



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**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.**

**Milton Andrés Gordillo Romero**

**María de Lourdes Torres, Ph.D.,** Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito  
para la obtención del título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, diciembre de 2014

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**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.**

**Milton Andrés Gordillo Romero**

Ma. De Lourdes Torres, **Ph.D.**

Director de Tesis y Miembro del Comité de Tesis

.....

Venancio Arahana, **Ph.D.**

Miembro del Comité de Tesis

.....

José Tobar, **Msc.**

Miembro del Comité de Tesis

.....

Stella de la Torre, **Ph.D.**

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas  
y Ambientales

.....

Quito, diciembre de 2014

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma: .....

Nombre: Milton Andrés Gordillo Romero

C. I.: 080302817-4

Fecha: Quito, diciembre de 2014

A mi madre,  
Elsie Romero.

## Agradecimientos

A Dios, por regalarme la oportunidad de cumplir este gran sueño de hacer ciencia.  
A mi familia y amigos, por haber permanecido junto a mí en todo momento brindándome  
todas sus buenas energías para alcanzar esta meta.  
A todos mis profesores, por haber compartido sus conocimientos, experiencias y consejos  
conmigo durante toda mi carrera universitaria.  
Al equipo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal: Vivi, Meche, Estefy, Jenni, por su  
apoyo, paciencia, compañía, y ayuda siempre oportuna para sacar adelante este proyecto.  
A Bernardo Gutiérrez, Jorge Chiriboga y Andrés Oleas, por haber iluminado mis  
conocimientos justo en los momentos precisos, con las palabras precisas.  
A María de Lourdes Torres, Venancio Arahana y José Tobar, confiar en mí y haber sido  
mis mentores a lo largo de este proyecto.  
Sin todos ustedes, nada de esto hubiera sido posible,  
Muchas gracias.

## RESUMEN

La autoincompatibilidad gametofítica es un mecanismo genético encargado de prevenir la autofecundación en varias familias de plantas; su funcionamiento está regulado por el locus S y ha sido identificado en varias especies del género *Prunus*. El conocimiento de la composición alélica S de individuos y cultivares de especies frutales es esencial para el establecimiento de huertos productivos, mediante la definición de combinaciones entre cultivares compatibles. La identificación y clonación de S-RNAsas de especies del género *Prunus* ha permitido el desarrollo de técnicas moleculares para la caracterización de genotipos S en varias especies silvestres y especies poco estudiadas del género. El presente estudio evaluó 80 individuos de capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) colectados en 8 provincias de la sierra ecuatoriana utilizando primers degenerados diseñados a partir de regiones conservadas del gen de la S-RNasa de varias especies del género *Prunus*. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa y mostraron ser polimórficos en tamaño. Adicionalmente, los amplicones polimórficos encontrados fueron secuenciados. El análisis de las secuencias reportó un total de 11 alelos presentes en la muestra estudiada y además mostró la existencia de similitud con secuencias de distintas especies del género *Prunus* en el locus analizado. Se podría especular que las secuencias encontradas en *P. serotina* que presentan un alto porcentaje de identidad con las secuencias reportadas en otras especies del género fueron heredadas a partir de un ancestro común que ya las poseía. Por otro lado, las secuencias con un menor porcentaje de identidad habrían tenido orígenes independientes en las distintas especies. El uso de primers consenso degenerados permitió realizar un screening rápido y eficiente de la muestra estudiada, mediante la asignación de genotipos putativos a los individuos analizados. Los resultados obtenidos en este estudio deben ser complementados con pruebas en el campo para confirmar el comportamiento fenotípico de los individuos de capulí estudiados.

## ABSTRACT

The gametophytic self-incompatibility is a genetic mechanism that prevents self-fertilization in several plant families. This mechanism is regulated by the S locus and it has been identified in several species of the genus *Prunus*. Information about of the S allele composition of individuals and cultivars of fruit species is essential for the establishment of productive orchards, by defining compatible combinations of cultivars. Identification and cloning of S-RNases of *Prunus* species has allowed the development of molecular techniques for the characterization of S genotypes in several wild species and species poorly studied within the genus. This study evaluated 80 individuals of capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) collected in 8 provinces of the Ecuadorian highlands using degenerate primers designed from conserved regions of the S-RNase gene of several species of the genus *Prunus*. The PCR products were separated on agarose gels and shown to be polymorphic in size. Additionally, polymorphic amplicons were sequenced. The sequence analysis reported a total of 11 alleles present in the sample evaluated and also shown the existence of similarity with sequences of *Prunus* species in the locus analyzed. It could be speculated that the sequences found in *P. serotina* that have a high percentage of identity with the sequences reported in other species of the genus were inherited from a common ancestor who already possessed them. Furthermore, sequences with lower percent of identity would have had independent origins in the different species. Using degenerate consensus primers allowed a rapid and efficient screening of the sample by assigning putative genotypes to the individuals analyzed. The results obtained in this study should be complemented with field tests to confirm the phenotypic behavior of the capulí individuals analysed.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	14
1.1 <i>Prunus serotina</i> .....	14
1.1.1 Taxonomía.....	14
1.1.2 Distribución geográfica.....	15
1.1.3 Características botánicas y genéticas de <i>P. serotina</i> subsp. <i>capulí</i> .....	17
1.1.4 Utilidad de <i>P. serotina</i> .....	18
1.2 La Autoincompatibilidad.....	20
1.2.1 Tipos de Autoincompatibilidad.....	21
1.2.2 Autoincompatibilidad en especies tetraploides .....	25
1.2.3 Identificación de alelos S.....	27
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	30
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3 ÁREA DE ESTUDIO</b> .....	30
<b>4 JUSTIFICACIÓN</b> .....	31
<b>5 MATERIALES</b> .....	33
5.1 Amplificación del Intrón I mediante PCR.....	33
5.2 Electroforesis en geles de agarosa.....	34
5.3 Electroforesis en geles de acrilamida .....	34
5.4 Tinción con Nitrato de Plata.....	35
5.5 Fotografía gel de acrilamida.....	35
<b>6 MÉTODOS</b> .....	36
6.1 Selección de muestras.....	36
6.2 Preparación de diluciones de ADN a partir de muestras stock .....	36
6.3 Selección de Primers y amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa.....	37
6.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	37
6.5 Toma de datos.....	38
6.6 Electroforesis en gel de Poliacrilamida y Tinción con Nitrato de Plata.....	39
6.7 Extracción de bandas a partir del gel de poliacrilamida.....	40
6.8 Reamplificación del ADN extraído de las bandas del gel.....	41

6.9	Secuenciamiento de los amplicones.....	41
6.10	Análisis de secuencias y determinación de genotipos putativos.....	41
<b>7</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
7.1	Muestras amplificadas, número de alelos encontrados y su tamaño.....	43
7.2	Grupos alélicos y selección de bandas para secuenciamiento.....	43
7.3	Gel de Poliacrilamida y bandas no detectadas previamente.....	44
7.4	Análisis de secuencias y resultados de búsqueda en el BLAST.....	44
7.5	Genotipos putativos.....	46
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
8.1	Amplificación con primers consenso degenerados.....	46
8.2	Similitudes con intrones de S-RNAsas de otras especies del género <i>Prunus</i> .....	50
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>10</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>11</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>12</b>	<b>TABLAS.....</b>	<b>64</b>
<b>13</b>	<b>FIGURAS.....</b>	<b>77</b>
<b>14</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>84</b>

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Efecto de la tetraploidización sobre el fenotipo de incompatibilidad en varias especies originalmente (2n) autoincompatibles (Lewis, 1949) .....	64
<b>Tabla 2.</b> Bandas amplificadas (122) en las 75 muestras analizadas y grupos alélicos (I-X) formados de acuerdo al criterio de tamaños en pb. ....	65
<b>Tabla 3.</b> Resumen del total de bandas amplificadas en cada provincia, número de alelos encontrados en cada una y el rango de tamaño en el que estos se encuentran .....	68
<b>Tabla 4.</b> Resumen del rango en pares de bases para cada grupo alélico, el número de bandas amplificadas en cada grupo y el número de bandas seleccionadas en cada grupo para ser secuenciadas .....	69
<b>Tabla 5.</b> Resultados del BLAST realizado con las secuencias consensus obtenidas para cada uno de los alelos. La secuencia que reporta mayor puntaje de acuerdo al algoritmo de búsqueda utilizado, es considerada como el alelo putativo de la secuencia analizada. El tamaño presentado en esta tabla es el tamaño del fragmento secuenciado. La secuencia de las bandas CAR012A y H025A no fue legible, por tanto no se pudo realizar el análisis BLAST con estas secuencias. ....	70
<b>Tabla 6.</b> Genotipo putativo propuesto para cada uno de los individuos analizados. (Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbia</i> ) significa que la banda amplificada pertenece al grupo alélico VI. A este grupo no se le pudo asignar un alelo putativo. N/A indica que la muestra no reportó amplificación. ....	73
<b>Tabla 7.</b> Genotipos encontrados en las muestras analizadas .....	76

## FIGURAS

- Figura 1.** Modelo de Autoincompatibilidad Gametofítica. Planta diploide con genotipo SaSb, que producirá granos de polen Sa ó Sb. Cuando los granos de polen con el haplotipo Sa ó Sb lleguen al estigma, éstos germinarán, produciendo un tubo polínico; sin embargo, su crecimiento será inhibido a nivel del estilo. Por otro lado, si el polen tiene un haplotipo Sx, el polen será aceptado y el tubo polínico alcanzará el saco embrionario y se llevará a cabo la fecundación, produciendo una progenie con individuos SaSx y SbSx (Cruz García & Juárez Díaz, 2007)..... 77
- Figura 2.** Modelo de la degradación de la S-RNasa por el proteosoma 26S. A. Cruza compatible entre un tubo polínico S3 creciendo en un estilo S1S2. En este caso tanto la S1-RNasa como la S2-RNasa se unen inespecíficamente a SLF, lo que provoca su ubiquitinación y degradación por el proteosoma 26S. B. Cruza incompatible entre un tubo polínico S1 creciendo en un estilo S1S2. En este caso se forman complejos S-RNasa-SLF específicos e inespecíficos. Solo los últimos serán degradados por el proteosoma 26S. Por lo que el complejo S-RNasas específico estará activo para degradar al RNA del tubo polínico ocasionando su muerte eventualmente (Cruz García & Juárez Díaz, 2007)..... 77
- Figura 3.** Estructura propuesta para el gen de la S-RNasa en las especies de la familia Rosaceae (Sonneveld, 2003) ..... 78
- Figura 4.** Mapa georeferenciado de la región continental de la República del Ecuador que señala las ocho provincias de donde provienen los 80 individuos de *P. serotina* analizados en la presente investigación (Intriago, 2013). ..... 78
- Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Carchi usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 6 (A-F) ..... 79
- Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Imbabura usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 6 (A-F) ..... 79
- Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Pichincha usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 5 (A-E) ..... 80
- Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Cotopaxi usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 5 (A-E) ..... 80
- Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Chimborazo usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 5 (A-E) ..... 81
- Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Tungurahua usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 4 (A-D)..... 81
- Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Azuay usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 5 (A-E) ..... 82
- Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Cañar usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 5 (A-E) ..... 82

**Figura 13.** Gel de poliacrilamida con las bandas seleccionadas para reamplificación y secuenciación. Estas bandas representan a 9 de los 10 grupos alélicos. El grupo alélico I está excluido del gel debido a su tamaño: 1100 pb. Dado que la extracción de bandas se realizó apenas terminó la corrida, la tinción de cada una de ellas no es muy legible; por tanto se aclara mediante un esquema. ¿? Hace referencia a las bandas inesperadas encontradas en las muestras CAN011B y H014E. .... 83

## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Registro de las 80 muestras de <i>Prunus serotina</i> subsp. <i>capulí</i> provenientes de las 8 provincias analizadas.....	84
<b>Anexo 2.</b> Alineamiento entre las secuencias consenso de las muestras CAN009E y CAN022E utilizando el algoritmo CLUSTAL W. Se observa una única mutación de tipo SNP en el nucleótido 11.....	88
<b>Anexo 3.</b> Alineamiento de las 15 secuencias consenso utilizando el algoritmo CLUSTAL W. Se observan mutaciones en la región del Primer F. AZU015A, CAR011E, IMB011F presentan delección de una T en la posición 9. CAN009E presenta una transversión de T a G en la posición 11. .....	88

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Prunus serotina*.

### 1.1.1 Taxonomía

El género *Prunus*, perteneciente a la familia Rosaceae y a la subfamilia Amygdaloidae, es un género botánico conformado por alrededor de 400 especies de árboles y arbustos (Maynard et al., 1991). La mayoría de ellas tienen su origen en las zonas de clima templado del hemisferio norte y fueron trasladadas de un continente a otro, a través de las rutas comerciales (Badenes & Parfitt, 1995). El gran número de especies existentes aumenta significativamente las posibilidades de hibridación ínterespecífica entre ellas, lo que complica el establecimiento de una correcta clasificación botánica (Rehder, 1940; Kumar & Panigrahi, 1995).

Inicialmente, el género *Prunus* fue subdividido en 5 subgéneros diferentes: *Amygdalus*, *Cerasus*, *Laurocerasus*, *Padus* y *Prunus* (Rehder, 1940). Sin embargo, estudios filogenéticos recientes que realizan análisis de Maximun Parsimony basados en ITSs agrupan a las distintas especies de este género en dos grandes clados monofiléticos; el primero conformado por los subgéneros *Cerasus*, *Laurocerasus* y *Padus*, y el segundo conformado por los subgéneros *Amygdalus*, *Emplectocladus* y *Prunus* (Bortiri, 2006). *Prunus* es un género que se ha destacado en el ámbito agrícola por poseer especies frutales de mucha importancia a nivel económico y comercial; ejemplos de ello son: el cerezo (*P. cerasus* y *P. avium*), el albaricoque (*P. armeniaca*), el almendro (*P. dulcis*), el durazno (*P. persica*), entre otros (Moore & Ballington, 1990).

*Prunus serotina* Ehrh, fue inicialmente incluida dentro del subgénero *Padus* por Rehder (1940); sin embargo, de acuerdo a los estudios filogenético-moleculares realizados por Pairon (2008), *P. serotina* fue reclasificada dentro del clado monofilético compuesto por los subgéneros *Cerasus*, *Laurocerasus* y *Padus*. De acuerdo a la clasificación taxonómica propuesta por la USDA (United States Department of Agriculture) para *P. serotina*, esta especie abarca dos subespecies: *P. serotina* subsp. *serotina* y *P. serotina* subsp. *capulí*.

### 1.1.2 Distribución geográfica

*P. serotina*, comúnmente conocida como black cherry, es una especie frutal arbórea nativa de la región oriental de América del Norte. Se distribuye a lo largo de Norteamérica empezando desde el sur de Canadá, en provincias como Ontario, Quebec y Nueva Escocia, y dirigiéndose hacia el sur a través de estados del centro-este de los Estados Unidos como: Dakota del Norte, Minnesota, Iowa, el este de Nebraska, Kansas, Oklahoma y Texas, hasta llegar a la zona central de Florida. Un poco más al sur del continente americano, esta especie ha sido reportada en países como México, Guatemala, Ecuador y el sur de Bolivia (Fresnedo et al., 2011).

*P. serotina* crece bajo un amplio rango de condiciones climáticas y edafológicas. Se lo encuentra desde altitudes al nivel del mar hasta elevaciones entre los 1800-3000 msnm (Intriago, 2013; McVaugh, 1951) y en una gran variedad de tipos de suelos, siendo los más comunes suelos ácidos, y relativamente infértiles (Fowells, 1965). Adicionalmente, *P. serotina* se desarrolla exitosamente en terrenos abiertos debido a que los individuos de esta especie en etapa adulta son intolerantes a la sombra (Powell & Beardmore, 2002). Es capaz de colonizar rápidamente claros de bosques y dominar grandes áreas forestales durante la sucesión secundaria.

Las dos subespecies de *P. serotina* presentan una distribución geográfica diferente: *P. serotina* subsp. *serotina* se ubica en la región este de Canadá y los Estados Unidos mientras que *P. serotina* subsp. *capulí* es nativa en México y Guatemala (McVaugh, 1951). A más de ser una especie nativa de Norteamérica, *P. serotina* ha sido ampliamente introducida en Europa y América del Sur.

La introducción de *P. serotina* en Europa se remonta al siglo XVII, época en la cual fue introducida con la finalidad principal de ornamentación. Durante las primeras décadas de los años 1600, esta especie fue plantada en parques y jardines europeos debido a la abundancia y belleza de sus flores blancas durante la época primaveral y el brillante de la tonalidad naranja de sus hojas en la época de otoño (Mulligan & Munro, 1981). Posteriormente, a finales del siglo XVIII, *P. serotina* fue considerada como una buena opción de especie maderable cultivable en suelos pobres en nutrientes (Mulligan & Munro, 1981). Programas de forestación para la obtención de madera de alta calidad a partir de esta especie entraron en auge en Holanda, Alemania y Bélgica alrededor de 1873 (Muys, Maddelein, & Lust, 1992). Durante la segunda mitad del siglo XX, la acelerada dispersión de *P. serotina* empezó a preocupar a las poblaciones humanas donde esta especie había sido introducida, al punto de ser considerada como una peste forestal. Los planes de plantación a gran escala de *P. serotina* fueron cambiados por planes de erradicación masiva de esta especie (Vanhellemont, 2009).

Por otro lado, *P. serotina* subsp. *capulí*, nativa de México y el occidente de Guatemala, debido a sus favorables características como especie frutal ha sido introducida en gran parte de América Central, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia en época de la conquista española, en el siglo XVI (McVaugh, 1951; Morton, 1987). Es muy común encontrarla en el

Noroccidente de Sudamérica, especialmente muy cerca de asentamientos y villas alrededor de los Andes (Morton, 1987).

### **1.1.3 Características botánicas y genéticas de *P. serotina* subsp. *capulí*.**

El capulí, *Prunus serotina* subsp. *capulí* (McVaugh), es una especie frutal arbórea, silvestre y de rápido crecimiento. En México y América Central el capulí raramente supera los 10 metros de altura, sin embargo, en Ecuador se pueden encontrar individuos que alcanzan fácilmente los 15 metros (Mille, 1942). Durante los primeros años de crecimiento, el capulí se desarrolla con tronco delgado y copa estrecha en estilo piramidal. Eventualmente, la copa comienza a desarrollarse en sentido horizontal y su diámetro empieza a aumentar. En individuos adultos, la corteza del tronco presenta coloración oscura con tonalidades entre gris y café, con un grosor de aproximadamente dos centímetros; su textura se caracteriza por presentar pequeñas fisuras distribuidas de forma reticular (Popenoe & Pachano, 1922).

Las hojas son de tipo simple, con forma oblonga-lanceolada y márgenes aserrados; presentan una coloración verde oscuro brillante por el lado del haz, se distribuyen de forma alternada y su longitud oscila entre los 5 y 15 centímetros (Mille, 1942).

Sus flores son hermafroditas, blancas, pequeñas y se encuentran agrupadas en racimos axilares colgantes de 10 a 15 centímetros de largo. Presentan un cáliz lobulado, cinco pétalos de margen redondeado y se caracterizan por desprender una agradable fragancia (Popenoe & Pachano, 1922).

Los frutos son drupas globosas, carnosas y lampiñas que crecen en racimos colgantes. Durante las primeras etapas del crecimiento del fruto, éste se desarrolla mostrando una coloración verdosa. A medida que el fruto va madurando, va adquiriendo una tonalidad roja oscura, para posteriormente, en etapas de plena madurez, alcanzar una coloración muy cercana

al negro. La pulpa es de coloración verde marrón pálido, muy jugosa y las dimensiones del fruto normalmente se encuentran entre los 10 y 30 milímetros de diámetro (Popenoe & Pachano, 1922). El tamaño y sabor del fruto depende mucho de la región donde éste se desarrolla. En Norteamérica, en países como Estados Unidos y Canadá, los frutos del capulí son pequeños (de 6 a 10 milímetros de diámetro), poco carnosos de sabor amargo y astringente, por lo que carecen de valor comercial. No obstante en la región andina de países como Ecuador, los frutos de esta especie se caracterizan por tener mayores tamaños (entre 20 y 35 milímetros de diámetro) y presentar un agradable sabor dulce con un ligero amargor proporcionado por la corteza (Popenoe & Pachano, 1922).

*P. serotina* es una especie tetraploide ( $2n=32$ ) dado que el número haploide base de cromosomas en las especies del género *Prunus* es  $x=8$  (Darlington, 1928). Adicionalmente *P. serotina* es considerada una especie aloploiploide (Pairot et al., 2008). Los aloploiploides se forman por un proceso de hibridación y una subsecuente duplicación cromosómica (Bennett, 2004). Es conocido que en el caso de los individuos aloploiploides segregan de manera disómica y que existe escasa o nula recombinación entre los genomas parentales durante la meiosis. Un estudio realizado por Pairot et al. (2008) demostró mediante cruces controlados y marcadores genoma-específicos que los embriones resultantes presentaban un patrón de herencia disómico en el cual no existía evidencia de recombinación intergenómica de los marcadores analizados en individuos de *P. serotina* estudiados. No existe información acerca de las especies progenitoras (Downey & Iezzoni, 2000).

#### **1.1.4 Utilidad de *P. serotina*.**

*P. serotina* es una planta que tradicionalmente ha sido aprovechada integralmente. En América del Norte, debido al espesor de su tronco, la madera de estos árboles es muy

apreciada en la industria maderera y trabajos de ebanistería; características como su dureza e incorruptibilidad hacen de esta una madera muy valorada en el mercado (Maynard et al., 1991; Mille, 1942). En Centroamérica y América del sur, debido al menor diámetro del tronco, ésta es empleada como combustible forma de leña y carbón (Mille, 1942). En el ámbito de la medicina tradicional, la corteza y hojas de esta especie son preparadas en infusión como expectorante, febrífugo, y para combatir las diarreas. Los extractos, infusiones y jarabes preparados con las ramas, corteza y raíces se usan como tónicos y sedantes en el tratamiento de la tisis pulmonar (Popenoe & Pachano, 1922).

Debido a la alta tolerancia que presenta esta especie frente a la contaminación ambiental, y su buen desarrollo en ambientes contaminados, suelos ácidos, suelos compactados y pedregosos, *P. serotina* es utilizada en la recuperación de terrenos degradados, así como para rehabilitar sitios donde hubo explotación minera (Maynard et al., 1991). Además, es muy común encontrar a individuos de esta especie sembrados en los límites de terrenos, puesto que funcionan muy bien como barrera rompevientos (Popenoe & Pachano, 1922). En el aspecto ornamental, la belleza y frondosidad de su follaje hacen de éste uno de los árboles de ornato más comunes en las áreas verdes del Valle de México (Mille, 1942).

En la región andina de América del Sur, debido al gran tamaño de su fruto y su agradable sabor, el capulí se ha convertido en alimento muy importante dentro de la dieta indígena del sector. Se lo suele consumir crudo o en conserva; adicionalmente, el fruto fermentado es utilizado en la elaboración de bebidas embriagantes (McVaugh, 1951; Popenoe & Pachano, 1922). No existen registros de cultivos formales a gran escala de esta especie, sin embargo es muy común encontrar a estos árboles creciendo en jardines o junto a carreteras. Durante la temporada de cosecha del fruto, enero-marzo, el capulí cobra importancia

económica y su fruto es comercializado en los mercados a nivel local (Downey & Iezzoni, 2000; Popenoe & Pachano, 1922).

## **1.2 La Autoincompatibilidad.**

La Autoincompatibilidad (AI) en términos botánicos se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después del proceso de autopolinización (de Nettancourt, 1978). Este sistema promueve la polinización cruzada y por tanto contribuye a la ampliación de la diversidad genética. Durante la evolución de las angiospermas, la autoincompatibilidad ha surgido en varias ocasiones y en linajes totalmente diferentes. Más de 100 familias botánicas, entre las cuales se incluyen las Solanáceas, Poáceas, Asteráceas, Brasicáceas, Rosáceas y Fabáceas, presentan especies autoincompatibles. De hecho, se ha estimado que alrededor del 39% de las especies de angiospermas son autoincompatibles (Igic & Kohn, 2001). Actualmente se sabe que la autoincompatibilidad está regulada a nivel genético por un locus multialélico denominado locus S. Este locus en realidad abarca 2 genes que se encuentran físicamente próximos en el genoma, fuertemente ligados, y por tanto se los considera como un solo locus. Uno de estos genes codifica para la determinante masculina y es expresado únicamente en el polen, mientras que el otro codifica para la determinante femenina, y se expresa selectivamente en los órganos femeninos (Dickinson et al., 1992). En especies de la familia Solanaceae, como *Solanum lycopersicum* y *Solanum tuberosum* L., el locus S se encuentra cerca del centrómero del cromosoma I (Tanksley & Loaiza-Figueroa, 1985). La ubicación del locus S cerca del centrómero y la proximidad de las dos determinantes provocan que no haya recombinación entre ambos genes. Para que ocurra una respuesta de rechazo del polen por parte del pistilo, estas dos determinantes deben interactuar físicamente para disparar una cascada de señales que

concluya con la inhibición del crecimiento del tubo polínico dentro del pistilo en cruza incompatibles (Wu et al., 2013).

### **1.2.1 Tipos de Autoincompatibilidad.**

Existen dos tipos de autoincompatibilidad: el sistema de autoincompatibilidad gametofítica (AIG) y el sistema de autoincompatibilidad esporofítica (AIS) (Newbiggin et al., 1993). En la AIG, el fenotipo de autoincompatibilidad del polen está determinado por su propio genotipo haploide, es decir, por el alelo que se encuentra portando el grano de polen (el gametofito) y que es expresado durante el crecimiento del tubo polínico. En la AIS, el fenotipo de autoincompatibilidad de los granos de polen de una planta está determinado por el genotipo diploide de la antera (el esporofito), en la cual se originaron. Las proteínas S son sintetizadas por los tejidos diploides de la antera y estas proteínas son incorporadas a la superficie del grano de polen durante la maduración. Así, a diferencia del sistema de AIG en el cual cada grano de polen expresa su propio alelo de incompatibilidad, en el sistema AIS, cada grano de polen tiene incorporado en su superficie los dos alelos de incompatibilidad de la planta que lo originó (Cruz García & Juárez Díaz, 2007).

#### **1.2.1.1 Autoincompatibilidad Gametofítica**

El sistema de autoincompatibilidad mayoritariamente distribuido en las plantas angiospermas es el AIG. Este sistema ha sido reconocido y estudiado fundamentalmente en las familias Solanaceae, Scrophulariaceae y Rosaceae (Newbiggin et al., 1993).

En la Figura 1, se muestra a una planta diploide SaSb, la cual produce normalmente granos de polen con genotipo Sa o Sb. Cuando los granos de polen con el haplotipo Sa o Sb llegan al estigma SaSb, estos comienzan con su proceso natural de germinación produciendo

un tubo polínico, no obstante, debido a la coincidencia con los haplotipos SaSb expresados en los órganos femeninos, el crecimiento de los tubos polínicos será inhibido a nivel de estilo. Por otro lado, en el caso de una polinización cruzada, si el polen expresa un haplotipo distinto a Sa o Sb, por ejemplo Sx, el grano de polen será aceptado y el tubo polínico alcanzará el saco embrionario y se llevará a cabo la fecundación. La progenie resultante será portadora de los siguientes genotipos: SaSx y SbSx. De esta manera, en el control gametofítico, la progenie puede retrocruzarse parcialmente con los padres y con individuos de la misma progenie (Cruz García & Juárez Díaz, 2007).

El mecanismo molecular de la autoincompatibilidad gametofítica ha sido ampliamente estudiado y los estudios iniciales en esta área fueron llevados a cabo en especies de plantas de la familia Solanaceae. El producto génico del locus S en el pistilo es una proteína con actividad ribonucleasa (RNasa) identificada por primera vez en *Nicotina glauca* (McClure et al., 1989). Las S-RNasas son glicoproteínas de aproximadamente 30 kDa que se expresan en el estigma, en el estilo y en el ovario. Las RNasas son secretadas hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, sitio por el cual el tubo polínico crece hacia el ovario e ingresan a las células del tubo polínico mediante endocitosis (Xue et al., 1996).

En el caso de la determinante masculina, el producto del alelo S del polen se identificó primero en *Petunia inflata* (Sijacic et al., 2004). Este gen se conoce como SLF (S-Locus F-Box Protein) y su producto es miembro de una familia de proteínas que contienen una caja F. Las proteínas con caja F están principalmente involucradas en la degradación de proteínas por la vía del proteosoma 26S (Sullivan et al., 2003). La expresión de SLF es haplotípica y está restringida al polen. La proteína SLF consta de dos dominios principales en su estructura: un dominio de reconocimiento S-específico y un dominio general inhibidor de S-RNasas. La

degradación de proteínas por la vía del proteosoma 26S involucra el marcaje por poliubiquitinización de las proteínas que se van a degradar (Sijacic et al., 2004).

Conociendo la naturaleza de las dos proteínas expresadas por el locus S (SLF en el polen y S-RNasa en órganos femeninos), Qiao et al. (2004) propusieron un modelo de interacción entre ambas para cruza compatibles e incompatibles. En este modelo se propone, que una vez dentro del citoplasma de las células del tubo polínico, el dominio general inhibidor de S-RNasas de la proteína SLF se unirá inespecíficamente a todas las S-RNasas que se encuentren en el medio, sin importar el haplotipo. A partir de este punto el dominio de reconocimiento S-específico desempeña un rol vital; si el dominio de reconocimiento S-específico de SLF no encuentra su mismo haplotipo en la región hipervariable de la S-RNasa a la que se ha unido, es decir, que ambas proteínas presentan haplotipos diferentes, esta unión provocará la formación de un complejo de tipo SCF (Skp1, Cullin, F-box containing complex), el cual es un tipo de complejo E3 ligasa de ubiquitina. En consecuencia la S-RNasa será marcada para la degradación por la vía del proteosoma 26S y fenotípicamente esto se manifestará como el crecimiento normal del tubo polínico. Sin embargo, si el dominio de reconocimiento S-específico de SLF encuentra a su conjugado expresado en la región hipervariable de la S-RNasa, es decir, que ambos haplotipos son iguales e interaccionan entre sí, la formación del complejo SCF será inestable, y por tanto no se producirá el marcaje de la S-RNasa para su posterior degradación. En este caso, la S-RNasa quedará libre en el citoplasma para ejercer su efecto citotóxico; la manifestación fenotípica será la interrupción del crecimiento del tubo polínico (Willems et al., 2004).

Por ejemplo, en un estilo heterocigoto S1S2 polinizado con polen S1, tanto la S1-RNasa como la S2-RNasa ingresarán a las células del tubo polínico, la S2-RNasa será

ubiquitinada y degradada por la vía del proteosoma 26S: por otro lado, la S1-RNasa permanecerá activa, evadirá la degradación y ejercerá su actividad citotóxica (Figura 2). Se ha propuesto que las S-RNasas actúan como agentes citotóxicos específicos. Esto, debido a que se ha observado que cuando se presenta la reacción de autoincompatibilidad, el ARN del tubo polínico es degradado, sobre todo el ARNr (Haring et al., 1990). Al degradar el ARNr, el tubo polínico no puede sintetizar nuevas proteínas y enzimas por lo que su crecimiento se detiene y termina colapsando. Experimentos de ganancia y pérdida de función con plantas transgénicas en *Solanum*, *Petunia* y *Nicotiana* demuestran que la expresión de diferentes transgenes de S-RNasas, causa cambios en el fenotipo de polinización, pasando de compatible a incompatible (Cruz García & Juárez Díaz, 2007).

Estudios llevados a cabo posteriormente en especies de la familia de las Rosáceas, como el almendro (*Prunus dulcis*) (Tao et al., 1997; Ushijima, 1998), el manzano (*Malus x domestica* Borkh.) (Broothaerts et al., 1995), el peral Europeo (*Pyrus communis*) (Zuccherelli et al., 2002), el albaricoquero Japonés (*Prunus mume*) (Yaegaki et al., 2001), el peral Japonés (*Pyrus serotina*) (Sassa et al., 1997), y el cerezo (*Prunus avium*) (Tao et al., 1997), han demostrado que ribonucleasas estilares similares a las de las Solanáceas están involucradas en la respuesta de autoincompatibilidad en estas especies y que, por lo tanto, un mecanismo similar al descrito en las Solanáceas tiene lugar en las Rosáceas. Así, en la AIG que opera en las Rosáceas, la reacción de autoincompatibilidad está determinada por una ribonucleasa alelo-específica que establece el fenotipo de autoincompatibilidad en el estilo y un factor S expresado en el polen que establece el fenotipo de autoincompatibilidad de éste (Wu et al., 2013).

#### **1.2.1.1.1 Estructura molecular de las S-RNasas.**

En los sistemas de incompatibilidad gametofítica, los productos del locus S expresados en los pistilos son glicoproteínas de carácter básico con actividad ribonucleasa (RNasa), llamadas S-RNasas (Newbiggin et al., 1993; Kao & McCubbin, 1996). Las S-RNasas en las plantas de la familia Rosácea se caracterizan por presentar cinco regiones conservadas: C1-C3, RC4 y C5, y una región hipervariable: RHV (Ushijima, 1998). Las regiones conservadas C2 y C3 se caracterizan por presentar dos residuos de histidina, esenciales para darle a la proteína su actividad de RNasa. Las regiones C1, RC4 y C5 presentan varios residuos de aminoácidos hidrofóbicos, lo cual sugiere que estos residuos se encuentran formando parte del núcleo hidrofóbico de la RNasa. Los residuos de aminoácidos de la región hipervariable RHV son variables e hidrofílicos, lo cual implica que esta región se encuentra expuesta en la superficie de la proteína plegada, y por tanto juega un papel importante en la respuesta rechazo-aceptación del polen (Ushijima, 1998). Matton et al., (1997) demostró experimentalmente que la RHV desempeña un rol pivotal en el reconocimiento de la S-especificidad del polen.

#### **1.2.2 Autoincompatibilidad en especies tetraploides**

El incremento en el número de cromosomas de un organismo produce alteraciones tanto en el balance genético, como en los procesos fisiológicos (Bennett, 2004). En las especies autoincompatibles estudiadas, el efecto de la duplicación del set cromosómico sobre el fenotipo de autoincompatibilidad puede variar desde tener un efecto nulo hasta producir un cambio total a un fenotipo de autocompatibilidad (Lewis, 1949). El efecto de la duplicación cromosómica observado en varias especies autoincompatibles se resume en la Tabla 1.

De acuerdo a lo expuesto por Lewis (1949), la clave para que se produzca o no el cambio del fenotipo de autoincompatibilidad está en el comportamiento del grano de polen

diploide y las células del tubo polínico, originado a partir de la planta madre tetraploide. En un estilo tetraploide, los cuatro alelos S, sean estos iguales o diferentes, operan cada uno de manera independiente y sin interacciones entre ellos para inhibir el crecimiento del tubo polínico diploide que conlleve los mismos alelos. En un grano de polen diploide, el balance genético no cambiará siempre y cuando ambos alelos sean los mismos, el polen se comporta como un grano de polen haploide. Sin embargo, en un grano de polen diploide con alelos distintos pueden ocurrir dos tipos de interacciones: interacción competitiva o dominancia alélica; esto depende del par de alelos involucrados. Con ciertos pares de alelos, ninguno funciona eficientemente debido a un fenómeno conocido como interacción competitiva. En este caso, la reacción fenotípica se presenta desde una reducción en el grado de autoincompatibilidad hasta una completa autocompatibilidad. En otros casos no existe interacción competitiva, pero un alelo es dominante sobre otro. En estos casos la reacción fenotípica se manifiesta como si el polen fuera homoalélico para el alelo dominante. Obviamente las plantas que producen este tipo de granos de polen permanecen como autoincompatibles. La interacción competitiva y la dominancia alélica en los granos de polen diploides explican la mayoría de los efectos de la poliploidía encontrados en varias especies. Los efectos en las especies poliploides que no muestran cambios pueden ser explicados por la dominancia alélica o por la falta de interacción dominante o competitiva. Las especies poliploides que muestran un cambio a autocompatibles deben presentar interacción de tipo competitiva entre alelos (Lewis, 1949).

Para explicar un poco más detalladamente lo que sucede en el modelo de la interacción competitiva, se ha propuesto que la forma activa de la proteína SLF expresada en el polen es un homo-tetrámero. Esta proteína contiene un dominio de S-especificidad y un dominio

genérico inhibidor de S-RNasas. El dominio inhibidor se une inespecíficamente a todas las S-RNasas que han ingresado al citoplasma y las marca mediante poliubiquitinación para su posterior degradación. Este marcaje se realizará inevitablemente, a menos que cierta región de la S-RNasa se encuentre con su alelo S conjugado expresado en la proteína SLF del polen. Es decir, que se produzca una unión específica entre la región hipervariable de la S-RNasa y el dominio de S-especificidad de la proteína SLF del polen. Solo en este caso no se producirá el marcaje para la degradación y la S-RNasa ejercerá su efecto citotóxico en las células del tubo polínico. Cuando un grano de polen diploide expresa dos alelos distintos se forman proteínas SLF hetero-tetrámeras, las cuales no pueden unirse eficientemente a su región conjugada en la S-RNasa. En consecuencia, el dominio inhibidor marcará a todas las S-RNasas mediante poliubiquitinación para su posterior degradación. Sin S-RNasas en el citoplasma, las células del tubo polínico podrán desarrollarse normalmente hasta alcanzar el ovario y los óvulos serán fecundados.

### **1.2.3 Identificación de alelos S.**

Estudios iniciales destinados a determinar los fenotipos de incompatibilidad en especies Rosaceae consistían en realizar cruces controlados. Crossa-Raynaud y Graselly (1985) propusieron la existencia de 6 diferentes alelos de autoincompatibilidad (S1, S2, S3, S4, S7, S8) en cultivares europeos de almendro y un alelo responsable en auto-compatibilidad denominado Sf. Años más tarde, Kester et al. (1994), realizaron estudios similares en cultivares americanos de almendro y reportaron la presencia de cuatro alelos de autoincompatibilidad: Sa, Sb, Sc y Sd.

Con el hallazgo de que el fenotipo de autoincompatibilidad está determinado por proteínas estilares con actividad ribonucleasa, y que estas proteínas pueden ser separadas

utilizando electroforesis basada en el punto isoeléctrico (IEF), Bošković et al., (1997) lograron determinar el fenotipo S de 29 cultivares de almendro. En este estudio, los autores corroboraron los resultados obtenidos previamente por Crossa-Raynaud y Graselly (1985) y Kester et al. (1994) y demostraron la sinonimia entre los alelos S1 y Sb. Adicionalmente renombraron a Sa como S5 y propusieron la existencia de 2 alelos más: S6 y S9. En estudios posteriores, Bošković et al. (1999) reportaron la existencia de nuevos alelos: S10, S11 y S12. En 2003, Bošković et al., utilizando la misma técnica, determinaron el fenotipo de 35 cultivares de almendro, la mayoría de origen americano. Como resultado, se logró la identificación de 11 nuevos alelos: S13-S23.

En 2001, varios alelos de la S-RNasa de distintas especies del género *Prunus* fueron secuenciados y analizados (Igić & Kohn, 2001). Estos análisis revelaron la presencia de 2 intrones altamente polimórficos (tanto en secuencia como en tamaño) ubicados al interior de la secuencia del gen de la S-RNasa. Además, las secuencias de estos 2 intrones resultaron tener mutaciones específicas para cada alelo S. De acuerdo a Sonneveld (2003), la estructura del gen codificante para las S-RNasas en las Rosáceas es la que se encuentra en la Figura 3. A partir de estos resultados, metodologías para la genotipificación basadas en PCR pudieron ser desarrolladas. Varios sets de primers fueron diseñados a partir de las regiones conservadas del gen de la S-RNasa flanqueantes a estos 2 intrones con el objetivo de determinar la composición alélica S de cultivares de cerezo (Sonneveld et al., 2003) y almendro (Channuntapipat et al. 2001; Tamura et al., 2000).

Sutherland et al, (2004) diseñaron primers a partir de las regiones conservadas del gen de la S-RNasa basándose en el alineamiento de secuencias de distintas especies del género *Prunus*. Los objetivos de amplificación de estos primers son de igual manera los intrones I y

II; sin embargo, al haber diseñado estos primers a partir del alineamiento de las regiones conservadas del gen de la S-RNasa de distintas especies del género *Prunus*, incorporaron ciertas degeneraciones puntuales en la secuencia de los mismos. Las amplificaciones realizadas usando estos nuevos primers lograron discriminar perfectamente cultivares de almendro que contenían alelos S1-S6. Adicionalmente, la combinación de resultados obtenidos para la amplificación de los Intrones I y II utilizando estos primers, ha sido de gran utilidad al momento determinar el genotipo S en cerezas (*P. avium* L.) y almendro (*P. dulcis* L.) (Ortega et al., 2005; Sonneveld & Tobutt, 2003).

*Prunus serotina* es una especie poco estudiada pero con gran potencial en el mercado tanto por sus propiedades farmacológicas como por su apetecido fruto. El mecanismo de incompatibilidad gametofítica tiene un rol vital en el establecimiento de frutos en especies frutales del género *Prunus*, por ejemplo: cerezo, almendro, albaricoque, etc. puesto que para obtener buenos rendimientos en el campo, al menos dos cultivares compatibles con tiempos de floración similares deben ser plantados juntos (Ortega et al., 2005). En el caso de *P. serotina*, específicamente hablando del territorio ecuatoriano, no existen cultivares establecidos ya que su cultivo no se lo realiza de una manera formal (Downey & Iezzoni, 2000), por tanto no se puede hablar de genotipos de cultivares o de grupos de incompatibilidad para cultivares. No obstante, el conocimiento de la constitución alélica S de individuos portadores de características agrícolas interesantes es esencial para el diseño cruces eficientes, el establecimiento de plantaciones productivas de capulí y el desarrollo de programas de mejoramiento genético en esta especie. Este estudio pretende establecer un método eficiente de identificación de alelos S en *P. serotina* mediante la técnica de PCR. La muestra analizada consiste en 80 individuos de capulí colectados en 8 provincias de la sierra ecuatoriana.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar el genotipo S de 80 individuos de *P. serotina* colectados en 8 provincias de la Sierra ecuatoriana, mediante secuenciamiento de los fragmentos amplificados del Intrón I del gen de la S-RNasa usando primers degenerados diseñados a partir de regiones conservadas del gen provenientes de varias especies del género *Prunus*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar un protocolo de PCR para amplificar en capulí el Intrón I del gen de la S-RNasa utilizando primers consenso desarrollados a partir de regiones conservadas de la secuencia del gen en varias especies de *Prunus*.
- Identificar los alelos S presentes en la muestra estudiada mediante la secuenciación de los fragmentos amplificados y su comparación con las secuencias reportadas en el GenBank.
- Determinar el genotipo S de los individuos de *P. serotina* analizados.

## 3 ÁREA DE ESTUDIO

Para la presente investigación, se seleccionó un total de 80 muestras de ADN extraído a partir de hojas de capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) colectadas en ocho provincias de la sierra ecuatoriana: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo, Tungurahua, Cañar y Azuay (Figura 4). Las muestras fueron colectadas en 2 estudios anteriores (Guadalupe, 2013; Intriago, 2013) en los que se evaluó la diversidad genética de esta especie. La mayoría de sitios de colección constituyeron los patios de casas ubicadas dentro y fuera de ciudades y los

bordes de carretera. Los análisis moleculares y estadísticos fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Quito-Ecuador.

#### **4 JUSTIFICACIÓN**

El capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) es una especie frutal arbórea con gran potencial en la industria farmacéutica, alimentaria y frutícola. En el ámbito farmacéutico, las infusiones preparadas a partir de la corteza y hojas de esta planta son utilizadas por la población indígena para aliviar fiebres, diarreas, cólicos, tos y bronquitis (CONABIO, 2012; Popenoe & Pachano, 1922). En el ámbito alimentario, el alto contenido de compuestos antioxidantes y antimicrobianos encontrados en extractos del fruto lo convierten en un buen candidato para la elaboración de aditivos en la conservación de alimentos (Jiménez et al., 2011). Finalmente, debido a su sabor y valor nutricional, el fruto del capulí es muy apetecido por la población, y en temporadas de cosecha tiene enorme acogida en los mercados (Popenoe & Pachano, 1922).

A pesar de todas las utilidades brindadas por esta especie, en Ecuador, el capulí no ha sido explotado formalmente ni a gran escala; únicamente se ha limitado a la crianza informal de individuos en los bordes de los campos para la delimitación de terrenos y a manera de cortinas rompe-vientos. Los frutos son colectados por campesinos en los huertos familiares y comercializados de manera artesanal en los mercados locales.

Cuando se trabaja con especies frutales autoincompatibles en el campo y se desea obtener buenos rendimientos en la formación de frutos es imprescindible que dos cultivares compatibles con tiempos de floración similares sean sembrados juntos. Es así, que conocimiento de la composición alélica S de los individuos de capulí con características de

interés agronómico puede contribuir al establecimiento de cruces compatibles, a fin de garantizar el rendimiento más eficiente del cultivo de este frutal.

Tradicionalmente, la determinación del fenotipo de autoincompatibilidad en individuos y cultivares consistía en realizar cruces controlados, observar el desarrollo del tubo polínico, y evaluar el porcentaje formación de fruto. Posteriormente, se recurrió al análisis de las proteínas estilares con actividad RNasa para la determinación del fenotipo de autoincompatibilidad. Un limitante al momento de utilizar estas técnicas es la necesidad de disponer de árboles maduros con flores, lo que en frutales generalmente significa entre tres y cuatro años desde que las semillas son plantadas (Tamura et al., 2000).

El uso de la PCR como técnica para la determinación del genotipo S permite el empleo de material vegetal que puede conseguirse en etapas iniciales del desarrollo de la planta, permitiendo así realizar una selección asistida eficiente en tiempos más cortos. Así mismo, el uso de primers degenerados diseñados a partir de regiones conservadas del gen de la S-RNasa permite realizar un screenig inicial de los alelos S en especies silvestres poco estudiadas, como es el caso de *Prunus serotina*.

La correlación entre los productos amplificados de los Intrones I y II del gen de la S-RNasa y los diferentes alelos S ha sido considerado un método muy eficiente en la determinación del genotipo S de individuos y cultivares. El alto número de publicaciones respecto a la determinación de los distintos alelos S de autoincompatibilidad indica un marcado interés en este campo. Este gran interés se encuentra estrechamente relacionado con el hecho de que el conocimiento del genotipo S previo a una cruce permite planificar de una manera mucho más eficiente los ensayos y evitar cruces no deseadas, ahorrando así tiempo y recursos.

Hasta la presente fecha no se han reportado estudios de autoincompatibilidad sexual a nivel molecular en el capulí, por tanto, al ser esta una especie poco estudiada en este sentido, existe la posibilidad de encontrar nuevos genotipos de alelos codificantes para la S-RNasa estilar, lo cual aportaría al enriquecimiento de las bases de datos moleculares. Adicionalmente, al tener conocimiento del genotipo S de individuos de capulí con características agronómicas de interés, se podrán iniciar programas de mejoramiento genético basados en cruces, así como también diseñar cruces eficientes en campo a fin de obtener buenas cosechas con miras a la formalización del cultivo de esta especie y la ampliación del consumo de su fruto a nivel nacional e internacional.

## **5 MATERIALES**

### **5.1 Amplificación del Intrón I mediante PCR**

- ADN Stock
- NANODROP 2000 (ThermoScientific).
- Agua Destilada Ultra Pura (GIBCO)
- Taq DNA polimerasa 5U/ $\mu$ L (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl<sub>2</sub> 50mM (Invitrogen)
- Agua Destilada Ultra Pura (GIBCO)
- dNTP's 10 mM (Invitrogen)
- BSA (Sigma-Aldrich)
- Set de Primers PaConsI-F/EM-PC1consRD (Ortega et al., 2005)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)

- T Personal Thermocycler (Biometra)

## **5.2 Electroforesis en geles de agarosa**

- SeaKem LE Agarose
- TBE 1X (Tris base -Acido Borico- EDTA)
- SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Agua Destilada Ultra Pura (GIBCO)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Ladder DNA 100 bp (Invitrogen)
- EC360M Electrophoretic Gel System (Maxicell)
- MGU-502T Horizontal Midi-Gel Kit (C.B.S Scientific)
- Fuente de Poder EPS -300 II (C.B.S Scientific)
- Fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD)

## **5.3 Electroforesis en geles de acrilamida**

- UltraPure™ Acrylamide (Invitrogen)
- UltraPure™ N,N'-Methylenebisacrylamide (Invitrogen)
- TBE 10X (Tris – Ácido Bórico – EDTA)
- UltraPure™ UREA (Invitrogen)
- Detergente Alconox
- Cleaning sheets-Kimwipes (Kimberly-Clark)
- Etanol 70%
- Rain.X™
- Sigmacote® (SIGMA)

- Solución para tratamiento de vidrios: etanol 96% y ácido acético glacial 0.5%.
- Bind-Silane (3-Trimethoxysilyl-propyl-methacrylate 98%) (SIGMA-ALDRICH).
- Persulfato de amonio (J.T. Baker)
- UltraPure™ TEMED (N-tetramethylethylenediamine) (Invitrogen)
- TBE 1X (Tris base -Ácido Bórico- EDTA)
- Buffer de carga para pre-corrída (Glicerol + Azul de Bromofenol)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Ladder 10bp (Invitrogen)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- Fuente de poder PowerPac HV (BIORAD)

#### **5.4 Tinción con Nitrato de Plata**

- Alcohol absoluto (J.T. Baker)
- Ácido acético glacial (MERCK)
- Agua destilada
- Nitrato de Plata (FISHER)
- Hidróxido de Sodio (MERCK)
- Formaldehído 37% (MERCK).

#### **5.5 Fotografía gel de acrilamida**

- Cámara fotográfica (Canon XPOSZ)

## **6 MÉTODOS**

### **6.1 Selección de muestras.**

Para la presente investigación se emplearon muestras de ADN de estudios previos realizados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (Guadalupe 2013, Intriago 2013). En estos estudios colectaron un total de 217 muestras correspondientes a individuos de *Prunus serotina* subs. *capulí* distribuidos en 8 provincias de la sierra ecuatoriana: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo, Tungurahua, Azuay y Cañar. El número promedio de muestras colectadas en cada provincia fue de 30. Para este estudio se seleccionaron aleatoriamente 10 muestras correspondientes a cada provincia, resultando un total de 80 muestras elegidas. Información detallada acerca de las muestras seleccionadas, como: fecha de colección, coordenadas geográficas, altitud (msnm) y estado del individuo pueden encontrarse en el Anexo 1. Las muestras colectadas corresponden a hojas jóvenes de árboles de capulí.

### **6.2 Preparación de diluciones de ADN a partir de muestras stock**

La concentración del ADN stock de las 80 muestras seleccionadas se determinó utilizando el espectrofotómetro NANODROP 2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos). A continuación, se realizaron los cálculos respectivos para obtener alícuotas de ADN con concentraciones finales de 10 ng/ul en un volumen total de 50 ul. Estas alícuotas fueron empleadas para realizar las reacciones de PCR.

### **6.3 Selección de Primers y amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa.**

El ADN de las 80 muestras fue amplificado mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando un par de primers diseñado a partir de regiones conservadas flanqueantes al Intrón I del gen de la S-RNasa; este intrón se caracteriza por ser una región altamente polimórfica tanto en tamaño como en secuencia (Ortega et al., 2005). El primer forward PaConsI-F fue diseñado por Sonneveld (2003) a partir de la región péptido señal de varias S-RNasas de cerezo. El primer reverse fue diseñado por Ortega et al. (2005) a partir de la región conservada C1 de 22 secuencias publicadas de S-RNasas de varias especies del género *Prunus*, entre ellas *P. avium*, *P. dulcis*, *P. mume*, *P. salicina* y *P. cerasifera*. La concentración de los reactivos usados en la reacción de PCR fue la siguiente: MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, Buffer de PCR 1X, BSA 0.1 mg/ul, dNTPs 0.2 mM, 0.3 uM de cada primer, Taq-Polimerasa 0.5 U, DNA 20 ng. El volumen final de cada reacción fue de 20 ul.

La reacción de amplificación se efectuó en un termociclador marca Biometra T-Personal y el programa de ciclado consistió de una denaturación inicial del ADN a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de denaturación a 94°C durante 10 segundos, una temperatura de annealing de 58°C durante 2 minutos y una extensión a 68 °C por 2 minutos, con un incremento de 10 segundos por ciclo en el paso de extensión, a partir del décimo ciclo (Ortega et al., 2005).

### **6.4 Electroforesis en geles de agarosa.**

De acuerdo con el estudio realizado por Ortega et al. (2005), el rango de tamaño de los amplicones obtenidos empleando este par de primers en muestras de *P. dulcis* oscila entre los 200 y los 1100 pb. Considerando esto, la visualización de los fragmentos amplificados se

realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% (100 ml de TBE 1X, 3 g de agarosa y 6 ul de SYBR® Safe Invitrogen). Las condiciones de corrida fueron: 4 horas a 40 voltios. Las fotografías de los geles de agarosa se tomaron con el Fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD). Debido al tamaño de la cámara de electroforesis utilizada en el estudio, se usó un gel de agarosa por cada 10 muestras, obteniendo así un total de 8 geles de agarosa, uno por cada provincia.

## **6.5 Toma de datos.**

Para la toma de datos a partir de los geles de agarosa lo primero que se hizo fue determinar el tamaño en pares de bases de cada una de las bandas amplificadas. Esto se realizó mediante regresiones logarítmicas. Al tamaño en pares de bases, de antemano conocido, para cada uno de los fragmentos del ladder se lo relacionó con su distancia migrada (mm) en el gel luego de la electroforesis. De esta manera se logró obtener un gráfico de dispersión que muestra en el eje X la distancia recorrida por el fragmento en milímetros versus el tamaño del fragmento en pares de bases en el eje Y. La trayectoria de la curva fue descrita mediante una ecuación logarítmica que se ajustó a la distribución de los puntos. Utilizando esta ecuación se determinó el tamaño de cada una de las bandas, conociendo la distancia migrada (mm) para cada una de ellas. Con estos tamaños calculados se realizó una tabla que los ordenó de forma decreciente (Tabla 2). Esta misma tabla fue utilizada para agrupar a las bandas de tamaños muy cercanos y considerarlas como un mismo alelo. Estas agrupaciones se denominaron “grupos alélicos”. El criterio para la conformación de grupos alélicos consistió en que la diferencia de tamaño en pares de bases entre los miembros de cada grupo alélico no superara los 6 pares de bases (diferencia intragrupal < 6pb).

Una vez conformados los grupos alélicos se seleccionó al menos una banda representante de cada grupo para secuenciarla. La secuencia obtenida representaría al resto de secuencias ubicadas dentro del mismo grupo alélico.

Como paso previo al secuenciamiento de las bandas seleccionadas, con la finalidad de aumentar la cantidad de amplicón para secuenciar, se realizó una reamplificación. Para ello, los productos iniciales de PCR fueron sometidos a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4%. A continuación las bandas fueron extraídas del gel y usadas como ADN plantilla para la reacción de reamplificación. Debido al tamaño de las bandas del grupo alélico I (aproximadamente 1100 pb), estas no pudieron ser separadas en el gel de poliacrilamida, por tanto, no fueron reamplificadas y el material enviado para la secuenciación de estas bandas fue el producto de la amplificación. Las bandas extraídas del gel de poliacrilamida y reamplificadas corresponden a los grupos alélicos II-X (13 bandas).

## **6.6 Electroforesis en gel de Poliacrilamida y Tinción con Nitrato de Plata**

Las bandas seleccionadas para representar a cada grupo alélico fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 4%. Tanto la electroforesis como la tinción del gel fueron realizadas siguiendo un protocolo ya estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (Benbouza et al., 2006).

La superficie del vidrio a ser utilizada para la polimerización del gel fue lavada tres veces con detergente Alconox y a continuación tratada con 2 ml de solución adherente: 96% de alcohol absoluto, 0.5% de ácido acético glacial y 6 µl de Bind-Silane (3-Trimethoxysilyl-propyl-methacrylate 98%). Posteriormente, se trató la superficie plástica de la cámara con una solución repelente: 3 ml de Rain-X™ y 800 µl de Sigmacote® (SIGMA).

Para obtener una concentración final de solución de poliacrilamida al 4% se tomaron 66 ml de la solución stock de poliacrilamida (5M Urea y acrilamida/bisacrilamida 19:1) y se los diluyó con 4.4 ml de TBE y 29.6 ml de agua. A continuación, la cámara de electroforesis fue armada de acuerdo a las instrucciones del fabricante y una vez lista, se inyectaron los 100 ml de solución de poliacrilamida junto con 545 µl de persulfato de amonio (J. T. Baker) al 10%, y 109 µl de UltraPure™ TEMED (Invitrogen). Luego de esto se dejó reposar la cámara en posición horizontal durante aproximadamente una hora para la polimerización del gel.

Previo a la etapa de corrida de las muestras, se prepararon 35 µl de ladder compuestos por: 27.5 µl de agua de PCR, 2.5 µl de Blue Juice 10X (Invitrogen) y 5 µl de ladder 100bp (Invitrogen). A cada uno de los tubos con el producto de PCR se les añadió 2 µl de Blue Juice 10X (Invitrogen) para obtener una concentración final aproximada de buffer de carga de 1X. Tanto el ladder como los productos de PCR fueron desnaturalizados a 96°C durante 6 minutos en el termociclador T100 Thermal Cycler (BIORAD). Para la fase de corrida, se cargaron 7 µl del producto de PCR y 5 µl de ladder. Las condiciones de corrida fueron 3 horas a 80 voltios.

Terminada la corrida, el gel fue revelado mediante un protocolo basado en tinción con nitrato de plata Benbouza et al. (2006); al final de éste, se dejó secar al gel por aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente.

## **6.7 Extracción de bandas a partir del gel de poliacrilamida.**

Este procedimiento consistió en ubicar a las bandas deseadas en el gel de poliacrilamida y realizar un corte alrededor de todo el perfil de la banda empleando un bisturí. A continuación, cada banda fue desprendida del gel utilizando una pinza de laboratorio y sumergida en 50 µl de TE contenidos en un tubo eppendorf. Para cada banda se empleó una hoja de bisturí diferente y las pinzas se lavaron con etanol al 70% entre extracción y

extracción con la finalidad de evitar la contaminación cruzada de ADN entre muestras. Las bandas extraídas fueron incubadas a 36 °C durante 12 horas en agitación constante. El objetivo de la incubación fue el de liberar el ADN alojado entre los poros del gel y obtener una solución de TE con el ADN disuelto en ella.

## **6.8 Reamplificación del ADN extraído de las bandas del gel.**

El ADN recuperado del gel de poliacrilamida fue reamplificado usando las mismas concentraciones de reactivos empleadas durante la reacción de amplificación, sin embargo el programa de ciclado presentó ciertas modificaciones: denaturación inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos de denaturación a 95 °C por 30 segundos, 58 °C para el annealing durante 45 segundos y 72 °C por un minuto para la extensión de los amplicones. Para terminar, una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. El cambio realizado en el programa de ciclado ayudó a obtener bandas mucho más intensas en el gel de agarosa y a eliminar un barrido que se observaba cuando se realizaba la reamplificación usando el programa de ciclado inicial.

## **6.9 Secuenciamiento de los amplicones.**

Los productos de PCR obtenidos luego de las reamplificaciones fueron cuantificados utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y enviados a Functional Biosciences Inc. (Madison EE.UU.) para ser secuenciados en ambas direcciones: 5'-3' y 3'-5'.

## **6.10 Análisis de secuencias y determinación de genotipos putativos.**

Cabe recalcar que por cada muestra enviada a secuenciar se recibieron dos archivos correspondientes a picos reportados por el secuenciador. El primer archivo correspondió a la

lectura del secuenciador teniendo como cebador al Primer PaConsI-F, mientras que el segundo archivo correspondió a la lectura del secuenciador teniendo como cebador al primer EM-PC1ConsRD. Teniendo las dos secuencias se procedió a obtener una secuencia de ADN consenso. Ésta es la secuencia ideal que representa los nucleótidos que se encuentran con mayor frecuencia en cada posición de un fragmento de ADN (Pierce, 2006). Además al construir esta secuencia consenso se pueden “reconstruir” los extremos del fragmento de interés que normalmente son ilegibles en el cromatograma. La creación de la secuencia consenso se la realizó mediante un alineamiento de las secuencias obtenidas a partir de los cromatogramas utilizando el sistema “ClustalW” del programa Mega 5 (Tamura et al., 2011). Este sistema utiliza el mecanismo de alineación progresiva. En este mecanismo, las secuencias más similares son las que se alinean primero. A partir de esto, se alinean progresivamente los grupos de secuencias más distantes hasta que se obtiene un alineamiento global (Thompson, et al., 1994). Para cada par de secuencias obtenidas por fragmento se realizó este procedimiento.

Con la secuencia consenso de cada alelo, se realizó una búsqueda en el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología). El tipo de algoritmo de búsqueda seleccionado fue Megablast, con la finalidad de obtener la identidad de los alelos de acuerdo a la secuencia obtenida para el Intrón I del gen de la S-RNasa. De los resultados obtenidos al realizar el BLAST para cada secuencia, se tomó como alelo putativo a aquel que presentó el mayor puntaje otorgado por el algoritmo.

Con la asignación de un alelo putativo específico a cada grupo alélico conformado en la Tabla 2, la determinación del genotipo de cada muestra consistió en la asignación de las identidades putativas encontradas en cada una de las bandas amplificadas de cada muestra.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Muestras amplificadas, número de alelos encontrados y su tamaño.**

Del total de muestras analizadas (80), 75 amplificaron al menos una banda para la región analizada. Las muestras en las cuales no hubo amplificación fueron: IMB004, PIC012, CAN014, C008 y T006. Las fotos de los geles de agarosa correspondientes a las muestras de cada una de las provincias analizadas se pueden encontrar en las Figuras 5-12. Adicionalmente en la Tabla 3 se presenta un resumen del total de bandas amplificadas en cada provincia, el número de alelos encontrados en cada una y el rango de tamaño en el que estos se encuentran. El número total de bandas amplificadas en las 75 muestras fue de 122. El tamaño de las bandas amplificadas fluctúa entre los 1155 y 310 pares de bases.

### **7.2 Grupos alélicos y selección de bandas para secuenciamiento**

La Tabla 2 agrupa a las 122 bandas amplificadas y las ordena de forma decreciente de acuerdo al tamaño en pares de bases. Además presenta el resultado de la división entre grupos alélicos. Se formaron un total de 10 grupos alélicos (I-X), esto corresponde a un total de 10 bandas polimórficas en cuanto a tamaño encontradas en las muestras analizadas. La Tabla 4 presenta un resumen con el rango en pb establecido para cada grupo alélico, el número de bandas amplificadas para cada grupo y el número de bandas seleccionadas para secuenciamiento. El número total de bandas seleccionadas para secuenciamiento fue de 15. Estas 15 bandas abarcan a los 10 grupos alélicos encontrados en las muestras analizadas.

### **7.3 Gel de Poliacrilamida y bandas no detectadas previamente**

La foto del gel de poliacrilamida con las 13 bandas seleccionadas para ser extraídas y reamplificadas se muestra en la Figura 13. Al analizar el gel de poliacrilamida se presentaron inconsistencias en las muestras H014 y CAN011. De acuerdo a los resultados obtenidos en los geles de agarosa, estas muestras fueron consideradas como muestras homocigotas (Figuras 9,12). Aparentemente presentaban un solo alelo para el locus analizado. No obstante, al realizar la electroforesis en el gel de poliacrilamida, el cual permite tener una mayor resolución en cuanto a la separación de fragmentos de ADN respecto al gel de agarosa (Benbouza et al., 2006), se observó un fragmento de ADN adicional para H014 y otro para CAN011. Estos dos fragmentos fueron inesperados. Para confirmar la identidad de este par de fragmentos, igualmente se decidió realizar la extracción de banda, reamplificación y secuenciamiento. El código asignado para estas bandas fue CAN011B' y H014E'. Por tanto, a más de las 13 bandas seleccionadas en un principio para la extracción y reamplificación, se agregaron éstas dos. Un total de 15 bandas fueron extraídas del gel y reamplificadas. Para la etapa de secuenciación se incorporaron las 2 bandas correspondientes al grupo alélico I (aproximadamente 1100 pb), las cuales debido a su tamaño no fueron incluidas en el gel de poliacrilamida. De esta manera, un total de 17 bandas fueron secuenciadas.

### **7.4 Análisis de secuencias y resultados de búsqueda en el BLAST.**

La lectura del secuenciador fue legible para 15 de las 17 bandas secuenciadas. Las muestras cuya secuencia no pudo ser analizada corresponden a las bandas CAR012A y H025A. Ambas bandas con un tamaño aproximado de 1100 pares de bases. Las 15 secuencias analizadas coinciden con alelos S reportados en diferentes especies del género *Prunus*; entre

ellas: *P. webbii* (wild almond), *P. avium* (cerezo dulce), *P. dulcis* (almendro), *P. armeniaca* (albaricoque), *P. tenella* (dwarf russian almond), *P. salicina* (ciruelo chino), *P. persica* (durazno), *P. fenzliana*, *P. cerasifera* (ciruelo mirobolano), *P. amygdalus* (almendro) y *P. mume* (ciruelo chino). El porcentaje de identidad con las secuencias encontradas oscila entre 83 y 98% mientras que el Query Cover de las secuencias oscila entre 93 y 100%. Para el caso CAR012A y H025A, de acuerdo a la particularidad de su tamaño (1100 pb), se relacionó a esta banda con la banda reportada por Ortega et al. (2005) de 1100 pb para el alelo S14 en *P. dulcis*. La Tabla 5 presenta el resultado de los matches más relevantes encontrados para cada secuencia y asigna como alelo putativo a aquella secuencia que presenta mayor puntaje de acuerdo al algoritmo del BLAST.

Las secuencias de las bandas CAN011B' y H014E' correspondieron a secuencias de alelos S. CAN011B' coincidió tanto en tamaño como en secuencia con las bandas del grupo alélico IV (PIC019C y CAN022C), mientras que H014E' coincidió tanto en tamaño como en secuencia con las bandas del grupo alélico VII (CAN009D e IMB011F). De acuerdo a aquello, el número total de bandas amplificadas en este estudio suman 124.

Las secuencias de las bandas IMB011E y CAR011E, correspondientes al grupo alélico VI, a pesar de tener un tamaño igual reportado por el secuenciador (382pb), presentan una secuencia distinta. Esto se aprecia luego de analizar los matches asignados por el BLAST: *P. salicina* S<sub>j</sub>, *P. salicina* S<sub>a</sub> y *P. fenzliana* S<sub>7</sub> para IMB011E, mientras que *P. webbii* S<sub>10</sub>, *P. dulcis* S<sub>41</sub>, *P. webbii* S<sub>4</sub> y *P. persica* S<sub>3</sub> para CAR011E. Adicionalmente, un posterior alineamiento de ambas secuencias (IMB011E y CAR011E) utilizando el algoritmo CLUSTAL W en el software MEGA 5.1 mostró la discrepancia entre estas secuencias: mutaciones de tipo SNP, inserciones y deleciones.

Las secuencias de las bandas CAN009E y CAN022E, correspondientes al grupo alélico IX, presentan igual tamaño de acuerdo al secuenciador y el resultado de búsqueda en el BLAST es el mismo. Sin embargo el valor de los puntajes reportados por el algoritmo para las secuencias encontradas difiere ligeramente. Esto fue confirmado realizando una alineamiento utilizando el algoritmo CLUSTAL W en el cual se encuentra una única mutación de tipo SNP (Anexo 2).

## **7.5 Genotipos putativos.**

En la Tabla 6 se presentan las muestras analizadas en este estudio y el genotipo putativo propuesto para cada una de ellas de acuerdo a los resultados obtenidos en el BLAST. El alelo (Sj *P. salicina*/S10 *P. webbii*) hace referencia a las bandas correspondientes al grupo alélico VI. A las bandas de este grupo no se les puede asignar un alelo putativo único debido a que las secuencias de las bandas seleccionadas como representantes de dicho grupo alélico son discrepantes y por tanto, los resultados de identificación en el BLAST son diferentes. Se encontró un total de 35 genotipos únicos en el total de muestras analizadas (Tabla 7).

# **8 DISCUSIÓN**

## **8.1 Amplificación con primers consenso degenerados.**

No existen reportes previos de detección de alelos S en *Prunus serotina* mediante la técnica de PCR. Este es el primer estudio que correlaciona alelos de S-RNAsas reportadas en otras especies del género *Prunus* con secuencias del intón I del gen de la S-RNasa encontradas en individuos de *P. serotina*. La amplificación de 124 bandas en 75 de las 80 muestras de *P. serotina* analizadas confirma el adecuado funcionamiento del set de primers PaCONSI-F/EM-

PC1consRD entre las especies del género *Prunus*. Esta situación puede deberse a los orígenes evolutivos comunes de los alelos S en las especies de este género (Wu et al., 2013). La secuencia del primer F fue diseñada a partir de secuencias de cerezo del Signal Peptide Region, mientras que el primer reverse fue diseñado a partir de la región conservada I del gen de la S-RNasa de varias especies del género *Prunus* (Ortega et al., 2005). Este par de primers igualmente ha sido empleado exitosamente en la genotipificación de cultivares de almendro (*Prunus dulcis*) (Ortega, et al., 2006), individuos silvestres de almendro, y varias especies del género *Prunus* (Rahemi et al., 2010). Los resultados obtenidos en el presente estudio presentan ciertas discrepancias con los resultados obtenidos en los dos estudios anteriormente mencionados. El tamaño de los amplicones obtenidos utilizando este par de primers en el presente estudio oscila entre 310 pb (CAN011F) y 1155 pb (H013A). La mayoría de los alelos se encuentran entre los 340 y 440 pb. Rahemi et al., (2010) reportan amplicones que oscilan entre los 196 y 1148 pb con la mayoría de ellos comprendidos entre los 200 y 400 pb. Por otra parte, Ortega et al. (2006), reportan tamaños de amplicones en cultivares de *P. dulcis* que oscilan entre los 122 y 1064 pb, la mayoría de ellos entre 122 y 346 pb. Adicionalmente reportan dos amplicones de gran tamaño: uno de 799 pb para el alelo S1 y otro de 1064 pb para el alelo S14. Basado en estos resultados, el grupo alélico I, conformado por 12 bandas de aproximadamente 1100 pb amplificadas en *P. serotina*, fue identificado como el alelo putativo del alelo S14 de *P. dulcis*.

En cuanto al número de alelos encontrados en este estudio (11 alelos), éste es menor al reportado en otros estudios. De Cuyper et al., (2005) analizan 65 accesiones de cerezo silvestre colectadas en Bélgica y reportan 17 alelos empleando el mismo set de primers. Por

otro lado, Rahemi et al., (2010) reportan un total de 23 alelos encontrados en 96 accesiones de almendro silvestre y otras especies silvestres del género *Prunus*.

Respecto a los 5 individuos en los que no se logró amplificación, Rahemi et al., (2010) también reportan 13 accesiones de las 96 analizadas en las que no se obtuvo amplificación empleando este par de primers. No se discuten posibles motivos. Por otro lado, Ortega et al. (2005), reportan fallas en la amplificación para los alelos S5, S10 y S15 en los cultivares analizados. Los autores presumen que estos resultados pueden deberse a una unión deficiente entre la secuencia del primer y la secuencia blanco, o debido a la presencia de un intrón muy grande para ser amplificado. A pesar de que el primer forward (PaCONSI-F) fue diseñado a partir de la región péptido señal de la S-RNasa (una región altamente conservada), el alineamiento de las 15 secuencias obtenidas en este estudio (se excluyen del análisis CAR012A y H025 debido a falla en el secuenciamiento de estas bandas) mostró ligeras mutaciones en esta región para ciertos alelos. AZU015A, CAR011E, IMB011F presentan la delección de una timina (T) en la posición 9, mientras que CAN009E presenta una transversión de guanina a timina en la posición 11 (Anexo 3). Ambas mutaciones corresponden a la región de unión con el primer PaCONSI-F. Se hipotetiza que las muestras no amplificadas pueden deberse a mutaciones en regiones del alelo cruciales para el adecuado anclaje del primer y de la Taq-Polimerasa, por ejemplo en el extremo 3' del primer (Green & Sambrook, 2012).

En relación a las muestras en las cuales se obtuvo una sola banda, esto puede deberse a la condición homocigota para el genotipo de la muestra o a otras causas. La amplificación de una sola banda cuando se emplean primers diseñados a partir de regiones consenso ha sido reportada en estudios en *P. persica* (Donoso, et al. 2009) y en *P. dulcis* (Channuntapipat et al., 2001). Esto puede deberse a la amplificación de alelos con tamaños iguales o a la

amplificación preferencial de uno de ellos (Donoso et al., 2009). En el presente estudio se obtuvieron secuencias muy distintas para alelos de un mismo tamaño en pares de bases (IMB011E y CAR011E). Ambas secuencias con una longitud de 382 pb. Consecuentemente los resultados del BLAST corresponden a alelos S diferentes y por tanto a pesar de haber conformado 10 grupos alélicos, el total de alelos encontrados en los 75 individuos analizados es 11. En un estudio realizado por Halász (2008), se encontró que al usar primers consenso para genotipar cultivares de almendro en Hungría, tanto el alelo S9 como el S31 amplificaban una banda del mismo tamaño. Adicionalmente, en los estudios citados anteriormente, la visualización y análisis de los fragmentos se los realizó en geles de agarosa. Al realizar este tipo de análisis en geles de agarosa se puede incurrir en errores debido a la baja resolución discriminativa que tiene este tipo de geles para separar fragmentos de tamaños muy cercanos (Calladine et al., 1991). Esto fue lo que ocurrió en este estudio con los individuos CAN011 y H014. De acuerdo al análisis en los geles de agarosa, estos individuos presentaron una sola banda para el locus analizado: CAN011B (410 pb) y H014E (358 pb). Sin embargo, una electroforesis en gel de poliacrilamida al 4%, un gel con mayor poder resolutivo que el de agarosa, reveló la presencia de bandas adicionales; una banda adicional de tamaño ligeramente menor en el caso de CAN011B (CAN011B' 402 pb) y una de tamaño ligeramente mayor en el caso de H014E (H014E' 363 pb). Cabe recalcar que en el caso de los individuos AZU015, PIC019 y CAR007, su condición de homocigosis fue evidente tanto en los geles de agarosa como en los de poliacrilamida.

De acuerdo al número de amplicones observados en las muestras amplificadas, 31 individuos portan un solo alelo, 39 individuos dos alelos y 5 individuos tres alelos. No se encontraron individuos que tengan cuatro alelos distintos para este locus analizado. Debido a la

particularidad del comportamiento de la autoincompatibilidad en especies tetraploides es necesario realizar ensayos con plantas en el campo para evaluar este rasgo a nivel fenotípico y poder vincular esos resultados con los resultados obtenidos en este estudio.

## **8.2 Similitudes con intrones de S-RNAsas de otras especies del género *Prunus*.**

Los resultados de la búsqueda en el GenBank realizada con el BLAST para las 15 secuencias analizadas muestra similitudes con S-RNAsas exclusivamente del género *Prunus*, entre ellas: *P. webbii*, *P. avium*, *P. dulcis*, *P. armeniaca*, *P. tenella*, *P. salicina*, *P. fenzliana*, *P. persica*, *P. cerasifera*, *P. amygdalus* y *P. mume* (Tabla 5). Aquellas secuencias que presentan el mayor porcentaje de identidad con secuencias reportadas en el GenBank son: CAR007D (97%) con el alelo S7 de *P. dulcis* reportado por Halasz (2008), H014E (96%) con el alelo S6 de *P. dulcis* reportado por Ortega et al., (2006). A continuación se encuentran IMB011F, CAN009D y H014E' con un 93% de identidad compartida con el alelo S3 de *P. webbii* reportado por Banovic et al., (2007). Finalmente se encuentra CAR011F, alelo que comparte un 92% de identidad con la secuencia del alelo S9 de *P. amygdalus* reportado por Rahemi (2010). De acuerdo con los hallazgos reportados por Ortega et al. (2006), al comparar sus secuencias obtenidas con la base de datos del European Bioinformatics Institute (EBI), muchas de ellas presentaban elevada homología interespecífica con varias especies del género *Prunus*. En muchos casos las identidades superaban el 97%. La secuencia del alelo S11 encontrado en su estudio sorprendentemente presentó una identidad del 100% con la secuencia del alelo S1 reportado por Sonneveld et al., (2001) para *P. avium* (cerezo). Adicionalmente la secuencia del alelo S6 de *P. dulcis* fue 98% idéntica a la secuencia MSRN-2 reportada por Yaegaki (2001) para *P. mume*, y la secuencia del alelo S13 de *P. dulcis* fue 97.5% idéntica a la

reportada como alelo Sd en *P. salicina*, reportada por Beppu et al., (2002). Además, al comparar las secuencias encontradas en *P. dulcis* con las encontradas en otras especies del género *Prunus*, Ortega et al. (2006) encontraron que en algunos casos las similitudes interespecíficas de las secuencias analizadas eran mucho más altas que las similitudes intraespecíficas; lo cual indicaría que al parecer la divergencia de los alelos S antecedió a la especiación dentro de la familia Rosaceae. El mismo caso está reportado por Ioerger et al. (1990) para la familia Solanaceae.

## 9 CONCLUSIONES

- Se comprobó la funcionalidad de los primers PaCONSI-F/EM-PC1consRD para amplificar el Intrón I del gen de la S-RNasa en la especie *P. serotina* subsp. *capulí*.
- Los resultados obtenidos al utilizar el set de primers PaCONSI-F/EM-PC1consRD para amplificar ADN de *P. serotina* indican que existen polimorfismos tanto de tamaño como de secuencia dentro de la región amplificada.
- El análisis de las secuencias mediante la búsqueda en el BLAST reporta identidades únicamente con secuencias provenientes de S-RNasas del género *Prunus*.
- Las secuencias obtenidas en este estudio permitieron identificar 11 alelos putativos para el Intrón I del gen de la S-RNasa presentes en los individuos de *P. serotina* analizados.
- Se especula que, por un lado, las secuencias encontradas en *P. serotina* que presentan un alto porcentaje de identidad con las secuencias reportadas en otras especies del género fueron heredadas a partir de un ancestro común que ya las poseía, mientras que, por otro lado, las secuencias que presentan un menor porcentaje de identidad con las reportadas en las bases de datos habrían evolucionado de manera independiente en *P. serotina*.

## 10 RECOMENDACIONES

- Complementar este estudio empleando geles de poliacrilamida al 4% en la electroforesis de todas las muestras; de esta manera se evitarán errores en la lectura por solapamiento de amplicones debido a tamaños muy cercanos.
- Continuar el estudio realizando cruces en el campo para comprobar que efectivamente los individuos con el mismo genotipo para este Intrón produzcan cruces incompatibles, así como también comprobar que los individuos con genotipos diferentes produzcan cruces compatibles. Mediante este análisis se podría determinar la eficiencia de este Intrón como marcador molecular en la predicción de cruces asistidos.
- Realizar un análisis funcional de la proteína S-RNasa, mediante un estudio de secuencias del gen completo. A través de este mecanismo, sería posible estudiar la secuencia de aminoácidos de esta RNasa, y determinar la variabilidad total de regiones hipervariables en el capulí ecuatoriano, lo que ayudaría en el entendimiento de cómo funciona el mecanismo de reconocimiento de secuencias de esta enzima y, por lo tanto, el mecanismo molecular de autoincompatibilidad en el capulí.
- Realizar una asociación entre la región hipervariable de la proteína con el tamaño o la secuencia del Intrón I para poder utilizar este Intrón como marcador molecular de autoincompatibilidad.
- Realizar estudios similares a éste, pero analizando el Intrón II, de tal manera que se puedan comparar los resultados y concluir cuál de ellos es más eficiente como marcador molecular de autoincompatibilidad en el capulí.

## 11 REFERENCIAS

- Badenes, M. L., & Parfitt, D. E. (1995). Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(7-8), 1035–1041. doi:10.1007/BF00222918
- Banović, B., Survanovsky, N., Konstantinovic, M., & Maksimovic, V. (2007). Basic RNases of wild almond (*Prunus webbii*): cloning and characterization of six new S-RNase and one non-S RNase genes. *Journal of Plant Physiology*, 166(4), 395–402. doi:10.1016/j.jplph.2008.06.009
- Benbouza, H., Mergeai, G., & Jacquemin, J.-M. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Base*. Retrieved from <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=1128>
- Bennett, M. D. (2004). Perspectives on polyploidy in plants – ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 411–423. doi:10.1111/j.1095-8312.2004.00328.x
- Beppu, K., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., & Kataoka, I. (2002). Diversity of S-RNase genes and S-haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.), (77), 658–665.
- Bortiri, E., Sang, Hun Oh, Gao, F. Y., & Potter, D. (2006). Phylogenetic analysis of morphology in *Prunus* reveals extensive homoplasy. *Plant Systematics and Evolution*, 259(10), 53–71. doi:10.1007/s00606-006-0427-8
- Bošković, R., Tobutt, K. R., Batlle, I., & Duval, H. (1997). Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica*, 97(2), 167–176. doi:10.1023/A:1003030913308

- Böšković, R., Tobutt, K. R., Batlle, I., Duval, H., & Gradziel, T. M. (2003). Styelar ribonucleases in almond: correlation with and prediction of incompatibility genotypes. *Plant Breeding*, *122*(1), 70 – 76. doi:10.1046/j.1439-0523.2003.00744.x
- Bošković, R., Tobutt, K. R., Duval, H., Batlle, I., Dicenta, F., & Vargas, F. J. (1999). A styelar ribonuclease assay to detect self-compatible seedlings in almond progenies. *Theoretical and Applied Genetics*, *99*(5), 800–810. doi:10.1007/s001220051299
- Broothaerts, W., Janssens, G. A., Proost, P., & Broekaert, W. F. (1995). cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Molecular Biology*, *27*(3), 499–511. doi:10.1007/BF00019317
- Calladine, C. R., Collis, C. M., Drew, H. R., & Mott, M. R. (1991). A study of electrophoretic mobility of DNA in agarose and polyacrylamide gels. *Journal of Molecular Biology*, *221*(3), 981–1005.
- Channuntapipat, C., Sedgley, M., & Collins, G. (2001). Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S1, S7, S8, and Sf alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Theoretical and Applied Genetics*, *103*(6-7), 1115–1122. doi:10.1007/s001220100629
- Comisión Nacional para el conocimiento y el uso de la biodiversidad (CONABIO). (2012). *Prunus serotina* (p. 156). México DF: Gobierno de la República de México. Retrieved from <[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arbolesdoctos/60rosac6m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arbolesdoctos/60rosac6m.pdf)>.
- Crossa Raynaud, P., & Grasselly, C. (1985). Existence de groupes d'intersterilite chez l'amandier. *Theoretical and Applied Genetics*, *90*(7-8), 43–45.

- Cruz García, F., & Juárez Díaz, J. A. (2007). Sistemas de reconocimiento célula-célula basados en S-RNasa que promueven la diversidad genética en las plantas. *Mensaje Bioquímico*, 31, 157–171.
- Darlington, C. (1928). *Studies in Prunus: i, ii* (2nd Edition., Vol. I, II). Boston, Massachusetts: The Macmillan Company.
- De Cuyper, B., Sonneveld, T., & Tobutt, K. R. (2005). Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Molecular Ecology*, 14(4), 945–955. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02460.x
- de Nettancourt. (1978). Incompatibility in angiosperms. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 13(4), 370–375. doi:10.1007/BF02851938
- Dickinson, H. G., Crabbe, M. J. C., & Gaude, T. (1992). Gametophytic Self-Incompatibility Systems: S Gene Products. In Scott D. Russell and Christian Dumas (Ed.), *International Review of Cytology* (Vol. Volume 140, pp. 525–561). Academic Press. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769608611080>
- Donoso, J., Aros, D., Meneses, C., & Infante, R. (2009). Identification of s-alleles associated with self-incompatibility in apricots (*Prunus armeniaca* L.) using molecular markers. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7, 270–273.
- Downey, S. L., & Iezzoni, A. F. (2000). Polymorphic DNA Markers in Black Cherry (*Prunus serotina*) Are Identified Using Sequences from Sweet Cherry, Peach, and Sour Cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(1), 76–80.
- Fowells, H. A. (1965). *Silvics of forest trees of the United States*. Washington, D.C.: U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service. Retrieved from <http://catalog.hathitrust.org/Record/001507718>

- Fresnedo, 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. doi:10.1007/s10722-010-9592-2
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition): Three-volume set* (4th edition.). Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guadalupe, J. (2013). *Estudio preliminar de la diversidad genética del capulí en cinco provincias de la región andina del Ecuador*. (Tesis de Pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito-Ecuador.
- Halász, J., Fodor, Á., Hegedűs, A., & Pedryc, A. (2008). Identification of a new self-incompatibility allele (S31) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection. *Scientia Horticulturae*, 116(4), 448–451. doi:10.1016/j.scienta.2008.02.009
- Haring, V., Gray, J. E., McClure, B. A., Anderson, M. A., & Clarke, A. E. (1990). Self-incompatibility: a self-recognition system in plants. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4983), 937–941.
- Igic, B., & Kohn, J. R. (2001). Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13167–13171. doi:10.1073/pnas.231386798
- Intriago, D. (2013). *Análisis de la diversidad genética del capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) en la región interandina del Ecuador mediante marcadores microsatélites*. (Tesis de Pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito-Ecuador.

- Ioerger, T. R., Clark, A. G., & Kao, T. H. (1990). Polymorphism at the self-incompatibility locus in Solanaceae predates speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24), 9732–9735.
- 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.
- Kester, D. E., Gradziel, T. M., & Micke, W. C. (1994). Identifying Pollen Incompatibility Groups in California Almond Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(1), 106–109.
- Kumar, A., & Panigrahi, G. (1995). *The Family Rosaceae in India: Revisionary Studies on Some Genera*. Bishen Singh Mahendra Pal Singh.
- Lewis, D. (1949). Incompatibility in Flowering Plants. *Biological Reviews*, 24(4), 472–496.  
doi:10.1111/j.1469-185X.1949.tb00584.x
- Matton, D. P., Maes, O., Laublin, G., Xike, Q., Bertrand, C., Morse, D., & Cappadocia, M. (1997). Hypervariable Domains of Self-Incompatibility RNases Mediate Allele-Specific Pollen Recognition. *The Plant Cell Online*, 9(10), 1757–1766.  
doi:10.1105/tpc.9.10.1757
- Maynard, C. A., Kavanagh, K., Fuernkranz, H., & Drew, A. P. (1991). Black Cherry (*Prunus serotina* Ehrh.). In P. D. Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Trees III* (pp. 3–22). Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-13231-9\\_1](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-13231-9_1)

- McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., & Clarke, A. E. (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*, *342*(6252), 955–957. doi:10.1038/342955a0
- McVaugh, R. (1951). A revision of the North American black cherries (*Prunus serotina* Ehrh., and relatives), *7*(4), 279–315. doi:10.2307/2804698
- Mille, L. (1942). El Capulí. In *FLORA-Instituto de Ciencias Naturales del Ecuador* (Vol. 2, pp. 50–51).
- Moore, J. N., & Ballington, J. R. (1990). *Genetic resources of temperate fruit and nut crops*. International Society for Horticultural Science.
- Morton, J. F. (1987). *Fruits of warm climates*. J.F. Morton.
- Mulligan, G., & Munro, D. (1981). THE BIOLOGY OF CANADIAN WEEDS.:51. *Prunus virginiana* L. and *P. serotina* Ehrh. *Canadian Journal of Plant Science*, *61*(4), 977–992. doi:10.4141/cjps81-144
- Muys, B., Maddelein, D., & Lust, N. (1992). Ecology, practice and policy of black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) management in Belgium. *Silva Gandavensis*, *57*(0). Retrieved from <http://ojs.ugent.be/silva/article/view/885>
- Newbiggin, E., Anderson, M., & Clarke, A. (1993). Gametophytic Self-Incompatibility Systems. *The Plant Cell*, *5*(10), 1315–1324.
- Ortega, E., Bosković, 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: MGG*, *276*(5), 413–426. doi:10.1007/s00438-006-0146-4

- 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. doi:10.1111/j.1439-0523.2004.01058.x
- Pairon, M., Jacquemart, A.-L., & Potter, D. (2008a). Detection and Characterization of Genome-specific Microsatellite Markers in the Allotetraploid *Prunus serotina*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *133*(3), 390–395.
- Pairon, M., Jacquemart, A.-L., & Potter, D. (2008b). Detection and Characterization of Genome-specific Microsatellite Markers in the Allotetraploid *Prunus serotina*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *133*(3), 390–395.
- Pierce, B. A. (2006). *Genética: un enfoque conceptual*. Editorial Médica Panamericana S.A. Retrieved from <http://books.google.com.ec/books?id=OXCuPAAACAAJ>
- Popenoe, W., & Pachano, A. (1922). The Capulín Cherry. In *Journal of Heredity* (Vol. 13, pp. 50–62).
- Powell, G. R., & Beardmore, T. (2002). New Brunswick tree and shrub species of concern: a field guide [OUT OF PRINT], 212E. Retrieved from <https://cfs.nrcan.gc.ca/publications?id=19658>
- Qiao, H., Wang, F., Zhao, L., Zhou, J., Lai, Z., Zhang, Y., ... Xue, Y. (2004). The F-box protein AhSLF-S2 controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell*, *16*(9), 2307–2322. doi:10.1105/tpc.104.024919
- Rahemi, A., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., Gradziel, T., & Chaparro, J. (2010). Genetic variation of S-alleles in wild almonds and their related *Prunus* species.

- Australian Journal of Crop Science*. Retrieved from <http://www.highbeam.com/doc/1P3-2243615241.html>
- Rehder, A. (1940). *Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America: exclusive of the subtropical and warmer temperate regions*. The Macmillan Company.
- 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. doi:10.1046/j.1365-313X.1997.12010223.x
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., ... Kao, T.-H. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, *429*(6989), 302–305. doi:10.1038/nature02523
- Sonneveld, T., & Tobutt, K. R. (2003). Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, *107*(6), 1059–1070. doi:10.1007/s00122-003-1274-4
- Sullivan, J. A., Shirasu, K., & Deng, X. W. (2003). The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Reviews. Genetics*, *4*(12), 948–958. doi:10.1038/nrg1228
- Sutherland, B. G., Robbins, T. P., Tobutt, K. R., & Weber, W. e. (2004). Primers amplifying a range of *Prunus* S-alleles. *Plant Breeding*, *123*(6), 582–584. doi:10.1111/j.1439-0523.2004.01016.x
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

- distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121
- Tamura, Ushijima, K., Sassa, H., Hirano, H., Tao, R., Gradziel, T. M., & Dandekar, A. M. (2000). Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(3), 344–349. doi:10.1007/s001220051489
- Tanksley, S. D., & Loaiza-Figueroa, F. (1985). Gametophytic self-incompatibility is controlled by a single major locus on chromosome 1 in *Lycopersicon peruvianum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(15), 5093–5096.
- Tao, R., Yamane, H., Sassa, H., Mori, H., Gradziel, T. M., Dandekar, A. M., & Sugiura, A. (1997). Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant & Cell Physiology*, 38(3), 304–311.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- USDA, ARS, & National Genetic Resources Program. (n.d.). *Germplasm Resources Information Network*. Beltsville, Maryland: National Germplasm Resources Laboratory. Retrieved from URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?30099>
- Ushijima, K. (1998). Characterization of the flanking regions of the S-RNase genes of Japanese pear (*Pyrus serotina*) and apple (*Malus x domestica*). *Gene*, 211(1), 159–167.

- Vanhellemont, M. (2009). *Present and future population dynamics of Prunus serotina in forests in its introduced range* (PhD Thesis). Ghent University, Belgium.
- Willems, A. R., Schwab, M., & Tyers, M. (2004). A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1695(1-3), 133–170. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.027
- 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. doi:10.1080/07352689.2012.715986
- Xue, Y., Carpenter, R., Dickinson, H. G., & Coen, E. S. (1996). Origin of allelic diversity in antirrhinum S locus RNases. *The Plant Cell*, 8(5), 805–814. doi:10.1105/tpc.8.5.805
- Yaegaki, H., Shimada, T., Moriguchi, T., Hayama, H., Haji, T., & Yamaguchi, M. (2001). Molecular characterization of S-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *Sexual Plant Reproduction*, 13(5), 251–257. doi:10.1007/s004970100064
- Zuccherelli, S., Tassinari, P., Broothaerts, W., & Dondini, L. (2002). S-Allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sexual Plant Reproduction*, 15(3), 153–158. doi:10.1007/s00497-002-0145-5

## 12 TABLAS

**Tabla 1.** Efecto de la tetraploidización sobre el fenotipo de incompatibilidad en varias especies originalmente (2n) autoincompatibles (Lewis, 1949)

Espece	Origen de tetraploidía	Efecto	Autor
<i>Antirrhinum molle</i>	Colchicina	Auto-compatible	Straub, 1941
<i>Campanula persicifolia</i>	Espontáneo	Auto-compatible	Gairdner, 1926
<i>Petunia axillaris</i>	Colchicina	Auto-compatible	Stout & Chandler, 1941
<i>Pyrus communis</i>	Espontáneo	Auto-compatible	Crane & Lewis, 1942
<i>Solanum (3 especies)</i>	Colchicina	Auto-compatible	Livermore & Johnstone, 1939
<i>Trifolium repens</i>	Colchicina	Auto-compatible	Atwood, 1944
<i>Ananas sativus</i>	Colchicina	No hay efecto	Kerns & Collins, 1947
<i>Brassica campestris</i>	Colchicina	No hay efecto	Howard, 1942
<i>Raphanus sativus</i>	Colchicina	No hay efecto	Howard, 1942
<i>Taraxacum koksaghys</i>	Colchicina	No hay efecto	Bannan, 1946

**Tabla 2.** Bandas amplificadas (122) en las 75 muestras analizadas y grupos alélicos (I-X) formados de acuerdo al criterio de tamaños en pb.

No	Alelo	Tamaño	Grupo alélico	
1	H013A	1155	I (1155-1117)  Diferencia intragrupal=38pb	
2	H016A	1155		
3	<b>H025A</b>	<b>1155</b>		
4	H035A	1155		
5	IMB003A	1143		
6	IMB007A	1143		
7	IMB010A	1143		
8	CAN001A	1135		
9	C012A	1133		
10	PIC018A	1119		
11	CAR003A	1117		
12	<b>CAR012A</b>	<b>1117</b>		
Diferencia intergrupal=670pb				
13	CAR004B	447	II (447-442)  Diferencia intragrupal=5pb	
14	CAR010B	447		
15	IMB009B	442		
16	AZU005A	442		
17	AZU010A	442		
18	<b>AZU015A</b>	<b>442</b>		
19	AZU027A	442		
20	AZU029A	442		
Diferencia intergrupal=16pb				
21	CAR006C	426		III (426-420)  Diferencia intragrupal=6pb
22	CAR009C	426		
23	C003B	426		
24	AZU001B	426		
25	PIC002B	425		
26	PIC007B	425		
27	PIC010B	425		
28	PIC016B	425		
29	T034A	424		
30	IMB014C	424		
31	H016B	424		
32	H023B	424		
33	H031B	424		
34	CAN001B	420		
35	CAN017B	420		

Tabla 2. Continuación.

No	Alelo	Tamaño	Grupo alélico
36	<b>CAN011B</b>	<b>420</b>	
Diferencia intergrupala=19pb			
37	AZU002C	401	IV (401-398)
38	AZU010C	401	
39	AZU021C	401	Diferencia intragrupal=3pb
40	AZU022C	401	
41	IMB003D	399	
42	IMB007D	399	
43	IMB009D	399	
44	IMB015D	399	
45	CAN003C	398	
46	<b>CAN022C</b>	<b>398</b>	
47	PIC003C	398	
48	PIC014C	398	
49	<b>PIC019C</b>	<b>398</b>	
Diferencia intergrupala=9pb			
50	<b>H006C</b>	<b>389</b>	V (389-386)
51	<b>H023C</b>	<b>389</b>	
52	<b>CAR005D</b>	<b>389</b>	Diferencia intragrupal=3pb
53	<b>CAR006D</b>	<b>389</b>	
54	<b>CAR007D</b>	<b>389</b>	
55	<b>CAR008D</b>	<b>389</b>	
56	<b>CAR009D</b>	<b>389</b>	
57	<b>AZU001D</b>	<b>387</b>	
58	<b>AZU002D</b>	<b>387</b>	
59	<b>AZU005D</b>	<b>387</b>	
60	<b>AZU011D</b>	<b>387</b>	
61	<b>AZU021D</b>	<b>387</b>	
62	<b>AZU027D</b>	<b>387</b>	
63	<b>AZU029D</b>	<b>387</b>	
64	<b>T020B</b>	<b>386</b>	
65	<b>T004B</b>	<b>386</b>	
66	<b>T005B</b>	<b>386</b>	
67	<b>T013B</b>	<b>386</b>	
68	<b>T022B</b>	<b>386</b>	
69	<b>T030B</b>	<b>386</b>	
Diferencia intergrupala=6pb			
70	<b>IMB006E</b>	<b>380</b>	VI (380-377)
71	<b>IMB008E</b>	<b>380</b>	

Tabla 2. Continuación.

No	Alelo	Tamaño	Grupo alélico
72	IMB010E	380	Diferencia intragrupal=3pb
73	<b>IMB011E</b>	<b>380</b>	
74	IMB014E	380	
75	CAR003E	378	
76	CAR009E	378	
77	<b>CAR011E</b>	<b>378</b>	
78	C001C	377	
79	C003C	377	
80	C009C	377	
81	C015C	377	
Diferencia intergrupal=12pb			
82	H001D	365	VII (365-361)  Diferencia intragrupal=4pb
83	H006D	365	
84	H013D	365	
85	H018D	365	
86	T004C	365	
87	T012C	365	
88	T024C	365	
89	T034C	365	
90	CAN007D	365	
91	<b>CAN009D</b>	<b>365</b>	
92	CAN017D	365	
93	CAN021D	365	
94	CAN024D	365	
95	C014D	363	
96	C015D	363	
97	C017D	363	
98	C019D	363	
99	IMB009F	361	
100	<b>IMB011F</b>	<b>361</b>	
101	IMB014F	361	
102	IMB015F	361	
Diferencia intergrupal=3pb			
103	PIC003D	358	VIII (358-355)  Diferencia intragrupal=3pb
104	PIC007D	358	
105	PIC010D	358	
106	PIC016D	358	
107	PIC018D	358	

**Tabla 2.** Continuación.

No	Alelo	Tamaño	Grupo alélico
108	PIC023D	358	
109	AZU011E	357	
110	H014E	355	
Diferencia intergrupala=6pb			
111	C003E	349	IX (349-344)  Diferencia intragrupal=5pb
112	C009E	349	
113	C013E	349	
114	C014E	349	
115	CAN003E	348	
116	CAN009E	348	
117	CAN022E	348	
118	CAN024E	348	
119	T013D	345	
120	T022D	345	
121	PIC007E	344	
Diferencia intergrupala=34pb			
122	CAR011F	310	X (310)

Las bandas resaltadas en negrita corresponden a las bandas seleccionadas para el secuenciamiento.

**Tabla 3.** Resumen del total de bandas amplificadas en cada provincia, número de alelos encontrados en cada una y el rango de tamaño en el que estos se encuentran

Provincia	Total bandas amplificadas	Total alelos	Rango de Tamaños
Carchi	15	6	1117-310
Imbabura	18	6	1143-361
Pichincha	15	5	1119-344
Cañar	15	5	1135-348
Cotopaxi	14	5	1133-349
Azuay	18	5	442-357
Chimborazo	14	5	1155-355
Tungurahua	13	4	424-345
Total	122		

**Tabla 4.** Resumen del rango en pares de bases para cada grupo alélico, el número de bandas amplificadas en cada grupo y el número de bandas seleccionadas en cada grupo para ser secuenciadas

<b>Grupo Alélico</b>	<b>Rango (pb)</b>	<b>No. bandas amplificadas</b>	<b>No. bandas seleccionadas para secuenciación</b>
I	(1155-1117)	12	2
II	(447-442)	8	1
III	(426-420)	16	1
IV	(401-398)	13	2
V	(389-386)	20	1
VI	(380-377)	12	2
VII	(365-361)	21	2
VIII	(358-355)	8	1
IX	(349-344)	11	2
X	310	1	1
	Total	122	15

**Tabla 5.** Resultados del BLAST realizado con las secuencias consensus obtenidas para cada uno de los alelos. La secuencia que reporta mayor puntaje de acuerdo al algoritmo de búsqueda utilizado, es considerada como el alelo putativo de la secuencia analizada. El tamaño presentado en esta tabla es el tamaño del fragmento secuenciado. La secuencia de las bandas CAR012A y H025A no fue legible, por tanto no se pudo realizar el análisis BLAST con estas secuencias.

Secuencia y grupo alélico	Tamaño (pb)	Resultados BLAST					Accesión
		Match	Query Cover	Identidad	Puntaje	Sequence ID	
CAR012A (I)	1100						
H025A (I)	1100						
AZU015A (II)	445	<i>Prunus webbii</i> S5	100%	83%	385	EU294326.1	<i>Prunus webbii</i> S5-RNase gene partial cds.
		<i>Prunus avium</i> S4	94%	83%	364	AJ635288.1	<i>Prunus avium</i> partial S-RNase gene for ribonuclease S4 precursor exons 1-2 cultivar Napoleon allele S4.
CAN011B (III)	410	<i>Prunus dulcis</i> S23 Cultivar Ramillete	97%	90%	420	FN429354.1	<i>Prunus dulcis</i> partial s-RNase gene for S-ribonuclease allele S23 cultivar Ramillete exons 1-3.
		<i>Prunus dulcis</i> S23 Cultivar ITAP-4	97%	90%	420	FN429355.1	<i>Prunus dulcis</i> partial s-RNase gene for S-ribonuclease allele S23 cultivar selection ITAP-4 exons 1-3.
CAN011' (IV)	402	<i>Prunus armeniaca</i> S52	100%	85%	396	KF951503.1	<i>Prunus armeniaca</i> S locus S-RNase 52 (S-RNase) gene complete cds.
		<i>Prunus armeniaca</i> S21	98%	85%	388	EU570210.1	<i>Prunus armeniaca</i> S21-RNase (S-RNase) gene S-RNase-S21 allele partial cds.
PIC019C(IV)	402	<i>Prunus armeniaca</i> S52	100%	85%	396	KF951503.1	<i>Prunus armeniaca</i> S locus S-RNase 52 (S-RNase) gene complete cds.
		<i>Prunus armeniaca</i> S21	98%	85%	388	EU570210.1	<i>Prunus armeniaca</i> S21-RNase (S-RNase) gene S-RNase-S21 allele partial cds.
CAN022C (IV)	402	<i>Prunus armeniaca</i> S52	100%	85%	396	KF951503.1	<i>Prunus armeniaca</i> S locus S-RNase 52 (S-RNase) gene complete cds.
		<i>Prunus armeniaca</i> S21	98%	85%	388	EU570210.1	<i>Prunus armeniaca</i> S21-RNase (S-RNase) gene S-RNase-S21 allele partial cds.
CAR007D (V)	387	<i>Prunus dulcis</i> S7	100%	97%	656	KC800707.1	<i>Prunus dulcis</i> genotype 23.5-16 St7-RNase gene exons 1 2 and partial cds.
		<i>Prunus tenella</i> S7	93%	98%	621	DQ983366.1	<i>Prunus tenella</i> S-RNase (S7) gene partial cds.

Tabla 5. Continuación

Secuencia y grupo alélico	Tamaño (pb)	Resultados BLAST					Accesión
		Match	Query Cover	Identidad	Puntaje	Sequence ID	
IMB011E (VI) *	382	<i>Prunus salicina</i> Sj	93%	92%	496	AB093132.1	<i>Prunus salicina</i> gene for Sj-RNase partial cds.
		<i>Prunus salicina</i> Sa	100%	90%	486	AB252411.1	<i>Prunus salicina</i> gene for Sa-RNase complete cds.
		<i>Prunus fenzliana</i> S7	100%	90%	477	HM003185.1	<i>Prunus fenzliana</i> ribonuclease S7 (S-RNase) gene partial sequence.
CAR011E (VI) *	382	<i>Prunus webbii</i> S10	100%	88%	448	EU294324.1	<i>Prunus webbii</i> S10-RNase gene partial cds.
		<i>Prunus dulcis</i> S41	100%	88%	442	HQ622704.1	<i>Prunus dulcis</i> ribonuclease S41 precursor (s-RNase) gene s-RNase-S41 allele exons 1 through 3 and part cds.
		<i>Prunus webbii</i> S4	100%	87%	433	DQ118146.1	<i>Prunus webbii</i> S4 S-RNase gene partial cds.
		<i>Prunus persica</i> S3	100%	87%	422	AB537563.1	<i>Prunus persica</i> S3-RNase gene for S-ribonuclease 3 complete cds.
IMB011F (VII)	363	<i>Prunus webbii</i> S3	100%	93%	525	EU294325.1	<i>Prunus webbii</i> S3-RNase gene partial cds.
		<i>Prunus salicina</i> Se	100%	93%	521	AB280793.1	<i>Prunus salicina</i> gene for Se-RNase complete cds haplotype: Se.
CAN009D (VII)	363	<i>Prunus webbii</i> S3	100%	93%	525	EU294325.1	<i>Prunus webbii</i> S3-RNase gene partial cds.
		<i>Prunus salicina</i> Se	100%	93%	521	AB280793.1	<i>Prunus salicina</i> gene for Se-RNase complete cds haplotype: Se.
H014' (VII)	363	<i>Prunus webbii</i> S3	100%	93%	525	EU294325.1	<i>Prunus webbii</i> S3-RNase gene partial cds.
		<i>Prunus salicina</i> Se	100%	93%	521	AB280793.1	<i>Prunus salicina</i> gene for Se-RNase complete cds haplotype: Se.
H014E (VIII)	358	<i>Prunus dulcis</i> S6	100%	96%	577	HQ622705.1	<i>Prunus dulcis</i> ribonuclease S6 precursor (s-RNase) gene s-RNase-S6 allele exons 1 through 3 and part cds.
		<i>Prunus dulcis</i> S6	100%	96%	577	AM231657.1	<i>Prunus dulcis</i> partial s-RNase gene for ribonuclease S6 precursor exons 1-3 allele S6 cultivar Ramillete.
		<i>Prunus dulcis</i> Se	100%	96%	571	DQ156216.1	<i>Prunus dulcis</i> cultivar Peerless Se-RNase (S) gene Se allele partial cds.

Tabla 5. Continuación.

Secuencia y grupo alélico	Tamaño (pb)	Resultados BLAST					Accesión
		Match	Query Cover	Identidad	Puntaje	Sequence ID	
CAN009E (IX)	353	<i>Prunus avium</i> Cult. Aydin S10	100%	85%	353	JQ280519.1	<i>Prunus avium</i> cultivar Aydin Siyahi S10-ribonuclease (S-RNase) gene S-RNase-S10 allele partial cds.
		<i>Prunus cerasifera</i> S14	100%	86%	350	AM992058.1	<i>Prunus cerasifera</i> partial s gene for self-incompatibility ribonuclease exons 1-2 allele 14.
CAN022E (IX)	353	<i>Prunus avium</i> Cult. Aydin S10	100%	85%	359	JQ280519.1	<i>Prunus avium</i> cultivar Aydin Siyahi S10-ribonuclease (S-RNase) gene S-RNase-S10 allele partial cds.
		<i>Prunus cerasifera</i> S14	100%	86%	355	AM992058.1	<i>Prunus cerasifera</i> partial s gene for self-incompatibility ribonuclease exons 1-2 allele 14.
CAR011F (X)	320	<i>Prunus amygdalus nairica</i> S9	100%	92%	453	HM003180.1	<i>Amygdalus nairica</i> ribonuclease S9 (S-RNase) gene partial sequence.
		<i>Prunus mume</i> S9	99%	92%	444	AB364470.1	<i>Prunus mume</i> S-RNase gene for S-ribonuclease partial cds allele: S9.

\*De acuerdo al tamaño calculado (382 pb) tanto IMB011E como CAR011E pertenecen al mismo grupo alélico (VI), sin embargo, las secuencias obtenidas para ambos fragmentos son diferentes. Por consiguiente, a este grupo alélico no se le puede asignar un alelo putativo.

**Tabla 6.** Genotipo putativo propuesto para cada uno de los individuos analizados. (Sj *P. salicina*/S10 *P. webbii*) significa que la banda amplificada pertenece al grupo alélico VI. A este grupo no se le pudo asignar un alelo putativo. N/A indica que la muestra no reportó amplificación.

	<b>Muestra</b>	<b>No Alelos</b>	<b>Genotipo S (Putativo)</b>
1	CAR003	2	S14 <i>P. dulcis</i> , (Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> )
2	CAR004	1	S5 <i>P. webbii</i>
3	CAR005	1	S7 <i>P. dulcis</i>
4	CAR006	2	S23 <i>P. dulcis</i> , S7 <i>P. dulcis</i>
5	CAR007	1	S7 <i>P. dulcis</i>
6	CAR008	1	S7 <i>P. dulcis</i>
7	CAR009	3	S23 <i>P. dulcis</i> , S7 <i>P. dulcis</i> , (Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> )
8	CAR010	1	S5 <i>P. webbii</i>
9	CAR011	2	(Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> ), S9 <i>P. amygdalus</i>
10	CAR012	1	S14 <i>P. dulcis</i>
11	IMB003	2	S14 <i>P. dulcis</i> , S52 <i>P. armeniaca</i>
12	IMB004	0	N/A
13	IMB006	1	(Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> )
14	IMB007	2	S14 <i>P. dulcis</i> , S52 <i>P. armeniaca</i>
15	IMB008	1	(Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> )
16	IMB009	3	S5 <i>P. webbii</i> , S52 <i>P. armeniaca</i> , S3 <i>P. webbii</i>
17	IMB010	2	S14 <i>P. dulcis</i> , (Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> )
18	IMB011	2	(Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> ), S3 <i>P. webbii</i>
19	IMB014	3	S23 <i>P. dulcis</i> , (Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> ), S3 <i>P. webbii</i>
20	IMB015	2	S52 <i>P. armeniaca</i> , S3 <i>P. webbii</i>
21	PIC002	1	S23 <i>P. dulcis</i>
22	PIC003	2	S52 <i>P. armeniaca</i> , S6 <i>P. dulcis</i>
23	PIC007	3	S23 <i>P. dulcis</i> , S6 <i>P. dulcis</i> , S10 <i>P. avium</i>
24	PIC010	2	S23 <i>P. dulcis</i> , S6 <i>P. dulcis</i>
25	PIC012	0	N/A
26	PIC014	1	S52 <i>P. armeniaca</i>
27	PIC016	2	S23 <i>P. dulcis</i> , S6 <i>P. dulcis</i>
28	PIC018	2	S14 <i>P. dulcis</i> , S6 <i>P. dulcis</i>
29	PIC019	1	S52 <i>P. armeniaca</i>
30	PIC023	1	S6 <i>P. dulcis</i>
31	CAN001	2	S14 <i>P. dulcis</i> , S23 <i>P. dulcis</i>
32	CAN003	2	S52 <i>P. armeniaca</i> , S10 <i>P. avium</i>
33	CAN007	1	S3 <i>P. webbii</i>
34	CAN009	2	S3 <i>P. webbii</i> , S10 <i>P. avium</i>
35	CAN011	2	S23 <i>P. dulcis</i> , S52 <i>P. armeniaca</i>
36	CAN014	0	N/A
37	CAN017	2	S23 <i>P. dulcis</i> , S3 <i>P. webbii</i>
38	CAN021	1	S3 <i>P. webbii</i>

Tabla 6. Continuación

	Muestra	No Alelos	Genotipo S (Putativo)
39	CAN022	2	S52 <i>P. armeniaca</i> , S10 <i>P. avium</i>
40	CAN024	2	S3 <i>P. webbii</i> , S10 <i>P. avium</i>
41	C001	1	(Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> )
42	C003	3	S23 <i>P. dulcis</i> , (Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> ), S10 <i>P. avium</i>
43	C008	0	N/A
44	C009	2	(Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> ), S10 <i>P. avium</i>
45	C012	1	S14 <i>P. dulcis</i>
46	C013	1	S10 <i>P. avium</i>
47	C014	2	S3 <i>P. webbii</i> , S10 <i>P. avium</i>
48	C015	2	(Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> ), S3 <i>P. webbii</i>
49	C017	1	S3 <i>P. webbii</i>
50	C019	1	S3 <i>P. webbii</i>
51	AZU001	2	S23 <i>P. dulcis</i> , S7 <i>P. dulcis</i>
52	AZU002	2	S52 <i>P. armeniaca</i> , S7 <i>P. dulcis</i>
53	AZU005	2	S5 <i>P. webbii</i> , S7 <i>P. dulcis</i>
54	AZU010	2	S5 <i>P. webbii</i> , S52 <i>P. armeniaca</i>
55	AZU011	2	S7 <i>P. dulcis</i> , S6 <i>P. dulcis</i>
56	AZU015	1	S5 <i>P. webbii</i>
57	AZU021	2	S52 <i>P. armeniaca</i> , S7 <i>P. dulcis</i>
58	AZU022	1	S52 <i>P. armeniaca</i>
59	AZU027	2	S5 <i>P. webbii</i> , S7 <i>P. dulcis</i>
60	AZU029	2	S5 <i>P. webbii</i> , S7 <i>P. dulcis</i>
61	H001	1	S3 <i>P. webbii</i>
62	H006	2	S7 <i>P. dulcis</i> , S3 <i>P. webbii</i>
63	H013	2	S14 <i>P. dulcis</i> , S3 <i>P. webbii</i>
64	H014	2	S6 <i>P. dulcis</i> , S3 <i>P. webbii</i>
65	H016	2	S14 <i>P. dulcis</i> , S23 <i>P. dulcis</i>
66	H018	1	S3 <i>P. webbii</i>
67	H023	2	S23 <i>P. dulcis</i> , S7 <i>P. dulcis</i>
68	H025	1	S14 <i>P. dulcis</i>
69	H031	1	S23 <i>P. dulcis</i>
70	H035	1	S14 <i>P. dulcis</i>
71	T004	2	S7 <i>P. dulcis</i> , S3 <i>P. webbii</i>
72	T005	1	S7 <i>P. dulcis</i>
73	T006	0	N/A
74	T012	1	S3 <i>P. webbii</i>
75	T013	2	S7 <i>P. dulcis</i> , S10 <i>P. avium</i>
76	T020	1	S7 <i>P. dulcis</i>

**Tabla 6.** Continuación.

	<b>Muestra</b>	<b>No Alelos</b>	<b>Genotipo S (Putativo)</b>
77	T022	2	S7 <i>P. dulcis</i> , S10 <i>P. avium</i>
78	T024	1	S3 <i>P. webbii</i>
79	T030	1	S7 <i>P. dulcis</i>
80	T034	2	S23 <i>P. dulcis</i> , S3 <i>P. webbii</i>

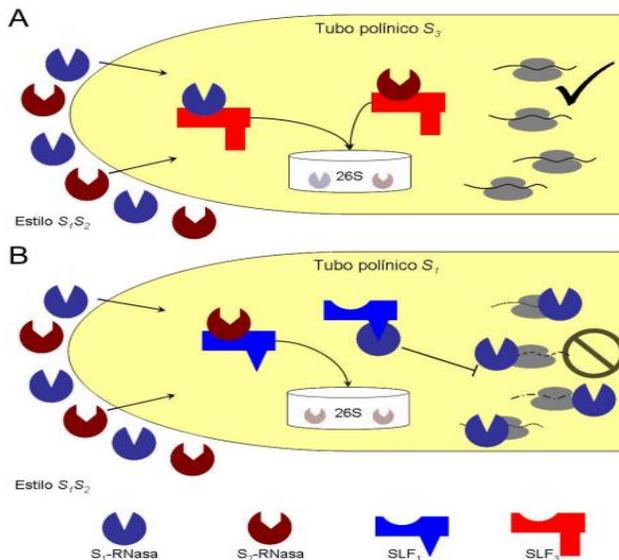
**Tabla 7.** Genotipos encontrados en las muestras analizadas

No	Genotipos encontrados	Muestras
1	(Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> )	IMB006, IMB008, C001
2	(Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> ), S10 <i>P. avium</i>	C009
3	(Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> ), S3 <i>P. webbii</i>	IMB011, C015
4	(Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> ), S9 <i>P. amygdalus</i>	CAR011
5	S10 <i>P. avium</i>	C013
6	S14 <i>P. dulcis</i>	CAR012, C012, H025, H035
7	S14 <i>P. dulcis</i> , (Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> )	CAR003, IMB010
8	S14 <i>P. dulcis</i> , S23 <i>P. dulcis</i>	CAN001, H016
9	S14 <i>P. dulcis</i> , S3 <i>P. webbii</i>	H013
10	S14 <i>P. dulcis</i> , S52 <i>P. armeniaca</i>	IMB003, IMB007
11	S14 <i>P. dulcis</i> , S6 <i>P. dulcis</i>	PIC018
12	S23 <i>P. dulcis</i>	PIC002, CAN011, H031
13	S23 <i>P. dulcis</i> , (Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> ), S10 <i>P. avium</i>	C003
14	S23 <i>P. dulcis</i> , (Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> ), S3 <i>P. webbii</i>	IMB014
15	S23 <i>P. dulcis</i> , S3 <i>P. webbii</i>	CAN017, T034
16	S23 <i>P. dulcis</i> , S6 <i>P. dulcis</i>	PIC010, PIC016
17	S23 <i>P. dulcis</i> , S6 <i>P. dulcis</i> , S10 <i>P. avium</i>	PIC007
18	S23 <i>P. dulcis</i> , S7 <i>P. dulcis</i>	CAR006, AZU001, H023
19	S23 <i>P. dulcis</i> , S7 <i>P. dulcis</i> , (Sj <i>P. salicina</i> /S10 <i>P. webbii</i> )	CAR009
20	S3 <i>P. webbii</i>	CAN007, CAN021, C017, C019, H001, H018, T012, T024
21	S3 <i>P. webbii</i> , S10 <i>P. avium</i>	CAN009, CAN024, C014
22	S5 <i>P. webbii</i>	CAR004, CAR010, AZU015
23	S5 <i>P. webbii</i> , S52 <i>P. armeniaca</i>	AZU010
24	S5 <i>P. webbii</i> , S52 <i>P. armeniaca</i> , S3 <i>P. webbii</i>	IMB009
25	S5 <i>P. webbii</i> , S7 <i>P. dulcis</i>	AZU005, AZU027, AZU029
26	S52 <i>P. armeniaca</i>	PIC014, PIC019, AZU022
27	S52 <i>P. armeniaca</i> , S10 <i>P. avium</i>	CAN003, CAN022
28	S52 <i>P. armeniaca</i> , S3 <i>P. webbii</i>	IMB015
29	S52 <i>P. armeniaca</i> , S6 <i>P. dulcis</i>	PIC003
30	S52 <i>P. armeniaca</i> , S7 <i>P. dulcis</i>	AZU002, AZU021
31	S6 <i>P. dulcis</i>	PIC023, H014
32	S7 <i>P. dulcis</i>	CAR005, CAR007, CAR008, T005, T020, T030
33	S7 <i>P. dulcis</i> , S10 <i>P. avium</i>	T013, T022
34	S7 <i>P. dulcis</i> , S3 <i>P. webbii</i>	H006, T004
35	S7 <i>P. dulcis</i> , S6 <i>P. dulcis</i>	AZU011

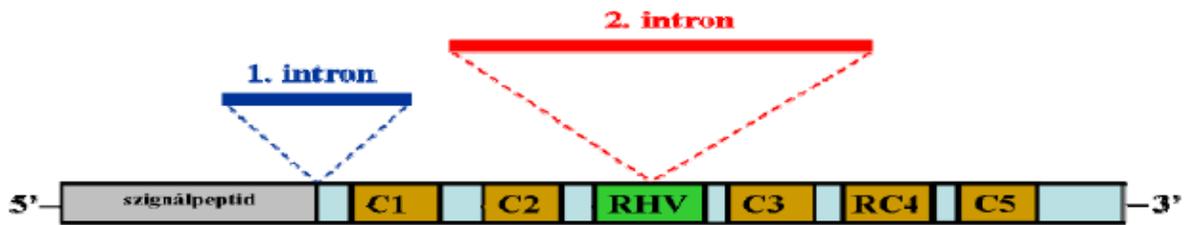
## 13 FIGURAS



**Figura 1.** Modelo de Autoincompatibilidad Gametofítica. Planta diploide con genotipo SaSb, que producirá granos de polen Sa ó Sb. Cuando los granos de polen con el haplotipo Sa ó Sb lleguen al estigma, éstos germinarán, produciendo un tubo polínico; sin embargo, su crecimiento será inhibido a nivel del estilo. Por otro lado, si el polen tiene un haplotipo Sx, el polen será aceptado y el tubo polínico alcanzará el saco embrionario y se llevará a cabo la fecundación, produciendo una progenie con individuos SaSx y SbSx (Cruz García & Juárez Díaz, 2007).



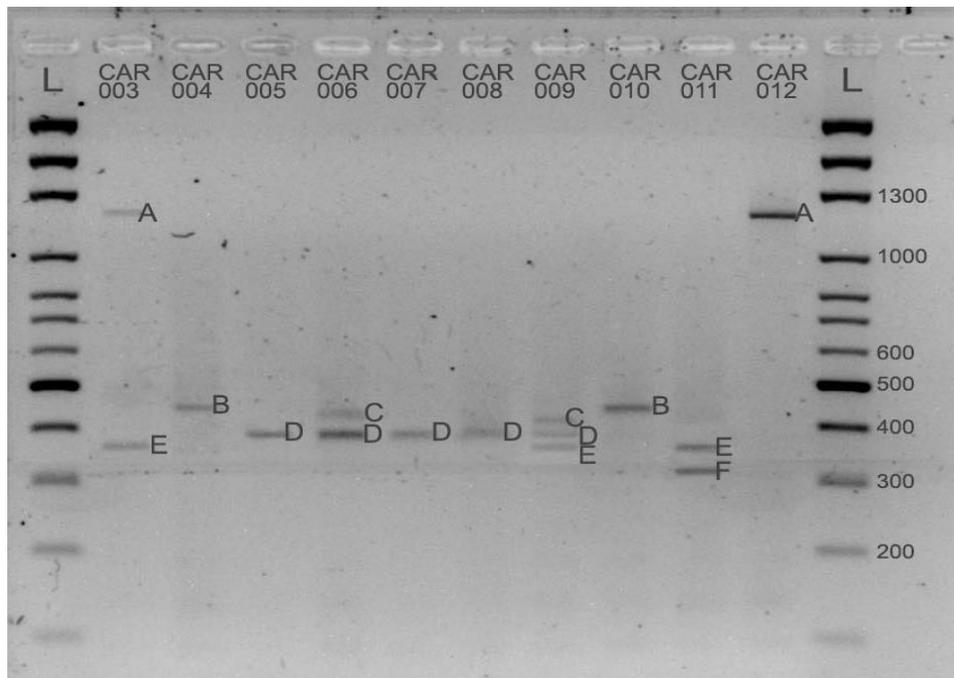
**Figura 2.** Modelo de la degradación de la S-RNasa por el proteosoma 26S. **A.** Cruza compatible entre un tubo polínico S<sub>3</sub> creciendo en un estilo S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>. En este caso tanto la S<sub>1</sub>-RNasa como la S<sub>2</sub>-RNasa se unen inespecíficamente a SLF, lo que provoca su ubiquitinación y degradación por el proteosoma 26S. **B.** Cruza incompatible entre un tubo polínico S<sub>1</sub> creciendo en un estilo S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>. En este caso se forman complejos S-RNasa-SLF específicos e inespecíficos. Solo los últimos serán degradados por el proteosoma 26S. Por lo que el complejo S-RNasas específico estará activo para degradar al RNA del tubo polínico ocasionando su muerte eventualmente (Cruz García & Juárez Díaz, 2007).



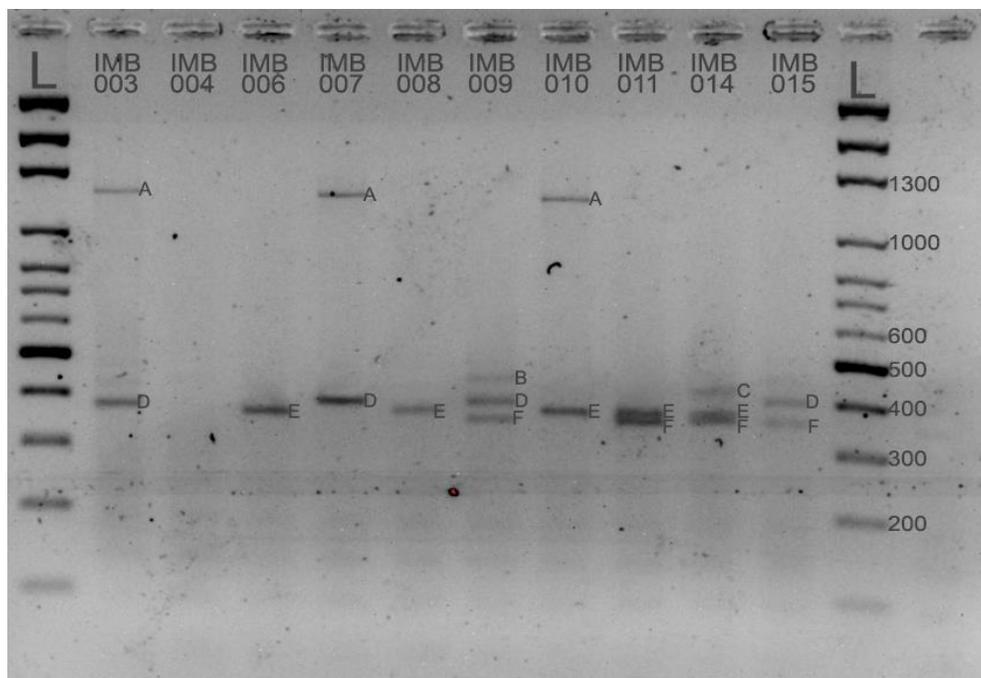
**Figura 3.** Estructura propuesta para el gen de la S-RNasa en las especies de la familia Rosaceae (Sonneveld, 2003)



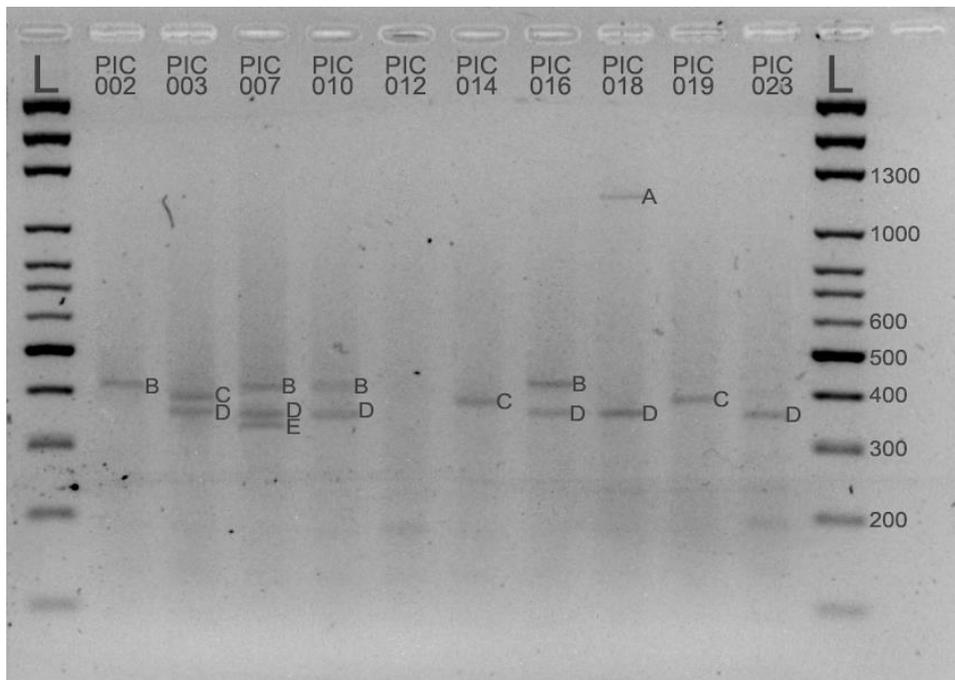
**Figura 4.** Mapa georeferenciado de la región continental de la República del Ecuador que señala las ocho provincias de donde provienen los 80 individuos de *P. serotina* analizados en la presente investigación (Intriago, 2013).



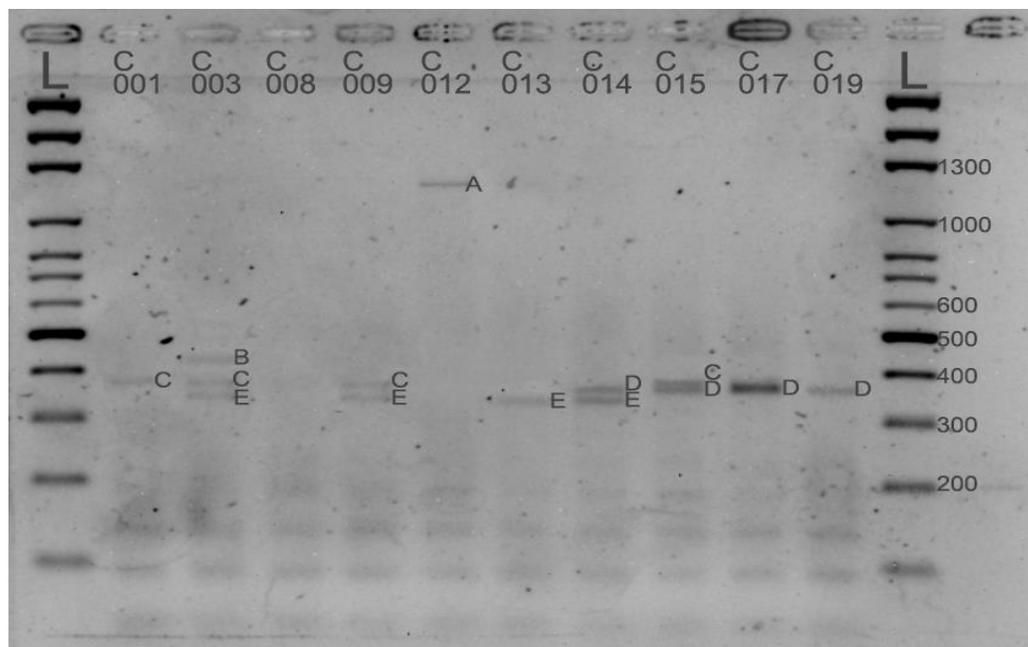
**Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Carchi usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 6 (A-F)



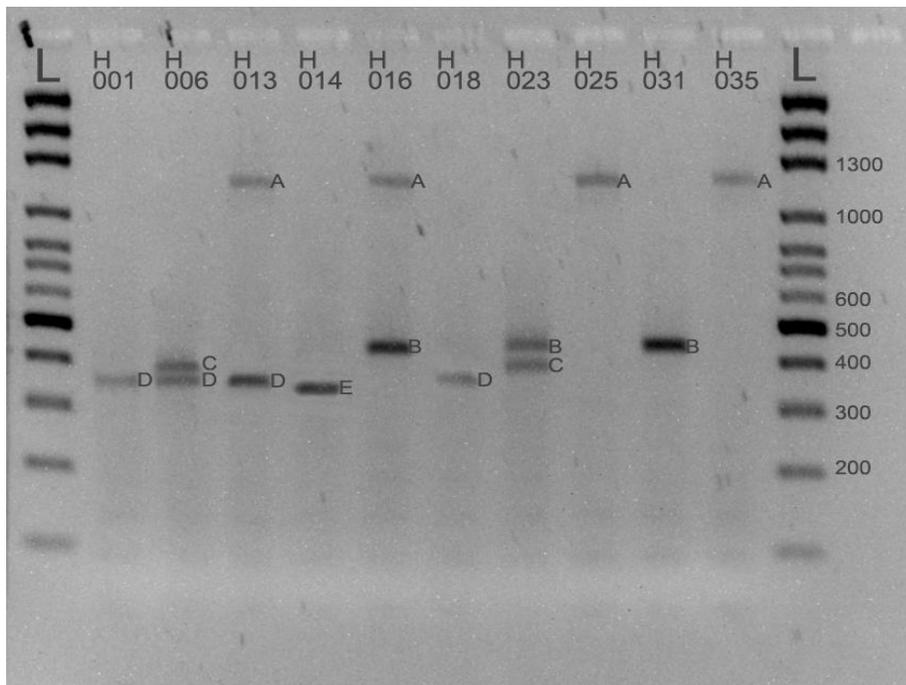
**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Imbabura usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 6 (A-F)



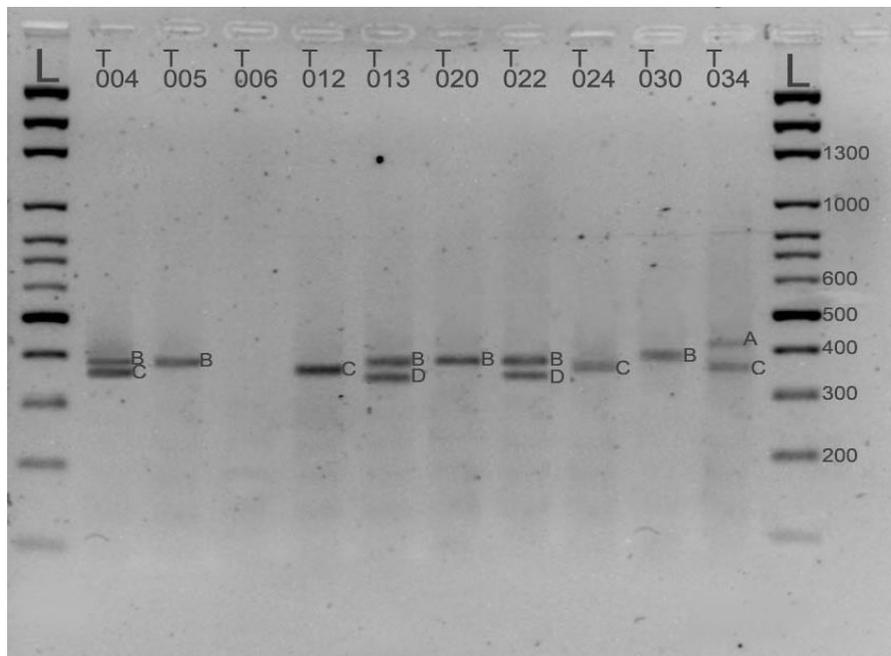
**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Pichincha usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 5 (A-E)



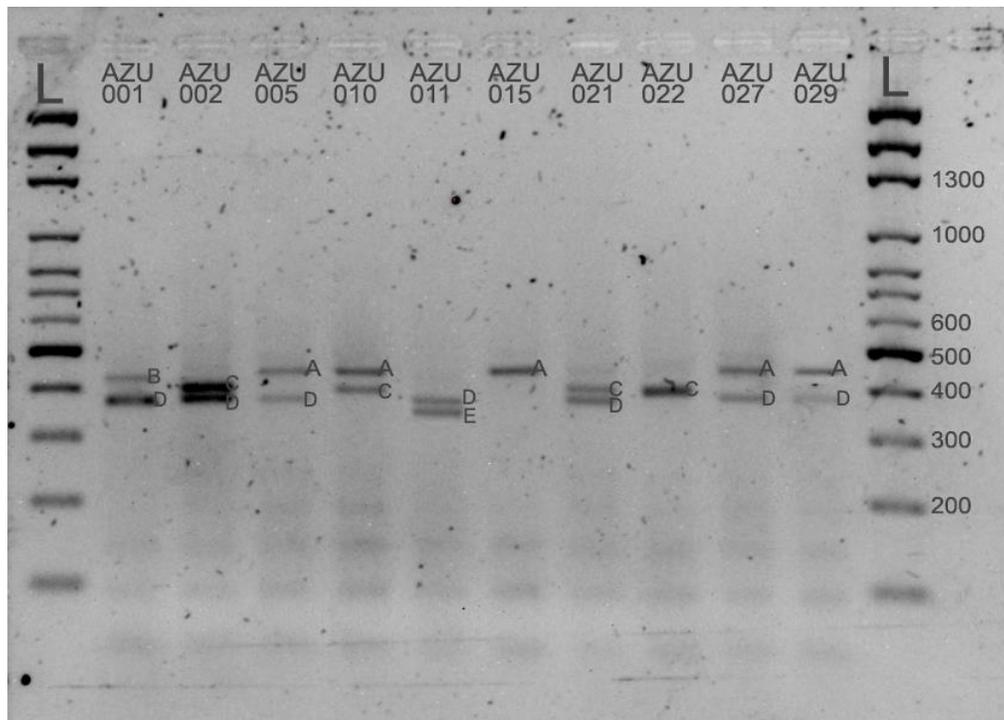
**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Cotopaxi usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 5 (A-E)



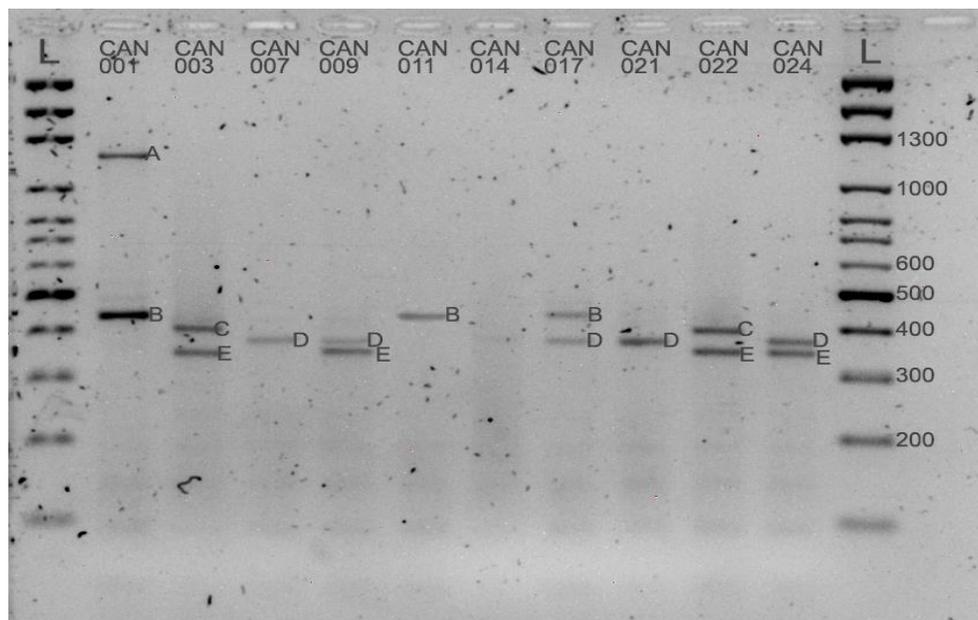
**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Chimborazo usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 5 (A-E)



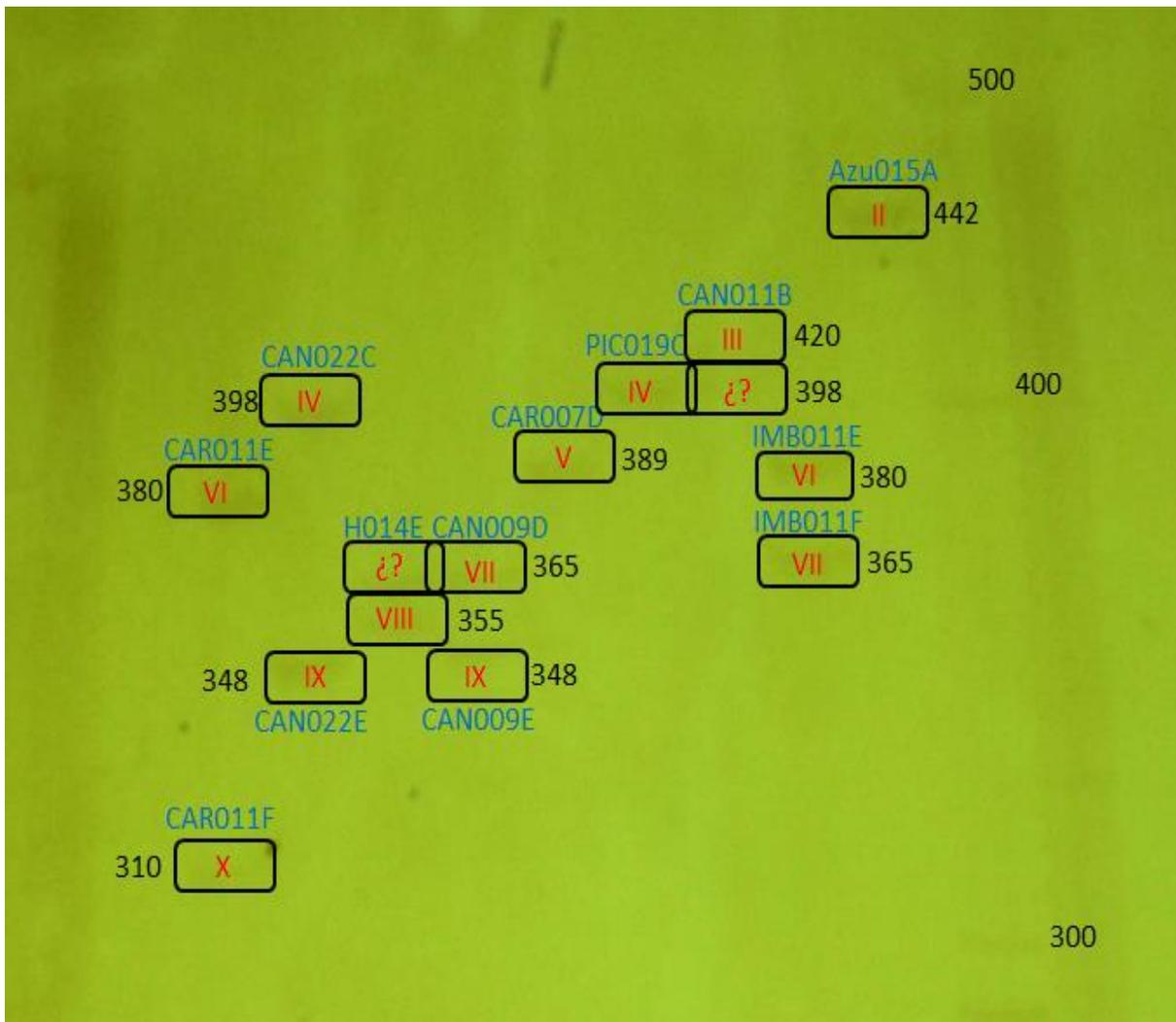
**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Tungurahua usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 4 (A-D)



**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Azuay usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 5 (A-E)



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa en las muestras de capulí de la Provincia de Cañar usando el set de primers PaConsI-F/EMPC1ConsRD. Número de alelos encontrados: 5 (A-E)



**Figura 13.** Gel de poliacrilamida con las bandas seleccionadas para reamplificación y secuenciación. Estas bandas representan a 9 de los 10 grupos alélicos. El grupo alélico I está excluido del gel debido a su tamaño: 1100 pb. Dado que la extracción de bandas se realizó apenas terminó la corrida, la tinción de cada una de ellas no es muy legible; por tanto se aclara mediante un esquema. ¿? Hace referencia a las bandas inesperadas encontradas en las muestras CAN011B y H014E.

## 14 ANEXOS

**Anexo 1.** Registro de las 80 muestras de *Prunus serotina* subsp. *capulí* provenientes de las 8 provincias analizadas.

<b>Código</b>	<b>Fecha de Colección</b>	<b>Provincia</b>	<b>Lugar</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>	<b>Edad</b>	<b>Estructura de las ramas</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
CAR003	25/05/2010	Carchi	San Isidro	N 00.35388 W 077.59280	Medio	Erectas	3006
CAR004	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.36597 W 077.56360	Adulto	Erectas	3020
CAR005	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.37017 W 077.56350	Medio	Dispersas	2998
CAR006	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.37017 W 077.56351	Adulto	Dispersas	2998
CAR007	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.37017 W 077.53330	Adulto	Dispersas	2998
CAR008	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.37147 W 077.56401	Joven	Dispersas	3004
CAR009	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.36343 W 077.56302	Adulto	Dispersas	2980
CAR010	25/05/2010	Carchi	Bolivar	N 00.32148 W 077.55143	Medio	Dispersas	2840
CAR011	25/05/2010	Carchi	Bolivar	N 00.30054 W 077.54125	Medio	Dispersas	2621
CAR012	25/05/2010	Carchi	Bolivar	N 00.30352 W 077.53471	Joven	Erectas	2621
IMB003	25/05/2010	Imbabura	Huyco-Pungo	N 00.18800 W 078.21243	Adulto	Erectas	2687
IMB004	25/05/2010	Imbabura	Huyco-Pungo	N 00.18721 W 078.21422	Adulto	Dispersas	2691
IMB006	25/05/2010	Imbabura	San Rafael	N 00.19099 W 078.22327	Adulto	Dispersas	2740
IMB007	09/09/2010	Imbabura	San Rafael	N 00.18945 W 078.22299	Adulto	Dispersas	2751
IMB008	09/09/2010	Imbabura	San Rafael	N 00.18981 W 078.22311	Adulto	Dispersas	2748
IMB009	09/09/2010	Imbabura	San Rafael	N 00.18052 W 078.22107	Adulto	Dispersas	2813
IMB010	09/09/2010	Imbabura	San Pablo	N 00.18277 W 078.22188	Adulto	Erectas	2803
IMB011	09/09/2010	Imbabura	San Pablo	N 00.18873 W 078.22543	Adulto	Dispersas	2778
IMB014	07/06/2010	Imbabura	San Pablo	N 00.20532 W 078.18553	Adulto	Dispersas	2792
IMB015	07/06/2010	Imbabura	San Pablo	N 00.20436 W 078.18984	Adulto	Erectas	2759
PIC002	11/02/2012	Pichincha	Quito Norte	S 00° 11' 0.19"/W 078° 28' 48.3"	Adulto	Erectas	2811
PIC003	11/02/2012	Pichincha	Quito Norte	S 00° 11' 02.1"/W 078° 28' 45.3"	Medio	Erectas	2780

## Anexo 1. Continuación

<b>Código</b>	<b>Fecha de colección</b>	<b>Provincia</b>	<b>Lugar</b>	<b>Coordenadas geográficas</b>	<b>Edad</b>	<b>Estructura de las ramas</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
PIC007	21/02/2012	Pichincha	Quito Norte	S 00° 10' 16.5"/W 078° 29' 33.8"	Adulto	Dispersas	2822
PIC010	21/02/2012	Pichincha	Quito Norte	S 00° 07' 58.3"/W 078° 30' 01.3"	Adulto	Dispersas	2860
PIC012	21/02/2012	Pichincha	Quito Norte	S 00° 09' 31.3"/W 078° 28' 52.3"	Adulto	Dispersas	2814
PIC014	25/02/2012	Pichincha	Quito Sur	S 00° 14' 40.6"/W 078° 31' 14.9"	Joven	Erectas	2816
PIC016	25/02/2012	Pichincha	Quito Sur	S 00° 14' 44.8"/W 078° 31' 22.5"	Adulto	Dispersas	2810
PIC018	14/04/2012	Pichincha	La Esperanza	N 00° 02' 41.3"/W 078° 14' 33.2"	Joven	Dispersas	2906
PIC019	14/04/2012	Pichincha	Tabacundo	N 00° 02' 46.3"/W 078° 13' 45.7"	Adulto	Dispersas	2889
PIC023	14/04/2012	Pichincha	Ayora-Cayambe	N 00° 04' 15.0"/W 078° 08' 06.9"	Adulto	Erectas	2841
C001	16/04/2010	Cotopaxi	Lasso	S 00.71344 W 078.59936	Adulto	Erectas	3103
C003	16/04/2010	Cotopaxi	San Vicente de Poalo	S 00.86731 W 078.65846	Medio	Dispersas	2927
C008	16/04/2010	Cotopaxi	San Felipe	S 00.92966 W 078.65781	Adulto	Dispersas	2903
C009	16/04/2010	Cotopaxi	Vía Pujilí	S 00.93454 W 078.67652	Adulto	Dispersas	2938
C012	16/04/2010	Cotopaxi	Parroquia Victoria	S 00.93145 W 078.68665	Adulto	Dispersas	2956
C013	16/04/2010	Cotopaxi	Vía Pujilí	S 00.43512 W 078.67841	Medio	Dispersas	2942
C014	16/04/2010	Cotopaxi	Vía Pujilí	S 00.93626 W 078.68098	Adulto	Dispersas	2939
C015	16/04/2010	Cotopaxi	Vía Pujilí	S 00.93653 W 078.68212	Medio	Dispersas	2948
C017	16/04/2010	Cotopaxi	Niño de Isinche	S 00.97936 W 078.71863	Adulto	Erectas	3036
C019	16/04/2010	Cotopaxi	Salcedo	S 01.02785 W 078.58485	Medio	Dispersas	2689
H001	31/03/2011	Chimborazo	Gatazo	S 01.40104 W 078.45273	Joven	Dispersas	3057
H006	31/03/2011	Chimborazo	Guamato	S 01.55139 W 078.42165	Joven	Erectas	3107
H013	31/03/2011	Chimborazo	Calpi	S 01.38424 W 078.44296	Joven	Dispersas	3115
H014	31/03/2011	Chimborazo	Lincan	S 01.39080 W 078.42147	Joven	Dispersas	2944
H016	31/03/2011	Chimborazo	Abraspungo	S 01.38301 W 078.38211	Joven	Erectas	2794

## Anexo 1. Continuación

<b>Código</b>	<b>Fecha de colección</b>	<b>Provincia</b>	<b>Lugar</b>	<b>Coordenadas geográficas</b>	<b>Edad</b>	<b>Estructura de las ramas</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
H018	31/03/2011	Chimborazo	Abraspungo	S 01.38218 W 078.38173	Adulto	Dispersas	2792
H023	31/03/2011	Chimborazo	Lago San Alfonso	S 01.37067 W 078.39109	Joven	Dispersas	2874
H025	31/03/2011	Chimborazo	Lago San Alfonso	S 01.37079 W 078.39370	Adulto	Dispersas	2902
H031	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.36188 W 078.38279	Adulto	Dispersas	2738
H035	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.36223 W 078.38141	Joven	Erectas	2715
T004	26/03/2010	Tungurahua	Pillaro	S 01.15435 W 078.54345	Adulto	Dispersas	2853
T005	26/03/2010	Tungurahua	Pillaro	S 01.15435 W 078.54345	Medio	Erectas	2853
T006	26/03/2010	Tungurahua	San Andrés	S 01.14421 W 078.54135	Adulto	Erectas	2876
T012	26/03/2010	Tungurahua	Pelileo	S 01.33489 W 078.54800	Medio	Dispersas	2663
T013	26/03/2010	Tungurahua	Pelileo	S 01.33512 W 078.54436	Medio	Dispersas	2657
T020	26/03/2010	Tungurahua	Llimpe Chico	S 01.36658 W 078.59254	Medio	Dispersas	2920
T022	26/03/2010	Tungurahua	Llimpe Chico	S 01.37428 W 078.59548	Medio	Dispersas	2931
T024	26/03/2010	Tungurahua	Quero	S 01.37837 W 078.60133	Medio	Dispersas	2931
T030	26/03/2010	Tungurahua	Cevallos	S 01.35375 W 078.62119	Adulto	Dispersas	2931
T034	26/03/2010	Tungurahua	Vía a Juan Benigno Vela	S 01.34037 W 078.87089	Medio	Dispersas	3215
AZU001	03/03/2012	Azuay	Vía a Jadán	S 02° 52' 03.6"/ W 078° 53' 03.6"	Adulto	Dispersas	2527
AZU002	03/03/2012	Azuay	Vía a Jadán	S 02° 52' 01.9"/ W 078° 53' 01.8"	Adulto	Dispersas	2541
AZU005	04/03/2012	Azuay	Cuenca	S 02° 53' 09.6"/ W 079° 00' 20.0"	Joven	Dispersas	2595
AZU010	04/03/2012	Azuay	San Antonio	S 02° 56' 43.5"/ W 078° 48' 06.3"	Joven	Dispersas	2354
AZU011	04/03/2012	Azuay	Vía a San Bartolo	S 02° 57' 07.5"/ W 078° 48' 30.4"	Adulto	Dispersas	2398
AZU015	04/03/2012	Azuay	San Juan	S 02° 58' 39.9"/ W 078° 49' 00.9"	Adulto	Erectas	2612
AZU021	04/03/2012	Azuay	Paute	S 02° 50' 16.4"/ W 078° 45' 52.7"	Adulto	Dispersas	2256
AZU022	04/03/2012	Azuay	Paute	S 02° 48' 20.2"/ W 078° 45' 06.2"	Adulto	Dispersas	2609

**Anexo 1. Continuación**

<b>Código</b>	<b>Fecha de colección</b>	<b>Provincia</b>	<b>Lugar</b>	<b>Coordenadas geográficas</b>	<b>Edad</b>	<b>Estructura de las ramas</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
AZU027	04/03/2012	Azuay	Cuenca	S 02° 52' 53.8"/ W 078° 58' 36.7"	Adulto	Dispersas	2509
AZU029	04/03/2012	Azuay	Cuenca	S 02° 53' 20.1"/ W 079° 01' 20.9"	Adulto	Dispersas	2596
CAN001	03/03/2012	Cañar	Azoguez	S 02° 44' 54.9"/ W 078° 51' 02.7"	Joven	Dispersas	2480
CAN003	03/03/2012	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 13.9"/ W 078° 50' 27.8"	Adulto	Dispersas	2546
CAN007	03/03/2012	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 27.8"/ W 078° 50' 12.9"	Adulto	Dispersas	2597
CAN009	03/03/2012	Cañar	Biblián	S 02° 42.1' 10.8"/ W 078° 53' 25.6"	Adulto	Dispersas	2733
CAN011	03/03/2012	Cañar	Biblián	S 02° 41' 57.3"/ W 078° 53' 29.6"	Adulto	Dispersas	2756
CAN014	03/03/2012	Cañar	Ingapirca	S 02° 32' 20.0"/ W 078° 55' 57.0"	Adulto	Erectas	2980
CAN017	03/03/2012	Cañar	Parroquia Juncal	S 02° 28' 51.0"/ W 078° 58' 53.6"	Joven	Dispersas	2927
CAN021	03/03/2012	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 25.6"/ W 078° 51' 16.5"	Joven	Dispersas	2513
CAN022	03/03/2012	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 40.0"/ W 078° 51' 28.6"	Joven	Dispersas	2526
CAN024	03/03/2012	Cañar	Azoguez	S 02° 47' 25.2"/ W 078° 52' 04.0"	Adulto	Dispersas	2511



