



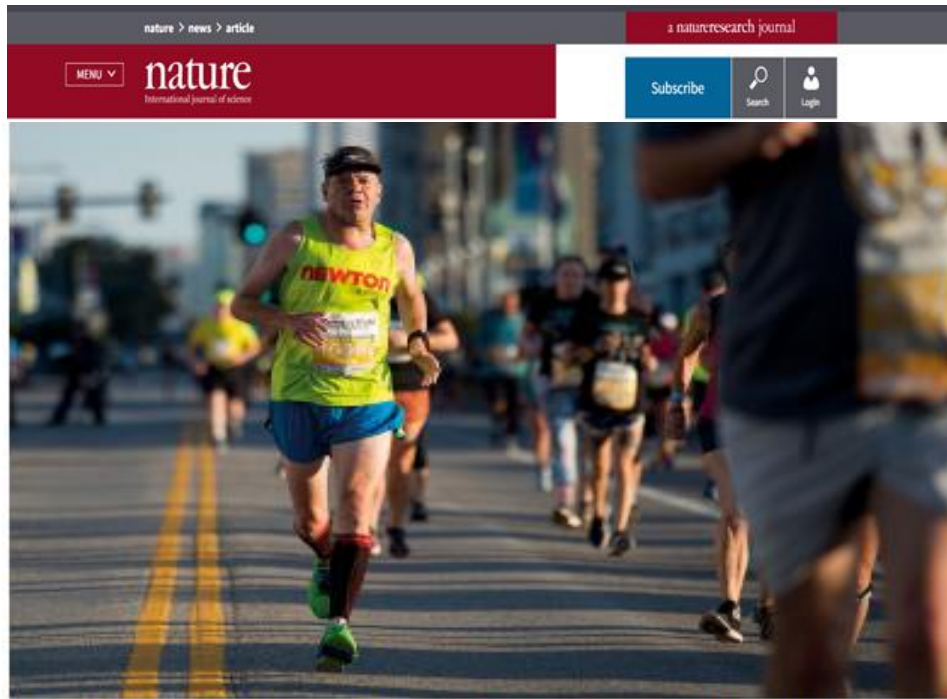
UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

I B A M

Variabilidad genética y epigenética en especies tuberosas de *Solanum*: *Aportes a la epigenética de poblaciones*

Ricardo Masuelli

Epigenética



A person's biological age, measured by the epigenetic clock, can lag behind or exceed chronological age.

EPIGENETICS

Trial hints at age-clock reversal

In a small trial, a drug cocktail seemingly rolled back the epigenetic clock, which tracks a person's biological age.

The cover of Parati magazine features a woman with long dark hair, wearing a vibrant, multi-colored (rainbow) off-the-shoulder dress and gold high-heeled shoes. She is sitting and looking towards the camera. The magazine title 'parati' is written in large, bold, black letters. At the top, it lists 'PALOMA HERRERA + ÉPOCA ROSA + los 7 + MANGAS TOP'. The issue date '22-9-2017' and number 'Nº 4966' are in the top right. A red banner on the left says 'Lo mejor de Casa FOA + entrada 2x1'. A speech bubble on the right says 'Luciana Aymar, su nueva vida'. The main headline is 'EPIGENÉTICA' in large, bold, black letters. Below it, a sub-headline reads 'AMOR FATAL el rugbier, la jugadora de hockey y el crimen.' There is a small orange cat icon and the text 'SÚPER TECHIES lo más nuevo para saber y tener.' At the bottom, there is a barcode, the website 'parati.com.ar', and a small note: 'CABA Y GBA \$ 45. RECARGO ENVÍO AL INTERIOR \$ 3. EN R.D.U. \$ 150. EN CORRIENTES Y NEUQUÉN SE ENTREGA CON LOS DIARIOS EL LITORAL Y LA MAÑANA. PROHIBIDA SU VENTA POR SEPARADO.'

El modelo de la papa

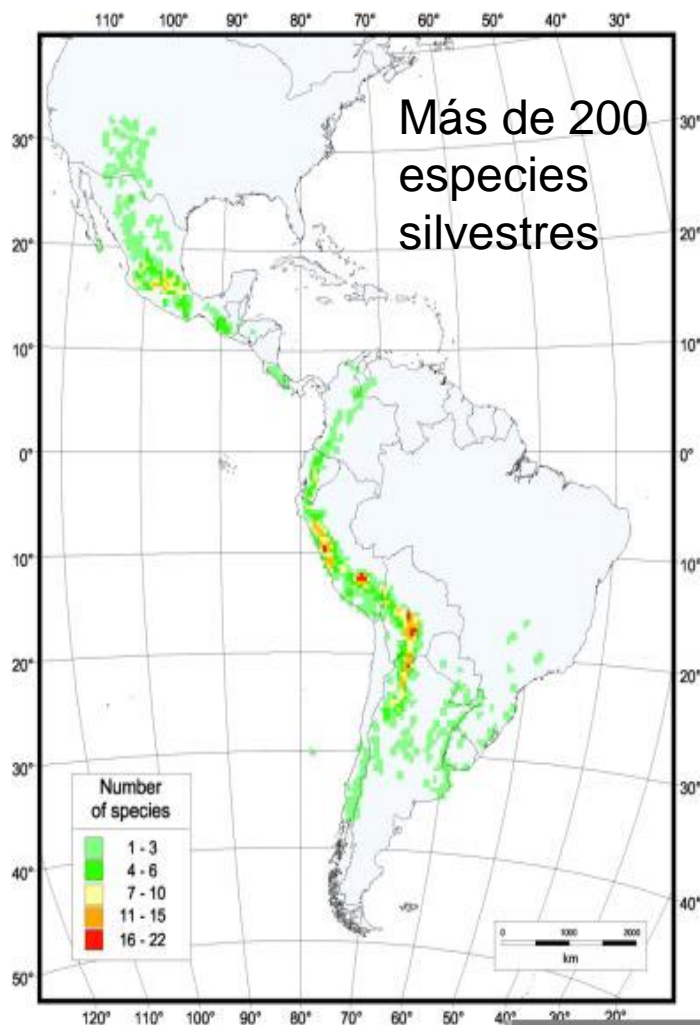


Solanum tuberosum L.

Más de 200 especies

Sección *Petota*

Amplia distribución geográfica y variación genética



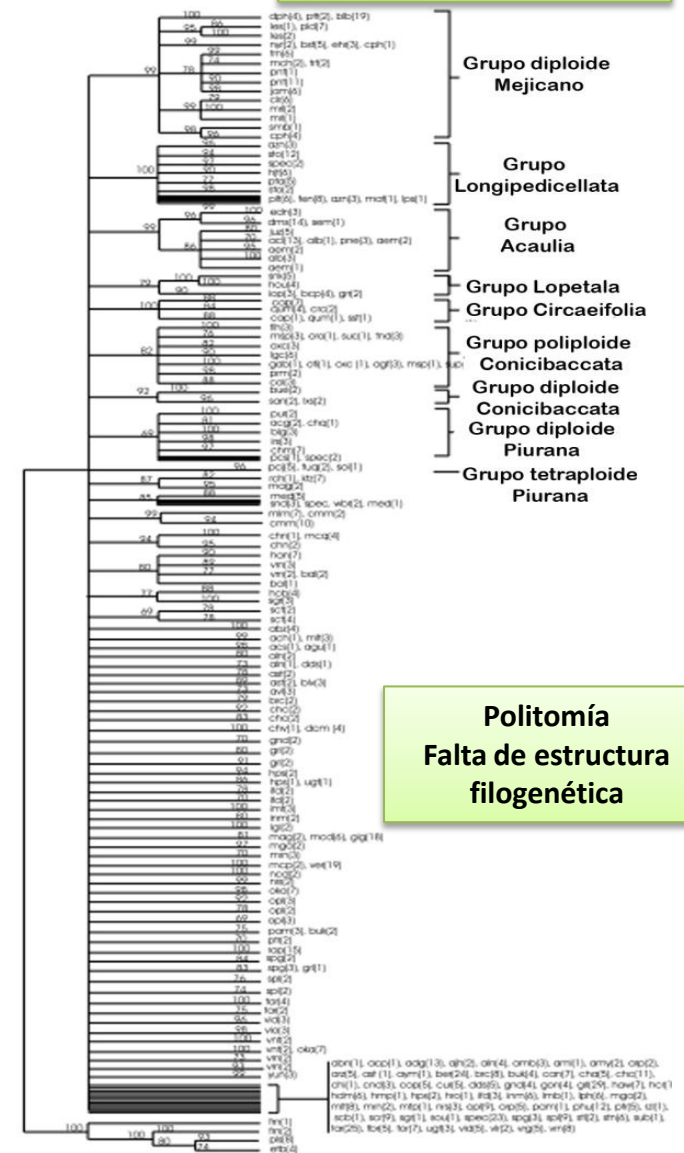
Gran variación morfológica



Biología reproductiva

- Multiplicación sexual y asexual
- Barreras incompletas a la hibridación
- Baja diferenciación cromosómica

Marcadores AFLP



- ¿Cuál es el origen de la amplia variabilidad fenotípica observada en especies tuberosas de *Solanum*?
 - ¿Variación genética ?
 - ¿Variación epigenética?
 - ¿Una interacción de ambas?

El estrés puede inducir cambios epigenéticos y reestructuración del genoma

- McClintock concepto de “Shock Genómico”
 - Cultivo de tejidos
 - Estrés biótico y abiótico
 - **Hibridación interespecífica**



Fuente de variabilidad

Cambios genéticos

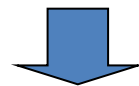
↓
Alelos

Cambios epigenéticos

↓
Epialelos

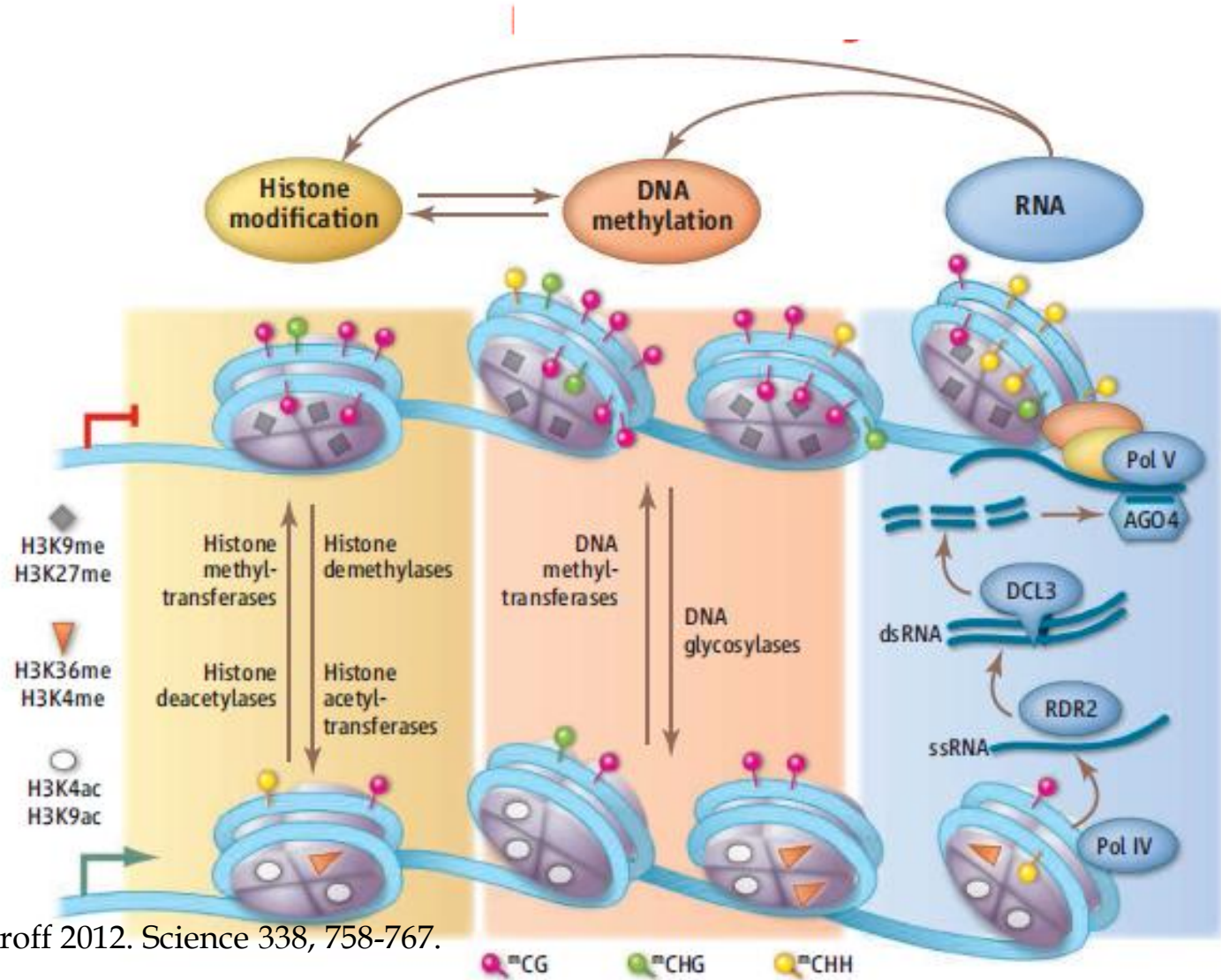
¿Qué son los cambios epigenéticos?

- Son cambios heredables en el fenotipo, y por lo tanto en la regulación génica, que no son causados por alteraciones en la secuencia del ADN.
- Entre las alteraciones epigenéticas se incluye la modificación química del ADN, de histonas y pequeños RNA.



Cambios en la estructura de la cromatina

Mecanismos epigenéticos en plantas



Fedoroff 2012. Science 338, 758-767.

Los mecanismos epigenéticos están regulados enzimáticamente y pueden ser reversibles. A su vez estos mecanismos son potencialmente heredables.

¿Existen ejemplos de epialelos
en poblaciones naturales?

Variación epigenética natural: Linaria

Variantes naturales de *Linaria vulgaris* que poseen flores con simetría radial tienen metilado y transcripcionalmente inactivo el gen *Lcyc*



Flor de *Linaria vulgaris* Peloria

Flor de *Linaria vulgaris* silvestre



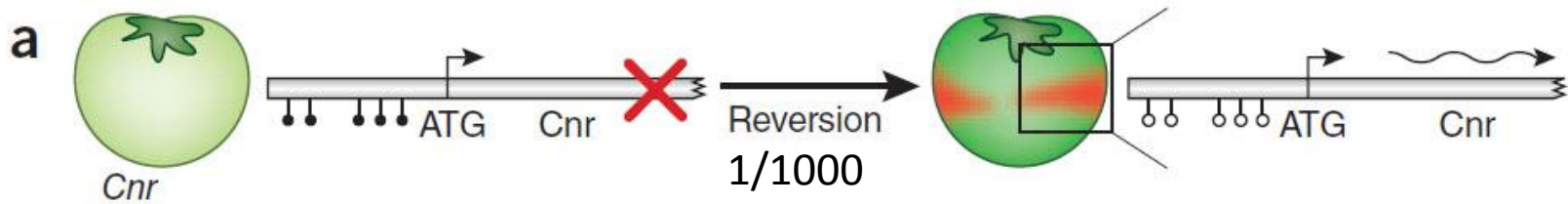
Metilación *Lcyc*

Epialelos: Potencialmente reversibles e influenciado por el ambiente



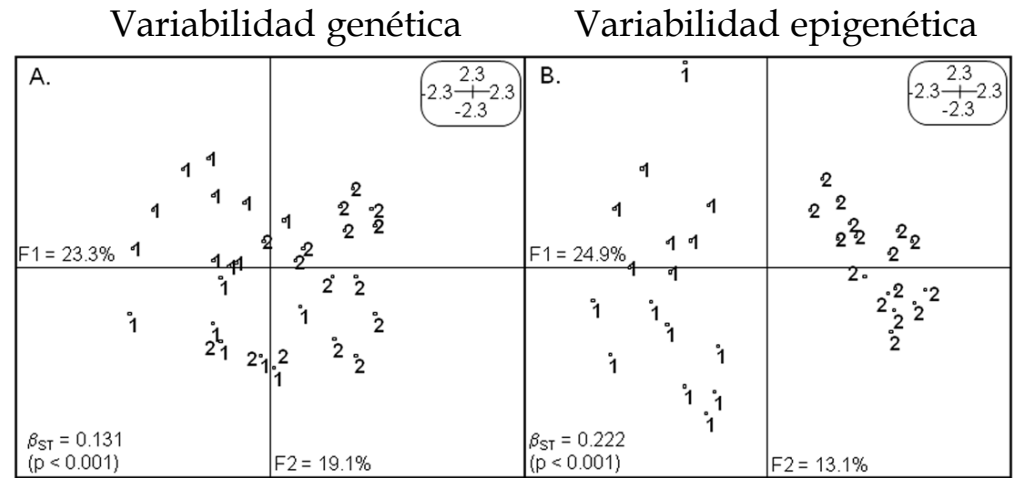
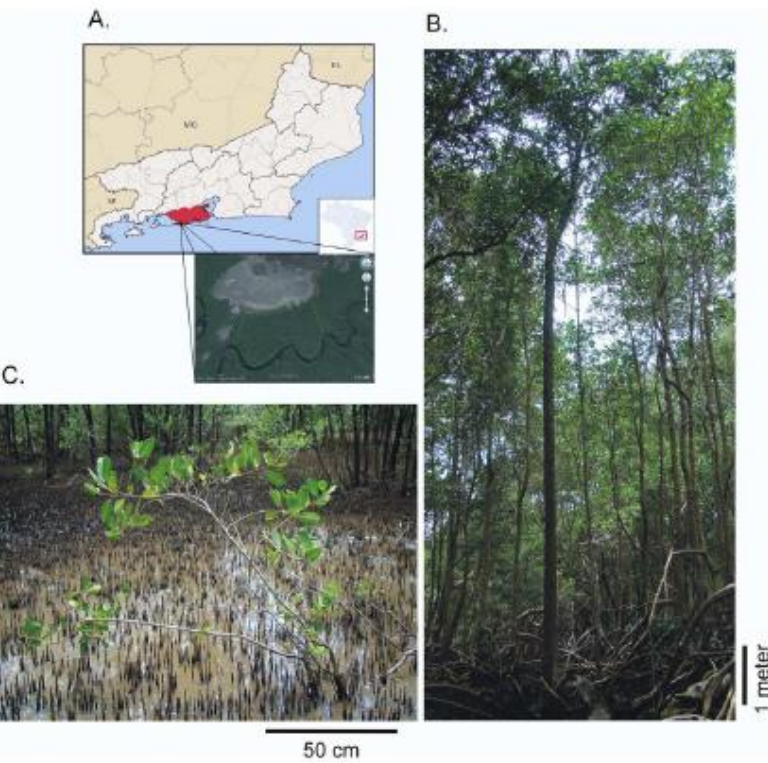
Cubas et al. Nature 401, 157-161 (1999)

Epimutación natural en tomate que inhibe la maduración del fruto: locus Colorless nonripening (Cnr)



Variación epigenética natural en manglares

Comparación entre individuos creciendo en ambientes contrastantes (pantanos vs. ríos)



- La variabilidad epigenética se asocia a la variabilidad morfológica.
- La variación epigenética natural tendría un rol importante en la adaptación de plantas a diferentes ambientes

Variabilidad genética y epigenética
generada por hibridación
interespecífica entre especies de
Solanum

Esquema

- Análisis de híbridos sintéticos
 - La hibridación interespecífica induce cambios epigenéticos.
- Análisis de híbridos naturales
 - Relación entre fenotipo y variabilidad epigenética.
 - Relación entre variación genética y epigenética.
 - Importancia en ecología y evolución.
- Cruzamientos interploides
 - La aneuploidía como fuente de variabilidad epigenética.
- Modelo

Cambios genéticos y epigenéticos en híbridos sintéticos de *Solanum*

Marfil et al 2006. Genomic instability in *Solanum tuberosum* × *Solanum kurtzianum* interspecific hybrids. *Genome* 49:104-113.

Híbrido 2x tbr x 2x ktz



S. tuberosum ($2n=2x=24$)

X

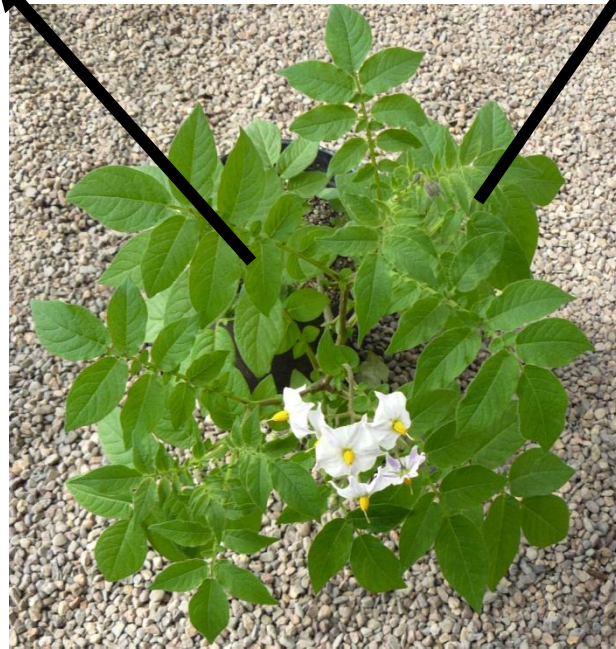


S. kurtzianum ($2n=2x=24$)

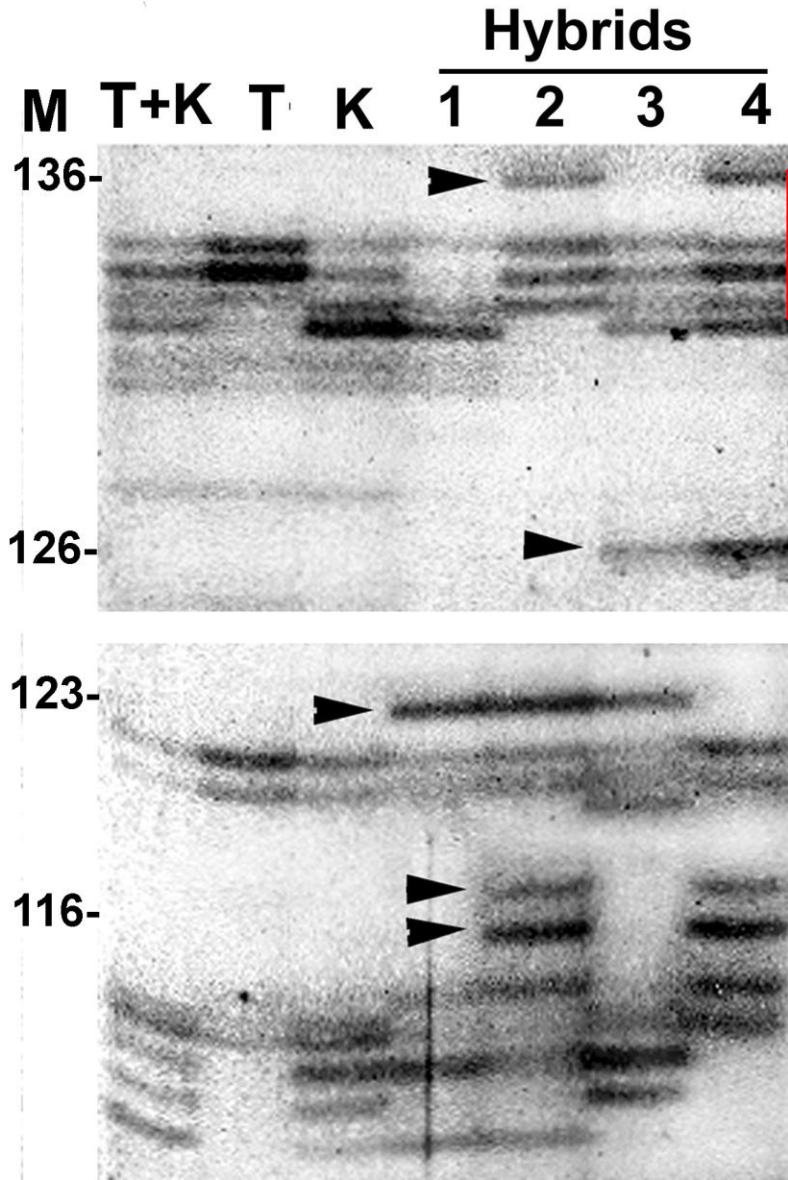


Híbrido diploide ($2n=2x=24$)

Anormalidades florales en híbridos



AFLP

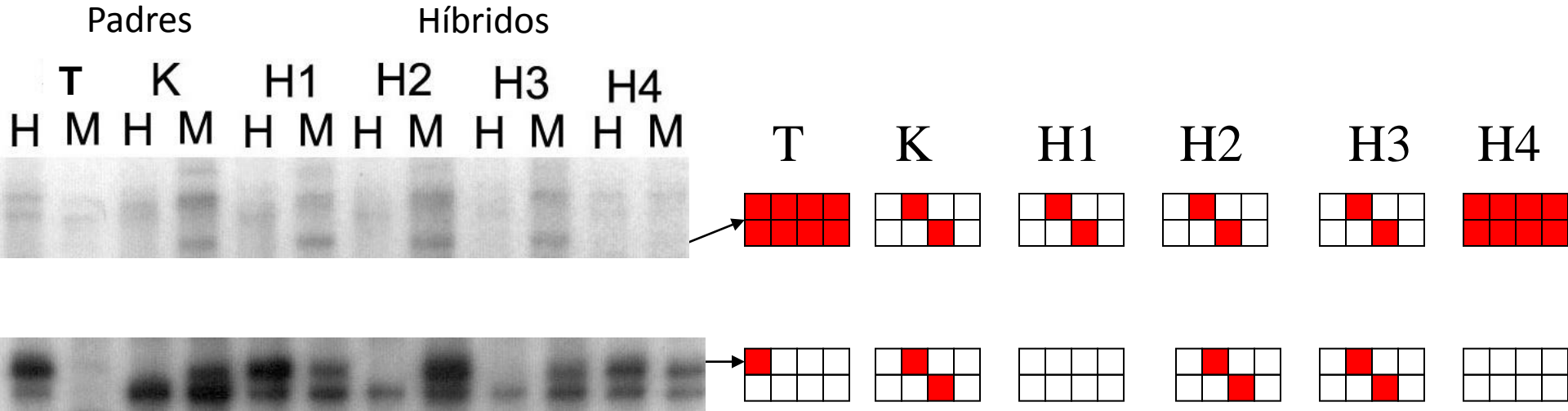


Reestructuraciones genómicas
en los híbridos

Evaluación de la metilación por Methylation Sensitive Amplify Polymorphism (MSAP)

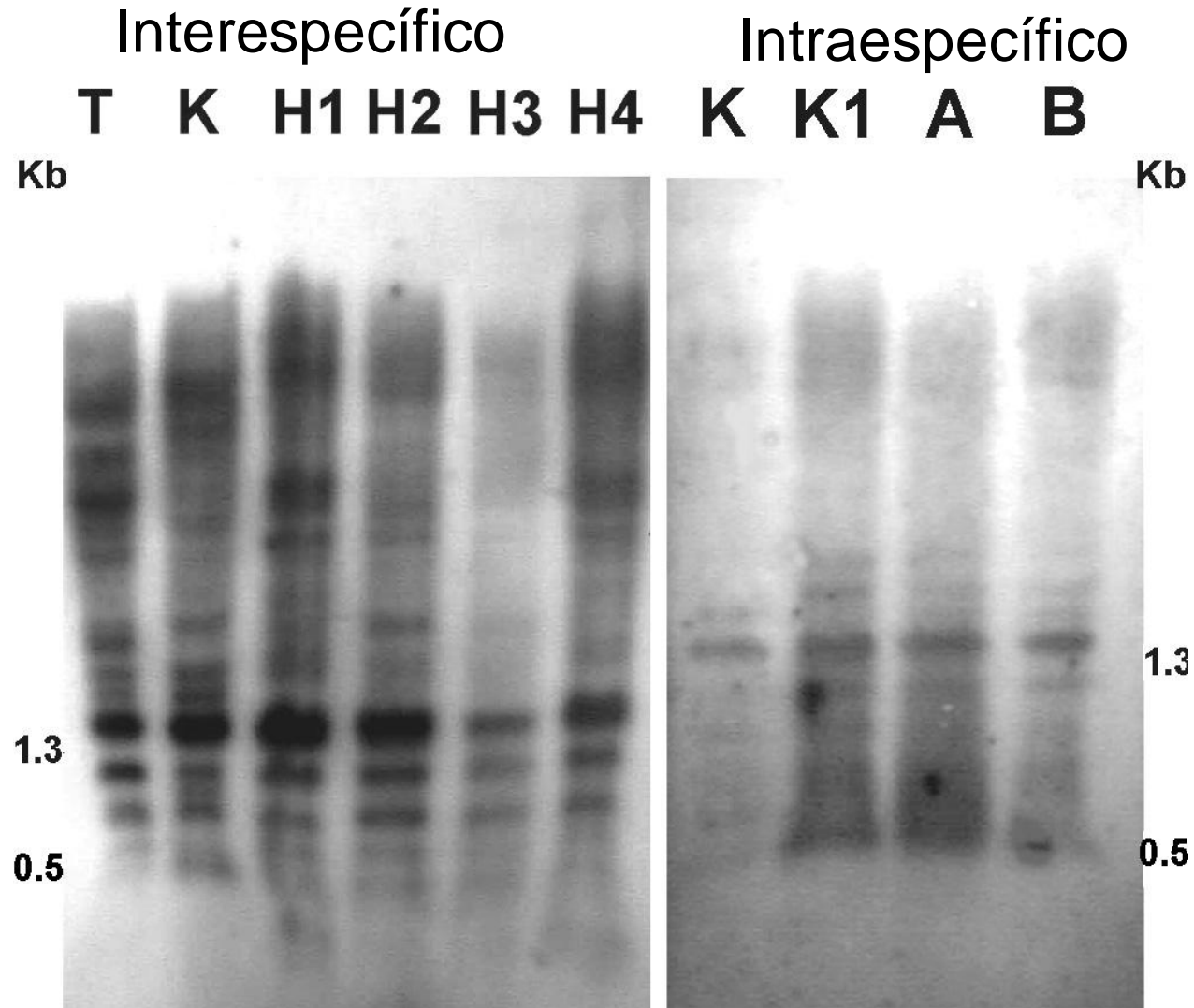
Metilación sitio CCGG	Patrón de bandas		Codificación del patrón	Estado de metilación								
	<i>EcoRI/HpaII</i>	<i>EcoRI/MspI</i>										
<table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table>	C	C	G	G	G	G	C	C	—	—	1	Desmetilado
C	C	G	G									
G	G	C	C									
<table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table>	C	C	G	G	G	G	C	C	—		2	Hemimetilado
C	C	G	G									
G	G	C	C									
<table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table>	C	C	G	G	G	G	C	C		—	3	Metilado
C	C	G	G									
G	G	C	C									
<table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table>	C	C	G	G	G	G	C	C			0	
C	C	G	G									
G	G	C	C									
<table border="1"> <tr><td>C</td><td>C</td><td>G</td><td>G</td></tr> <tr><td>G</td><td>G</td><td>C</td><td>C</td></tr> </table>	C	C	G	G	G	G	C	C			0	
C	C	G	G									
G	G	C	C									

Patrones de metilación

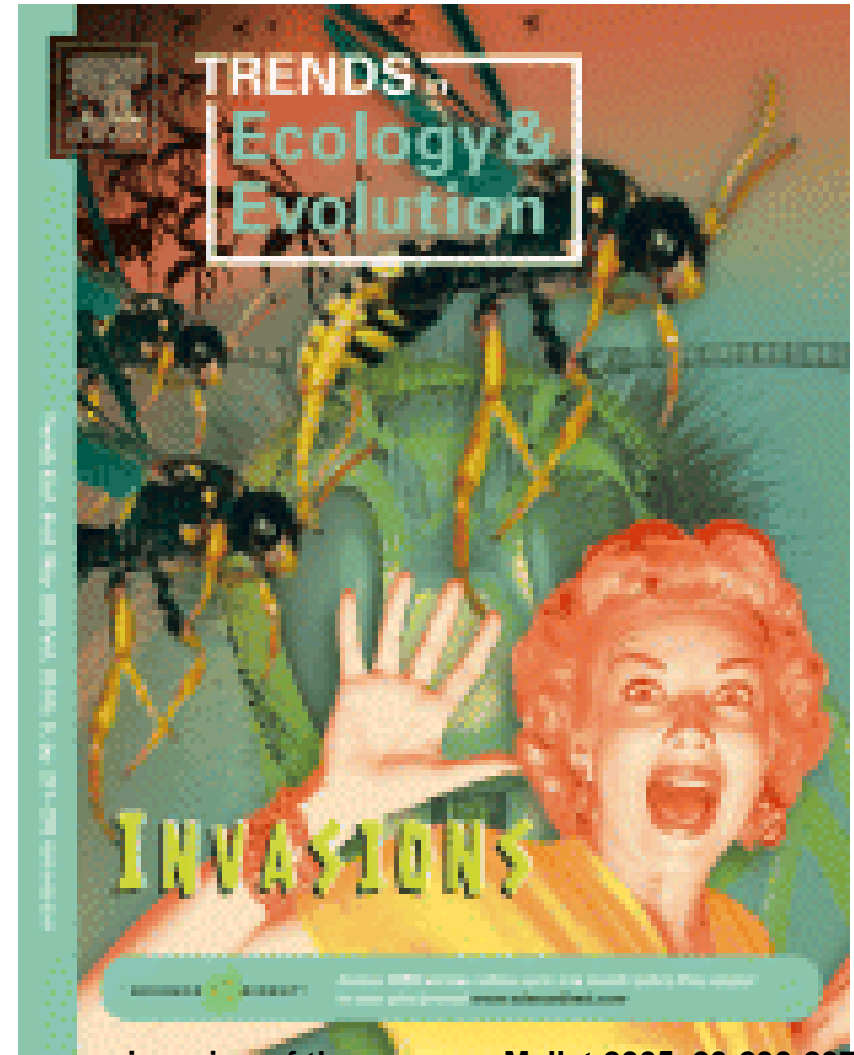
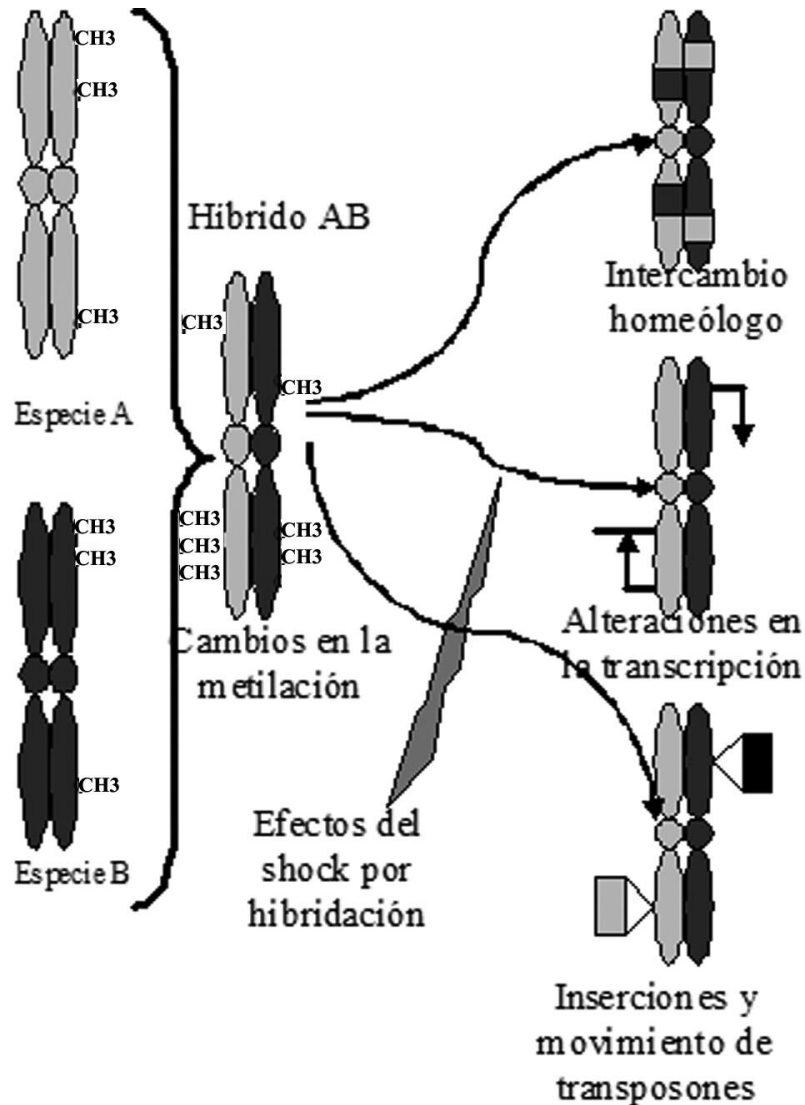



Porcentaje totales de cambios en relación a los padres → 10.6 11.3 9.2 12.9

ADN cortado con HpaII y gen de patatina como sonda



Estrés por Hibridación: Alteraciones Genéticas, Epigenéticas y Reestructuración del genoma





Variabilidad genética y epigenética en híbridos naturales de papa

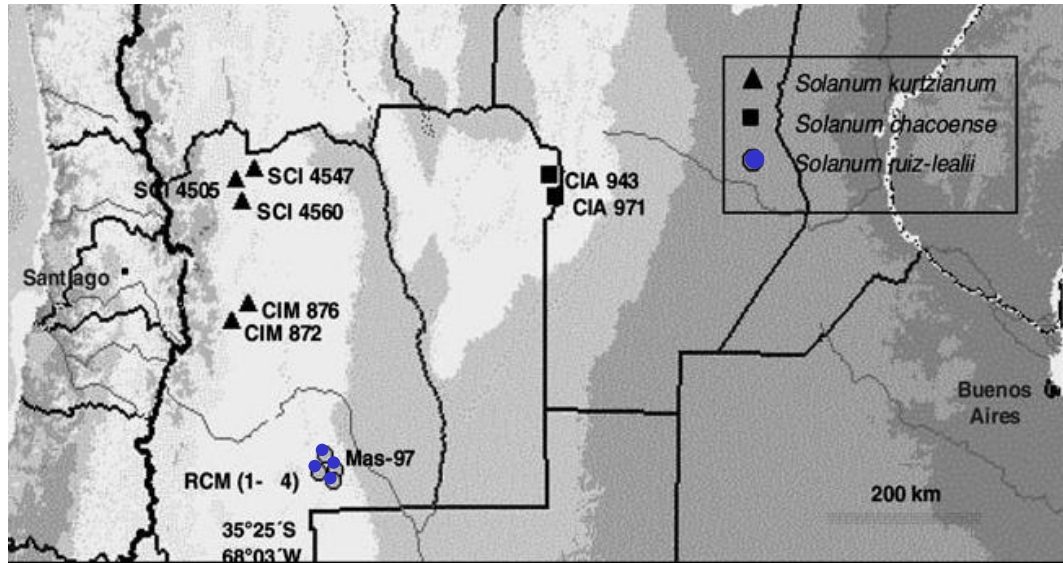
Aportes a la Epigenética de Poblaciones y a la Epigenética Ecológica

Asociando la variabilidad epigenética con el fenotipo

Solanum ruiz-lealii

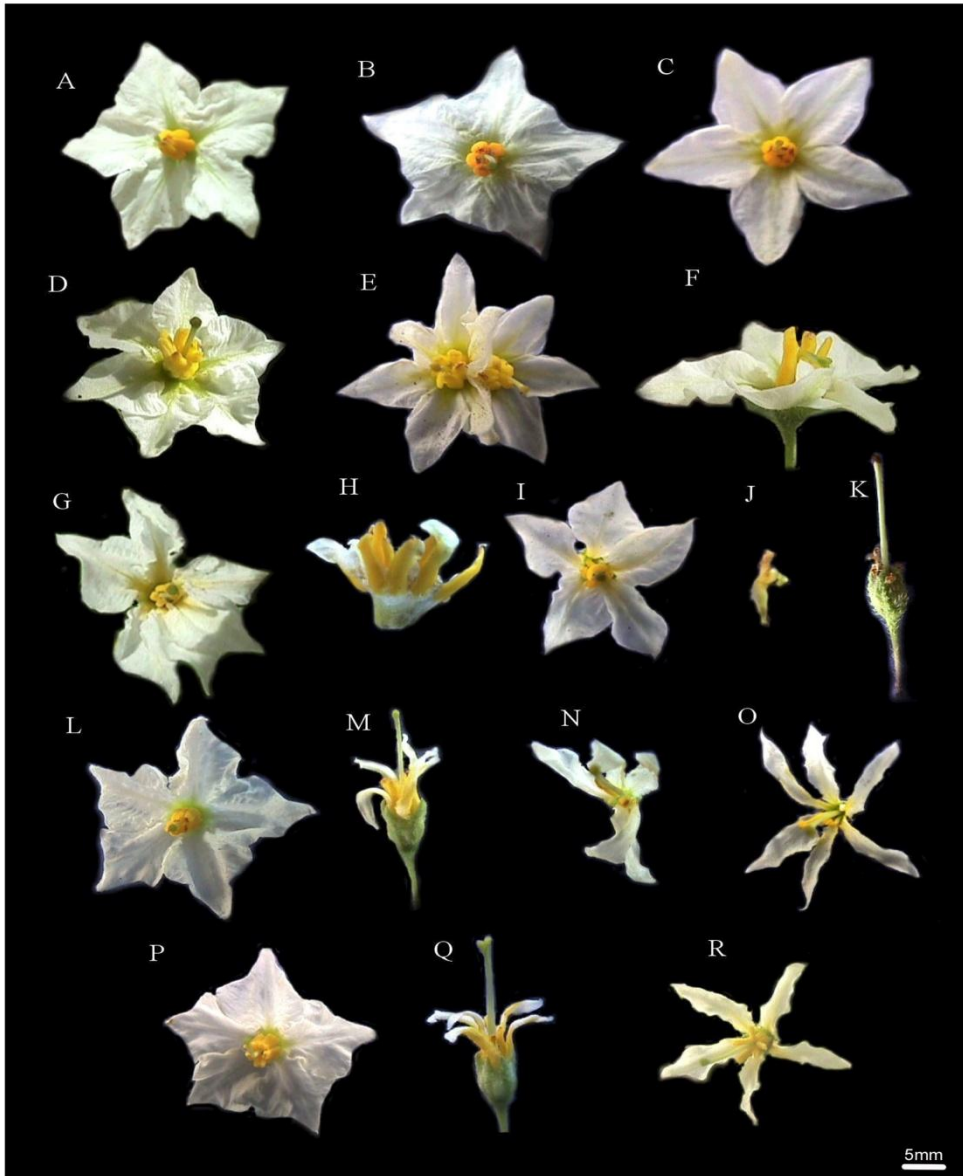
Marfil et al. 2009. Phenotypic instability and epigenetic variability in a diploid potato of hybrid origin, *Solanum ruiz-lealii*. BMC Plant Biology Feb 20, 9:21.

Solanum ruiz-lealii $2n=2x=24$



- Híbrido natural entre *S. kurtzianum* (ktz) y *S. chacoense* (chc) Hawkes y Hjerting, 1969 Raimondi et al. 2005.

Variabilidad en la morfología floral



Variabilidad genética

AFLP (*Amplified fragment-length polymorphism*)

	G19.3-a	G9-a	G2003-a	G13.2-a	G6-i	G17.1-n	GV0-n	G13.4-n
G19-a	1.0000							
G9-a	0.8953	1.0000						
G2003-a	0.8933	0.9979	1.0000					
G13_2-i	0.9089	0.8945	0.8924	1.0000				
G6-i	0.9245	0.8844	0.8822	0.8983	1.0000			
G17_1-n	0.9371	0.8912	0.8891	0.9029	0.9816	1.0000		
GV0-n	0.8548	0.8611	0.8611	0.8617	0.8575	0.8690	1.0000	
G13_4-n	0.9083	0.8940	0.8940	0.9014	0.9020	0.9130	0.8783	1.0000

Variación genética entre 1 y 15 %

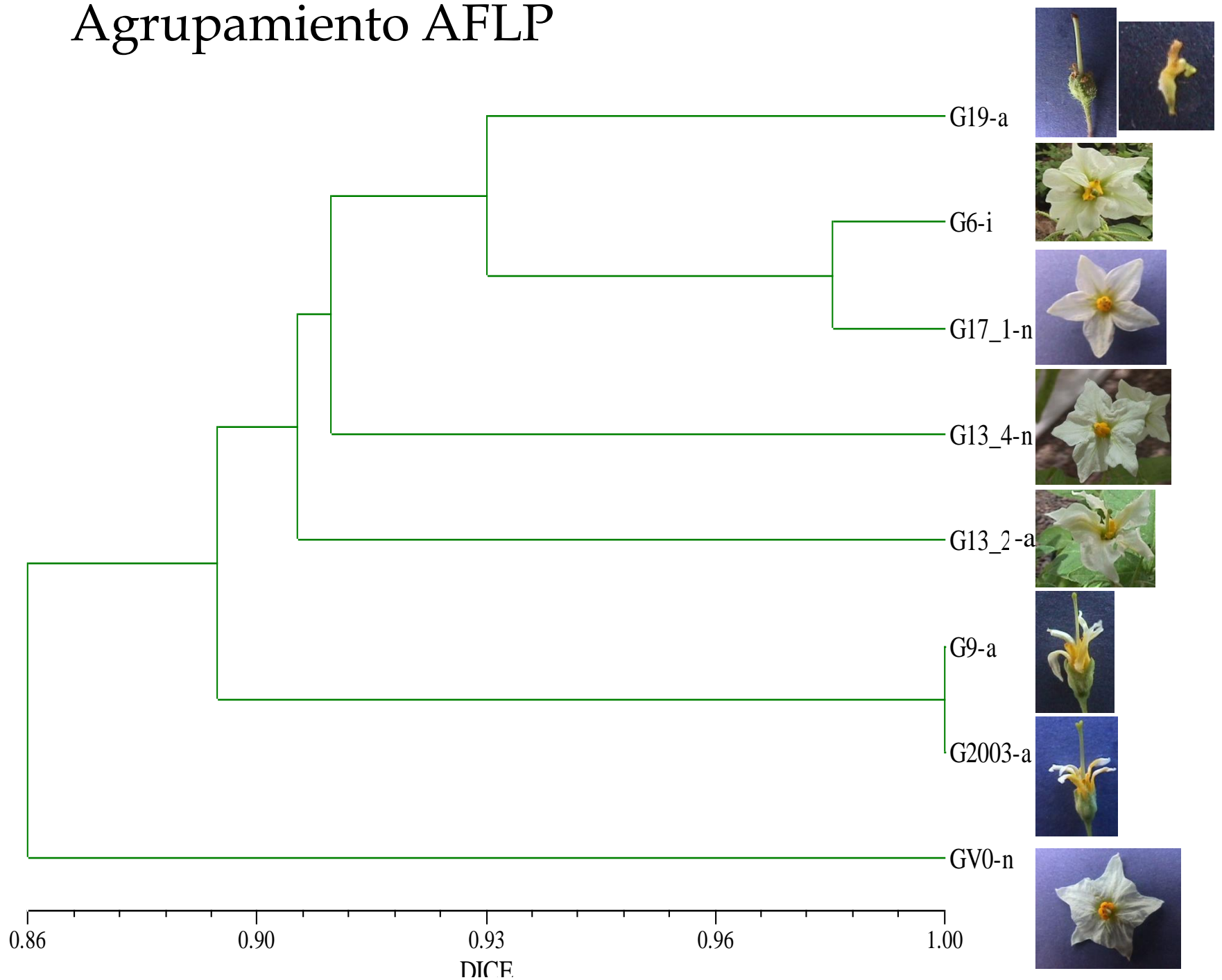
Variabilidad epigenética (metilación)

MSAP (*Methylation sensitive amplification polymorphism*)

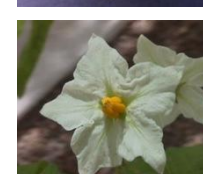
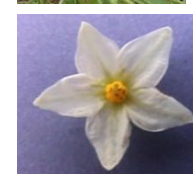
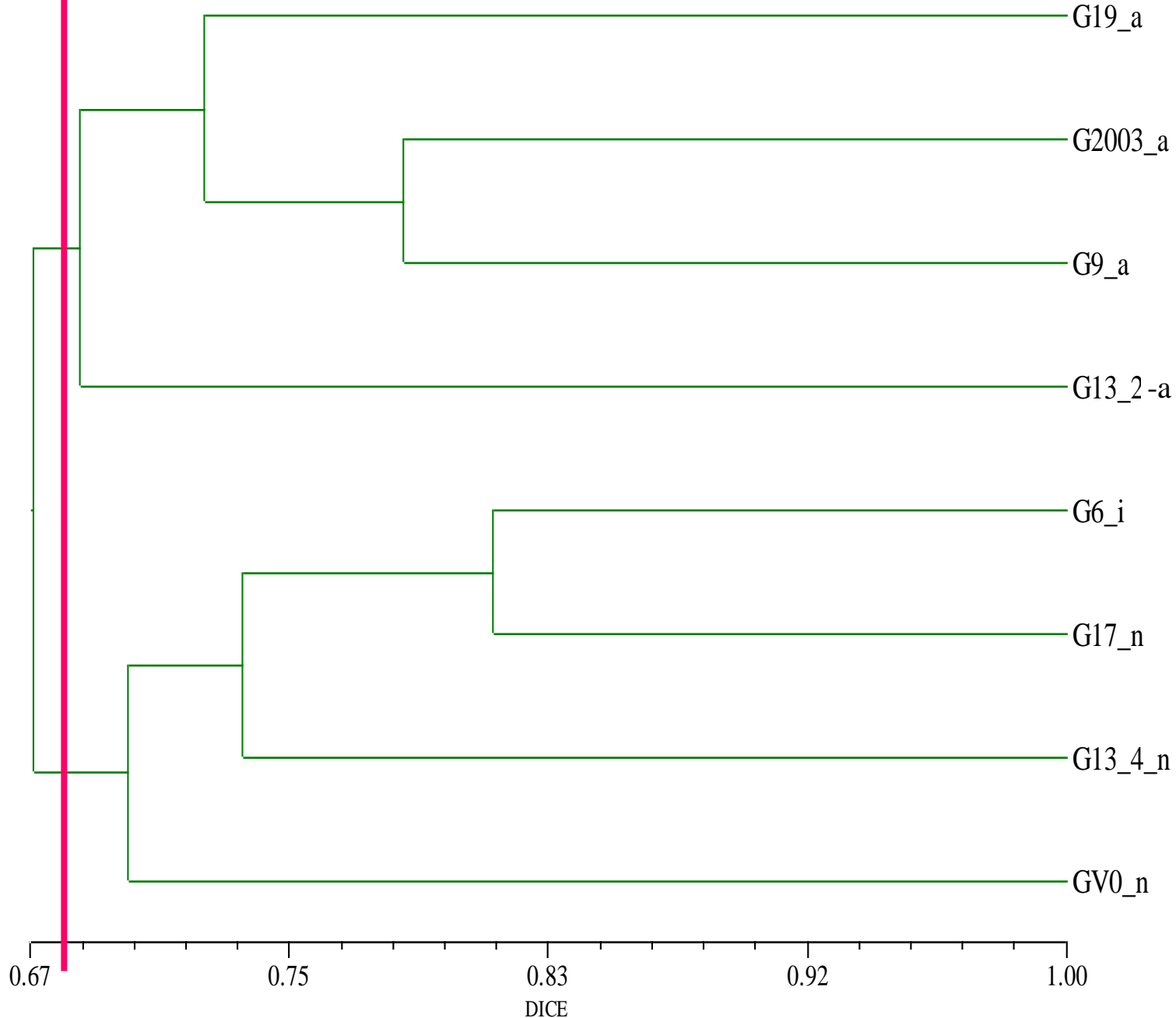
	G19-a	G9-a	G2003-a	G13.2-a	G6-i	G17.1-n	GV0-n	G13.4-n
G19-a	1.0000							
G9-a	0.7352	1.0000						
G2003-a	0.7151	0.7887	1.0000					
G13_2-i	0.6702	0.6797	0.7076	1.0000				
G6-i	0.7095	0.6989	0.6423	0.6852	1.0000			
G17_1-n	0.6992	0.6828	0.6141	0.6685	0.8172	1.0000		
GV0-n	0.6667	0.7155	0.6568	0.6082	0.7099	0.6986	1.0000	
G13_4-n	0.6904	0.6897	0.6389	0.6703	0.7639	0.7109	0.6944	1.0000

Variación epigenética entre 28 y 53 %

Agrupamiento AFLP



Agrupamiento MSAP

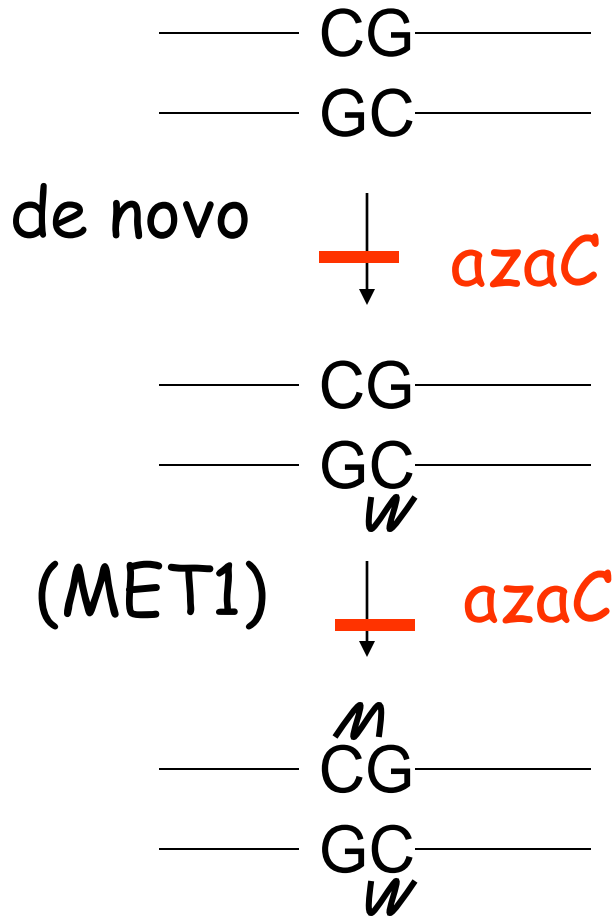


F.A

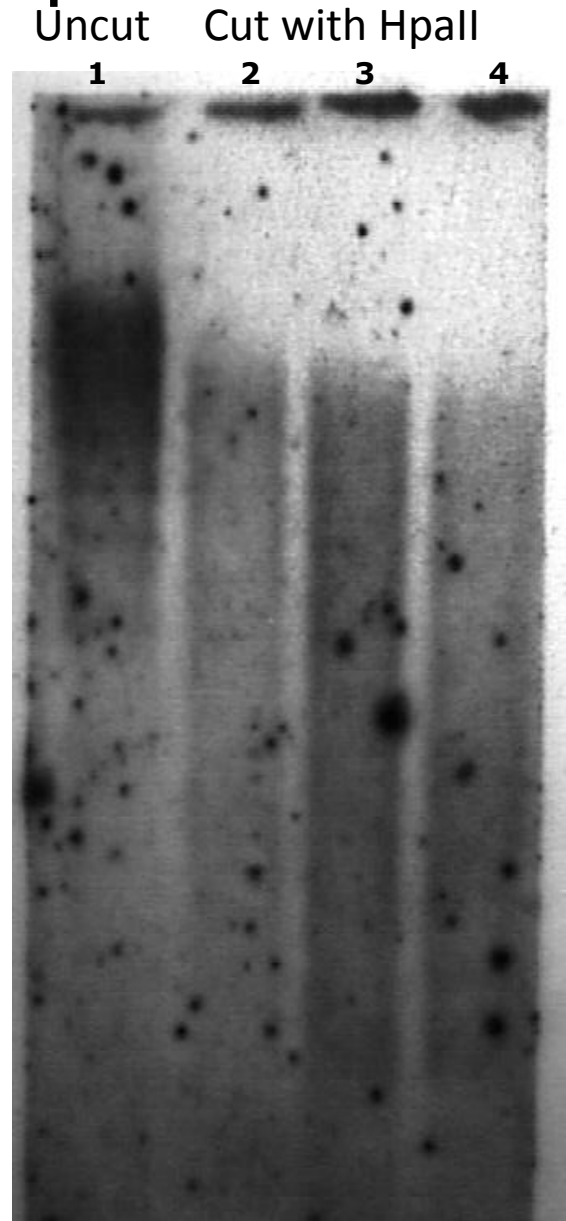
F.N

¿Es posible reproducir los cambios fenotípicos por desmetilación química?

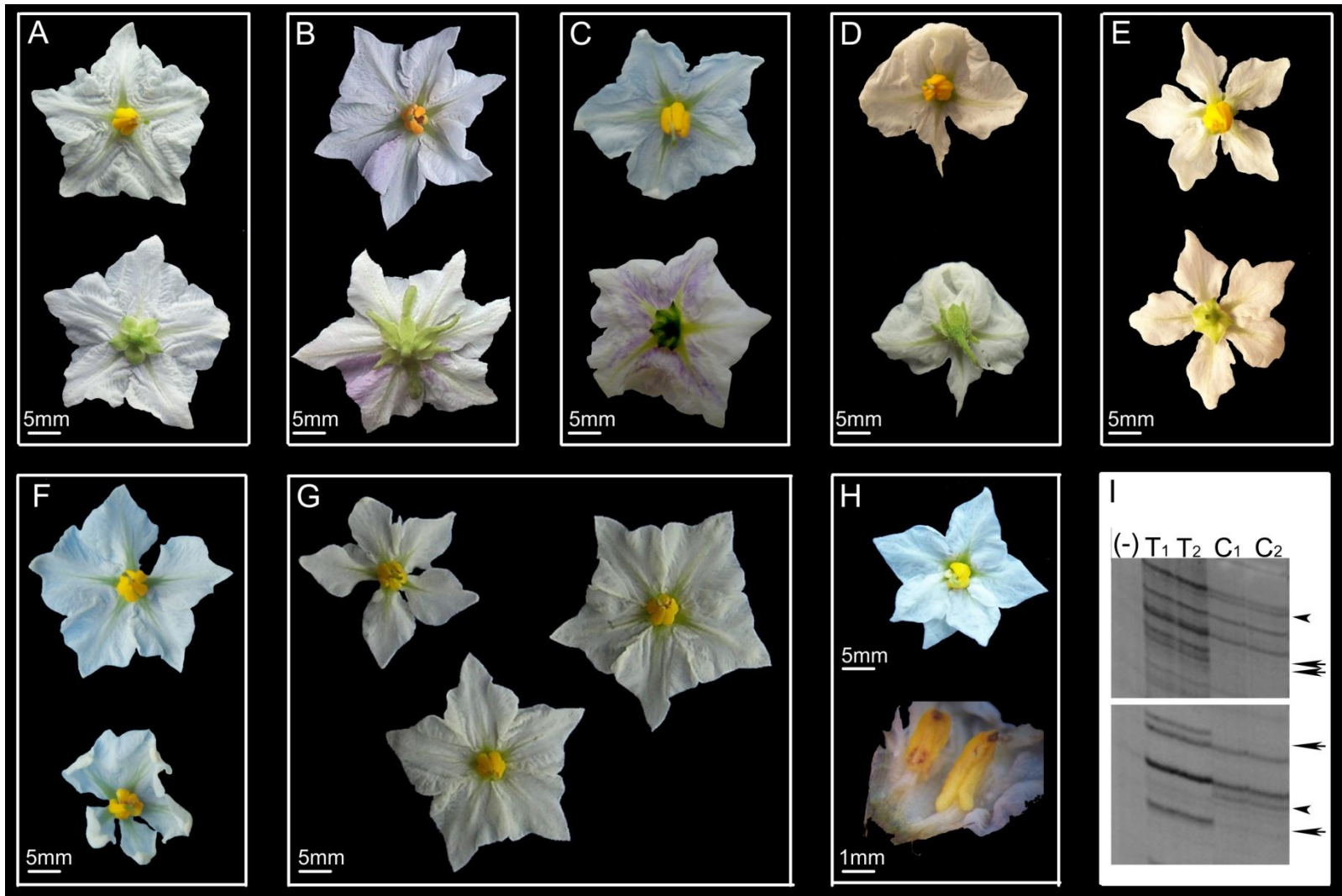
HpaII
CCGG
GGCC



Brotos de rzl
tratados con azaC
por 10 días

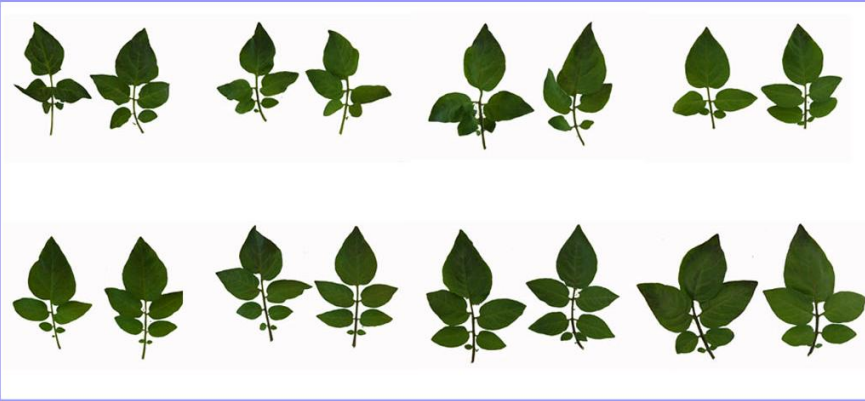


Se obtuvieron fenotipos anormales a través del tratamiento químico

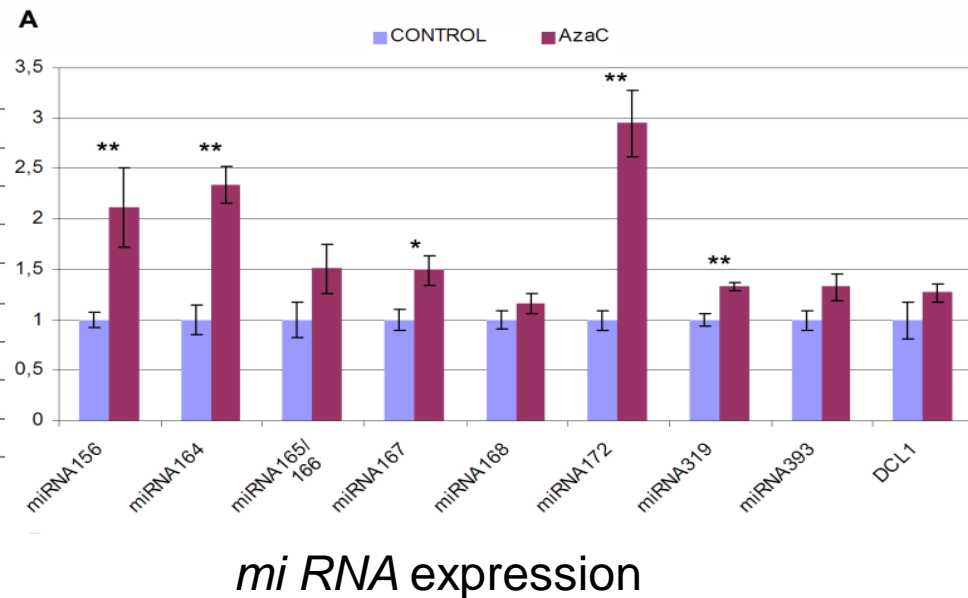
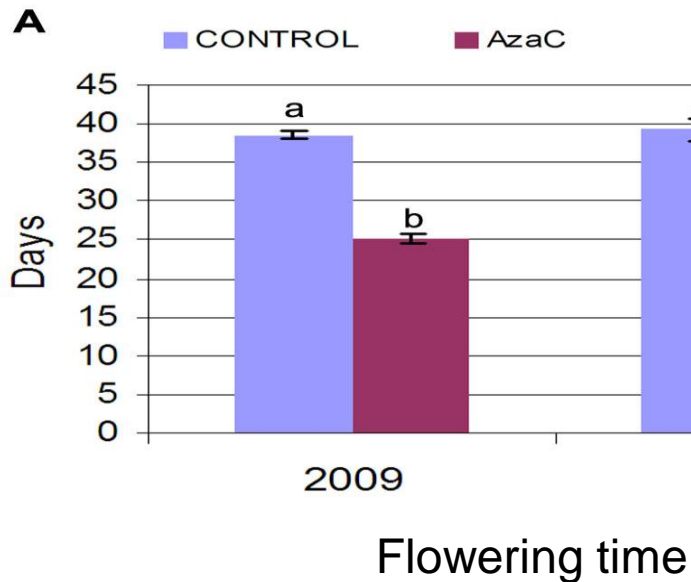
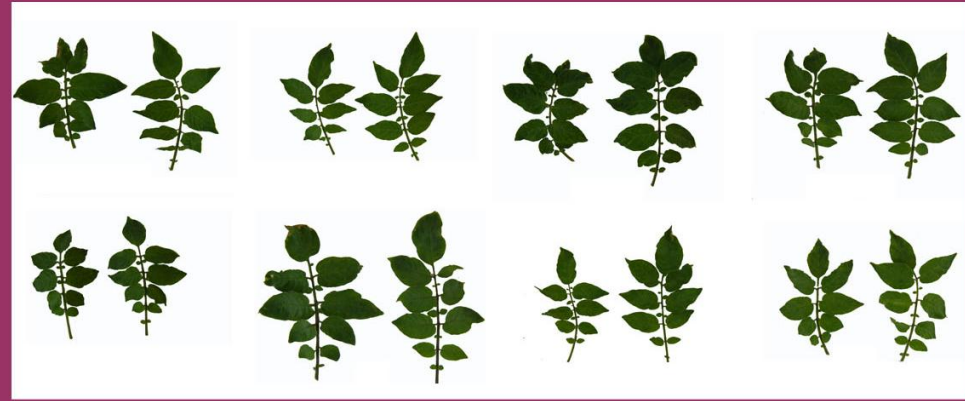


Cambios fenotípicos de importancia ecológica inducidos por tratamiento químico

CONTROL



AzaC



Conclusiones parciales

- En poblaciones naturales se observó mayor variabilidad epigenética (40%) que genética (15%).
- Se encontró asociación entre fenotipos y patrones de metilación.
- Por desmetilación química se reprodujeron los fenotipos observados en poblaciones naturales.

Importancia ecológica y evolutiva

- Los cambios en fenotipos florales y tiempo a floración tienen un impacto directo en la biología reproductiva de las poblaciones.
 - Aislamiento híbrido de poblaciones parentales.
 - Afectando la actividad de polinizadores.

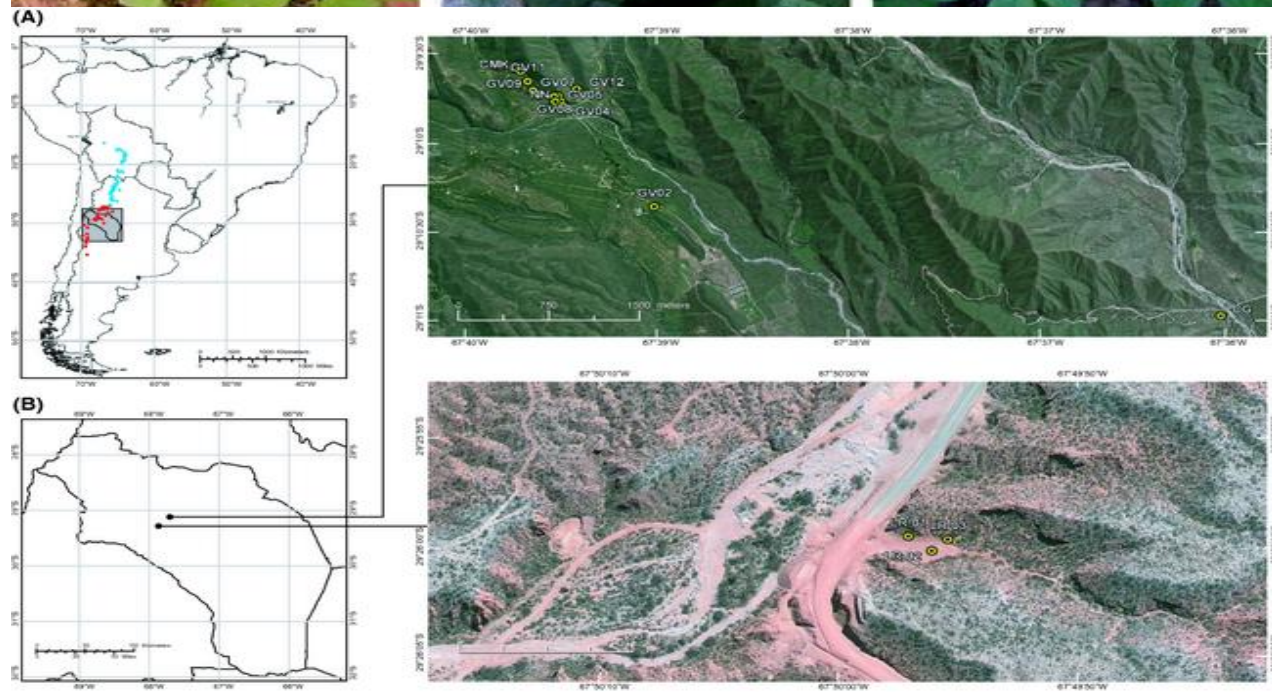


Aislamiento reproductivo

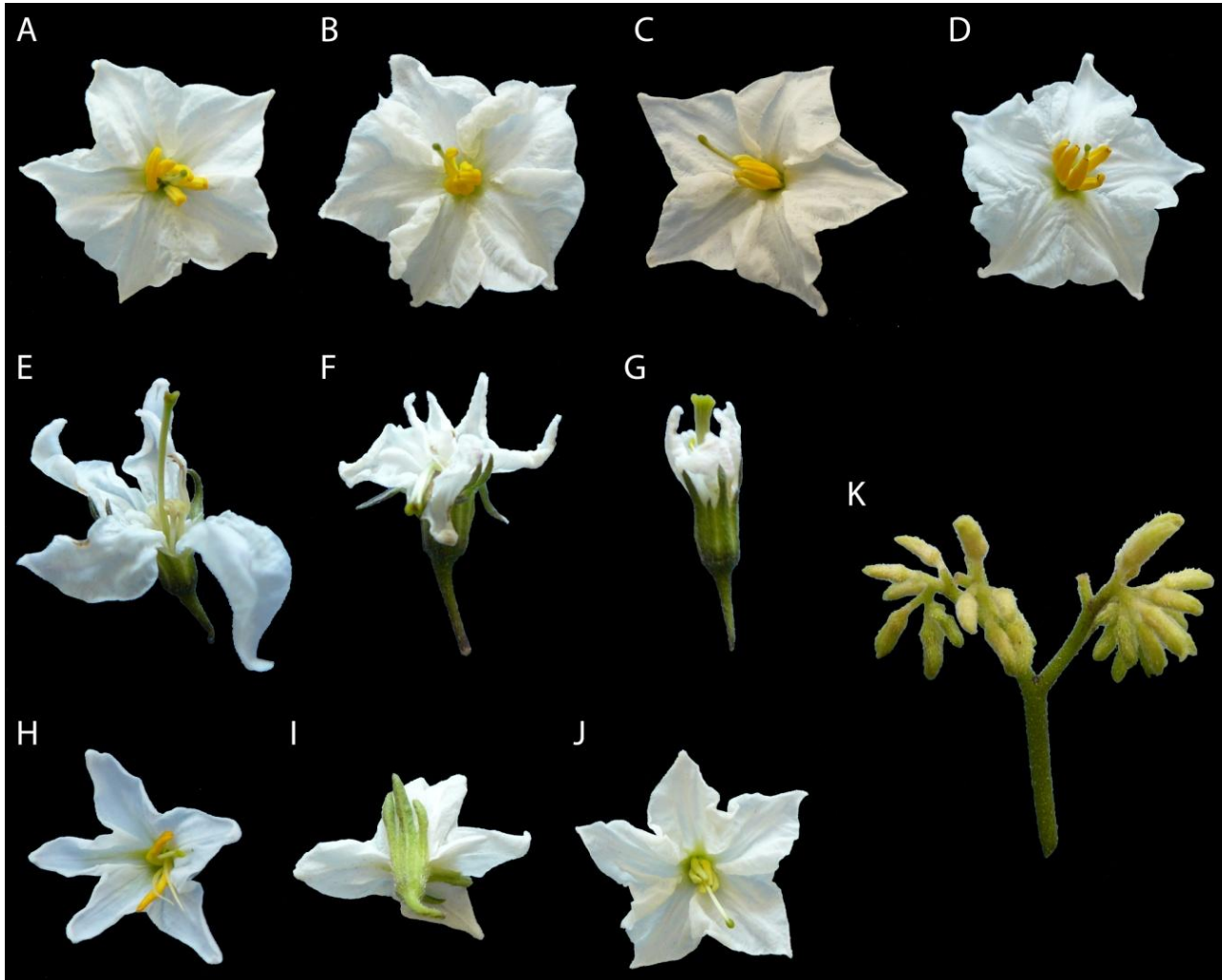
Variabilidad genética y epigenética en el híbrido natural *Solanum x rechei*

¿Cuáles son las consecuencias ecológicas de la variación
epigenética?

Distribución geográfica de las especies estudiadas

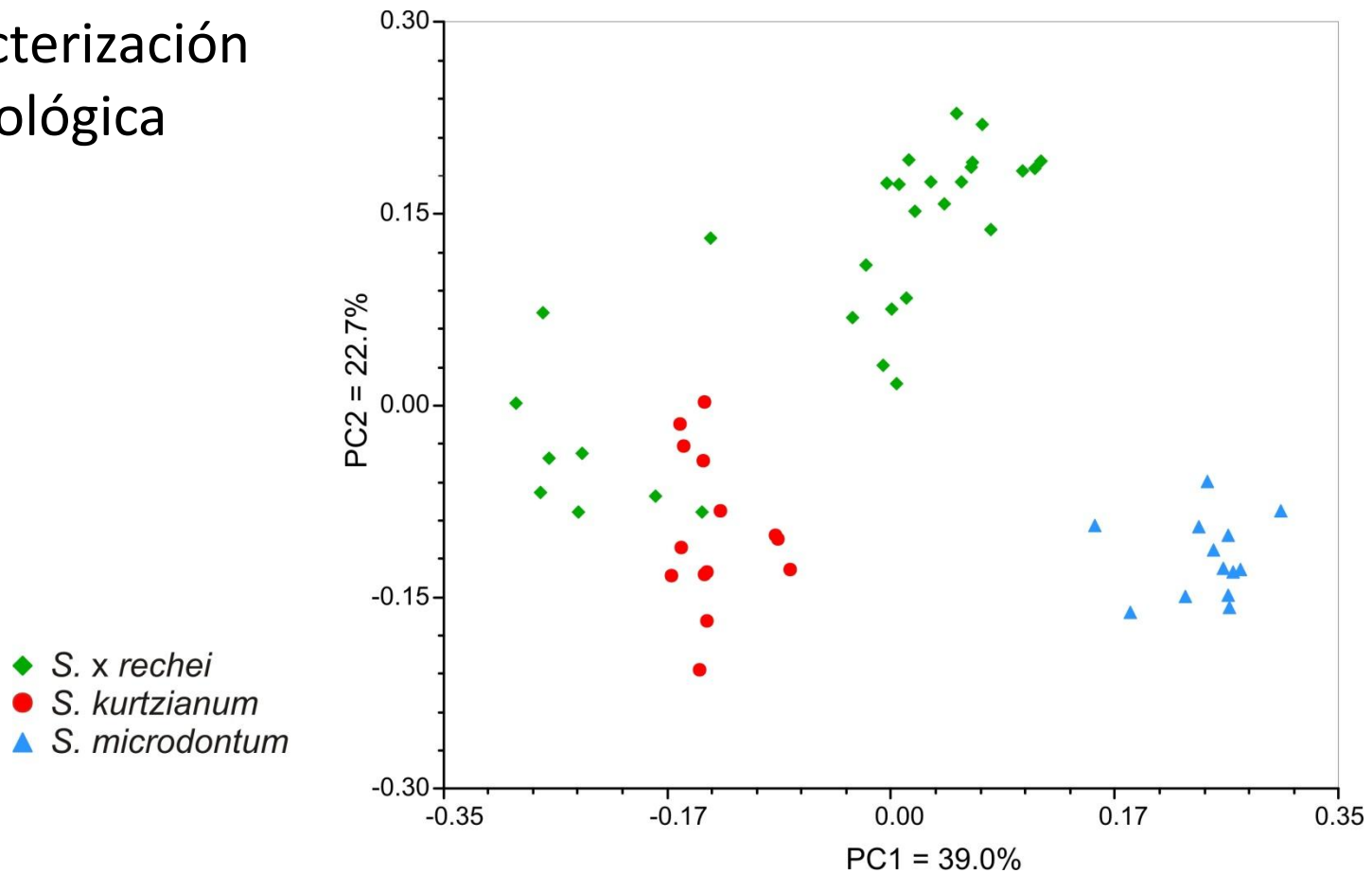


Variabilidad en la morfología floral

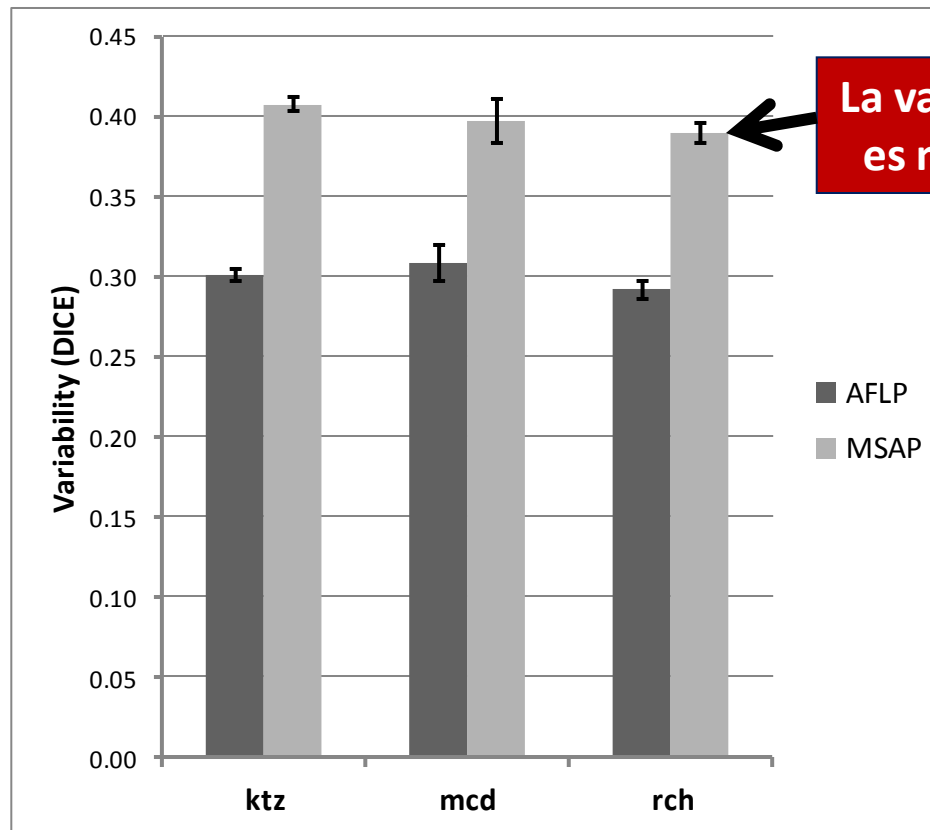


Análisis de Coordenadas Principales

Caracterización
morfológica

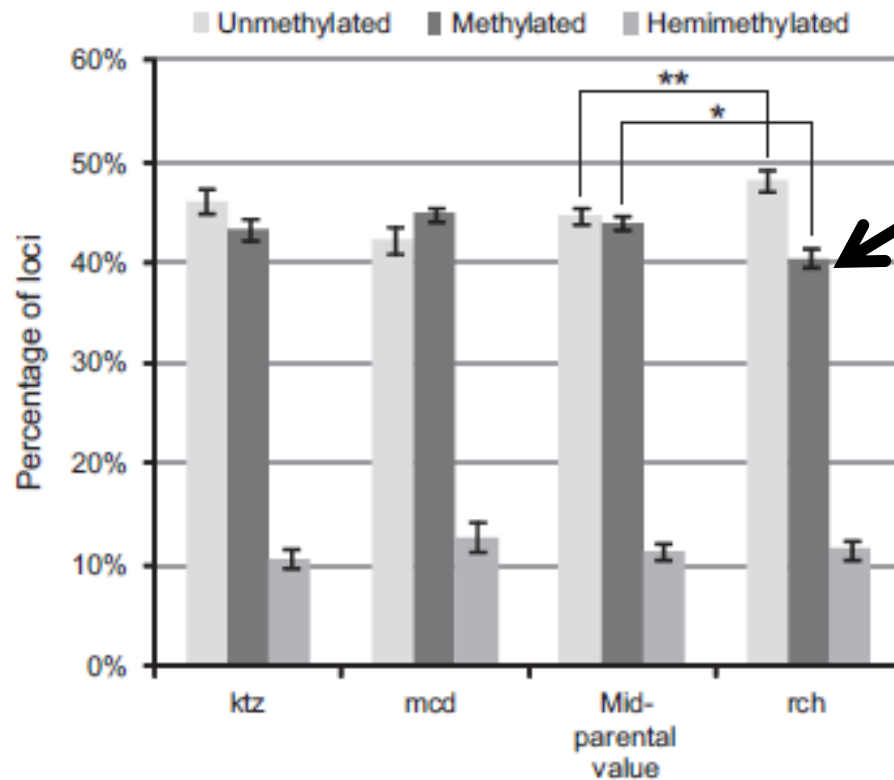


Variabilidad genética y epigenética



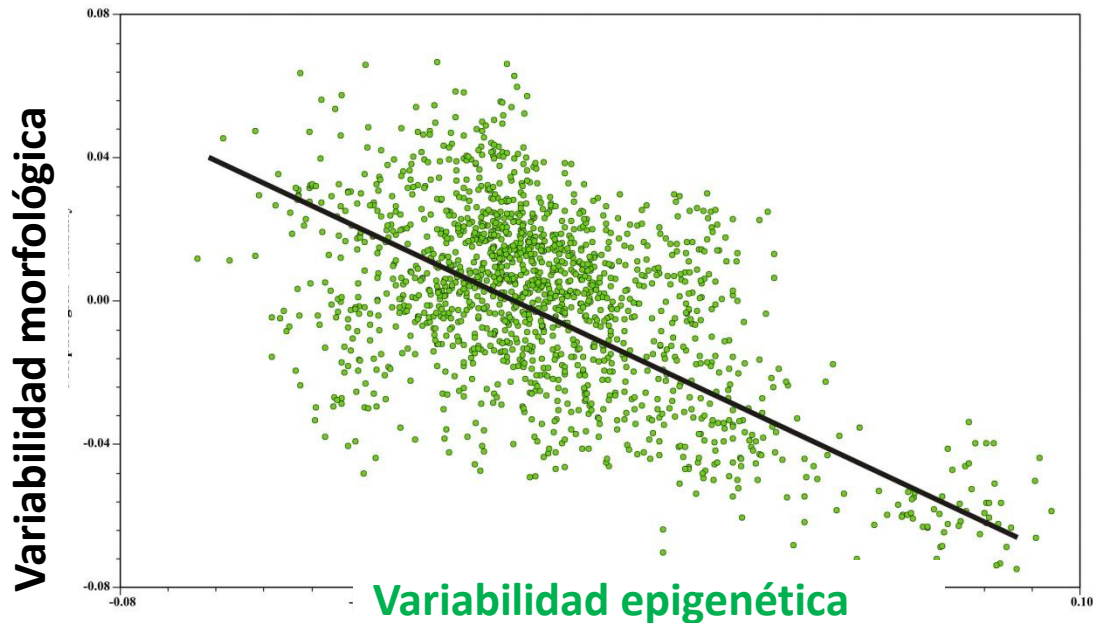
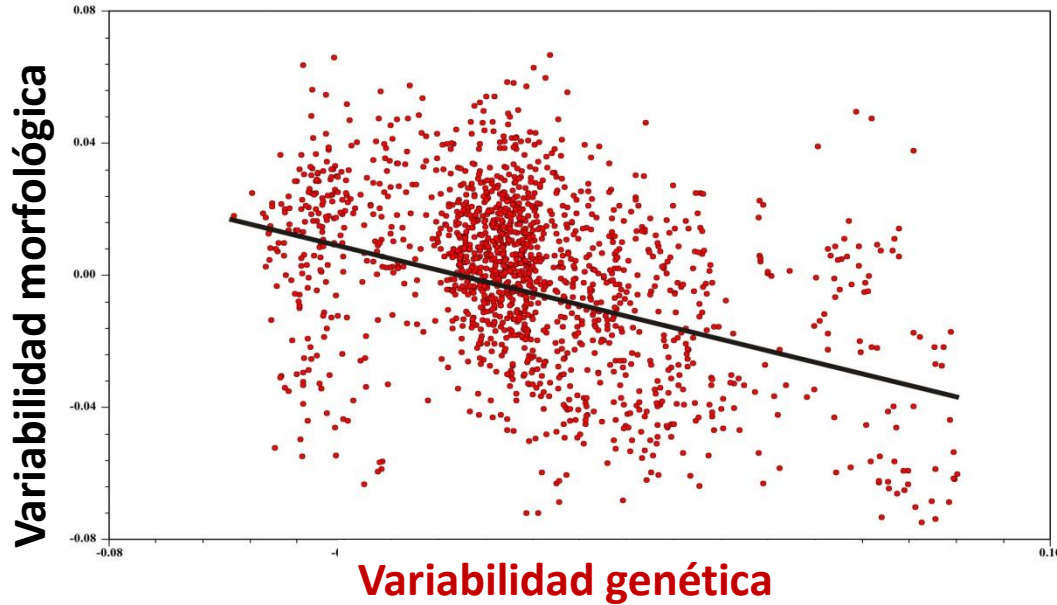
La variabilidad epigenética es mayor que la genética

Porcentaje metilación de *S. kurtzianum*, *S. microdontum* y *S. x rechei*



S. x rechei se desmetila en comparación con la media parental

Variabilidad morfológica



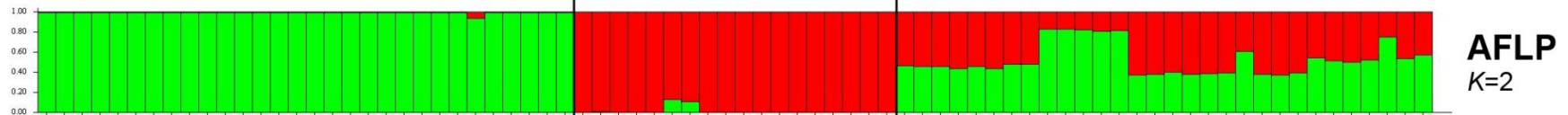
Estructura genética y epigenética del híbrido y especies parentales



S. kurtzianum

S. microdontum

S. x rechei



4505 4544 4548 4549 4552 LR CG CMK 4631 5902 GV07 CMM GV02 GV04 GV05 GV08 GV09 GV11 GV12 NN CMR

Population

Cada individuo es representado por una línea vertical dividido en K colores que simbolizan la proporción de pertenencia a cada grupo.

Los nuevos patrones epigenéticos en los híbridos podrían influir en la plasticidad fenotípica y adaptación a nuevos entornos

Solanum microdontum



Crece en las márgenes de ríos en ambientes húmedos y protegidos

Solanum kurtzianum



Crece en ambientes secos bajo arbustos



Solanum x rechei



Jardines de casas



Fincas de nogales

Okada y Hawkes 1978

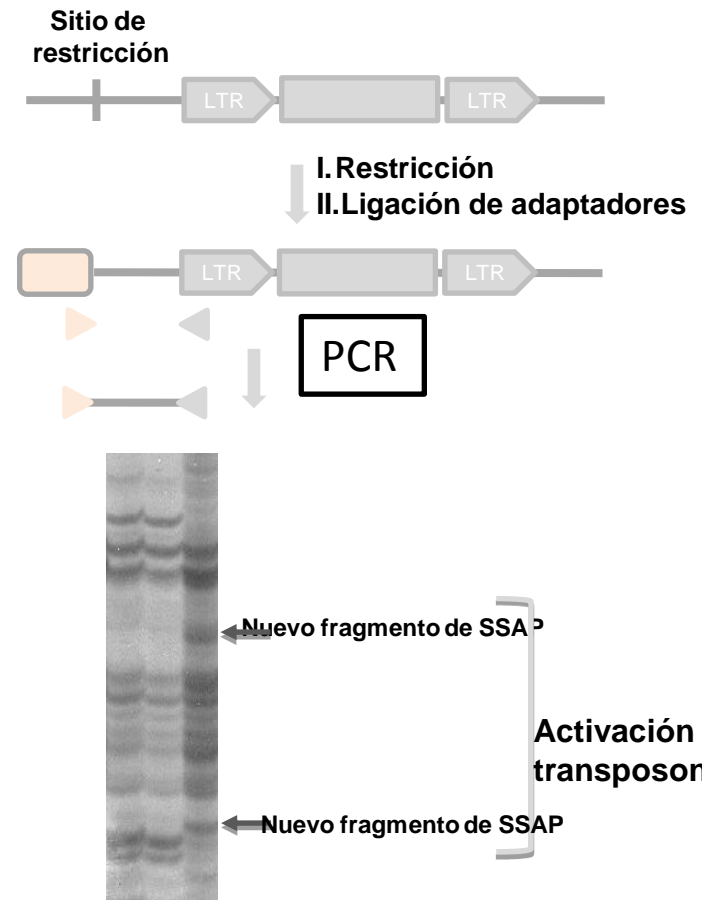
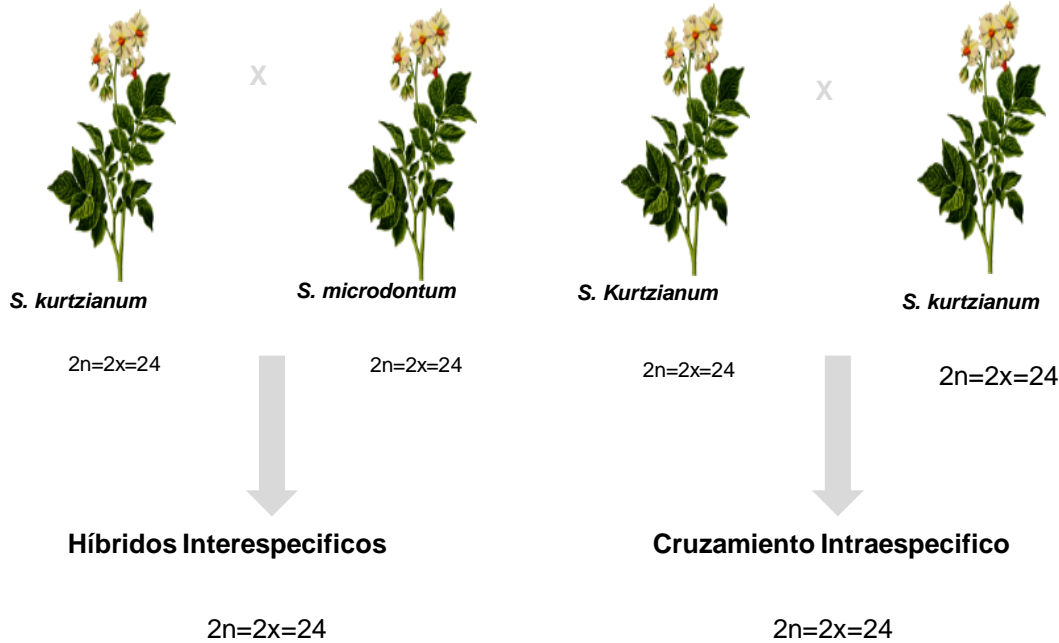
Conclusiones

- La variabilidad morfológica tiene una correlación más alta con la variabilidad epigenética que con la genética.
- En híbridos recientes rápidamente se establece un **nuevo patrón epigenético**, de importancia en la evolución de mecanismos de aislamiento reproductivo.

¿Pueden los cambios
epigenéticos influir en la
variación genética?

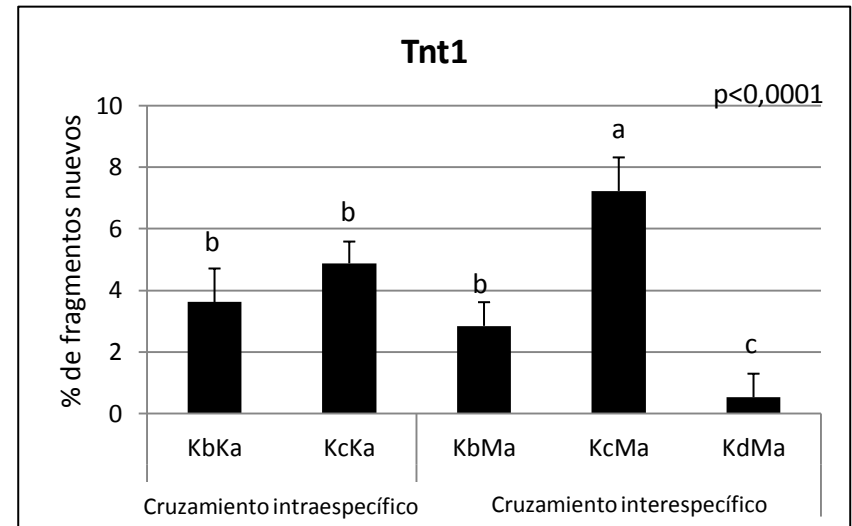
Activación de transposones y metilación en híbridos de reciente formación

Análisis de la activación de transposones por Sequence-specific amplification polymorphism (S-SAP)



Activación de transposones en híbridos de *S. kurtzianum* x *S. microdontum*

Actividad de transposones en cruzamientos inter e intraespecíficos

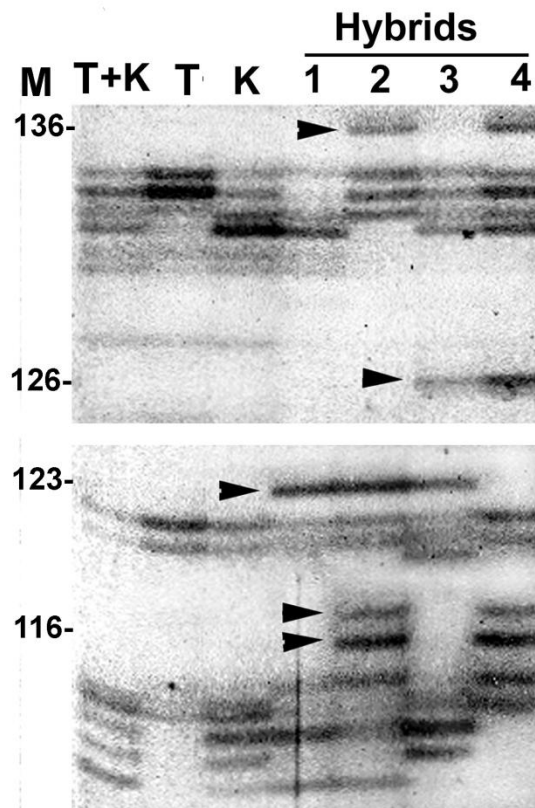


Análisis de la metilación por Transposon Methylation Display (TMD) en los híbridos

	Fragmentos nuevos	Hipermetilación	Hipometilación
Tnt1		-0,48* ($p_{0,05}=0,0365$)	0,58** ($p_{0,05}=0,0085$)
Tto1		-0,17 ($p_{0,01}=0,4306$)	0,48* ($p_{0,05}=0,0161$)

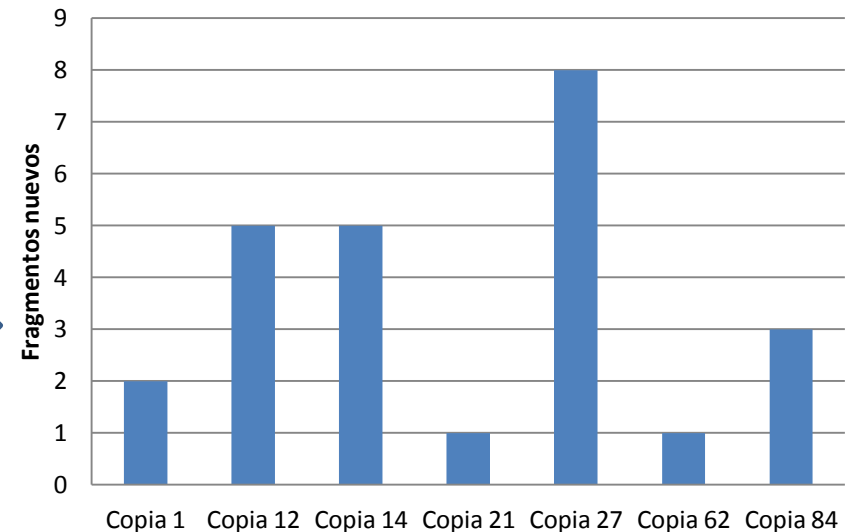
Actividad de transposones en híbridos sintéticos de *S. tuberosum* x *S. kurtzianum*

Fragmentos nuevos de AFLP



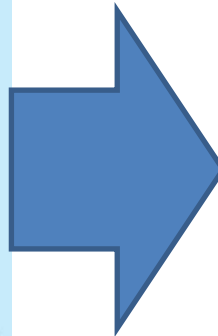
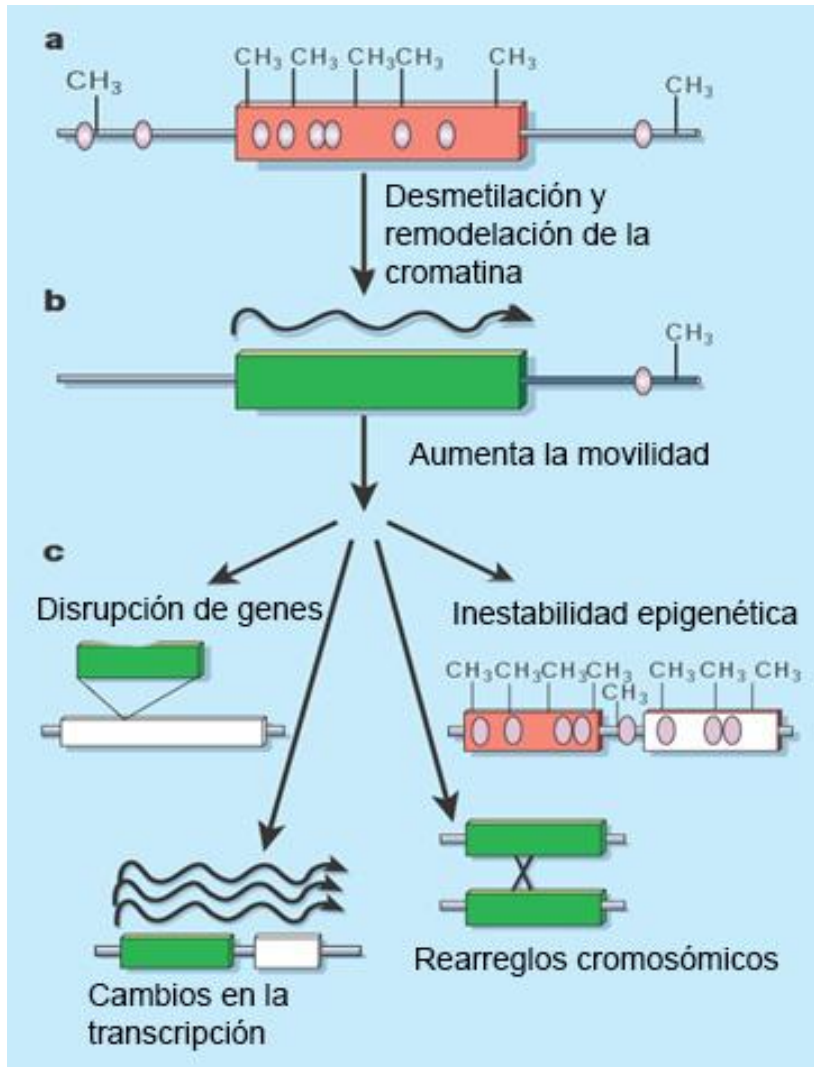
Reestructuraciones genómicas

Actividad de Transposones en el híbrido 3



Inserciones en genes específicos y en secuencias de transposones

Cambios epigenéticos y actividad de transposones en híbridos



Variación Genética

Fenotipos generados por transposones en papa

Tuberización en días largos
StCDF1
(Hardigan et al. 2017)

Cambios en el color del tubérculo
(Momose et al. 2010)

Cruzamientos Interploides

¿La aneuploidía altera la metilación?

Híbridos aneuploides

Cruzamientos interploides

S. microdontum $2n=3x=36$ × *S. kurtzianum* $2n=2x=24$

Híbrido interploide

Naturales (rch)

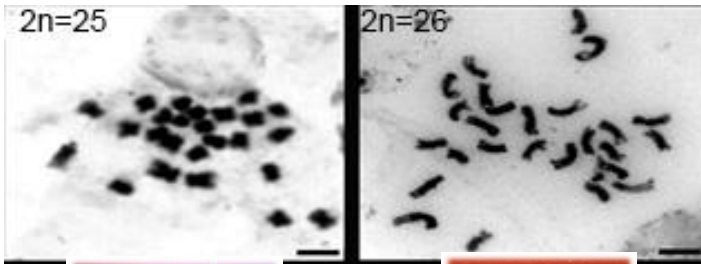
$2n=2x=24$

$2n=2x+1=25$

Sintéticos

$2n=2x+2=26$

$2n=2x+3=27$

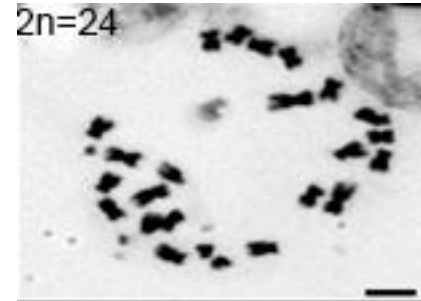


Cruzamientos intraploides

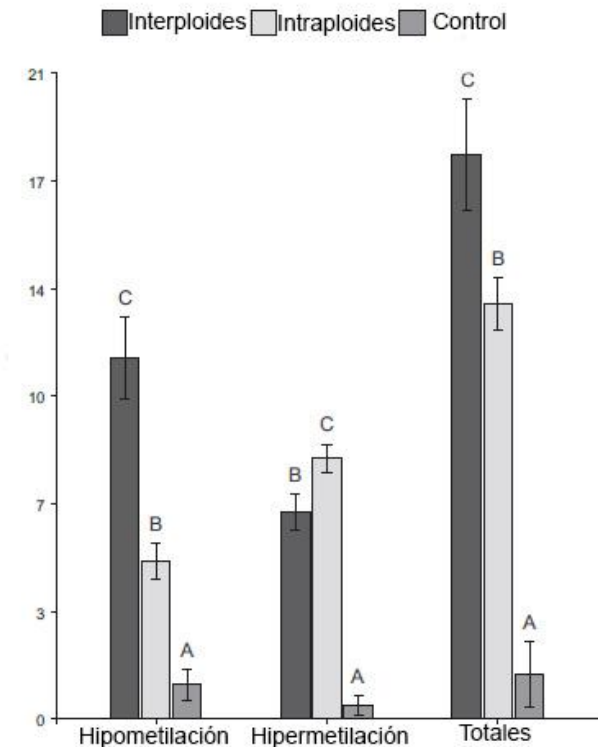
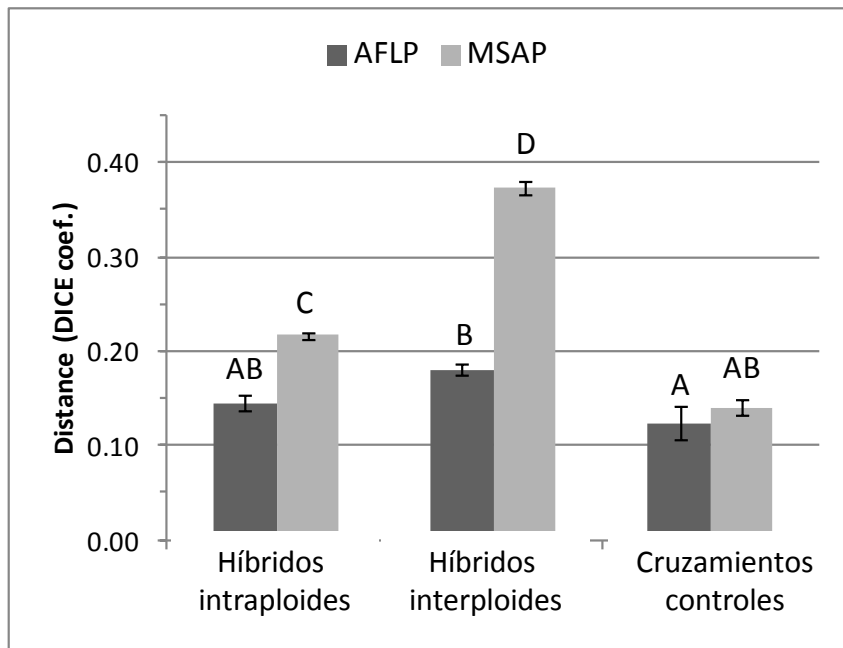
S. microdontum $2n=2x=24$ × *S. kurtzianum* $2n=2x=24$

Híbrido intraploide

$2n=2x=24$



Cambios en la metilación y reestructuraciones genómicas

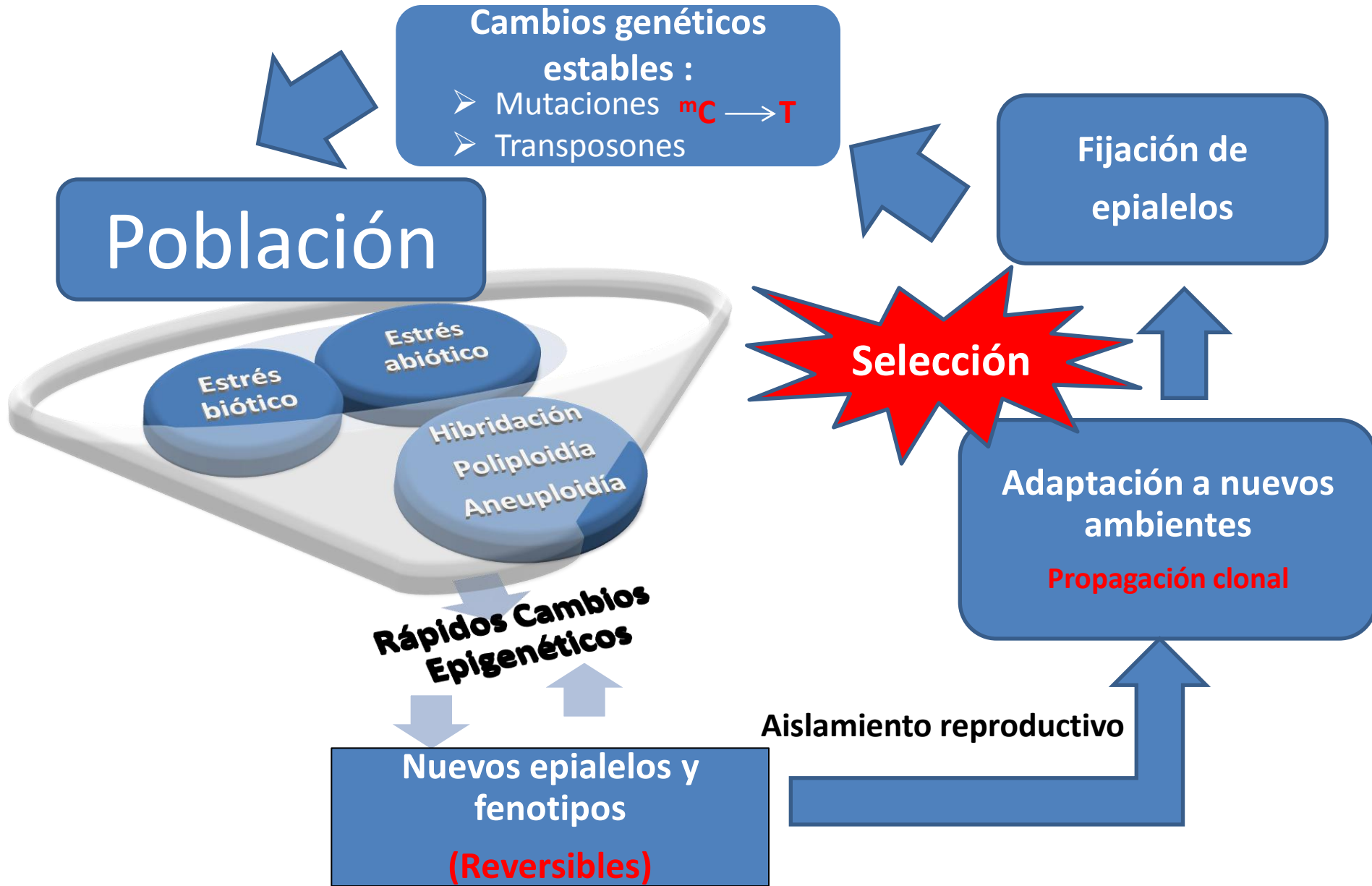


La variabilidad epigenética es mayor que la genética

Fragmentos nuevos:

- AFLP 4-17%
- MSAP 29,5 – 47,9%

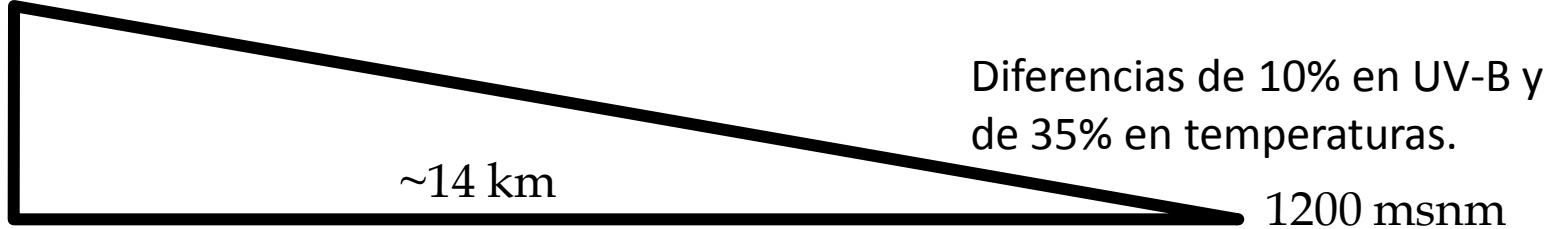
Epigenética y evolución en *Solanum*



Perspectivas

Jardines experimentales establecidos en ambientes contrastantes, Villavicencio, Mendoza. Las plantas creciendo en microambientes contrastantes podrían divergir epigenéticamente.

2200 msnm



Ibañez et al. 2017 Plant Science

Reconocimientos

- Grupos de Biología Molecular y Recursos Genéticos (IBAM-FCA)

- Carlos Marfil
- Nicolás Cara
- Verónica Ibañez
- Magdalena Gantuz
- Victoria Bertoldi
- Laura Mitjans
- Carolina Kozub
- Nicolás Jerez



- INTA: Elsa Camadro y Sebastián Asurmendi

- Financiamiento:

- Agencia de Promoción Científica y Técnica
- Secretaría de Ciencia y Técnica de la UN Cuyo
- CONICET



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

I B A M

¡Muchas Gracias!