

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Estudio preliminar fenotípico de la incompatibilidad gametofítica en Capulí (*Prunus serotina* subsp. capuli)
Proyecto de investigación

Verónica Yolanda Baquero Méndez

Licenciatura en Biología

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Licenciada en Biología

Quito, 5 de diciembre de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Estudio preliminar fenotípico de la incompatibilidad gametofítica en Capulí
(*Prunus serotina* subsp. capuli)

Verónica Yolanda Baquero Méndez

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Andrés Torres, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 5 de diciembre de 2018

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Verónica Yolanda Baquero Méndez

Código: 00106948

Cédula de Identidad: 1716132400

Lugar y fecha: Quito, 5 de diciembre de 2018

DEDICATORIA

A mi madre, por su incansable motivación y apoyo para que culmine esta etapa.

A María José, luz en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia, especialmente a Daniel, Xavier y Ana Isabel.
- A María de Lourdes Torres por la oportunidad de participar en este proyecto.
- A Andrés Torres por la ayuda, paciencia y comprensión.
- A la Universidad San Francisco de Quito y la IFS por financiar este proyecto.
- A José Tobar por facilitarme el acceso a los árboles ubicados en la Hacienda “San Felipe”.
- A Carlos Vintimilla y Lisa Correa, por su ayuda y consejos durante todo el proceso.
- A Liseth Salazar por el inmenso apoyo en esta última etapa.
- A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ.
- A Pieter Van 't Hof y Milton Gordillo por el apoyo al inicio del proyecto.
- A Hilsea Investments Limited en especial a Jennifer Fiallos y Diandra Jurado por su ayuda y guía.
- Al Instituto de Microbiología de la USFQ por facilitarme el microscopio de fluorescencia.

RESUMEN

Algunas especies del género *Prunus* presentan incompatibilidad gametofítica, un mecanismo genético controlado por un solo locus altamente polimórfico (denominado Locus-S) que disminuye la productividad en árboles frutales. Este locus comprende de dos genes fuertemente ligados: el gen SFB que controla el determinante masculino (polen) y el gen de la S-RNasa que controla la determinante femenina (pistilo). En el pistilo, la interacción de las proteínas SFB y S-RNasa permite el reconocimiento de polen genéticamente emparentado, es decir procedente del mismo Locus-S e inhibe el desarrollo del tubo polínico, frustrando la fecundación del óvulo. El objetivo de este estudio fue investigar si el Locus-S controla la incompatibilidad gametofítica en el capulí (*Prunus serotina* subsp. capuli). Con este fin, se evaluó como la diversidad alélica del Locus-S influye en el desarrollo del tubo polínico en cruzas controladas. La diversidad alélica del gen de la S-RNasa de 8 árboles de capulí fue analizada con un marcador molecular tipo CAPS diseñado para caracterizar polimorfismos en la región C2-C3 de este gen. Los árboles analizados presentaron un total de 10 alelos. Con esta información se establecieron cruzas compatibles (entre genotipos con alelos diferentes para la S-RNasa), incompatibles (entre genotipos con alelos idénticos para la S-RNasa) y se realizaron polinizaciones controladas en laboratorio para analizar el desarrollo de tubos polínicos en el pistilo mediante microscopía de fluorescencia. Para las cruzas incompatibles, se observó dos características fenotípicas inhibición del crecimiento de tubos polínicos en el estilo (antes de llegar a la zona del ovario) y la punta del tubo hinchada, mientras que para cruzas compatibles se observó que los tubos polínicos logran entrar a la zona del ovario y la punta de los tubos normales. Un ANOVA de una vía demostró que estas diferencias fueron significativas ($p < 0.05$). Estos resultados son un fuerte indicio de que el Locus-S influye la incompatibilidad gametofítica en el capulí. Entender el funcionamiento de este mecanismo en la especie podría resultar útil para establecer programas de mejoramiento eficientes y aumentar la productividad en las cosechas mediante cruzas que sean compatibles.

Palabras Clave: *Prunus serotina* subsp. capuli, incompatibilidad gametofítica, S-RNasa, CAPS, tubo polínico

ABSTRACT

Various species of *Prunus* present gametophytic incompatibility, a genetic mechanism controlled by a single highly polymorphic locus (Locus-S) that decreases productivity in fruit trees. This locus encodes pollen and pistil determinants, SFB and S-RNase genes that are strongly linked. The interaction of SFB and S-RNase proteins within pistil allows the recognition of genetically related pollen and inhibits the development of the pollen tube, interfering with fertilization. To understand the action of Locus-S on the control of gametophytic incompatibility on capulí (*Prunus serotina* subsp. capulí), controlled crosses were held in order to determine if the locus S allelic diversity influences the development of the pollen tube. The allelic diversity of the S-RNase gene of eight capulí trees were analyzed through CAPS molecular marker. The marker was exclusively designed to characterize polymorphisms in the C2-C3 region. The analyzed trees presented a total of ten alleles. Based on this information, compatible crosses were established (between genotypes with different alleles for S-RNase) and incompatible crosses (between genotypes with identical alleles for S-RNase). Hand pollinizations were carried out at the laboratory and the development of pollen tubes were observed in the pistil using a fluorescent microscopy. Pollen tube growth along the style on incompatible crosses revealed two morphological expressions of incompatibility such as inhibition of growth in the upper half of the style and swollen tips. Compatible crosses, meanwhile, revealed that pollen tubes managed to enter the base of the style. Using the number of pollen tubes in the base of the style, a one-way ANOVA showed significant differences between crosses ($p < 0.05$). Therefore, this evidence suggests that the Locus-S influences the gametophytic incompatibility in capulí. Understanding how this mechanism works on capulí could be useful to establish efficient breeding programs that might also increase productivity in crops.

Key words: *Prunus serotina* subsp. capulí, gametophytic incompatibility, S-RNase, CAPS, pollen tube

Tabla de contenido

1. Introducción	12
1.1 Prunus serotina subsp. capuli	12
1.1.1 Distribución geográfica	12
1.1.2 Características botánicas y agronómicas	12
1.1.3 Importancia social y económica en el Ecuador	13
1.2 Incompatibilidad gametofítica	14
1.2.1 Incompatibilidad gametofítica en Prunus	14
1.2.2 Estructura molecular del Locus-S	15
1.2.3 Mecanismo molecular y genético del proceso de reconocimiento de las proteínas del Locus-S durante el proceso de fecundación del capulí.....	16
1.3 Estudios preliminares del Locus-S en capulí	18
1.3.1 Estructura molecular del Locus-S en el capulí	18
1.3.2 Importancia de la incompatibilidad gametofítica en el cultivo de capulí.....	19
2. Objetivos	20
2.1 Objetivo General	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. Área de estudio	20
4. Justificación	21
5. Materiales	22
5.1 Optimización de protocolo para el análisis fenotípico del desarrollo de tubos polínicos en capulí	22
5.1.1 Determinación del tiempo óptimo de receptividad en el estigma y viabilidad del polen... ..	22
5.1.2 Determinación del tiempo y concentración óptimos para teñir tubos polínicos en capulí.. ..	23
5.2 Evaluación de la diversidad alélica del gen de la S-RNasa mediante CAPS	23
5.2.1 Extracción de ADN y restricción enzimática	23
5.3 Análisis de la influencia de diversidad alélica del Locus-S en el desarrollo del tubo polínico del capulí	25
5.3.1 Análisis del desarrollo del tubo polínico en cruzas compatibles e incompatibles mediante microscopía de fluorescencia	25
5.3.2 Análisis estadístico de los tubos polínicos que llegaron a la zona del ovario en cruzas compatibles e incompatibles	25
6. Métodos	25
6.1 Optimización de protocolo para el análisis fenotípico del desarrollo de tubos polínicos en capulí	25
6.1.1 Determinación del tiempo óptimo de receptividad en el estigma y viabilidad del polen... ..	27
6.2 Evaluación de la diversidad alélica del gen de la S-RNasa mediante marcadores moleculares tipo CAPS	29

6.2.1 Extracción de ADN y restricción enzimática	29
6.3 Análisis de la influencia de diversidad alélica del Locus-S en el desarrollo del tubo polínico del capulí	30
6.3.1 Análisis del desarrollo del tubo polínico en cruzas compatibles e incompatibles mediante microscopia de fluorescencia	30
6.3.2 Análisis estadístico de los tubos polínicos que llegaron a la zona del ovario en cruzas compatibles e incompatibles	31
7. Resultados	32
7.1 Optimización de protocolo para el análisis fenotípico del desarrollo de tubos polínicos en capulí	32
7.1.1 Determinación del tiempo óptimo de receptividad en el estigma y viabilidad del polen.	32
7.1.2 Determinación del tiempo y concentración óptimos para teñir tubos polínicos en capulí. ...	32
7.2 Evaluación de la diversidad alélica del gen de la S-RNasa mediante CAPS.....	33
7.2.1 Extracción de ADN y restricción enzimática	33
7.3 Análisis de la influencia de diversidad alélica del Locus-S en el desarrollo del tubo polínico del capulí	34
7.3.1 Análisis del desarrollo del tubo polínico en cruzas compatibles e incompatibles mediante microscopia de fluorescencia	34
8. Discusión.....	35
8.1 Adaptación de protocolos.....	35
8.2 Genotipado mediante CAPS: eficacia y aplicación	38
8.3 Incompatibilidad gametofítica	40
9. Conclusiones.....	42
10. Recomendaciones	43
11. Bibliografía	44
12. Tablas	55
13. Figuras.....	61
14. Anexos.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Alelos encontrados en los árboles seleccionados para las distintas cruzas.....	55
Tabla 2: Tamaño de los fragmentos generados para cada alelo S según la enzima de restricción.....	56
Tabla 3: Árboles seleccionados para cada tipo de cruce.....	57
Tabla 4: Porcentaje de germinación en el estigma de diferentes cruces a las 0 y 24 horas después de la emasculación	58
Tabla 5: Porcentaje de pistilos analizables según el tiempo y sustancia de fijación.....	58
Tabla 6: Porcentaje de viabilidad del polen	59
Tabla 7: Análisis de varianza de una vía de los tubos polínicos encontrados en la zona del ovario.....	59
Tabla 8: Comparación de Fisher con un nivel de confianza del 95%.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del Locus S	61
Figura 2: Sistema de incompatibilidad gametofítica	61
Figura 3: Mecanismo molecular de incompatibilidad gametofítica	62
Figura 4: Flor en estado de botón tardío	62
Figura 5: Flor emasculada para polinizar.....	63
Figura 6: Pistilo control	63
Figura 7: Pistilo analizable.	64
Figura 8: División pistilo	64
Figura 9: Tinción de pistilos con diferentes concentraciones de NaOH.....	65
Figura 10: Amplificación región C2-C3 gen S-RNasa.....	65
Figura 11: Digestión con las enzimas RsaI, MboI y HinfI	67
Figura 12: Pistilo de autopolinización árbol 1.	67
Figura 13: Pistilo de la cruz semicompatible.	68
Figura 14: Pistilo de cruz la cruz compatible entre el árbol 1 y 17.....	68
Figura 15: Tubos polínicos de cruzas compatibles e incompatibles.....	69
Figura 16: Pistilo con tubos polínicos.....	69
Figura 17: Mirlo (<i>Turdus merula</i>).	70

1. Introducción

1.1 *Prunus serotina* subsp. *capuli*

1.1.1 Distribución geográfica

El capulí (*Prunus serotina* subsp. *capuli*) es una especie arbórea de la familia Rosaceae. La especie tiene su origen en Norte América y presenta una amplia distribución geográfica, desde el Sur de Canadá hasta el norte de Guatemala. La especie también prevalece en Ecuador, Perú y Bolivia (McVaugh, 1951; Fresnedo et al, 2011). Estudios botánicos proponen que los españoles de la época colonial introdujeron el árbol de capulí en la zona Andina desde México o América Central (Chucuri, 2014). En el Ecuador, *Prunus serotina* se encuentra dispersa a lo largo del Callejón Interandino, desde la provincia del Carchi hasta Loja, con una distribución altitudinal que varía entre los 1800 a 3400 m.s.n.m (Mille, 1942).

1.1.2 Características botánicas y agronómicas

El capulí es un árbol tetraploide ($2n=32$) que puede alcanzar hasta más de 10 metros de altura. Presenta hojas estipuladas, simples y alternas, de margen aserrado, cortamente pecioladas y lanceoladas. Su haz es de color verde oscuro y brillante. Las flores del capulí son pequeñas, hermafroditas y blancas; estas se agrupan en racimos axilares colgantes. Su fruto es una drupa globosa, de color negro rojizo cuando alcanza la madurez, y tiene un diámetro de 12 a 20 mm con una sola semilla. El capulí se propaga principalmente por semillas (Conabio, 2012; Downey & Iezzoni, 2000; Pairon & Jacquemart, 2008).

El árbol de capulí es extremadamente vigoroso y puede producir flores y frutos a partir del segundo o tercer año de crecimiento (National Research Council, 1989). No requiere muchos nutrientes para crecer por lo que se encuentra en una gran variedad de tipos de suelos: arenosos, arcillosos, ácidos y relativamente infértiles. Es resistente a la

erosión y a varias enfermedades, sin embargo es susceptible al hongo que provoca nudos negros y a la humedad. Se ha descrito que en el Ecuador se encuentran las mejores zonas para que crezca adecuadamente ya que existe una precipitación anual entre 300-1800mm, en ciertas zonas de la sierra (National Research Council, 1989). Los individuos en la etapa adulta son intolerantes a la sombra por lo que se desarrollan bien en lugares claros. Tienen la capacidad de convertirse en entes dominantes durante la sucesión secundaria y se establecen bien después de perturbaciones o desastres naturales (Conabio, 2012; Fresnedo et al, 2011).

1.1.3 Importancia social y económica en el Ecuador

El capulí es una fuente natural importante de compuestos bioactivos como flavonoides, antocianinas, vitamina C y beta carotenos. En un estudio donde se recolectaron frutos de capulí en mercados populares de las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo se encontró que los valores de vitamina C son mayores que los reportados en la frutilla, mora y frambuesas. Este estudio constituye el primer informe sobre las propiedades de los frutos de capulí proveniente de las regiones andinas de Ecuador. Los hallazgos permiten confirmar que este fruto, al igual que otras frutas del grupo de bayas, demuestra ser una fuente importante de compuestos bioactivos asociados con importantes propiedades biológicas como capacidades antiinflamatorias y antioxidantes, lo que sugiere que las frutas de Capulí podrían ser utilizados como fuente natural de este tipo de compuestos. Además se destaca por ser una fuente nutritiva de proteína, vitaminas y minerales (Chucuri, 2014; Rúaless, 2007; Alvarez et al, 2017).

El capulí se volvió popular desde un extremo de los Andes hasta el otro, especialmente alrededor de los asentamientos indígenas. En las tierras altas andinas la selección de los pueblos nativos sobre esta especie ha permitido que los frutos sean comestibles y más grandes (National Research Council, 1989). En el Ecuador el fruto del capulí es apreciado por su sabor y se utiliza principalmente para la elaboración de

conservas, mermeladas, bebidas refrescantes y bebidas embriagantes luego de un proceso de fermentación. En las provincias de Tungurahua y Chimborazo se prepara un dulce tradicional llamado “Jucho” que tiene como ingrediente principal el capulí y es servido como postre después de la fanesca (Chucuri, 2014; Rúaless, 2007).

Por otro lado, los frutos de tipo norteamericano son pequeños y astringentes por lo que no tienen valor comercial (Downey & Iezzoni, 2000). En Norte America, el capulí tiene mayor importancia en la industria maderera. Al ser una especie de rápido crecimiento; después de 6-8 años produce madera rojiza de excelente calidad que puede ser utilizada para la construcción rural, decoración de interiores y carpintería en general.

La madera se caracteriza por tener facilidad de labrado y adquiere un fino pulimento por lo que se puede realizar esculturas y decoraciones de gran valor estético. La madera es dura, resistente al daño por insectos y hongos (National Research Council, 1989; Conabio, 2012; Chucuri, 2014). A pesar de este gran potencial en la industria alimenticia, maderera y su valor social, el capulí no ha sido domesticado en el Ecuador como cultivo industrial. El aprovechamiento de las cualidades comerciales de esta especie requiere de intervenciones científicas que permitan incrementar la productividad del cultivo en extensiones amplias.

1.2 Incompatibilidad gametofítica

1.2.1 Incompatibilidad gametofítica en *Prunus*

Las angiospermas que producen flores hermafroditas tienen una fuerte tendencia a autopolinizarse por la cercanía de sus órganos reproductivos (pistilo y anteras) (Jiménez & Cruz, 2011; Oukabli et al, 2000). Dado que la autopolinización reduce la eficacia biológica en la progenie y disminuye la diversidad genética, las angiospermas han adoptado estrategias para prevenirla y promover la reproducción entre individuos genéticamente distantes (Nettancourt, 1997). Una de estas estrategias comprende la

incompatibilidad gametofítica (Kao & Tsukamoto, 2004; Hua et al, 2007). De hecho, la mayoría de especies de árboles frutales de la familia Rosaceae y del género *Prunus* presentan este mecanismo (Kubo et al., 2010).

1.2.2 Estructura molecular del Locus-S

En el género *Prunus* se ha reportado que la incompatibilidad gametofítica está determinada por el Locus-S. Este locus es altamente polimórfico y está comprendido por varios genes, dependiendo de la especie. En *Prunus* se entiende que la determinante femenina está codificada por el gen de la S-RNasa, mientras que la determinante masculina es codificada por el gen *SFB* (S-locus F-box protein) (Lewis, 1949; Matsumoto et al, 2012). La distancia física entre estos dos genes varía entre 380 bp hasta 30kb, dependiendo del haplotipo S (Entani et al. 2003; Ushijima et al. 2003; Yamane et al. 2003). Actualmente, el término alelo S se usa para referirse a las diferentes formas alélicas de los genes (S-RNasa o SFB) (Kao & Tsukamoto, 2004; Cruz & Díaz, 2007; Cachi et al, 2017; Zhang et al, 2009).

En la **Figura 1** se encuentra una representación esquemática del locus S. La S-RNasa en *Prunus* contiene cinco dominios altamente conservados (C1, C2, C3, RC4, and C5) es decir secuencias que son altamente similares entre las especies de este género, y una región hipervariable (denominada RHV) localizada entre la región C2 y C3. En *Prunus*, el gen de la S-RNasa también presenta dos intrones, mientras que en otros géneros de la familia Rosaceae, como *Malus* o *Pyrus*, solo se puede encontrar un intrón (Tao & Iezzoni, 2010; Sassa et al, 1997). La presencia de regiones altamente conservadas ha permitido clonar (mediante PCR) fragmentos de cDNA del gen de la S-RNasa de distintas especies de *Prunus* usando primers universales. Esto ha resultado útil para elucidar la función del Locus-S en la incompatibilidad sexual de las distintas especies del género (Tao et al, 1999). Por otro lado, el gen SFB presenta cuatro regiones variables (HVb, HVa, V2 y V1), un intrón y una caja F (Ushijima et al, 2004; Wu et al, 2013).

1.2.3 Mecanismo molecular y genético del proceso de reconocimiento de las proteínas del Locus-S durante el proceso de fecundación del capulí

La incompatibilidad gametofítica es un mecanismo genético que permite al pistilo rechazar el polen de individuos genéticamente emparentados. Los productos proteicos del gen de la S-RNasa y el gen SFB son secretados respectivamente en el pistilo y el polen, e interactúan entre sí durante el proceso de fecundación (Kao & Tsukamoto, 2004; Hua & Kao, 2006; Hauck et al, 2002; McClure et al., 1990). Hoy se entiende que la interacción de estas proteínas genera el reconocimiento de polen emparentado, lo que provoca que el crecimiento del tubo polínico se inhiba en el estigma (o en el estilo) evitando que éste llegue al saco embrionario y fecunde al óvulo (Yamane et al, 2003; Sonneveld, 2005).

Por lo tanto, en este sistema, la compatibilidad de la cruce está determinada por el genoma haploide del polen y el genoma diploide del pistilo (Zhang et al, 2009; McCubbin & Kao 2000). Por ejemplo, una planta diploide S_1S_2 producirá granos de polen con haplotipo S_1 o S_2 . Si los granos de la misma planta llegan al pistilo, habrá germinación y se producirá un tubo polínico, pero al ser polen genéticamente emparentado (cruce incompatible), el crecimiento de los tubos será inhibido en el estilo. Por otro lado, en el caso de que los granos de polen de una planta diploide S_2S_3 que llegan a un pistilo S_1S_2 , únicamente los granos con haplotipo S_3 producirían tubos polínicos que alcancen el saco embrionario para concretar así el proceso de fecundación (**Figura 2**).

Hoy se sostiene que el gen de la S-RNasa codifica RNAsas; glicoproteínas con actividad ribonucleasa que actúan como agentes citotóxicos S-específicos y que se expresan en el estigma, estilo y ovario. Por otro lado, el gen SFB es parte de la familia de enzimas tipo ligasa-E3 que contienen una caja F. Estas enzimas están involucradas principalmente en la degradación de proteínas vía el proteosoma 26S que implica el marcaje por poliubiquitilación de las S-RNAsas que serán degradadas. El complejo SCF

está compuesto por Skp1, Cullin-1, proteína F-box y Rbx1. La proteína F-box regula la degradación de la proteína mediada por la ubiquitina del proteosoma 26S (Ushijima et al, 2003; Ushijima et al, 2004; Cruz & Díaz, 2007; Zhang et al, 2009; Wu et al, 2013).

La compatibilidad sexual se da por la ubiquitilación de la S-RNasa de un haplotipo-S distinto al del polen, y su posterior degradación mediada por el proteosoma 26S. En una reacción incompatible (i.e. polen y pistilo con haplotipos-S emparentados) el complejo SCF y su S-RNasa relacionada interactúan a través del dominio de interacción específico del haplotipo que consiste en la región hipervariable. Esta región codifica el complejo proteico de la membrana en el pistilo. Esta interacción evita que la S-RNasa sea poliubiquitinada. Como resultado, la S-RNasa emparentada permanece activa y degrada el ARN del polen que resulta en la detención del crecimiento del tubo polínico (**Figura 3**) (Ushijima et al, 2004; Hua et al, 2007; Hua & Kao, 2006; Wu et al, 2013).

Finalmente, se han planteado tres modelos para explicar cómo se trunca el crecimiento del tubo polínico: el de inhibición, el de receptor y el de compartimentalización. En el primero se asume que el producto del polen S es un inhibidor de RNasa que inactiva todas las S-RNasas, excepto las análogas, que son absorbidas por el tubo polínico. De esta manera las S-RNasas afines quedan activas y se detiene el crecimiento del tubo polínico. El segundo supone que el producto del polen S es un receptor de membrana y permite aceptar el haplotipo de la S-RNasa afín, una vez dentro del tubo polínico ejerce sus efectos citotóxicos y detiene el crecimiento del tubo.

En este modelo solo las S-RNasas afines entran en el tubo polínico para ejercer su actividad RNasa. En el tercero la S-RNasa es tomada de manera inespecífica en los compartimentos luminales del sistema de la endomembrana del polen, se mantiene establemente secuestrado en una vacuola en un polen compatible y por lo tanto no ejerce su citotoxicidad en el citosol. En tubos incompatibles, la vacuola se rompe y la S-RNasa

citotóxica sale al citosol (Luu et al 2000; McCubbin & Kao, 2000; Zisovich et al, 2004 Hua et al, 2008; Zhang et al, 2009; Tao & Iezzoni, 2010). En los tres modelos se establece claramente que el efecto citotóxico, manifestado por la degradación del ARN del polen y la inhibición del crecimiento del tubo, solo ocurre en aquellos que son incompatibles (Mau et al, 1982; Williams et al, 1982; Cruz & Díaz, 2007; Cachi et al, 2014; Sonneveld, 2005). McClure et al. (1990) obtuvo resultados consistentes con la degradación de RNA por parte de las S-RNasas. En su estudio mostraron que el ARNr del tubo polínico era degradado después de la autopolinización.

1.3 Estudios preliminares del Locus-S en capulí

1.3.1 Estructura molecular del Locus-S en el capulí

En una investigación previa donde se secuenció el gen completo de la S-RNasa del capulí, se determinó que este posee la misma estructura molecular típica de las S-RNasas de otras especies *Prunus*. Es decir, cinco regiones conservadas, una región hipervariable entre las regiones conservadas C2-C3, y dos intrones. Por otro lado, mediante BLAST se encontró que existe un alto porcentaje de similitud entre el gen de la S-RNasa del capulí, con S-RNasas exclusivas del género *Prunus* ya que posiblemente comparten el mismo origen evolutivo (Correa, 2018; Gordillo, 2014).

En cuanto a la diversidad alélica de la S-RNasa, Gordillo (2014) encontró 11 alelos mediante la amplificación del intrón I. Mientras que Correa (2018) encontró 15 alelos mediante la secuenciación del gen completo de la S-RNasa. Además, Correa (2018) diseñó un marcador molecular CAPS específico para la S-RNasa en capulí, con el que se identificaron 13 alelos en el intrón I y 15 alelos en la región C2-C3. Con estos resultados se determinó que CAPS para esta última región es un marcador molecular eficiente para identificar la diversidad alélica de la S-RNasa.

1.3.2 Importancia de la incompatibilidad gametofítica en el cultivo de capulí

El mecanismo de incompatibilidad gametofítica cumple un rol vital en la producción de frutos en especies del género *Prunus* (Ortega et al, 2006). Este mecanismo no ha sido estudiado en *Prunus serotina* subsp capulí. En el Ecuador no existe un cultivo formal de la especie por lo que es importante conocer cómo funciona este mecanismo para establecer cruzas que garanticen alta eficiencia en las cosechas y desarrollar programas de mejoramiento genético, con variedades de capulí que tengan un gran valor comercial. A pesar de que no hay genotipos de cultivares, Borja (2017) estableció 11 morfotipos en base a características cualitativas y cuantitativas de la colección del INIAP de la región andina del Ecuador. Con esta información, la caracterización alélica de la S-RNasa y su influencia en el mecanismo de la incompatibilidad gametofítica se puede aportar a que se formalice el cultivo de esta especie para que se aprovechen todos sus usos a nivel nacional (Gordillo, 2014; Intriago, 2013).

En la literatura se reporta ampliamente que el Locus-S está directamente relacionado con el rechazo de polen genéticamente emparentado en diferentes especies del género *Prunus*. Con la información previamente reportada por Correa (2018) y Gordillo (2014) acerca de la S-RNasa se establece que la estructura de este gen en el capulí es similar a otras especies *Prunus*. En teoría, el estudio de la diversidad alélica de la determinante femenina (S-RNasa) mediante CAPS podría resultar útil para establecer cruzas compatibles e incompatibles en el capulí en base a haplotipos-S. De esta forma se puede conocer la influencia de este locus en la incompatibilidad gametofítica, al estudiar como la influencia de esta diversidad alélica afecta el desarrollo del tubo polínico.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

El objetivo principal de esta investigación fue el de investigar si el Locus-S determina la incompatibilidad sexual en el capulí. Con este fin, este trabajo científico se enfocó en estudiar cómo la diversidad alélica del Locus-S determina la incompatibilidad gametofítica de *Prunus serotina* subsp capulí.

2.2 Objetivos específicos

- Adaptar y optimizar un protocolo para analizar el desarrollo fenotípico del desarrollo de tubos polínicos para el capulí.
- Evaluar genóticamente la diversidad alélica del gen de la S-RNasa mediante el marcador molecular CAPS.
- Analizar la influencia de la diversidad alélica en el desarrollo de tubos polínicos en capulí en cruza compatibles e incompatibles.

3. Área de estudio

El material vegetal utilizado en este estudio se obtuvo a partir de árboles de capulí de la Hacienda “San Felipe,” ubicada en Cayambe (N 00.04049 W 078.15900). La optimización de protocolos, cruza in-vitro, análisis moleculares y análisis estadísticos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. El análisis con microscopía de fluorescencia se realizó en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

4. Justificación

El árbol de capulí tiene varios usos agronómicos, medicinales y alimenticios (Chucuri, 2014; Rúales, 2007; Jimenez et al, 2011; Conabio, 2012; Fresnedo et al, 2011; National Academies, 1989). Tiene un gran potencial comercial, sin embargo actualmente en el Ecuador esta especie no ha sido domesticada por lo que es vital motivar su producción a nivel nacional ya que podría representar un aporte económico importante. De esta manera, es importante domesticar la especie, a través de programas de mejoramiento y el aumento de la productividad en las cosechas.

En la literatura se reporta ampliamente que el mecanismo de incompatibilidad gametofítica mediado por el Locus-S, compuesto por el gen de la S-RNasa (determinante femenina) y SFB (determinante masculina), está directamente relacionado con la disminución en la productividad de varias especies del género *Prunus* (Tao & Iezzoni, 2010; Ortega & Dicenta, 2003). En este mecanismo la interacción de los productos codificados por estos dos genes provocan que el polen de individuos genéticamente emparentados sea rechazado a través de la inhibición del crecimiento de los tubos polínicos, evitando así la fecundación. El entender si la incompatibilidad gametofítica limita la eficiencia de fecundación en el capulí es un primer paso esencial en la domesticación del capulí; ya sea para establecer eficientemente programas de mejoramiento convencional, o para garantizar la producción eficiente de frutos.

En el Ecuador, no existen estudios acerca de la incompatibilidad en capulí. Sin embargo, se ha estudiado el gen de la S-RNasa y su diversidad alélica, determinando que la estructura de este gen es similar al de otras especies *Prunus* (Gordillo, 2014; Correa, 2018). En la literatura se ha estudiado ampliamente este gen en otras especies y se ha comprobado que conocer su diversidad alélica es útil para establecer cruza compatibles e incompatibles. En base a esto Correa (2018) estableció un marcador molecular CAPS para caracterizar los alelos de la S-RNasa presentes en el capulí. Mediante la aplicación

de este marcador molecular CAPS se establecieron diferentes cruzas con el objetivo de comprender cómo funciona el mecanismo de incompatibilidad gametofítica en el capulí y comprobar la eficiencia y sencillez de la aplicación de este marcador para determinar cruzas que garanticen un mayor rendimiento en las cosechas.

5. Materiales

5.1 Optimización de protocolo para el análisis fenotípico del desarrollo de tubos polínicos en capulí

5.1.1 Determinación del tiempo óptimo de receptividad en el estigma y viabilidad del polen

- Bolsas de papel
- Pinzas
- Tijeras
- Tubos Eppendorf 0.6ml
- Acetocarmín
- Microscopio óptico (Olympus)
- Ramas en estadio floral
- Floreros
- Conservante para flores (Biogranp)
- Pincel delgado

5.1.2 Determinación del tiempo y concentración óptimos para teñir tubos polínicos en capulí

- Etanol al 70% (QUIMFAS)
- Ácido acético glacial (MERCK)
- Etanol al 90% (QUIMFAS)
- NaOH 10M (EMSURE)
- Agua destilada
- Azul de Anilina al 0.1% en K_2HPO_4
- Glicerol (SIGMA-ALDRICH)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio de fluorescencia BX50 (Olympus)
- Cámara digital MU633-FL (AmScope)

5.2 Evaluación de la diversidad alélica del gen de la S-RNasa mediante CAPS

5.2.1 Extracción de ADN y restricción enzimática

- Hojas jóvenes de árboles de capulí de la Hacienda San Felipe ubicada en Cayambe
- Etanol al 70%
- CTAB
- 2B-mercaptoetanol (ALDRICH)
- Cloroformo : Alcohol Isoamílico en proporción 24:1

- Isopropanol
- Etanol al 76%
- TE estéril
- Morteros esterilizados
- Tubos Eppendorf
- Centrífuga 5414 (Eppendorf)
- 3mM MgCl₂ (Invitrogen)
- 1X Buffer de PCR (Invitrogen)
- 0.2 mM dNTPs (Invitrogen)
- 0.5M Primer Forward
- 0.5M Primer Reverse
- 1U Taq polimerasa platinum (Invitrogen)
- 20ng/μl de ADN de capulí
- Termociclador T-Personal (Biometra)
- Kit de extracción de banda (Promega)
- Bisturí
- Pinzas
- Enzimas de restricción RsaI, MboI y HinfI (Thermo Fisher Scientific)
- Buffer 10x
- Agua libre de nucleasas

5.3 Análisis de la influencia de diversidad alélica del Locus-S en el desarrollo del tubo polínico del capulí

5.3.1 Análisis del desarrollo del tubo polínico en cruzas compatibles e incompatibles mediante microscopia de fluorescencia

- Software de análisis de imagen (AmScope)

5.3.2 Análisis estadístico de los tubos polínicos que llegaron a la zona del ovario en cruzas compatibles e incompatibles

- Software Minitab 17 (2010)

6. Métodos

6.1 Optimización de protocolo para el análisis fenotípico del desarrollo de tubos polínicos en capulí

6.1.1 Determinación del tiempo óptimo de receptividad en el estigma y viabilidad del polen

El primer paso fue determinar el protocolo óptimo de polinización. Con el objetivo de reducir el número de variables que influyen en este proceso se realizaron ensayos de viabilidad de polen y receptividad del estigma usando árboles ubicados en la Hacienda “San Felipe” en Cayambe. Para obtener polen para el ensayo de receptividad del estigma se recolectaron 50 flores de diferentes árboles de capulí en estado de botón tardío (i.e. uno o dos días antes de la antesis (apertura de la flor) como se muestra en la **Figura 4**. Para determinar el estado de desarrollo de la flor se siguió el esquema fenológico propuesto por Ramírez & Davenport (2016). A cada flor colectada se le removieron las anteras con ayuda de pinzas, estas últimas se colocaron en una bolsa de papel y se las dejó reposar por 48 horas a temperatura ambiente para que liberen su polen (Radičević et

al, 2016; Radunić et al, 2017). Posteriormente el polen se almacenó en un tubo Eppendorf a 4°C.

Para determinar la viabilidad del polen antes de cada polinización, se realizó una tinción con acetocarmín en un portaobjetos y luego se analizó en un microscopio compuesto con una resolución de 10X. Los granos de polen teñidos de color rojo fuerte y con forma redonda fueron considerados como viables mientras que los no teñidos y con forma alargada fueron considerados como no viables (Murat, 2008). Para obtener el porcentaje de viabilidad, se realizó un conteo de granos de polen en 5 campos ópticos diferentes. Seguido de esto el porcentaje se calculó como la relación entre el número de granos viables y el número de granos de polen total, multiplicado por 100 (Ćalić et al, 2013).

Un porcentaje alto de viabilidad en el polen es importante, ya que tienen el potencial de desarrollar tubo polínico. Una vez que se determinó que el polen extraído se encuentra viable, se lo utilizó para el ensayo de receptividad del estigma. Para esto, se recolectaron ramas que tenían flores en estado de botón tardío (a partir de 6 diferentes árboles) y se realizaron 4 eventos de cruza entre estos individuos sin importar el genotipo ya que solo se esperaba observar la germinación del tubo polínico que indica que el estigma está receptivo. Las ramas colectadas fueron trasladadas de Cayambe al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ en esponjas de florista previamente hidratadas. A continuación, en el laboratorio se colocaron las ramas en floreros con agua y conservante para flores. Luego se realizó la polinización, que consiste en tomar el polen extraído previamente con la ayuda de un pincel fino y colocar sobre el estigma de cada pistilo, todo esto a temperatura ambiente (Ortega & Dicenta, 2004; Oukabli et al, 2000). Esto se realizó a 40 pistilos a las 0 y 24 horas después de la emasculación (la emasculación consistió en eliminar los estambres con ayuda de pinzas sin dañar el carpelo) como se indica en la **Figura 5**. Como control se tomaron pistilos emasculados sin polinizar para

asegurar que el polen observado es el colocado por el pincel (**Figura 6**). Los pistilos fueron fijados a las 48 horas de haber sido polinizados en etanol al 70% por 2 días.

Por otro lado, el estigma ofrece los nutrientes necesarios para el desarrollo de los tubos polínicos por lo que es de suma importancia que se encuentre receptivo al momento de realizar polinizaciones. El tiempo en que se encuentra receptivo varía según la especie, en el género *Prunus* se ha reportado que varía entre el día de la antesis y hasta 24 horas después. De esta manera es esencial determinar el tiempo óptimo de receptividad del estigma en el capulí realizando polinizaciones en diferentes tiempos y contando la cantidad de granos de polen germinado. Para determinar que el polen observado es el deseado y no el propio de la flor, se usó como control, pistilos solamente emasculados.

A continuación se realizó la tinción de los pistilos con NaOH 8M y con azul de anilina por 1 hora (Hedhly, 2003). Se los analizó con un microscopio de fluorescencia Olympus BX50, una cámara digital para microscopio MU633-FL marca AmScope y el software de análisis de imagen Amscope. Para cada pistilo se contó el número de granos de polen adheridos y el número de granos germinados, es decir aquellos que presentaban un tubo polínico con un tamaño superior al diámetro del grano de polen, para determinar el porcentaje de germinación (Dicenta, 2002;Cachi et al, 2014).

6.1.2 Determinación del tiempo y concentración óptimos para teñir tubos polínicos en capulí

Para este ensayo se utilizaron pistilos de flores que se encontraban abiertas para garantizar que estaban polinizadas y poder observar tubos polínicos y se usó 40 pistilos para cada tratamiento. El primer paso para la tinción es la fijación, para esto es necesario usar métodos de fijación químicos para que se mantengan los componentes celulares y los tubos polínicos se tiñan adecuadamente ya que es fundamental para la distinción de los mismos en las distintas secciones del pistilo (Huang & Yeung, 2015). El tiempo de

fijación y el método varía entre especies del género *Prunus*, sin embargo se tomó como base lo reportado por Hedhly (2003) para el cerezo. Con el fin de determinar qué método es el más adecuado para preparar los pistilos antes de la tinción. Se realizaron pruebas con etanol al 70% y con etanol al 70% más ácido acético glacial (3:1) y se probó diferentes tiempos de fijación (2 días y 7 días). Los pistilos previamente fijados, se lavaron con etanol al 90% y después con etanol al 70%. El siguiente paso es suavizar el tejido y transparentarlos para intensificar la tinción con azul de anilina. Para lograr esto en varios protocolos se utiliza NaOH y temperaturas de aproximadamente 60°C (Cachi et al, 2014; Čalić et al, 2013; Ludwig et al, 2014). Por consiguiente se realizaron ensayos con concentraciones de 8M y 10M NaOH. Para ambas concentraciones se incubó a 60°C por 30 minutos y se lavaron los pistilos con agua destilada.

El siguiente paso fue realizar la tinción con azul de anilina que tiñe la calosa que rodea con un revestimiento a los tubos polínicos, además se encuentra como tapones espaciados irregularmente. Las observaciones se hacen en una habitación oscura, bajo estas condiciones la calosa fluoresce y contrasta con la fluorescencia azulada o grisácea del tejido del estilo (Martin, 1959; Jefferies & Belcher, 1974). Los pistilos teñidos se colocaron entre el portaobjetos y el cubreobjetos con unas gotas de glicerol y se aplastaron ligeramente. Finalmente a partir del número de pistilos polinizados se determinó el porcentaje de pistilos analizables, aquellos donde se distingue claramente el desarrollo de los tubos polínicos a lo largo del pistilo (**Figura 7**).

Al ser un proceso que depende de varios factores simultáneamente, se probaron distintos tiempos y concentraciones de los reactivos en base a los previamente reportados para la tinción de tubos polínicos en el género *Prunus*. Hasta obtener la mayor cantidad de pistilos analizables, aquellos donde se observa claramente el desarrollo de tubos polínicos a lo largo del pistilo. Se tomó en cuenta cada pistilo como una réplica.

6.2 Evaluación de la diversidad alélica del gen de la S-RNasa mediante marcadores moleculares tipo CAPS

6.2.1 Extracción de ADN y restricción enzimática

Para analizar la diversidad alélica de la S-RNasa, primero se colectaron muestras de hojas jóvenes de 8 árboles de capulí presentes en la Hacienda “San Felipe” ubicada en Cayambe (Anexo 1) para extraer su ADN genómico. Para esto se utilizó el protocolo de extracción con CTAB, estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ y descrito por Guadalupe (2012).

A continuación se determinó la concentración y calidad del ADN a través del espectrofotómetro NANODROP 2000 (Thermo Scientific). A partir de la concentración se realizaron los cálculos correspondientes para obtener alícuotas de ADN con una concentración final de 20 ng/μl en un volumen total de 100 μl.

Posteriormente, se realizó la amplificación de la región C2-C3 del gen de la S-RNasa en los 22 árboles del estudio. La amplificación se realizó en un volumen final de reacción de 25 μL, con 1x de Buffer, 3mM de MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.5mM de primer forward y reverse y 1U de Taq DNA polimerasa platinum de Invitrogen. El programa de ciclado consistió de una denaturación inicial del ADN a 94°C durante 2 minutos, seguido de una denaturación a 94°C durante 1 minuto. Una temperatura de annealing de 58°C durante 2 minutos y una extensión a 68°C durante 4 minutos, seguido por 34 ciclos de denaturación a 94°C durante 1 minuto. Y una extensión final a 68°C durante 10 minutos (Ortega et al, 2006). A continuación se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 1.5% y se corrió a 80 voltios por 1 hora.

El capulí es una especie tetraploide por lo que en la electroforesis se observan varios alelos, por este motivo es importante extraer cada banda para separar cada alelo y realizar la restricción enzimática y analizar los patrones para cada alelo de acuerdo al protocolo CAPS desarrollado por Correa (2018). Para esto se utilizó el kit de extracción

de banda de Promega, con la ayuda de un bisturí se separó cada banda del resto del gel para colocarla en un tubo Eppendorf respectivamente rotulado. Para cada banda se utilizó una hoja de bisturí nueva.

Separada cada banda se procedió a utilizar el marcador molecular CAPS que se basó en tres enzimas de restricción: RsaI, MboI y HinfI (Correa, 2018). La reacción se realizó con 8µl de ADN, 1µl de enzima, 2µl de Buffer y 9 µl de agua libre de nucleasas en un volumen final de 20µl para cada una. Se centrifugó por 10 segundos y a continuación se incubó a 37°C por 15 minutos. A continuación se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 1.5% y se corrió a 80 voltios por 1 hora. Se tomó fotografías de los geles con el fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD). Como resultado se obtuvieron diferentes fragmentos (**Tabla 1**), los cuales se compararon con los reportados por Correa (2018) para determinar a qué patrón corresponde según la enzima para después realizar la identificación alélica (**Tabla 2**). Una vez identificados los alelos presentes en cada individuo según reporta Correa (2018), se establecieron cruzas compatibles, incompatibles y semicompatibles, que se muestran en la **Tabla 3**.

6.3 Análisis de la influencia de diversidad alélica del Locus-S en el desarrollo del tubo polínico del capulí

6.3.1 Análisis del desarrollo del tubo polínico en cruzas compatibles e incompatibles mediante microscopia de fluorescencia

Establecidas las cruzas con los 8 individuos, se recolectaron flores de estos para extraer polen y para la polinización. En la **Tabla 3** se resume qué individuos fueron seleccionados como donadores y receptores. Para la extracción de polen y las polinizaciones se siguió el protocolo descrito en la sección 6.1.1. De aquellos seleccionados como donadores, se extrajo polen de aproximadamente 50 flores para cada árbol. Las polinizaciones se realizaron en 25 pistilos (por receptor) y se usaron 10 pistilos

como control para cada cruce. El proceso de polinización se realizó en 3 distintos eventos; es decir, se obtuvo 3 replicas independientes para cada cruce. Se realizaron dos tipos de cruces incompatibles: autocruces (polinizaciones a pistilos con polen extraído de las anteras de la misma flor) en individuos usados como receptores en las otras cruces y entre individuos distintos pero con el mismo genotipo. Para comparar el crecimiento del tubo polínico en cruces con polen de distinto genotipo y polen con el mismo genotipo y observar si existe incompatibilidad entre estos. La cruce semicompatible consistió en realizar una polinización entre individuos que compartían un solo alelo. Las cruces compatibles fueron entre individuos con genotipos completamente distintos.

Las polinizaciones y análisis de desarrollo de tubo polínico también se llevaron a cabo respectivamente de acuerdo a los protocolos descritos en la 6.1.1 y 6.2.1. Se analizaron los pistilos bajo luz UV en el microscopio de fluorescencia Olympus BX50. Se tomaron fotografías de los pistilos con la cámara digital para microscopio MU633-FL marca AmScope. Para el análisis de imágenes se utilizó el software Amscope y se dividió el pistilo en tres tercios como se muestra en la **Figura 8**. De cada pistilo se contaron la cantidad de tubos polínicos presentes en cada tercio.

6.3.2 Análisis estadístico de los tubos polínicos que llegaron a la zona del ovario en cruces compatibles e incompatibles

Con el objetivo de analizar la influencia de la diversidad alélica en el desarrollo de tubos polínicos en capulí en cruces compatibles, incompatibles y semicompatibles. Los datos del número de tubos polínicos que llegaron a las distintas secciones del pistilo en las diferentes cruces, se sometieron primero a una prueba de normalidad y una prueba de Levene para homogeneidad de la varianza. A continuación se analizaron usando el modelo de análisis de varianza de Fisher (ANOVA) con un diseño de un factor, utilizando la prueba F con un valor $p < 0.05$. En los casos en que la prueba F fue significativa, las

diferencias entre medias aritméticas se evaluaron utilizando una comparación de Fisher $p < 0.05$ para observar en dónde se encuentran las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de cruza. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Minitab.

7. Resultados

7.1 Optimización de protocolo para el análisis fenotípico del desarrollo de tubos polínicos en capulí

7.1.1 Determinación del tiempo óptimo de receptividad en el estigma y viabilidad del polen

En la polinizaciones de prueba que se realizaron inicialmente se observó que a las 24 horas hay un porcentaje de germinación más alto, en comparación a las 0 horas de polinización después de la emasculación (**Tabla 4**). En la literatura se reporta la importancia de realizar polinizaciones en el momento en que el estigma se encuentra receptivo ya que ofrece los nutrientes y las condiciones para que ocurra la germinación del polen y la elongación del tubo polínico.

7.1.2 Determinación del tiempo y concentración óptimos para teñir tubos polínicos en capulí

Al realizar ensayos con los dos protocolos de tinción se observa que el mayor porcentaje de pistilos analizables se obtuvo con un proceso de fijación de 7 días en una solución de etanol al 70%, NaOH 10M (**Tabla 5**). En la **Figura 9** también se puede apreciar la superioridad en cuanto a calidad de resolución visual del tratamiento descrito anteriormente, frente a su alternativa (70% etanol, NaOH 8 M). En el primero

se puede analizar el desarrollo de los tubos polínicos a diferencia del segundo donde el tejido no permite observar el desarrollo de los tubos polínicos.

7.2 Evaluación de la diversidad alélica del gen de la S-RNasa mediante CAPS

7.2.1 Extracción de ADN y restricción enzimática

De las 22 muestras analizadas, todas amplificaron para la región C2-C3. Todos los individuos presentaron patrones heterocigotos con haplotipos diploide. En la Figura 10 se muestra la amplificación de la región C2-C3 del gen de la S-RNasa de los 8 individuos seleccionados para análisis de desarrollo de tubo polínico.

En la **Figura 11** se muestra también los patrones de digestión de ADN de cada genotipo con las enzimas RsaI, MboI y HinfI. Con estos resultados se realizó la selección de cruza en base a los alelos que compartían estos individuos. De acuerdo a Correa (2018), si dos individuos presentan los mismos patrones de restricción para las tres enzimas, ambos genotipos comparten al mismo haplotipo-S. Por lo tanto, en las cruza compatibles los individuos seleccionados muestran distintos patrones de restricción, mientras que en las cruza incompatibles los individuos seleccionados presentan el mismo patrón de restricción para RsaI, MboI y HinfI. En la cruza planteada como semicompatible, los individuos comparten los mismos patrones de restricción para una de las variantes alélicas de la región C2-C3 de la S-RNasa (los 8 individuos seleccionados presentaron patrones heterocigotos diploides).

Para el análisis de la diversidad alélica de los 8 individuos se encontraron 10 alelos: I, VII, VIII, IX y XII reportados con anterioridad por Correa (2018); los cinco restantes son alelos nuevos. En la **Tabla 1** se muestran los patrones encontrados para cada enzima y para cada banda y los alelos correspondientes reportados. Mientras que en la **Tabla 2** se resumen los fragmentos resultantes de la digestión de cada enzima para cada alelo y el patrón correspondiente reportado por Correa (2018). En algunos casos no hubo digestión

ya que para ciertos alelos, algunas enzimas no tienen sitio de corte, como es el caso del alelo XII donde no hubo digestión en las enzimas MboI y HinfI.

7.3 Análisis de la influencia de diversidad alélica del Locus-S en el desarrollo del tubo polínico del capulí

7.3.1 Análisis del desarrollo del tubo polínico en cruzas compatibles e incompatibles mediante microscopía de fluorescencia

En el ensayo de la viabilidad de polen antes de las polinizaciones se observó que para todos los árboles, el polen tuvo una viabilidad mayor al 50% (**Tabla 2**). Esto es importante porque indica si es que el polen está en la capacidad de germinar y desarrollar tubo polínico. Después de las polinizaciones de las cruzas establecidas se analizó los pistilos teñidos en el microscopio de fluorescencia para observar el desarrollo del tubo polínico. En las **Figuras 12, 13 y 14** se observan las diferencias en el crecimiento de los tubos polínicos de las distintas cruzas. En la **Figura 12** se muestra el pistilo de una autopolinización y en la **Figura 13** se muestra el pistilo de la craza que se plantea como semicompatible. En ambas figuras se observa que el crecimiento de los tubos polínicos se inhibe en el estilo. En la **Figura 14** se muestra el pistilo de una craza compatible, en este caso se observa que los tubos polínicos llegan a la zona del ovario. Como se muestra en la **Figura 15**, otra diferencia que se observa es que en las cruzas incompatibles la punta del tubo polínico se hincha mientras que en las compatibles la punta del tubo polínico se encuentra normal. Todos estos resultados fueron en base al análisis de 95 pistilos.

Para observar si existen diferencias significativas entre cruzas en el número de tubos polínicos en cada sección del pistilo, se realizó un ANOVA de una vía. Con los resultados del 1/3 y 2/3 no se observan diferencias ya que en estas zonas los tubos incompatibles todavía pueden crecer. Sin embargo, en la zona del ovario(3/3) se observa que existen diferencias significativas entre las cruzas con $p < 0.05$ (**Tabla 7**). Con una comparación

de Fisher con un nivel de confianza de 95% se observó que las cruzas compatibles son estadísticamente diferentes al resto (**Tabla 8**).

8. Discusión

La incompatibilidad gametofítica es un mecanismo presente en especies del género *Prunus* y está regulada por dos genes (S-RNasa y SFB). Estos genes codifican proteínas que interactúan entre sí; cuando estas son de origen emparentado (i.e. provienen de individuos con el mismo haplotipo-S) se genera un rechazo en el pistilo de polen. Se reporta en otras especies del género, que conocer el haplotipo-S de los individuos es útil para establecer cruzas compatibles con el fin de aumentar la eficiencia de las cosechas. Con la información previamente reportada por Correa (2018) y Gordillo (2014) acerca de la S-RNasa se establece que la estructura de este gen en el capulí es similar a otras especies *Prunus*. Con los resultados de este estudio se observa que las S-RNasas tienen un efecto similar en el desarrollo de tubos polínicos que en otras especies. De esta manera se plantea que en efecto este gen está involucrado en el mecanismo de incompatibilidad gametofítica en *Prunus serotina* subsp. capuli.

8.1 Adaptación de protocolos

Para extraer polen en especies del género *Prunus* se ha reportado que colocar las anteras en bolsas de papel facilita este proceso (Hedhly et al, 2016; Radičević et al, 2016; Radunić et al, 2017). Este método también es útil en capulí ya que se obtuvo una gran cantidad de polen. Por otro lado, se comprobó que almacenar el polen a 4° C resultó ser efectivo ya que se obtuvieron porcentajes altos de viabilidad antes de cada polinización. Además al analizar los pistilos se observó una gran cantidad de granos en el estigma y crecimiento de tubos polínicos.

Por otro lado, es importante determinar en qué momento el estigma se encuentra receptivo ya que ofrece los nutrientes necesarios para el desarrollo de los tubos polínicos (Hormaza & Herrero, 1996; Hormaza & Herrero, 1999). Se ha reportado en especies como el durazno y cerezo dulce que el estigma se encuentra más receptivo el día de la antesis y hasta 24 horas después. En el capulí se observó que el estigma se encontraba más receptivo a las 24 horas de la emasculación. Por esta razón es importante seleccionar flores en estado de botón tardío, es decir uno o dos días antes de la antesis, realizar la emasculación y dejar los pistilos 24 horas después de este procedimiento para que coincida con la apertura de la flor (Hedhly et al., 2016; Egea & Burgos, 1992; Hedhly et al., 2003).

Una vez que el polen germina en el estigma, los tubos polínicos crecen hasta llegar al ovario, sin embargo muy pocos lo logran. La literatura reporta que una disminución en el número de tubos polínicos desde el estigma hasta la base del estilo y el ovario, puede darse por la temperatura. También, por la disminución en el tejido de transmisión del pistilo que tiene forma de embudo, de tal manera que el espacio como los nutrientes disponibles para el crecimiento del tubo polínico disminuyen a lo largo del estilo (Hormaza & Herrero, 1996; Hormaza & Herrero, 1999; Egea & 1992; Stephenson et al., 2003; Hedhly et al, 2005; Murat 2008; Hedhly et al, 2007). Se ha reportado que la detención del crecimiento del tubo polínico se produce entre el primer y segundo tercio del estilo y se completa a las 48 horas después de la polinización (Luu et al, 2000). En algunas especies de la familia Rosácea, como *Chaenomeles japónica*, se ha reportado que en cruza compatibles, los tubos polínicos se demoran de 2 a 6 días en llegar a la base del estilo, mientras que en cruza incompatibles se demora de 6 a 7 días. En otras especies como la almendra se ha reportado que se necesitan 4 días para que los tubos polínicos lleguen a la base del estilo (Oukabli et al, 2000; Kaufmane & Rumpunen, 2002).

En el capulí se observó que 48 horas son suficientes para observar tubos polínicos en la zona del ovario. Sin embargo, no se observó ninguno fecundar el óvulo ya que no se dejó más tiempo porque a pesar de que el transporte de las flores desde Cayambe se lo realizó con cuidado, procurando que se mantengan hidratadas todo el tiempo, la integridad de las mismas se ve afectada con el tiempo. De esta manera el dejar más tiempo podría significar una pérdida total de los pistilos. Además Ortega & Dicenta (2004) reportan que la receptividad del estigma decrece con el tiempo desde la apertura de la flor.

Para observar los resultados de las polinizaciones se usó azul de anilina ya que tiñe la calosa que rodea con un revestimiento a los tubos polínicos, además se encuentra como tapones espaciados irregularmente. Las observaciones se hacen en una habitación oscura, bajo estas condiciones la calosa fluoresce y contrasta con la fluorescencia azulada o grisácea del tejido del estilo (Martin, 1959; Jefferies & Belcher, 1974). Los resultados mostraron que al igual que en otras especies *Prunus* los tubos polínicos en el capulí son fácilmente observados mediante esta tinción y solamente las condiciones y tiempos varían en relación a otros reportados.

Para observar los resultados se desarrolló un método de conteo mediante la división por secciones del pistilo, ya que como se observa en la **Figura 16** hay muchos tubos polínicos a lo largo del estilo y se juntan entre ellos. Este método permitió tener una aproximación y con esto observar diferencias significativas entre los diferentes tipos de cruza (i.e. compatible, incompatible, semi-compatible). Es importante mencionar que adaptar estos protocolos para el capulí fueron de gran utilidad para tener polinizaciones y un análisis de tubos polínicos más eficientes.

Por otro lado, es importante mencionar que la temperatura no se controló en las polinizaciones ya que en la literatura se reporta que esta variable afecta el desarrollo de tubos polínicos (Hedhly et al, 2005; Hedhly et al, 2004; Radičević et al, 2016). Glišić et

al (2017) reporta que la mayor cantidad de tubos polínicos observados en la base del estilo se dio en el año en que la temperatura ambiental durante el tiempo de floración fue la más baja en *Prunus domestica*. Hedhly et al (2007) reporta que un incremento en la temperatura media de 1 a 3°C durante las dos primeras semanas después de la antesis, tiene un efecto negativo en el número de tubos polínicos llegando a la base del estilo en el cerezo dulce.

En Cumbayá, lugar donde se realizaron las polinizaciones, la temperatura está entre los 15,2 y 18 °C; mientras que en Cayambe, donde se recolectaron las flores, la temperatura media anual está entre 6 y 12°C (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1979; INIAP, 1991). De esta manera al no controlar esta variable no se puede descartar por completo la posibilidad de que en algunos casos el crecimiento de los tubos haya sido afectado por este factor.

Es importante recalcar que en la mayoría de estudios de este tipo en otras especies, se ha tomado en cuenta el porcentaje del cuajado de frutos después de cada polinización, ya que la llegada del tubo polínico al ovario no garantiza la fertilización. En este estudio no se hizo este análisis por cuestiones de logística. Además cabe destacar que la presencia de mirlos que se alimentan de este fruto, como se muestra en la **Figura 17**, constituyen una limitante para observar el desarrollo del fruto.

8.2 Genotipado mediante CAPS: eficacia y aplicación

Utilizando un marcador molecular CAPS específico para la regiones conservadas C2-C3 del gen de la S-RNasa (Correa,2018), se identificaron los alelos de este gen presentes en los distintos individuos de manera rápida y eficiente y se establecieron cruza compatibles, semicompatibles e incompatibles. Ya que se ha reportado ampliamente que este gen es esencial en el rechazo de polen en Rosaceae (Tao& Iezzoni, 2010; Thompson& Kirch, 1992; McCubbin and Kao, 2000). Para el capulí Gordillo (2014)

previamente realizó una amplificación del Intrón I para caracterizar la S-RNasa, sin embargo, con esta técnica no se distingue entre fragmentos que presentan el mismo tamaño y no se observa con claridad la diversidad alélica. Por esta razón, se desarrolló un sistema CAPS específico para el Intrón I y la región C2-C3 del gen de la S-RNasa y se determinó que la región hipervariable encontrada entre estas dos regiones conservadas presenta una gran cantidad de polimorfismos.

CAPS por sus siglas en inglés (cleaved amplified polymorphic sequence) es un marcador codominante y específico del locus (Matsumoto & Tsumura, 2004; Shi & Panthee, 2017; Carbonell et al, 2018). Los marcadores CAPS consisten en la amplificación de un ADN objetivo mediante PCR, seguido de una digestión a los amplicones de PCR específicos del locus con una o más enzimas de restricción, seguido de la separación del ADN digerido en un gel de agarosa, que producen un patrón de bandas causados por el polimorfismo de nucleótidos entre las muestras, que permite distinguir entre individuos homocigotos y heterocigotos (Konieczny & Ausubel, 1993; Agarwal et al, 2008; Semagn et al, 2006).

Este marcador presenta una ventaja porque descifra los polimorfismos del tamaño del fragmento generado por la restricción, causados por cambios de una sola base (SNP) o por inserciones/deleciones que modifican los sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción en los amplicones de PCR (Agarwal et al, 2008). Además el uso de un sistema de CAPS usando primers marcadores diseñados de las regiones conservadas y enzimas de restricción específicas, ha sido reportado con anterioridad para genotipar alelos S en géneros de la familia Rosaceae (Tao et al, 1999; Iqbal & Kohn, 2001; Yamane & Tao, 2009). De esta manera con los resultados obtenidos se comprueba que el gen de la S-RNasa es un excelente indicador para establecer cruces y el genotipado del gen SFB deber ser usado como un análisis suplementario para determinar el haplotipo-S.

8.3 Incompatibilidad gametofítica

Los resultados obtenidos indican que las autocruzas, las cruzas entre individuos genéticamente emparentados y la cruce entre individuos que compartían un alelo (semicompatible), son incompatibles. Como se muestra en la **Figura 15** se observaron consistentemente dos expresiones morfológicas de incompatibilidad: la inhibición del crecimiento de los tubos polínicos hasta el segundo tercio del pistilo y la punta del tubo polínico hinchada (Oukabli et al, 2000; Hedhly et al, 2004; Ludwig et al, 2013; Čalić et al, 2013; Cachi et al, 2014; Estaji et al, 2016; Radičević et al, 2016; Glišić et al, 2017; Radunić et al, 2017).

En una reacción incompatible el complejo SCF (Skp1, Cullin-1, proteína F-box y Rbx1) y su S-RNasa relacionada interactúan en un dominio de interacción específica del haplotipo que depende de la región hipervariable. Esta región es importante, porque se encarga de codificar para el complejo proteico de la membrana del pistilo como se mencionó anteriormente (Tao & Iezzoni, 2010; Wu et al, 2013). Este complejo reconoce cuando el mismo alelo es expresado en el polen y el pistilo y activa la RNasas. De esta manera la acumulación de estas proteínas producidas por el pistilo en el tubo polínico degradan el ARN de los tubos polínicos emparentados inhibiendo futuras síntesis de proteínas necesarias para el desarrollo del tubo polínico y esto da como resultado la detención de su crecimiento. También se observa que los tubos polínicos incompatibles presentan la característica de la punta del tubo se hinchada. Esta característica se da por la acumulación de calosa que al ser teñida con azul de anilina fluoresce más fuerte que el resto del tubo polínico (Kao & Tsukamoto, 2004; Ludwig et al, 2013; Luu et al, 2000; Glišić et al, 2017).

Por otro lado, en las cruzas compatibles los tubos polínicos no presentan una hinchazón en la punta y se observa crecimiento de los mismos hasta la zona del ovario ya

que las RNasas se encuentran inactivas por la ubiquitilación de la S-RNasas de un haplotipo distinto y posteriormente por la degradación mediada por el proteosoma 26S . Aunque existen otros factores que pueden estar involucrados como el estado de madurez del pistilo, que es capaz de soportar un número mayor o menor de granos de polen, ya que el estigma controla el flujo de agua para la germinación del polen o la temperatura (Egea & 1992; Hormaza & Herrero, 1999). A pesar de que existen varios factores externos que pueden influir en el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estilo, los resultados son consistentes con que el genotipo es el mayor determinante (Cachi et al, 2014; Kaufmane et al, 2002; Oukabli et al, 2000; Glišić et al, 2017). Estos resultados además indican que el sistema CAPS diseñado a partir de las regiones conservadas C2-C3 es una herramienta útil y sencilla para genotipar el gen de la S-RNasa y establecer cruzas que tengan una mayor probabilidad de generar frutos.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se contribuye a entender de mejor manera el mecanismo de incompatibilidad gametofítica en el capulí controlado por el Locus S. Se muestra que existe una influencia de la S-RNasa en este mecanismo. Sin embargo, como se mencionó anteriormente este locus comprende de otro gen denominado SFB. Tao & Iezzoni (2010) reportan haplotipos autocompatibles por mutaciones en el polen que codifican una SFB disfuncional. Estos hallazgos podrían indicar que la determinante del polen en este género puede actuar para prohibir mecanismos desconocidos que funcionan para inactivar los efectos citotóxicos de la S-RNasa (Mable, 2004; Golz et al, 2000; Tao& Iezzoni, 2010; Hauck et al, 2006; Makovics, 2016; Tsukamoto et al, 2006; Ushijima et al, 2004; Yamane et al, 2003; Watari et al, 2007; Tsukamoto et al, 2008). Por lo tanto, para entender completamente este mecanismo se deben estudiar sus dos componentes: la determinante femenina (S-RNasa) y la determinante masculina (SFB) en conjunto.

9. Conclusiones

- A partir de los resultados obtenidos se comprueba que los protocolos optimizados para el capulí han sido exitosos.
- El sistema de CAPS desarrollado para la región C2-C3 del gen de la S-RNasa es efectivo para identificar alelos en los distintos individuos y el análisis de la diversidad alélica de este gen es útil para predecir si una cruce es compatible o incompatible.
- En cruces incompatibles, se observan dos características fenotípicas: inhibición del crecimiento de tubos polínicos en el 2/3 del pistilo y la hinchazón de su punta.
- En cruces compatibles los tubos polínicos pueden llegar hasta la zona del ovario. Esto coincide con los resultados observados en otras especies de *Prunus*.
- Con cruces compatibles e incompatibles, seleccionadas a partir del genotipado de la S-RNasa con el marcador molecular CAPS. Se comprobó la influencia de este gen en la incompatibilidad en *Prunus serotina subsp.capuli*, lo que facilita un mayor entendimiento de este sistema para el capulí..

10. Recomendaciones

- Realizar un RT-qPCR para cuantificar los niveles de expresión de la S-RNasa presentes en una cruce incompatible y en otra cruce compatible, con la finalidad de comprobar si es que están activas durante una cruce incompatible.
- Realizar polinizaciones en el campo para evitar que una variable como la temperatura ambiental afecte al crecimiento de los tubos polínicos. Además de esta manera, se podrá analizar el cuajado de frutos y determinar que cruces presentan un mayor rendimiento.
- Analizar el genotipo de los frutos resultantes de las cruces para comprender como se da la segregación de alelos.
- Estudiar el gen SFB y su influencia en la incompatibilidad de *Prunus serotina* subsp. capuli y explorar si existen individuos autocompatibles.
- Realizar cruces con información de los dos genes y establecer haplotipos S.

11. Bibliografía

- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27(4), 617-631.
- Alvarez, J., Carrillo, E., Aller, A., Gasparrini, M. (2017). Anti-inflammatory effect of capuli cherry against LPS induced cytotoxic damage in RAW 246.7 macrophages. *Food and chemical toxicology*, 102, 46-52.
- Ben Mustapha, S., Ben Tamarzizt, H., Baraket, G., Abdallah, D., & Salhi Hannachi, A. (2015). Genetic diversity and differentiation in *Prunus* species (Rosaceae) using chloroplast and mitochondrial DNA CAPS markers. *Genetics and Molecular Research*, 14(2), 4177-4188.
- Borja, Edwin. (2017). Caracterización Eco-geográfica de la colección de *Prunus serotina* Ehrh subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh (Capulí), en la región andina de Ecuador. (Tesis Maestría). Universidad de Valencia.
- Cachi, A.M., Hedhly, A., Hormaza, J. I., & Wünsch, A. (2014). Pollen tube growth in the self-compatible sweet cherry genotype, 'Cristobalina', is slowed down after self-pollination: Pollen tube growth in self-compatible cherry. *Annals of Applied Biology*, 164(1), 73-84.
- Cachi, Ariana M., Wünsch, A., Vilanova, A., Guàrdia, M., Ciordia, M., & Aletà, N. (2017). *S*-locus diversity and cross-compatibility of wild *Prunus avium* for timber breeding. *Plant Breeding*, 136(1), 126-131.
- Ćalić, D., Devrnja, N., Kostić, I., & Kostić, M. (2013). Pollen morphology, viability, and germination of *Prunus domestica* cv. Požegača. *Scientia Horticulturae*, 155, 118-122.
- Carbonell, P., Alonso, A., Grau, A., Salinas, J., García-Martínez, S., & Ruiz, J. (2018). Twenty Years of Tomato Breeding at EPSO-UMH: Transfer Resistance from Wild

- Types to Local Landraces—From the First Molecular Markers to Genotyping by Sequencing (GBS). *Diversity*, 10(1), 12.
- Chucuri, J. (2014). *Colecta y caracterización morfoagronómica in situ y molecular de capulí (Prunus serótina Ehrh) del Banco Nacional de germoplasma del INIAP* (Tesis pregrado). Universidad Estatal de Bolívar. Recuperado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/928/1/iniapscP.Ch559c2013.pdf>
- Correa, L. (2018). *Caracterización molecular y diseño de marcadores moleculares CAPS para el gen de la S-RNasa en Prunus serotina subsp.capuli* (Tesis de Pregrado). Universidad San Francisco de Quito.
- Cruz, F; Díaz, J. (2007). Sistemas de reconocimiento célula-célula basados en S-RNasa que promueven la diversidad genética en las plantas, 31, 157-171.
- Dabholkar,A. (2006). *General Plant Breeding*. New Delhi: Concept Publishing.
- de Nettancourt, D. (1997). Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction*, 10(4), 185-199.
- Dicenta, F., Ortega, E., Canovas, J. A., & Egea, J. (2002). Self-pollination vs. cross-pollination in almond: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breeding*, 121(2), 163-167.
- Downey, S; Iezzoni, A. (2000). Polymorphic DNA Markers in Black Cherry (Prunus serotina) Are Identified Using Sequences from Sweet Cherry, Peach, and Sour Cherry., 125(1), 76-80.
- Egea, J., & Burgos, L. (1992). Effective pollination period as related to stigma receptivity in apricot. *Scientia Horticulturae*, 52(1-2), 77-83.
- Entani, T., Iwano, M., Shiba, H., Che, F.-S., Isogai, A., & Takayama, S. (2003). Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of Prunus mume: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 8(3), 203-213.

- Estaji, A., Ebadi, A., Ghorbani, A., & Allabakhsh, R. (2016). Comparison of different classical and molecular methods to identify superior self-compatible almond (*Prunus dulcis* Mill.) genotypes and evaluation of their traits. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91(1), 36-42.
- Fresnedo-Ramírez, J., Segura, S., & Muratalla-Lúa, A. (2011). Morphovariability of capulín (*Prunus serotina* Ehrh.) in the central-western region of Mexico from a plant genetic resources perspective. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(4), 481-495.
- Glišić, I., Milatović, D., Cerović, R., Radičević, S., Đorđević, M., & Milošević, N. (2017). Examination of self-compatibility in promising plum (*Prunus domestica* L.) genotypes developed at the Fruit Research Institute, Čačak. *Scientia Horticulturae*, 224, 156-162.
- Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C. B., Hancock, C. N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., McClure, B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible Nicotiana. *Nature*, 439(7078), 805-810.
- Golz, J., Clarke, E., & Newbigin, E. (2000). Mutational Approaches to the Study of Self-incompatibility: Revisiting the Pollen-part Mutants. *Annals of Botany*, 85, 95-103.
- Gordillo, M. (2014). *Identificación de alelos S asociados con autoincompatibilidad en individuos de capulí (Prunus serotina subsp. capulí) mediante la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa*. (Tesis pregrado). Universidad San Francisco de Quito.
- Guadalupe, J. (2014). *Estudio preliminar de la diversidad genética del capulí en cinco provincias de la región andina del Ecuador*. (Tesis pregrado). Universidad San Francisco de Quito.

- Hauck, N. R. (2005). Accumulation of Nonfunctional S-Haplotypes Results in the Breakdown of Gametophytic Self-Incompatibility in Tetraploid *Prunus*. *Genetics*, *172*(2), 1191-1198.
- Hauck, N., Yamane, H., Tao, R., & Iezzoni, A. (2002). Self-compatibility and incompatibility in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Sexual Plant Reproduction*, *15*(1), 39-46.
- Hauck, Nathanael R., Ikeda, K., Tao, R., & Iezzoni, A. F. (2006). The Mutated S1-Haplotype in Sour Cherry Has an Altered S-Haplotype-Specific F-Box Protein Gene. *Journal of Heredity*, *97*(5), 514-520.
- Hedhly, A, Hormaza, J, & Herrero, M. (2007). Warm temperatures at bloom reduce fruit set in sweet cherry, *81*(2), 158-164.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I., & Herrero, M. (2003). The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant, Cell and Environment*, *26*(10), 1673-1680.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I., & Herrero, M. (2004). Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *American Journal of Botany*, *91*(4), 558-564.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I., & Herrero, M. (2005). Influence of genotype-temperature interaction on pollen performance: Variation in pollen performance. *Journal of Evolutionary Biology*, *18*(6), 1494-1502.
- Hedhly, A., Wünsch, A., Kartal, ö., Herrero, M., & Hormaza, J. I. (2016). Paternal-specific *S* -allele transmission in sweet cherry (*Prunus avium* L.): the potential for sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology*, *29*(3), 490-501.
- Hedly, A. (2003). *Efecto de la temperatura sobre la fase reproductiva en cerezo (Prunus avium L.)*. Universidad de Lleida. Recuperado de

- Hormaza, J. I., & Herrero, M. (1999). Pollen performance as affected by the pistilar genotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Protoplasma*, 208(1), 129-135.
- Hua, Z., Meng, X., & Kao, T. -h. (2007). Comparison of *Petunia inflata* S-Locus F-Box Protein (Pi SLF) with Pi SLF Like Proteins Reveals Its Unique Function in S-RNase Based Self-Incompatibility. *THE PLANT CELL ONLINE*, 19(11), 3593-3609.
- Hua, Z.-H., Fields, A., & Kao, T. (2008). Biochemical Models for S-RNase-Based Self-Incompatibility. *Molecular Plant*, 1(4), 575-585.
- Hua, Zhihua, & Kao, T.-H. (2006). Identification and characterization of components of a putative *petunia* S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell*, 18(10), 2531-2553.
- Huang, B. Q., & Yeung, E. C. (2015). Chemical and Physical Fixation of Cells and Tissues: An Overview. En E. C. T. Yeung, C. Stasolla, M. J. Sumner, & B. Q. Huang (Eds.), *Plant Microtechniques and Protocols* (pp. 23-43). Cham: Springer International Publishing.
- Igic, B., & Kohn, J. R. (2001). Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13167-13171.
- Ikeda, K., Ushijima, K., Yamane, H., Tao, R., Hauck, N. R., Sebolt, A. M., & Iezzoni, A. F. (2005). Linkage and physical distances between the S-haplotype S-RNase and SFB genes in sweet cherry. *Sexual Plant Reproduction*, 17(6), 289-296.
- INIAP. (1991). *Diagnóstico Agro-socioeconómico de la actividad lechera en la Zona de Cayambe* (p. 3).
- Intriago, D. (2013). *Evaluación de la variabilidad genética del capulí (*Prunus serotina* subsp. *capuli*) en tres provincias del Ecuador* (Tesis pregrado). Universidad San Francisco de Quito. Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2417/1/107005.pdf>

- Ioerger, T. R., Gohlke, J. R., Xu, B., & Kao, T.-H. (1991). Primary structural features of the self-incompatibility protein in solanaceae. *Sexual Plant Reproduction*, 4(2).
- Jefferies, C. J., & Belcher, A. R. (1974). A Fluorescent Brightener used for Pollen Tube Identification *In Vivo*. *Stain Technology*, 49(4), 199-202.
- Jiménez, K; Cruz,F. (2011). Incompatibilidad sexual, un mecanismo genético que evita la autofecundación y contribuye a la diversidad vegetal, 34(1), 1-9.
- Kao, T. H., & McCubbin, A. G. (1996). How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), 12059-12065.
- Kao, T. H., & Tsukamoto, T. (2004). The Molecular and Genetic Bases of S-RNase-Based Self-Incompatibility. *THE PLANT CELL ONLINE*, 16(suppl_1), S72-S83.
- Kaufmane, E., & Rumpunen, K. (2002). Pollination, pollen tube growth and fertilization in *Chaenomeles japonica* (Japanese quince). *Scientia Horticulturae*, 94(3-4), 257-271.
- Komori, T., & Nitta, N. (2005). Utilization of the CAPS/dCAPS Method to Convert Rice SNPs into PCR-based Markers. *Breeding Science*, 55(1), 93-98.
- Konieczny, A., & Ausubel, F. M. (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 4(2), 403-410.
- Kubo, K. -i., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A. M., Hua, Z., Takayama, S. (2010). Collaborative Non-Self Recognition System in S-RNase-Based Self-Incompatibility. *Science*, 330(6005), 796-799.
- Ludwig, S., Robertson, A., Rich, T. C. G., Djordjević, M., Cerović, R., Houston, L., Hiscock, S. J. (2013). Breeding systems, hybridization and continuing evolution in Avon Gorge *Sorbus*. *Annals of Botany*, 111(4), 563-575.

- Luu, D.-T., Qin, X., Morse, D., & Cappadocia, M. (2000). S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*, *407*(6804), 649-651.
- Mable, B. K. (2004). Polyploidy and self-compatibility: is there an association? *New Phytologist*, *162*(3), 803-811.
- Makovics, N., & Halász, J. (2016). Self-incompatibility system in polyploid fruit tree species- A review, *8*(1).
- Martin, F. W. (1959). Staining and Observing Pollen Tubes in the Style by Means of Fluorescence. *Stain Technology*, *34*(3), 125-128.
- Matsumoto, A., & Tsumura, Y. (2004). Evaluation of cleaved amplified polymorphic sequence markers for *Chamaecyparis obtusa* based on expressed sequence tag information from *Cryptomeria japonica*. *Theoretical and Applied Genetics*, *110*(1), 80-91.
- Matsumoto, D., Yamane, H., Abe, K., & Tao, R. (2012). Identification of a Skp1-Like Protein Interacting with SFB, the Pollen S Determinant of the Gametophytic Self-Incompatibility in *Prunus*. *PLANT PHYSIOLOGY*, *159*(3), 1252-1262.
- Mau, S. L., Raff, J., & Clarke, A. E. (1982). Isolation and partial characterization of components of *Prunus avium* L. styles, including an antigenic glycoprotein associated with a self-incompatibility genotype. *Planta*, *156*(6), 505-516.
- McClure, B. A., Gray, J. E., Anderson, M. A., & Clarke, A. E. (1990). Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*, *347*, 757.
- McCubbin, A. G., & Kao, T. (2000). Molecular Recognition and Response in Pollen and Pistil Interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *16*(1), 333-364.
- McVaugh, R. (1951). A Revision of the North American Black Cherries (*Prunus serotina* Ehrh., and Relatives). *Brittonia*, *7*(4), 279.

- Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (1998). A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 14(3), 381-385.
- Ministerio de Agricultura y Ganaderia. (1979). *Diagnostico agropecuario del area comprendida en el pida pisque - tumbaco* (p. 14).
- Murat, Bayram. (2008). Determination of pollen viability, germination ratios and morphology of eight apricot genotypes, 7(23), 4269-4273.
- National Research Council. (1989). *Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*. Washington, D.C.: National Academies Press.
- Ortega, E., & Dicenta, F. (2004). Effective pollination period in almond cultivars, 39(1), 19-22.
- Ortega, E., Sutherland, B. G., Dicenta, F., Boskovic, R., & Tobutt, K. R. (2005). Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new S alleles and correction of reported S genotypes. *Plant Breeding*, 124(2), 188-196.
- Ortega, Encarnación, Bošković, R. I., Sargent, D. J., & Tobutt, K. R. (2006). Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination. *Molecular Genetics and Genomics*, 276(5), 413-426.
- Oukabli, A., Lansari, A., Wallali, D. L., Abousalim, A., Egea, J., & Michaux-Ferriere, N. (2000). Self and cross pollination effects on pollen tube growth and fertilization in self-compatible almond *Prunus dulcis* 'Tuono'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(6), 739-744.

- Pairon, Marie; Jacquemart, Anne. (2008). Detection and Characterization of Genome-specific Microsatellite Markers in the Allotetraploid *Prunus serotina*, *133*(3), 390-395.
- Radičević, S., Cerović, R., Nikolić, D., & Đorđević, M. (2016). The effect of genotype and temperature on pollen tube growth and fertilization in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Euphytica*, *209*(1), 121-136.
- Radunić, M., Jazbec, A., Ercisli, S., Čmelik, Z., & Ban, S. G. (2017). Pollen-pistil interaction influence on the fruit set of sweet cherry. *Scientia Horticulturae*, *224*, 358-366.
- Ramírez, F., & Davenport, T. L. (2016). The phenology of the capuli cherry [*Prunus serotina* subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh] characterized by the BBCH scale, landmark stages and implications for urban forestry in Bogotá, Colombia. *Urban Forestry & Urban Greening*, *19*, 202-211.
- Sassa, H., Hirano, H., Nishio, T., & Koba, T. (1997). Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). *The Plant Journal*, *12*(1), 223-227.
- Semagn, K; Bjørnstad, Å; Ndjiondjop, M. (2006). An overview of molecular marker methods for plants, *5*(25), 2540-2568.
- Shi, R., & Panthee, D. R. (2017). A novel plant DNA extraction method using filter paper-based 96-well spin plate. *Planta*, *246*(3), 579-584.
- Sonneveld, T. (2005). Loss of Pollen-S Function in Two Self-Compatible Selections of *Prunus avium* Is Associated with Deletion/Mutation of an S Haplotype-Specific F-Box Gene. *THE PLANT CELL ONLINE*, *17*(1), 37-51.
- Stephenson, A. G., Travers, S. E., Mena-Ali, J. I., & Winsor, J. A. (2003). Pollen performance before and during the autotrophic-heterotrophic transition of pollen tube

- growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1434), 1009-1018.
- Tao, R., & Iezzoni, A. F. (2010). The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Scientia Horticulturae*, 124(4), 423-433.
- Tao, R.; Yamane, H.; Sugiura, A. (1999). Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry, 3(124), 224-233.
- Thompson, R. D., & Kirch, H. H. (1992). The S locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest. *Trends in Genetics: TIG*, 8(11), 381-387.
- Tsukamoto, T., Hauck, N. R., Tao, R., Jiang, N., & Iezzoni, A. F. (2006). Molecular characterization of three non-functional S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*). *Plant Molecular Biology*, 62(3), 371-383.
- Tsukamoto, T., Potter, D., Tao, R., Vieira, C. P., Vieira, J., & Iezzoni, A. F. (2008). Genetic and molecular characterization of three novel S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3169-3185.
- Tsukamoto, T., Tao, R., & Iezzoni, A. F. (2007). PCR markers for mutated S-haplotypes enable discrimination between self-incompatible and self-compatible sour cherry selections. *Molecular Breeding*, 21(1), 67.
- Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M., Tao, R., & Hirano, H. (2003). Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *The Plant Cell*, 15(3), 771-781.
- Ushijima, K., Yamane, H., Watari, A., Kakehi, E., Ikeda, K., Hauck, N. R., ... Tao, R. (2004). The S haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-

- compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *The Plant Journal*, 39(4), 573-586.
- Watari, A, Hanada, T, & Yamane, H. (2007). A Low Transcriptional Level of S-RNase in the Se -haplotype Confers Self-compatibility in Japanese Plum, 132(3), 396-406.
- Williams, E. G., Ramm-Anderson, S., Dumas, C., Mau, S. L., & Clarke, A. E. (1982). The effect of isolated components of *Prunus avium* L. styles on in vitro growth of pollen tubes. *Planta*, 156(6), 517-519.
- Wu, J., Gu, C., Khan, A., Wu, J., Gao, Y., Wang, C., . . . Zhang, S. (2013). Molecular Determinants and Mechanisms of Gametophytic Self-Incompatibility in Fruit Trees of Rosaceae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23-68.
- Yamane, H. (2003). Self-incompatibility (S) locus region of the mutated S6-haplotype of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional pollen S allele and a non-functional pistil S allele. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2431-2437.
- Yamane, Hisayo, Ikeda, K., Ushijima, K., Sassa, H., & Tao, R. (2003). A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Plant & Cell Physiology*, 44(7), 764-769.
- Yamane, Hisayo, & Tao, R. (2009). Molecular Basis of Self-(in)compatibility and Current Status of S-genotyping in Rosaceous Fruit Trees. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 78(2), 137-157.
- Zisovich, A., Stern, R., Sapir, G., Shafir, S., & Goldway, M. (2004). The RHV region of S-RNase in the European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. *Sexual Plant Reproduction*, 17(3).

12. Tablas

Tabla 1 Alelos encontrados en los árboles seleccionados para las distintas cruzas

Árbol	Bandas	RsaI	MboI	Hinfl	Alelo
1	A	I	G	J	VII
	B	E	A-D	B	Alelo nuevo A
6	A	I	G	J	Alelo VII
	B	F	K	K	Alelo VIII
12	A	J	H	D	Alelo nuevo B
	B	F	K	K	Alelo VIII
13	A	J	H	D	Alelo nuevo B
	B	F	K	K	Alelo VIII
14	A	J	G	-	Alelo nuevo C
	B	C	F	B	Alelo nuevo D
15	A	H	J	D	Alelo IX

	B	C	F	F	Alelo XII
17	A	J	H	-	Alelo nuevo E
	B	J	H	H	Alelo I
22	A	J	H	-	Alelo nuevo E
	B	J	H	H	Alelo I

Tabla 2 Tamaño de los fragmentos generados para cada alelo S según la enzima de restricción

Alelo	RsaI	MboI	HinfI
I	879,103,98	542,447,76,15	577,503
VII	515,424,358,8	497,296,249,103,91,6 9	621,384,300
VIII	386,220,90,8	538,750	343,270
IX	453,245,95,8	710,900	411,380,10
XII	233,183,45,13,8	482	482
*A	280,120,90	290,180,90	290,220
*B	900,390,220,17 0	620,500,320	480,420,250,220

*C	1000,250,150	600,500,400,300	400,350,250,200
*D	220,200,110	450,100	270,220
*E	900,200,150	600,500,300	400,375,250,200,20 0

*Alelos Nuevos

Tabla 3 Árboles seleccionados para cada tipo de cruce

# de Árbol	Tipo de cruce
6A (madre) X 1A (padre)	Semicompatible
17A (madre) X 22A (padre)	Incompatible
1A (madre) X 17A (padre)	Compatible
13A (madre) X 12A (padre)	Incompatible
15A (madre) X 14A (padre)	Compatible

Tabla 4 Porcentaje de germinación en el estigma de diferentes cruzas a las 0 y 24 horas después de la emasculación

# de árbol	0 horas	24 horas
11 (madre) X 2 (padre)	50%	63,96%
18 (madre) X 10 (padre)	40,74%	52,51%
2 (madre) X 18 (padre)	41,92%	61,94%
10 (madre) X 11 (padre)	1,53%	48,49%

Tabla 5 Porcentaje de pistilos analizables según el tiempo y sustancia de fijación

# de árbol	2 días fijación		7 días fijación	
	Etanol al 70%	Etanol al 70% y A.A.G (3:1)	Etanol al 70%	Etanol al 70% y A.A.G (3:1)
Árbol 1	24,99%	40,27%	65,47%	62,85%
Árbol 22	9,72%	8,33%	13,88%	3,12%

Tabla 6 Porcentaje de viabilidad del polen

#Árbol	%Viabilidad Polen
1	66,94
6	55,38
12	52,70
13	81
14	88,06
15	59,42
17	77,81
22	63,87

Tabla 7 Análisis de varianza de una vía de los tubos polínicos encontrados en la zona del ovario

	DF	MS	F	P value
Tipo de cruza	3	56.524	14.35	0.000
Error	91	3.93		
Total	94			

Tabla 8 Comparación de Fisher con un nivel de confianza del 95%

Tipo de Cruza		Media
Incompatible	Individuos géneticamente emparentados	1.83 (B)
	Autopolinización	1.061 (B)
Semicompatible		0.000 (B)
Compatible		4.52 (A)

13. Figuras

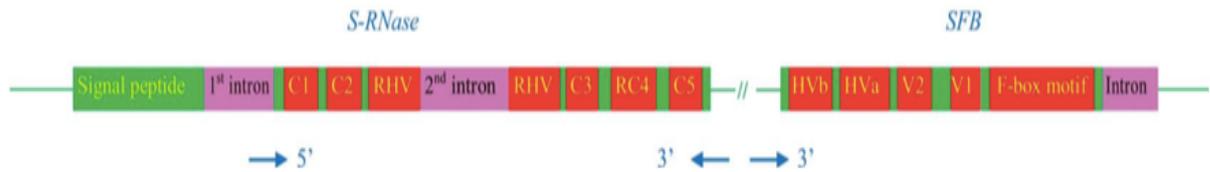


Figura 1 Estructura del Locus S (Wu et al, 2013). Conformado por el gen de la S-RNasa y el gen SFB. El gen de la S-RNasa se transcribe en sentido 5' a 3' mientras el gen SFB de 3' a 5'. El gen de la S-RNasa cuenta con 5 regiones conservadas (C1-C5) y una región hipervariable (RHV) en las regiones conservadas C2-C3. El gen SFB tiene un intrón, 4 regiones variables y una caja F.

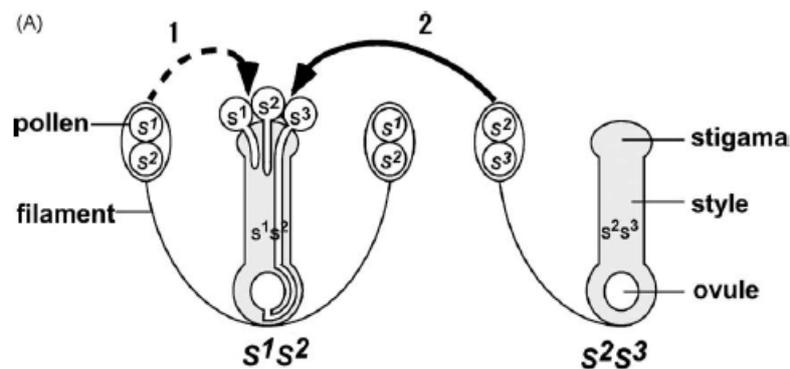


Figura 2 Sistema de incompatibilidad gametofítica(Tao & Iezzoni, 2010). Si el haplotipo del polen coincide con uno de los del pistilo, el crecimiento del tubo polínico se inhibe en el estilo. El polen con genotipo distinto al del pistilo puede generar tubos polínicos que llegan hasta el ovario.

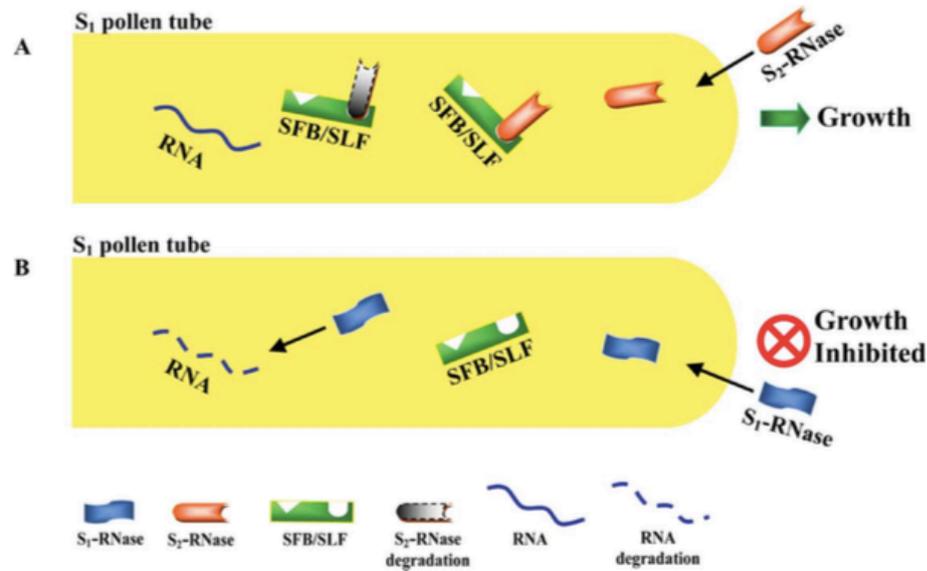


Figura 3 Mecanismo molecular de incompatibilidad gametofítica. A) En una cruce compatible entre un polen S_1 y un pistilo S_2 , la S-RNasa S_2 interactúa con el SFB y se ubiquitina mediante el sistema de enzimas de la ubiquitina, degradando esta S-RNasa, lo que permite el crecimiento del tubo de polen S_1 en el pistilo. B) En una cruce incompatible la S-RNasa 1 del estilo está libre de ubiquitinación, por lo tanto se mantiene activa y degrada el ARN del tubo polínico S_1 , que finalmente detiene el su crecimiento.



Figura 4 Flor en estado de botón tardío. Descripción para *P. serotina* subsp. *capuli* de Ramírez & Davenport (2016).



Figura 5 Flor emasculada para polinizar. Se mantiene intacto el pistilo.

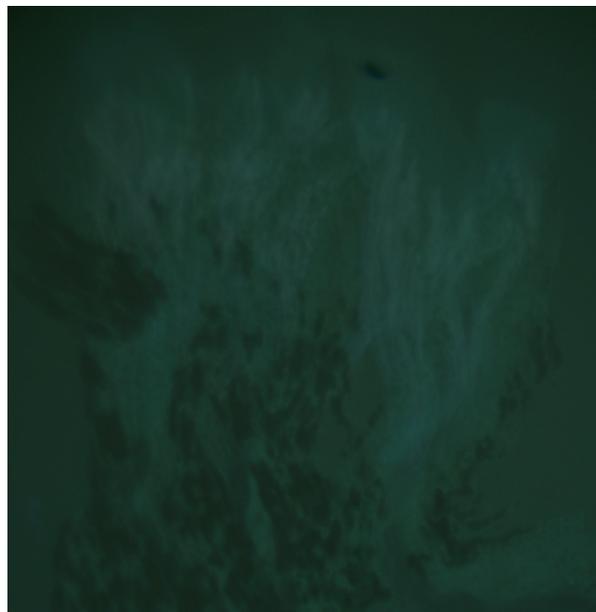


Figura 6 Pistilo control. Estigma sin granos de polen después de la emasculación



Figura 7 Pistilo analizable. Se observa claramente el desarrollo de tubos polínicos desde el estigma hasta el ovario.

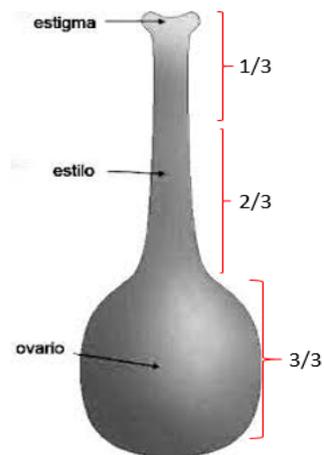


Figura 8 División pistilo. El 1/3 va del estigma hasta la mitad del estilo. El 2/3 va desde la mitad del estilo hasta antes de llegar a la zona del ovario. El 3/3 consiste en toda la zona del ovario.

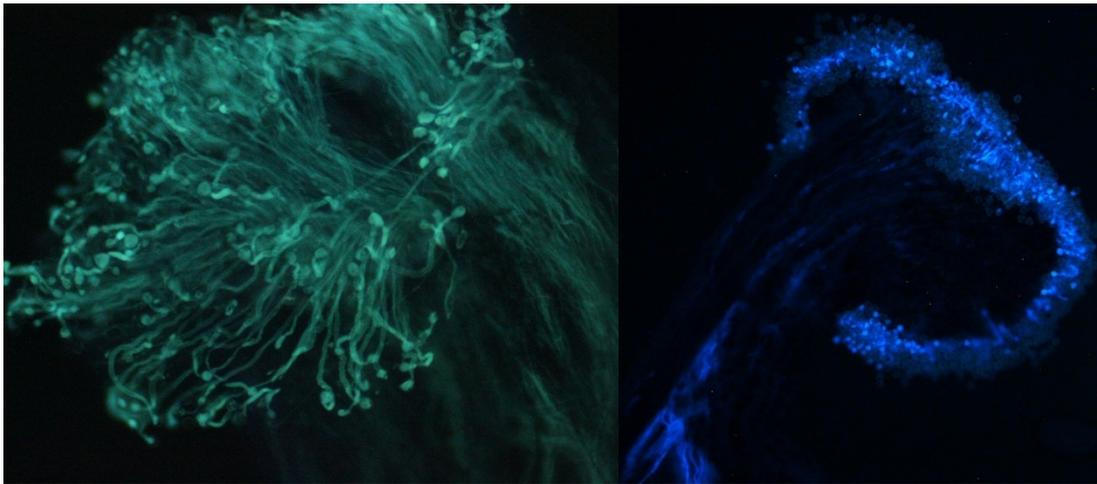


Figura 9 Tinción de pistilos con diferentes concentraciones de NaOH. A) Pistilo con NaOH 10M. B) Pistilo con NaOH 8M.

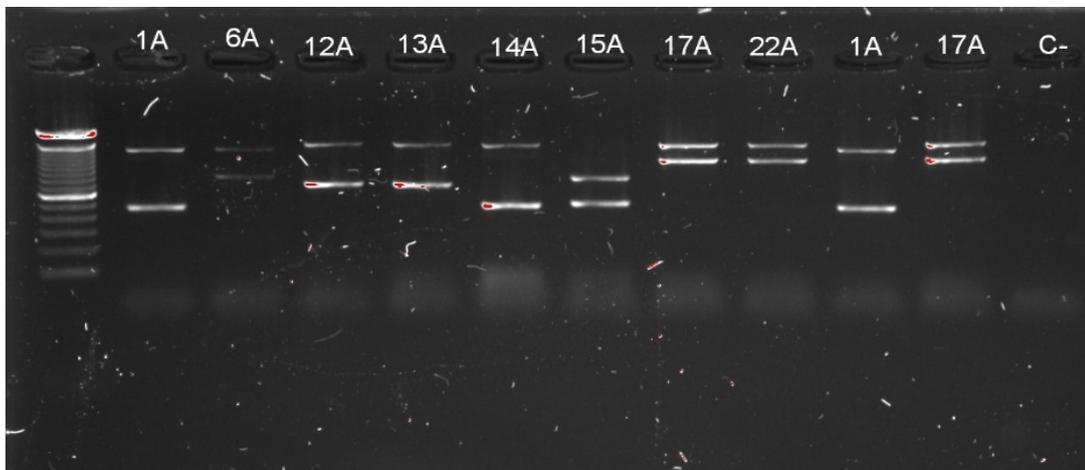
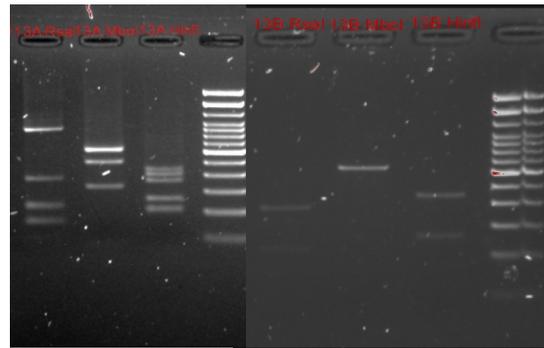
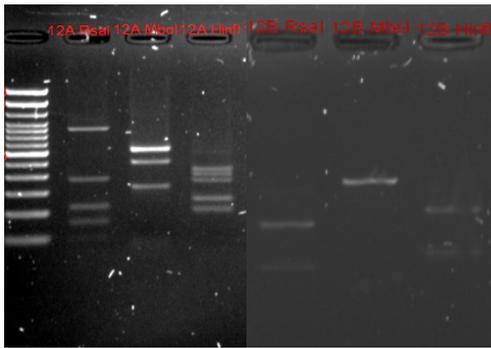


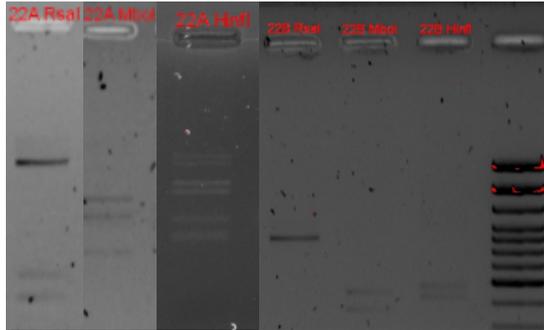
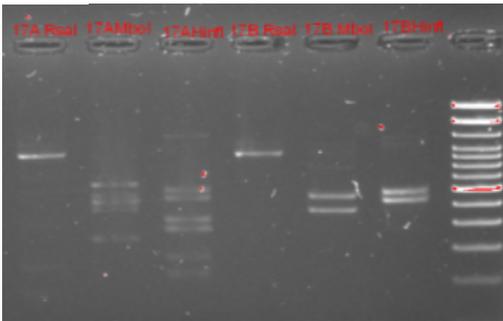
Figura 10 Amplificación región C2-C3 gen S-RNasa. Amplificación región C2-C3 gen S-RNasa de los árboles seleccionados para las cruzas. Carriles. 1. Ladder 2000pb. 2-11. Individuos seleccionados. 12. Control negativo

Cruzas Incompatibles

A.1

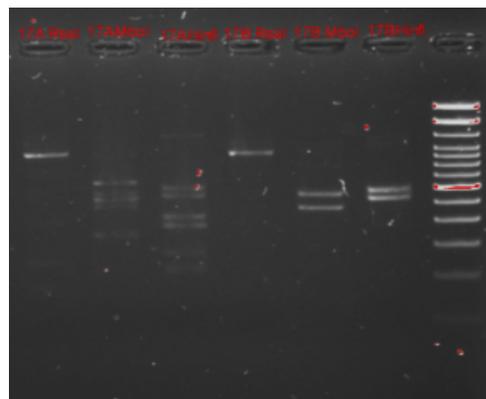
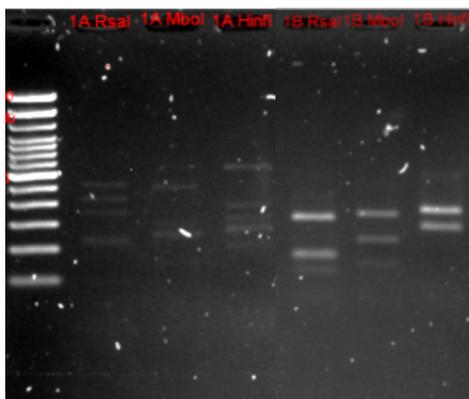


A.2



Cruzas Compatibles

B.1



B.2

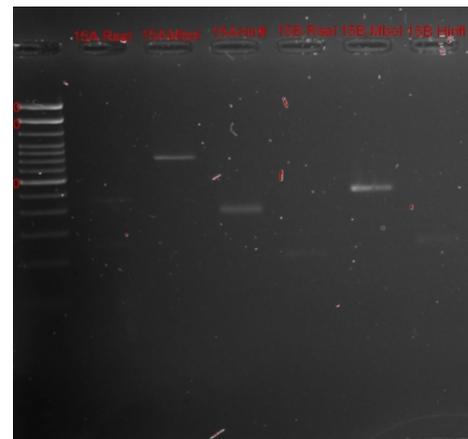
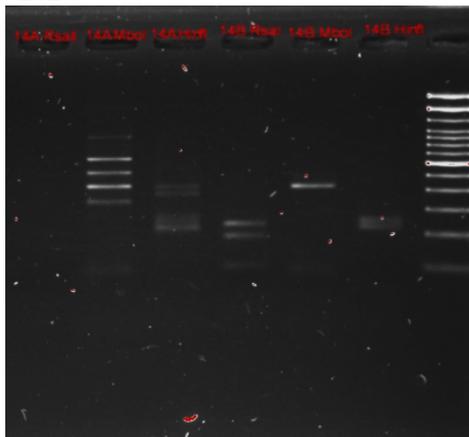


Figura 11 Digestión con las enzimas RsaI, MboI y HinfI de ADN de los individuos seleccionados para las distintas cruzas. A1. Padre individuo 12 x Madre individuo 13. A.2. Padre individuo 22 x Madre individuo 17. B.1. Padre individuo 17 x Madre individuo 1. B.2. Padre individuo 14 x Madre individuo 15. C. Padre individuo 1 x Madre individuo 6. Ladder 2000pb.

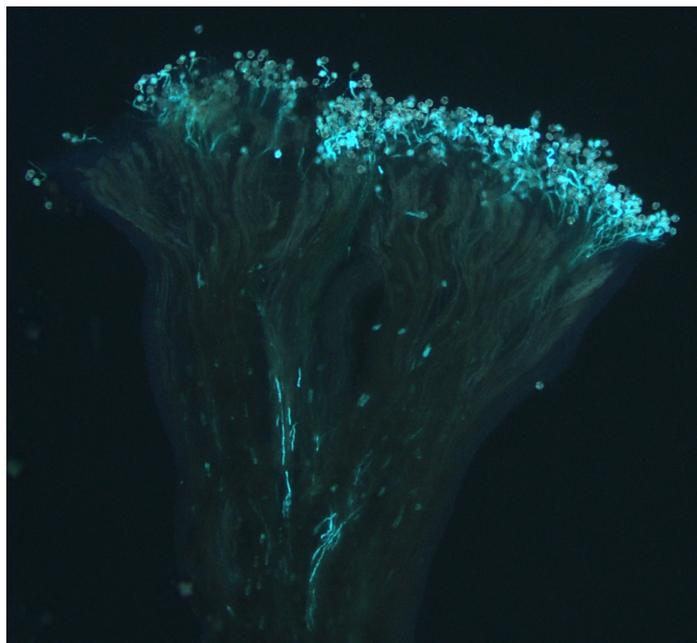


Figura 12 Pistilo de autopolinización árbol 1. El crecimiento de los tubos polínicos es inhibido en el estilo.

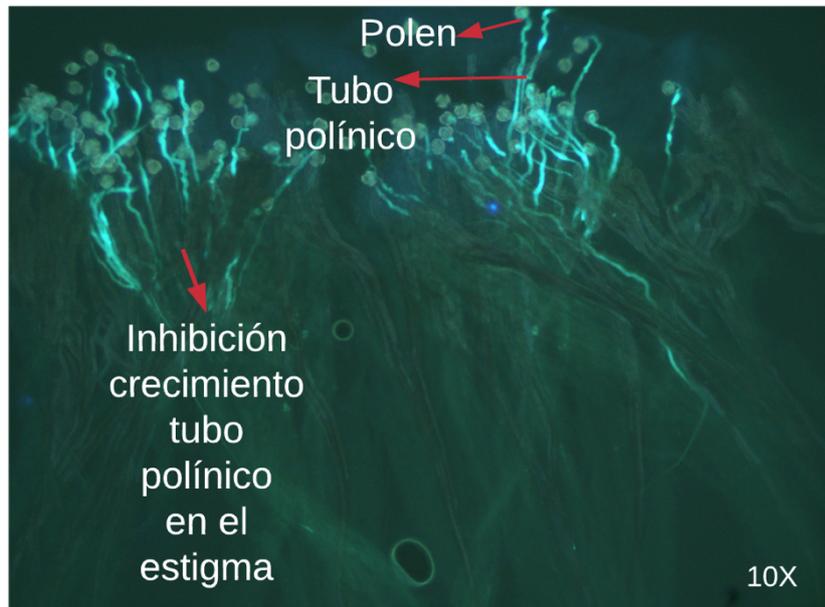


Figura 13 Pistilo de la cruz semicompatible. El crecimiento de los tubos polínicos es inhibido en el estilo.

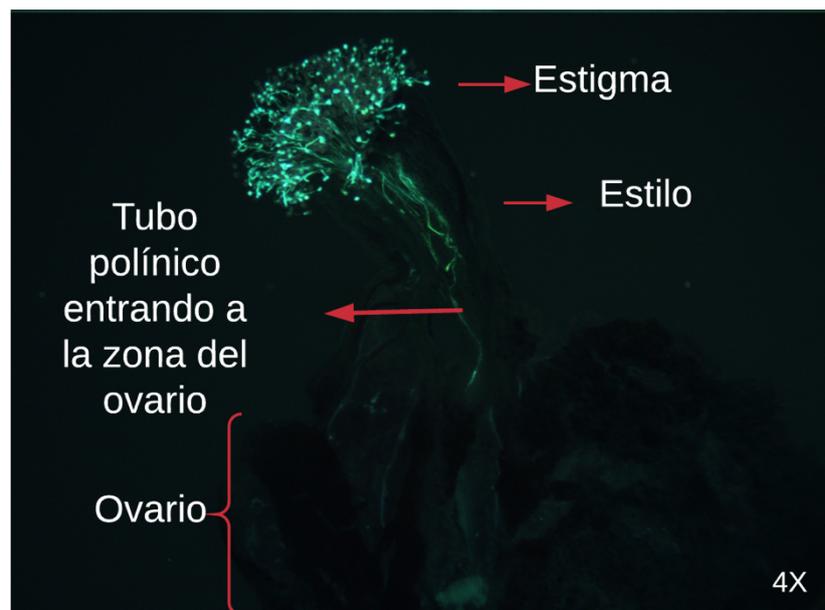


Figura 14 Pistilo de cruz compatible entre el árbol 1 y 17. Los tubos polínicos crecen a lo largo del estilo hasta entrar a la zona del ovario.

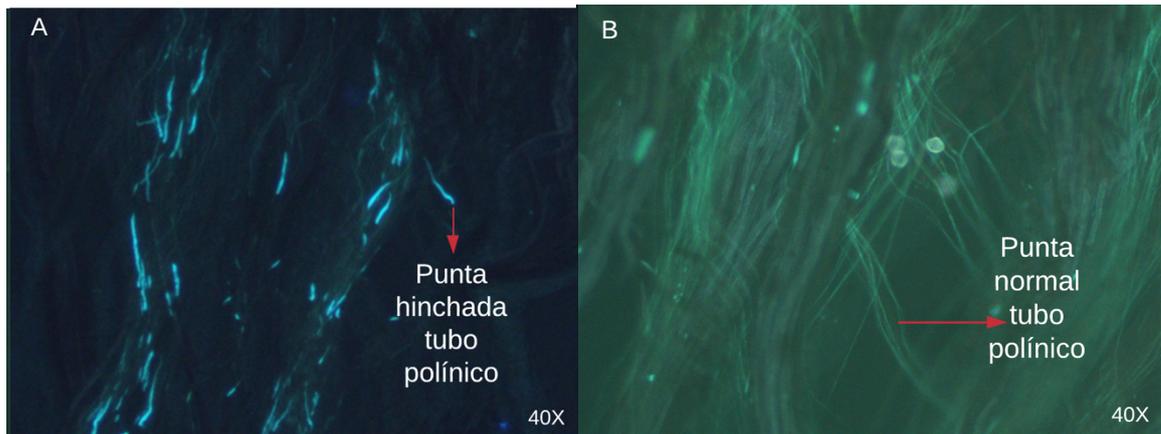


Figura 15 Tubos polínicos de cruza compatibles e incompatibles. A) Los tubos polínicos en el estilo de uno de los pistilos de la cruz incompatible entre el árbol 17 y 22 presentan la punta hinchada. B) Los tubos polínicos en el estilo de uno de los pistilos de la cruz compatible entre el árbol 1x17 no muestran una expresión morfológica de incompatibilidad.



Figura 16 Pistilo con tubos polínicos. Crecimiento de tubos polínicos desde el estigma hasta el estilo



Figura 17 Mirlo (*Turdus merula*).

14. Anexos

Anexo 1. Información Geográfica y Fenotípica de los árboles ubicados en la Hacienda “San Felipe”.

# Árbol	Coordenadas geográficas	Altitud (msnm)	Altura (m)
1	N 00.04049 W 078.15900	2776	2,5
6	N 00.04036 W 078.15908	2776	3
12	N 00.04021 W 078.15916	2776	3
13	N 00.04020 W 078.15916	2776	2,5
14	N 00.04018 W 078.15919	2776	4,5
15	N 00.04017 W 078.15919	2776	4,5
17	N 00.04012 W 078.15921	2776	3,5
22	N 00.03986W 078.15936	2776	3,5