

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Atlas de diversidad alélica del Locus-S del capulí:
identificación, análisis y clasificación de haplotipos
de la especie en el Ecuador**

Esteban David Larrea Peñafiel

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
INGENIERO EN PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Atlas de diversidad alélica del Locus-S del capulí:
identificación, análisis y clasificación de haplotipos
de la especie en el Ecuador**

Esteban David Larrea Peñafiel

Nombre del profesor, Título académico

Andrés Torres, PhD.

Quito, 4 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Esteban David Larrea Peñafiel

Código: 00130200

Cédula de Identidad: 1718952722

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

UNPUBLISHED DOCUMENT

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

RESUMEN

P. serotina subsp. *capulí* (capulí) es una especie de árbol de la familia Rosaceae que posee alto valor a nivel cultural, ecosistémico y económico. Además, presenta una barrera reproductiva pre-cigótica denominada sistema de autoincompatibilidad gametofítica. Este mecanismo genético está controlado por un solo locus altamente polimórfico (denominado Locus-S). El Locus-S comprende dos genes fuertemente ligados: el gen SFB controla el determinante masculino (polen) y el gen de la S-RNasa controla el determinante femenino (pistilo). Estudios previos han demostrado que la diversidad alélica del gen de la S-RNasa influye en el desarrollo de tubo polínico en cruces controladas. El objetivo de este estudio fue elucidar el nivel de diversidad alélica del gen de la S-RNasa del capulí en el Ecuador. Con este propósito, se aplicó el marcador molecular CAPS para analizar polimorfismos en este gen en 88 muestras de capulí colectadas a lo largo de la sierra ecuatoriana. En total, se encontró 24 alelos, estos distribuidos en 71 haplotipos heterocigotos (81%) y 17 (19%) haplotipos homocigotos. Los alelos encontrados presentaron una distribución homogénea a lo largo de la región de muestreo, y ningún alelo mostro una frecuencia mayor al 15%. Además, se generó un atlas de diversidad alélica para categorizar las 88 muestras analizadas en grupos de incompatibilidad sexual. Se encontró una alta diversidad de genotipos lo que sugiere que la mayor parte de individuos es compatible y puede dar cruces viables. La información encontrada puede dar lugar a futuras investigaciones que permitan entender aún mejor un sistema tan complejo como el que presenta el capulí.

Palabras clave: sistema de autoincompatibilidad, S-RNasa, marcador molecular CAPS y atlas de diversidad alélica.

ABSTRACT

P. serotina subsp. *capuli* is a species of tree in the Rosaceae family which has a cultural, ecosystem and economic value. Moreover, it presents a pre-zygotic reproductive barrier known as a gametophytic self-incompatibility system. This genetic mechanism is controlled by a unique highly polymorphic locus (determined Locus-S). The Locus-S is conformed by two genes strongly related: the gene SFB controls the masculine determinant (pollen) and the gene of the S-RNase controls the feminine determinant (pistil). Previous studies have demonstrated that the allelic diversity of the S-RNase influences in the development of the pollinic tube in controlled crosses. The objective of this study was to elucidate the level of allelic diversity of the capuli S-RNase gene in Ecuador. For this purpose, the CAPS molecular marker was applied to analyse polymorphisms in this gene in 88 samples of capuli collected throughout the Ecuadorian highlands. In total, 24 alleles were found, these distributed in 71 heterozygous haplotypes (81%) and 17 (19%) homozygous haplotypes. The alleles found presented a homogeneous distribution throughout the sampling region, and no allele showed a frequency greater than 15%. In addition, an atlas of allelic diversity was generated to categorize the 88 samples analysed into groups of sexual incompatibility. A high diversity of genotypes was found, which suggests that most individuals are compatible and can give viable crosses. The information found may give rise to future research that will allow us to understand even better a system as complex as that presented by the capuli.

Key words: self-incompatibility system, S-RNase, CAPS molecular marker, and atlas of allelic diversity.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Descripción general del capulí	10
1.2. Importancia del capulí y sus posibles usos.	11
1.3. Sistema de autoincompatibilidad de <i>Prunus serotina</i> subsp. <i>capulí</i>	12
1.4. Relevancia del estudio de diversidad alélica de la S-RNasa del capulí	15
2. MÉTODOS.....	17
2.1. Selección de muestras de colección de germoplasma representativo de capulí de la sierra ecuatoriana.	17
2.2. Identificación de alelos del gen de la S-RNasa con la metodología del marcador molecular CAPS.....	17
2.3. Determinación de alelos.	19
3. RESULTADOS	20
3.1. Aplicación del marcador molecular CAPS para el reconocimiento de alelos de S-RNasa de <i>P. serotina</i> subsp. <i>capuli</i>	20
3.2. Distribución geográfica de los alelos S de capulí en la Sierra ecuatoriana.....	21
3.3. Generación de atlas de diversidad alélica y determinación de grupos de incompatibilidad.	24
4. DISCUSIÓN.....	26
4.1. Nivel de diversidad del gen de la S-RNasa en el capulí.....	26
4.2. La variabilidad alélica está distribuida homogéneamente en la Sierra ecuatoriana..	28
4.3. El análisis de diversidad alélica proporciona una nueva perspectiva sobre el sistema de autoincompatibilidad.....	30
5. CONCLUSIONES.....	33
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXO A: TABLA DE NOMENCLATURA DE ALELOS REPORTADOS POR CORREA (2018).....	39
ANEXO B: EJEMPLO DE INCONCISTENCIA DE TAMAÑOS DE BANDA EN PATRONES CAPS Y DE BANDA DE AMPLIFICACIÓN.....	40
ANEXO C: PORCENTAJE DE INDIVIDUOS QUE PRESENTAN CADA ALELO	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de incompatibilidad de las 88 muestras analizadas en el estudio.	25
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Self/Nonsel self Discrimination by Multiple F-Box Genes (Matsumoto & Tao 2016)..	14
Figura 2 Specific Self-recognition (Matsumoto & Tao 2016).....	15
Figura 3. Patrones de banda de alelos nuevos no reportados previamente (Correa, 2018)	21
Figura 4. Distribución geográfica y frecuencia de los alelos en la región Sierra del Ecuador	23

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción general del capulí

Prunus serotina subsp. *capulí* (*capulí*) es una especie de árbol de la familia Rosaceae. Es originaria de América del Norte, pero se ha naturalizado en las tierras altas de Ecuador, Colombia y Perú (Nesom, 2003). Su introducción a la región Andina, de acuerdo a muchos botánicos, se cree fue dada por los españoles en tiempos coloniales y posiblemente fue traído de América Central o México (Popenoe, 1990). En el Ecuador el capulí se distribuye en la región de la Sierra, donde puede ocupar una variedad de altitudes y diferentes condiciones climáticas (Mille, 1942). La especie presenta hábitos silvestres, ésta se puede encontrar esporádicamente en bosques y sectores periurbanos (e.j. a lo largo de carreteras y caminos rurales), pero también existe en cultivos informales y semi-formales (Avendaño-Gómez et al., 2015).

En la región Andina, el capulí presenta un importante valor a nivel cultural, ecosistémico y económico. Dicho árbol, así como su fruto, es usado en eventos tradicionales tanto en nuestro país como en países vecinos. (Fried y Naranjo, 2001; Gill, 2007).

A nivel ecosistémico el fruto del capulí es un alimento importante para un gran número de especies de aves y mamíferos. En la región Andina el capulí es alimento de aves como el Perico Caretirrojo (*Aratinga erythrogenys*), la Tangara Azuleja (*Thraupis episcopus*) y la Tangara Azuliamarilla (*Thraupis bonariensis*) (Astudillo y Siddons, 2013).

A nivel ambiental, la especie también es útil para programas de reforestación debido a su crecimiento rápido y se usa además para evitar procesos de erosión debido a que funciona como barrera física contra el viento (Palacios, 2011; Popenoe y Pachano, 1922). De igual manera se ha reportado el uso de capulí para la rehabilitación de sitios de explotación minera ya que es capaz de crecer en suelo sódico y cambiar el pH de este de uno básico a uno más neutro (McVaugh, 1951).

El capulí presenta también un prometedor potencial comercial el cual no se ha explotado aún en su totalidad. Como fuente de alimento el capulí presenta un valor nutricional debido a su excelente balance en contenido de ácido ascórbico (26 mg), hierro (1.20 mg), calcio (28 mg), aminoácidos (proteína 1 g) y fibra (1 g) por cada 100 gramos de capulí (FUNIBER, s.f.). Además, estudios previos han demostrado que el capulí contiene un alto contenido de antocianinas, vitamina C y β -caroteno, los cuales poseen propiedades antiinflamatorias y valor nutracéutico (Álvarez-Suarez et al., 2017). También contiene antioxidantes como compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas monoméricas los cuales son capaces de prevenir el cáncer y, en general, el daño causado en tejidos por especies reactivas de oxígeno (Ríos-Corripio & Guerrero-Beltrán, 2020). Actualmente el consumo del fruto del capulí se da como baya directamente o en productos elaborados como infusiones, vinos, pasteles y postres (Casillas y Martínez, 2017; Caisaguano y Llamuca, 2018). También se encuentra un valor comercial de su madera la cual posee una consistencia dura y resistencia a daños por insectos y hongos. En Norte América esta es ampliamente usada para la fabricación de gabinetes, repisas y alacenas y puede alcanzar altos costos en el mercado maderero (Maynard et al., 1991; Popenoe, 1990).

1.2. Importancia del capulí y sus posibles usos.

Como se estableció previamente el capulí no posee un sistema formal de cultivo a pesar de representar una fuente económica potencial para la agricultura por el valor de su fruto y su madera. Es importante resaltar que el capulí dentro de la región Andina ya tiene acogida y debido a su composición nutricional presenta un potencial de exportación en mercados nutracéuticos. Además, juega un importante rol a nivel ecosistémico tanto como fuente de alimento para la fauna de la región como barrera contra la erosión de suelos. Por ello el capulí podría cumplir un rol como cultivo relevante para la agricultura: puede añadir a la biodiversidad de los sistemas agrícolas, crear oportunidades económicas y traer alimentos más saludables para la población. De esta manera el capulí puede apoyar a las metas futuras que

tiene la agricultura para un desarrollo sustentable al incluirse dentro de la diversidad de cultivos que se tiene. Otro propósito es ser capaz de alimentar a la población en la que el capulí puede tomar un rol importante debido a su valor nutricional. Como uno de los puntos base de la agricultura sustentable se encuentra la correcta gestión de recursos naturales en la que consta el manejo de agua y tierra. En el caso del capulí, este no es exigente en sus requerimientos de suelo y crece bien en cualquier sitio razonablemente fértil. Además, puede prosperar en suelos pobres, incluso arcillas, y parece preferir suelos arenosos secos. Presenta un crecimiento rápido por lo que su madera puede también ser usada como materia prima y debido a su fácil cuidado tiene bajos costos de producción. Finalmente, otra característica del capulí que ayudaría a cumplir las metas de la agricultura es su función ecosistémica como barrera contra la erosión de suelos ya que esta tiene un efecto negativo sobre suelos productivos (Fao.org, s.f.; Popenoe, 1990).

Para poder crear oportunidades de formalizar la utilización del capulí para cultivo se debe entender los procesos biológicos que forman parte de esta como el crecimiento y la reproducción. Es aquí donde estudios como el presente aportan con información relevante permitiendo dar avances a la generación de sistemas de cultivo y el establecimiento de huertos productivos.

1.3. Sistema de autoincompatibilidad de *Prunus serotina* subsp. *capulí*

Un paso importante para formalizar el cultivo del capulí implica entender de mejor manera sus patrones reproductivos ya que a nivel fisiológico el capulí es una especie tetraploide que no puede dar partenocarpia por lo que la producción de frutos y semillas depende de la fertilización de sus óvulos (Mille, 1942). El proceso de fertilización en el capulí presenta una barrera reproductiva precigótica que se conoce como sistema de autoincompatibilidad gametofítica. Las plantas a diferencia de los animales no poseen movilidad por lo que dependen de diferentes medios para que se dé la polinización y fertilización de sus flores. Al depender

de factores externos como el viento, insectos, aves, etc., las plantas desarrollaron mecanismos para evitar la endogamia que puede llegar a reducir la variabilidad genética. El sistema de autoincompatibilidad gametofítica es uno de estos y en *P. serotina* subsp. *capulí* (*capulí*) está regulado por el locus S el cual está compuesto por dos genes: el gen de la S-RNasa y el gen SFB. El gen de la S-RNasa es el determinante femenino el cual se expresa en el pistilo mientras que el gen de tipo SFB es el determinante masculino que se expresa en el tubo polínico (Matsumoto & Tao, 2016). Dicho sistema se da por un mecanismo molecular en el cual la S-RNasa degrada el ARN inhibiendo así la expresión de genes y causando un efecto citotóxico. Esto ocurre en el polen en el cual al darse la citotoxicidad se detiene la generación del tubo polínico que es esencial para la fertilización de la oosfera por lo que esta se ve inhibida (de Nettancourt, 2001). Para que la citotoxicidad se active se debe dar un reconocimiento específico (SFB) ya que este mecanismo tiene como objetivo evitar la endogamia y promover el entrecruzamiento al rechazar la fertilización de individuos genéticamente emparentados (Karasawa, 2015).

Esta barrera reproductiva precigótica no es exclusiva del *capulí* ya que se encuentra en algunas especies de la familia Rosaceae al igual que en otras familias como Solanaceae y Plantaginaceae. Dentro de la Familia Rosácea, se ha reportado la existencia de 2 variantes del sistema de autoincompatibilidad gametofítica: el Self/Nonself Discrimination by Multiple F-Box Genes, y el Specific Self-recognition. En la primera variante, observada en especies de la tribu Maleae como *Malus* y *Pyrus*, la inhibición del crecimiento del tubo polínico está mediada por la acción citotóxica de la S-RNasa mientras que el reconocimiento está mediado por la interacción de múltiples F-Box genes. Los productos de dichos genes median un proceso de ubiquitinación de las S-RNasas que el individuo no posee, es decir de aquellas codificadas por alelos diferentes al propio (*Figura 1*). Esto evita que se dé la citotoxicidad y que no se inhiba el tubo polínico cuando los alelos difieren, pero si se tiene un alelo en común no se da el proceso

de ubiquitinación. Debido a esto se considera un sistema de Nonsel Self Recognition (Matsumoto & Tao 2016).

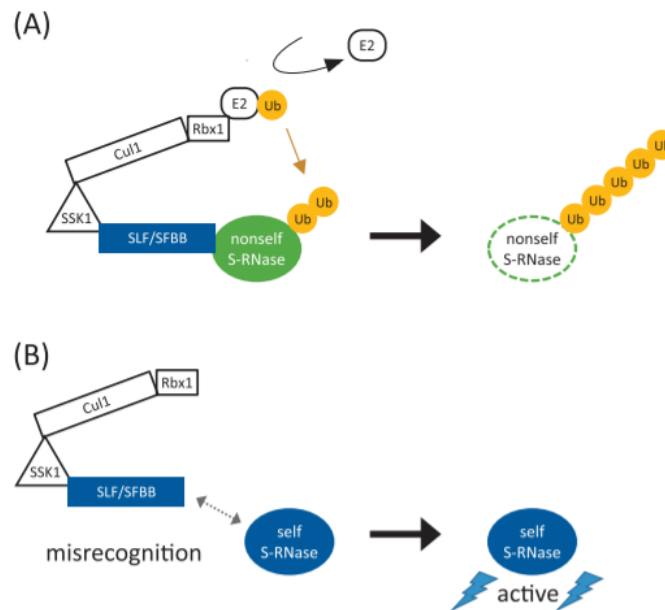


Figura 1 Self/Nonsel Discrimination by Multiple F-Box Genes (Matsumoto & Tao 2016).

Descripción: En la parte (A) de la figura se muestra como en esta variante del sistema de autoincompatibilidad el complejo de reconocimiento formado por varios elementos, pero dirigido por el SLF, lleva a cabo el proceso de ubiquitinación de la S-RNasa que proviene de diferentes alelos inactivando a la misma. En la parte (B) de la figura por otro lado se muestra como el complejo al no lograr reconocer como ajena a la S-RNasa esta no es ubiquitinada y se mantiene activa generando la citotoxicidad e inhibiendo la generación del tubo polínico.

Por otro lado, en la segunda variante, observada en especies del género *Prunus*, la inhibición del crecimiento del tubo polínico se cree está mediada por la interacción directa entre las proteínas S-RNasa y SFB en la que la S-RNasa se encuentra inactivada por un inhibidor general. En este caso se habla de un sistema de Self Recognition ya que la SFB da una ubiquitinación del inhibidor general para que se dé la citotoxicidad por S-RNasa cuando se identifica que comparten un mismo alelo (*Figura 2*) (Matsumoto & Tao 2016). Esto cambia por completo el impacto que tiene el sistema de autoincompatibilidad ya que en el género *Prunus* el sistema de autoincompatibilidad es más estricto en el reconocimiento de alelos.

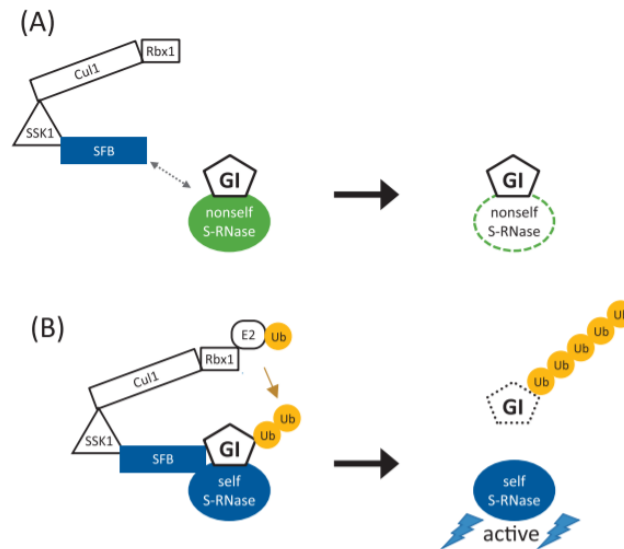


Figura 2 Specific Self-recognition (Matsumoto & Tao 2016).

Descripción: En la parte (A) de la figura se muestra como en esta variante del sistema de autoincompatibilidad el complejo de reconocimiento formado por varios elementos, pero dirigido por el SLF, no actúa sobre el inhibidor general (GI) de la S-RNasa dejándola inactiva. En la parte (B) de la figura por otro lado se muestra como el complejo reconoce la S-RNasa de su propio alelo y el inhibidor general es ubiquitinado y activado la S-RNasa y generando la citotoxicidad que inhibiendo la generación del tubo polínico.

1.4. Relevancia del estudio de diversidad alélica de la S-RNasa del capulí

En términos generales la autoincompatibilidad representa un desafío para el cultivo de plantas, así como para programas de fitomejoramiento por entrecruzamiento si no se conoce que individuos son compatibles entre ellos (Do Canto, Studer y Lubberstedt, 2016). Algunos cultivos que presentan dicho desafío son: las manzanas, rosas, peras, duraznos, ciruelas y cerezas dulces (Claessen et al., 2019; Orcheski & Brown, 2012). Por ello se han llevado a cabo estudios previos en los que se ha estudiado desde diferentes puntos la autoincompatibilidad en el capulí. Estos estudios se han enfocado principalmente en el desarrollo de marcadores polimórficos para el gen de la S-Rnasa del capulí.

Gordillo et al. (2015) aportó información relevante en relación al uso del intrón 1 del gen de la S-RNasa como marcador para la identificación de haplotipos S. Correa (2018), por su parte, encontró que la región intra-génica C2-C3 del gen de la S-RNasa era más informativa en la identificación de los alelos para el gen. Correa (2018) desarrollo un sistema de marcadores

tipo CAPS que permitía analizar polimorfismos a nivel de tamaño y secuencia en la región hipervariable localizada entre las regiones conservadas C2 y C3. Finalmente, Baquero (2019) llevó a cabo fertilizaciones in vitro de flores de individuos compatibles y no-compatibles (en base a sus haplotipos S determinados mediante CAPS) para realizar un estudio fenotípico y evidenciar si el sistema de incompatibilidad gametofítica del capulí estaba determinado por la variabilidad del Locus S. A partir del estudio de Correa (2018) surge el presente ya que en este se dio la estandarización del marcador CAPS y presenta los alelos de referencia. (ANEXO A).

El presente estudio busca expandir el entendimiento del sistema de incompatibilidad sexual del capulí mediante la generación de un atlas de diversidad alélica del gen de la S-RNasa utilizando el sistema de marcador tipo CAPS desarrollado por Correa (2018). Este estudio pretende elucidar el nivel diversidad alélica del Locus-S del capulí en muestras de germoplasma de *Prunus serotina* subsp. *capuli* representativas de la diversidad de la especie en el Ecuador. El nivel de diversidad de este locus y la distribución de esta diversidad en el país podría dar un nuevo entendimiento de repercusión del Locus-S sobre la reproducción de la especie. Con dicha información se pueden establecer grupos de incompatibilidad lo que permitiría un manejo adecuado de cruces para los cultivos y programas de cruzamiento, tanto comerciales como de conservación, ya que como se mencionó previamente el capulí presenta un potencial de comercialización.

2. MÉTODOS

2.1. Selección de muestras de colección de germoplasma representativo de capulí de la sierra ecuatoriana.

El material genético utilizado en este proyecto de investigación se seleccionó de un banco de muestras que posee el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de los proyectos de grado realizados con *P. serotina* subsp. *capuli*. En este caso, se seleccionaron 88 muestras de la colección de muestras en base a la información de caracterización de los individuos de los proyectos de Guadalupe (2012) e Intriago (2013). Para esto, se consideraron los siguientes criterios: la concentración de ADN en ng / μ l, la calidad del material genético en 260/230, la provincia de origen y la agrupación (Intriago, 2013). En cuanto a la concentración, se eligió la más alta, la mejor calidad (260/230), y las muestras entre provincias y grupos se seleccionaron de manera homogénea.

2.2. Identificación de alelos del gen de la S-RNasa con la metodología del marcador molecular CAPS.

Para la identificación alélica del gen S-RNasa (Locus-S) de muestras de *P. serotina* subsp. *capuli*, la metodología aplicada fue la del marcador molecular CAPS diseñado in silico y validado experimentalmente por Correa (2018). La metodología consta de 4 pasos: (1) Amplificar la región de interés mediante PCR convencional (2) Extraer todas las bandas visibles en el gel de agarosa (3) Reamplificar el ADN extraído (4) Digerir los fragmentos de ADN con la enzima de restricción establecida para cada región.

Para amplificar por PCR convencional la región de interés, donde se encuentra RHV (región hipervariable), se usaron los siguientes cebadores para las regiones C2-C3: Ps 1 C2 Fw (5' ATY-CAT-GGC-CTR-TGG-CCA-AG 3') y Ps2 C3 Rv (3' TGY-TTR-TTC-CAT-TCV-CBT-TCC 5') que fueron diseñados por Correa (2018) Las siguientes concentraciones de

reactivos se utilizaron para la PCR de amplificación: 20 ng de ADN, 1X de Buffer de PCR (Invitrogen), 0.5 μ M de cebador C2F, 0.5 μ M de cebador C3 R, 3 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTP's y 1U de Platinum Taq polimerasa con una reacción final de 30 μ l. El protocolo del termociclador utilizado fue el siguiente: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de: 1 minuto de desnaturalización a la misma temperatura, annealing a 58°C, 4 minutos a 68°C de extensión y un paso final de extensión a 68°C por 10 min (Ortega y Dicenta, 2011).

Para verificar la amplificación y ser capaz de separar las bandas de ADN, se cargó un gel de agarosa del 1,5% (100 ml de TBE 1X, 1,5 g de agarosa y 3 μ l de SYBR Safe Invitrogen) para una electroforesis a 80 V durante una hora. Para visualizar las bandas, se utilizó la documentación fotográfica Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2018). Para el proceso de extracción de bandas, se utilizó el protocolo comercial de Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System siguiendo las especificaciones del kit (Promega, 2009).

El proceso de reamplificación siguió el mismo protocolo que la amplificación detallada anteriormente con dos cambios: la cantidad de ADN de la reacción de PCR fue de 40 ng en lugar de 20 ng y la temperatura de annealing fue de 62°C en lugar de 58°C (esta temperatura fue inicialmente de 61°C, pero cambió a 62°C para evitar inespecificidades en la amplificación).

Las enzimas de restricción utilizadas para la digestión fueron Fast Digest de *RsaI*, *MboI* y *HinfI* de la marca ThermoFisher Scientific. La concentración para cada enzima fue la misma y el volumen de reacción total fue de 20 μ l: 2 μ l de Buffer, 1 μ l de enzima Fast Digest, 9 μ l de agua libre de nucleasas y 8 μ l de producto de ADN re-amplificado. Los resultados de la digestión se visualizaron en un gel de agarosa al 2% marcado con SYBR Safe (Invitrogen) y la electroforesis se dio a 80 V durante 1 hora que posteriormente se reveló con la documentación fotográfica Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2018). El Ladder usado en todos los geles de agarosa de la investigación fue el 100 bp DNA Ladder de Invitrogen™.

2.3. Determinación de alelos.

Basado en los patrones y los tamaños de banda generados por la metodología del marcador molecular CAPS, es posible diferenciar y agrupar las muestras por sus alelos. Como tal, los patrones de los alelos ya reportados por Correa (2018) se compararon visualmente con los de las muestras de este proyecto de investigación para observar coincidencias, lo que nos indica un mismo alelo.

Para la determinación de los alelos, se consideró la nomenclatura utilizada previamente por Correa (2018) con respecto a los patrones de bandas CAPS que coinciden con los alelos ya reportados (ANEXO A). La nomenclatura de los nuevos alelos encontrados en este proyecto sigue un orden de los ya reportados.

3. RESULTADOS

3.1. Aplicación del marcador molecular CAPS para el reconocimiento de alelos de S-RNasa de *P. serotina* subsp. *capuli*.

Como parte de la diversidad alélica del gen de la S-RNasa se encontró un total de 24 alelos en las 88 muestras usando el marcador molecular CAPS (Correa, 2018). La identificación de alelos se basó en los patrones referenciales de Correa (2018) (ANEXO A); los cuáles fueron estandarizados mediante secuenciamiento y validados con CAPS. Previo a este estudio, se contaba con 16 alelos (S1 a S18), todos los cuáles fueron encontrados en el set de muestras analizadas.

Además, en el presente estudio se encontraron 8 nuevos patrones CAPS (Figura 3), los cuáles fueron designados S19 a S26. Se hipotetiza que de genotiparse más muestras de *P. serotina* utilizando el marcador CAPS, se podrían encontrar nuevos patrones CAPS correspondientes a nuevos alelos S no reportados previamente. De hecho, en este estudio se encontraron más potenciales alelos, que se especula pueden ser 12, para los cuales no se pudo determinar con exactitud su patrón CAPS. Estos alelos no pudieron ser identificados por el marcador CAPS ya que lo que se espera es obtener patrones determinados para las muestras, sin embargo, en estos patrones se encontró una mezcla. No se puede diferenciar si los patrones que se está observando pertenecen estrictamente a un solo alelo o pueden encontrarse patrones de bandas mezclados en una misma restricción pertenecientes a diferentes alelos. Esto se comprueba contrastando el tamaño de banda de amplificación y los tamaños de bandas del patrón. Como se observa en el ANEXO B los tamaños de bandas que se dan por la digestión enzimática no coinciden con el tamaño de banda de la amplificación previo a la restricción por lo que el patrón no puede ser bien definido.

Analizando la diversidad de alelos del gen de la S-RNasa en un total de 88 muestras de germoplasma de *P. serotina* subsp. *capuli* de la Sierra ecuatoriana se encontró que 71 de estas

(81%) son heterocigotas (incluidos 6 genotipos para los cuáles no se pudo precisar con exactitud sus alelos CAPS) y 17 (19%) presentaron patrones de banda homocigotos. La mayor parte de muestras presenta sus alelos como diploides, sin embargo, en las 88 muestras se pudo identificar un individuo que presentó un patrón de banda triploide de 3 diferentes alelos.

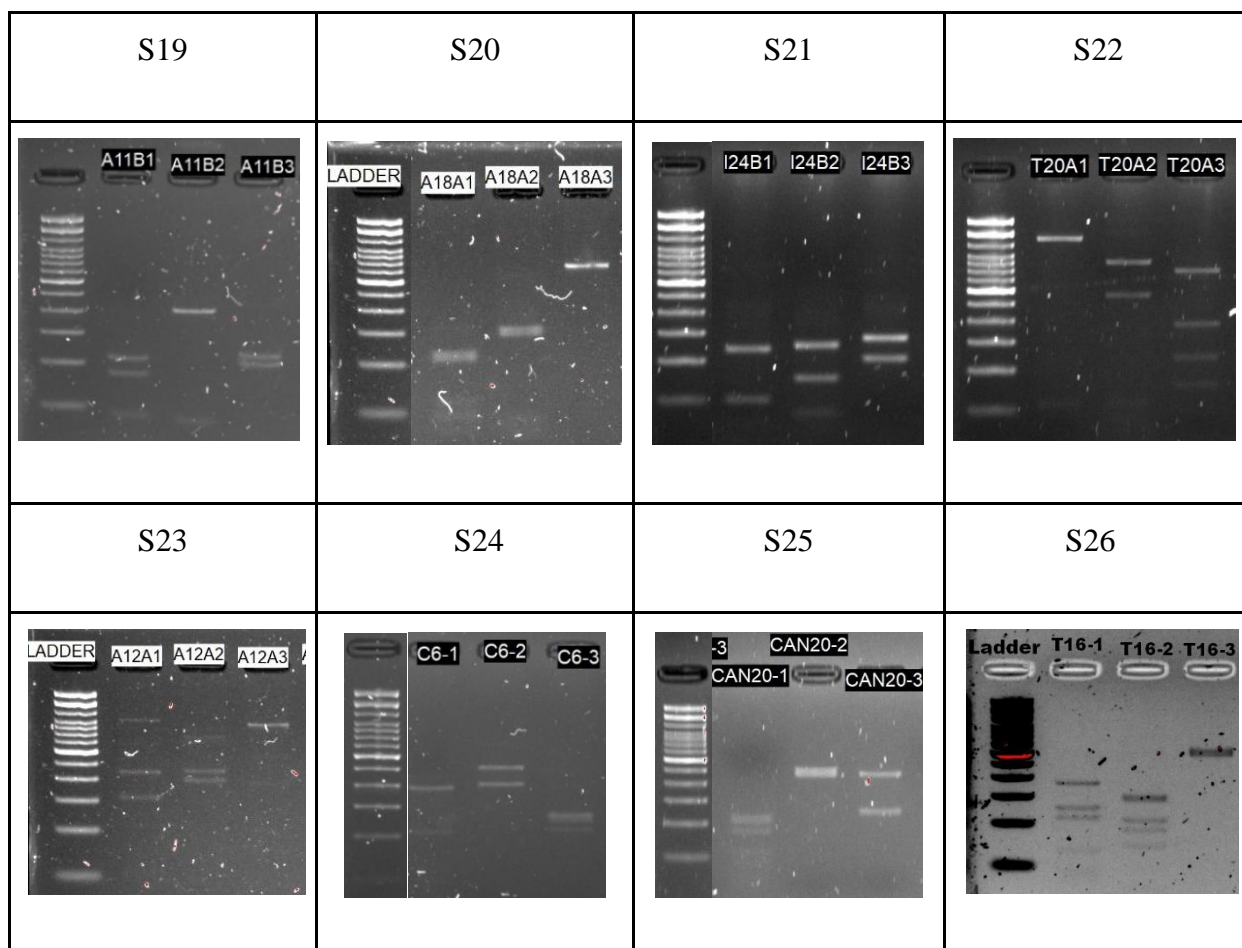


Figura 3. Patrones de banda de alelos nuevos (no reportados previamente por Correa, 2018)

3.2. Distribución geográfica de los alelos S de capulí en la Sierra ecuatoriana.

Las muestras de germoplasma usadas para el estudio pertenecen a la Sierra ecuatoriana y pertenecen a las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay. En el ANEXO C se presenta el resultado el número de veces que se presenta un mismo alelo en los individuos analizados.

Los alelos S10, S17, S4, S12 y S20 representan los alelos más comunes en las 88 muestras, con 11%, 9%, 8%, 8% y 7% respectivamente. En relación a la distribución espacial

de los alelos estos se encuentran dispersos a lo largo de la región y no existe una concentración de alelos en una determinada localidad (Figura 4). Para poder analizar la distribución geográfica de los alelos se debe tomar en cuenta la frecuencia con la que los mismos se encuentran en el genotipo ya que en el caso de alelos S16, S23 y S26 solo se presentan una vez en la colección de 88 genotipos analizados, por lo que no son informativos en cuanto a distribución. En la Figura 4 además se presentan gráficos de pastel con las principales proporciones de alelos por provincia. Hay sectores donde no se evidencian muestras, pero esto puede estar dado por el proceso de muestreo el cual se realizó principalmente en lugares cercanos a la carretera debido a su accesibilidad.

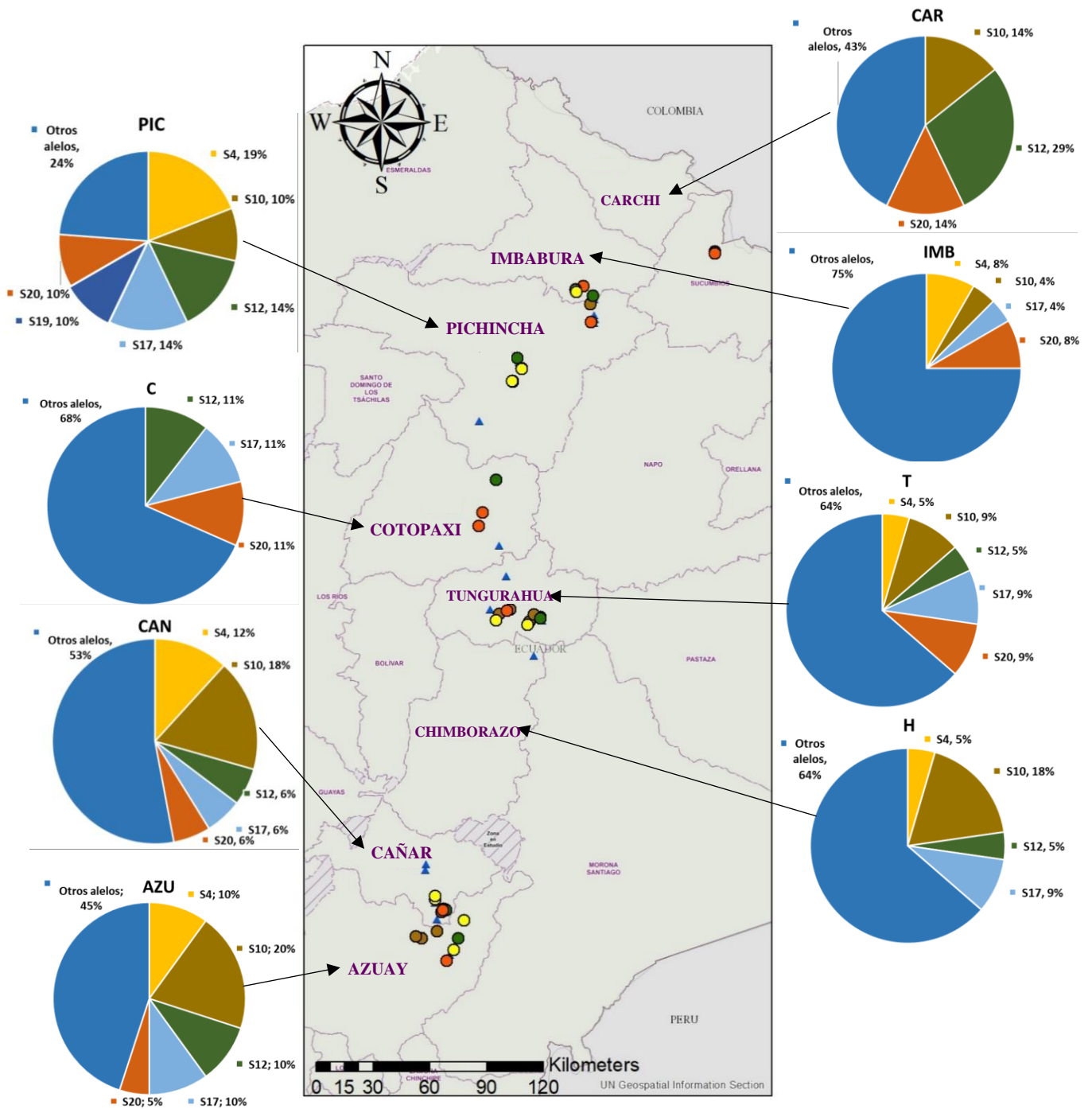


Figura 4. Distribución geográfica y frecuencia de los alelos en la región Sierra del Ecuador. (Mapa elaborado con el programa ArcMap 10.6.1 del software ArcGIS)

Descripción: Se presentan fallas en las coordenadas de las muestras de Carchi las cuales aparentemente se encontrarían en la provincia de Sucumbíos. Se revisó esta información y de acuerdo al documento del cual se sacaron las coordenadas, las muestras fueron tomadas en un punto cercano a los límites políticos entre provincias por lo cual se pudo haber dado ese error, sin embargo son muestras de Carchi como tal.

3.3. Generación de atlas de diversidad alélica y determinación de grupos de incompatibilidad.

Como punto principal del estudio se generó un atlas de diversidad alélica del gen de la S-RNasa de *P. serotina* subsp. *capuli*. Esta información se presenta en la Tabla 1 en la que se dispuso a los individuos en grupos de incompatibilidad los cuales se determinan al agrupar cada genotipo específico, es decir toda muestra que comparte un mismo genotipo va dentro de un mismo grupo al cual se le establece un número en nomenclatura romana, como se puede apreciar en la Tabla 1. Se determinó 62 grupos de incompatibilidad en 88 muestras. Existe una alta variedad de genotipos (un alto número de grupos) y además 42 de los 63 grupos pertenecen a una sola muestra, asimismo no se presentan más de 4 muestras en un mismo grupo. No se ve una distribución definida lo largo de la Sierra ecuatoriana pues a nivel de provincias los grupos son variados y no se ve un grupo de incompatibilidad predominante en una de ellas. El grupo XXIX presenta 4 muestras una de Pichincha, una de Cañar, una de Cotopaxi y una de Carchi que espacialmente, más allá de la división política, se encuentran considerablemente distanciadas.

Una sola muestra (AZU8-Grupo de incompatibilidad LXIII) presentó tres bandas diferentes en la amplificación lo que sugiere que tiene al menos 3 alelos diferentes. A pesar de haber identificado los tres patrones dados por las 3 bandas no se puede determinar la composición alélica por lo que su genotipo en la Tabla 1 está presentado con una nomenclatura de tres alelos. Esto sucede con el resto de las muestras en las que por términos prácticos el genotipo es presentado con solo dos alelos, pero no se sugiere que el capulí se diploide. Para poder determinar la composición alélica exacta se requiere de otras técnicas moleculares.

Tabla 1. Grupos de incompatibilidad de las 88 muestras analizadas en el estudio.

Grupos de incompatibilidad	Muestras	Genotipo
I	PIC22	S17/S19
II	IMB12 CAN21	S19/S20
III	C7	S20/S20
IV	T24 PIC3 C11	S12/S20
V	IMB6	S15/S20
VI	AZU18	S17/S20
VII	T12	S7/S20
VIII	H10 T20	S17/S22
IX	PIC6	S4/S22
X	C6 CAR8	S24/S24
XI	CAN20 CAR6 T15	S25/S25
XII	T16	S26/S26
XIII	AZU12	S14/S23
XIV	T18	S1/S1
XV	H11	S1/S10
XVI	T1 Y C12	S1/S17
XVII	IMB10	S1/S5
XVIII	T21	S1/S7
XIX	IMB23	S1/S9
XX	CAN23 H24	S10/S19
XXI	PIC29 CAR9	S10/S20
XXII	AZU25 AZU7	S10/S10
XXIII	H2	S10/S13
XXIV	H36 IMB19	S10/S14
XXV	T14	S10/S15
XXVI	AZU3	S5/S10
XXVII	T19	S6/S10
XXVIII	CAN4	S7/S10
XXIX	PIC9 CAN6 C1 CAR2	S12/S12
XXX	CAR5	S12/S15
XXXI	T2	S13/S13
XXXII	PIC8	S13/S17
XXXIII	IMB21 C4	S7/S13
XXXIV	PIC27 T32	S14/S19
XXXV	CAN15	S14/S14
XXXVI	AZU24	S7/S16
XXXVII	AZU9 PIC28	S17/S17
XXXVIII	H16	S1/S18
XXXIX	H23	S12/S18
XL	AZU22 PIC14	S4/S12
XLI	CAN12	S4/S21
XLII	PIC13	S4/S10
XLIII	IMB7	S4/S14
XLIV	T25	S3/S4
XLV	CAN10 AZU10	S4/S4
XLVI	H8	S4/S5
XLVII	PIC15 IMB9	S4/S8
XLVIII	C19 IMB16	S6/S17
XLIX	AZU13 CAN13	S6/S6
L	C15 C2	S6/S9
LI	H7	S7/S17
LII	IMB14	S8/S19
LIII	IMB22 IMB24	S8/S21
LIV	C13	S1/S8
LV	CAN2	S8/S10
LVI	PIC33	S8/S8
LVII	H14	S8/S9
LVIII	AZU11	S9/S19
LIX	H22	S9/S14
LX	CAN25	S9/S17
LXI	H12	S5/S9
LXII	C14	S7/S9
LXIII	AZU8	S3/S10/S12

4. DISCUSIÓN

4.1. Nivel de diversidad del gen de la S-RNasa en el capulí

La identificación de alelos del Locus S para el atlas alélico nos permite ir generando conocimiento del nivel de diversidad del germoplasma de *Prunus serotina* subsp. *capulí* nativo de la Sierra ecuatoriana a partir de una característica fisiológica importante como la autoincompatibilidad. En nuestro país, al igual que al resto de la región Andina, el capulí fue introducido a partir de Norte América que es el lugar de origen de esta especie (Popenoe, 1990). Es importante entender que el centro de origen es un determinante en temas de diversidad al analizar una especie ya que de este parte la diversidad que se puede dar cuando existe migración de la especie a otros lugares. En un estudio en el que se analizó la diversidad genética del capulí por medio del marcador SSR se reporta la posibilidad de que en el Ecuador el capulí fue introducido con un pool limitado de la diversidad que existe en su lugar de origen que es Norte América (Guadalupe et al., 2015). Sin embargo, la diversidad alélica alta que se presenta a nivel del Locus S podría estar indicando que, a pesar de que se sugirió en ese estudio una diversidad moderada, esta puede ser mucho mayor a lo que se pensaba en el país y posiblemente en la región Andina como tal.

En el caso del presente estudio de *P. serotina* subsp. *capuli* en 88 muestras se identificó 24 alelos por medio del marcador CAPS con una relación en proporción del número de alelos por número de muestras analizadas de 0.27. En otros estudios que presentan la misma información pero que en su mayoría usan la PCR o el secuenciamiento para determinar alelos se dan proporciones de 0.40, 0.31 y 0.15 en diferentes especies, pero dentro del género *Prunus* (Herrera et al., 2018). (Abdallah et al., 2019). (Kato & Mukai, 2004).

Como se puede ver con el resto de los estudios, previamente mencionados, a pesar de no ser de la misma especie son estudios de diversidad alélica del gen de la S-RNasa. El número de alelos que se encuentra en relación al número de muestras que se analizó es alto y sugiere

que, tanto en el capulí como en otras especies, se tiene una alta diversidad alélica en el gen de la S-RNasa que está involucrado con la autoincompatibilidad. Esto además está respaldado por el hecho de que como tal el gen es considerado polimórfico y descrito como multi-alélico por lo que el encontrar un gran número de alelos en el presente estudio es algo esperado a pesar de que la especie no es originaria de Ecuador. (Boskovic, Sargent & Tobutt, 2009).

Este alto número de alelos en un lugar que no es el punto de origen de una especie puede sugerir que en el momento en el que la especie fue introducida en la región Andina se trajo una alta diversidad de individuos o también dicha diversidad puede estar dada por una tasa de mutación alta

En un estudio se determinó la tasa de mutación de genes relacionados con la autoincompatibilidad en base al número de individuos en la población y el número de alelos ya existentes. Lo que llegan a determinar es que como tal se tiene una alta tasa de mutación para genes de este tipo debido a su función (Wright, 1939; De Nettancourt, 2001). Las mutaciones permiten que se den nuevos alelos lo que aumenta la diversidad del gen y este es un punto importante ya que el sistema de autoincompatibilidad depende de la diversidad alélica. Si se tiene una diversidad muy baja de alelos, el sistema va a tener un efecto restrictivo en la reproducción de la planta impidiendo que esta se reproduzca y causando posiblemente un efecto negativo. Pero por otro lado si la diversidad alélica es muy alta lo que se genera es una compatibilidad general y como tal el sistema no estaría impidiendo la endogamia que es su objetivo como barrera de reproducción precigótica (McClure et al., 2011). Por ello se puede ver a la diversidad alélica del gen de la S-RNasa como un factor que debe mantener un equilibrio para que el sistema funcione adecuadamente.

Por otra parte, existen limitaciones en cuanto al marcador molecular CAPS usado en el estudio. Una es el no poder determinar ciertas características como el número y composición alélica, en el caso de aplicarse en organismos tetraploides como el capulí, así como el estar

sujeto al proceso de estandarización para la identificación de nuevos alelos. También presenta una baja sensibilidad a múltiples SNPs, ya que las enzimas tienen sitios de reconocimiento que constan de un número de entre 4 a 13 nucleótidos (Grimont y Grimont, 2001). Cuando se da un cambio de una o más bases nitrogenadas el sitio de restricción se pierde y la enzima no hace la digestión lo que cambia el patrón de bandas, pero no se detecta los cambios múltiples que se pueden estar dando en una misma secuencia que pertenece a un sitio de reconocimiento (Konieczny & Ausubel, 1993).

A pesar de esto el marcador CAPS es útil debido a que presenta algunas ventajas al ser un marcador dominante que permite identificar si una muestra es homocigota o heterocigota. En términos generales la obtención de información requiere un manejo de menor complejidad (una vez que se encuentra estandarizado) comparado con otras técnicas como el secuenciamiento (Filatov, 2005). En relación al capulí, el marcador CAPS permitió encontrar múltiples alelos cuando no se poseían otras herramientas ya que el intrón I no fue eficiente y en general el secuenciamiento presenta una alta complejidad de análisis, además es laborioso y costoso.

4.2. La variabilidad alélica está distribuida homogéneamente en la Sierra ecuatoriana

Las muestras usadas en el presente estudio fueron seleccionadas de una colección previamente obtenida. En términos de distribución geográfica es importante recordar el aislamiento que se puede dar de individuos o grupos en términos físicos. En nuestro país existen barreras geográficas de grandes proporciones como lo son las montañas. En el caso de la distribución que se ve la Figura 4 esta no se encuentra influenciada por barreras representativas que podrían estar causando un aislamiento o influenciar en la reproducción del capulí. El único factor que se tiene es la distancia y esto es debido a que se muestreo a lo largo de la Sierra ecuatoriana y principal en lugares de libre y fácil acceso como las cercanías a carreteras. Analizando los valores altitudinales de la Sierra ecuatoriana y las zonas de muestreo que

corresponde a los bordes de carreteras se evidencia que no puede resaltar una variación relevante en el relieve de la zona muestreada que pueda estar afectando la distribución de la planta en relación al gen en estudio. Estos cambios pueden ser representativos en términos de cambios en el ambiente como temperatura y tipos de suelo lo cual podría tener una incidencia en el crecimiento del capulí pero que no se ve relacionado con el sistema de autoincompatibilidad. Se puede evidenciar una distribución dispersa de los alelos de manera general, pero en especial de los más abundantes S10, S17, S4, S12 Y S20. (Barraclough, 2019). En el caso del alelo S20 que se presenta en la Figura 4 con el color naranja se puede ver una aparente disminución de la abundancia de dicho alelo al dirigirse a la parte sur de la Sierra, pero se encuentra presente tanto en la provincia tope del norte como la del sur. Al ser muestras de zonas cercanas a carretera no se puede determinar que un patrón de distribución se esté dando de forma natural ya que puede tener incidencia de factores antropogénicos.

La distribución que se ve a nivel de alelos podría estar relacionada con la función del gen. Puede que no se esté dando la concentración de un alelo en un lugar determinado, pero si una dispersión. Esto podría pasar si el polen de un individuo llega a una nueva locación. En ese caso se daría una ventaja a nivel de reproducción si dicho polen no comparte ningún alelo con los individuos de la nueva locación, ya que el mismo no presentaría el impedimento de autoincompatibilidad. Al igual que una barrera física como una montaña puede tener una incidencia en la reproducción de una especie, la auto incompatibilidad representa una barrera reproductiva (Barraclough, 2019). Esta información sin embargo debe ser investigada más afondo pues lo que se tiene es un primer vistazo a lo que podría estar pasando. Como se presenta en el artículo de Kato et al. (2007): “La relación genética en el locus S entre las poblaciones también dio un patrón de "aislamiento por distancia"”. Sin embargo, no se puede concluir nada a partir solo de esta información la cual únicamente permite observar cómo se distribuyen los

alelos de manera general y se necesitaría de estudios más profundos para poder relacionar realmente a la función del gen.

4.3. El análisis de diversidad alélica proporciona una nueva perspectiva sobre el sistema de autoincompatibilidad.

Como se puede observar en la Tabla 1 existe una alta variedad de genotipos (un alto número de grupos) y además 42 de los 63 grupos están formados por una sola muestra. Asimismo, no se presentan más de 4 muestras en un mismo grupo. Esto sugiere que en términos generales la mayoría de las muestras son compatibles y pueden dar cruces viables lo cual cambiar la perspectiva que se tenía sobre el sistema de autoincompatibilidad en el capulí. En un principio se generó el atlas alélico organizado en grupos de incompatibilidad ya que se consideraba que podría ser usado para programas de cruzamiento y de cultivo con fines comerciales o con una finalidad de conservación (Wiersma et al., 2001). No obstante, en la Tabla 1 se puede observar que la diversidad de grupos de incompatibilidad que presentan las 88 muestras puede sugerir que la incompatibilidad no representa una barrera para el entrecruzamiento y por ende no sería un desafío el producir cruces viables para la generación de huertos productivos. Una de las razones por la cuales se puede dar un gran número de genotipos es la alta diversidad alélica que se encontró. Desde un punto más específico la funcionalidad del gen se ve involucrado en este comportamiento de los alelos y como tal de los genotipos y es una presión selectiva que se la define dentro de los sistemas de autoincompatibilidad. Dicha presión promueve la diversidad alélica ya que de no haber está el sistema podría dar lugar a un bloqueo de la reproducción de la especie y como tal impedir la proliferación de esta, por lo que ejerce una presión que permite que nuevos alelos sean exitosos reproductivamente (Kao & Huang, 1994).

En el caso de *Prunus* esta presión se creía estaba dándose en mayor grado que en otros géneros que poseen el sistema de autoincompatibilidad ya que como se presentó en la

introducción el mecanismo de reconocimiento es más estricto (Matsumoto & Tao, 2016). No obstante, a partir de la información de diversidad del Locus S se ve que el sistema de autoincompatibilidad en el capulí puede ser diferente a lo que se pensaba. (Cachi et al., 2017).

El capulí a pesar de ser tetraploide en las 88 muestras nunca presentó 4 alelos diferentes y solo se encontró 1 individuo que presentaba 3 alelos diferentes. Esto puede estar dado por un comportamiento citogenético común en tetraploides de origen autotetraploide, en el cual los cromosomas son heredados como en un organismo diploide (Mastenbroek, Dewet & Lu, 1982; Stift et al., 2008). Esto es lo que puede estar ocurriendo en el capulí y que difiere de lo que se encontró en el estudio de Guadalupe et al. en el cual si se reporta marcadores SSR que sugieren un comportamiento tetraploide normal. Que el capulí se comporte como diploide quiere decir que, al generar gametos, estos poseen dos alelos pero que son los mismo por una posible cosegregación de cromosomas diploide (Mastenbroek, Dewet & Lu, 1982; Stift et al., 2008). Esta diferencia cambia la manera en la que el sistema de autoincompatibilidad funciona y la idea que se tenía de una variante más estricta de reconocimiento en *Prunus* dado este tipo de comportamiento cromosómico.

Por otra parte, encontrar un solo individuo triploide ya se ha reportado previamente por De Cuyper et al. en 2005 en un estudio de *Prunus avium* que presenta también una sola muestra triploide en 65 accesiones estudiadas las cuales de igual manera se comportan como diploides a pesar de ser tetraploide. En dicho estudio se establece que este individuo triploide produce semillas débiles ya que se generará aneuploidía por lo que se debería tomar en cuenta a la muestra AZU8 para generar cruza. En otro estudio similar de 145 individuos de *Prunus lannesiana* var. *speciosa* se encontró igual un solo individuo que presentó un genotipo triploide (Kato & Mukai, 2004). Esto sugiere en conjunto que es común que se de individuos triploides,

pero con una frecuencia muy baja y que puede estar asociado a una división de cromosomas no normal en dichas especies.

Durante la identificación de alelos además se encontraron un 19% de genotipos homocigotos, lo cual no era esperado, sin embargo, la mayor parte de muestras fueron heterocigotos. El Locus S estudiado es parte de un sistema de autoincompatibilidad (AI). Este sistema AI en *Prunus* se presume funciona a nivel gametofítico al bloquear o interrumpir la formación del tubo polínico e interferir así con el proceso de fertilización cuando los gametos identifican por medios moleculares que las plantas están genéticamente relacionadas y comparten alelos del Locus S. Esta es la razón por la cual el hallazgo de genotipos homocigotos parece poco probable, teniendo en cuenta que la base del mecanismo AI es evitar la fertilización de plantas que comparten un mismo alelo y por tanto evitar la endogamia (Hauck et al., 2005).

Una primera hipótesis que podría explicar estos genotipos es la pérdida de funcionalidad del sistema, ya sea del gen S-RNasa o del gen SFB (Tao et al., 2006). La literatura muestra que ciertos cambios genéticos pueden hacer que el sistema AI no sea funcional. "En comparación con sus alelos *wild type*, S 6m2-RNase tiene una delección de 1 pb, S 13m-RNase tiene una delección de 23 pb y SFB 13' tiene una sustitución de 1 pb que conduce a codones de parada prematuros" (Tsukamoto et al., 2006). Es por ello por lo que en estos estudios se reporta alelos con nomenclatura diferente cuando han perdido funcionalidad y se convierten en alelos compatibles. Esto no es posible identificar con los marcadores CAPS usados para el presente estudio (Sonneveld et al., 2004). Estos individuos compatibles presentan 13 alelos de los 24 encontrados los cuales también se encuentran en individuos heterocigotos y que en el estudio de Baquero (2018) se evidenció presentaron incompatibilidad. Esto contribuye con la hipótesis de pérdida de funcionalidad ya que estos alelos se han evidenciado son funcionales.

5. CONCLUSIONES

El presente estudio de análisis de diversidad alélica del capulí promueve información a nivel del Locus S y a su vez permite comprender otros aspectos a nivel genético de la especie y contrastar con la información y comprensión que se tenía de esta. La diversidad alélica encontrada fue alta al igual que el número de genotipos, o en otras palabras grupos de incompatibilidad, lo que quiere decir que en su gran mayoría las muestras analizadas son compatibles. Esto apunta a que el sistema de autoincompatibilidad en estas muestras no representa una barrera o desafío como se pensaba, si se quisiera realizar cruces viables para programas de cultivos productivos.

Otro hallazgo importante del estudio es el comportamiento diploide que tiene el capulí, en cuanto al gen de la S-RNasa, a pesar de ser una especie tetraploide lo que podría sugerir un origen autotetraploide ya que en este es común dicho comportamiento. Además, si existe un tipo de segregación a nivel cromosómico de los alelos, que puede explicar el comportamiento diploide, este cambiaría la perspectiva que se tenía del sistema de reconocimiento en *Prunus* el cual se consideraba exigente.

Se pudo evidenciar igualmente que el sistema de autoincompatibilidad no es infalible en la naturaleza y esto se pudo evidenciarse con la presencia de 17 (19%) individuos homocigotos en las 88 muestras analizadas lo cual puede estar explicado por una pérdida de funcionalidad, pero se necesita realizar más investigación en relación a dicho tema.

Finalmente, un análisis interesante que se podría realizar con la información obtenida en un futuro estudio es la comparación de diversidad alélica de la S-RNasa y la diversidad genética determinada por marcadores SSR lo que puede aportar con información sobre el funcionamiento del sistema al analizar si estas tienen relación y si realmente la autoincompatibilidad tiene un impacto a nivel de diversidad genética.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, D., Baraket, G., Perez, V., Ben Mustapha, S., Salhi-Hannachi, A., & Hormaza, J. (2019). Analysis of Self-Incompatibility and Genetic Diversity in Diploid and Hexaploid Plum Genotypes. *Frontiers In Plant Science*, 10. doi: 10.3389/fpls.2019.00896
- Álvarez-Suarez, J., Carrillo-Perdomo, E., Aller, A., Giampieri, F., Gasparrini, M., & González-Pérez, L. et al. (2017). Anti-inflammatory effect of Capulí cherry against LPS-induced cytotoxic damage in RAW 264.7 macrophages. *Food And Chemical Toxicology*, 102, 46-52. doi: 10.1016/j.fct.2017.01.024
- Astudillo Webster, P., y Siddons D.C. (2013) Avifauna de la ciudad de Santa Ana de los Cuatro Ríos de Cuenca, Ecuador. Cuenca, Ecuador: Comisión de Gestión Ambiental de Cuenca, Municipalidad de Cuenca y Universidad del Azuay.
- Avendaño-Gómez, Aidé, & Lira-Saade, Rafael, & Madrigal-Calle, Beatriz, & García-Moya, Edmundo, & Soto-Hernández, Marcos, & Romo de Vivar-Romo, Alfonso (2015). MANEJO Y SÍNDROMES DE DOMESTICACIÓN DEL CAPULÍN (*Prunus serotina* Ehrh ssp. *capuli* (Cav.) Mc Vaugh) EN COMUNIDADES DEL ESTADO DE TLAXCALA. *Agrociencia*, 49(2),189-204. ISSN: 1405-3195.
- Baquero Méndez, V. (2018). Estudio preliminar fenotípico de la incompatibilidad gametofítica en capulí (*Prunus serotina* subsp.*capuli*). Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/7782>
- Barraclough, T. (2019). *The evolutionary biology of species* (1st ed., pp. 92-93). Oxford.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (2018). Gel Imaging Systems: Gel Doc™ XR+ System Brochure. *Bio-Rad*.
- Boskovic, R., Sargent, D., & Tobutt, K. (2009). Genetic evidence that two independent S-loci control RNase-based self-incompatibility in diploid strawberry. *Journal Of Experimental Botany*, 61(3), 755-763. doi: 10.1093/jxb/erp340
- Cachi, A., Wünsch, A., Vilanova, A., Guàrdia, M., Ciordia, M., & Aletà, N. (2017). S-locus diversity and cross-compatibility of wild *Prunus avium* for timber breeding. *Plant Breeding*, 136(1), 126-131. doi: 10.1111/pbr.12450
- Caisaguano, F., & Llamuca, S. (2018). *Plan de negocios para la elaboración y comercialización de té de capulí en el cantón Píllaro, provincia de Tungurahua*. Recuperado de <http://repositorio.uti.edu.ec/handle/123456789/823>
- Casillas, M., & Martínez, E. (2017). *Aportar al sector vinícola mediante un estudio de factibilidad para la implementación de una microempresa dedicada a la elaboración y comercialización de vinos de capulí y claudia, ubicada al sur del Distrito metropolitano de Quito, sector Guamaní*. Recuperado de <http://www.dspace.cordillera.edu.ec:8080/xmlui/handle/123456789/3775>
- Claessen, H., Keulemans, W., Van de Poel, B., & De Storme, N. (2019). Finding a Compatible Partner: Self-Incompatibility in European Pear (*Pyrus communis*);

- Molecular Control, Genetic Determination, and Impact on Fertilization and Fruit Set. *Frontiers In Plant Science*, 10. doi: 10.3389/fpls.2019.00407
- Correa Baus, L. (2018). Caracterización molecular y diseño de marcadores moleculares CAPS para el gen de la S-RNasa en *Prunus serotina* subsp. *capuli*. Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/7363>
- De Cuyper, B., Sonneveld, T., & Tobutt, K. (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, D. (2001). *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Do Canto, J., Studer, B., & Lubberstedt, T. (2016). Overcoming self-incompatibility in grasses: a pathway to hybrid breeding. *Theoretical And Applied Genetics*, 129(10), 1815-1829. doi: 10.1007/s00122-016-2775-2
- Fao.org. Agricultura sostenible | Objetivos de Desarrollo Sostenible | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado de <http://www.fao.org/sustainable-development-goals/overview/fao-and-post-2015/sustainable-agriculture/es/>
- Filatov, D. (2005). Isolation of Genes from Plant Y Chromosomes. *Methods In Enzymology*, 418-442. doi: 10.1016/s0076-6879(05)95023-4
- Fried, M., & Naranjo, P. (2001). *Comidas del Ecuador* (p. 90). Quito: Artes Gráf. Señal Impr.
- FUNIBER (Fundación Universitaria Iberoamericana). (s.f.). *Composición nutricional del capulí*. Recuperado de <http://composicionnutricional.com/alimentos/CAPULI-5>
- Gill, N. (2007). *Adventure guide to Peru*. Edison, N.J.: Hunter.
- Gordillo, M., Tobar, J., Arahana B., V., & Torres, M. (2015). 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. *ACI Avances En Ciencias E Ingenierías*, 7(1). doi: 10.18272/aci.v7i1.224
- Grimont, P., & Grimont, F. (2001). rRNA Gene Restriction Pattern Determination (Ribotyping) and Computer Interpretation. *New Approaches For The Generation And Analysis Of Microbial Typing Data*, 107-133. doi: 10.1016/b978-044450740-2/50006-x
- Guadalupe, J., Gutiérrez, B., Intriago-Baldeón, D., Arahana, V., Tobar, J., Torres, A., & Torres, M. (2015). Genetic diversity and distribution patterns of Ecuadorian capulí (*Prunus serotina*). *Biochemical Systematics And Ecology*, 60, 67-73. doi: 10.1016/j.bse.2015.04.001
- Halász, J., Makovics-Zsohár, N., Szőke, F., Ercisli, S., & Hegedűs, A. (2016). Simple Sequence Repeat and S-locus Genotyping to Explore Genetic Variability in Polyploid *Prunus spinosa* and *P. insititia*. *Biochemical Genetics*, 55(1), 22-33. doi: 10.1007/s10528-016-9768-3

- Hauck, N., Yamane, H., Tao, R., & Iezzoni, A. (2005). Accumulation of Nonfunctional S-Haplotypes Results in the Breakdown of Gametophytic Self-Incompatibility in Tetraploid Prunus. *Genetics*, *172*(2), 1191-1198. doi: 10.1534/genetics.105.049395
- Herrera, S., Lora, J., Hormaza, J., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2018). Optimizing Production in the New Generation of Apricot Cultivars: Self-incompatibility, S-RNase Allele Identification, and Incompatibility Group Assignment. *Frontiers In Plant Science*, *9*. doi: 10.3389/fpls.2018.00527
- Herrera, S., Rodrigo, J., Hormaza, J., & Lora, J. (2018). Identification of Self-Incompatibility Alleles by Specific PCR Analysis and S-RNase Sequencing in Apricot. *International Journal Of Molecular Sciences*, *19*(11), 3612. doi: 10.3390/ijms19113612
- Karasawa, M. (2015). *Reproductive diversity of plants* (pp. 70 - 71). Cham [etc.]: Springer.
- Kao, T., & Huang, S. (1994). Gametophytic Self-Incompatibility: A Mechanism for Self/Nonself Discrimination during Sexual Reproduction. *Plant Physiology*, *105*(2), 461-466. doi: 10.1104/pp.105.2.461
- Kato, S., Iwata, H., Tsumura, Y., & Mukai, Y. (2007). Distribution of S-alleles in island populations of flowering cherry, Prunus lannesiana var. speciosa. *Genes & Genetic Systems*, *82*(1), 65-75. doi: 10.1266/ggs.82.65
- Kato, S., & Mukai, Y. (2004). Allelic diversity of S-RNase at the self-incompatibility locus in natural flowering cherry populations (Prunus lannesiana var. speciosa). *Heredity*, *92*(3), 249-256. doi: 10.1038/sj.hdy.6800403
- Konieczny, A., & Ausubel, F. (1993). A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, *4*(2), 403-410. doi: 10.1046/j.1365-313x.1993.04020403.x.
- Mastenbroek, I., Dewet, J., & Lu, C. (1982). Chromosome Behaviour in Early and Advanced Generations of Tetraploid Maize. *Caryologia*, *35*(4), 463-470. doi: 10.1080/00087114.1982.10796944
- Matsumoto, D., & Tao, R. (2016). Distinct Self-recognition in the Prunus S-RNase-based Gametophytic Self-incompatibility System. *The Horticulture Journal*, *85*(4), 289-305. doi: 10.2503/hortj.mi-ir06
- Matsumoto, D., & Tao, R. (2019). Recognition of S-RNases by an S locus F-box like protein and an S haplotype-specific F-box like protein in the Prunus-specific self-incompatibility system. *Plant Molecular Biology*, *100*(4-5), 367-378. doi: 10.1007/s11103-019-00860-8
- Maynard, C., Kavanagh, K., Fuernkranz, H., & Drew, A. (1991). Black Cherry (Prunus serotina Ehrh.). *Biotechnology In Agriculture And Forestry*, 3-22. doi: 10.1007/978-3-662-13231-9_1
- McClure, B., Cruz-García, F., & Romero, C. (2011). Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Annals Of Botany*, *108*(4), 647-658. doi: 10.1093/aob/mcr179

- McVaugh. (1951). *Prunus serotina*. Recuperado de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/60-rosac6m.pdf
- Mille, L. (1942). *El Capulí*. FLORA Instituto de Ciencias Naturales del Ecuador, 02, 50-51.
- Molina Montoya, N. (2005). ¿Qué es el estado del arte?. *Ciencia & Tecnología Para La Salud Visual Y Ocular*, (5), 73. doi: 10.19052/sv.1666
- Morden-Moore, A., & Willson, M. (1982). On the ecological significance of fruit color in *Prunus serotina* and *Rubus occidentalis*: field experiments. *Canadian Journal Of Botany*, 60(8), 1554-1560. doi: 10.1139/b82-198
- Nesom, G. (2003). *Black Cherry: Prunus serotina Ehrh.* University of North Carolina. North Carolina: USDA NCRS.
- Ortega, E., & Dicenta, F. (2011). Cloning and Characterization of Nine New S-RNases from Iranian Almond Cultivars. *Plant Breeding*.
- Orcheski, B., & Brown, S. (2012). A Grower's Guide to Self and Cross-Incompatibility in Apple. *NEW YORK FRUIT QUARTERLY*, 20(2), 25-28.
- Palacios, W., 2011. *Arboles del Ecuador*. Ministerio del Ambiente-Gobierno Nacional de la República del Ecuador, first ed. Grupo Comunicacional Efigie, Quito.
- Peattie, D. (1953). *A Natural History of Western Trees*. New York: Bonanza Books. p. 539.
- Popenoe, W. and Pachano, A. (1922) The Capulín Cherry. *Journal of Heredity*, 13, 51-62. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a102156>
- Popenoe, H. (1990). *Lost crops of the Incas*. Washington, DC: National Academy Press.
- Promega. (2009). *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System: Quick Protocol*. USA: Promega.
- Ríos-Corripio, G., & Guerrero-Beltrán, J. (2020). Physicochemical, Antioxidant and Sensory Characteristics of Black Cherry (*Prunus Serotina* Subsp. Capulí) Fermented Juice. *International Journal Of Fruit Science*, 1-19. doi: 10.1080/15538362.2019.1709113
- Stift, M., Berenos, C., Kuperus, P., & van Tienderen, P. (2008). Segregation Models for Disomic, Tetrasomic and Intermediate Inheritance in Tetraploids: A General Procedure Applied to Rorippa (Yellow Cress) Microsatellite Data. *Genetics*, 179(4), 2113-2123. doi: 10.1534/genetics.107.085027
- Sonneveld, T., Tobutt, K., Vaughan, S., & Robbins, T. (2004). Loss of Pollen-S Function in Two Self-Compatible Selections of *Prunus avium* Is Associated with Deletion/Mutation of an S Haplotype-Specific F-Box Gene. *The Plant Cell*, 17(1), 37-51. doi: 10.1105/tpc.104.026963
- Tao, R., Watari, A., Hanada, T., Habu, T., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., & Yamane, H. (2006). Self-compatible peach (*Prunus persica*) has mutant versions of the S haplotypes

found in self-incompatible *Prunus* species. *Plant Molecular Biology*, 63(1), 109-123. doi: 10.1007/s11103-006-9076-0

Tsukamoto, T., Hauck, N., Tao, R., Jiang, N., & Iezzoni, A. (2006). Molecular characterization of three non-functional S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*). *Plant Molecular Biology*, 62(3), 371-383. doi: 10.1007/s11103-006-9026-x

Van Dersal, W. (1938). *Native woody plants of the United States, their erosion-control and wildlife values*. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture. 362 p.

Wiersma, P., Wu, Z., Zhou, L., Hampson, C., & Kappel, F. (2001). Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis. *Theoretical And Applied Genetics*, 102(5), 700-708. doi: 10.1007/s001220051700

Wright S. (1939). The Distribution of Self-Sterility Alleles in Populations. *Genetics*, 24(4), 538–552.

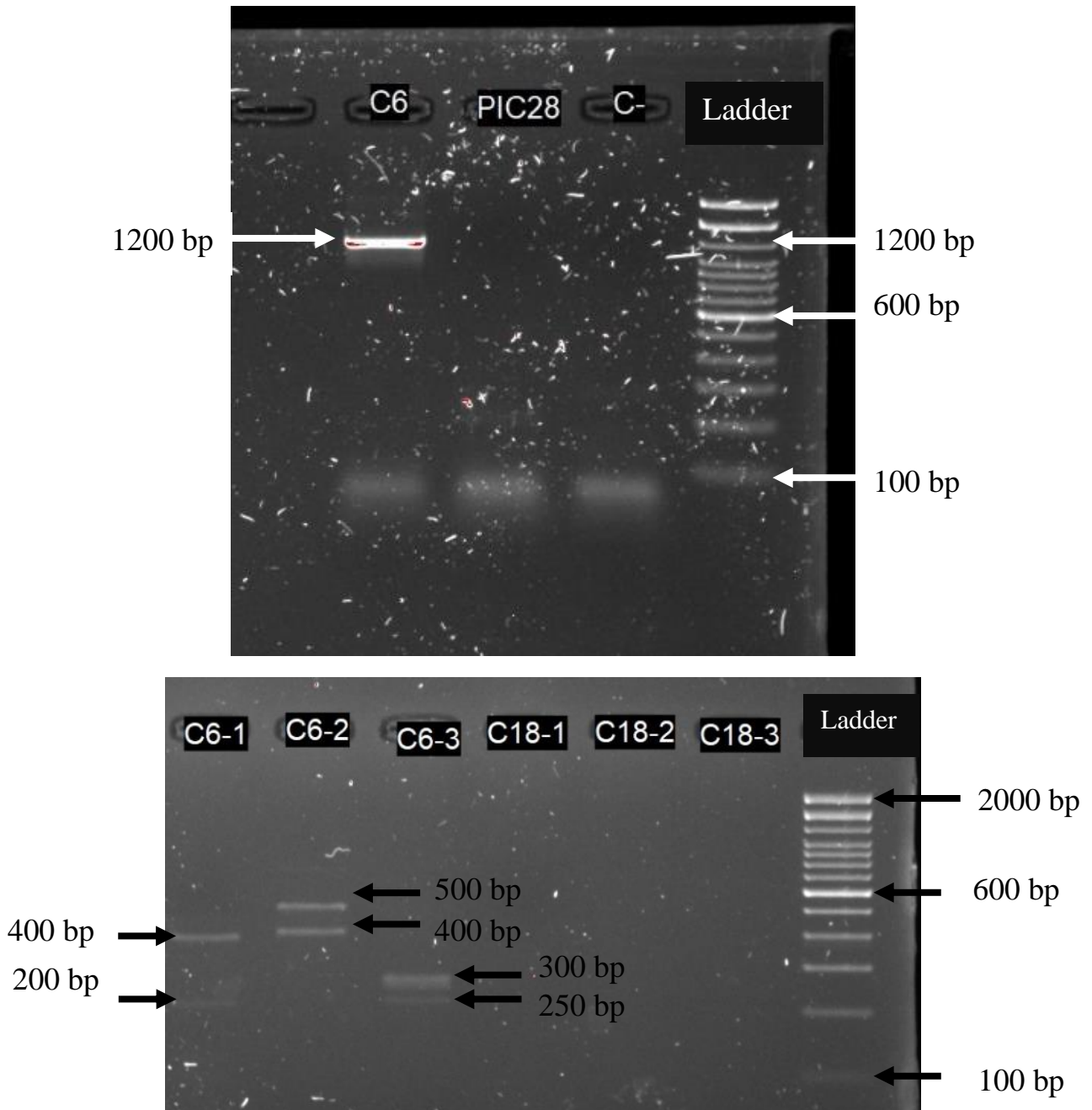
**ANEXO A: TABLA DE NOMENCLATURA DE ALELOS REPORTADOS
POR CORREA (2018)**

ID Muestra	Patrón	Alelo
H025A	PJN	S1
H025B	FCE	S17
Azu015A	NOO	S18
Azu015B	Determinado por secuencia*	S2
Pic002A	OLI	S4
Pic002B	BEJ	S3
Pic019A	OLI	S4
Pic019B	FCA	S15
Car007A	DFC	S5
Car007B	FCE	S17
Imb011A	LHQ	S8
Imb011B	CIE	S6
Car011A	EGL	S7
Car011B	Determinado por secuencia*	S11
Can009A	LHQ	S8
Can009B	KNJ	S10
Car005A	JFF	S12
Car005B	FCA	S15
H014A	LHQ	S8
H014B	IMK	S9
Can022A	OLI	S4
Can022B	KNJ	S10
Can011A	OLI	S4
Can011B	IMK	S9
Car003A	MKG	S16
Car003B	GBM	S14
Pic023A	LHQ	S8
Pic023B	HCP	S13
Car012A	GBM	S14
Car012B	FCA	S15
Pic014A	OLI	S4
Pic014B	FCA	S15
CAN24	KNJ	S10

Cada alelo con su respectivo patrón de bandas en código de letras y la muestra a la que pertenece. En el caso de tener una A o B al final de la ID de las muestras esto indica que la muestra posee dos bandas en amplificación, siendo A la banda de mayor tamaño a la de B.

*En el caso del alelo S2 y S11, estos fueron determinados solo por secuenciamiento por Correa y no se tiene información de patrón de bandas para CAPS.

ANEXO B: EJEMPLO DE INCONCISTENCIA DE TAMAÑOS DE BANDA EN PATRONES CAPS Y DE BANDA DE AMPLIFICACIÓN.



ANEXO C: PORCENTAJE DE INDIVIDUOS QUE PRESENTAN CADA ALELO

Alelo	Porcentaje de Individuos
S1	6%
S3	1%
S4	8%
S5	3%
S6	5%
S7	5%
S8	5%
S9	5%
S10	11%
S12	8%
S13	3%
S14	5%
S15	2%
S16	1%
S17	9%
S18	1%
S19	6%
S20	7%
S21	2%
S22	2%
S23	1%
S24	1%
S25	2%
S26	1%