

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Análisis de la expresión del gen de la S-RNasa en cruzas
controladas de *Prunus serotina* subsp. Capulí**

Daniela Carolina Mejía Duque

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Quito, 22 de diciembre del 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Análisis de la expresión del gen de la S-RNasa en cruzas
controladas de *Prunus serotina* subsp. Capulí**

Daniela Carolina Mejía Duque

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, PhD

Quito, 22 de diciembre de 2022

© 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 la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Daniela Carolina Mejía Duque

Código: 00201167

Cédula de identidad: 1722904727

Lugar y fecha: Quito, 22 de diciembre de 2022

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El capulí (*Prunus serotina* subsp. capulí) es un árbol de la familia Rosaceae, distribuido a lo largo de las zonas andinas de Sudamérica, tiene varios usos y propiedades, especialmente su fruto esférico pequeño con sustancias antioxidantes y antiinflamatorias que tienen la capacidad de combatir enfermedades. Se lo considera un fruto tradicional asociado a los pueblos indígenas por la preparación de bebidas sagradas, además productores nacionales utilizan el capulí para la elaboración de productos secundarios como mermeladas. Al tener una flor hermafrodita, posee un Sistema de Incompatibilidad Gametofítica (GSI) controlado por el Locus S, formado por dos genes principales conocidos como S-RNasa, hallado en el pistilo y SFB, hallado en el polen. La interacción de estos genes determinan la producción de determinadas proteínas que interfieren en la compatibilidad o incompatibilidad de una crusa. La compatibilidad se refiere a mantener alelos distintos que permiten una interacción a modo de llave y cerradura. En esta investigación, se estudió uno de los genes de este sistema, el gen de la S-RNasa. Se realizaron polinizaciones controladas entre cruas determinadas como compatibles o incompatibles en estudios anteriores. Se extrajo material genético de estas cruas para realizar RT-qPCR y obtener valores para determinar, mediante análisis estadísticos, si la expresión génica entre los pistilos polinizados y no polinizados eran significativas. También se realizaron tinciones del desarrollo de los tubos polínicos para visualizar (comprobar) si las cruas eran compatibles o no. Los resultados reportados sugieren la idea de que en especies del género *Prunus*, como es el caso del capulí, puede existir el fenómeno donde el sistema de GSI se anula, generando una compatibilidad entre cruas que se consideraban incompatibles.

Palabras clave: Capulí, *Prunus serotina*, Sistema de Incompatibilidad Gametofítica, S-RNasa, RT-qPCR

ABSTRACT

The capuli (*Prunus serotina* subsp. capuli) is a tree of the Rosaceae family, distributed along the Andean areas of South America. It has various uses and properties, especially its small spherical fruit with antioxidant and anti-inflammatory substances that have the ability to combat diseases. It is considered a traditional fruit for indigenous cultures due to the preparation of sacred drinks. In addition, domestic producers use this fruit to produce secondary products such as jams and marmalades. Capuli has a hermaphroditic flower, therefore it has a Gametophytic Incompatibility System (GSI) controlled by Locus S, formed by two main genes known as S-RNase, found in the pistil, and SFB, found in pollen. The interaction of these genes determines the production of certain proteins that interfere with the compatibility or incompatibility of a cross. Compatibility refers to maintaining different alleles that allow for a lock-and-key interaction. In this research, the S-RNase gene is being studied. Controlled pollinations were performed between crosses determined to be compatible or incompatible in previous studies. Genetic material was extracted from these crosses to perform RT-qPCR and obtain values to determine, through statistical analysis, if the gene expression between the pollinated and non-pollinated pistils were significant. Stains of the development of the pollen tubes were also carried out to visualize if the crosses were compatible or not. The reported results suggest that in *Prunus* species, as is the case of the capulí, there may be a phenomenon where the GSI system is canceled, generating a compatibility between crosses that were considered incompatible.

Keywords: Capulí, *Prunus serotina*, Gametophytic Incompatibility System, S-RNase, RT-qPCR

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	11
1.1	Características generales del capulí.....	11
1.1.1	Importancia en el Ecuador.....	11
1.2	Sistema de Incompatibilidad Gametofítica.....	12
1.2.1	Descripción y función del mecanismo.....	12
1.2.2	Estructuras genéticas implicadas en Locus S y su interacción.....	12
2	METODOLOGÍA	15
2.1	Selección de muestras.....	15
2.1.1	Árboles del estudio.....	15
2.1.2	Selección y preparación de polen y pistilos.....	15
2.2	Polinización y recolección de pistilos.....	16
2.3	Análisis genéticos.....	16
2.3.1	Extracción ARN y Obtención de cDNA.....	16
2.3.2	RT-qPCR.....	16
2.3.3	Análisis estadísticos.....	17
2.4	Efectos visibles de la expresión de la S-RNasa en los tubos polínicos.....	17
2.4.1	Tinción tubos polínicos.....	17
2.4.2	Verificación crecimiento tubos polínicos.....	17
3	RESULTADOS	18
3.1	Selección de muestras.....	18
3.2	Obtención de resultados genéticos.....	18
3.2.1	RT-qPCR.....	18
3.2.2	Análisis estadísticos.....	18
3.2.2.1	<i>Comparación de la expresión de la S-RNasa entre muestras polinizadas y no polinizadas de cada cruce</i>	18
3.2.2.2	<i>Comparación de la expresión de la S-RNasa entre las muestras polinizadas entre cruces compatibles incompatibles</i>	19
3.3	Efectos visibles de la expresión de la S-RNasa en los tubos polínicos.....	19
3.3.1	Verificación del crecimiento de los tubos polínicos.....	19
3.3.1.1	<i>Cruces incompatibles</i>	19
3.3.1.2	<i>Cruces compatibles</i>	20
4	DISCUSIÓN	21
4.1	Expresión diferencial de las cruces controladas realizadas en el estudio.....	21
4.2	Limitantes del RT-qPCR y del método $2^{-\Delta\Delta CT}$	24
5	CONCLUSIONES	25
6	TABLAS	26
7	FIGURAS	28
8	REFERENCIAS	31
9	ANEXOS	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de árboles utilizados en el estudio según la cruce.....	26
Tabla 2. Secuencias de primers utilizados en el estudio.....	26
Tabla 3. Comparación de la expresión de la S-RNasa entre muestras polinizadas y control (no polinizadas) de cada cruce.....	27
Tabla 4. Comparación de la expresión de la S-RNasa entre pistilos polinizados de muestras incompatibles y compatibles	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los pasos seguidos para el análisis genético y fenotípico del gen de la S-RNasa en <i>Prunus serotina</i>	28
Figura 2. Geles de agarosa al 2% que indica los resultados del proceso de estandarización tanto del primer como de los genes housekeeping utilizados en el RT-qPCR.....	29
Figura 3. Parte superior del pistilo (estigma) con presencia de polen donde se visualiza su fluorescencia tras la tinción con azul de anilina y representa un pistilo polinizado.....	29
Figura 4. Pistilo teñido con azul de anilina para la visualización de la fluorescencia del desarrollo de tubos polínicos (TP), donde se observa TP llegando hasta el ovario, como un TP con hinchazón que trunca su crecimiento en el estilo.	30

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Porcentajes de granos de polen que lograron el desarrollo de los tubos polínicos (TP) hasta determinadas secciones del pistilo	40
ANEXO 2: Registro de flores en los árboles de <i>Prunus serotina</i> utilizados en el estudio, desde agosto del 2020 hasta mayo del 2022, ubicados en la <i>Hacienda San Felipe</i> de Cayambe.....	41

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales del capulí

El capulí (*Prunus serotina* subsp. Capulí) es un árbol de la familia Rosaceae. Es originario de América del Norte, específicamente del sudeste de Estados Unidos y norte de México, sin embargo, ha logrado adaptarse a lo largo de la región Andina de Sudamérica (León, 2000). Está presente en zonas tanto frías como templadas, desde los 2.200 a 3.100 metros a nivel del mar (Nesom, 2003).

Se destaca por sus inflorescencias blancas de aproximadamente 1cm, de las cuales se obtiene de 10 a 20 frutos esféricos entre 2-2.5 cm por cada racimo (National Research Council, 1989). Su floración se da entre los meses de agosto a octubre, mientras que los frutos de un color verde brillante empiezan a madurar a inicios de noviembre hasta tomar tonalidades entre rojizas, marrones y negras a finales del mismo mes (Ramírez, & Davenport, 2016).

1.1.1 Importancia en el Ecuador

El capulí es una especie que tiene alto potencial comercial debido a sus múltiples usos, pues muchas de las partes del árbol son utilizables (Málaga, et al., 2009; Baños, 2017; Cueva, 2019). Con respecto a los frutos, la presencia de polifenoles funciona como antioxidantes y antiinflamatorios para combatir los efectos del cáncer, diabetes, o envejecimiento prematuro (Zavala, et al., 2006; Ruiz et al., 2018)., además de un correcto desarrollo, funcionamiento y protección del cerebro, disminuyendo el riesgo de presentar enfermedades neurodegenerativas (Torres, & Teves, 2011). Es un fruto apreciado, tanto en diversos mercados naturales internacionales, como en el Ecuador, por conservar una fuerte vinculación con los pueblos tradicionales, quienes preparan la sagrada bebida conocida como jucho (Acosta, 2019). Además de ser la fuente de ingresos de comunidades andinas por la fabricación de mermeladas y bebidas fermentadas (Ruales, 2007). Según León (2000), los mejores frutos de capulí se encuentran en el Ecuador, que se distribuyen principalmente en la zona andina (Baldeón, et al. 2013). Sin

embargo, no existen cultivos extensos controlados que puedan hacer eficiente su producción (Monteros, et al., 2013).

1.2 Sistema de Incompatibilidad Gametofítica

1.2.1 Descripción y función del mecanismo

La incompatibilidad gametofítica o *gametophytic self-incompatibility* (GSI) es un mecanismo que ha evolucionado en diversas plantas cuya flor es hermafrodita, con el propósito de conservar la diversidad genética de las especies (Kao, & Tsukamoto, 2004). Este sistema induce al rechazo del propio polen o polen genéticamente similar mediante una barrera genética-química, evitando así la formación de un cigoto (García, et al., 2013). La eficacia de esta barrera radica en la capacidad de las células del pistilo para reconocer el haplotipo S del polen. Si este haplotipo S (haploide) es el mismo que alguno de los dos haplotipos S (diploide) presentes en el pistilo, entonces el sistema se activará para inhibir el crecimiento y desarrollo del tubo polínico (TP) (Newbiggin, et al., 1993).

Dentro de la familia Rosaceae, en géneros como *Malus*, *Prunus* y *Pyrus*, se ha determinado que el GSI es controlado por el locus multialélico conocido como Locus S (Roalson, & McCubbin, 2003). Su estructura tiene dos componentes principales vinculados entre sí, que son el gen SFB expresado en el determinante masculino (polen) y el gen S-RNasa expresado en el determinante femenino (pistilo) (Yamane, & Tao, 2009). Ambos producen proteínas específicas que al relacionarse determinan la compatibilidad o incompatibilidad de una cruce (De Nettancourt, 2001).

1.2.2 Estructuras genéticas implicadas en Locus S y su interacción

Para que la dinámica funcione se debe entender la estructura e interacción de los productos de los genes de la S-RNasa y SFB. Por un lado, el gen SFB (polen) presenta 5

dominios (la región F-box, 2 regiones variables y 2 regiones hipervariables) (Ikeda, et al., 2004).

La S-RNasa es un gen que codifica las proteínas encargadas del reconocimiento del polen y activación de las ribonucleasas, que se encargan de catalizar la hidrólisis de cadenas de ARN. La estructura de este gen consiste en 5 regiones altamente conservadas (C1 a C5) y una región hipervariable entre C2 y C3 (Roalson, & McCubbin, 2003; Tao, R., & Iezzoni, A. F., 2010; Yamane, H., & Tao, R., 2019).

Las RNasas se localizan en los tejidos extracelulares del estigma, estilo y ovario (Goldraij, et al., 2006), las cuales se irán incorporando en los tubos polínicos mediante endocitosis a medida que estos se desarrollen, independientemente de tener haplotipos compatibles o no compatibles (Hua, et al., 2008). Existen dos modelos que indican cómo se involucra la S-RNasa en el sistema de incompatibilidad. En primer lugar, hay una compartimentalización de la RNasa en la vacuola de los tubos polínicos, esto quiere decir que independientemente del haplotipo que tenga tanto el polen como el pistilo, la proteína quedará almacenada hasta dar paso a la reacción desencadenada por la cruce correspondiente. En el caso de ser compatible, las S-RNasas no ejecutarán su función de degradación porque quedarán retenidas en la vacuola sin ejercer toxicidad (McClure, 2009). Mientras que, el segundo modelo se basa en la degradación de la S-RNasa por ubiquitinación. La región F-box del gen SFB participa en la vía de degradación proteica liderada por el proteosoma 26s que marcan las S-RNasas que comparten el mismo haplotipo S con el SFB del polen a través de las enzimas de tipo E3 (Moon, & Estelle, 2004; Hua, et al., 2008; Wu, et al., 2013).

En ambos casos, se demuestra que, en cruces incompatibles, las S-RNasas quedarán activas generando un efecto citotóxico para degradar a los tubos polínicos y evitar su fecundación (Hua, et al., 2008; Wu, et al., 2013).

En esta investigación se plantea cuantificar y comparar la expresión del gen de la S-RNasa de cruzas controladas (compatibles e incompatibles) del capulí mediante RT-qPCR, para esclarecer su función en el sistema de incompatibilidad gametofítica (GSI), tanto desde un análisis genético como fenotípico.

2. METODOLOGÍA

La metodología empleada en esta investigación se esquematiza en la Figura 1.

2.1 Selección de muestras

2.1.2 Árboles del estudio

Los árboles pertenecen a la Hacienda *San Felipe* ubicada en Cayambe (N 00.04049 W 078.15900), donde la temperatura oscila entre 10 y 20 °C durante todo el año. Los árboles fueron seleccionados a partir de estudios previos, donde Correa (2018) estableció marcadores moleculares CAPS para definir los alelos del capulí, y Baquero (2018) los usó como herramienta molecular para determinar los haplotipos de cada individuo de la Hacienda y posteriormente establecer cruzas (Tabla 1). Se tomaron en cuenta 4 cruzas, donde 2 fueron compatibles (1x17; 15x14) y 2 incompatibles: la crusa (17x22) y la autopolinización (17x17). El árbol 17 tiene un interés especial en la investigación ya que en estudios previos se observó como el GSI presenta algunas anomalías morfológicas (Baquero, 2018; Gordillo, et al., 2020). Esto podría indicar que la reacción de incompatibilidad se rompe y permite el crecimiento de tubos polínicos, a pesar de expresar el mismo haplotipo S (Kakui, et al., 2011).

2.1.2 Selección y preparación de polen y pistilos

La etapa fenológica para la recolección de flores se encuentra entre el estadio F y G, que son botones cerrados a punto de abrirse para la fecundación, esto para evitar contaminación con polen ajeno (Ramírez, & Davenport, 2016). Para la obtención del polen, a 50 flores de cada árbol 'donador', se les retiró las anteras, que fueron puestas en bolsas de papel durante 48h (Radičević, et al., 2016). El polen fue almacenado a 4°C y se verificó que tuviera un 80% de viabilidad con una tinción de Acetocarmín (Asma, 2008; Baquero, 2018). Para la obtención de pistilos, se emascularon 120 flores de cada árbol 'receptor', de los cuales 60 fueron destinados para ser polinizados y 60 se mantuvieron como control (no polinizados) (Tabla 1).

2.2 Polinización y recolección de pistilos

Las polinizaciones se realizaron 24 horas después de la emasculación, manteniendo tanto a los pistilos polinizados como a los pistilos control bajo las mismas condiciones. En las cruzas incompatibles, se realizaron 2 tipos distintos de polinización; el uno catalogado como ‘cruza’ que consistió en utilizar polen caracterizado por los mismos alelos del pistilo, mientras que el otro fue una ‘autopolinización’ (Tabla 1). Luego de 48 horas, los pistilos fueron recolectados (Ortega, et al., 2002) y 100 (50 polinizados/50 control) se destinaron para los análisis genéticos los cuales se conservaron a -80 °C para preservar el ARN, mientras que los 20 sobrantes (10 polinizados/10 control) se almacenaron en etanol al 70% a 4°C (Baquero, 2018) para realizar análisis fenotípicos.

2.3 Análisis genéticos

2.3.1 Extracción ARN y Obtención de cDNA

Para la extracción del ARN de los pistilos polinizados y control de cada una de las cruzas se utilizó el protocolo de Gambino, et al. (2008) y Gómez, et al. (2015). Además, se realizaron las siguientes modificaciones: se agregó 2.6uL de Glycoblue durante la precipitación con isopropanol frío 0.7 vols con el fin de teñir al pellet, y la resuspensión final se hizo en un volumen final de 15uL de agua DEPC. El cDNA se obtuvo siguiendo el protocolo de Pazmiño (2018), desde el paso de ARN libre de DNAsas hasta el uso de la enzima transcriptasa inversa, con un volumen final de 20uL.

2.3.2 RT-qPCR

Los primers sintetizados fueron seleccionados a partir de Gómez, et al., (2019) (Tabla 2), al igual que los candidatos a gen housekeeping; 18s, RPII y Actina (Figura 2). Para la selección del gen housekeeping óptimo, se escoge aquel con menos cambios en la expresión en los diferentes tratamientos, cuyos Cq tengan una línea base de expresión menor a los 30 ciclos y no varíen en más de 2 decimales (Kozera, et al., 2013). Se ocupó el termociclador para PCR en tiempo real CFX96 TOUCH™ Bio-Rad, programado con los pasos detallados en Erazo (2019).

2.3.3 Análisis estadísticos

En el RT-qPCR se realizaron 3 réplicas para la evaluación de los genes; S-RNasa y RPII, en las muestras polinizadas y no polinizadas de cada cruce. Por cada cruce, los valores Cq fueron analizados mediante cuantificación relativa con la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Luego, se normalizaron los datos en el software Minitab 18. Se realizó una prueba T-de Student para evaluar si entre pistilos polinizados y no polinizados había una diferencia de expresión estadísticamente significativa. Por otro lado, con un ANOVA, se estudió si la expresión diferencial entre las muestras polinizadas de las cruces incompatibles y compatibles eran estadísticamente significativas, tomando en cuenta un valor p menor a 0.05 (Molina, 2017).

2.4 Efectos visibles de la expresión de la S-RNasa en los tubos polínicos

2.4.1 Tinción tubos polínicos

Se tiñeron todos los pistilos utilizando la metodología de Baquero (2018), realizando algunos cambios de tiempo. Se dejó actuar el 10M NaOH durante 1 hora, para luego lavar los pistilos hasta que quedaran casi transparentes, para que el azul de anilina pueda teñir la calosa (Jefferies, & Belcher, 1974) durante 2 horas. La calosa es un polisacárido presente tanto en las paredes de los TP como alrededor de los granos de polen. Posteriormente, se prepararon placas de 8-10 pistilos polinizados y 8-10 pistilos no polinizados, fijados con glicerol (Baquero, 2018).

2.4.2 Verificación crecimiento tubos polínicos

Se observaron las placas en un cuarto oscuro bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse Si), con la cámara (Mshot MS60), en el programa Am Scope. Se observó si las muestras tenían polen en el estigma, luego se dividió a cada pistilo en 3 secciones (Figura 4) para obtener el porcentaje de desarrollo de los TP (Tabla 4). La fluorescencia se da porque la calosa, que se une con el azul de anilina al momento de la tinción, otorga una imagen verde azulada cuando la placa con los pistilos teñidos es iluminada con luz azul o ultravioleta (Radičević, et al., 2016).

3. RESULTADOS

3.1 Selección de muestras

En la Tabla 1, se observa los árboles escogidos para el análisis, donde se detalla los individuos receptores y donadores de cada cruza; 2 cruza compatibles (diferente haplotipo S) y 2 cruza incompatibles (mismo haplotipo S) (Baquero, 2018; Gordillo et al., 2020). Todos los donadores presentaron una viabilidad del polen mayor al 80%.

3.2 Obtención de resultados genéticos

3.2.1 RT-qPCR

Los primers seleccionados de Gómez (2019), fueron probados tras un ensayo de PCR y amplificados en un gel de agarosa al 2% para obtener la banda en el tamaño deseado de 118pb. (Figura 2a). Se obtuvo los amplicones para los genes housekeeping analizados en los tamaños esperados; *RPII*: 128pb, *Actina*: 1090pb y *18s*: 91pb, bajo la gradiente de temperatura de 54 a 58 °C (Figura 2a). Además, tras un ciclado de RT-qPCR, se verificaron los valores Cq, donde el gen RPII arrojó los valores más estables de 26.30, 26.37 y 26.05, por lo que éste se lo utilizó para la normalización de los datos, al igual que en Gómez (2019).

3.2.2 Análisis estadísticos

3.2.2.1 Comparación de la expresión de la S-RNasa entre muestras polinizadas y control (no polinizadas) de cada cruza

En base a los valores *p* de la prueba T-de Student, se calculó una mayor expresión de la S-RNasa en los pistilos polinizados en comparación a los no polinizados (control). Esto indica que se adhirió polen en el estigma, iniciando la interacción (pistilo-polen) que activa el sistema de GSI.

Sin embargo, a nivel estadístico, se determinó que 3 (17x17; 17x22; 15x14) de las 4 cruzas, no son estadísticamente significativas. A excepción de la crusa compatible 1x17, que obtuvo un valor p de $0.011 < 0.05$, mostrando que efectivamente la expresión diferencial de los pistilos polinizados es mayor. El hecho de ser estadísticamente significativo indica que el gen de la S-RNasa en esta crusa tuvo una expresión claramente diferenciada entre pistilos polinizados y no polinizados.

3.2.2.2 Comparación de la expresión de la S-RNasa entre las muestras polinizadas entre cruzas compatibles e incompatibles

En la Tabla 4, se observa la relación de la expresión entre las cruzas compatibles y las incompatibles. Con respecto a los datos numéricos, se ve que las cruzas incompatibles tienen una media de 1.391 y las compatibles un valor menor de 0.839. Al comparar estos datos, tras la prueba ANOVA, el valor p que se obtuvo fue de $0.22 < 0.05$, mostrando que no hay una diferencia significativa en la expresión de la S-RNasa.

3.3 Efectos visibles de la expresión de la S-RNasa en los tubos polínicos

3.3.1 Verificación del crecimiento de los tubos polínicos

Las observaciones de los pistilos se resumen en el Anexo 1. Se conoce que un pistilo ha sido polinizado cuando se observa polen en el estigma (Figura 3) y que los tubos polínicos han truncado su crecimiento cuando se visualiza una hinchazón al final del tubo, acompañado del cese de la fluorescencia (Figura 4).

3.3.1.1 Cruzas incompatibles

En la crusa 17x17 (Anexo 1), se verificó un alto porcentaje de crecimiento de TP tanto en la primera (estigma) como segunda parte (estilo) del pistilo con 38,89% y 50%, respectivamente. Mientras que, a la tercera parte del pistilo (ovario) solamente el 11% de TP

lograron desarrollarse. En los pistilos de la muestra control también se registró un crecimiento alto del 68,42% hasta el estigma.

En la cruz 17x22 (Anexo 1), se registró un 23,09% de TP creciendo hasta la primera parte del pistilo (estigma), un 46,15% que se desarrolló hasta la segunda parte (estilo), y solamente un 7,69% que llegó hasta la tercera parte (ovario). Los resultados del control se asemejan a la cruz 17x17, con un crecimiento de 66,66% hasta el estilo, que posteriormente se vio truncado en su avance hasta el ovario.

3.3.1.2 Cruzas compatibles

En la cruz 1x17 (Anexo 1), se visualizó que el 18,2% de los TP creció hasta el estigma, y el 45,5% llegó hasta el estilo, mientras que ningún TP continuó su recorrido hasta el ovario. Al observar los pistilos control, donde no debería haber la presencia de polen ni el crecimiento de TP, se reporta un leve crecimiento del 9,1% de TP solamente hasta la primera parte (estigma).

En la cruz 15x14 (Anexo 1), en los pistilos polinizados, no se logró observar ni presencia de polen en el estigma ni desarrollo de TP a ningún nivel del pistilo, mientras que el control igualmente se reporta ausencia total de crecimiento de TP.

4. DISCUSIÓN

4.1 Expresión diferencial de la S-RNasa en cruzas controladas

Estudios previos han demostrado que el Locus S implicado en el Sistema de Incompatibilidad Gametofítica (GSI) tiene una estrecha relación en la dinámica de los genes S-RNasa y SFB para garantizar que una craza sea compatible o incompatible (García, et al., 2013). Por eso, la presente investigación se centró en el estudio de la expresión del gen de la S-RNasa. Este gen codifica proteínas con actividad ribonucleasa para evitar el desarrollo de los granos de polen (Yamane, & Tao, 2009). Aunque en especies *Prunus* como *P. avium*, *P. armeniaca*, *P. dulcis*, *P. saliciana*, entre otras, ha sido reportada una posible autocompatibilidad por la ruptura del sistema GSI ((Cachi, 2011; Halász, 2007; Gómez, et al., 2019; Kakui, et al., 2011; Gu, et al., 2015).

Comparando la expresión de la S-RNasa en cruzas compatibles e incompatibles, se espera tener una menor expresión en cruzas compatibles, ya que la interacción entre el pistilo y el polen con haplotipos distintos formarán los complejos proteicos que degradarán a las S-RNasas, evitando la hidrólisis de ARN, lo que permite el crecimiento de los TP (De Nettancourt, 2001). Los resultados presentados en la Tabla 4, muestran una diferencia numérica que concuerda lo expuesto, aunque estadísticamente hablando, la expresión que se obtuvo no fue significativa entre cruzas compatibles e incompatibles. De forma más específica, este resultado se puede explicar desglosando por cada craza.

En las cruzas incompatibles, se sugiere que posiblemente el sistema de incompatibilidad se rompe ya que el porcentaje de los tubos polínicos (TP) llegan hasta el ovario, específicamente en aquellas cruzas implicadas con el individuo 17 (17x17 y 17x22) (Anexo 1). En los experimentos realizados por Gordillo, et al. (2020), se observa un comportamiento similar en los pistilos polinizados de las mismas cruzas (17x17 y 17x22). Donde se reporta un porcentaje alto de desarrollo de TP hasta el estilo y luego evidentemente

disminuye la cantidad de éstos al llegar al ovario. Aun así, el hecho de que un TP logre llegar hasta el ovario, no implica una fecundación exitosa.

Esta singularidad también se la observa en las muestras no polinizadas (control) de las cruzas incompatibles, donde los TP presentan porcentajes altos de crecimiento hasta el estilo. En las muestras control (17x17 y 17x22), el árbol 17 actúa como el receptor del polen, entonces, al momento de realizar la emasculación, algo de polen pudo permanecer en el estigma de los pistilos y desarrollar TP que llegaron hasta el ovario. En el primer caso, (17x17), que es una autopolinización, posiblemente los pistilos utilizados se encontraban en una fase receptiva (Ramírez, & Davenport, 2016), lo que puede aumentar el éxito de crecimiento de TP. Algo similar sucede con los pistilos no polinizadas de la craza 17x22, donde el árbol 17 también es el receptor por lo que polen propio puede quedar en el estigma. En la literatura se ha reportado que este tipo de comportamiento se puede dar por una pérdida de funcionalidad de los genes implicados en el GSI, tanto en la S-RNasa como en el SFB debido a diversas mutaciones en los alelos S, volviéndola una craza potencialmente viable (Yamane, et al., 2001; Hauck, et al., 2002). Otras investigaciones de la especie *Prunus*, igualmente respaldan resultados sobre la autocompatibilidad a través de la observación de TP con microscopía de fluorescencia. Đorđević et al., (2010) reportan que 13 de los 18 cultivares estudiados de *P. domestica* tuvieron TP que alcanzaron al menos la base del estilo. Al igual que, Milatović, et. al (2010), que indican que 3 de 8 cultivos de *P. armeniaca* registraron este fenómeno de autocompatibilidad con crecimiento de TP.

Ahora se analizaron los resultados de las cruzas compatibles (1x17 y 15x14). En el caso de la 1x17, los datos arrojaron una diferencia significativa en la expresión de la S-RNasa entre pistilos polinizados y no polinizados, indicando que la expresión diferencial de los pistilos polinizados es mayor. Igualmente es importante recalcar que en la craza 1x17 el árbol receptor es el 1, por lo que no se espera ninguna anomalía explicada previamente con respecto al individuo 17. Con respecto a la craza 15x14, aunque la diferencia de la expresión del gen no

sea significativa, existe una mayor expresión de pistilos polinizados en comparación a los no polinizados. Si se relacionan estos datos con el análisis fenotípico de esta cruza 15x14 (Anexo 1), se ratifica que no se observó polen a pesar de que los pistilos fueron polinizados. Esto indica que algunos factores influyeron en la polinización. Posiblemente los pistilos no fueron receptivos al polen colocado. La receptividad hace referencia a la habilidad del estigma para favorecer la germinación de polen viable (Yi, et al., 2006). A su vez, la receptividad se puede ver afectada por la temperatura. Según Hedhly, et al. (2003), el éxito de una fertilización también se puede deber a la temperatura sometida a lo largo del proceso, desde la receptividad del estigma hasta el desarrollo completo del TP. Generalmente, cultivares de *Prunus* al estar expuestos a temperaturas altas, mayores a 23-25°C, reducen tanto la cantidad de granos de polen que se adhieren al estigma, como la velocidad de crecimiento de TP tras la polinización (DeCeault, & Polito, 2008). Se debe tomar en cuenta que las muestras son traídas de Cayambe, donde la temperatura oscila de los 8°C en la noche y alcanza los 20°C a medio día. En cambio, en el cuarto de cultivo donde se realizaron las polinizaciones, la temperatura promedio es de 23°C, que podría afectar el rendimiento de los TP, pero sin afectar por completo su germinación, como en el caso de la cruza 1x17.

Otro factor relevante para tomar en cuenta con respecto a la receptividad es el estadio de recolección de las inflorescencias. Cuando las flores se encuentran en la etapa recomendada, éstas están próximas a abrirse (Ramírez, & Davenport, 2016), por lo tanto, se encuentran más receptivas, secretando sustancias que ayudan a la germinación del polen (Yi, et al., 2006). Los datos que se presentan en el Anexo 2 indican que, en los distintos meses en los que se recolectaban las muestras para hacer diversos ensayos, existía escasez de flores. Por esta razón, no se logró realizar suficientes repeticiones de ensayos de polinización para obtener resultados analizables, específicamente en la cruza 15x14.

Es importante mencionar que los resultados reportados en esta investigación solo indican una parte del estudio global que se debería realizar con respecto al mecanismo GSI. Por

eso, es necesario llevar a cabo un estudio que involucre la participación del gen SFB, el cual es el encargado de degradar proteínas a través del proteosoma 26. Este gen ubiquitina o marcan a las proteínas que son genéticamente iguales para que sean degradadas (Sullivan, et. al., 2003; Cardozo & Pagano, 2004). Al igual que estudiar otros complejos proteicos, involucrados en este proceso como SCF-E3, los cuales se encargan de marcar la proteína a ser degradada a través de un sitio de reconocimiento específico para las S-RNAsas, que posteriormente será ubiquitinada por el SFB (Sonneveld, et. al., 2005). Mutaciones por fuera del Locus S también han sido discutidas por generar un impacto (Tsukamoto, 2003; Hancock, 2005; Li, et al, 2020), como el gen que codifica para la proteína de la glicina que contribuye en la activación de la S-RNasa, ya que la sustitución de alguno de los alelos genera cambios genéticos y conduce a una falla en la autoincompatibilidad (Li, et al, 2020).

4.2 Limitantes del RT-qPCR y del método $2^{-\Delta\Delta CT}$

La literatura reporta que existen algunos limitantes al utilizar tanto el RT-qPCR como el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para el análisis estadístico de los datos obtenidos en los experimentos. En este caso, resultó complicado recolectar más cantidad de material genético debido a las diferentes épocas en las que se realizan los experimentos y la falta de flores en todos los meses del año. Esto limitó la cantidad de ARN que posteriormente sería transformada en cDNA para realizar los ensayos de RT-qPCR. Por otro lado, con respecto a las limitaciones del método $2^{-\Delta\Delta CT}$, es una fórmula que no toma en cuenta la efectividad de la reacción de amplificación. Determina directamente que la eficiencia en todas las muestras es uniforme en un 100%, pues únicamente asume condiciones óptimas y controladas. No se considera que son muestras biológicas que por diversos factores pueden alterar su expresión; ya sea por la presencia de potenciadores o inhibidores de la reacción PCR, en los primers o en la extracción de ARN (Rao, et al., 2013). Rao et.al, (2013) reportan que los rangos de variaciones de efectividad pueden provocar una distorsión en los resultados que genera un error de hasta 4 veces en la diferencia de expresión.

5. CONCLUSIONES

- Se cuantificó y comparó la expresión del gen de la S-RNasa de distintos tipos de cruzas controladas del capulí.
- En el caso del capulí, para lograr una producción eficiente es importante estudiar los diferentes componentes moleculares y los mecanismos implicados en su reproducción. Así desarrollar programas de mejoramiento genético, lo que implica un estudio del GSI y los genes que regulan la compatibilidad o incompatibilidad entre individuos en *Prunus serotina*.
- Se comprueba la participación del gen de la S-RNasa en el GSI, aún así se debe estudiar la expresión del gen SFB que compruebe el rompimiento de la reacción de incompatibilidad, permitiendo el crecimiento de tubos polínicos, a pesar de expresar el mismo haplotipo S.
- Se verificó un comportamiento anómalo del árbol 17, que posiblemente implique un rompimiento de la incompatibilidad, lo que permite el crecimiento de tubos polínicos, fenómeno estudiado en otras especies de *Prunus* como *P. avium*, *P. armeniaca*, *P. dulcis*, *P. pyrifolia* y *P. saliciana*.
- Resulta necesario realizar cruzas controladas en campo para reportar el éxito de fecundidad de las cruzas que reportaron crecimiento de tubos polínicos hasta el ovario (cruza 17x17 y 17x22) en los ensayos en el laboratorio.
- Es importante escoger las flores en el estadio correcto para realizar polinizaciones exitosas, pues esto puede determinar qué tan receptivos son los pistilos para realizar los ensayos y determinar la capacidad de estimular la germinación de polen.

6. TABLAS

Tabla 1. Clasificación de árboles utilizados en el estudio según la cruza

Tipo de cruza	Árboles del estudio		Rango de viabilidad polen
	Receptor (pistilo)	Donador (polen)	
<i>Autoincompatible</i>	17	17	87-92%
<i>Incompatible</i>	17	22	89-91%
<i>Compatible</i>	1	17	87-92%
<i>Compatible</i>	15	14	82-89%

Tabla 2. Secuencias de primers utilizados en el estudio

Gen	Especie referencial	Primer		Referencia
		Forward	Reverse	
S-RNasa	<i>Prunus dulcis</i>	TGCACTGGGTCGCAATTTAA	TGTTCCACTCGTCTTCCCAA	Gómez, et al., 2019
RPII	<i>Prunus dulcis</i>	TGAAGCATACACCTATGATGA TGAAG	CTTTGACAGCACCAGTAGAT TCC	Tong, et al., 2009

Tabla 3. Comparación de la expresión de la S-RNasa entre muestras polinizadas y control (no polinizadas) de cada crusa

Cruzas	T-de Student	Promedio de la expresión		Relación de la expresión de las polinizadas en base al control
		Control	Polinizadas	
17x17	0.373	3.057	4.571	1.495
17x22	0.117	21.884	113.331	5.179
1x17	0.011*	1.085	17.281	15.926
15x14	0.365	1.915	3.168	1.654

*Estadísticamente significativo

Tabla 4. Comparación de la expresión de la S-RNasa entre pistilos polinizados de muestras incompatibles y compatibles

Tipo de crusa	Media	Valor P
Incompatible	1.391	0.220
Compatible	0.839	

7. FIGURAS

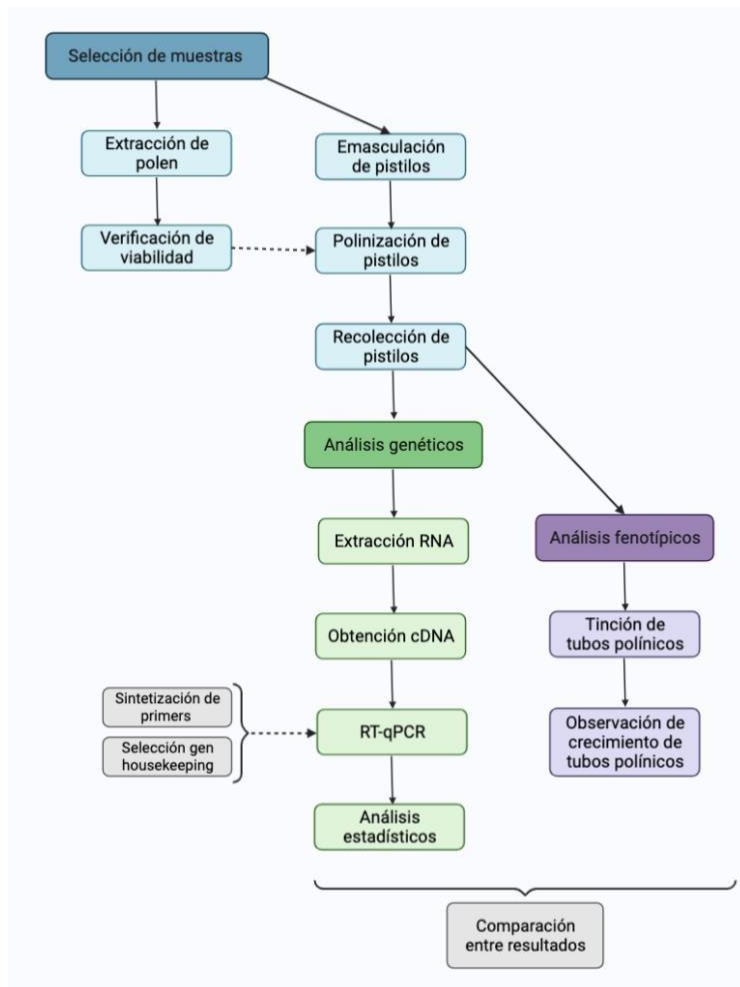


Figura 1. Esquema de los pasos seguidos para el análisis genético y fenotípico del gen de la S-RNasa en *Prunus serotina* (BioRender, 2022).

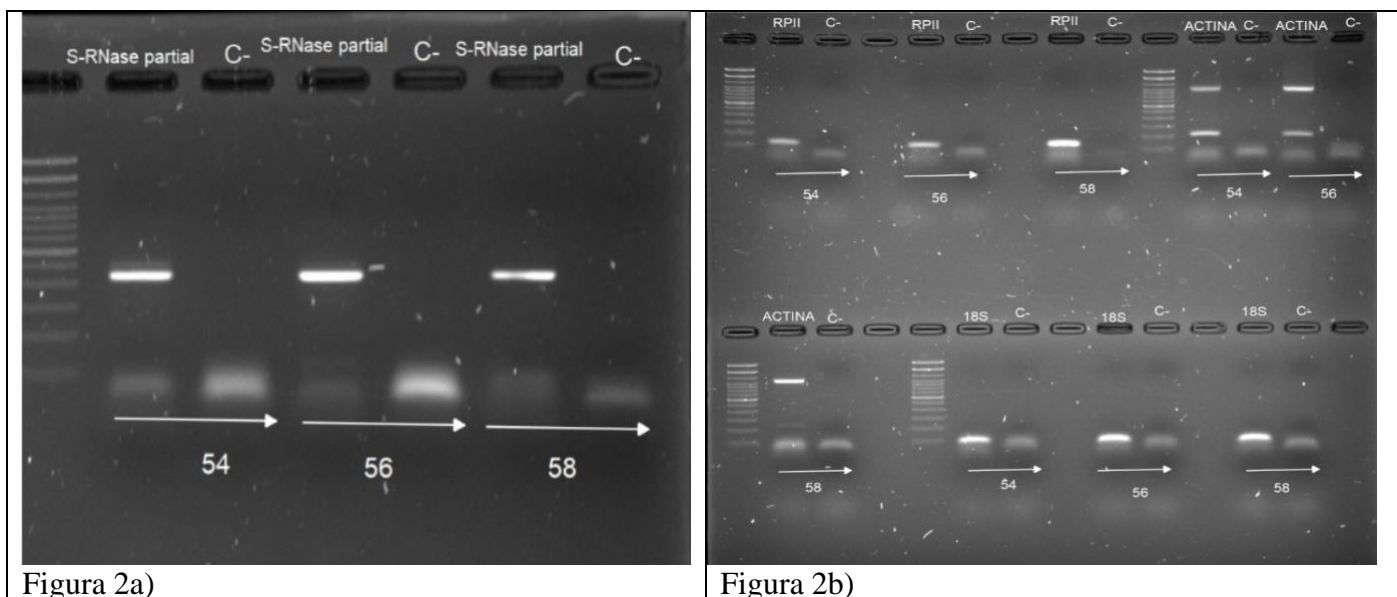


Figura 2. Geles de agarosa al 2% que indica los resultados del proceso de estandarización tanto del primer como de los genes housekeeping utilizados en el RT-qPCR.

- a) Amplificación del primer S-RNase Partial con un tamaño esperado de 118pb tras un gradiente de temperatura de 54 a 58 °C.
- b) Amplicones con los tamaños esperados de cada gen housekeeping (*RPII*: 128pb, *Actina*: 1090pb y *18s*: 91pb), con un gradiente de temperatura de 54 a 58 °C.

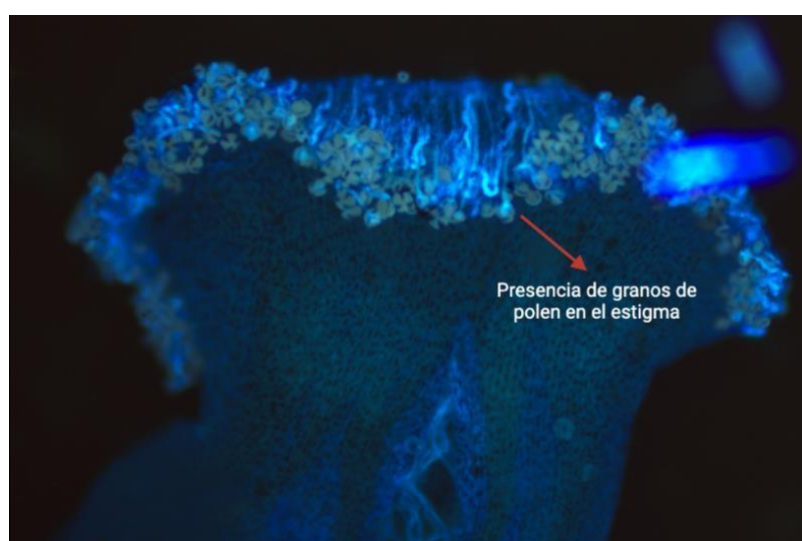


Figura 3. Parte superior del pistilo (estigma) con presencia de polen donde se visualiza su fluorescencia tras la tinción con azul de anilina y representa un pistilo polinizado.

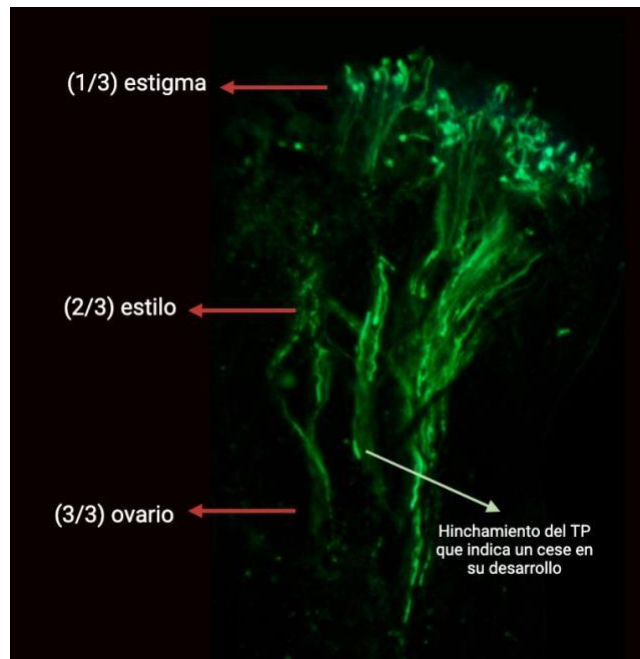


Figura 4. Pistilo teñido con azul de anilina para la visualización de la fluorescencia del desarrollo de tubos polínicos (TP), donde se observa TP llegando hasta el ovario, como un TP con hinchazón que trunca su crecimiento en el estilo.

8. REFERENCIAS

- Acosta, A. (2019). *Caracterización carpológica de la especie de uso alimenticio Prunus serotina Kunth 1879 en la Zona Central de los Andes del Ecuador*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
- Asma, B. M. (2008). *Determination of pollen viability, germination ratios and morphology of eight apricot genotypes*. African Journal of Biotechnology, 7(23).
- Baldeón, D. et, al. (2013). *Evaluación de la variabilidad genética del capulí (Prunus serotina subsp. capuli) en tres provincias del Ecuador*. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB, 34(1), 11-24.
- Baños, K. (2017). *Identificación y descripción de las características anatómicas de la madera de Prunus serotina (Capulí) procedente de tres provincias: Chimborazo, Tungurahua y Cotopaxi*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Baquero Méndez, V. Y. (2018). *Estudio preliminar fenotípico de la incompatibilidad gametofítica en capulí (Prunus serotina subsp. capuli)*. Universidad San Francisco de Quito
- Cachi, A. M. (2011). *Incompatibilidad polen-pistilo en cerezo (prunus avium l). Caracterización de nuevas fuentes de autocompatibilidad*. Universidad de Zaragoza.
- Chen, G., Zhang, B., Zhao, Z., Sui, Z., Zhang, H., & Xue, Y. (2010). 'A life or death decision' for pollen tubes in S-RNase-based self-incompatibility. Journal of Experimental Botany, 61(7), 2027-2037.
- Cueva, C. (2019). *Etnobotánica de las plantas medicinales del caserío Laguna San Nicolas*. Universidad Nacional de Cajamarca
- Correa, L. (2018). *Caracterización molecular y diseño de marcadores moleculares CAPS para el gen de la S-RNasa en Prunus serotina subsp. Capuli*. Universidad San Francisco de Quito.

- DeCeault, M. T., & Polito, V. S. (2008). *High temperatures during bloom can inhibit pollen germination and tube growth, and adversely affect fruit set in the prunus domestica cultivars 'improved french' and 'muir beauty'*. In IX International Symposium on Plum and Prune Genetics, Breeding and Pomology 874 (pp. 163-168).
- De Nettancourt, D. (1997). *Incompatibility in angiosperms*. Sexual Plant Reproduction, 10(4), 185-199.
- De Nettancourt, D. (2001). *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Donovan C. (1969). *Self and Cross-incompatibility in Black Cherry (Prunus serotina)*. The University of Florida
- Đorđević, M., Cerović, R., Nikolić, D., & Radičević, S. (2010). *Unusual behavior of growing pollen tubes in the ovary of plum culture (Prunus domestica L.)*. Archives of Biological Sciences, 62(1), 137-142.
- Erazo García, M. P. (2019). *Determinación de la producción de alcaloides y análisis de expresión de genes de defensa inducidos por metil jasmonato en semillas de chocho (Lupinus mutabilis sweet)*. Universidad San Francisco de Quito.
- Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). *A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants*. Phytochemical analysis, 19(6), 520-525.
- García-Valencia, L. E., Bravo-Alberto, C. E., & Cruz-García, F. (2013). *Evitando el incesto en las plantas: control genético y bioquímico*. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 16(1), 57-65.
- 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.

- Gómez, E. M., Dicenta, F., Martínez-García, P. J., & Ortega, E. (2015). *iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of pistils and anthers from self-incompatible and self-compatible almonds with the S f haplotype*. *Molecular Breeding*, 35(5), 1-14.
- Gómez, E. M., Buti, M., Sargent, D. J., Dicenta, F., & Ortega, E. (2019). *Transcriptomic analysis of pollen-pistil interactions in almond (Prunus dulcis) identifies candidate genes for components of gametophytic self-incompatibility*. *Tree Genetics & Genomes*, 15(4), 1-13.
- Gordillo-Romero, M., Correa-Baus, L., Baquero-Méndez, V., de Lourdes Torres, M., Vintimilla, C., Tobar, J., & Torres, A. F. (2020). *Gametophytic self-incompatibility in Andean capuli (Prunus serotina subsp. capuli): allelic diversity at the S-RNase locus influences normal pollen-tube formation during fertilization*. *PeerJ*, 8, e9597.
- Gu, C., Wang, L., Korban, S. S., & Han, Y. (2015). *Identification and characterization of S-RNase genes and S-genotypes in Prunus and Malus species*. *Canadian Journal of Plant Science*, 95(2), 213-225.
- Halász, J., Pedryc, A., & Hegedűs, A. (2007). *Origin and dissemination of the pollen-part mutated SC haplotype which confers self-compatibility in apricot (Prunus armeniaca)*. *New Phytologist*, 176(4), 792-803.
- Hancock C, Kent, B, McClure (2005) *The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in Nicotiana*. *The Plant J*. 43:716-723.
- Hauck, N. R., Yamane, H., Tao, R., & Iezzoni, A. F. (2002). *Self-compatibility and incompatibility in tetraploid sour cherry (Prunus cerasus L.)*. *Sexual Plant Reproduction*, 15(1), 39-46.

- Hedhly, A. (2003). *Efecto de la temperatura sobre la fase reproductiva en cerezo (Prunus avium L.)*. Universidad de Lleida
- 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.
- Hua, Z. H., Fields, A., & Kao, T. H. (2008). *Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility*. Molecular Plant, 1(4), 575-585.
- Ikeda, K., Igc, B., Ushijima, K., Yamane, H., Hauck, N. R., Nakano, R., ... & Tao, R. (2004). *Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in Prunus*. Sexual Plant Reproduction, 16(5), 235-243.
- Jefferies, C. J., & Belcher, A. R. (1974). *A fluorescent brightener used for pollen tube identification in vivo*. Stain Technology, 49(4), 199-202.
- Jiménez-Durán, K., & Cruz-García, F. (2011). *Sexual incompatibility, a genetic mechanism that prevents self-fertilization and contributes to plant diversity*. Revista fitotecnia mexicana, 34(1), 1-9.
- Kakui, H., Kato, M., Ushijima, K., Kitaguchi, M., Kato, S., & Sassa, H. (2011). *Sequence divergence and loss-of-function phenotypes of S locus F-box brothers genes are consistent with non-self recognition by multiple pollen determinants in self-incompatibility of Japanese pear (Pyrus pyrifolia)*. The Plant Journal, 68(6), 1028-1038.
- Kao, T. H., & Tsukamoto, T. (2004). *The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility*. The Plant Cell, 16(suppl_1), S72-S83.
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). *Reference genes in real-time PCR*. Journal of applied genetics, 54(4), 391-406.

- León, J. 2000. *Fundamentos Botánicos de los Cultivos Tropicales. Del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)*. Edición tercera revisada y aumentada. San José. Costa Rica. p. 183
- Li, Y., Wu, J., Wu, C., Yu, J., Liu, C., Fan, W., ... & Li, W. (2020). *A mutation near the active site of S-RNase causes self-compatibility in S-RNase-based self-incompatible plants*. *Plant molecular biology*, 103(1), 129-139.
- Málaga, R. et. al. (2009). *Caracterización y evaluación de los recursos naturales de la microcuenca cunyatupe*. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 12(23), 12-20.
- McClure, B. (2009). *Darwin's foundation for investigating self-incompatibility and the progress toward a physiological model for S-RNase-based SI*. *Journal of experimental botany*, 60(4), 1069-1081.
- Milatović, D., Nikolić, D., Rakonjac, V., & Fotirić-Akšić, M. (2010). *Cross-(in) compatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.)*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(5), 394-398.
- Molina Arias, M. (2017). *¿Qué significa realmente el valor de p?*. *Pediatría Atención Primaria*, 19(76), 377-381.
- Monteros, A., Tapia, C., & Borja Borja, E. J. (2013). *Colecta y caracterización morfoagronómica in situ y molecular de capuli (*Prunus serotina* Ehrh) del banco nacional de germoplasma del INIAP-Ecuador*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Santa Catalina
- Moon, J., Parry, G., & Estelle, M. (2004). *The ubiquitin-proteasome pathway and plant development*. *The Plant Cell*, 16(12), 3181-3195.
- Nesom, G. (2003). *Black Cherry: *Prunus serotina* Ehrh*. University of North Carolina. North Carolina: USDA NCRS.

- Newbigin, E., Anderson, M. A., & Clarke, A. E. (1993). *Gametophytic self-incompatibility systems*. *The Plant Cell*, 5(10), 1315.
- Newbigin, E., & Uyenoyama, M. K. (2005). *The evolutionary dynamics of self-incompatibility systems*. *TRENDS in Genetics*, 21(9), 500-505.
- Ortega, E., Egea, J., Cánovas, J., & Dicenta, F. (2002). *Pollen tube dynamics following half- and fully-compatible pollinations in self-compatible almond cultivars*. *Sexual Plant Reproduction*, 15(1), 47-51.
- Pazmiño Cajiao, M. A. (2018). *Evaluación de crecimiento y expresión de genes relacionados a las rutas metabólicas del ácido jasmónico y ácido salicílico después de la aplicación de glifosato en Arabidopsis thaliana*. Universidad San Francisco de Quito.
- Perkins, J. R., Dawes, J. M., McMahon, S. B., Bennett, D. L., Orengo, C., & Kohl, M. (2012). *ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data*. *BMC genomics*, 13(1), 1-8.
- Popenoe, W., & Pachano, A. (1922). *THE CAPSULÍN CHERRY: A Superior Form of the Northern Black Cherry Developed in the Highlands of Tropical America*. *Journal of heredity*, 13(2), 51-62.
- 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.
- Ramírez, F., & Davenport, T. (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.

- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). *An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71.d
- Roalson, E. H., & McCubbin, A. G. (2003). *S-RNases and sexual incompatibility: structure, functions, and evolutionary perspectives*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 29(3), 490-506.
- Ruales Estupiñán, C. (2007). *Estudios para la recuperación de la flora nativa en el valle de Tumbaco-Distrito Metropolitano de Quito: inventario florístico y ensayo de propagación vegetativa*. Universidad San Francisco de Quito
- Ruiz, S. (2018). *Características farmacognósticas y cuantificación espectrofotométrica de antocianinas totales del fruto de *Prunus serotina* subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh (Rosaceae)" capulí"*. *Arnaldoa*, 25(3), 961-980.
- Sonneveld, T., Tobutt, K. R., Vaughan, S. P., & Robbins, T. P. (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*, 17(1), 37-51
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- 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.
- Torres, R., & Teves, F. (2011). *Estudio comparativo de la actividad antioxidante in vitro de los extractos antociánicos y caracterización de las antocianidinas en los frutos de las especies vegetales *Prunus serótina* (capuli)*. Universidad Nacional de San Antonio de Cusco

- Tong, Z., Gao, Z., Wang, F., Zhou, J. y Zhang, Z. (2009). *Selección de genes de referencia fiables para estudios de expresión génica en melocotón mediante PCR en tiempo real*. *Biología molecular BMC* , 10 (1), 1-13.
- Tsukamoto, T., Ando, T., Kokubun, H., Watanabe, H., Sato, T., Masada, M., ... & Kao, T. H. (2003). *Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by a modifier locus that suppresses the expression of an *S-RNase* gene*. *Sexual Plant Reproduction*, 15(5), 255-263.
- Vasih'a, A. F. (2010). *Competitive ability and plant breeding*. *Plant Breeding Reviews*, Volume 14, 14, 89.
- Wu, J., Gu, C., Khan, M. 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*, 32(1), 53-68.
- Yamane, H., Tao, R., Sugiura, A., Hauck, N. R., & Iezzoni, A. F. (2001). *Identification and characterization of *S-RNases* in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*)*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(6), 661-667.
- Yamane, H., & 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.
- Ye, X., Zhang, F., Tao, Y., Song, S., & Fang, J. (2015). *Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in different cherry genotypes, developmental stages and organs*. *Scientia Horticulturae*, 181, 182-188.
- Yi, W., Law, S. E., McCoy, D., & Wetzstein, H. Y. (2006). *Stigma development and receptivity in almond (*Prunus dulcis*)*. *Annals of Botany*, 97(1), 57-63.

- You, S., Cao, K., Chen, C., Li, Y., Wu, J., Zhu, G., ... & Wang, L. (2021). *Selection and validation reference genes for qRT-PCR normalization in different cultivars during fruit ripening and softening of peach (Prunus persica)*. Scientific reports, 11(1), 1-13.
- Zarrinbal, M., Soleimani, A., Baghban Kohnehrouz, B., & Dejampour, J. (2018). *Self-compatibility in some apricot (Prunus armeniaca L.) genotypes*. Crop Breeding Journal, 8(2), 49-59.
- Zavala, D. et. al. (2006). *Efecto citotóxico de Physalis peruviana (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica*. Facultad de Medicina (Vol. 67, No. 4, pp. 283-289). UNMSM. Facultad de Medicina.

ANEXOS

ANEXO 1. Porcentajes de granos de polen que lograron el desarrollo de los tubos polínicos

(TP) hasta determinadas secciones del pistilo.

Desarrollo de TP	Cruzas							
	Incompatibles				Compatibles			
	17x17		17x22		1x17		15x14	
	<i>Polinizadas</i>	<i>Control</i>	<i>Polinizadas</i>	<i>Control</i>	<i>Polinizadas</i>	<i>Control</i>	<i>Polinizadas</i>	<i>Control</i>
(1/3) estigma	38.89%	10.53%	23.09%	33.33%	18.2%	9.1%	-	-
(2/3) estilo	50%	68.42%	46.15%	66.67%	45.5%	0%	-	-
(3/3) ovario	11.11%	0%	7.69%	0%	0%	0%	-	-
Sin polen/ sin desarrollo	0%	21.05%	23.07%	0%	36.3%	90.9%	-	100%

ANEXO 2. Registro de flores en los árboles de *Prunus serotina* utilizados en el estudio, desde agosto del 2020 hasta mayo del 2022, ubicados en la *Hacienda San Felipe* de Cayambe.

Año	Mes	Fecha	Árboles				
			1	14	15	17	22
2020	Agosto	02.08.20	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
	Septiembre	27.09.20	Ausencia	Abundancia	Ausencia	Abundancia	Abundancia
	Octubre	18.10.20	Ausencia	Ausencia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
2021	Enero	17.01.21	Ausencia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Ausencia
	Enero	31.01.21	Ausencia	Ausencia	Abundancia	Abundancia	Ausencia
	Marzo	21.03.21	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	Abril	18.04.21	Ausencia	Ausencia	Abundancia	Abundancia	Ausencia
	Junio	01.06.21	Ausencia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
	Junio	22.06.21	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
	Julio	13.07.21	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
	Julio	27.07.21	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
	Septiembre	05.09.21	Abundancia	Ausencia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
	Septiembre	26.09.21	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
	Octubre	24.10.21	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
	Noviembre	26.11.21	Abundancia	Ausencia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
Diciembre	07.12.21	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	
2022	Marzo	13.03.22	Ausencia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
	Abril	03.04.22	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
	Abril	10.04.22	Ausencia	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Abundancia
	Mayo	14.05.22	Abundancia	Abundancia	Abundancia	Ausencia	Abundancia

Abundancia	Abundancia de flores
Escasez	Escasez de flores
Ausencia	Ausencia de flores

Se observa una clasificación de 3 colores en base al registro de la presencia de flores en los árboles del estudio según los meses en los que se recolectaron las muestras. El verde indica 'Abundancia', haciendo referencia a que era posible hallar más flores de las necesarias para el estudio, indicando una alta floración. Además, se encontraban florescencias tempranas entre las etapas A y D de la escala reproductiva de Ramírez, & Davenport (2016). El color azul indica 'Escasez', es decir que era posible encontrar flores, aunque no las suficientes para realizar los experimentos, tampoco se encontraban brotes en etapas de la A a la D (Ramírez, & Davenport, 2016). El color rojo indica 'Ausencia', lo que indica que en esa temporada no se hallaron flores ni brotes nuevos en etapas tempranas.