II Congreso Internacional de Ciencias Agropecuarias para la SOBERANÍA ALIMENTARIA

13 al 15 de NOVIEMBRE 2019

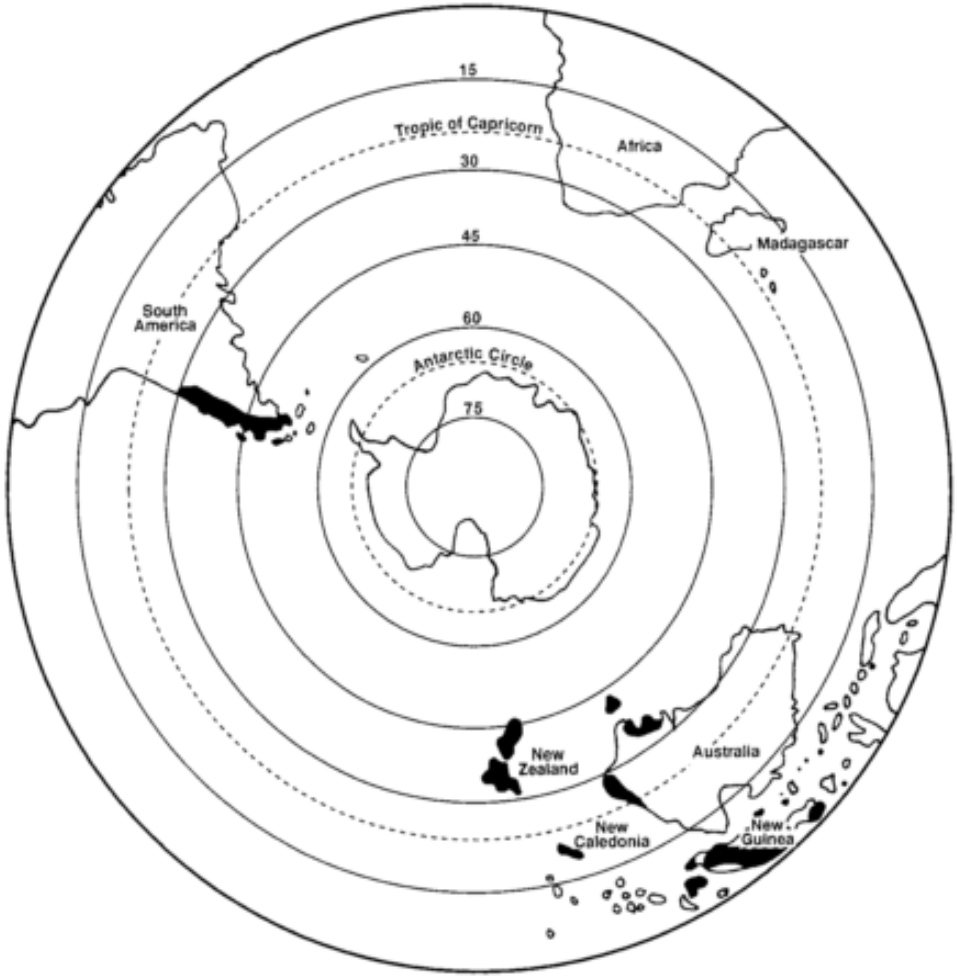
Con el Aval de:

Identificación y análisis de expresión de genes candidatos asociados a la autoincompatibilidad y su relación con el cruzamiento interespecífico: el caso de *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus alpina*

Marlene Molina-Müller y Santiago C. Vásquez

Contacto: Dra. Marlene Molina Müller *PhD*
marlene.molina@unl.edu.ec

Género *Nothofagus*



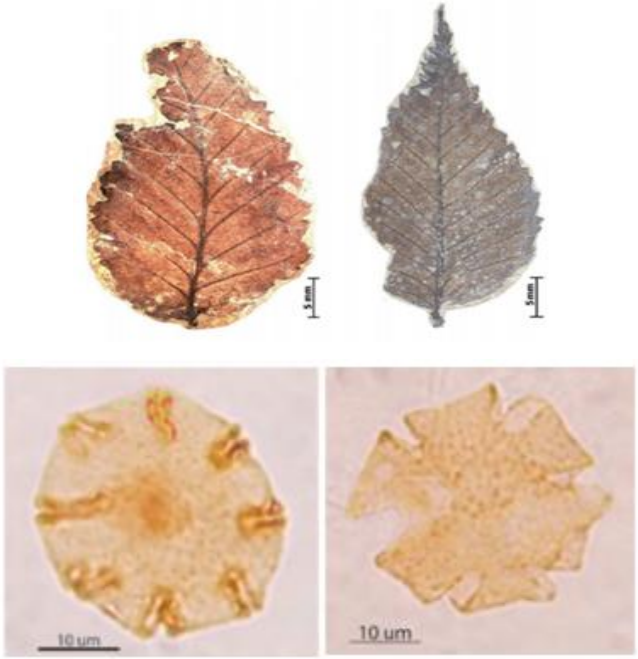


Figura 2: Macrofósiles y microfósiles de *Nothofagus* (Mod. Hinojosa *et al.*, 2015).

Familia: Nothofagaceae
Orden: Fagales

Figura 1: Distribución de especies del género *Nothofagus* (Manos, 1997).

(Hill y Jordan, 1993; Harden, 2000; Moreira - Muñoz, 2011; Heenan y Smissen, 2013).

Nothofagus obliqua y Nothofagus alpina

*Nothofagus obliqua (*Mirb.) Oerst.

"Roble"

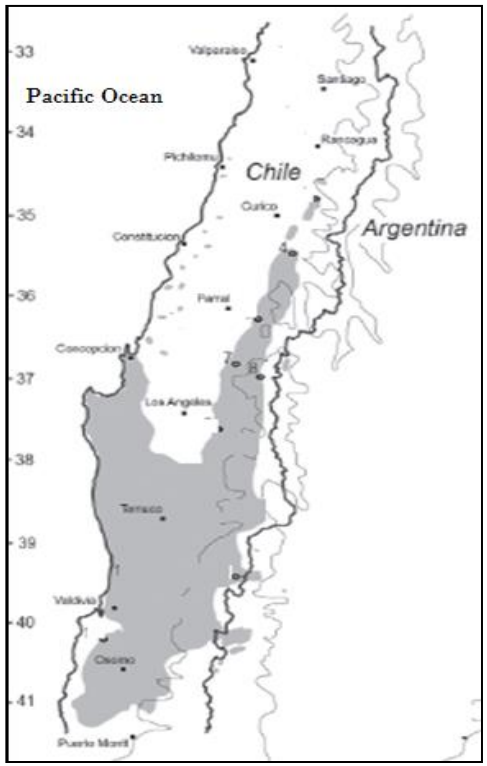
Nothofagus alpina (Poepp. & Endl.)Oerst.

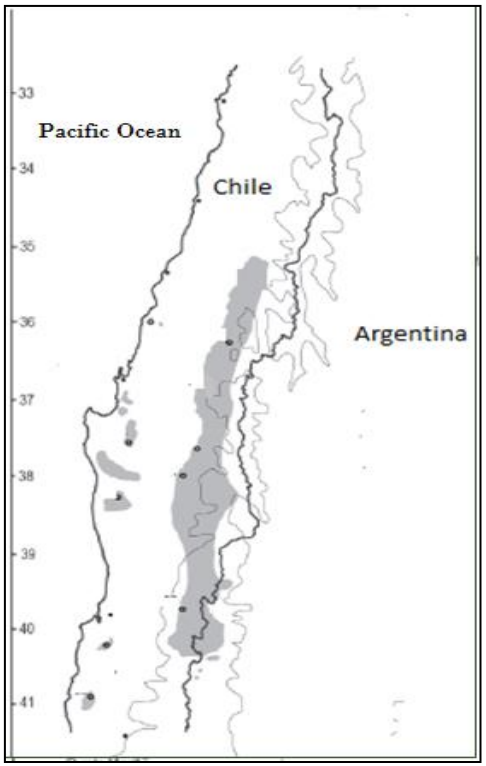
Sinónimos

Nothofagus procera Oerst.

Nothofagus nervosa (Phil) Krasser

"Raulí"





Zonas de simpatría

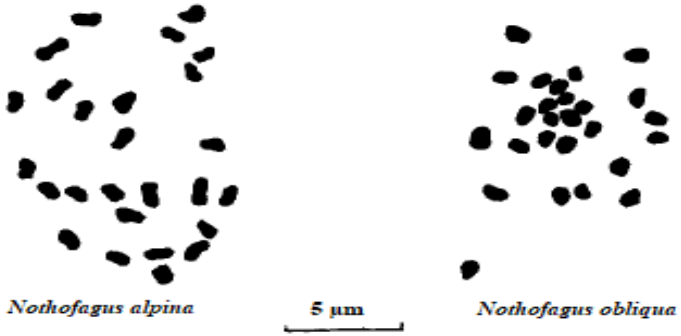
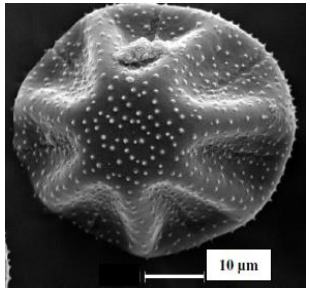


Figura 3: Cariotipo de *Nothofagus alpina* y *Nothofagus obliqua* (Mod. de Ono, 1977).



- Caducas
- Hojas simples
- Diclino monoicas
- Lophozonia
- Época de floración

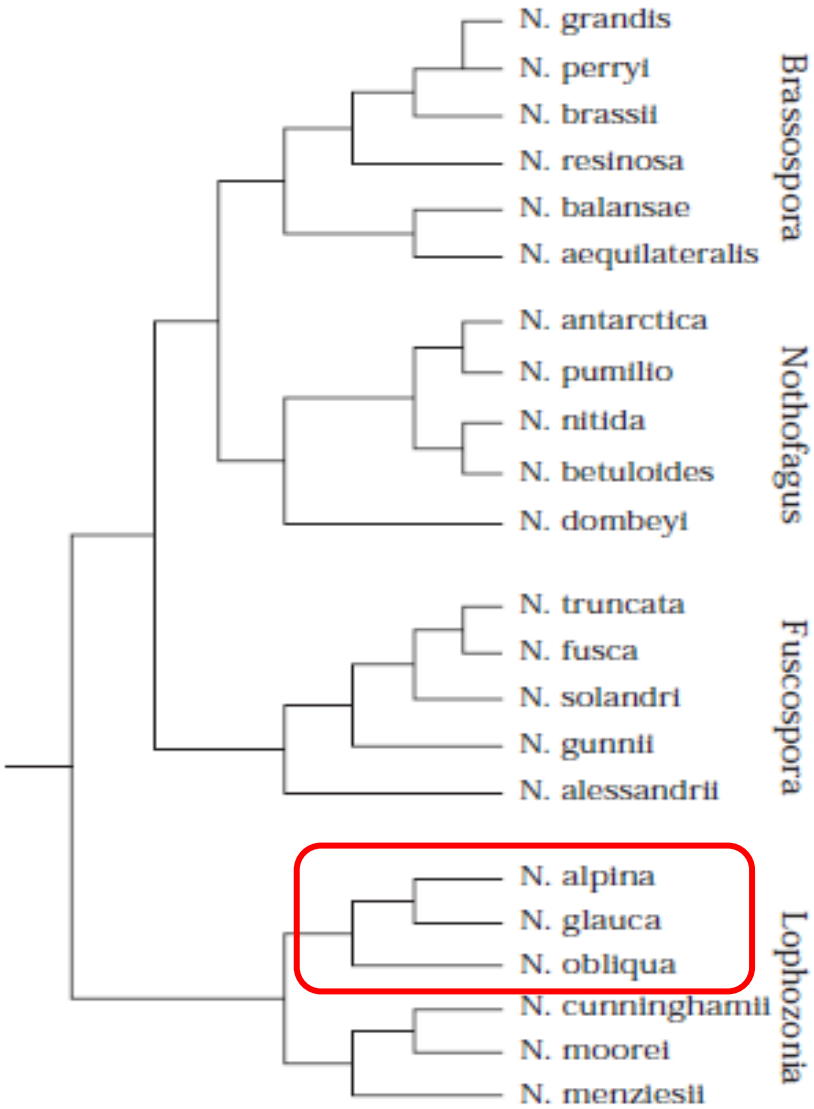


Figura 4: Relaciones filogenéticas de especies de la familia Nothofagaceae (Manos, 1997).

Hibridación

Aspectos reproductivos involucrados en el cruzamiento interespecífico entre *N. obliqua* y *N. alpina*

Nothofagus obliqua

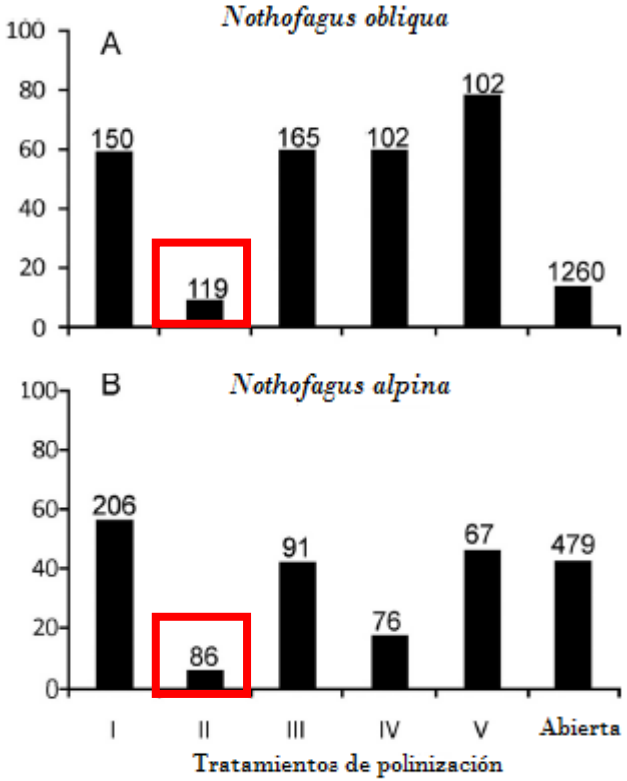
- ✓ Diclino-monoicas
- ✓ Anemófilas
- ✓ Alógamas
- ✓ Dicogamia protándrica
- ✓ Autoincompatibilidad

Nothofagus alpina

Tabla 1: Resultado de tres experiment

Especie	Test	N° de semillas	Semillas por fruto
N. obliqua	Autopoliniza	6	0.016
	Polinización	266	0.351
	Espontánea	132	0.084

Modificado de Riveros *et al.*(1995)



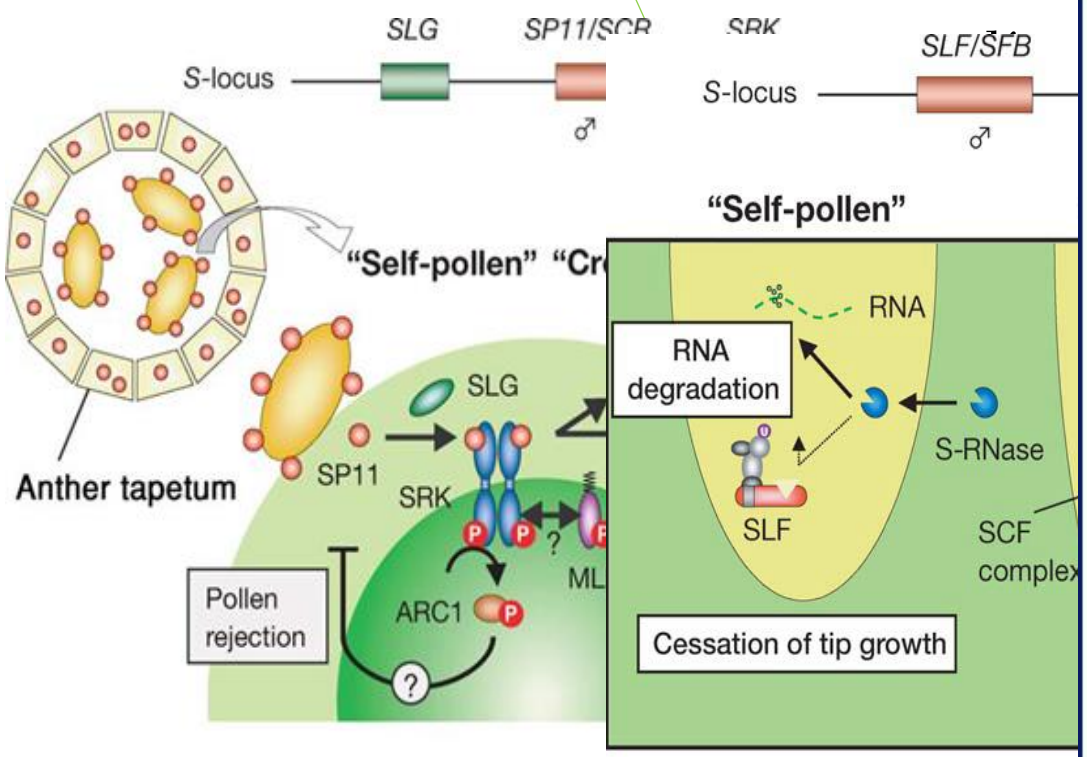
I: P. cruzada
II: Autopolinización
III: P. cruzada…..Autopolinización
IV: Autopolinización…..P. cruzada
V: P. cruzada + Autopolinización

Modificado de Torres y Puntieri (2013)

(Riveros *et al.*, 1995; Marchielli *et al.*, 1998; Torres y Puntieri, 2013; García, 2014).

Autoincompatibilidad

- Homomórfica
  - Esporofítica (Brassicaceae)
  - Gametofítica (Papaveraceae) → Auto/ no auto reconocimiento
- Heteromórfica



(Seavey y Bawa, 1986; Kao y Tsukamoto, 2004; Takayama e Isogai, 2005; Iwano y Takayama, 2012; Chen *et al.*, 2012; Gibbs, 2014; Sawada *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016)

Autoincompatibilidad e hibridación

Rorippa austriaca

Rorippa sylvestris

Rorippa amphibia

Rorippa palustris

(Bleeker, 2007)

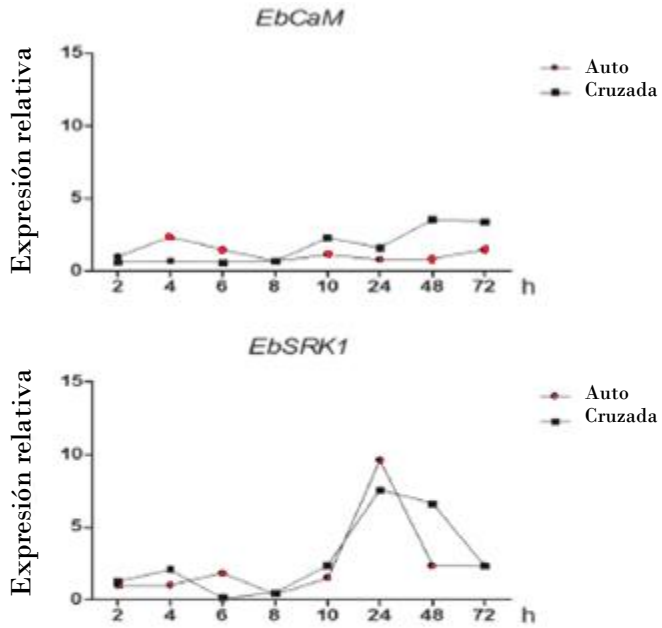
Leptosiphon androsaceus
SI

Leptosiphon jepsonii
SC

(Lewis y Crowe, 1958; Onus y Pickersgill, 2004; Goodwillie y Ness, 2013; Baeck *et al.*, 2015)

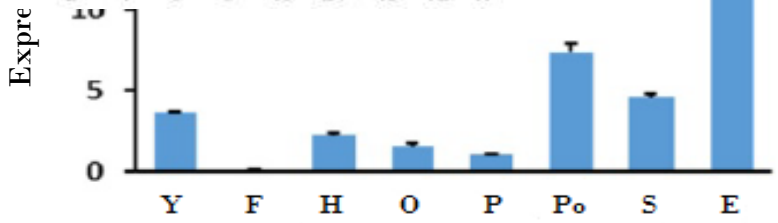
En búsqueda de la autoincompatibilidad

Erigeron breviscapus
(Zhang *et al.*, 2015)



Expresión relativa de genes diferencialmente expresados en interacción polen – pistilo.
SRK: S-locus receptor kinasa.
CaM: Calmodulina
(Modificado de Zhang *et al.*, 2015)

Camellia sinensis L.
(Zhang *et al.*, 2016)



Y: Yema floral
F: Filamentos
H: Hojas
O: Ovarios
P: Pétalos
Po: Polen
S: Sépalos
E: Estilo

Patrones de expresión del gen putativo S-Rnasa en diferentes tejidos de *C. sinensis* (Modificado de Zhang *et al.*, 2016)

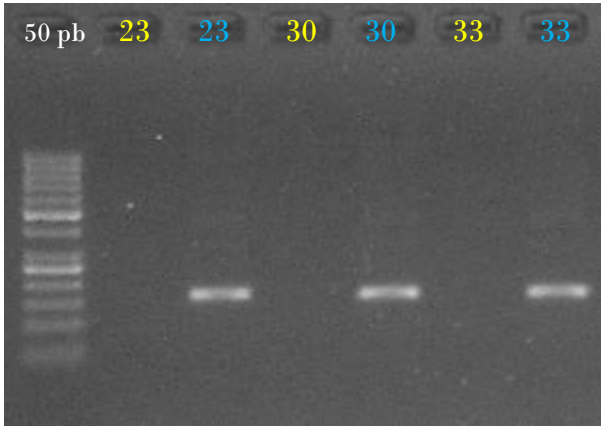
OBJETIVOS

- Identificar genes candidatos asociados a la autoincompatibilidad en *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus alpina,* y estimar su tipo de autoincompatibilidad.

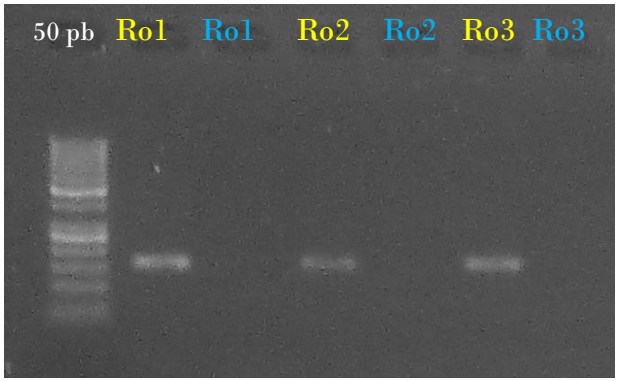
- Definir los genes candidatos asociados a la autoincompatibilidad que podrían facilitar el cruzamiento interespecífico

Materiales y Métodos

Material Vegetal



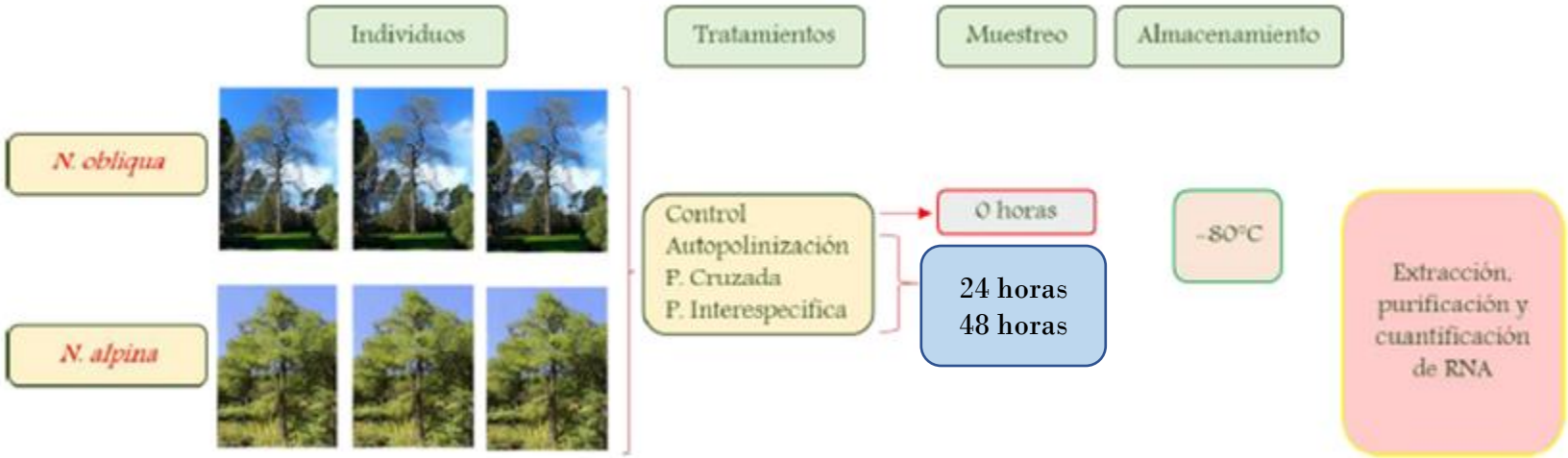
Clones de *N. alpina* amplificados con partidor especie – específico para *N. obliqua* (amarillo) y *N. alpina* (azul)



Individuos de *N. obliqua* amplificadas con partidor especie – específico para *N. obliqua* (amarillo) y *N. alpina* (azul)

Nothofagus alpina

Nothofagus obliqua



- Síntesis de cDNA
- Identificación de secuencias
- Identificación de gen constitutivo
- Análisis de expresión génica qPCR

Resultados y Discusión

Identificación de genes candidatos

Tabla 2: Secuencias base (CDS) y *contings* de *Nothofagus nervosa* de genes candidatos asociados a mecanismos de autoincompatibilidad.

Familia	Especies	ID GenBank	Función	Conting de *Nothofagus* identificado	Función de conting *Nothofagus*	Mecanismo de autoincompatibiidad asociado
Juglandaceae	*J. regia*	XM_018973593.1	CDPK	JT780999.1	Proteina kinasa	Esporofítica
	J. regia	XM_018986027.1	CDPK	JT777369.1	Proteina kinasa	Esporofítica
	J. regia	XM_018965512.1	CDPK	JT773327.1	Proteina kinasa	Esporofítica
	J. regia	XM_018954868.1	CDPK	JT772341.1	Proteina kinasa	Esporofítica
	J. regia	XM_018949840.1	Calmodulin -like	JT766647.1	Calmodulina	Gametofítica; Auto-reconocimiento
Rosaceae	*Prunus mume*	XM_016795910.1	F-box protein At3g23880 -like	JT783342.1	Dominio F-box	Gametofítica; No auto-reconocimiento
Solanaceae	*Petunia axillaris*	AB568404.1	S-locus linked F-box protein	JT766147.1	S-locus F-box	Gametofítica; No auto-reconocimiento
Rosaceae	*Prunus dulcis*	EU095947.1	S13-RNase	JT769423.1	RibonucleasaT2	Gametofítica; No auto-reconocimiento

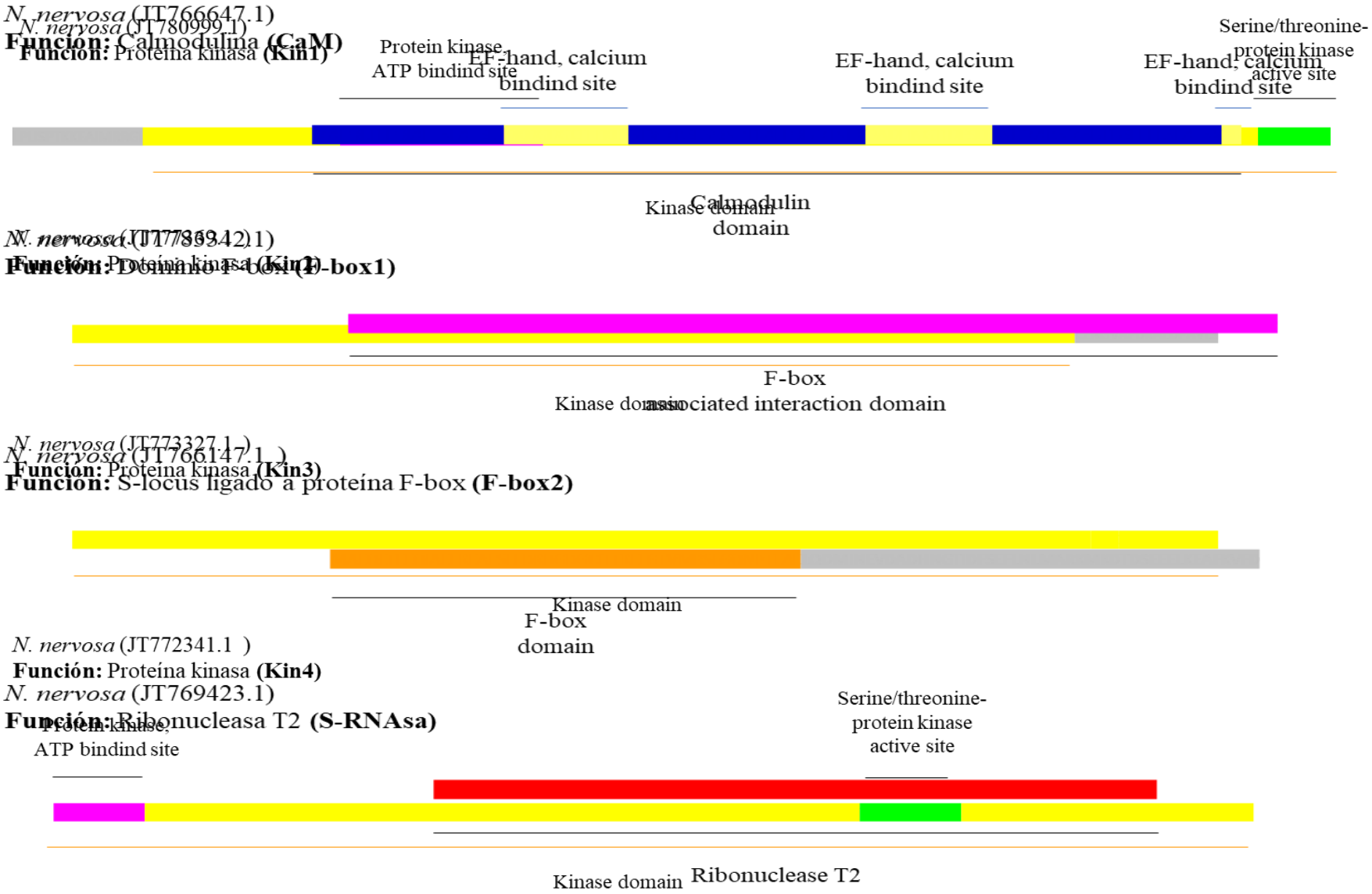


Figura 6: Representación gráfica de los componentes de las secuencias aminoacídicas de los *conting* de *Nothofagus nervosa* asociados a Calmodulina (CaM), Kinasa 1, Kinasa 2 y S-RNAsa. Segmento gris es parte de la secuencia externa al dominio.

Gen constitutivo depende del tejido evaluado

18S

GAPDH

GAPDH

β-tub

Identificación y selección de EF1α como gen constitutivo para análisis de expresión de *N. obliqua* y *N. alpina*

GeNorm

Nothofagus alpina			*Nothofagus obliqua*		
Rank	**Gene**	**M values**	**Rank**	**Gene**	**M values**
1	EF1α	0.576	1	EF1α	1.016
2	ACT7	0.639	2	GAPDH	1.171
3	β-tub	0.714	3	β-tub	1.199
4	GAPDH	0.729	4	18S	1.339
5	18S	0.813	5	ACT7	1.758

RefFinder

Nothofagus alpina			*Nothofagus obliqua*		
Rank	**Gene**	**Geomean**	**Rank**	**Gene**	**Geomean**
1	ACT7	1.19	1	EF1α	1.32
2	β-tub	2.21	2	GAPDH	1.86
3	EF1α	3.08	3	18S	2.83
4	18S	3.34	4	β-tub	3.08
5	GAPDH	3.72	5	ACT7	4.73

DeltaCt

Nothofagus alpina			*Nothofagus obliqua*		
Rank	**Gene**	**SD**	**Rank**	**Gene**	**SD**
1	EF1α	0.58	1	EF1α	0.99
2	ACT7	0.64	2	GAPDH	1.15
3	β-tub	0.71	3	β-tub	1,16
4	GAPDH	0.73	4	18S	1.27
5	18S	0.81	5	ACT7	1.74

BestKeeper

Nothofagus alpina			*Nothofagus obliqua*		
Rank	**Gene**	**SD**	**Rank**	**Gene**	**SD**
1	18S	0.75	1	β-tub	1.016
2	ACT7	0.85	2	EF1α	1.171
3	EF1α	1.01	3	GAPDH	1.199
4	β-tub	1.07	4	18S	1.339
5	GAPDH	1.09	5	ACT7	1.758

NormFinder

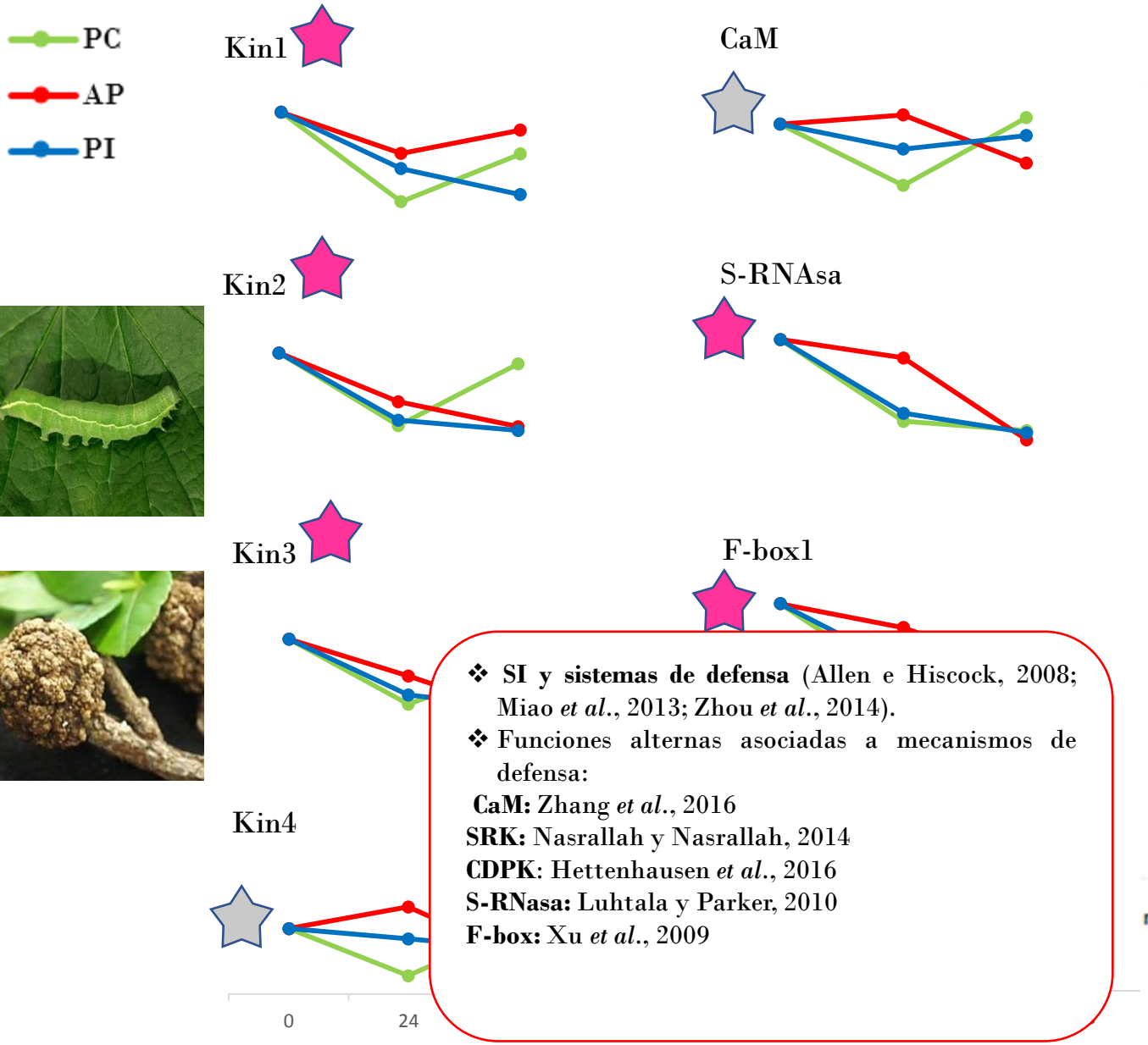
Nothofagus alpina			*Nothofagus obliqua*		
Rank	**Gene**	**Stability**	**Rank**	**Gene**	**Stability**
1	EF1α	0.143	1	EF1α	0.113
2	ACT7	0.266	2	GAPDH	0.527
3	β-tub	0.364	3	β-tub	0.549
4	GAPDH	0.394	4	18S	0.691
5	18S	0.474	5	ACT7	1.113

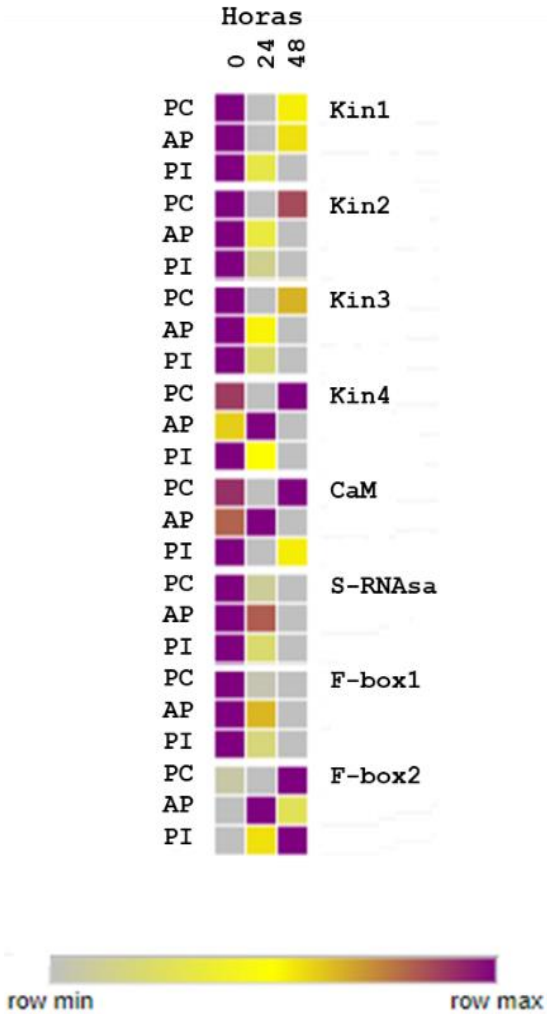
F
e

ando los valores de ciclo umbral (Cq) obtenidos en qPCR, considerando
aplicados a *Nothofagus alpina* (rojo) *y N. obliqua* (azul).

Figura 8: Estabilidad de la expresión de 5 genes de referencia candidatos calculada por GeNorm, DeltaCt, NormFinder, RefFinder y BestKeeper, en muestras obtenidas de tratamientos de polinización de *N. alpina* y *N. obliqua* ($p \leq 0.01$).

Expresión génica en *Nothofagus obliqua*

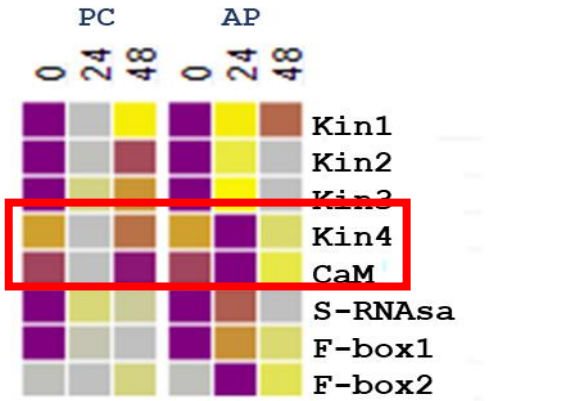


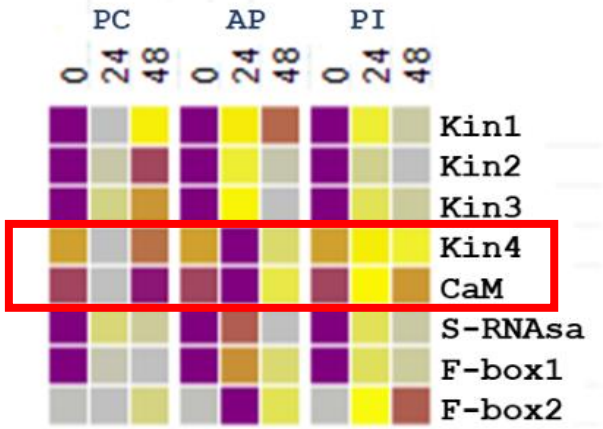


- **SI y sistemas de defensa** (Allen e Hiscock, 2008; Miao *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014).
- Funciones alternas asociadas a mecanismos de defensa:

CaM: Zhang *et al.*, 2016
SRK: Nasrallah y Nasrallah, 2014
CDPK: Hettenhausen *et al.*, 2016
S-RNasa: Luhtala y Parker, 2010
F-box: Xu *et al.*, 2009

Líneas de tendencia





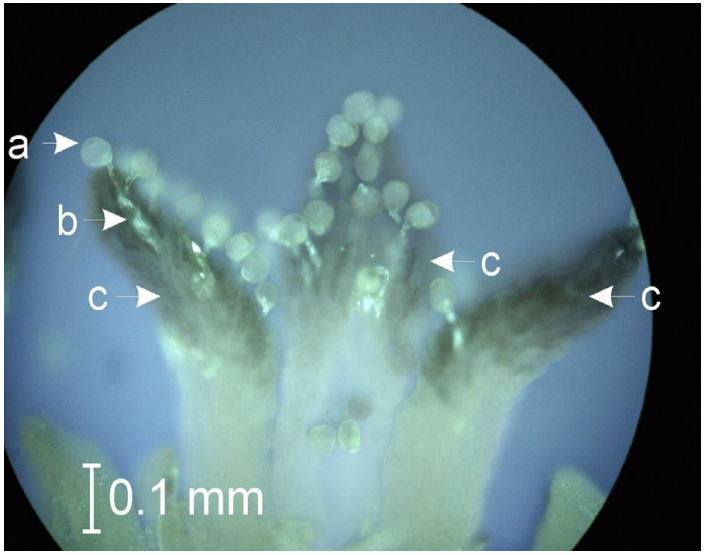
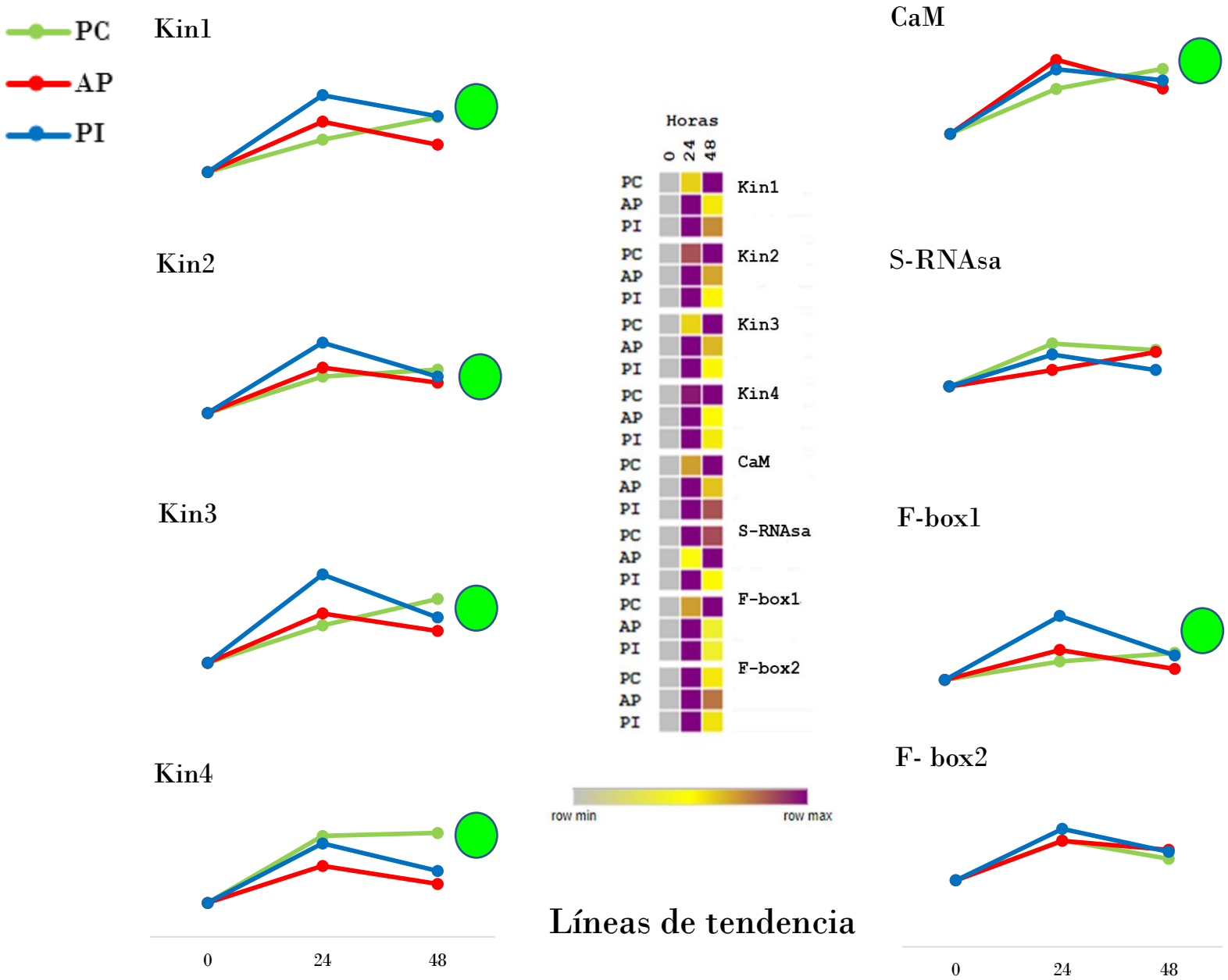
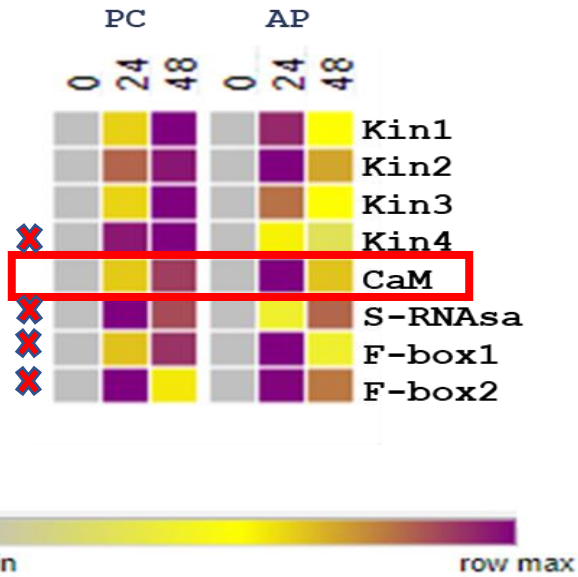


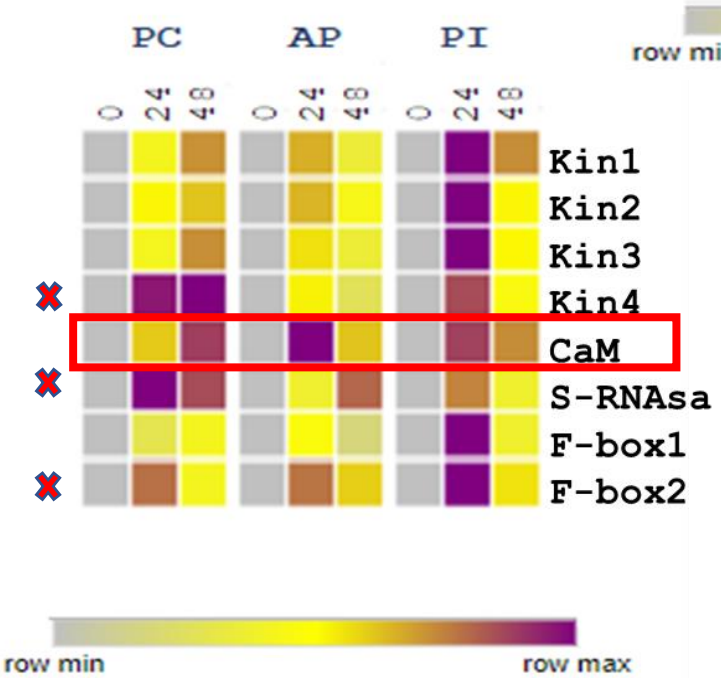
Figura 9: Germinación de granos de polen de *N. obliqua* en la superficie del estigma de la flor pistilada 24 horas post-polinización. a) grano de polen, b) tubo polínico y c) estigmas (Torres y Puntieri, 2013).

Expresión génica en *Nothofagus alpina*



Líneas de tendencia





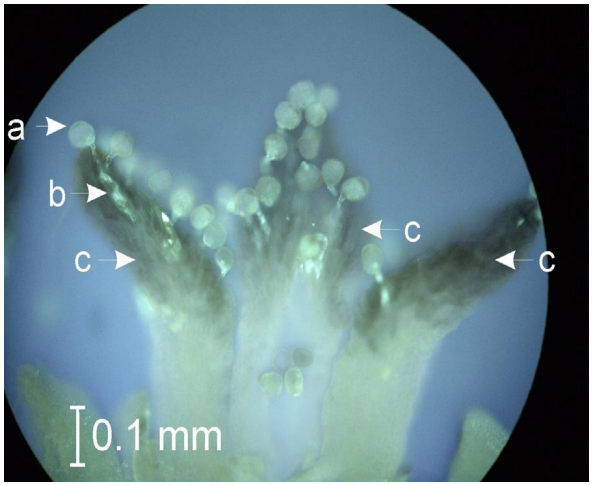
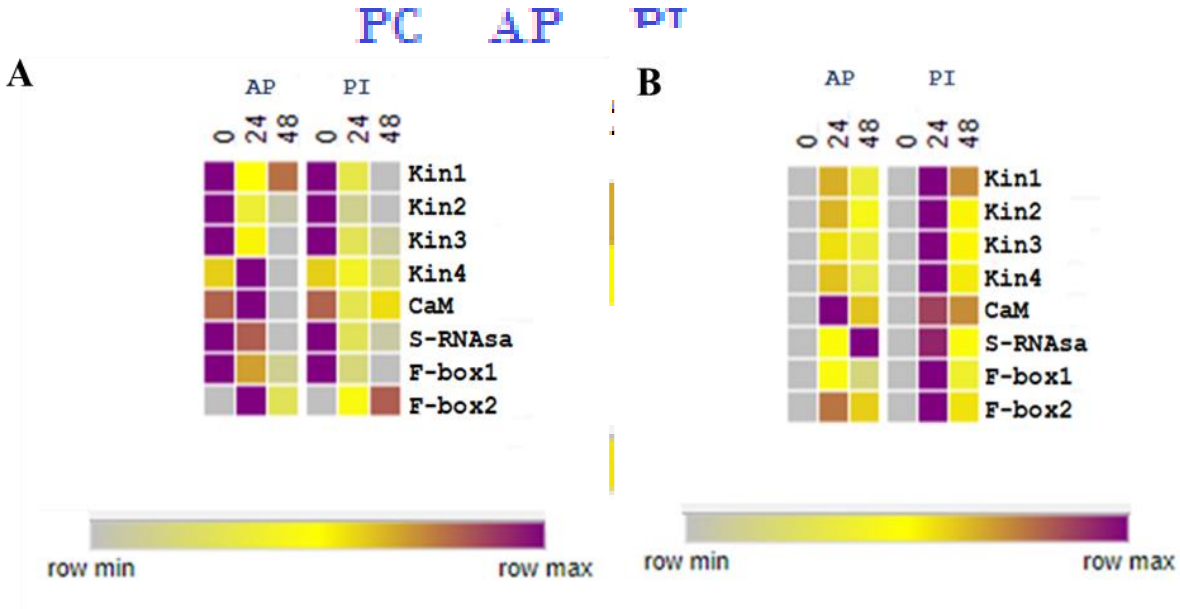


Figura 10: Germinación de granos de polen de *N. obliqua* en la superficie del estigma de la flor pistilada 24 horas post-polinización. a) grano de polen, b) tubo polínico y c) estigmas (Torres y Puntieri, 2013).

Genes candidatos asociados a la expresión de incompatibilidad y su relación con el proceso de hibridación entre N. *obliqua* y *N. alpina*



Nothofagus obliqua *Nothofagus alpina*

(P<0.05; Test de Tuckey 95%. *N. alpina* (p: 0.0313); *N. obliqua* (p: 0.0415))

Conclusiones

- Los genes constitutivos o *housekeeping* se comportan de manera distinta según el tejido/ órgano en que se evalúa su expresión.

- El gen constitutivo más estable para análisis de expresión en tejido floral pre y post-polinización en *N. obliqua* y *N. alpina* corresponde al Factor de elongación 1 alfa (EF1α).

- La identificación de genes ortólogos asociados a los mecanismos de autoincompatibilidad permitió identificar *contings* de *Nothofagus alpina* con funcionalidad asociada a estos genes.

- Los patrones de expresión génica en *N. obliqua* y *N. alpina* son característicos en autoincompatibilidad gametofítica.

- El gen CaM asociado a la autoincompatibilidad gametofítica de *N. alpina* presentan una disminución de su actividad en el tratamiento de polinización interespecífica, provocando una posible vulnerabilidad en la barrera reproductiva.

Muchas gracias por su atención