada y procesados los datos morfométricos (dimensiones, colores, densidades, etc.), rebasan ampliamente la propia capacidad de observación humana, y ofrecen un campo amplio de posibles aplicaciones.

Sin ánimo de hacer un inventario exhaustivo de las diferentes situaciones en las que es importante un buen análisis de imagen en experimentos de Genética, podemos citar entre otras las siguientes:

Imágenes visibles

- observaciones de morfología externa de cromosomas (número, tamaño y forma),
- análisis de morfología interna cromosómica (posición de constricciones, zonas de mayor o menor condensación, bandas),
- detección de marcas moleculares en los cromosomas procedentes de hibridación *in situ*,
- interpretación de geles de electroforesis uni-dimensional, para la separación de proteínas o isoenzimas,
- interpretación de geles de electroforesis bi-dimensional, para la separación de proteínas o isoenzimas,
- comparación de perfiles electroforéticos uni- ó bi-dimensionales, de muestras diferentes separadas en el mismo gel en diferentes carriles, o en geles separados,
- análisis comparativo, estimación de tamaño, etc., de los productos de amplificación de ADN por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR),
- análisis de la intensidad de reacción antígeno-anticuerpo,
- análisis y lectura de geles de secuenciación de ácidos nucleicos,
- cuantificación del ADN, análisis de ploidía,
- análisis de imágenes southern-blot y dot-blot.

Imágenes virtuales

- conversión de marcas radioactivas en imágenes visibles,
- conversión de marcas de fluorescencia en imágenes visibles.

Dado el programa de esta reunión, orientada fundamentalmente hacia las técnicas de microscopía, nos referiremos fundamentalmente a las aplicaciones del análisis de imagen en relación con imágenes tipo visible, las más usuales en los estudios cariotípicos. Esto nos permitirá adquirir una base de conocimientos sobre el funcionamiento general de estos sistemas, que con determinadas adaptaciones, es igualmente útil en todas las demás aplicaciones.

Citogenética asistida por análisis de imagen

En numerosos estudios en Biología y Medicina es de importancia decisiva la caracterización morfométrica de los cromosomas a partir de imágenes microscópicas. Los citogenéticos clínicos y los citogenéticos aplicados a la mejora de plantas, saben el tiempo que se requiere a veces para hacer una buena determinación de una constitución cromosómica individual, que requiere además una adecuada cualificación por parte del experimentador. Las limitaciones en cuanto al consumo de tiempo y número de expertos necesarios son evidentes cuando hay que llevar a cabo un número elevado de diagnósticos, o cuando se desea estudiar la constitución cromosómica de una población de individuos, o una descendencia en segregación.

Los análisis cariotípicos son uno de los primeros campos a los que se aplicaron las técnicas del análisis de imagen asistido por ordenador. Las primeras aplicaciones de la analítica informática en Biología se llevaron a cabo para el estudio de los cromosomas humanos, y concentraron su atención en la cuantificación de la densidad de los cromosomas teñidos, que eran captados directamente a través del microscopio o de microfotografías. Los analizadores eran entonces densitómetros que cuantificaban el contenido del ADN por métodos fotométricos (Carlson et al., 1963; Mendelsohn et al., 1966).

A principios de los años setenta se introdujeron las técnicas de los análisis de imagen en cromosomas humanos bandeados y se elevaron las exigencias técnicas para discernir los detalles morfométricos (Caspersson et al. 1971a and b; Lubs and Ledley 1973; Marimuthu et al. 1974). Los avances metodológicos para la realización de las preparaciones microscópicas junto con la puesta a punto de las técnicas microelectrónicas derivó en la simplificación de unos métodos de análisis de imágenes de cromosomas humanos que hoy en día son muy eficaces (Fujita 1983).

Los problemas son diferentes en cromosomas de otras especies. Los de las especies animales ofrecen en común unas características propias que les hacen en general más asequibles a las técnicas de análisis de imagen que los de las plantas. Las técnicas de obtención de las preparaciones microscópicas suelen ser más sencillas al carecer de las rígidas paredes celulares de las células vegetales. Por otro lado, la gama de métodos de tinción diferencial son más ricas, al poder aplicarse el bandeo-G, que desvela una estructura de regiones de mayor o menor condensa-

ción longitudinal en el estadio de la metafase mitótica, a un nivel de detalle no apreciable en los cromosomas vegetales, probablemente debido al mayor grado de condensación de éstos con relación a otros estadios de relajación de la cromatina durante el ciclo celular (Greilhuber, 1977).

El estudio de los cromosomas de las plantas se facilita enormemente utilizando las técnicas del análisis de imagen. La aplicación de pretratamientos enzimáticos con pectinasa, celulasa y pectoliasa, facilitan la degradación de las paredes celulares y la obtención de buenas preparaciones, con cromosomas nítidos y bien separados por aplastamiento. Los primeros métodos de análisis de imágenes aplicados a cromosomas vegetales los introdujo el japonés Fukui en el National Institute of Agrobiological Resources en Tsukuba (Fukui, 1985, 1986, 1987; Fukui and Ito, 1985). El método de Fukui, también conocido por CHIAS (Chromosome Image Analyzing System) está diseñado en torno a cinco principios básicos:

- es un método diseñado para el estudio de cromosomas vegetales,
- las operaciones de análisis asistidas por ordenador se realizan de forma interactiva hombre-máquina,
- las operaciones de rutina se automatizan tanto como es posible,
- se introduce la automatización en los procesos de microscopía,
- todos los procedimientos analíticos se basan en imágenes digitalizadas.

La idea principal es la de extraer información morfométrica de cromosomas somáticos previamente tratados por cualquier tipo de técnica, desde las de tinción convencional con aceto-carmín, Feulgen, etc., hasta las más sofisticadas técnicas determinantes de una diferenciación longitudinal, como el bandeo-C. A ello hemos de añadir un campo de grandes posibilidades para la localización y estudio de señales en los cromosomas incorporadas por hibridación in situ.

El propósito es el de aunar métodos de caracterización semiautomática de cromosomas y la cuantificación de sus detalles físicos (distancia entre puntos, superficie, volumen, densidad). El interés radica en la posibilidad de cuantificar los parámetros físicos para la identificación y caracterización de regiones, detección de variaciones estructurales, localización de señales de hibridación in situ, confección de mapas citogenéticos, etc., todo ello con repercusión en aplicaciones en biotecnología y mejora genética.

En lo sucesivo nos referiremos al sistema MIP (Microm Image Processing) comercializado en España por la firma Microm España S.A., diseñado a partir de la metodología informática analítica de Kontron Bildanalyse, que a su vez está basado en las necesidades de análisis propuestas por Fukui (1986) para cromosomas vegetales. Este sistema combina técnicas de Proceso Digital de Imágenes con metodologías analíticas objetivas y de respuesta reproducible. El sistema funciona de forma interactiva investigador-analizador, de manera tal que la mano del primero se restringe a los pasos del proceso que requieren tomas de decisiones para la preparación de los cromosomas, o sus detalles, como objetos visibles a analizar. El resto del proceso hasta la extracción de los datos cuantitativos requiere así

mismo de la intervención del investigador para el tratamiento de la imagen, pero la cuantificación de los parámetros es objetiva y los datos extraídos pueden seguir un proceso rutinario de interpretación estadística.

La arquitectura informática del sistema consta de los siguientes elementos (Fig 1):

1. *Un microscopio óptico para la captación de la imagen.* Es esencial el contar con un buen sistema de iluminación para campo claro (halógena de 100 W, y filtro de 550 nm), incluidos contraste de fases y fluorescencia para hibridación in situ. Es conveniente contar con un estativo automatizado en X-Y y Z (autofocus).
2. *Cámara de TV con microadaptador*

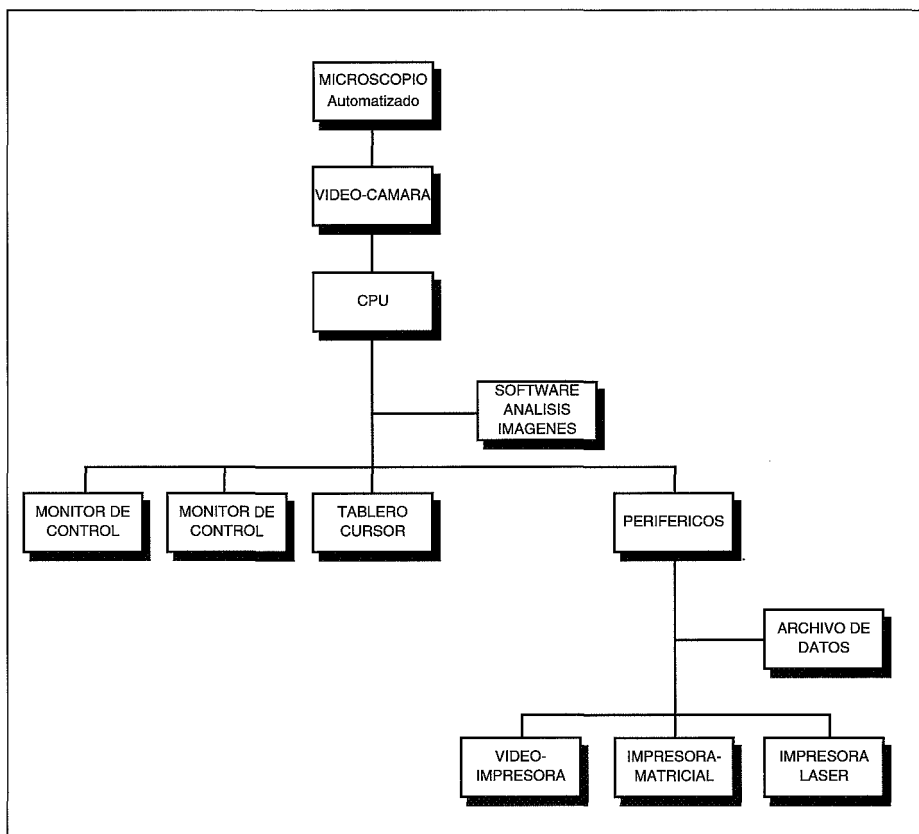


Figura 1.- Arquitectura informática necesaria para la realización del análisis de imagen de cariotipos. Para imágenes no microscópicas, fotografías, microfotografías, etc. sería necesario sustituir el microscopio por un estativo dotado de una iluminación adecuada para la captación de imágenes.

3. *Ordenador de 32 bits (486)* dotado de un sistema operativo compatible DOS (Hardware), un disco de un mínimo de 100 MB y un entorno de Proceso Digital de Imagen (Software).
4. *Coprocesador matemático* capaz de resolver a tiempo casi real los complejos cálculos operativos relacionados con el tratamiento de imágenes.
5. *Un monitor de salida de imagen* de alta resolución (800 x 600 puntos).
6. *Una consola compuesta por el teclado y un cursor*, para el manejo del programa y la utilización manual del mismo durante los procesos interactivos.
7. *Un monitor de trabajo*, de visualización EGA ó VGA (14") para la conducción de los pasos que requieren la intervención interactiva por parte del investigador.
8. Periféricos para el almacenamiento de imágenes, impresora (matricial ó láser) de imágenes, gráficos o datos, vídeo-grabadora, vídeo-impresora, etc.

En la Fig. 2 se esquematizan los pasos conducentes a la extracción de los datos cuantitativos de los cromosomas, siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

El proceso comienza con la captación de la imagen desde el microscopio a través de la vídeo-cámara, y su conversión en una imagen digital. Se procede a la búsqueda de metafases con un buen grado de separación, condensación y tinción de los cromosomas (Fig 3a). De las células que interesan, y de las que se van captando imágenes, se van almacenando paralelamente sus coordenadas utilizando la consola de motorización de la platina del microscopio. Los requerimientos de condiciones de iluminación y tipo de óptica, pueden variar si se trata de cromosomas no teñidos, o si han sido sometidos a tinción, o bandeó-C, o hibridación in situ de detección enzimática. En todos estos casos las imágenes se observan en campo claro, y no sería necesario usar contraste de fases. Sin embargo, éste es obligado en el análisis de material no teñido. Si se trata de objetos de observación sobre campo oscuro, como la hibridación in situ de detección por fluorescencia (FISH), es preferible captar la imagen a partir de microfotografías en color.

Se evita así el problema del decaimiento de la señal propia de los fluorocromos que dificultaría la estandarización de la captación de la imagen, y las dificultades de enfoque y escasa iluminación. De todas formas existen vídeo-cámaras con una gran capacidad de captación en las condiciones de escasa luminosidad propias de la microscopía de fluorescencia.

Sea para la utilización directa, o para la obtención de microfotografías a utilizar después, es muy importante la estandarización de las condiciones de iluminación, mediante una adecuada combinación de óptica, cantidad y calidad de luz, filtros y enfoque, que puede ser facilitado de contar con un sistema de autofocus. El ajuste fino del foco es mejor realizarlo sobre la imagen del monitor.

Una vez obtenida una imagen digital a partir de la imagen visible original se debe proceder a su procesado en gris, paso de la imagen de color a gris, y corrección de los niveles de gris mediante la aplicación de filtros y en su caso realce de

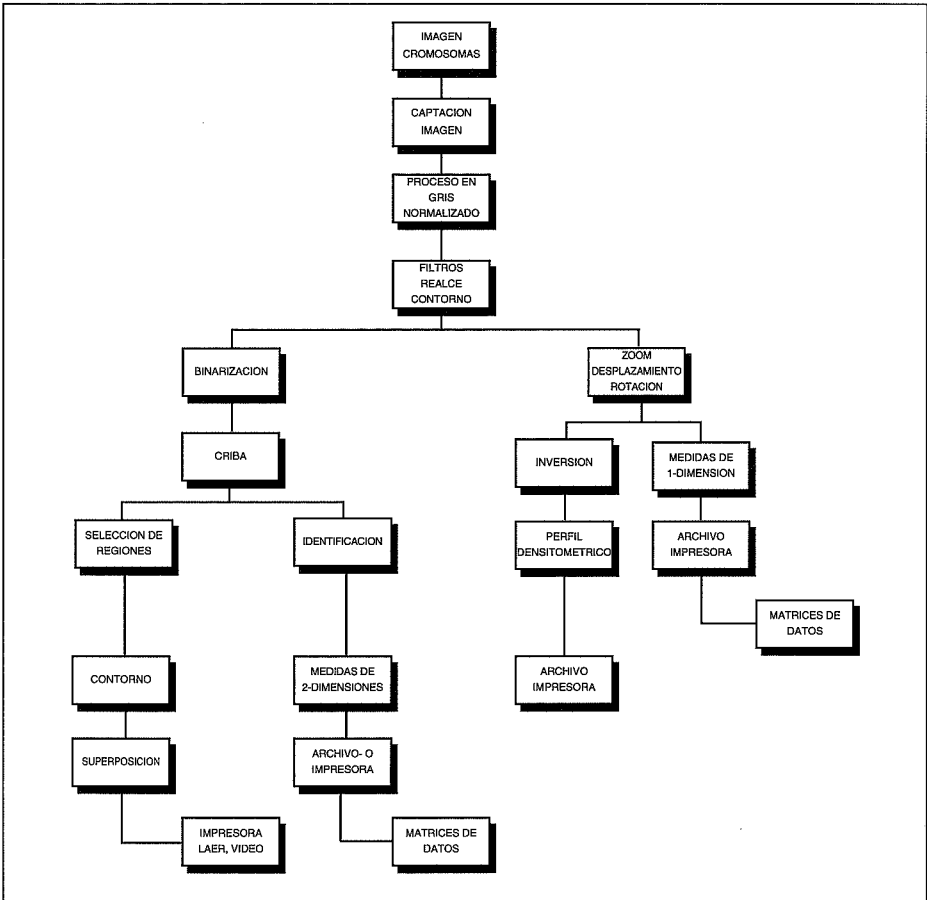


Figura 2.- Flujo de información desde las imágenes microscópicas o fotográficas originales hasta la toma de datos de medidas o perfiles densitométricos. Para más información ver el texto.

contornos. Los sistemas del tipo MIP tienen capacidad para discriminar hasta 255 niveles de gris (desde 0, negro total, hasta 255, blanco total), por cada pixel. Si se van a tomar medidas de densidad en un conjunto de imágenes diferentes (varias células de la misma o diferente preparación) es muy importante la uniformidad del nivel de grises del conjunto de imágenes a comparar. Para ello conviene hacer lo que se define por una normalización de la imagen, que es una función integrada en los sistemas usuales de análisis de imagen, y que trata de regular el nivel de gris del conjunto de una o varias imágenes de acuerdo con un patrón de referencia. Los cromosomas a analizar pueden ampliarse realizando un zoom interactivo de la parte de la célula que se vaya a utilizar en cada momento (Fig. 3b). Opcionalmente, puede hacerse un escalado de la imagen mediante la limitación de los

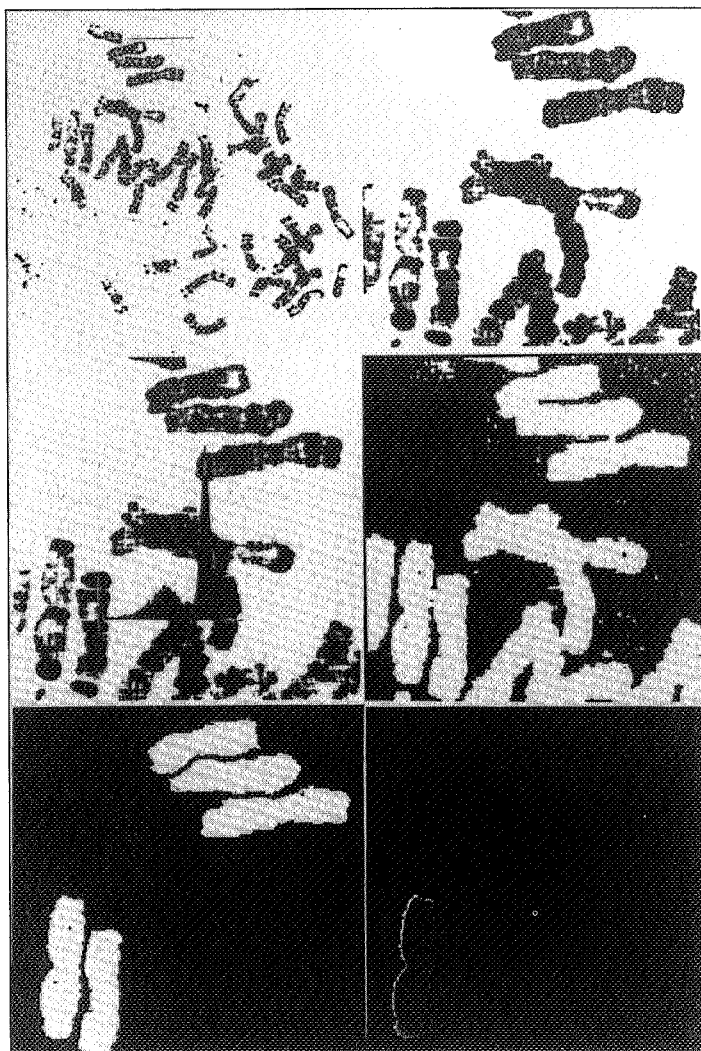


Figura 3.- Aspectos derivados de los sucesivos pasos del análisis de imágenes de cromosomas utilizando el sistema MIP de MICROM. De izda. a dcha. y de arriba a abajo: a) Una microfotografía de un cariotipo de triticale hexaploide ($2n=42$), sometida a bandeado-C para desvelar las regiones de heterocromatina constitutiva, de la que se ha seleccionado una región para hacer el zoom; b) imagen ampliada tras el zoom; c) histograma para estudiar los niveles de gris existentes en el conjunto de la imagen y de los que dependerá los niveles mínimo y máximo para la realización de una binarización; d) imagen transformada en blanco y negro (binarización) para facilitar las operaciones de medida de objetos a realizar a continuación; e) misma imagen que la anterior tras la realización de una criba de objetos inferiores a 3000 píxels (área del cromosoma más pequeño). Los objetos no deseados se han troceado en regiones de menos de 3000 píxels para su eliminación utilizando un editor de líneas; f) identificación de objetos para la toma de medidas.

niveles de gris pasando de los niveles originales al óptimo dentro del rango de 0 a 255. Este paso debe hacerse de forma interactiva y la decisión de los niveles de gris de salida es otra operación a decidir por el investigador. Puede ser conveniente hacer uso del comando histograma (Fig 3c), lo que permite conocer los rangos de gris de cada imagen. Por otra parte todas estas operaciones de filtrado, normalización y preparación de los cromosomas se pueden estandarizar utilizando una imagen de referencia previamente almacenada.

Un segundo grupo de acciones, conduce a la preparación de cada cromosoma individual para obtener los datos cuantitativos, proceder a su identificación y clasificación, y en su caso construir el cariotipo.

Para la identificación de los objetos, en los que se van a estudiar una serie de parámetros físicos no densitométricos, interesa la obtención de una imagen binaria a partir de la original (Fig. 3d). Para ello la imagen a obtener debe tener los cromosomas como objetos blancos (nivel de gris 255) y el fondo debe quedar negro (nivel de gris 0) mediante los correspondientes cambios de los pixels con nivel de gris entre los límites máximo y mínimo de la escala al blanco. Para la binarización se realiza una segmentación en dos niveles de la imagen, poniendo como nivel inferior 0 (equivalente al fondo que se convertirá en negro), y como nivel máximo el valor medio de gris de la imagen original que se conoce a partir del histograma realizada previamente (Fig. 3c). De esta forma tendremos una imagen en la que los cromosomas aparecen como siluetas en blanco sobre un campo negro, y en la que conviene eliminar las partículas extracromosómicas, cristales de sal, restos de paredes celulares, cromosomas superpuestos y cualquier otro objeto que no se desee analizar. Esta criba se puede hacer de forma automática, pero el investigador tiene que decidir el tamaño en pixels de los objetos a eliminar, que siempre será menor al tamaño del más pequeño de los cromosomas a estudiar (Fig. 3e). Si de la imagen resultante nos interesa un objeto en particular se puede guardar en un archivo la imagen binaria total y alternativamente hacer la selección de objetos que se deseen utilizar.

Puede ser necesario extraer un contorno del cromosoma mediante el correspondiente comando del proceso de imagen binaria. El editor de gráficos interactivo puede servir también para delimitar cromosomas adyacentes, marcar centrómeros, etc. Todo esto es útil para la identificación de los objetos que se deseen analizar: cromosomas, brazos, satélites, marcas de cualquier tipo. Otro paso más, conduce a la creación de una imagen combinada mediante la superposición del contorno, y otras líneas de delimitación, sobre la imagen gris mejorada, lo que tiene una doble utilidad. Por un lado, sirve para probar el ajuste y delimitar las regiones de la imagen original del cromosoma y la binaria que se utilizará en la extracción de los datos densitométricos. Por otro lado, muestra los detalles útiles para la obtención de un cariotipo, o si se desea imprimir el cromosoma por una vídeo-impresora, o una impresora láser.

Las imágenes original y binaria quedan así preparadas para la tercera fase del proceso, la obtención de datos sobre medidas físicas que se deseen obtener. Estas

son de dos tipos, uni-dimensionales (longitud total y de cada brazo, posición de marcas tales como bandas o señales de hibridación in situ, satélites, centrómeros, etc) y bi-dimensionales (perímetro y área).

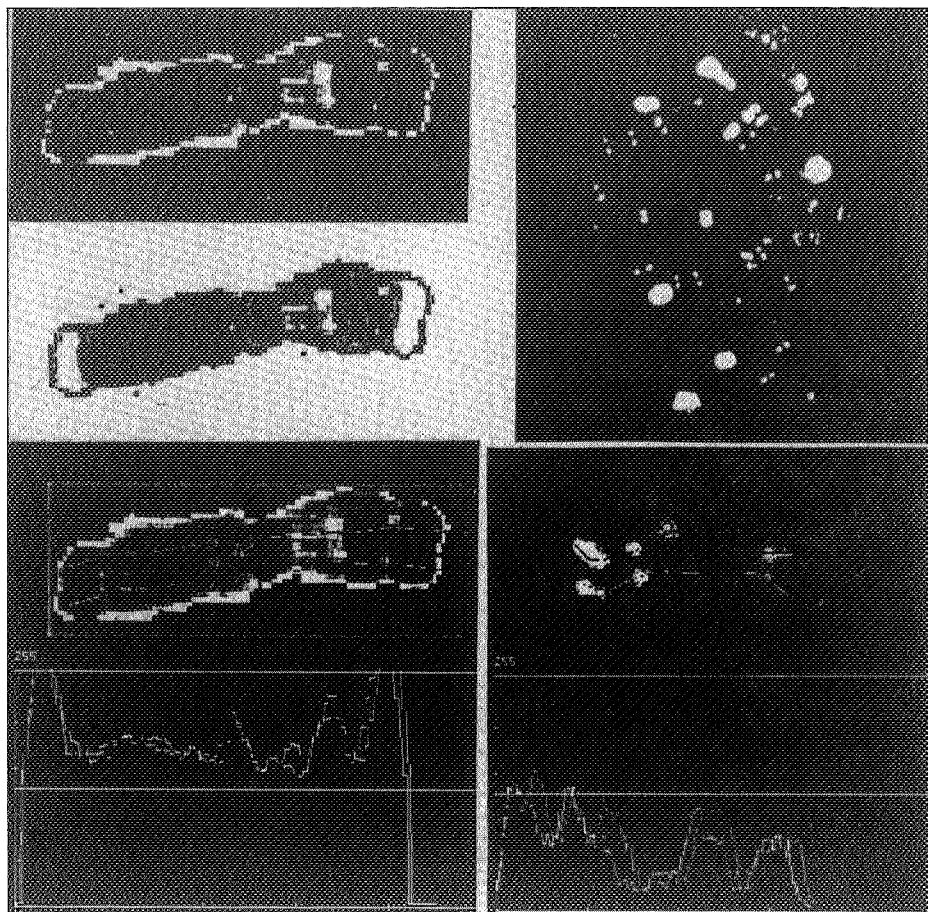
Las medidas uni-dimensionales se obtienen de forma interactiva, para lo que se trazan con la ayuda del cursor líneas de extremo a extremo de los objetos a medir. Los programas modernos, como el desarrollado por Kontron Bildanalyse GmbH (Chromosome Analysis Package, ref 2.2; y la versión 1.01 DGMIP de Microm España, etc.), pueden ofrecer en pantalla los trazos de cada medida en un color diferente, y cada trazo, interrumpido al nivel de los centrómeros, bandas, satélites, etc., se traduce en una medida en pixels, o directamente en micras mediante una función de calibración. Todas las medidas obtenidas se almacenan en archivos o se pueden imprimir directamente.

Las medidas bi-dimensionales, como el perímetro y el área de cada objeto se obtienen automáticamente a partir de las imágenes binarias. Para ello, todos los cromosomas individuales y que aparecen con silueta blanca sobre el fondo negro se han de identificar. Programas como los indicados permiten la identificación de los objetos a medir dando un color diferente a cada objeto (Fig. 3f). Objetos colindantes pero separados muestran diferente color. De ahí la importancia de trazar líneas delimitadoras entre cromosomas próximos, o sobre el centrómero para separar ambos brazos, o delimitando bandas o satélites, según el tipo de observación que se desee realizar. A continuación se miden los objetos, y como en el caso de las medidas lineales, se pueden crear archivos, o añadirlos a los de aquellas, o imprimir directamente los datos obtenidos.

Un tipo de observación muy útil para la identificación y el emparejamiento de los cromosomas homólogos es el perfil densitométrico. Para su obtención se parte de la imagen gris original mejorada, que se amplía haciendo un zoom del cromosoma que se desea estudiar. Mediante las funciones desplazamiento y rotación se sitúa la imagen del cromosoma ampliado en la mitad superior de la pantalla, y se obtiene una copia de la imagen con inversión de los niveles de gris más adecuado para la obtención de las medidas de densidad. Mediante la utilización del cursor se hace un trazado de telómero a telómero de cada cromátida, lo que genera un registro densitométrico de cada cromátida seleccionada, que pueden superponerse para su comparación (Fig 4a). Si se desea hacer un buen análisis, es mejor hacer el estudio en un número amplio de ejemplares del mismo par cromosómico (ej.: 40 cromátidas de 20 cromosomas, de 10 células). Del mismo modo que en las medidas lineales y bi-dimensionales, los datos de densidad media del objeto analizado pueden almacenarse en archivos, añadirse como nuevos parámetros e imprimirse directamente.

El método CHIAS, descrito originalmente por Fukui (1985), aplicado sobre diversos ejemplares del mismo cromosoma permite derivar una serie de datos cuantitativos que a continuación se utilizan para construir idiogramas, con un buen nivel de detalle de las regiones cromosómicas y perfectamente a escala.

Este método, con variaciones está siendo utilizado en nuestro Departamento. Su aplicación produjo buenos resultados en un análisis comparativo de los cromos-



*Figura 4.- a) A la izquierda y de arriba a abajo, un cromosoma 1R, de la misma célula de la Fig. 3, de la que se han obtenido diversas imágenes en color para destacar las diferentes áreas de tinción (bandeo-C). Abajo se muestra los densitogramas superpuestos de las dos cromátidas. Estos perfiles son muy específicos para cada par cromosómico, y utilizables en la identificación y emparejamiento de los pares homólogos. b) A la derecha se muestra una vídeo-fotografía de un cariotipo de centeno (*Secale cereale*) sometido a hibridación in situ con las sondas pSc119.2 y pSc74, para revelar los lugares donde se encuentran las familias repetitivas de ADN de 120 pb y 480 pb, respectivamente. Abajo se muestra la densitometría de las dos cromátidas de un cromosoma 7R.*

somas homólogos de dos formas de trigo de diferente nivel ploídico, sometidos a bandeo-C y cuya distribución de heterocromatina se trataba de relacionar con la intensidad del apareamiento estudiado en diversos genotipos mutantes. La Tabla 1 presenta los resultados de los datos físicos de 9 cromosomas identificados por bandeo-C de la variedad hexaploide “Chinese Spring” de *Triticum aestivum* ($2n=6x=42$; fórmula genómica AABBDD), que fueron obtenidos por el método

Tabla 1.- Parámetros físicos y densitométricos correspondientes a los cromosomas 4A, 7A y los siete del genomio B del trigo "Chinese Spring", obtenidos mediante la aplicación de la metodología CHIAS. L=brazo largo; S=brazo corto; Las medidas de longitud se indican en micras, por conversión tras calibración a partir de pixels. La densidad óptica es relativa y el valor 1 corresponde a la densidad de regiones no bandeadas normalizadas a un nivel de gris medio (valor de gris 128, de la escala 0- 256).

Cromosoma banda	L	S	L/S	Distancia desde telómero	Densidad
4A	6,85	4,18	1,63		
4AL1.3				5,47	1,99
4AL2.4				1,78	1,64
7A	5,58	5,48	1,07		
7AL1.7				0	1,47
7AS1.5				0	1,46
1B	6,93	4,35	1,59		
1BL2.2				3,30	1,39
1BS2.5				1,65	1,36
2B	7,06	4,92	1,35		
2BS2.7				0	1,90
2BS2.5				1,33	1,71
2BS1.3				3,85	2,22
3B	6,71	5,10	1,33		
3BS2.2				2,25	1,36
3BS1.3				4,06	1,66
4B	5,52	4,81	1,15		
4BL1.1				5,52	1,86
4BL2.8				0	1,50
4BS2.2				0	1,38
4BS1.1				4,81	1,91
5B	7,56	3,57	2,12		
5BL2.1				4,57	2,10
5BL2.3				3,76	1,80
5BL2.5				2,76	1,95
5BL2.8				0	1,16
5BS2.4				0	1,42
5BS1.3				3,57	2,50
6B	5,96	3,22	1,20		
6BL1.1				3,22	1,54
6BL2.7				0	1,17
6BS3.6				0	1,48
6BS2.4				1,72	1,21
6BS1.1				5,96	1,48
7B	7,07	4,72	1,50		
7BL2.6				2,91	1,79

CHIAS utilizando el sistema MIP de la firma española MICROM. Mediante este análisis fue posible determinar las diferencias entre los cromosomas de "Chinese Spring" y los del trigo tetraploide "Cappelli" de *Triticum turgidum* ($2n=4x=28$; genomiomas AABB). Se pudo determinar con precisión la posición de las bandas principales, y considerar su influencia en la intensidad de la asociación meiótica en cada brazo (Bernardo et al., 1992; Jouve, 1993). Estos trigos revelaron un conjunto de más de medio centenar de bandas-C, distribuidas de forma heterogénea en el conjunto cariotípico, lo que constata la importancia del polimorfismo de la heterocromatina en estas especies vegetales.

El análisis de imagen puede permitir la medición precisa de las conspicuas diferencias existentes en cada región cromosómica. Aun más importante que este hecho, de cariz descriptivo, es la posibilidad de verificar de forma medible la influencia de los parámetros físicos en los fenómenos del apareamiento, o utilizar las marcas físicas polimórficas en la confección de mapas citogenéticos, en combinación con otros caracteres segregantes (isoenzimas, proteínas, RFLPs, RAPIDs, etc.).

La eficacia de estos métodos para el análisis cariológico en plantas se pone especialmente a prueba en especies en las que los cromosomas son muy pequeños. Así, recientemente, Kamisugi et al. (1993) han analizado los cromosomas del arroz, *Oryza sativa*, que tienen un tamaño absoluto de 1-2 micras durante la meta-fase mitótica, y son del orden de 5-10 veces más cortos que los cromosomas del trigo. El método CHIAS utilizado por estos autores en el National Institute of Agrobiological Resources de Tsukuba, permitió la identificación automatizada de los 12 pares de cromosomas. Para ello utilizaron dos tipos de parámetros de identificación: 1) un patrón de condensación (CP) que equivale al perfil densitométrico de telómero a telómero de cada cromosoma, y 4 parámetros físicos típicos como son la longitud relativa total y de cada brazo, y la relación de brazos; y 2) un conjunto de parámetros derivados de las imágenes digitalizadas, tales como gradientes de niveles de gris, posición de las regiones de mayor condensación, integración de los niveles de gris, etc. La identificación automática fue posible mediante la interpretación de todo el conjunto de datos generados por el analizador de imágenes mediante la aplicación de tres métodos estadísticos diferentes: 1) una carta de discriminación, basada en decisiones dicotómicas o de flujos (Iijima et al., 1991); 2) un método de funciones de discriminación lineal aplicando una serie de parámetros físicos selectos; 3) un método de clasificación por estimación de distancias mínimas basado en las distancias Euclideas a partir de 20 parámetros físicos.

En cualquier caso, existen muchos métodos alternativos de análisis multifactorial que pueden ponderar los parámetros físicos procedentes de los análisis de imágenes. Esta es la última fase del proceso, que en realidad es ajena a los sistemas de cuantificación aplicados, pero cuya estrategia de trabajo puede depender mucho de cómo se hayan tomado los datos en el analizador de imágenes. Existe incluso la posibilidad de interconectar éste con programas estadísticos, preparando los datos derivados del análisis de imagen, creando ficheros de datos compatibles (ASCII), o en forma de matrices en hojas de cálculo, que permitan la introducción en dichos programas. Un programa que creemos muy recomendable para

todo tipo de análisis multifactorial, estimaciones de distancias Euclideas y genéticas, elaboración de dendrogramas, ponderación de parámetros, etc, es el programa NT-SYS (Numerical Taxonomy System) desarrollado por Rolph (1987).

El análisis de imagen ofrece igualmente enormes posibilidades para el estudio de los resultados de aplicación de las técnicas de hibridación *in situ*. Estas técnicas permiten localizar los lugares específicos de los cromosomas en los que se produce una reacción de hibridación con una sonda marcada (Gall and Pardue, 1969). Estas técnicas son de una gran utilidad en la confección de mapas físicos en numerosas especies. Sin embargo, los cromosomas de las especies vegetales, al igual que sucede con otros métodos citogenéticos, presentan dificultades muy especiales, más acusadas para ADN de copia simple que para familias de ADN repetitivo (Jouve et al., 1991). En primer lugar están las dificultades propias de obtener buenas preparaciones con cromosomas bien separados. Por otro lado está la necesidad de habilitar técnicas adecuadas de marcado y de detección. La resolución y sobre todo el tiempo requerido ha mejorado sensiblemente al pasar del marcado radioactivo del ADN al no radioactivo, mucho más limpio y rápido.

Respecto al marcado no radioactivo existen diversas alternativas cuya elección depende del tipo de muestra utilizada, la sensibilidad requerida y la resolución de la señal necesaria. El marcado con biotina es el método más extendido, especialmente desde que se describió la posibilidad de sintetizar todos los tipos de deoxinucleótido 5'-trifostato (dATP, dGTP, dCTP y dUTP) con el hapteno biotina unido a los anillos de las bases nucleotídicas (Gebeyehu et al. 1987). Este hecho, y la posibilidad de su incorporación a pruebas de ADN, en sustitución de los nucleótidos normales, por las reacciones de "nick translation" o "random priming", han contribuido a mejorar de forma muy notable la obtención de sondas muy adecuadas para la hibridación *in situ* (Feinberg and Vogelstein 1983).

Tabla 2.- Parámetros físicos medidos por el sistema CHIAS para definir la posición de los tres loci de la familia multigénica ADNr 5S en los cromosomas 1R, 3R y 5R de Secale cereale, analizado en tres variedades diferentes de triticale (2n=6x=42; fórmula genómica AABBRR). Las medidas se expresan en pixels. CEN=centrómero; NOR=Organizador nucleolar.

Parámetros	"Badiel"	"Tajuña"	"0-22-80"
1RL/1RS	1,33 \pm 0,15	1,70 \pm 0,10	1,40 \pm 0,11
CEN a NOR	57,43 \pm 0,93	50,51 \pm 3,29	53,97 \pm 3,04
CEN a locus 5S (1RS)	65,94 \pm 3,46	65,83 \pm 2,61	68,03 \pm 2,99
3RL/3RS	1,14 \pm 0,04	1,17 \pm 0,10	1,11 \pm 0,04
CEN a locus 5S (3RS)	70,37 \pm 3,64	74,49 \pm 2,07	74,32 \pm 4,14
5RL/5RS	1,74 \pm 0,11	2,15 \pm 0,23	1,93 \pm 0,10
CEN a locus 5S (5RS)	46,96 \pm 5,33	53,85 \pm 4,8	60,52 \pm 1,76

No obstante, el mayor problema lo plantea la detección de la señal, en la que interviene de forma muy decisiva el grado de repetición de la secuencia a localizar. Solo recientemente se ha empezado a lograr con relativo éxito la detección de la hibridación in situ de pruebas de ADN de secuencia única en especies vegetales (Ambros et al. 1986; Clarck et al., 1989; Gustafson et al. 1990; Lehfer et al., 1993). De todas las técnicas aplicadas a la localización de la hibridación in situ en plantas, la que parece ofrecer las mejores perspectivas es la que combina la utilización de fluorocromos unidos directamente a las bases nucleotídicas, o a antígenos capaces de reaccionar con la biotina o digoxigenina introducida en la sonda de ADN, seguido de la detección con microscopía de fluorescencia. Estas técnicas han mejorado enormemente por la cantidad y calidad de los reactivos, y sobre todo por la posibilidad de hacer hibridaciones simultáneas o sucesivas (rehibridación de las mismas células) con diferentes sondas marcadas diferencialmente, y que se pueden ir detectando de forma también simultánea o sucesiva (Heslop-Harrison, 1991; Heslop-Harrison et al. 1991, 1993; Cuadrado et al., 1994). Aquí de nuevo, el análisis de imagen asistido por ordenador ofrece todo un mundo de posibilidades al poder superponer con gran precisión la imagen de una misma célula hibridada con diferentes sondas, en una misma reacción o en hibridaciones sucesivas, y cuya imagen puede irse captando con diferentes filtros para revelar las posiciones relativas de los loci.

En la Fig. 4b se muestra un trazado densitométrico de un cromosoma de centeno sometido a hibridación in situ con fluorescencia para varias sondas de ADN repetitivo. En la Tabla 2 se registran los resultados de la aplicación de la hibridación de fluorescencia (FISH) y el análisis de imagen utilizando el sistema MIP, para definir la posición de un nuevo locus que codifica para el ARN ribosomal 5S en el cromosoma 3R del centeno. Este fue descubierto recientemente en nuestro laboratorio y en el John Innes Institute, en el Karyobiology Unit, en Norwich, en colaboración con el Dr. Heslop-Harrison (Cuadrado et al., 1994), y se une a los ya localizados en los cromosomas 1R y 5R. Los resultados cuantitativos que se indican en la Tabla 2 corresponden al análisis de una serie de células de tres variedades del anfiploide sintético Triticale, habiéndose encontrado también en varias líneas de centeno de diversos orígenes. El locus que hemos denominado 5SDna-R7 presenta polimorfismo de presencia-ausencia no estando presente en todas las líneas analizadas de *Secale cereale*.

En definitiva, las principales dificultades de la localización de las señales de hibridación in situ radican en el caso de los cereales en tres aspectos: 1) la debilidad de la señal, cuando los cromosomas están cubiertos por restos de citoplasma; 2) la debilidad de la señal en sí misma, por su localización a veces muy restringida ó puntual; y 3) la incapacidad de su detección con los medios ópticos habituales, que pueden no alcanzar el poder de resolución necesario. Cada uno de estos problemas puede ser resuelto por métodos diferentes. Probablemente la combinación de una buena metodología de obtención de las preparaciones microscópicas, con el uso de enzimas para obtener protoplastos, la aplicación de las técnicas de fluorescencia (FISH) y un buen sistema de análisis de imagen como el CHIAS aquí descrito, pue-

den ser decisivos para mejorar muy sensiblemente las dificultades de los análisis en cromosomas vegetales, y potenciar de forma considerable el estudio de la hibridación con sondas de bajo número de copias, e incluso de copia simple.

Genética molecular asistida por análisis de imágenes

Los analizadores de imágenes se han convertido también en herramientas indispensables para el análisis de imágenes procedentes de la aplicación de una extensa gama de técnicas de Biología Molecular. La mayoría de los ejemplos fueron citados al principio.

Estos trabajos son necesarios en numerosos experimentos de Genética Molecular y conllevan un trabajo tedioso de no contar con instrumentos de análisis adecuados. Sin embargo, son trabajos muy rutinarios y sencillos para un analizador de imágenes, siempre y cuando éstas se le presenten de una forma adecuada.

Esto implica que los experimentos en sus aspectos formales deben contemplar la aplicación del analizador de imágenes en su fase de interpretación de los resultados. Así, se debe tener en cuenta el tamaño de las membranas, geles, fotografías, etc. que se deseen interpretar. Se deben introducir muestras control que nos permitan por comparación conocer el tamaño, el peso molecular, la densidad, etc.

Existen numerosos equipos informáticos en el mercado diseñados expresamente para el análisis de imágenes de experimentos como los que indicamos anteriormente. De entre ellos, el que consideramos más eficaz, rápido y versátil es el diseñado por Millipore y conocido como Bioimage. Es un instrumento que básicamente cuenta con los mismos elementos que el ya explicado para análisis de cromosomas, con la salvedad de que las imágenes reales se convierten en imágenes digitales a través de un scanner o de una cámara de TV.

Una vez digitalizadas las imágenes, y previo a su análisis con el Bioimage, se ha de pasar por una serie de etapas previas que requieren la preparación de la imagen para su análisis. En resumen las etapas a seguir exigen:

- captación de la imagen,
- edición de la imagen (definir carriles, parámetros de comparación, seleccionar los umbrales de intensidad a partir de los cuales se consideran los objetos a analizar, definición y/o eliminación de las bandas, manchas, etc. que se desean estudiar, etc.),
- análisis propiamente dicho (comparación de carriles, geles, etc.),
- creación de archivos de datos cuantitativos (número de carriles, número de bandas, pesos moleculares, distancias de recorrido, tamaños, etc.),
- impresión de archivos con formatos predefinidos,
- conexión con programas estadísticos que faciliten la interpretación de los resultados obtenidos.

Sistemas de análisis

Por imágenes virtuales, nos referimos a objetos de observación no directa, no visual, sino oculta pero tornable en visible mediante determinadas tecnologías. En los últimos años se han desarrollado técnicas que permiten convertir las señales radioactivas no visuales en una imagen óptica, y por lo tanto analizable como cualquier objeto visible. Esto tiene un gran campo de aplicaciones en Biología Molecular, y por tanto en Genética.

Se aplica sobre todo en sustitución de las autoradiografías, que como es sabido se utilizan para revelar la posición de focos emisores de radiación beta, rayos-X, u otros tipos sobre soportes o geles de cualquier clase. La autorradiografía tradicional implica la colocación de una película no impresionada de rayos-X, sobre la superficie de la muestra que lleva marcas radioactivas. Se expone la película durante bastantes horas, a veces varios días y semanas, y a continuación se revela el film. Las manchas oscuras de los precipitados de plata corresponderán a las posiciones de las marcas radioactivas en la muestra. Los prolongados tiempos de exposición, el ruido de fondo y la baja resolución de las imágenes resultantes son los principales problemas de estas técnicas.

Pues bien, existen ya en el mercado unos equipos especiales que son capaces de transformar la energía que despiden un objeto radioactivo en energía lumínica que puede ser leída y traducida en luz de un color determinado. Esto se logra exponiendo durante unos minutos un soporte especial de fósforo, contra la superficie de la muestra u objeto radioactivo. El soporte de fósforo es capaz de absorber la energía procedente de la fuente radioactiva a una determinada longitud de onda y la re-emite a otra. Dichos soportes son únicos por su especial capacidad para atrapar y almacenar energía que solo se revela cuando estando impresionado, es estimulado con una fuente de luz apropiada.

Los equipos de utilización de este tipo de tecnologías son bastante recientes. Hoy en el mercado existen varias marcas que los han comercializado: Fujitsu, Molecular Dynamics y Bio-Rad son las más importantes. Utilizaremos la denominación genérica de Imagen de Fósforo para referirnos a las imágenes creadas y manejadas por estos equipos. Pero antes hagamos hincapié en sus ventajas frente a la tradicional autoradiografía:

- Exposición más rápida de la muestra,
- Mayor sensibilidad,
- Mayor rango dinámico,
- Menor coste por imagen (las pantallas de fósforo son reusables),
- Cuantificación con mayor resolución,
- Versatilidad de muestras a analizar, ya que la fuente radioactiva puede proceder de distintos isótopos o tipos de radiación: ^{32}P , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , Rayos-X, rayos γ , etc.

Cuando la pantalla de fósforo en la oscuridad es expuesta a una muestra radioactiva, la energía procedente de ésta es atrapada por el soporte de fósforo. La

energía atrapada es estable hasta que la pantalla se somete a un rastreo con un rayo láser. La iluminación con el láser transforma la energía estable a un nivel de inestabilidad tal que su posición se desvela en forma de luz azul. El mismo fenómeno ocurriría si la pantalla de fósforo se expusiera a rayos gamma, rayos-X, ó radiación ultravioleta.

La eficacia con la que el fósforo captura energía radioactiva de tipo β , es próxima al 100 %. Si se compara con las imágenes de autorradiografía las ventajas son muy evidentes. Así, para emisión de tipo β , como las procedentes de ^{32}P , el 90% de las partículas pasan a través del film y se pierden sin contribuir a la formación de la imagen. Existen fórmulas de intensificación que mejoran esta situación, pero aún así las pantallas de fósforo son del orden de 10 veces más sensibles. Por último otra ventaja evidente de la tecnología de las imágenes de fósforo es el rango dinámico. En las pantallas de fósforo el rango dinámico es de cinco ordenes de magnitud, frente a los dos órdenes de magnitud de las imágenes autorradiográficas, y todo ello en un tiempo de hasta 10 veces menor.

Las ventajas de estas técnicas son evidentes en el abaratamiento, rentabilidad de tiempo y resolución y nivel de sensibilidad obtenida. El resto del proceso, es decir la obtención de la información de tipo paramétrico-cuantitativo entra dentro de la bondad de los programas informáticos, capaces de extraer todo tipo de detalles al máximo de resolución tras el proceso de preparación de la imagen. Al igual que en los equipos informáticos descritos anteriormente, la información puede resumirse en informes de datos con un formato definido por el propio investigador, y pueden imprimirse la imagen y los informes derivados de la misma.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la C.I.C.Y.T., por la concesión del Proyecto AGR91-0191, que ha hecho posible la aplicación del análisis de imagen para estudios cariotípicos en los materiales recogidos en esta publicación.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Ambros, P.F., Matzke, M.A. & Matzke, A.J.M. (1986). Detection of a 17 kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 94: 11-18.
- 2.-Bernardo, A., Montero, M., Cuadrado, A. & Jouve, N. (1992). Image analysis of C-banded chromosomes and pairing regionalization in wheat. *Genome* 35: 1062-1067.
- 3.-Carlson, L., Caspersson, T., Foley, G.E., Kudynowski, J., Lomakka, G., Simonsson, E. & Soren, L. (1963). The application of quantitative cytochemical techniques to the study of individual mammalian chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 31: 589-594.
- 4.-Caspersson, T., Lomakka, G., Zech, L. (1971a). The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes - distinguishing characters and variability. *Hereditas* 67:89-102.
- 5.-Caspersson, T., Lomakka, G. & Moller, A.(1971b). Computerized chromosome identification by aid of the quinacrine mustard fluorescence technique. *Hereditas* 67:103-110.
- 6.-Clark, M., Karp, A. & Archer, S.(1989). Physical mapping of the B-hordein loci on barley chromosome 5 by in situ hybridization. *Genome* 32: 925-929.
- 7.-Cuadrado, A., Jouve, N. & Heslop-Harrison, J.S. (1994). Physical mapping of the 5S-rRNA multigene family in 6x-Triticale and rye: identification of a new rye locus. *Genome* (enviado).
- 8.-Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- 9.-Fujita, S. (1983). The microcomputer-based color image analyzer and its application to histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 238-240.
- 10.-Fukui, K. (1985). Identification of plant chromosomes by image analysis method. *The Cell Tokyo* 17: 145-149.
- 11.-Fukui, K. (1986). Standardization of karyotyping plant chromosomes by a newly developed chromosome image analyzing system (CHIAS). *Theor. Appl. Genet.* 72: 27-32.
- 12.-Fukui, K. (1987). Application of image analysis methods in plant chromosome research. En "Plant Chromosome Research 1987" (H. Deyman, ed). *Proc SINO-Japanese Symposium on Plant Chromosomes*: 195-212.
- 13.-Fukui, K. & Ito, K. (1985). Analysis and utility of chromosome information. 16. Development of the software for banding analysis. *Jap. J. Genet.* 60: 586.
- 14.-Gall, J.G. & Pardue, M.L.(1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 63:378-383.

- 15.-Gebeyehu, G., Rao, P.Y., SooChan, P., Simms, D. & Klevan, L. (1987). Novel biotinylated nucleotide analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. *Nucleic Acid Res.*, 15: 4513-4534.
- 16.-Greilhuber, J. (1977). Why plant chromosomes do not show G-bands?. *Theor. Appl. Genet.* 50: 121-124.
- 17.-Gustafson, J.P., Butler, E. & McIntyre, C.L.(1990). Physical mapping of a low copy DNA sequence in rye (*Secale cereale* L.). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 87: 1899-1902.
- 18.-Heslop-Harrison, J.S. (1991). The molecular cytogenetics of plants. *Journal of Cell Sci.*, 100: 15-21.
- 19.-Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T., Anamthawat-Jonsson, K., Leitch, A.R., Shi, M. & Leitch, I.J.(1991). In situ hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique-A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology*, vol 3, N° 3. pp.109-116.
- 20.-Heslop-Harrison, J.S., Leitch, A.R., Schwarzacher, T.(1993). The physical organization of interphase nuclei. In "The chromosome" (Heslop-Harrison JS, Flavell RB, eds). Oxford: BIOS pp 178-182 and 221-232.
- 21.-Iijima, K., Kakeda, K., Fukui, K.(1991). Identification and characterization of somatic rice chromosomes by imaging methods. *Theor. Appl. Genet.*, 81: 597-605.
- 22.-Jouve, N.(1993). Image Analysis of C-banded chromosomes. *Rice Biotech. Quart.* 15: 32-33.
- 23.-Jouve, N., McIntyre, C.L. & Gustafson, J.P.(1991). Chromosome preparations from protoplasts: in situ hybridization banding pattern of a dispersed DNA sequence in rye (*Secale cereale* L.). *Genome* 34: 524-527.
- 24.-Kamisugi, Y., Furuya, N., Iijima, K., Fukui, K.(1993). Computer-aided automatic identification of rice chromosomes by image parameters. *Chromosome Research* 1: 189-196.
- 25.-Langer, P.R., Waldrop, A.A. & Ward, D.A.(1981). Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 78: 6633-6637.
- 26.-Lehfer, H., Busch, W., Martin, R. & Herrmann.(1993). Localization of the B-hordein locus on barley chromosomes using fluorescence in situ hybridization. *Chromosoma*, 102: 428-432.
- 27.-Lubs, H.A. & Ledley, R.S.(1973). Automated analysis of differentially stained human chromosomes. A review of goals, problems and progress. *Nobel. Symp.* 23:61-76.
- 28.-Marimuthu, K.M., Selles, W.D., Neurath, P.W.(1974). Computer analysis of giemsa banding patterns and automatic classification of human chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 26:369-377.

- 29.-Mendelsohn, M.L., Conway, T.J., Hungerford, D.A., Kolman, W.A., Perry, B.H. & Prewitt, J.M.S.(1966). Computer-oriented analysis of human chromosomes. I. Photometric estimation of DNA content. *Cytogenetics* 5:223-242.
- 30.-Rolph, E.F.(1987). NT-SYS pc: numerical taxonomy system of multivariate analysis system for IBM PC microcomputer (and compatibles). En "Applied Biostatistics" (Setavek N.Y. ed.). Univ New York.