

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Caracterización molecular y diseño de marcadores  
moleculares CAPS para el gen de la S-RNasa en *Prunus  
serotina subsp. capuli*  
Proyecto de investigación**

**Lisa Cristina Correa Baus**

**Biología**

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

Quito, 25 de mayo de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Caracterización molecular y diseño de marcadores moleculares CAPS para  
el gen de la S-RNasa en *Prunus serotina subsp. capuli***

**Lisa Cristina Correa Baus**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Andrés Torres, Ph.D.

Firma del profesor:

---

Quito, 25 de mayo de 2018

## DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma del estudiante:

---

Nombres y apellidos:

Lisa Cristina Correa Baus

Código:

00125261

Cédula de Identidad:

1750397935

Lugar y fecha:

Quito, 25 de mayo de 2018

## **DEDICATORIA**

A la ciencia, por abrir las puertas del conocimiento.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, Sandra, Marco y Francisco por el incondicional apoyo en mi vida y educación.

A mis profesores, María de Lourdes Torres y Andrés Torres por guiarme durante mis últimos años estudiantiles para mejorar como científica.

A Milton Gordillo y Carlos Vintimilla, por su persistente apoyo y completa disposición para orientarme en cualquier duda con respecto al desarrollo de la presente investigación.

A Pieter Van't Hof, por compartir su conocimiento, guiarme y ayudarme en todo lo que ha podido.

A Izan Chalen, mi mejor amigo, por el apoyo incondicional en los momentos más necesarios.

A Raí Chávez, por su paciencia, comprensión, motivación y apoyo en cada aspecto de mi vida.

A los miembros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por todos los momentos compartidos.

A la IFS, por financiar este proyecto.

## RESUMEN

En el Ecuador, *Prunus serotina* subsp. *capuli* es una especie de interés económico, comercial, nutricional y etnobotánico; sin embargo, esta aún no ha sido domesticada en el país. *P. serotina* presenta el mecanismo de auto-incompatibilidad gametofítica (AI) el cual favorece la diversidad genética y eficacia biológica de la especie. El mecanismo de AI presenta un gran desafío para la agricultura, especialmente en especies de interés comercial, ya que evita el cruzamiento entre individuos en programas de mejoramiento y limita la producción de frutos en granjas de producción comercial. En las especies de *Prunus*, la AI está controlada por el Locus-S, el cual está compuesto por dos genes fuertemente ligados: la S-RNasa y SFB. Históricamente, para el entendimiento de la influencia del Locus-S sobre la AI gametofítica, se ha realizado el estudio de la diversidad alélica del gen de la S-RNasa. Este gen no ha sido estudiado a profundidad en *P. serotina*. Es de esta manera que la presente investigación tuvo como objetivos principales la caracterización molecular del gen de la S-RNasa en *P. serotina* subsp. *capuli*. y el diseño de un sistema de marcadores moleculares basado en CAPS para la identificación alélica del gen. La presente investigación tuvo como resultado la obtención de 22 secuencias del gen de la S-RNasa a partir de 15 genotipos seleccionados de *P. serotina* subsp. *capuli*. A partir de los análisis de las 22 secuencias mediante herramientas bioinformáticas (MEGA 7, BLAST), se encontró alto grado de parentesco entre el gen de la S-RNasa de *P. serotina* y otras especies cercanas del género *Prunus*. Por otro lado, se determinó que la estructura del gen consistía de cinco regiones conservadas (C1, C2, C3, RC4, C5), dos intrones y una región hipervariable (RHV). Además, se logró identificar la presencia de 15 alelos, debido a que las secuencias evidenciaban polimorfismos a nivel de tamaño y secuencia. A partir de las 15 secuencias correspondientes a los 15 alelos, se logró diseñar un sistema de marcadores moleculares CAPS *in silico*, dirigido a las regiones de Intrón I y C2-C3. Se validó *in vivo* dicho sistema y se encontró que CAPS para el Intrón I pudo identificar 13 alelos del gen de la S-RNasa, mientras que CAPS para la región C2-C3 pudo distinguir 15 alelos del gen. Estos resultados demuestran que CAPS para C2-C3 es el marcador molecular más eficiente para la genotipificación del Locus-S en *P. serotina*. Mediante este método de genotipificación del Locus-S, será posible la determinación de individuos que son genéticamente compatibles, de forma que se puede inducir cruza efectivas en programas de mejoramiento y en plantaciones productivas del frutal.

**Palabras clave:** *P. serotina*, S-RNasa, CAPS, auto-incompatibilidad gametofítica, polinización. marcador molecular, cruza, agricultura.

## ABSTRACT

*Prunus serotina subsp. capuli* is a species of economic, commercial, nutritional and ethnobotanical interest in Ecuador; however, it is yet to be domesticated in the country. *P. serotina* displays the mechanism of gametophytic self-incompatibility (SI), which favors the genetic diversity and biological fitness of the species. The mechanism of SI poses a great challenge for agriculture as it hinders crossing of selected individuals in breeding programs and limits fruit-set in commercial orchards. In *Prunus*, gametophytic SI is controlled by the S-Locus which consists of two tightly linked genes: the S-RNase and SFB genes. Understanding of how the S-Locus influences SI has been realized by studying the allelic diversity in the S-RNase gene. This gene has not been studied in depth in *P. serotina*. Thus, the present investigation aimed for the molecular characterization of the S-RNase gene in *P. serotina subsp. capuli* and the design of a molecular marker system based on CAPS for allelic genotyping of the gene. The present investigation resulted in 22 sequences of the S-RNase gene from 15 genotypes selected from *P. serotina subsp. capuli*. From the analysis of these 22 sequences by bioinformatic tools (MEGA 7, BLAST), a high degree of homology was found between the S-RNase gene of *P. serotina* and its close relatives of the *Prunus* genus. Moreover, it was determined that the structure of the gene consisted of five conserved regions (C1, C2, C3, RC4, C5), two introns and a hypervariable region (RHV). Overall, it was possible to identify 15 alleles in the 22 analyzed sequences based on polymorphisms at the level of size and nucleotide sequence. From the 15 sequences corresponding to the 15 alleles, it was possible to design a system of molecular markers CAPS *in silico*, directed to the Intron I and C2-C3 regions. This system was validated *in vivo*, and showed that CAPS markers for Intron I were only able to identify 13 alleles of the S-RNase gene, while CAPS markers for the C2-C3 region were able to distinguish 15 alleles of the gene. In conclusion, it has been established that CAPS for C2-C3 is the most efficient molecular marker for the genotyping of the Locus-S in *P. serotina subsp. capuli*. Through this method of genotyping for the S-Locus, it is principally possible to determine individuals that are genetically compatible, so that effective crosses can be realized in breeding programs and productive farms.

**Key words:** *P. serotina*, S-RNase, CAPS, gametophytic self-incompatibility, polinization, molecular marker, breeding, agriculture.

# TABLA DE CONTENIDO

## Tabla de contenido

<b>1</b>	<b><i>Introducción</i></b> .....	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Prunus serotina</i></b> .....	<b>14</b>
1.1.1	Distribución geográfica y taxonomía .....	14
1.1.2	Características generales y botánicas de <i>P. serotina subsp. capuli</i> .....	15
1.1.3	Importancia de <i>P. serotina</i> en Ecuador .....	16
<b>1.2</b>	<b>Autoincompatibilidad en <i>P. serotina</i></b> .....	<b>17</b>
1.2.1	Definición e importancia .....	17
1.2.2	Implicaciones de autoincompatibilidad .....	18
1.2.3	Mecanismo de auto-incompatibilidad en <i>Prunus</i> .....	19
1.2.4	Sistema de genotipaje del gen de la S-RNasa.....	20
1.2.5	Sistema de marcadores moleculares para genotipaje del gen de la S-RNasa: Intrón I y CAPS como alternativas. ....	22
<b>2</b>	<b><i>Objetivos</i></b> .....	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo general</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>3</b>	<b><i>Área de estudio</i></b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b><i>Justificación</i></b> .....	<b>24</b>
<b>5</b>	<b><i>Materiales</i></b> .....	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>Amplificación de Intrón I del gen de la SRNasa en PCR convencional</b>	<b>26</b>
<b>5.2</b>	<b>Amplificación del gen completo de la SRNasa mediante PCR convencional.</b>	<b>26</b>
<b>5.3</b>	<b>Amplificación de región C2-C3 del gen de la SRNasa mediante PCR convencional</b> .....	<b>27</b>
<b>5.4</b>	<b>Diseño de primers específicos para amplificación de región C2-C3.</b>	<b>28</b>

5.5	<b>Análisis de datos mediante bioinformática .....</b>	<b>28</b>
5.6	<b>Diseño de sistema de marcadores moleculares CAPS <i>in silico</i> .....</b>	<b>28</b>
5.7	<b>Validación de sistema de marcadores moleculares CAPS <i>in vivo</i> .....</b>	<b>29</b>
5.8	<b>Electroforesis en geles de agarosa .....</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b><i>Métodos</i> .....</b>	<b>30</b>
6.1	<b>Selección de muestras basadas en alelos de Intrón I .....</b>	<b>30</b>
6.1.1	Determinación de muestras de interés y duplicados.....	30
6.2	<b>Secuenciación del gen completo de la S-RNasa de <i>Prunus serotina</i> subsp. <i>capuli</i> .....</b>	<b>30</b>
6.2.1	Amplificación del gen completo de S-RNasa en <i>Prunus serotina</i> mediante PCR convencional.....	30
6.2.2	Reamplificación y Secuenciación de Productos Amplificados .....	31
6.2.3	Análisis de datos: análisis de secuencias, comparación con intrón I y determinación de genotipos.....	31
6.3	<b>Marcadores moleculares CAPS.....</b>	<b>32</b>
6.3.1	Diseño de marcadores moleculares CAPS a partir de secuencias de Intrón I y región C2-C3 del gen de la SRNasa ( <i>in silico</i> ).....	32
6.3.2	Validación molecular sistema CAPS.....	33
<b>7</b>	<b><i>Resultados</i> .....</b>	<b>35</b>
7.1	<b>Amplificación del gen de la S-RNasa en <i>P. Serotina</i>.....</b>	<b>35</b>
7.2	<b>Análisis estructural y de diversidad alélica del gen de la S-RNasa de <i>P. serotina</i> .....</b>	<b>36</b>
7.3	<b>Desarrollo de un sistema de genotipaje para el gen de la S-RNasa basado en CAPS.....</b>	<b>37</b>
7.3.1	Diseño de sistema CAPS para el Intrón I y la región intra-génica C2-C3 .....	37
7.4	<b>Validación <i>in vivo</i> del sistema CAPS para el genotipaje del Intrón I y la región inter-génica C2-C3 .....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b><i>Discusión</i>.....</b>	<b>40</b>

<b>8.1</b>	<b>Amplificación, secuenciación y análisis de secuencias del gen de la S-RNasa</b>	<b>43</b>
<b>8.2</b>	<b>Validación de CAPS para intrón I y región C2-C3 .....</b>	<b>46</b>
<b>9</b>	<b><i>Conclusiones</i> .....</b>	<b>49</b>
<b>10</b>	<b><i>Recomendaciones</i> .....</b>	<b>50</b>
<b>11</b>	<b><i>Referencias</i>.....</b>	<b>52</b>
<b>12</b>	<b><i>Tablas</i>.....</b>	<b>57</b>
<b>13</b>	<b><i>Figuras</i>.....</b>	<b>67</b>
<b>14</b>	<b><i>Anexos</i>.....</b>	<b>80</b>

## TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Resultados del alineamiento de la secuencia consenso del gen completo de la S-RNasa obtenida a partir de 15 genotipos de <i>P. serotina</i> .....	57
<b>Tabla 2:</b> Resumen de los resultados de secuenciación del gen completo de la S-RNasa para 23 amplicaciones del gen derivados de 15 genotipos de <i>P.serotina</i> .....	59
<b>Tabla 3:</b> Patrones de bandas a partir de digestiones enzimáticas con RsaI (Afa I), MboI y XspI (Hinfl) para intrón I del gen de la S-RNasa.....	60
<b>Tabla 4:</b> Patrones de bandas a partir de digestiones enzimáticas con RsaI (Afa I), MboI y FspBI para la región C2-C3 del gen de la S-RNasa. ....	61
<b>Tabla 5:</b> Clave de identificación de patrones de alelos putativos para el Intrón I de la S-RNasa.....	62
<b>Tabla 6:</b> Clave de identificación de patrones de alelos putativos en la región C2-C3 de la S-RNasa.....	63
<b>Tabla 7:</b> Identificación de alelos del intrón I mediante CAPS .....	64
<b>Tabla 8:</b> Identificación de alelos de la región C2-C3 I mediante CAPS .....	65
<b>Tabla 9:</b> Patrones de bandas de amplificación para intrón I, región C2-C3 y gen completo de la S-RNasa. ....	66

## FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribución geográfica de <i>P. serotina</i> subsp. <i>capuli</i> en el Ecuador .....	67
<b>Figura 2 :</b> Modelo de auto-incompatibilidad gametofítica en <i>Prunus</i> .....	68
<b>Figura 3:</b> Estructura del Locus-S: genes S-RNasa y SFB en especies del género <i>Prunus</i> .....	69
<b>Figura 4:</b> Estructura del gen de la S-RNasa en <i>Prunus</i> .....	70
<b>Figura 5:</b> Modelo de inhibición del crecimiento de tubo polínico en la reacción molecular de la auto-incompatibilidad gametofítica .....	71
<b>Figura 6:</b> Amplificación del intrón I para selección de muestras.....	72
<b>Figura 7:</b> Amplificación del gen completo de la S-RNasa.....	73
<b>Figura 8:</b> Re-amplificación del gen de la S-RNasa a partir de bandas extraídas de la amplificación del gen completo.....	74
<b>Figura 9:</b> Amplificación del intrón I del gen de la S-RNasa para validación de CAPS	75
<b>Figura 10:</b> Amplificación de la región C2-C3 del gen de la S-RNasa para validación de CAPS .....	76
<b>Figura 11:</b> Reamplificación de productos de extracción de bandas a partir de la amplificación de C2-C3.....	77
<b>Figura 12:</b> CAPS en intrón I.....	78
<b>Figura 13:</b> CAPS para la región C2-C3.....	79

## ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Secuencias del gen completo de la S-RNasa.....	80
<b>Anexo 2:</b> Alineamientos de secuencias obtenidas del gen de la S-RNasa para determinar la estructura del gen.....	83
<b>Anexo 3:</b> Digestiones enzimáticas <i>in silico</i> con enzimas RsaI (Afa I), MboI, y XspI para el intrón I .....	84
<b>Anexo 4:</b> Digestiones enzimáticas <i>in silico</i> con enzimas RsaI (Afa I), MboI, y FspBI (Hinf I) para la región C2-C3 .....	99

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Prunus serotina*

### 1.1.1 Distribución geográfica y taxonomía

La especie *Prunus serotina*, conocida comúnmente como capulí, pertenece a la familia Rosaceae, subfamilia Amygdaloideae, género *Prunus* y subgénero *Padus* (Pérez-Zabala, 2007). La especie se encuentra distribuida desde el este de Norte América hasta Bolivia en América del Sur. En Centroamérica, *P. serotina* se encuentra desde México hasta Guatemala y en Sudamérica, se concentra principalmente en la zona norte del continente, es decir en Venezuela, Colombia y Ecuador. En Europa Oriental y Holanda, *P. serotina* es considerada como una planta altamente invasiva (Nesom, 2003).

A lo largo de la historia, esta especie ha sido denominada de diferentes formas, debido a la variabilidad morfológica que existe en los diferentes rangos geográficos donde se ha encontrado. Las primeras plantas de *Prunus serotina* que fueron descritas, se encontraban en las tierras altas del sur de México; no obstante, el capulí de Norte América fue el primero en ser nombrado como *Prunus serotina* (McVaugh, 1951). En 1800, también se nombró a la especie como *Prunus capuli*, basándose en la descripción de árboles de capulí del Ecuador (McVaugh, 1951). A pesar de esto, en la actualidad se ha concluido que *P. serotina* guarda similitudes con todo el resto de especies nombradas y por lo tanto, esta es la forma correcta de referirse a la especie (McVaugh, 1951). Sin embargo, para mayor especificidad de clasificación, se ha determinado dos niveles de agrupamiento: subespecie y variación, debido a que hay diferencias significativas en cuanto al tamaño del fruto y la altura del árbol, en las distintas zonas donde se distribuye la especie (McVaugh, 1951).

En Ecuador, *P. serotina* no es agrícolamente domesticada, por lo tanto, no existen grandes cultivos de capulí. Sin embargo, hay grupos de árboles dispersos de norte a sur del país (**Figura 1**), que crecen en los bordes de las carreteras, parcelas familiares y jardines (Intriago, 2013; Popenoe & Pachano, 1922). En las provincias centrales, desde Cotopaxi hasta Azuay, hay mayor abundancia de la especie (Mille, 1942).

### **1.1.2 Características generales y botánicas de *P. serotina subsp. capuli***

*P. serotina subsp. capuli* es una especie arbórea tetraploide ( $2n=32$ ). Puede llegar a medir hasta 15 metros de altura (Popenoe & Pachano, 1922; Guadalupe et al., 2015). La corteza del árbol es fisurada, de 1.27 a 1.90 cm de ancho y de color gris oscuro. Las hojas son simples, alternas, de 7 a 14 cm de largo, 2.3-5 cm de ancho. Estas tienen márgenes dentados, variables en forma, oblongas- lanceoladas y son de color verde oscuro brillante (Nesom, 2003; Popenoe & Pachano, 1922). La inflorescencia es en racimo de 10 a 25 cm de largo. Las flores se encuentran posicionadas en el extremo terminal del racimo; son numerosas, blancas y aromáticas, y tienen un cáliz con lóbulos cortos y 5 pétalos (Popenoe & Pachano, 1922). El fruto de *P. serotina subsp. capuli*, a diferencia de otras subespecies que son usadas en la industria maderera, es carnoso y jugoso, aunque puede variar dependiendo del cultivo. Generalmente los frutos tienen un diámetro de 0.8 a 1.3 cm, son de color rojo oscuro cuando han crecido por completo, y de color negro, marrón o morado en su etapa madura. Además, tienen forma de drupa, son comúnmente monospermos, presentan un exocarpo delgado y piloso, mesocarpo carnoso y endocarpo leñoso (Popenoe & Pachano, 1922). La semilla no tiene albumen (Delucchi, 2011). Su jugo es de color morado muy oscuro, dulce con un toque de amargura, similar al vino (Popenoe & Pachano, 1922). Finalmente, las semillas de *P. serotina* son ortodoxas (*i.e.*, pueden sobrevivir largos periodos de sequía y/o congelación) y bajo condiciones adecuadas su viabilidad puede ser de hasta de ocho años (McVaugh, 1951).

Los árboles de *P. serotina* pueden crecer a una altitud entre 1800 a 3400 m.s.n.m (Intriago, 2013; McVaugh, 1951). La especie presenta un crecimiento óptimo en suelos arenosos y altamente arcillosos, además es tolerante a suelos ácidos, húmedos, someros compactados y pedregosos, los cuales son comunes en la sierra ecuatoriana (McVaugh, 1951; Popenoe y Pachano, 1922). También, *P. serotina subsp. capuli* tolera la contaminación ambiental y es resistente al fuego, así como al daño por termitas. Por otro lado, el capulí no tolera la sombra y demanda en extremo la luz solar (McVaugh, 1951). Además, es susceptible al daño por hongos, insectos, gusanos, orugas y polillas (McVaugh, 1951). La producción máxima de semillas de *Prunus serotina* es entre los 30 y 100 años, aunque empieza a los 10 años de edad del árbol. Algunas semillas son producidas anualmente, y los buenos frutos son producidos en un intervalo de 1-5 años. La mayoría de semillas son viables (Nesom, 2003). Las semillas tardan aproximadamente 3 años en germinar, esto permite el almacenamiento de semillas en el suelo de los bosques (Nesom, 2003). En laboratorio la germinación es en 14 días con temperatura entre 18°C-24°C (McVaugh, 1951). La dispersión de semillas es mediada por aves y mamíferos. Las semillas que pasan por el tracto digestivo de las aves paseriformes, tienen tasas más altas de germinación comparadas con las semillas que no fueron digeridas (Nesom, 2003).

### **1.1.3 Importancia de *P.serotina* en Ecuador**

*P. serotina subsp. capuli* tiene una gran importancia a nivel económico, comercial, nutricional, medicinal y etnobotánico. A pesar de esto, en Ecuador *P. serotina* es una especie semidomesticada, de la cual no se ha profundizado la investigación. Como consecuencia, no se ha podido aprovechar su gran potencial (Intriago, 2013). Por otro lado, en algunos países se ha reportado el uso de los frutos para la fabricación de mermeladas y vino. También, estos han sido comercializados como saborizantes de algunas bebidas alcohólicas (ej. Ron y brandy) (Nesom, 2003). Además, el capulí tiene

propiedades antimicrobianas y antioxidantes, de modo que puede ser utilizado como aditivo en los alimentos, o para el tratar algunas enfermedades (Mille, 1942; Intriago, 2013). Una de las mayores aplicaciones que se le ha dado a *P. serotina* ha sido en la industria maderera, ya que es un árbol muy útil para la fabricación de muebles, adornos para decoración, juguetes e instrumentos (Nesom, 2003). Por último, a nivel ecológico, el fruto de *Prunus serotina* es importante porque sirve como fuente de alimento para aves paseriformes y mamíferos (Nesom, 2003)

En Ecuador, el potencial económico del capulí está relacionado estrechamente con su valor etnobotánico. El capulí ha jugado un rol importante en la economía, nutrición y cultura de comunidades indígenas (Popenoe & Pachano, 1922). En el pasado, el consumo y comercialización del capulí era alto, sobre todo los primeros meses del año, justo después de que el maíz cosechado se hubiera agotado. Además, muchos indígenas lo usaban para preparar una especie de cocido o estofado llamado “jucho”, el cual se cree que tiene relación con la fertilidad. Estas comunidades también han usado el capulí como remedio natural y para la producción de licores similares al *kirsch* o maraschino (Popenoe & Pachano, 1922). De esta manera, se puede decir que el valor del capulí no solo es económico, nutricional o comercial, pero también es cultural (Guadalupe, 2013).

## **1.2 Autoincompatibilidad en *P. serotina***

### **1.2.1 Definición e importancia**

La auto-incompatibilidad sexual (AI) es un mecanismo fisiológico presente en plantas hermafroditas, que tiene como propósito impedir la auto-fecundación (**Figura 2**) (Kao & Tsukamoto, 2004). En la naturaleza, el mecanismo de auto-incompatibilidad evolucionó principalmente para evitar la endogamia y sus efectos genéticos adversos. El sistema de AI funciona de forma que, a pesar de que una flor hermafrodita sea fértil, no tiene la capacidad de producir cigotos cuando se da el reconocimiento de que se ha auto-

polinizado. En este proceso el pistilo es la estructura que juega un papel fundamental, ya que combina las barreras físicas, fisiológica, bioquímicas y genéticas para promover la polinización cruzada (Cruz et al., 2007). De esta manera, la auto-incompatibilidad sexual promueve la polinización cruzada y el flujo génico; teniendo como resultado una mayor diversidad genética en las especies, además de la conservación de la eficacia biológica de sus individuos (Cruz et al., 2007).

Las especies que presentan un mecanismo de AI, son un desafío para la producción agrícola (Gordillo et al., 2015). Se sabe que para obtener un buen rendimiento en la producción de frutos, es necesario que dos cultivares combatibles sean sembrados de forma simultánea y en áreas muy cercanas (Gordillo et al., 2015). Por esta razón, es necesario conocer los genotipos S de los individuos de *P. serotina* que tengan características de interés agrícola y comercial (**Figura 2**), de forma que se pueda establecer cruzas compatibles. De esta manera, se podrá desarrollar variedades mejoradas de la especie y tener cultivos eficientemente productivos (Intriago, 2013). Esta aplicación agrícola, beneficiaría el comercio y economía del sector primario de los países.

### **1.2.2 Implicaciones de autoincompatibilidad**

Algunas especies de árboles frutales de *Prunus* son de gran interés comercial, es por esa razón que la fertilización y formación de semillas, es necesaria para que haya un producción exitosa de frutos (Tao & Iezzoni, 2010). En los cultivos que se dedican a la comercialización, se han plantado cultivares que se puedan cruzar compatiblemente, esto quiere decir que tienen diferentes tipos de polen y pistilo (Westwood, 1993). Para crear este tipo de cultivares, es necesario determinar los grupos de polen y pistilo que son incompatibles (Tao & Iezzoni, 2010). Mediante esto se podría cumplir uno de los mayores logros de cruzamiento en las especies frutales de *Prunus* (Janick & Moore, 1975).

Usualmente, se ha determinado la incompatibilidad polen-pistilo mediante polinizaciones controladas haciendo evaluaciones microscópicas del crecimiento del tubo polínico (Janick & Moore, 1975). Sin embargo, esta técnica demanda mucho tiempo, y existen factores ambientales que también influyen en la polinización (Janick & Moore, 1975). Por esta razón, se ha hecho investigaciones de los genes encargados de controlar dos proteínas involucradas en el reconocimiento de AI (Kao & Tsukamoto, 2004).

### 1.2.3 Mecanismo de auto-incompatibilidad en *Prunus*

Se ha encontrado que todas las especies de la familia Rosaceae presentan autoincompatibilidad (AI) gametofítica (Kao & Tsukamoto, 2004). Este mecanismo funciona mediante la discriminación entre la compatibilidad o incompatibilidad del polen y pistilo determinada por uno o más loci polimórficos. En *Prunus serotina*, el Locus-S es responsable de controlar la especificidad del mecanismo de AI. Esto es posible por el reconocimiento genético del polen en el pistilo (Kao & Tsukamoto, 2004). Mediante análisis de DNA codificante en Solanaceae (principalmente) y Rosaceae se ha logrado entender el mecanismo de AI (Anderson et al., 1986). Actualmente, aún no hay datos de la especie *Prunus serotina*. Sin embargo, hay más de 100 secuencias de especies de *Prunus* que han permitido llegar a la conclusión de que este género tiene un mecanismo de auto-incompatibilidad gametofítica homomórfico controlado por el Locus-S (Tao & Iezzoni, 2010).

Se conoce que el Locus-S esta compuesto por dos genes fuertemente ligados, el gen SFB que controla la determinante masculina (polen) y el gen S-RNasa que controla la determinante femenina (pistilo) (**Figura 3**) (Kao & Tsukamoto, 2004; Wu et al., 2013). Se ha comprobado que el gen de la S-RNasa es el determinante para la especificidad de la incompatibilidad gametofítica del rechazo del polen (Lee, Huang, & Kao, 1994; Broothaerts et al., 1995). Las investigaciones acerca de la S-RNasa, en el género *Prunus*

empezaron con las primeras clonaciones mediante PCR en las especies *Prunus dulcis* y *Prunus avium* (Tao et al., 1997; Ushijima et al., 1998). Se ha encontrado que el gen de la S-RNasa es productor de proteínas de amplia variación genotípica; la secuencia de aminoácidos de la S-RNasa en una misma especie puede presentar un grado de disimilitud que varía entre 10 a 70% (McCubbin & Kao, 2000). No obstante, a pesar de que existe una gran diversidad alélica para el gen, este también presenta cinco regiones altamente conservadas; denominadas secuencialmente de C1 a C5 (**Figura 4**) (Ushijima et al., 1998). Comparando esta estructura entre las secuencias del gen de la S-RNasa y especies del género *Prunus*, se ha encontrado que este gen es muy similar en cuanto a las regiones conservadas (**Figura 4**) (Ioerger et al., 1991). Además, el gen de la S-RNasa presenta una única región hipervariable (RHV) en las especies de Rosaceae (Ioerger et al., 1991). Esta región RHV es importante, porque se encarga de codificar para el complejo proteico de la membrana del pistilo. Dicho complejo, está encargado del reconocimiento del polen y posterior activación de las RNAsas para la inhibición de los tubos polínicos. La reacción de AI se desencadena cuando el mismo alelo S es expresado en el polen y el pistilo, como se muestra en la **Figura 5**. De esta forma, el crecimiento del tubo polínico se trunca (Tao & Iezzoni, 2010). El mecanismo de reconocimiento funciona de forma que el polen con un genotipo S produce un receptor de membrana (**Figura 2**), en caso de que el complejo de membrana, resultante de la codificación del gen de la S-RNasa, tenga el mismo genotipo, se inhibirá el crecimiento del tubo polínico. Esto se debe a la activación de las RNAsas, que evitan la transcripción celular necesaria para el crecimiento del tubo (Tao & Iezzoni, 2010).

#### **1.2.4 Sistema de genotipaje del gen de la S-RNasa**

En algunas especies del género *Prunus* ha sido necesario realizar la genotipificación del Locus-S, debido a que la determinación alélica del mismo permite

inducir cruces entre individuos compatibles de especies de interés comercial (Gordillo, 2014). De esta manera, se esperaría que la producción agrícola incremente, trayendo consigo beneficios económicos y comerciales. Las regiones en las que se ha aplicado el sistema de genotipaje han sido el intrón I y el intrón II (**Figura 4**). No se ha encontrado significancia evolutiva o biológica, de la región del intrón I y del intrón II del gen (Banovic et al., 2009). Sin embargo, estas regiones son importantes debido a su variación en tamaño y secuencia. Por esta razón, han sido usadas para el desarrollo de marcadores moleculares que tienen como propósito distinguir entre alelos del gen de la S-RNasa en *Prunus* según el tamaño del producto amplificado por PCR. Se ha reportado, que hacer una o dos PCRs han sido suficientes para genotipar al gen de S-RNasa en *Prunus* (Ortega et al., 2006). Genotipar los alelos mediante el intrón I, ha sido fundamental para el establecimiento de cruces compatibles que den como resultado una progenie viable y una producción de frutos que sea abundante (Ortega et al., 2006). Sin embargo, una de las limitaciones es que no se asegura la distinción entre alelos, debido a que el tamaño no es un buen criterio para determinar diferencias a nivel de secuencia. Por esa razón, para otros géneros de Rosaceae, y especies de *Prunus*, es necesario usar primers específicos para cada alelo o implementar marcadores moleculares como CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) (Yamane & Tao, 2009; Ortega et al., 2006).

Por otro lado, en múltiples estudios, se ha mencionado que una de las regiones más importantes del gen, que han contribuido significativamente para los procesos de evolución ha sido la región hipervariable RHV. Esta región está comprendida entre las regiones conservadas C2-C3 del gen de la S-RNasa, donde también se encuentra el intrón II (**Figura 4**). Esta región, es la que juega el rol más importante en el reconocimiento o no reconocimiento propio (Ortega et al., 2006; Iqbal & Kohn, 2001). Debido a que se

encarga de la codificación para el complejo proteico de membrana del pistilo, como se mencionó previamente.

### **1.2.5 Sistema de marcadores moleculares para genotipaje del gen de la S-RNasa: Intrón I y CAPS como alternativas.**

Como se ha mencionado previamente, uno de los métodos más utilizados para el genotipaje del gen de la S-RNasa ha sido la amplificación del intrón I por PCR convencional. Este método se basa en la identificación del tamaño de los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa. La distinción entre tamaños permite la determinación del alelo o alelos del gen correspondientes al genotipo analizado. Sin embargo, se ha encontrado que este método no es completamente confiable, ya que al amplificar el intrón I del gen, se pueden ver productos de amplificación que tienen el mismo tamaño pero pueden diferir a nivel secuencia (Gordillo, 2014). Por esa razón, uno de los marcadores moleculares más óptimos para la determinación de alelos es CAPS (*Cleaved Amplify Polymorphic Sequence*). CAPS es un marcador codominante, que se basa en la técnica de PCR, combinada con la digestión enzimática (NCBI, 2016) Este marcador molecular, es capaz de detectar cambios específicos en las secuencias de ADN dentro de un locus. Mediante CAPS, es posible, identificar polimorfismos y genotipar un fragmento amplificado de ADN mediante la lectura de un patrón de bandas. Los cambios de patrones de bandas se producen por las mutaciones puntuales, los cuales se pueden identificar en la secuencias amplificadas mediante cortes generados por la digestión enzimática en sitios específicos (Semagn, Bjørnstad, & Ndjiondjop, 2006). Esta es una técnica simple y económica, que depende de la calidad y cantidad de ADN que se tenga. Una de las ventajas de este sistema es que, en el caso de *Prunus serotina* se podría usar para la identificación de alelos que tengan el mismo tamaño (pb) pero diferente secuencia. Además, el sistema de CAPS tiene la

característica de que puede ser ampliamente reproducible, por su alta especificidad (Shavrukov, 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente el gen de la S-RNasa en *Prunus serotina subsp. capuli* y diseñar un sistema de identificación alélica basada en el sistema CAPS para el mismo.

### 2.2 Objetivos específicos

- Amplificar y secuenciar el gen completo de la S-RNasa de *Prunus serotina*.
- Determinar la estructura del gen de la S-RNasa en *Prunus serotina* mediante la identificación de las regiones: Intrón I, intrón II, regiones conservadas C1, C2, C3, RC4, C5, y región hipervariable (RHV).
- Analizar los patrones de polimorfismo de las secuencias (Intrón I y región C2-C3), e identificar sitios de corte de enzimas de restricción para diseñar un sistema de genotipaje del gen de la S-RNasa basada en marcadores moleculares tipo CAPS.
- Plantear un sistema de marcadores moleculares para la identificación alélica del gen de la S-RNasa en *Prunus serotina*.

## 3 ÁREA DE ESTUDIO

Para el presente estudio se seleccionó 17 muestras de *P. serotina subsp. capuli* colectadas (2013) en 7 provincias de la sierra ecuatoriana. Se incluyeron muestras de Carchi, Imbabura, Pichincha, Chimborazo, Cañar y Azuay (**Figura 1**) (Intriago, 2013; Guadalupe, 2013). El ADN utilizado de estas muestras fue extraído y analizado en

estudios previos de diversidad genética y específicamente del intrón I del gen de la S-RNasa (Gordillo, 2014; Guadalupe, 2013; Intriago, 2013). Los sitios de colección fueron bordes de las carreteras y patios de casas (Gordillo, 2014). La investigación presente, fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá (Ecuador).

## 4 JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador, *Prunus serotina* es una especie de gran relevancia etnobotánica y con gran potencial comercial. Como se ha mencionado previamente, el capulí tiene muchas aplicaciones útiles e importantes, en la industria alimenticia, maderera, gastronómica e incluso farmacéutica. Es por esta razón que, su producción y comercialización es importante, ya que podría representar un rubro económico adicional para poblaciones locales en el Ecuador, especialmente por su potencial de exportación. Sin embargo, para alcanzar ese objetivo, es necesario el incremento y homogenización de la producción de capulí. Para esto, se necesita el desarrollo de variedades mejoradas que permitan el incremento en la productividad del cultivo.

El mejoramiento de los cultivos agrícolas depende de procesos deliberados de cruzamientos compatibles entre individuos de la misma especie y la posterior selección de progenies con características superiores. La fecundación del capulí es controlada por el locus polimórfico S, la cuál rige la compatibilidad de cruza entre individuos de la especie. Se ha desarrollado técnicas moleculares para genotipar el Locus-S, los cuales están siendo incorporados en programas de cruza (breeding) (Tao et al., 1999). De esta manera, se ha determinado haplotipos del Locus-S y por otro lado, el término "alelo", se ha utilizado para referirse a las variantes de cada uno de los genes presentes en el locus

(Tao et al., 1999). Algunas de las técnicas se basan en el gen de la S-RNasa de varias especies del género *Prunus*.

Actualmente, no se tiene información acerca de la S-RNasa en *Prunus serotina* subsp. *capuli*. La identificación alélica de este gen permitirá determinar la compatibilidad entre individuos para la realización de cruces en programas de mejoramiento. Para esto, es necesario el uso de un marcador molecular eficaz, que sea capaz de diferenciar entre alelos. El marcador molecular CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphism Sequence*) permite reconocimiento de alelos de forma precisa, evitando usar el método de secuenciación. Además, este método es eficiente ya que es posible la identificación de varios alelos en un mismo genotipo, en comparación con otros métodos que involucran únicamente PCR o secuenciación.

Adicionalmente, la compatibilidad en *Prunus serotina* y en plantas que presentan el mecanismo de auto-incompatibilidad, da como resultado una mayor eficiencia en la producción de frutos. La comercialización del capulí, puede traer beneficios a nivel local e internacional. En Ecuador, el capulí está presente en una temporada corta del año, y no en abundancia, por esa razón los beneficios económicos para el país son reducidos. Si se encuentra un método de producción eficaz, los beneficios alimenticios, nutricionales y económicos del capulí podrían incrementar. Mediante el desarrollo y aplicación de un método rápido, sencillo, económico y eficaz, como CAPS, es posible aprovechar al máximo los periodos de reproducción del capulí. De esta forma, se podrían establecer fincas dedicadas a la producción de este fruto, organizando la siembra de árboles, y garantizando la compatibilidad entre los mismos. De esta manera, se podría aplicar los resultados a nivel agrícola para una producción a gran escala.

## 5 MATERIALES

### 5.1 Amplificación de Intrón I del gen de la SRNasa en PCR

#### convencional

- ADN Stock
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- Agua Destilada Ultra Pura libre de nucleasas
- Taq DNA polimerasa 5U/ $\mu$ L (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl<sub>2</sub> 50mM (Invitrogen)
- dNTP's 10mM (Invitrogen)
- BSA
- Primer PaConsI-F (Sonneveld et al., 2003)
- Primer EM-PC1 cons RD (Ortega et al., 2005).
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- T Personal Thermocycler (Biometra)
- Tubos Eppendorf 0, 2 mL
- Tubos Eppendorf 1, 5 mL

### 5.2 Amplificación del gen completo de la SRNasa mediante PCR

#### convencional.

- ADN Stock
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- Agua Destilada Ultra Pura libre de nucleasas
- Taq DNA polimerasa Platinum 5U/ $\mu$ L (Invitrogen)

- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl<sub>2</sub> 50mM (Invitrogen)
- dNTP's 10mM (Invitrogen)
- BSA
- Primer PaConsI-F (Sonneveld et al., 2003)
- Primer EM-PC5consRD (Sutherland, et al., 2004.)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- T Personal Thermocycler (Biometra)
- Tubos Eppendorf 0, 2 mL
- Tubos Eppendorf 0,6 mL
- Tubos Eppendorf 1, 5 mL

### **5.3 Amplificación de región C2-C3 del gen de la SRNasa mediante**

#### **PCR convencional.**

- ADN Stock
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- Agua Destilada Ultra Pura libre de nucleasas
- Taq DNA polimerasa Platinum 5U/ $\mu$ L (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl<sub>2</sub> 50mM (Invitrogen)
- dNTP's 10mM (Invitrogen)
- BSA
- Primer C2 FW( 5' ATY- CAT-GGC-CTR-TGG-CCA-AG 3')
- Primer C3 RV (3' TGY-TTR-TTC-CAT-TCV-CBT-TCC 5')
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)

- T Personal Thermocycler (Biometra)
- Tubos Eppendorf 0, 2 mL
- Tubos Eppendorf 0,6 mL
- Tubos Eppendorf 1, 5 mL

#### **5.4 Diseño de primers específicos para amplificación de región C2-C3.**

- Computadora Windows / Mac
- MEGA 7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016)
- Secuencias del gen completo de la S-RNasa *Prunus serotina*
- Secuencias de primers EM-PC2consFD y EM-PC3consRD reportados por Sutherland et al. en 2004.

#### **5.5 Análisis de datos mediante bioinformática**

- Computadora Windows / Mac
- MEGA 7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016)
- Pre Gap
- Gap4
- Genome Compiler
- GenBank
- BLAST (Altschul et al., 1990)

#### **5.6 Diseño de sistema de marcadores moleculares CAPS *in silico***

- Computadora Windows / Mac
- Secuencias del gen completo de la S-RNasa *Prunus serotina*
- Secuencias Intrón I de la S-RNasa de *Prunus serotina* (Gordillo, 2014).
- Secuencias región C2-C3 de la S-RNasa de *Prunus serotina*

- Genome Compiler
- MEGA 7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016)

### **5.7 Validación de sistema de marcadores moleculares CAPS *in vivo***

- Kit de extracción de banda (Invitrogen)
- Agua destilada ultra pura libre de nucleasas
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- Rsa I Fast Digest (Invitrogen)
- Mbo I Fast Digest (Invitrogen)
- Xsp I Fast Digest (Invitrogen)
- FspBI Fast Digest (Invitrogen)
- Buffer Enzima
- Cama de arena (Thermo Scientific)
- Tubos Eppendorf 0, 2 mL
- Tubos Eppendorf 1, 5 mL

### **5.8 Electroforesis en geles de agarosa**

- SeKem LE Agarose
- TBE 1X (Tris base- Ácido Bórico- EDTA)
- SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Agua Destilada Ultra Pura libre de nucleasas
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Ladder DNA 100 bp (Invitrogen)
- ENDURO™ XL Electrophoresis System
- Fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2018).

## 6 MÉTODOS

### 6.1 Selección de muestras basadas en alelos de Intrón I

#### 6.1.1 Determinación de muestras de interés y duplicados

Previamente, Gordillo (2014) reportó 11 alelos del gen S-RNasa, en *Prunus serotina subsp. capuli*, identificados mediante la amplificación y secuenciación del intrón I. La presente investigación, tuvo como punto de partida la información reportada por Gordillo en 2014 para caracterizar el gen completo de la SRNasa de los 11 alelos identificados.

La determinación de las muestras de interés fue hecha a partir de la amplificación del intrón I, evidenciada en fotos de geles de agarosa, reportadas por Gordillo en 2014. Se eligió de dos a tres muestras representativas de cada alelo (**Figura 6**). Posteriormente, se determinó 17 muestras de interés que representaban a los 11 alelos putativos, algunas de estas muestras siendo heterocigóticas, de forma que había la representación de algunos alelos más de una vez. Entre estas 17 muestras estuvieron incluidas las 11 de las que se tenía la secuencia del intrón I.

### 6.2 Secuenciación del gen completo de la S-RNasa de *Prunus serotina subsp. capuli*

#### 6.2.1 Amplificación del gen completo de S-RNasa en *Prunus serotina* mediante PCR convencional.

La amplificación del gen completo de la S-RNasa se realizó utilizando los primers degenerados: PaConsI-F, diseñado por Sonnevald (2003), y EM-PC5consRD diseñado por Sutherland et al. (2004), los cuales flanquean el gen completo de la S-RNasa. Las condiciones que se usaron para la amplificación del gen completo de la S-RNasa fueron: Buffer de PCR 1X (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTP's 0.2 mM, primer PaConsI-F 0.5

$\mu\text{M}$ , primer C5 Rv 0.5  $\mu\text{M}$ , Taq- polimerasa Platinum 1U, ADN 40 ng. El ciclado usado fue: Denaturación inicial 94°C por 2 min, luego 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 min, annealing con una temperatura de 58°C, extensión a 68°C por 4 min, y por último una extensión final a 68°C por 10 min (Ortega & Dicenta, 2011). Los productos amplificados fueron evaluados mediante electroforesis (1 hora a 80 V) en gel de agarosa al 2% (50 mL de TBE 1X, 1.0 g de agarosa y 1.5  $\mu\text{L}$  de SYBR Safe Invitrogen). Se realizó la fotografía del gel (**Figura 7**) en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2018).

### **6.2.2 Reamplificación y Secuenciación de Productos Amplificados**

Los productos obtenidos tras la amplificación del gen de la S-RNasa en 17 genotipos seleccionados fueron extraídos para su posterior secuenciación. La extracción de bandas se realizó usando el Kit PCR clean-up Gel Extraction (Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las especificaciones del fabricante (Macherey-Nagel, 2017). La reamplificación de ADN extraído del gel (**Figura 8**) se basó en las concentraciones cuantificadas por el NanoDrop 2000. Las condiciones de amplificación están descritas en la sección anterior, cambiando a únicamente la concentración de ADN a 20 ng.

El ADN reamplificado del gen completo fue enviado a MacroGen (Seúl, Korea del Sur) para que se realice la secuenciación. Se usó el servicio de secuenciación convencional. Además, se usó el servicio de Primer Walking cuando existieron problemas en la lectura de las secuencias en ciertos alelos.

### **6.2.3 Análisis de datos: análisis de secuencias, comparación con intrón I y determinación de genotipos.**

Las secuencias que fueron totalmente legibles fueron procesadas y limpiadas, mediante el programa Pre Gap 4 y Gap 4. A partir de esto, se logró obtener secuencias consenso del gen completo de la S-RNasa. Se utilizó el programa MEGA 7 (Kumar,

Stecher, & Tamura, 2016), para hacer alineamientos de las secuencias obtenidas, identificar las regiones conservadas C1-C5, y por último, se utilizó la herramienta BLAST del NCBI (Altschul et al., 1990) para comparar con secuencias de otras especies (**Tabla 1**).

### **6.3 Marcadores moleculares CAPS**

#### **6.3.1 Diseño de marcadores moleculares CAPS a partir de secuencias de Intrón I y región C2-C3 del gen de la SRNasa (in silico)**

Se diseñó un sistema de marcadores moleculares *in silico* con el propósito de identificar los alelos del gen de la SRNasa de *Prunus serotina*. Se usó el programa de bioinformática Genome Compiler (Genome Compiler, 2018). Este sistema de marcadores moleculares es aplicable para el intrón I del gen o para la región C2-C3, la cual incluye al intrón II flanqueado por la región hipervariable (RHV) (Ortega & Dicenta, 2011). Como se mencionó anteriormente, CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) es un sistema de genotipaje molecular que depende en un inicio de la secuencia de ADN para su diseño, y para su aplicación combina la amplificación y el uso de enzimas de restricción de modo que se pueda generar patrones de bandas únicas para cada alelo de un gen (Yamane & Tao, 2009).

El método que se utilizó fue mediante el establecimiento de las regiones del gen que brinden la mayor cantidad de información posible. En este caso, se eligió al intrón I, ya que se ha reportado a esta región como un buen marcador para genotipar los alelos de S-RNasa en el género *Prunus*. Además, se eligió la región C2-C3, que comprende la región hipervariable (RHV), la cual tiene una función biológica en la auto-incompatibilidad (AI), y también el segundo intrón, que varía en tamaño entre alelo y alelo, por lo tanto brinda mucha información acerca del gen (Tao & Iezzoni, 2010).

El diseño de CAPS para ambas regiones consistió en: (1) Aislamiento de las secuencias de las regiones de interés, (2) identificación de enzimas con sitio de corte en cada una de las secuencias, (3) determinación de enzimas con sitios de corte comunes a todas las secuencias, (4) selección de tres enzimas óptimas que logren diferenciar todas las secuencias de cada región, representantes de todos los alelos determinados previamente; y (5), la elaboración de una guía de identificación de patrones de cada alelo. Es importante mencionar que el diseño de CAPS realizado para cada una de las regiones (intrón I y C2-C3) fue hecho por separado.

### **6.3.2 Validación molecular sistema CAPS**

Para aplicar el método CAPS en el intrón I y en la región C2-C3 del gen de la S-RNasa *in vivo*, es necesario seguir cuatro 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) Cortar con las enzimas de restricción establecidas para cada región. Cabe recalcar, que el paso 3 no es siempre necesario, depende de la concentración de ADN obtenida luego de la extracción de banda en el gel. Si la concentración es muy baja se recomienda hacer la reamplificación, si no es muy baja entonces se puede seguir con el paso 4 directamente.

Para la amplificación del intrón I se usó un par de primers que flanqueaban dicha región, los cuales fueron diseñados a partir de las regiones conservadas del gen. El primer forward (sentido 5'- 3'), PaConsI-F, fue diseñado por Sonneveld (2003) y el primer reverse EM-PC1cons RD, fue diseñado por Ortega et al. (2005). Las concentraciones utilizadas para la reacción de PCR fueron: Buffer de PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, BSA 0.1 mg/  $\mu$ L, dNTP's 0.2 mM, 0.3  $\mu$ M de primer PaConsI-F, 0.3  $\mu$ M de primer EM-PC1cons RD, Taq-Polimerasa 0.5 U, DNA 20 ng (Ortega et al., 2005). Se obtuvo un volumen total de la reacción de 25  $\mu$ L. El programa de ciclado consistió en una denaturación inicial de

94°C por 2 minutos, posteriormente 35 ciclos que iniciaban con una 94 °C durante 10 s, luego 58°C durante 2 minutos para el annealing y una extensión de 68°C por 2 minutos. La extensión se aumentó 10 segundos en cada ciclo a partir del décimo (Gordillo, 2014). Se realizó la fotografía del gel de agarosa (**Figura 9**) en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2018).

Por otro lado, la amplificación mediante PCR de la región C2-C3 fue realizada utilizando los primers: Ps 1 C2 Fw ( 5' ATY- CAT-GGC-CTR-TGG-CCA-AG 3') y Ps 2 C3 Rv (3' TGY-TTR-TTC-CAT-TCV-CBT-TCC 5') diseñados en el desarrollo de esta tesis a partir de las regiones conservadas C2 y C3 que flanquean la región hipervariable (RHV) del gen de la S-RNasa de *Prunus serotina subsp. capuli*. Las condiciones que se usaron para la amplificación de la región C2-C3 fueron: Buffer de PCR 1X (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTP's 0. 2 mM, primer C2F 0.5 μM, primer C3 R 0.5 μM, Taq-polimerasa Platinum 1U, ADN 20 ng. El ciclado usado fue el mismo que se usó para la amplificación del gen completo: Denaturación inicial 94°C por 2 min, luego 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 min, annealing con una temperatura de 58°C, extensión a 68°C por 4 min, y por último una extensión final a 68°C por 10 min (Ortega & Dicenta, 2011). Los resultados de amplificación fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (100 mL de TBE 1X, 1.5 g de agarosa y 3 uL de SYBR Safe Invitrogen) y se corrió la electroforesis por 1 hora a 80V. Se realizó la fotografía del gel de agarosa (**Figura 10**) en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2018).

En el caso de la región C2-C3, fue necesario la extracción de las bandas visualizadas y reamplificación del ADN extraído, para realizar las digestiones enzimáticas, ya que la mayoría de genotipos eran heterocigotos. Por el contrario, para el intrón I, se encontraron mayoritariamente de genotipos homocigotos, por lo cual se usó el producto de amplificación para realizar las digestiones enzimáticas. Para la extracción

de bandas se usó el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Se siguió el protocolo especificado por el kit (Promega, 2009). La reamplificación del ADN extraído de la región C2-C3 tuvo las mismas condiciones de amplificación, a excepción de que se incrementó la concentración de ADN a 40 ng. Se realizó la fotografía del gel de agarosa (**Figura 11**) en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2018).

Las enzimas utilizadas son de la línea Fast Digest de ThermoFisher Scientific, para las 4 enzimas (RsaI, Mbo I, XspI, FspBI) se usó las mismas concentraciones. El volumen total de la reacción es fue de 20  $\mu\text{L}$ , se usó 9  $\mu\text{L}$  de Agua libre de nucleasas, 2  $\mu\text{L}$  de Buffer, 1  $\mu\text{L}$  de la enzima Fast Digest y 8  $\mu\text{L}$  ( $<0.2 \mu\text{g}$ ) de producto no purificado de re-amplificación de ADN. Los resultados se evaluaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2% (100 ml de TEB 1X, 2.0 g de Agarosa, 3  $\mu\text{L}$  de SYBR Safe (Invitrogen), y se corrió por 50 minutos a 80V. Se realizaron las fotografías en gel de agarosa (**Figura 12, Figura 13**) en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2018).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Amplificación del gen de la S-RNasa en *P. Serotina*

Se logró amplificar exitosamente el gen completo de la S-RNasa en 15 de 17 genotipos seleccionados (**Figura 7**). De estos, 9 genotipos presentaron patrones homocigotos, 4 presentaron patrones heterocigotos con un máximo de 2 bandas por genotipo, y 2 presentaron patrones heterocigotos con un máximo de 3 bandas por genotipo. Para todos los patrones heterocigotos detectados se procedió a extraer los productos amplificados a partir del gel de agarosa; posteriormente, estos fueron re-amplificados con el fin de confirmar si realmente correspondían al gen de la S-RNasa. En total se obtuvo 23 productos de amplificación, todos representativos del gen de la S-

RNasa (**Tabla 2**). Estos fueron enviados a MacroGen (Seúl, Corea del Sur) para ser secuenciados.

## **7.2 Análisis estructural y de diversidad alélica del gen de la S-RNasa de *P. serotina***

A partir de 23 productos amplificados del gen de la S-RNasa de *P. serotina* (derivados de 15 genotipos) se logró obtener 22 secuencias legibles (**Tabla 2, Anexo 1**). Las secuencias obtenidas fueron identificadas y caracterizadas mediante análisis comparativo con secuencias almacenadas en el repositorio genómico del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) mediante uso del paquete informático BLAST (Altschul et al., 1990). La **Tabla 1** detalla los resultados de dicho análisis comparativo. En resumen, todas las secuencias analizadas presentaron un alto grado de homología (>85%) con secuencias del gen de la S-RNasa de parientes cercanos de *P. serotina*. Este resultado indica que el gen de la S-RNasa se encuentra altamente conservado en las especies del género *Prunus*.

Posteriormente, el programa bioinformático MEGA7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016) fue empleado para realizar el análisis estructural del gen de la S-RNasa de *P. serotina*. Con este fin, las 22 secuencias obtenidas fueron alineadas usando la función de alineamientos múltiples de ClustalW (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016). Estos alineamientos permitieron distinguir todas las regiones características del gen de la S-RNasa (i.e., SPR, intrón I, intrón II, regiones conservadas C1-C5, y región hipervariable RHV) en 17 de las 22 secuencia analizadas (**Anexo 2**). El resto de secuencias (5 en total) representaban secuencias parciales que carecían (en distintos grados) de las regiones conservadas C2, C3, RC4 y C5 (**Tabla 2**). Posiblemente, la lectura incompleta de estas secuencias fue causada por artefactos intrínsecos de la tecnología de secuenciación implementada en este estudio.

Finalmente, también se realizó un análisis preliminar de la diversidad alélica del gen de la S-RNasa en las 22 secuencias analizadas. La determinación de alelos putativos se realizó mediante análisis comparativo y alineamiento de la región del intrón I en las secuencias obtenidas con las secuencias del intrón I de *P. serotina* obtenidas previamente por Gordillo (2014). El resultado de estos alineamientos fue la correspondencia de 17 secuencias con los 11 alelos anteriormente identificados por Gordillo (2014). Por otro lado, las 5 secuencias restantes derivaron en 4 nuevas secuencias alélicas. En conclusión, a partir de las 22 secuencias obtenidas inicialmente se identificó un total de 15 alelos putativos del gen de la S-RNasa (**Tabla 2**).

### **7.3 Desarrollo de un sistema de genotipaje para el gen de la S-RNasa basado en CAPS**

#### **7.3.1 Diseño de sistema CAPS para el Intrón I y la región intra-génica C2-C3**

La presente investigación tuvo como objetivo el desarrollo de un marcador molecular económico, eficiente y confiable para la identificación alélica del gen de la S-RNasa en *P. serotina*. El sistema de genotipaje que cumple con estos requisitos es CAPS (por sus siglas en inglés: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence). El diseño de marcadores CAPS depende del uso y análisis de regiones con alto grado de polimorfismo a nivel de secuencia. Es así que se eligió la región del intrón I y la región inter-génica C2-C3 (la cual incluye la región hipervariable del gen de la S-RNasa) pues estas brindan la mayor cantidad de información polimórfica posible.

El diseño de marcadores CAPS fue realizado sistemáticamente, considerando cada región de interés (intrón I y C2-C3) de forma independiente. En total se contó con 15 secuencias únicas para el intrón I (representativas de los 15 alelos putativos encontrados previamente) y 11 secuencias para la región C2-C3 (**Anexo 1**), pues 4 de las

22 secuencias obtenidas fueron parcialmente legibles y no presentaban las regiones C2, C3, RC4 y C5 (**Tabla 2**).

Posteriormente se usó el programa Genome Compiler (Genome Compiler, 2018) para determinar todos los sitios de restricción enzimática en las secuencias analizadas (**Anexo 1**). Se encontró alrededor de 42 enzimas capaces de realizar cortes en las secuencias sondeadas. De estas, se seleccionaron 9 enzimas. El criterio de selección fue que dichas enzimas tengan sitios de corte en la mayoría de secuencias analizadas para cada región. Posteriormente, se realizaron digestiones enzimáticas simples *in silico* con cada enzima. Un total de 135 digestiones enzimáticas fueron realizadas para la región de intrón I (9 enzimas, 15 secuencias) y 99 digestiones enzimáticas para la región C2-C3 (9 enzimas, 11 secuencias). Los resultados de estas digestiones fueron visualizados usando el simulador virtual de electroforesis en gel del programa Genome Compiler. En todos los casos, los gels virtuales resultantes mostraron los patrones de corte esperados. Por región, también se encontró que ninguna enzima tenía la capacidad de cortar en todas las secuencias analizadas y generar así patrones individuales únicos para cada alelo. Se vio que la mejor opción para diferenciar a todos los alelos era mediante la combinación de 3 diferentes enzimas que dieron como resultado 3 patrones individuales. Esta combinación de 3 patrones individuales fue denominada como “patrón global”.

El objetivo fue establecer patrones globales únicos para cada alelo en cada región. De esta manera, para la selección de las 3 enzimas, fue necesario descartar aquellas que dieron como resultado patrones globales con alto grado de similitud, ya que impedían la diferenciación alélica del gen de la S-RNasa. Finalmente, se encontró patrones globales únicos para cada alelo en intrón I (**Anexo 3**). Estos patrones globales son el resultado de digestiones enzimáticas con las enzimas RsaI, Mbo I y Xsp I (**Tabla 3**). Por otro lado, también se encontró patrones globales únicos para cada alelo en la región C2-C3 (**Anexo**

4). Las enzimas necesarias para la distinción entre todos los alelos de la región C2-C3 son RsaI, Mbo I y FspBI (**Tabla 4**). En base a esta selección de enzimas se generó una guía preliminar de identificación de patrones alélicos para el intrón I y la región inter-génica C2-C3 del gen de la S-RNasa de *P. serotina* (**Tabla 5, Tabla 6**).

#### **7.4 Validación *in vivo* del sistema CAPS para el genotipaje del Intrón I y la región inter-génica C2-C3**

Para validar el sistema CAPS en las regiones del intrón I y C2-C3 se usaron los 15 genotipos seleccionados inicialmente. En todos se logró amplificar exitosamente las regiones diana. Se visualizó las bandas resultantes de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa. Para el intrón I se identificó 11 genotipos homocigotos y 4 heterocigotos (**Figura 9**). En cambio, para la región C2-C3 se identificó 2 genotipos homocigotos y 13 heterocigotos (**Figura 10**).

En base a los análisis *in silico*, para la región del intrón I se esperaba encontrar 15 alelos distintos. Sin embargo, la validación *in vivo* demostró la presencia de 13 alelos. Esto se debe a que para ciertos genotipos fue imposible diferenciar los patrones de bandeo pues se presentaron más bandas de las esperados en los ensayos de restricción. Por otro lado, según lo predicho *in silico*, para la región C2-C3, se esperaba encontrar 11 alelos distintos. Sin embargo, fue posible identificar 15 distintos alelos. En este caso particular, es importante destacar que de los 11 alelos esperados solo se encontraron 8 patrones predichos. Es decir, hubo un total de 7 patrones nuevos. En conclusión, mediante CAPS para el intrón I se logró distinguir 13 alelos y para la región C2-C3 15 alelos (**Tabla 7, Tabla 8**).

A pesar de los resultados, cabe recalcar que en ciertos genotipos no existía una correspondencia entre el número de alelos encontrados para la región del intrón I y la región C2-C3 (**Tabla 9**). Un ejemplo claro de esta inconsistencia se evidencia en las

muestras Imb011 y Car011. Se ha visto que, al amplificar el intrón I y la región C2-C3 de estas muestras, se visualizan claramente dos bandas, lo que en teoría indica la presencia de dos alelos diferentes en cada uno de estos genotipos. Sin embargo, cuando se amplifica el gen completo de las mismas muestras, se visualiza únicamente una banda en el gel de agarosa, lo que se asumiría como un único alelo presente en dichos genotipos (**Tabla 9**). Otro ejemplo de inconsistencia en la amplificación es la muestra Pic023. Esta muestra presenta un genotipo homocigoto al amplificar el intrón I. Sin embargo, al amplificar el gen completo de la S-RNasa, se puede asumir que el genotipo es heterocigoto ya que se ven 2 bandas en el gel de agarosa (**Tabla 9**).

## 8 DISCUSIÓN

En el Ecuador, el capulí (*P. serotina subsp. capuli*) es una especie de gran importancia a nivel comercial, nutricional y etnobotánico. Debido a procesos evolutivos, la especie ha desarrollado el mecanismo de auto-incompatibilidad gametofítica para mantener la diversidad genética y la eficacia biológica de sus poblaciones (Popenoe & Pachano, 1922; Kao & Tsukamoto, 2004). En la actualidad no existe información detallada acerca del funcionamiento del mecanismo de auto-incompatibilidad (AI) en *P. serotina*. Sin embargo, investigaciones en parientes cercanos de la especie demuestran que el mecanismo AI en *Prunus* está controlado por el Locus-S, el cual se compone de dos genes: el gen de la S-RNasa y el gen SFB (Tao & Iezzoni, 2010). Dicho mecanismo funciona mediante el reconocimiento genético entre el pistilo y el polen el momento de la polinización. En caso de que, tanto el polen como el pistilo, presenten un mismo genotipo S (referente al Locus-S), se inhibe la fecundación (**Figura 2**). Sin embargo, si el genotipo S difiere, se da la compatibilidad sexual entre polen y pistilo, resultando en una fecundación efectiva (Tao & Iezzoni, 2010).

El desarrollo de métodos para la genotipificación del Locus-S es de suma importancia para la domesticación y potenciación agrícola del capulí. Como se sabe, hay dos problemáticas en cuanto a la incompatibilidad sexual de las especies que presentan este mecanismo. La primera es que la AI (auto-incompatibilidad) influye en la posibilidad de realizar cruzas que permitan el mejoramiento genético de los cultivos (Ortega et al., 2006). Por otro lado, la segunda problemática es que al tener árboles incompatibles en una hacienda o finca (como es el caso de *P. serotina* en el Ecuador), la producción de frutos es reducida ya que no es posible tener polinizaciones cruzadas compatibles (Ortega et al., 2006). Es así como, el conocimiento del genotipo de S (referente al Locus-S) de individuos de *P. serotina* permitiría inducir cruzas compatibles, y por lo tanto permitir el desarrollo de planes de mejoramiento genético para incrementar la producción del fruto. En conclusión, el entendimiento de la AI en *P. serotina subsp. capuli* es importante para la explotación comercial del cultivo en Ecuador y a nivel mundial.

Algunos de los métodos de genotipificación del Locus-S más utilizados se han basado en el estudio del gen de la S-RNasa. Este gen ha sido considerado como marcador alélico del Locus-S debido a su polimorfismo en tamaño y secuencia. Las regiones del gen que presentan mayor polimorfismo son el intrón I y la región inter-génica comprendida entre las regiones C2 y C3 (*i.e.* éstas incluyen el intrón II y RHV) (Wu et al., 2013). En estudios previos, los métodos de identificación alélica se han basado en la amplificación por PCR convencional de los intrones. El criterio para la distinción entre alelos ha sido la diferencia en tamaños de los productos de amplificación visualizados en gel de agarosa. Sin embargo, se ha comprobado que este método no es totalmente efectivo. Esto se debe a que alelos de un mismo tamaño pueden tener diferencias en secuencia (Gordillo, 2014).

Un estudio previo, realizado por Gordillo (2014) en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, tuvo como objetivo la genotipificación del Locus-S de 80 muestras de capulí recolectadas en la sierra de Ecuador. El método de genotipificación utilizado fue la amplificación por PCR convencional del intrón I del gen de la S-RNasa. El criterio de distinción entre genotipos fue el tamaño del producto de amplificación visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa. De esta manera, se determinó el alelo putativo del gen de la S-RNasa correspondiente a cada muestra. Finalmente, el resultado del estudio fue la identificación de 11 alelos putativos del gen de la S-RNasa en las 80 muestras *P. serotina subsp. capuli*. Sin embargo, una de las limitaciones del estudio fue que el uso del marcador molecular basado en PCR. En primer lugar se usaron primers degenerados que no eran específicos para la especie de interés. Por otro lado, la determinación de tamaños de los productos de amplificación visualizados no fue exacta. Esto se debe a que, en el gel se puede aproximar el número de pares de base que tiene un producto de amplificación. De esta manera, es difícil distinguir entre los tamaños de los productos de amplificación que difieran entre 30 pb o menos. Además, se ha reportado en otras especies del género *Prunus*, que la distinción de alelos por tamaño de los productos de amplificación visualizados en el gel, no es garantía de homología a nivel de secuencia (Ortega et al., 2005)

Es de esta manera que el presente estudio tuvo como objetivo la caracterización molecular del gen de la S-RNasa en *Prunus serotina subsp. capuli* y el desarrollo de un sistema de marcadores moleculares basado en CAPS para la identificación alélica del mismo. Con este objetivo, se seleccionaron 17 genotipos representativos de los 11 alelos del gen de la S-RNasa previamente identificados por Gordillo (2014).

## 8.1 Amplificación, secuenciación y análisis de secuencias del gen de la S-RNasa

A partir de la secuenciación de 15 genotipos (para los cuales se pudo amplificar exitosamente el gen de la S-RNasa) se logró identificar 15 alelos del gen de la S-RNasa de la especie *P. serotina subsp. capuli*. El análisis de las secuencias de los 15 alelos identificados permitió evidenciar el alto grado de similitud entre el gen de la S-RNasa en *P. serotina subsp. capuli* y otras especies del género *Prunus*. Cabe resaltar que la presente investigación es la primera en caracterizar molecularmente el gen de la S-RNasa en la especie *P. serotina subsp. capuli*. A pesar de los resultados positivos, se debe mencionar que el procedimiento tuvo ciertos contratiempos, especialmente en cuanto a la amplificación y secuenciación.

Con respecto a la amplificación, el problema se dio en la consistencia de alelos amplificados correspondientes a cada genotipo. Esto quiere decir que, en todas las ocasiones que se hizo la amplificación de las diferentes regiones (intrón I, región C2-C3 y gen completo de la S-RNasa), se vio distintos números de bandas para un mismo genotipo. En este estudio, se usaron pares de primers degenerados para la amplificación del intrón I y del gen completo de la S-RNasa. Sin embargo, para la amplificación de la región C2-C3 se usaron primers homólogos para *P. serotina*, diseñados a partir de las secuencias obtenidas a partir de los 15 genotipos seleccionados inicialmente en el presente estudio. El uso de primers degenerados, puede ser una de las causas de la inconsistencia en la amplificación para el gen de la S-RNasa. La literatura ha reportado que el uso de primers que son diseñados con la mayoría de nucleótidos degenerados tiene problemas en la hibridación al ADN molde. Esto se debe a que el ensamblaje de los enlaces de hidrógeno no es estable. De esta forma, la polimerasa no es capaz de sintetizar una nueva cadena de ADN, ya que no detecta el primer hibridado en la cadena de ADN

molde (Linhart & Shamir, 2004). Otro aspecto importante es que, la efectividad del funcionamiento de un par de primers degenerados en la amplificación depende de que al menos uno de los primers tenga pocas degeneraciones. De esta manera, la amplificación logra ser específica para la región de interés (Linhart & Shamir, 2004). Sin embargo, en la investigación presente, los pares primers utilizados para la amplificación del intrón I y el gen completo de la S-RNasa tienen alrededor del 30% de nucleótidos degenerados en su secuencia. Por lo tanto, se podría esperar que hubiera un fallo en la hibridación de dichos primers, limitando la identificación de los alelos del gen.

La inconsistencia en la amplificación de regiones diana y el gen completo de la S-RNasa generó un problema mayor en este estudio. Este problema está relacionado con uno de los objetivos de la investigación, el cual consiste en el diseño de un sistema de genotipaje de la S-RNasa basado en CAPS. Se sabe que para el funcionamiento eficaz de este sistema es necesario la especificidad de la amplificación de las regiones de interés, ya que mediante los productos de dicha amplificación se hará la identificación alélica del gen. Una de las regiones de interés que se ha propuesto en esta investigación es el intrón I. El problema con la amplificación de esa región es que no se logra distinguir varios alelos que presentan diferentes tamaños. Es decir, muchos genotipos son aparentemente homocigotos, cuando deberían ser heterocigotos. Una solución que se le puede dar a este problema es que al tener las secuencias del gen completo de la S-RNasa, es posible el diseño de primers específicos para *P. serotina subsp. capuli*. De esta forma, se puede obtener primers que tengan la menor cantidad de degeneraciones en sus secuencias, y de esta manera poder visualizar en un gel de agarosa, tras la amplificación, todas las variantes del gen de la S-RNasa que presenta una muestra.

Otro factor importante que presentó irregularidades en el procedimiento de esta investigación fue la secuenciación. Como se mencionó en la sección 7.2, se logró obtener

17 secuencias del gen completo de la S-RNasa, 5 secuencias parciales (sin la presencia de las regiones: C2, C3, RC4 y C5) y 1 secuencia ilegible. La lectura de las secuencias parciales no fue exitosa debido a que los tamaños de estas eran considerablemente grandes (< 1100 pb). El secuenciador usado por MacroGen en el servicio convencional es el “3730 xl DNA Analyzer”, el cual está diseñado para secuenciar fragmentos de hasta 900 pb (ThermoFisher Scientific, 2018). De esta forma, se puede explicar que no siempre fue posible identificar las secuencias completas para ciertos genotipos (MacroGen, Seúl, Corea del Sur). Otro posible inconveniente con respecto a las secuencias parciales puede estar relacionado con la presencia de regiones poli T en dichas secuencias (ej., alelo IV). Estas regiones evitaban la correcta lectura de los nucleótidos que se encontraban después de la región poli T (MacroGen). En la literatura, se ha reportado que existen este tipo de problemas en la secuenciación, cuando se presentan secuencias repetitivas de ADN. Este inconveniente sucede incluso con el uso de las nuevas tecnologías (NGS). Esto se debe a que desde la perspectiva computacional tener secuencias repetitivas genera ambigüedades en los alineamiento y en la interpretación de resultados (Treagen & Salzberg, 2011). Sin embargo, para evitar estos inconvenientes, se podría optar por el uso de la metodología de secuenciación por nanoporo, ya que se ha reportado que esta tecnología es altamente específica, rápida, reduce costos y lo más importante: puede leer fragmentos grandes (>1000 kb) fácilmente (Clarke, 2009). En conclusión se podría decir que estos problemas de artefactos en la secuenciación, afectan directamente al diseño del sistema CAPS. Esto se debe a que las secuencias son la herramienta principal e inicial, ya que de estas se parte para lograr el diseño de un buen sistema de marcadores moleculares que permita la identificación alélica.

## 8.2 Validación de CAPS para intrón I y región C2-C3

El marcador molecular CAPS ha sido utilizado como método para la genotipificación del Locus-S en otras especies de interés comercial del género *Prunus* (Yamane & Tao, 2009). CAPS es una herramienta útil que puede aplicarse para desarrollar planes de mejoramiento genético de los cultivos de capulí. A través del uso de CAPS, se puede determinar cruza entre individuos genéticamente compatibles, de forma que la producción de frutos sea eficiente. Este método es fácil, económico y rápido, por lo tanto puede ser considerado como una buena alternativa para aplicarlo a nivel agrícola e industrial. Actualmente, en el Ecuador, los cultivos de capulí no son extensos y se dan únicamente en fincas, jardines familiares, bordes de carreteras, etc. De esta forma, al usar CAPS se podría impulsar significativamente la producción de capulí y que los cultivos crezcan de manera considerable.

En cuanto a la presente investigación, se encontró que el sistema CAPS funcionó para la identificación alélica del gen de la S-RNasa en *Prunus serotina subsp. capuli*. En comparación con el sistema tradicional de genotipado (i.e. amplificación por PCR convencional del Intrón I), se puede decir que el sistema CAPS tiene mayor eficiencia. La limitación del sistema tradicional es que se basa únicamente en la distinción de tamaños de productos de amplificación, mas no en las secuencias de ADN de los mismos. Por otro lado, mediante la aplicación de CAPS, es posible distinguir los alelos del gen a nivel de tamaño y secuencia.

En esta investigación, se diseñó y validó el marcador molecular CAPS en dos regiones del gen de la S-RNasa: el intrón I y la región C2-C3. Con respecto a la validación del sistema CAPS para intrón I se puede decir que los resultados indican que esta región del gen no es la óptima para ser usada como indicador alélico del Locus-S. Como se mencionó en la sección anterior, la falta de fiabilidad del intrón I se da porque al

amplificarlo mediante PCR convencional, se revela menos alelos del gen de la S-RNasa en comparación con la amplificación de la región C2-C3. Esto puede ser causado por el uso de primers degenerados. Se reitera nuevamente que una de las soluciones que se propone para mejorar los resultados de la amplificación del intrón I, es el diseño de primers específicos para *P. serotina subsp. capuli*, que sean capaces de amplificar todos los alelos de un genotipo.

Es así como, al amplificar el intrón I del gen de la S-RNasa en los 15 genotipos seleccionados, se vio la presencia de 11 genotipos homocigotos y 4 heterocigotos (**Figura 9**). De esta forma, al tener la mayoría de genotipos homocigotos, se optó por omitir los pasos de extracción de banda y reamplificación, ya que se esperaba tener un solo alelo en la mayoría de los productos de amplificación. Es así como se usó el producto de amplificación como material genético molde para la digestión enzimática. El revelado de las reacciones de restricción, mediante electroforesis en gel de agarosa, mostró en la superposición de patrones lo que dificultó la interpretación de resultados para CAPS en esta región. Sin embargo, al tener las secuencias de las muestras utilizadas y los patrones predichos en las simulaciones de gel hechas en Genome Compiler, fue posible distinguir claramente la mayoría de alelos (13 de 15). Los alelos XII y XIII no fueron identificados; esto se debe a que aquellas muestras de las que no se logró identificar los patrones, eran correspondientes a dichos alelos. Sin embargo, se puede decir que los resultados obtenidos son útiles para comprobar que el diseño de CAPS fue exitoso, ya que se verifica que los cortes enzimáticos fueron predichos precisamente y son capaces de diferenciar entre alelos del gen. Por otro lado, esta situación no es favorable en el caso de que se aplique CAPS para intrón I a una muestra desconocida, ya que la superposición de patrones puede llevar a interpretaciones erradas acerca del alelo identificado del gen.

Por el contrario, los resultados muestran que CAPS para la región C2- C3 es un marcador molecular válido y confiable. La principal razón es que mediante la amplificación de la región C2-C3 por PCR convencional, se revela más alelos en comparación con la amplificación del intrón I. Esto muestra nuevamente que el intrón I no puede ser utilizado como marcador molecular confiable. Además, C2-C3 es la región con mayor grado de polimorfismo en tamaño y secuencia de todo el gen de la S-RNasa. Esto se debe a que incluye la región hipervariable (RHV) y el intrón II. Además, se ha dicho que esta región es una posible determinante para el reconocimiento de la compatibilidad o incompatibilidad entre alelos del Locus-S. Por otro lado, en la validación del sistema CAPS *in vivo* para la región C2-C3 fue posible comprobar los patrones predichos *in silico*, y también se pudo encontrar patrones nuevos que brindan más información. Esta nueva información es útil para realizar cruces compatibles entre los individuos de capulí. Con respecto a la amplificación de la región C2-C3, se puede decir que los resultados fueron exitosos. Esto se debe al uso de primers diseñados específicamente para *Prunus serotina*. Por lo tanto, se logró ver mayor cantidad alelos en la electroforesis en gel de agarosa, en comparación con la amplificación del intrón I o del gen completo de la S-RNasa. Se encontró, un total de 13 genotipos heterocigotos y 2 homocigotos. Los productos de amplificación presentes en el gel fueron extraídos y reamplificados, a diferencia de los productos de amplificación del Intrón I. Esto se pudo realizar, ya que los tamaños de cada producto, correspondiente a un alelo, eran significativamente diferentes. De este modo, no se corrió el riesgo de contaminación el momento de la extracción. Posteriormente, los productos de reamplificación fueron digeridos con las enzimas de restricción determinadas en el diseño de CAPS para la región C2-C3 (RsaI, MboI y FspBI). El análisis de los patrones de banda resultantes de las digestiones enzimáticas fue sencillo. No se vio patrones superpuestos ni

inespecificidades. Se evidenció que el diseño de CAPS *in silico* fue preciso. Además, en el diseño se usó únicamente 11 secuencias correspondientes a 11 alelos de la región C2-C3. Es decir que, se tuvo menos información para el diseño de CAPS de C2-C3 comparado con el intrón I. Sin embargo, fue posible la identificación de 15 alelos, 8 predichos y 7 nuevos. Los 3 alelos faltantes que fueron predichos *in silico*, no pudieron ser identificados, debido a problemas con la extracción de banda y reamplificación.

## 9 CONCLUSIONES

- Se logró identificar 15 alelos mediante la secuenciación del gen completo de la S-RNasa, 13 alelos mediante CAPS para el intrón I y 15 alelos mediante CAPS en la región C2-C3.
- Los resultados obtenidos mediante análisis comparativo usando BLAST indican un alto porcentaje de identidad del gen de la S-RNasa del capulí con las secuencias del mismo gen en diferentes especies de género *Prunus*.
- El gen de la S-RNasa de *Prunus serotina* presenta la estructura génica previamente reportada en otras especies del género *Prunus*. Se identificó cinco regiones conservadas (C1-C5), una región hipervariable RHV entre C2 y C3, un intrón en el medio de la región RHV, y un intrón entre el péptido señal y la región C1.
- El uso de primers degenerados diseñados a partir de otras especies del género *Prunus* son útiles para la amplificación de las distintas regiones de *Prunus serotina subsp. capulí*. Sin embargo, no son óptimos para la identificación alélica.
- Se logró diseñar un sistema de marcadores moleculares CAPS exitoso para la identificación alélica del gen de la S-RNasa. Se eligió 3 enzimas para maximizar el número de alelos encontrados en la región del intrón I y en la región C2-C3.

- No es recomendable usar CAPS sobre el Intrón I como marcador de diversidad alélica del gen de la S-RNasa en *P. serotina* debido a que no es posible diferenciar visualmente los alelos en un gel luego de la amplificación de Intrón I. Una de las razones, es el uso de primers degenerados. Se ha visto que el uso de dichos primers, impide la amplificación de todos los alelos existentes en el genotipo. Además, en esta región (a diferencia de C2-C3) es más probable encontrar alelos que tengan el mismo tamaño pero polimorfismos a nivel de secuencia. De esta forma, al aplicar CAPS en el intrón I se podrían observar dos patrones superpuestos que confundan los resultados.
- El diseño de primers específicos para el intrón I en la especie *P. serotina subsp. capuli*, podría ser un método de refinamiento del sistema de marcadores moleculares CAPS en esta región. De esta forma se podría amplificar todos los alelos de un genotipo.
- CAPS para la región C2-C3 es el marcador molecular más óptimo y eficiente para la identificación alélica del gen de la S-RNasa en *P. serotina subsp. capuli*. La razón se debe a que esta región presenta un alto grado de polimorfismo en tamaño y secuencia (en comparación con cualquier otra región del gen). Además, tiene una relación directa con el mecanismo de AI, ya que codifica para los receptores de membrana encargados del reconocimiento de polen-pistilo el momento de la polinización.

## 10 RECOMENDACIONES

- Diseñar primers específicos para amplificar el intrón I en *Prunus serotina*. De forma que se pueda visualizar todos los alelos del gen y se pueda aplicar el sistema CAPS propuesto.

- Refinar la metodología de CAPS para intrón I y para la región C2-C3, para que los patrones de bandas en la experimentación sean más fáciles de detectar.
- Aplicar el sistema de CAPS de la región C2-C3 en la identificación de alelos de muestras aleatorias recogidas en campo, para comprobar la efectividad de mismo.
- Hacer análisis de expresión génica de la S-RNasa en *Prunus serotina* para identificar los niveles de expresión alélica en cruces compatibles, incompatibles y auto-incompatibles.
- Relacionar los alelos del gen de la S-RNasa con los alelos del gen SFB, para comprobar la correspondencia alélica entre estos genes y asegurar al gen de la S-RNasa como gen representativo que permite la genotipificación del Locus-S.

## 11 REFERENCIAS

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Anderson, M., Cornish, E., Mau, S., Williams, E., Hoggart, R., Atkinson, A., . . . Clarke, A. (1986). Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, 38-44.
- Banovic, B., Surbanovski, N., Konstantinovic, M., & Maksimovic, V. (2009). Basic RNases of wild almond (*Prunus webbii*): cloning and characterization of six new SRNase and one “non-S RNase” genes. *Journal of Plant Physiology*, 395–402.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (2018). Gel Imaging Systems: Gel Doc™ XR+ System Brochure. *Bio-Rad*.
- Broothaerts, W., Janssens, G., Proost, P., & Broekaert, W. (1995). cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Molecular Biology*, 499–511.
- Clarke, J., Wu, H., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S., & Bayley, H. (2009). Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology*, 265-270.
- Cruz, F., Juarez, J., Cruz, Y., Busot, G., & Hernandez, A. (2007). *Sistema de reconocimiento célula-célula basados en S-RNasa que promueven la diversidad genética en las plantas*. México D.F: Universidad Autónoma de México.
- Delucchi, G. (2011). Synopsis of the adventitious species of Rosaceae: Subfamilia Prunoideae. *Bonplandia* , 20(1), 73-94.
- Genome Compiler. (2018). *Herramienta de digestión enzimática y simulador de gel de agarosa*.

- Gordillo, M. (2014). *Identificación de alelos S asociados con autoincompatibilidad en individuos de capulí (Prunus serotina subsp. capulí) mediante la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Gordillo, M., Tobar, J., Arahana, V., & De la Torre, M. (2015). Identification of S alleles associated with self-incompatibility in capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) samples by amplification of the Intron I of the S-RNasa gene. *Avances*.
- Guadalupe, J. (2013). *Estudio preliminar de la diversidad genética del capulí en cinco provincias de la región andina del Ecuador*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Guadalupe, J., Gutierrez, B., Intriago, D., Arahana, V., Tobar, J., Torres, A., & Torres, M. (2015). Genetic diversity and distribution patterns of Ecuadorian capulí (*Prunus serotina*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 67-73.
- Igic, B., & Kohn, R. (2001). Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 13167–13171.
- Intriago, D. (2013). *Análisis de la diversidad genética del capulí (Prunus serotina subsp. capulí) en la región interandina del Ecuador mediante marcadores microsatélites*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Ioerger, T., Gohlke, J., Xu, B., & Kao, T.-H. (1991). Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Plant Reproduction*, 81–87.
- Janick, J., & Moore, J. (1975). *Advances in Fruit Breeding*. University Press.
- Kao, T.-h., & Tsukamoto, T. (2004). The Molecular and Genetic Bases of S-RNase-Based Self-Incompatibility. *The Plant Cell*, 16, S72-S83.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870-1874.

- Lee, H., Huang, S., & Kao, T. (1994). S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature*, 560–563.
- Linhart, C., & Shamir, R. (2005). The Degenerate Primer Design Problem: Theory and Applications. *Journal of Computational Biology*.
- Macherey-Nagel. (2017). *PCR clean-up Gel extraction*. Alemania: Macherey-Nagel.
- MacroGen. (2017). *Solución de Problemas*. Obtenido de MacroGen Corea del Sur: <https://dna.macrogen.com/eng/>
- McCubbin, A., & Kao, T.-H. (2000). Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 333–364.
- McVaugh, R. (1951). A revision of the North American black cherries (*Prunus serotina* Ehrh., and relatives). *Brittonia*, 279-315.
- Mille, L. (1942). El Capulí. *FLORA*, 50- 51.
- NCBI. (2016). *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)*. . Obtenido de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechCAPS.shtml>
- Nesom, G. (13 de Febrero de 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*.
- Ortega, E., Sutherland, G., Dicenta, F., & Bošković, T. K. (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*, 188-196.
- Pérez-Zabala, J. (2007). Estudios sobre el género *Prunus* (Rosaceae) en el Neotrópico: novedades taxonómicas y nomenclaturales para Colombia. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 64(2), 177-190.

- Popenoe, W., & Pachano, A. (1922). The Capulín Cherry. *The Journal of Heredity*, 52-62.
- Pringle, R. (01 de Septiembre de 2005). The Origins of the Nile Perch in Lake Victoria. *BioScience*, 55(9), 780-787.
- Promega. (2009). *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System: Quick Protocol*. USA: Promega.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., & Ndjiondjop, M. N. (2006). *An overview of molecular marker methods for plants*. USA: African journal of biotechnology,.
- Shavrukov, Y. N. (2016). *CAPS markers in plant biology*. Russia: Russian Journal of Genetics: Applied Research.
- Sonneveld, T., Tobutt, K., & Robbins, T. (2003). Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics*.
- Sutherland, B., Tobutt, K., & Robbins, T. .. (2004.). Primers amplifying a range of Prunus S alleles. *Plant Breeding*, 582-584.
- Tao, R., & Iezzoni, A. (2010). The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in Prunus exhibits distinct genetic and molecular features. *ELSEVIER*, 423-433.
- Tao, R., Yamane, H., Sassa, H., Mori, H., Gradziel, T., Dandekar, A., & Sugiura, A. (1997). Identification of stilar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiol*, 304–311.
- Tao, R., Yamane, H., Sugiura, A., Murayama, H., Sassa, H., & Mori, H. (1999). Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 224–233.

- ThermoFisher Scientific. (2018). *3730 xl DNA Analyzer*. Obtenido de ThermoFisher Scientific:  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/3730XL?SID=srch-srp-3730XL>
- Treangen, T., & Salzberg, S. (2011). Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 2, 146.
- Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R., Yamane, H., Dandekar, A., Gradziel, T., & Hirano, H. (1998). Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the SRNases in Rosaceae. *Springer*, 261-268.
- Westwood, M. (1993). Temperate-Zone Pomology, physiology and Culture. *Timber Press*.
- Wu, J., Gu, C., Khan, A., Wu, J., Gao, Y., Wang, C., . . . Zhang, S. (2013). Molecular Determinants and Mechanisms of Gametophytic Self-Incompatibility in Fruit Trees of Rosaceae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23-68.
- Yamane, H., & Tao, R. ( 2009). Molecular basis of self-(in)compatibility and current status of S-genotyping in Rosaceous fruit trees . *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 137–157.

## 12 TABLAS

**Tabla 1: Resultados del alineamiento de la secuencia consenso del gen completo de la S-RNasa obtenida a partir de 15 genotipos de**

*P. serotina*.

Alelo	Tamaño	Genotipo o Blast	Query cover	Identidad	Puntaje	Sequence ID	Accesión
I	2144	S14	42%	98%	1521	AM992058	<i>Prunus cerasifera</i> partial s gene for self-incompatibility ribonuclease, exons 1-2, allele 14
		S36	29%	95%	999	AB289889.1	<i>Prunus speciosa</i> S gene for S-RNase, partial cds, allele: S36
		S4	39%	94%	991	DQ983363.1	<i>Prunus tenella</i> S-RNase (S4) gene, partial cds
II	1204	S5	53%	83%	564	EU294326.1	<i>Prunus webbii</i> S5-RNase gene, partial cds
III	1077	S23	75%	89%	997	AB488496.1	<i>Prunus dulcis</i> S gene for S23-RNase, complete cds
IV	1912	S52	28%	85%	553	KF951503.2	<i>Prunus armeniaca</i> S locus S-RNase 52 (S-RNase) gene, complete cds
IV	1992	S52	27%	86%	579	KF951503.2	<i>Prunus armeniaca</i> S locus S-RNase 52 (S-RNase) gene, complete cds
V	1084	S53	82%	94%	1424	FN599509.1	<i>Prunus dulcis</i> partial s-RNase gene for ribonuclease S53, cultivar Holouei, exons 1-3
		S7	78%	97%	1459	DQ983366.1	<i>Prunus tenella</i> S-RNase (S7) gene, partial cds
		S02	66%	91%	957	AB289859.1	<i>Prunus speciosa</i> S gene for S-RNase, partial cds, allele: S02
VIB	1144	S43	68%	95%	1243	AB289894.1	<i>Prunus speciosa</i> S gene for S-RNase, partial cds, allele: S43
		S3	77%	87%	984	AB537563.1	<i>Prunus persica</i> S3-RNase gene for S-ribonuclease 3, complete cds
VII	1976	S3	94%	93%	2810	EU294325.1	<i>Prunus webbii</i> S3-RNase gene, partial cds

VII	1975	S3	94%	93%	2798	EU294325.1	<i>Prunus webbii</i> S3-RNase gene, partial cds
VII	1975	S3	94%	93%	2798	EU294325.1	<i>Prunus webbii</i> S3-RNase gene, partial cds
VIII	1301	S6	89%	96%	1680	HQ622705.1	<i>Prunus dulcis</i> ribonuclease S6 precursor (s-RNase) gene, s-RNase-S6 allele, exons 1 through 3 and partial cds
		S14	95%	68%	1397	JQ627802.1	<i>Prunus virginiana</i> putative self-incompatibility S-RNase (S) gene, S14 allele, partial cds
IX	1390	S6	96%	57%	1312	EF595837.1	<i>Prunus humilis</i> self-incompatibility S6-RNase gene, partial cds
IX	1389	S6	96%	57%	1306	EF595837.1	<i>Prunus humilis</i> self-incompatibility S6-RNase gene, partial cds
XI	1131	S4	88%	94%	1450	AB364465.1	<i>Prunus mume</i> S-RNase gene for S-ribonuclease, partial cds, allele: S4
XII	1156	S43	70%	96%	1269	AB289894.1	<i>Prunus speciosa</i> S gene for S-RNase, partial cds, allele: S43
XIII	1296	S6	89%	96%	1603	HQ622705.1	<i>Prunus dulcis</i> ribonuclease S6 precursor (s-RNase) gene, s-RNase-S6 allele, exons 1 through 3
		S14	70%	95%	1380	JQ627802.1	<i>Prunus virginiana</i> putative self-incompatibility S-RNase (S) gene, S14 allele, partial cds
XIV	1023	S57	74%	99%	1228	AY613344.1	<i>Prunus dulcis</i> cultivar S57 RNase-like gene, partial sequence
XV	2043	S52	31%	97%	1095	KM250381.1	<i>Prunus dulcis</i> cultivar Fascionello S-RNase S52 (S) gene, S52 allele, partial cds
XV	1788	S52	36%	97%	1089	KM250381.1	<i>Prunus dulcis</i> cultivar Fascionello S-RNase S52 (S) gene, S52 allele, partial cds

**Tabla 2: Resumen de los resultados de secuenciación del gen completo de la S-RNasa para 23 amplicaciones del gen derivados de 15 genotipos de *P.serotina***

Nº	Alelo	Muestra	Estado de la secuencia	Full Length (bp)	I (bp) (SPR-C1) (PaConsIFw-EMPC)	Intrón II (bp) (C2-C3)	Estructura del Gen					Observaciones	
							SPR	C1	C2	C3	RC4		C5
1	I	H025	Secuencia Completa	>2350	1299	1080							Coincide con intrón I de H025 Alelo I (Gordillo, 2014)
2	II	Azu015	Solo se lee Fw, Falta Rv	ND	445	ND							Coincide con intrón II con Azu015 Alelo II (Gordillo, 2014)
3	III	Pic002B	Secuencia Completa	1124	410	397							Coincide con intrón I Can011A Alelo III (Gordillo, 2014)
4	IV	Pic019	No hay overlap	>1995	402	ND							Coincide con intrón I de Pic019 Alelo IV, Can011' y Can022A (Gordillo, 2014)
5	IV	Can022A	No hay overlap	>1918	401	ND							Coincide con intrón I de Pic019 Alelo IV, Can011' y Can022A (Gordillo, 2014)
6	V	Car007	Secuencia Completa	1144	385	463							Coincide con intrón I de con Car007 Alelo V (Gordillo, 2014)
7	VIA	Imb011A	Solo secuencia Intrón I (Gordillo 2014)	ND	382	ND							Al amplificar el gen completo de Imb011, no se obtuvo esta banda
17	VIB	Can011	Secuencia Completa	1138	384	482							Nuevo alelo
8	VIB	Car011A	Secuencia Completa	1204	383	481							Coincide con intrón I de Car011A Alelo VIB (Gordillo, 2014)
9	VII	Imb011B	Secuencia Completa	1975	363	1307							Coincide con intrón I de Imb011B Alelo VII (Gordillo, 2014)
10	VII	Car003A1	Secuencia Completa	1974	363	1306							Coincide con intrón I de Can009A Alelo VII, Imb011B Alelo VII (Gordillo, 2014)
11	VII	Can009A	Secuencia Completa	2005	363	1305							Coincide con intrón I de Can009A Alelo VII, Imb011B Alelo VII (Gordillo, 2014)
12	VIII	Pic023A1	Secuencia Completa	1396	358	704							Coincide con intrón I de H014E Alelo VIII (Gordillo, 2014)
13	IX	Can022B	Secuencia Completa	1461	352	801							Coincide con intrón I de Can009B Alelo IX, Can022B Alelo IX (Gordillo, 2014)
14	IX	Can024B	Secuencia Completa	1389	352	801							Coincide con intrón I de Can009B Alelo IX, Can022B Alelo IX (Gordillo, 2014)
15	X	Car011B	Solo secuencia Intrón I (Gordillo 2014)	ND	321	ND							Al amplificar el gen completo de Car011, no se obtuvo esta banda
16	XI	Car005	Secuencia Completa	1151	393	494							Nuevo alelo
18	XII	Car003B	Secuencia Completa	1315	358	705							Nuevo alelo
19	XIII	Pic023B	Secuencia Completa	1023	193	589							Nuevo alelo
20	XIII	Car003A2	Secuencia Completa	1023	193	589							Nuevo alelo
21	XIV	Car012	Secuencia Completa	>2045	>1230	605							Nuevo alelo
22	XIV	Pic023A2	Secuencia Completa	>2044	>1230	605							Nuevo alelo
23		Pic002A	No se pudo leer	ND	ND	ND							No hubo lectura

Resumen de resultados de secuenciamiento de las 23 muestras enviadas a secuenciar. \*La tabla muestra en las columnas de izquierda a derecha: número de muestra, alelo al que corresponde la secuencia según los alineamientos realizados en MEGA, el nombre de la muestra, el estado de la secuencia, tamaño completo de la secuencia consenso obtenida, tamaño del intrón I obtenido, tamaño del intrón II obtenido, columna presencia o ausencia de las regiones del gen de la S-RNasa de cada una de las secuencias obtenidas, observaciones. \*\*La clave de colores significa que: amarillo – la región analizada está presente en la secuencia, rojo – la región está ausente en la secuencia analizada, naranja- se encuentran anomalías en la secuencia, los primeros no se pegan correctamente.

**Tabla 3: Patrones de bandas a partir de digestiones enzimáticas con RsaI (Afa I), MboI y XspI (HinfI) para intrón I del gen de la S-RNasa.**

AfaI	B_01	B_02	PAT
	140	250	A
	160	190	B
	195		C
	220-260		D
	305		E
	350-380		F
	400-420		G
	450		H
	600	680	I
	1180	180	J

MboI	B_01	B_02	B_03	PAT
	110	180		A
	110			B
	120-160	170-200		C
	250	310	510	D
	290	120		E
	300-310			F
	360-380			G
	560	390	180	H

XspI	Alelo	B_01	B_02	B_03	B_04	PAT
	15	100	160	390	500	A
	9	120	200			B
	4	150	210			C
	10	150	190			D
	6B	180	210			E
	12	190-200				F
	7	350				G
	5	390-400				H
	2	450				I
	1	1200				J

**Tabla 4: Patrones de bandas a partir de digestiones enzimáticas con RsaI (Afa I), MboI y FspBI para la región C2-C3 del gen de la S-RNasa.**

<b>RsaI</b>	<b>B_1</b>	<b>B_2</b>	<b>B_3</b>	<b>B_4</b>	<b>B_5</b>		<b>MboI</b>	<b>B_1</b>	<b>B_2</b>	<b>B_3</b>	<b>B_4</b>	<b>B_5</b>	<b>B_6</b>		<b>HinfI</b>	<b>B_1</b>	<b>B_2</b>	<b>B_3</b>
A	178	116	95	8			A	205	181	143	76				A	217	201	45
B	199	107	95	54	8		B	298	291						B	282	212	
C	233	183	45	13	8		C	306	91						K	343	270	
D	247	233	79	46			D	372	91						C	397		
E	352	134	103				E	403	76	15					D	411	380	10
F	386	220	90	8			F	482							E	433	271	
G	391	103					G	497	296	249	103	91	69		F	482		
H	453	245	95	8			K	538	75						G	569	36	
I	515	424	358	8			H	542	447	76	15				H	577	503	
J	879	103	98				I	629	76						I	589		
							J	710	90						J	621	384	300

**Tabla 5: Clave de identificación de patrones de alelos putativos para el Intrón I de la S-RNasa.**

Alelo	Afa I	MboI	Xsp I
1	I	H	J
2	H	E	I
3	G	C	F
4	G	C	C
5	A	G	H
6A	F	F	G
6B	D	C	G
7	D	C	B
8	E	A	D
9	D	F	H
10	B	F	F
11	D	B	G
12	C	B	F
13	J	D	A
14	F	G	H
15	B	G	E

**Tabla 6: Clave de identificación de patrones de alelos putativos en la región C2-C3 de la S-RNasa.**

Alelo	RsaI	MboI	FspBI
1	A	F	I
3	B	C	G
5	B	D	A
7	H	A	E
8	E	H	C
9	G	I	F
11	I	E	B
12	E	H	D
13	C	C	L
14	F	B	K
6B	D	G	J

**Tabla 7: Identificación de alelos del intrón I mediante CAPS**

#	Muestra	Alelo secuencia	Alelo identificado	Observaciones
1	H025	I	I	
2	Azu015	II	II	
3	Pic002	III	III	
4	Pic019	IV	IV	
5	Car007	V	V	
6	Imb011	VIA/VII	VIA/VII	
7	Car011	X/VIB	X/VIB	Difícil de identificar los dos alelos
8	Can009	VII	VII	Presencia de más bandas
9	H14	VII/VIII	VII/VIII	
10	Can022	IV/IX	IV/IX	Difícil de identificar los dos alelos
11	Car005	XI	XI	
12	Can011	VIB		
13	Car003	VII/XIII/XII		
14	Pic023	VIII/XIII/XIV	VIA	No coincide con lo predicho
15	Car012	XIV	XIV	

**Tabla 8: Identificación de alelos de la región C2-C3 I mediante CAPS**

<b>Muestra</b>	<b>Alelo identificado mediante CAPS</b>	<b>Observaciones</b>
H025B	XVI	Banda no esperada. Nuevo patrón.
Car007	V	Dos enzimas se parecen al 5. Enzima 3 no coincide
Can011A		
Can011B	XIII	Banda no esperada. Nuevo patrón.
H14A		
H14B	XVII	No se tenía información de la secuencia
Pic023A		No se hizo la restricción.
Pic023B	VIII	
Car003A	VII	
Car003B	VII	Banda no esperada.
Car005A	XVIII	Banda no esperada. Nuevo patrón.
Car005B	XI	
Can022A		No se hizo la restricción.
Can022B	IX	
Car012A	XV	
Car012B	XIX	Banda no esperada. Nuevo patrón.
Imb011A	VII	
Imb011B	VIB	
Pic019A	IV	No se tenía información de la secuencia. Nuevo patrón.
Pic019B	XX	Banda no esperada. Nuevo patrón.
Azu015A	II	No se tenía información de la secuencia. Nuevo patrón.
Azu015B	XXI	Banda no esperada. Nuevo patrón.
Pic002A	XXI	No se tenía información de la secuencia. Nuevo patrón
Pic002B		Banda no esperada. No se hizo la restricción.
Pic014A	XXII	No se tenía información de la secuencia. Nuevo patrón.
Pic014B	XXII	No se tenía información de la secuencia. Nuevo patrón.

**Tabla 9: Patrones de bandas de amplificación para intrón I, región C2-C3 y gen completo de la S-RNasa.**

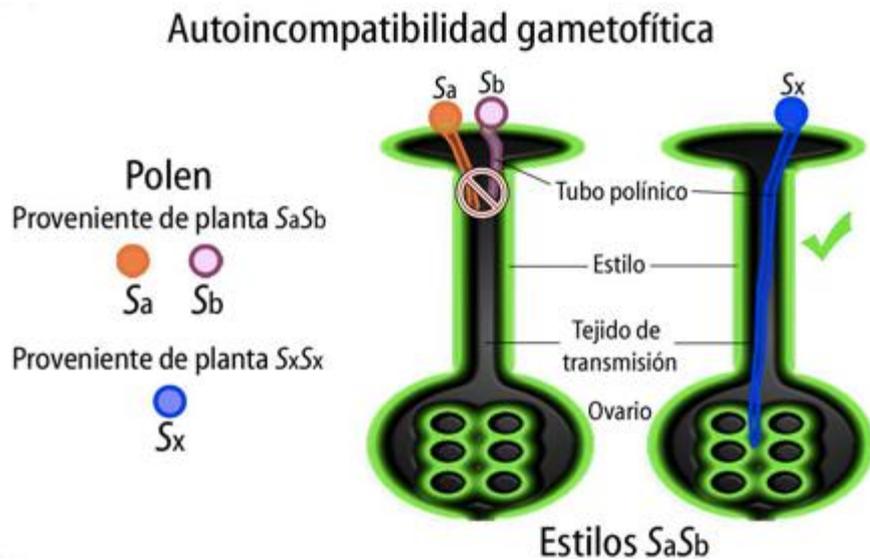
<b>Muestra</b>	<b>Intrón I</b>	<b>C2-C3</b>	<b>Gen completo</b>
Azu015	1	2	1
Can009	1	2	2
Can011	2	2	1
Can022	1	2	2
Can024	1	1	2
Car003	2	2	2
Car005	2	2	1
Car007	1	2	1
Car010	1		1
Car011	1	1	1
Car012	1	2	1
H025	2	2	1
H14	1	2	2
Imb011	2	2	1
Pic002	1	2	2
Pic023	1	2	2
Pic014	1	2	2
Pic019	1	2	1

## 13 FIGURAS



**Figura 1: Distribución geográfica de *P. serotina subsp. capuli* en el Ecuador**

Se evidencia las 8 provincias de donde se recolectó las muestras (Intriago, 2013). Posteriormente se seleccionó para ser usadas en esta investigación. Todas las provincias señaladas, excepto Tungurahua, fueron incluidas en el estudio.



**Figura 2 : Modelo de auto-incompatibilidad gametofítica en *Prunus***

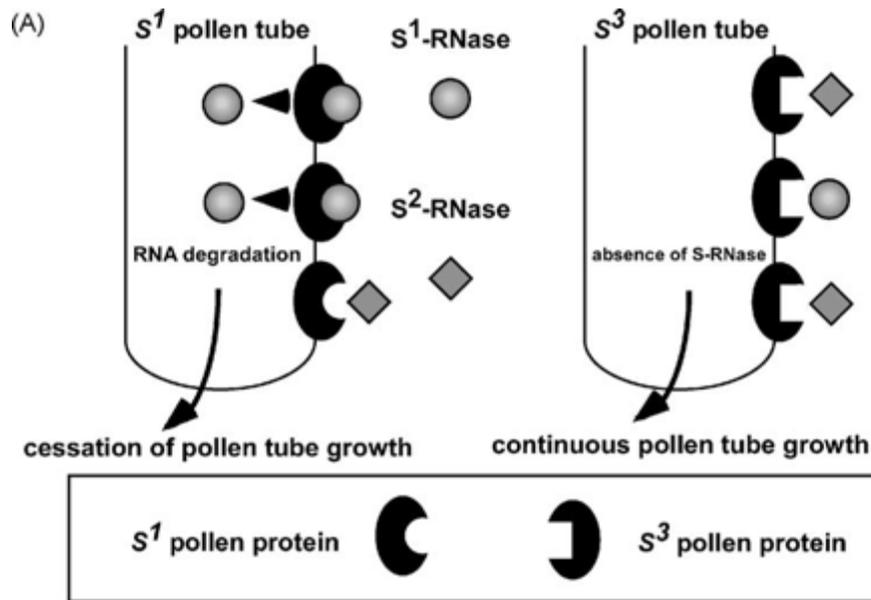
Se muestra una planta diploide que presenta un genotipo SaSb, que no desarrollará el tubo polínico en caso de reconocer polen del mismo genotipo Sa o Sb. Sin embargo, si el polen presenta un genotipo Sx, el cual evidentemente es diferente al de la planta, el estilo aceptará el polen y se dará el crecimiento del tubo polínico hasta alcanzar al ovario y producirse la fecundación (Cruz et al., 2007)



**Figura 3: Estructura del Locus-S: genes S-RNasa y SFB en especies del género *Prunus***

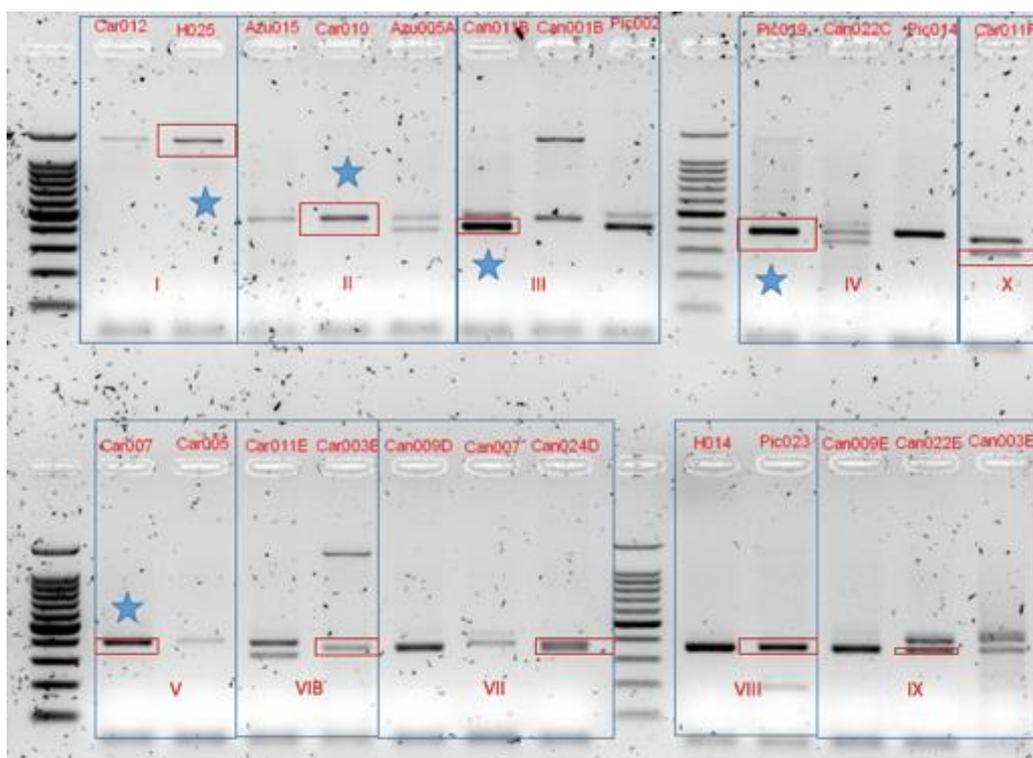
Este locus está conformados por dos genes, el primero es el gen de la S-RNasa que se transcribe en sentido 5' a 3'; el segundo gen es el SFB, cuya transcripción se da en sentido 3' a 5'. El gen de la S-RNasa tiene un intrón localizado entre la región del péptido señal y la región conservada C1. El segundo intrón de este gen está en la región hipervariable RHV, entre las regiones conservadas C2 y C3. Por otro lado, el gen SFB, cuenta con un solo intrón, una caja F y 4 regiones variables (Wu et al., 2013).





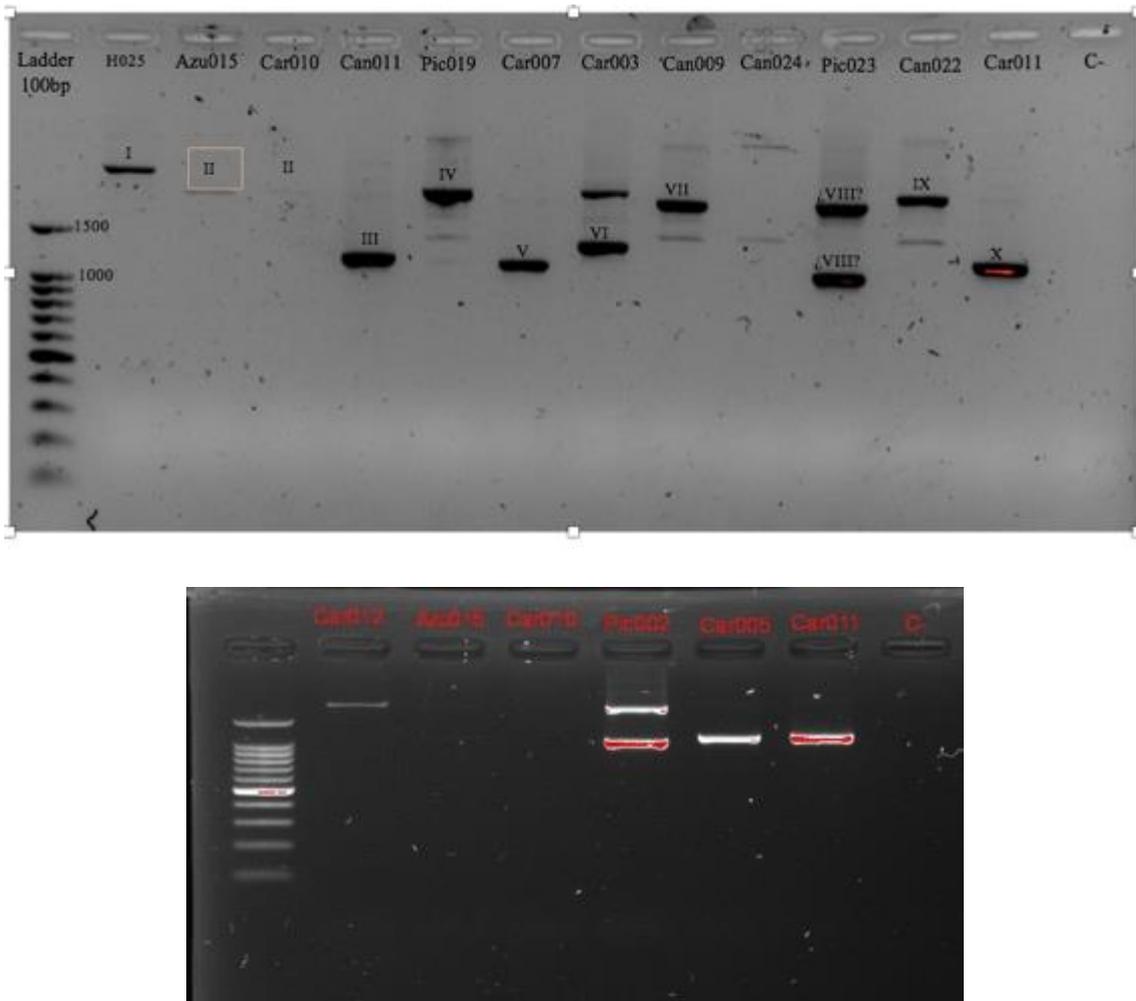
**Figura 5: Modelo de inhibición del crecimiento de tubo polínico en la reacción molecular de la auto-incompatibilidad gametofítica**

Se describe el crecimiento que se daría en un tubo polínico con genotipos de polen  $S^1$  y  $S^3$  en caso de interactuar con un pistilo de genotipo  $S^1S^2$ . Se asume que el producto de polen  $S$  es un receptor de membrana que se une al correspondiente producto de la  $S$ -RNasa con el mismo haplotipo. En caso de que se de la unión, el crecimiento del tubo polínico se trunca y en caso de que la unión no se haga, el tubo polínico crece (Tao & Iezzoni, 2010).



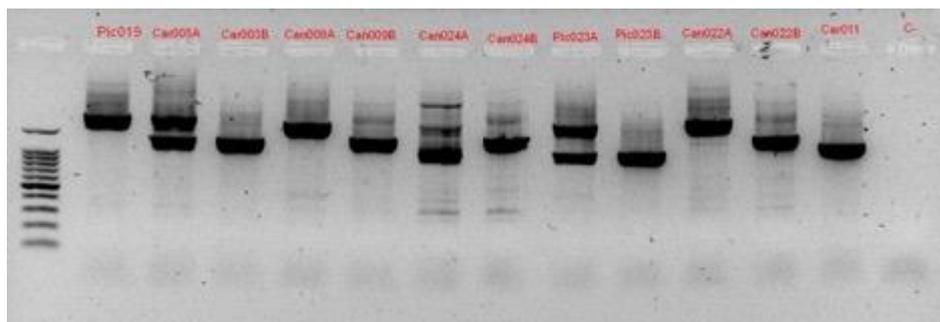
**Figura 6: Amplificación del intrón I para selección de muestras**

Se amplificó, por PCR convencional, el intrón I del gen de la S-RNasa de muestras cuyo genotipo fue identificado por Gordillo (2014). Se ve amplificación de 24 muestras representando a 11 alelos.



**Figura 7: Amplificación del gen completo de la S-RNasa**

Se muestran 15 de las 17 muestras de *P. serotina* amplificadas por PCR convencional. Se ve variedad de genotipos homocigotos y heterocigotos. Algunas muestras presentan bandas tenues (e.g. Azu015).



**Figura 8: Re-amplificación del gen de la S-RNasa a partir de bandas extraídas de la amplificación del gen completo**

Se muestra la reamplificación de los productos de extracción de banda a partir de la amplificación del gen completo de la S-RNasa. Se evidencia que la reamplificación no fue exitosa para Car003A ni Pic023A, ya que se ven dos bandas claras en lugar de una. Lo que indica que hubo contaminación el momento de la extracción.



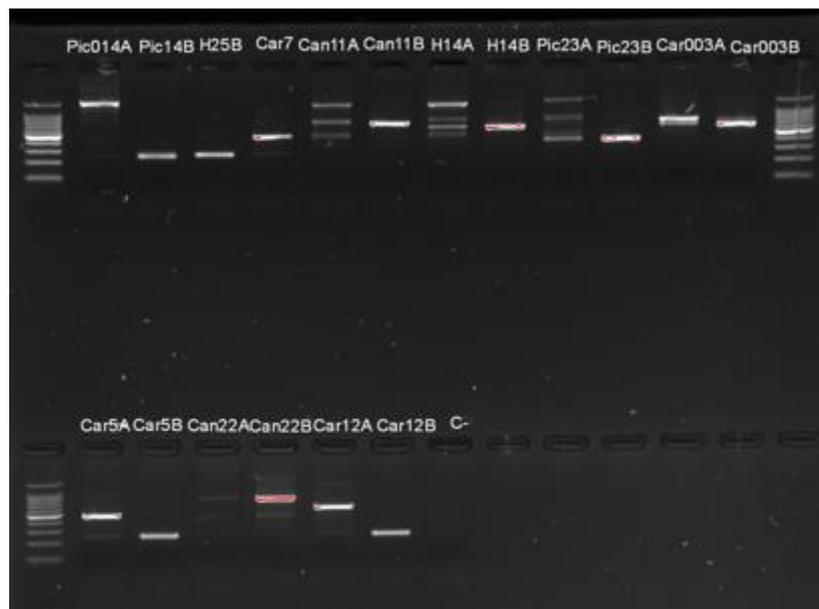
**Figura 9: Amplificación del intrón I del gen de la S-RNasa para validación de CAPS**

Se amplificó el intrón I de 17 genotipos, de los cuales se eligió 11 homocigotos y 4 heterocigotos para la validación de CAPS.



**Figura 10: Amplificación de la región C2-C3 del gen de la S-RNasa para validación de CAPS**

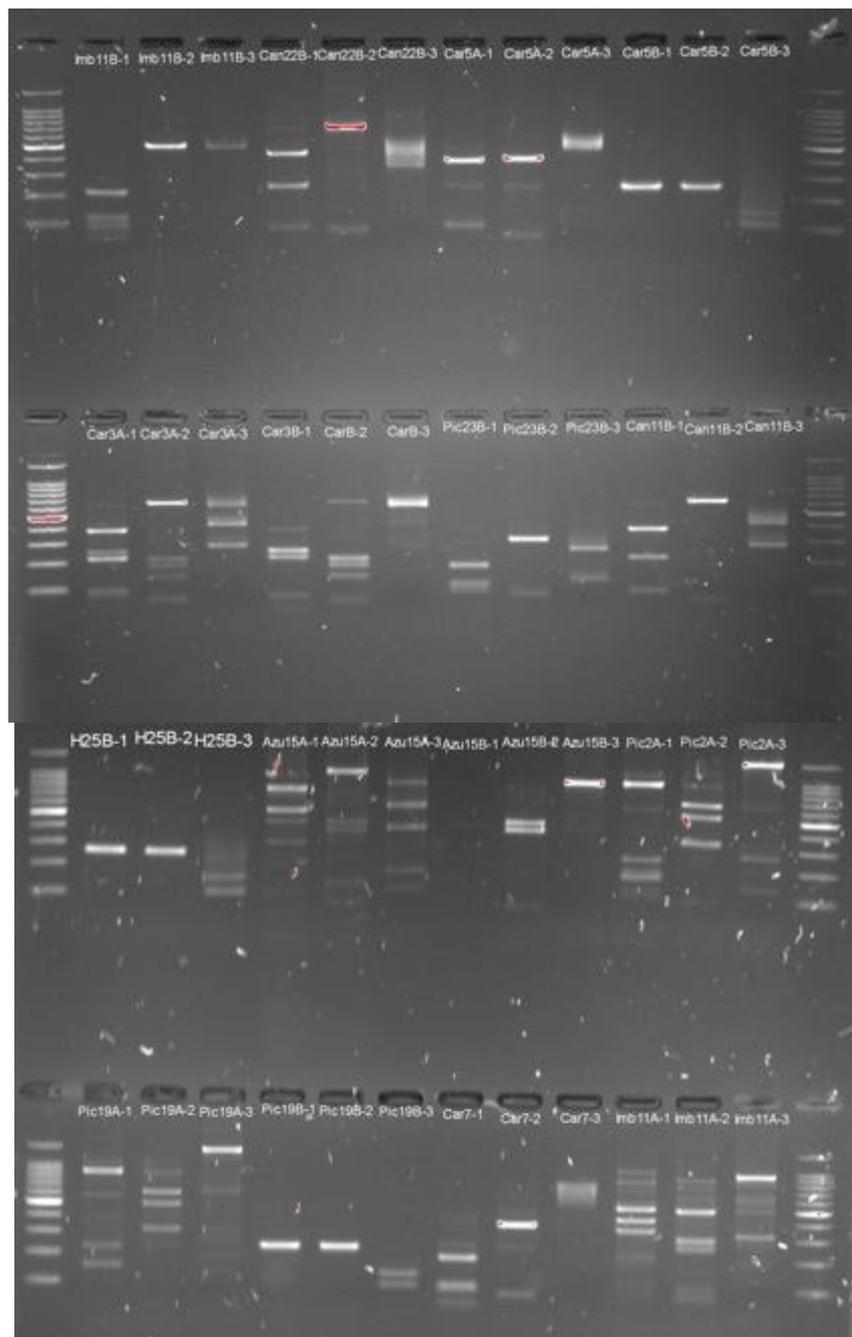
Se presenta la amplificación de la región de C2-C3 de 16 genotipos, de los cuales se eligió 15 para la validación del sistema CAPS en esta región.



**Figura 11: Reamplificación de productos de extracción de bandas a partir de la amplificación de C2-C3**

Se evidencia que la re-amplificación no fue exitosa para 4 de los productos de extracción de banda, ya que solo se debería divisar una sola banda.





**Figura 13: CAPS para la región C2-C3**

Las imágenes muestran las digestiones enzimáticas realizadas con cada uno de los productos de re-amplificación de la región C2-C3. El número (1), significa que se usó la enzima Rsa I, el número (2) MboI y el número (3) FspBI.

# 14 ANEXOS

## Anexo 1: Secuencias del gen completo de la S-RNasa

>I

GGTGGGTGGCATTACAATCTTTGCTCTTTATAGTATGCATATAAATTTGCATTGTATTTTCTACTTTTATTTTATGTTTGGAGA  
AATGCTGTGTGCGCACAACTTTCTTTGGCTGAGTAACCTACTTGGGAATTACTTTTCTGCATATTTTATTCGTTTCTCTGATA  
GTTGTTGCAATAAGTGCAGCGGAATTATTATGTTATTGGAACATCAAATTCCTTATTAAAGGTGTTTAGATTTTCTGTCCATGC  
ATATGTGTTCCCTTTATACATATTTTAATTTGTTAACACGTGTCTACTTAACTTTACTTTAATAGAAAACTTTTAATAA  
AAATAAAATAATAAAAATGTATCTAATTTCTTATCAATACACGTCTCCATCGTCTTTTATCTCCTGAAGAAGCCACGCAGAA  
TTCTCCGAAGGAACCAGCATGGAGTTTCGGTGCATTCCAGAACTCTCAGAAGGAACCAGCATGGAGAAGGCCAAGGATAAAA  
CTGAACAGCTTAAAAGTTGGAAGCTTGTGGATCTCAAAGAAGGCCAAGGAAGAGCTCTAACATCTCCGACGACCTCACTG  
TAAGTACAGATTTGTGCCCTTTTGGCTTTCCCTTTGTGTAATGTAGCTTGGATGAAGTTTCCAGTTCATGATTTTCTGTCTAA  
TTTTGCTTTCTCGTGTGAATFACGGGTGGATGAGATCTGATCTGTTAGGTATATGATTTAGGATTTTTTTTACGCTTTCCAA  
TTCCCTGGTTCATTCATGGTGGTTTTTCACTCTGGAACGATCACTGGTTAAAGGAAAAACAAACACGGGGTAAACAAAATTG  
AGAATTTATGCAAGTTTTTGTGCAATCTTAAGCAGTATGTTTGTGTTGCAGACTTCTTAAATATGTTGAGGAGAAGGCCAA  
AATGGGTTTTCAACAACTAAAAGGCGTGGAAACAATATTCTGGTGGCTTCTCAGGAGATGAAAAACAGATGGCTGCTTCTT  
CAGCAGATGAAAACAGATGGAGACGTGTATTGATAAGAAATTAGACATATTTATTGTTTTATTTTATTAAGAGATAAAAA  
AGTTAACTGTGTTAAAGTAAAGTTAAATGAGATGACAGTATCAAAAAATAAAATATGAACAAGAGTAATACATTAACAAAC  
ATGAATAGCAAGTTTGTGACCTTAACTCTCAACAATAATTTGCAAGGATCTTATGTCTATTTTCAATTTTGGCAACAATGGCCA  
CCGACCAACTGCAGAGTTCGCAATTAAGCGACCTTGTCTCAACCCCGGCCATTACAATATTTACCATCCATGGCCTGTGGCC  
AAGTAATTTACAAACCCAAACGCGGCCAGTAATTTGCAATGGTTCGCAATTTGACGCCAGGAAAGTGGTATGTATGAAGATA  
TATAATAAATGGTCACTTCTTTTCTTTTCTTACTACTTAAAGCATTGGTTTTTAGAAAAATAGATTGTCATGTGAA  
GATAATATACTTTTTTTCAATAAATCTGGATTTAAAATAAAGGGAAGTATTTTCACTCTCTTCTATCTACACTCC  
CTTTGTTAGAAATTGTATATTCAGGGGAGTGAGAAAATCAACACTCTAAAATAAAATTTTGATGTTGGTATAAGACAAGAA  
TGGAATAATTTCAAAATACTAGAAAATGTCATTAGTTAATGATAATTTAAGAATTAATAAATTAATAAATGAGAAAAA  
TATAATAAATGTATATTTTTTTGAGAGATCCATTTTATCTTTTTTAAAGTCTATAATAAAATTTAAAAACAAAACAAAAAGAGA  
ATCAGTTGGTGAACATGGGGCTAGTATATATAGGTAGTGGCATCAAACTCTGAAACAATGAAAATCCTAAAAAAATCA  
TCTGATTAACAAAGTGCCTAAGATACAATGATTTTATAAATGAGGTGAAAAGGAAGTTTATCTTTATAAATTAATAAAACA  
AACAAACCCACTTACCCCTCTTTATCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTT  
AAATTTATTTGAAACAAGAGGCCAGTATAAATTAATAACAAAATTAATAATACATAGTATTTTGTATTTGCTATATATTCA  
AGATATTGTATGTGAATACAAGCATCAAATCATCAATTTAGTACTCAGAATTAATGGAAAAAAATCATATACAAAAATGAA  
AATCTAATTTGCTCATAAAATTTTATTTTCTCAAAAATATGGCTGGGACGTCTCAGTACCCCGATTGAGATCCAGACTGAAT  
AGATCTTGGCCGGACGTGGAAAAGTGGCAATGATACAAAATTTTGGGAAAGCGAATGGAATAAACATGGCACATGTTCCCAAC  
GGATACTTAACCAATACCAATACTTCGAGCGATCCACGAAATGTGGAGATCGTACAATATTACAGAGATCTT

>II (Secuencia incompleta)

CCTTGTTCTGGTTTTGCTTTCTTTGTTATGTTATGAGCAGTGGTGGGTTGCATTACAATATCTTTTGTCTTTTATATGATAG  
AATTGCGTTTTTCTACTTGTATTTTTGTTCCGAGAACTATTGTGTGTTCGATGATATATCATGCGCATGCGGTGATTG  
AATTCACCCACATATTTTCATTTAATCTCTGCACAACCTTCTTTGGATGAGTAAGTATTTGGGGATTGTTTTCAGCATGTCTCT  
TTTCAAATTTGCAATAAATGCATCCCTTTTGTATTATTAGTATCAGTGTGCAAAAGAGAGCAGCCTAATTCATCTGGAAGACT  
AAAATATGTTCTTTATTGTTCAAATCCTTATTAAATGATACCATTAACTCTCAACAATAATTTGGCAGGATCATATGTCTAT  
TTTTCAATTTGTGCAACAAATGGCCCGGACCAACTGCAGAGTTCGAGTAAACCTTGTCTCCAGTCCCGGCAAAATACAAATGTT  
CACCATCCATGGCCTATGGCCAAGTAAATTTCAAAACCAACGATGCCAGTAAATGCAGGGGGTGGCATTAAACGGAAGT  
AACCTGGTATGTATTTTCAATTTTTTCTTTTACTCTTTTACGATACGTCATAAATGAATCTGAATTTTGGTTTTAGATAAAA  
AAATTTCAATGTTGGTCTTTGCTAGGCAGTATATTTATAAATGAGAAATTTACATAAATACCACATGAATTTATACGAAT  
GTGGCCGACTTACTACTGAATTTTTATTTTTATTTTAAACCACTAACTTTTAAAGTGTTCATTTCACTCAACTATGTATAACT  
CTGTTAAAGTTATGTTAAAGTCAAAATTTAAGGGTGTTTTCACTCAATTTACTACATTTAAAATTTTAAACAAAACAAAAAAG  
AAAGCTAACCTAATTTATGGGCACAACCTCCCTACCCTTTTCAAACATCAATTTCTTCCCAAACTAACCTAATGTCAAAT  
GAAATGGTCTATTATTGGAATCAGTTGTCTGTTCCAGCCACTGTTGGCTTGTACTATTTACAGCAGCAATTTCTCTCTCTCC  
AATCCAGAGAGATTTCAAAAATACATCAAGGCTGAGAATTTGGAAAGAATATGGATTTGTAACCTCCATCCATCCCTCCGGC  
TATTATACATACACACCTCTTATTAGA

>III (1077)

CCTTGTTCTGGTTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTTCATTATGAGCACCAGTGGGTTGCATTAATAACAATCTTTGCTCTTTTTTAA  
TTAAAAACAATCTTTTGTCTTTAATATCTTATAAATATGCATTGTATGTTTCTACATCTATTTTATGTTGGAGAAGTATTGTG  
TGTTCCGGTATATATATCACGTAACGGAGGACTTGTATCTAGCGCACAACTTCTTTGGCTGAGTAACTACTTGGGAATTAATTT  
TCTGCATGCTTTCTTCCGGTACTCTGATTTGTTGCAATAAGTGCAGCGGAAATATGTTCTTTATACATCCAATCCTTATTT  
AAGCTACCAATAACCGTCTCAACAATAATTTTCCGAGGATCTTATGTCTATTTTCAATTTGTCACAACAATGGCCACCGACCAACT  
GCAGAGTTCGAAGAACCTTGTCTAATCCCCGGCCATTACAATTTTACCATCCATGGCCTATGGCCAAGCAATTTATCA  
AACCCAAACGAGGCCAGTAATTTGCACTGGGTGCAATTTGATGGACGGAAATGGTATGTGTTGTTCTTTTCTTTTCTTTTCT  
TACGCTTTAGTGTAAATAAAAAGGCATATATATTATTGTAATTTGCGTATATATTCAAGACATCGTAAATGAAAGGTT  
CAAAATTAGAATCAATTTAATAGTCAGGTTTAAATGAAAAAACAATAAATCTAACTATTCCTAGGTTTTACTTTTCTCAAAA  
TGCTTGGATGTCTAGTACCCTCATATGAGATCCAAACTGAAGATATCTTGGCCGACGTGGAAAAGTGGCAATGATACAAAAG  
TTTTGGGAAAGCGAATGGAACAACAATGGTACATGTTCCGTAGAGCGACTTAAACCAATGCAATACTTCGAGCGATCTCAG  
ACATGTTGGTGTGCGACAATGTTACAGAGACTTGAACACGCTTCAATCGTACCACATCCGACACAAACTTGGAAAGTACTCG  
GACATAGAATCACCAATTAAGAGCAACTAAAAGAACACCCGCTCTTCTGCAAAACGTGATCTTAGCACAGA

>IV (Secuencia incompleta)

CCTTGTTCTGGTTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTTCATTACGAGCACTGGTGTGGTGGGTTGCATTCCAATTTTTTGTCTTTTATAT  
CCATGCATATAAATTTGCGTTGCATTTTCTACTTGTATTTTATGTTGGAGATATATTGTGTGTGTTTCGATGAAACCGGAGGAC  
TGACTAGCGCACAACTTTTCATTTGGATGAGTAACTCTTTGGGAATTAATTTCTGCTTGGTTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTT  
TTGCAATAAAGTGCAGTATTTTCTATCATTTGGAAGTTAAAGTTATGTTATTATACATCAAAATCTTTTAAAGATTATATACCA  
TTAACCTCTCAACAATAAATTTGGCAGGATCTTATGTCTATTTTCAATTTGTGCAACAATGGCCACCGATCACCTGCAGATTTAG  
TCGACAGCTTCTCAAAACACCGCTCCATTAACAATTTTCAATTTGCAACAATGGCCACCGATCACCTGCAGATTTAG  
TGCCAGTAAATGGTTCGCTTGGGTCGCAATTTAAGCAATTTGATGTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTT  
ATTCTTCAAAATTTTAAACCGTAATTTTTCTTTTATTACAAGCGATATAATCTAATTTACAGAGGAGGGGATTCTTACACACA

CATACAATTACAATGCCTTAGGAATTTGAAAATGTGACCTCGGGTCTACAAATTAAGGCCCTTTCCATTGGGTTAAACCTTG  
 TTGGCTTTTTTTTTT-----  
 TTATGTATAAAAAATACAAAAATCGTAGGGAATGAAGGATTCGAACAAAAGAATCTCAAATTCAGTAGCCACTTTATAATAA  
 ACCTTGATCGGTCCCATTTTTAATACTATATACTATAATTTATATCACACGTA AAAAATTC AATGTCACATGTCACATGAGTA  
 AATGAAGTAAACGGTTTAAATTTCTTATTATTTCTTTAAACCAAAAAATAAACCAATTCACCTTTCTGTCTATTTCCAGTTCC  
 TCCCOCGGAGTCAATTTCTGTGCCATTTCTATTACTTAATTTAACTTTTTGAAAACATGTCCTTTCTATTATCCCAAGTTAAACA  
 ATTTTAACTTTTAAATTAATAAAAAATACTAAAAAACTAATAATTGAAGGAAAAAAAATACCTTTAATTTACCAGATTAA  
 CACTGTTAAGTATTAACCTGGGGTTAAGTGAAAGAACATGTCAAAAAATAGATAAGTAAACAGGGTGGACAAGAAAAATGGT  
 AACATGAAAATGAACTACCACCCCTGTCAGCGTTCTCTTATCCATGGGTTCCACCCGGGACTAAACTTTGGATTTATTC  
 CAGTATTTCTGGTGGCCACGTAGAAAAACAACGATTCCTCAATTAAGCCTGTACTGGTATAGGCTGATTTGTATCAGCAGTGAC  
 CCTGTGGGTTCTGAGAAATCAATATATGATCATCTAATAAAGGATGTTGTATAATAATGGACCGCATATCTAATTTAAAAG  
 ACCTACCATTTTGTATTTGAAGTATATATCAAAAAATGTACCAATATTAATAATTC AATTTAATAATCAGATTTAATAAAAAAG  
 AAAATCTTATTCAATAACGAAAAATTTACCTATACCTTATGTAATTTGGTGAATGTAATTAATTTCTGAAAAATATATATTGCT  
 TGGATGTTTACGCTCTCAATTTGCGAACCAAACTGAAGATATCTTGGCCGACGTGGAAAGCGGCAATGATACCAGATTTTG  
 GGAAAGCGAATGGAACAAACATGGTACATGCTCCCAACAGAGACTCAACCAATGCAATACTTCGAGCGATCCTACGCAATG  
 TGAAGTCGTACAATATTACAGAAATCTTAAAAACGCTTCAATCGTACCAAGTACGACACAAACATGGACCTACTCGGACA  
 TAGTATCAGCCATTA AAAACAGCAACTCAAAGAACCACCGCTTCGTGCAGAAC

>V (1084)

CCTTGTTCTGGTTTTGCTTTCTTCTTTTGTACGCTATGAGCAGTGGTGGGTTGCATTACAATCTTTTGTCTTTTATATCTTATA  
 CATGTGCATATAATCAGCATTGCGTTTTTCTACTTTTATTTTTTGTTCATAGAAACTATTGTGTGTTGGATGATATATATCACAT  
 GACATCGCGGTGATTGAATTCACCCACATATTTTGCATTAAATCTAACGCACAACCTTTCTTTGGATGAGAAGTACTTGGTGATT  
 GTTTTCTGCATGCTCTTTTATTTTATTTTATTTTATTTCTGATAAGTGTGCAATAAGTGCAGTCTATTATCACAATAAT  
 TTTGGCAGGAACCTATGACTATTTTCAATTTGTCGAACAATGGCCACTGACCAACTGCAGAGTTCCGATCAAGAAACCTTGGT  
 CCAACCCCGGCCATTACAATATTTACCATCCATGGCCTATGGCAAGTAATTTTCAAACCAATGAAGCCAGTAATTGC  
 AATGGGACGAAATTTGACGACAGGAAAGTGGTATGTAATTTTTTTTACCTACTCTTTAACATTTAGAAAAATGATTGTC  
 ATCTGAAGACGTATACTAAAACATATTTGTAAGTAAATTTATATCTGTATGTAATTCATGTAATTCATGTAATTCATGTAATG  
 ATCTGCCATCTAATTAAGGACCTTCCATTTTGTACTTAAATGAATCAAAAATCAAAAATCAATTAATACTCAGATTTAATG  
 GGGAAAAACCAATCTAATTATTTCTCAAATATGTATATATTGCTTGGATGTCACAGTACCCTCATATGCGATCCAACTGA  
 AGATATCTTGGCCGACGTGGAAAGTGGCAATGATACAAATTTTGGGAACGCGAATGGAACAAGCATGGTACGTGTTCCGA  
 ACGGACACTTAACCAATTTCCAATCTTCGAGCGATCCTACGAAATGTGGAGATCGCAACAATATTACAGAGATCCTTAAAAAC  
 GCTCAATCGTACCACATCCGACACAAAACATGGACCTACTCCGACATCTATCACCCATTAAGCAGCAACTAAAAGAAC

>VI (1144)

CCTTGTTCTGGTTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTCATTATGAGCGTGGTGTGGTGGGTTGCTTTACAATCTTTTACTCTTTATATC  
 CTATATGCATAATGCATTTTCTACTTGTATTTTTTGTGTTAGAAACTATTGTGTGTTGATGATATAACACATGACATGGC  
 GTTTTAAATCCAATCCACCCACATATTTTCAATTAATCTAGCGTACAACCTTTCTTTGGATGAGTAAGTATTTGGGGATTTT  
 CTGCATGTTCTTTTATTTTTCATCACTTTTCTTTATTTCTGATAAATTTGTTGCAATAAGTGCAGTCTGTTTCATCAACATTTT  
 GGCAGGATCTTATGACTATTTTCAATTTGTGCAACAATGGCCACCGACCCTGCAGAGTTCGGAATAAACCTTGTCTCAAAC  
 CCCGCCGTTACAAATTTTACGATCCATGGCCTATGGCAAGTAATTTTCAAACCAACGATGCCAGTAATTTGAACATTTGGG  
 TCGCAATTTGAGGGAGGAAAGTGGTATGTAATTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTT  
 AAATAGATTAGATTGTTCTCATGTGCAATATAGTTTTTAAATAAACCTTTTCAATACTTCTTATTTACTTACTTTTCAAAT  
 ATTTACCTAATGAAAGTACCAAAATCAAAATCAATACTCAGATTTAATGAGAAAAACAATCCTATATATTCAAGAATG  
 AAAATCTATCTTAAAGTTTGTTTTTTCTTTCTCAAATATGTCTATATTGCGTGGATGTTCTCAGTCCCCTCGATTGCAATC  
 CAAGCTGAAGATCTTGGCCCAACGTGGAAAGTACCAATGATACAAAATTTGGGAAGGCGAATGGAACAACCAATGTTGATC  
 ATGTTCCGAACAGACACTTAACCAATACAATACTTCGAGCGATCACACGACATGTGGATGTCGCATAATATGACAAAGATC  
 TTTCAAACGCTTCAATCGTACCACATCCGACACAAAACATGGAAATACAGGGACATAGTATCATCCATTAAAGCAGTAACTC  
 AAACAACACCCCTCCCTTCGTTGCAAACCTGATTCAGCACAGCCTAAGTAGCCAT

> VII (1976)

CCTTGTTCTGGTTTTGCTTTCTTCTTGTGTTTCATTATGAGCACTGGTGTGGTGGGTTGCATTACAATCTTTTGTCTTTTATAT  
 CCTATATGCATAAATAGCATTGCATTTTCTAATTTGTATTTTGTGTTGAGAGAAACTATTGTGTGGATGATATTTTACATG  
 AAACATGAGGTGATTGAATTCACCCACATATTTTCAATTTAAACCACAAAATTTCTTTGGATAAGTAAAGTATATTTGGGGATTA  
 CTACATGTCCTTTTCGTTTGTCTGGTAATTTGTGCAATAAGTGCAGTCTATTATCACAATAATTTTGGCAGGATCTTATGAC  
 TATTTCAATTTGTGCAACAATGGCCACCGACCACTGAGAGTTCGAACGAGATGTCACCCCGGCCATTACAATCTT  
 CACCATCTATGGCCTATGGCCAAAGTAATTTCAAACCCACAGTACGCAATTTGCAATGGGTCAAATTTGAGGACAGG  
 AAAGTGGTATGATTGTTTCATTATTTTGTCACTTACCGTATTTAGTATTTATAGTTCTTAATTAGAGCATCTACAATAGGCTC  
 CCTGAACAATCTACGCAATGACCTCAATGATGTTCCCTCATATATTTATGATCTTTTTTTTTGGCTCAAAAATATATTTATG  
 TATCTGATCAATGAAAGTAAAGGACCTAACGTTTCTATTTGAAGGAAAGTAAATCAAGATTCATTTAAAACCTTCAATTT  
 ATTTATTTGTTTCTGCCAAAAGTTATACCACCATCTTCTAACTAAAAAAGAAAAATCATTGTAATGACTTTTATTGAGCACC  
 ACCAACAGCAACACCGGCTCCACCTCCACAATTTGAAATTTTTTTTTTTGGGCTTTTAAAGGAGTTGAGTTCAACCCATAAAA  
 TGTTTCTCTCTTCCCCTGACTCAGTCTCTTGTATCATTTGGCTTTTGTATGCAATAAAGAGAAATAATTCACAAGGAGCC  
 ATATAATAAACATAAAGCTGGGAAAATAACAAACAATAAATCTAAAAAAGAAAAATAGTAGAATTTGACTTGTATCTTAAAT  
 TCAAGTCTATTGTTGGCCCTTAAACTTTGTATATCGTCACTTATGATGAACCTGATCAAGGAAAGAGTGGAGGATTTTG  
 ACCAAATCTGGGGCAAAATCTCCCCTAAATTTGGAAGAAAGTAATAAGATTATCTAATCAATCATCTTCCATATTGATGTT  
 TATATGGCCTCAAATAAAGTGGGATTTCCAGGACATGAGGAACAGCACAAAGAGATAAGCCATATCATATCTATAGACGTT  
 TGCAATGGCGGAATCGCGCGGTTCTAGTACTGCAGCGATGACAGTGTGCTGCTAGAATGATATTTAGGGTTTGGTTGT  
 TAAACTAATTAATCAAATAAATTTTAAAAACATTATAAATAAAAAAAGCTGATTAATTAATAATAGATGATGTCACATGG  
 CATATGACATGGATTGCCATGTCACACATATTTGGTAATAAAAAAGTTGGTGTAAAGTTACAGTTAATGAAAGCGCTGTCAA  
 AAAAAGAAATTTTATCACTGAAATTTTACTTTTGTGTTTCTGATGTTTCTTAACTGATGTTTAACTGATGTTTAAAGGAGGCTTGGCCCG  
 ACGTGGAAAGTGGCAATGATACAAAATTTGGGAAGGCAATGGAACAACACCGTACATGTTCCGAACAGACATTAACCC  
 AAATGCAATACTTCGAGCGATCCCACTCAATGTGGTACTCGTTCAATATTACAGAAATCCTCAGAAACGCTTCAATCGTACCA  
 AGTGGACACAACATGGACCTACTCCGACATGATACGCTTAAACTGCAACTCAAAGAACCCTCCTTCGTTGCA  
 AACCTCAGCCTAAGTACTAAGAGCCAGACGAAGTCTCAGCTAGAGTCAATGCCGATCCAT

> VIII (1301)

CCTTGTTCTGGTTTTGCTTTCTTCTTTTGTACGTTATGAGCAGTGGTGGGTTGGATTACAATGTTTTGCTATTTATATCTTAT  
 ACATGTACATATAATCAGCATTGCATTTTCTAATTTGTACGTTTTTGTGAGAGAAACTATACTGTGTGTTGATGATCACAT  
 GACATGCGCTATTGAAATCCACCCACATATTTTCAATTAATCTATAGCCGTGTAATCCACCCTTTCTTTGGATGAGAGTATTTG  
 GGGATTTCTTCTGATGTTGCTTTTTATTTGATCTTTTCTTTTATTTCTGCTAATTTTACAGAGTACTTAACTATTG  
 CAATTTGTGCAACAATGGCCACCGACCAACTGCAGAGTTCGAACGAAATGCTCAACCCCGGCCATTACAATGTTCAACA



AAAAACGCTTCAATCGTACCAAGTGCTACACAAACATGGACCTACTCGGCTATAGTAGCACCCATTA AACAGCAACTAATA GAACACCC

>XIV (1023)

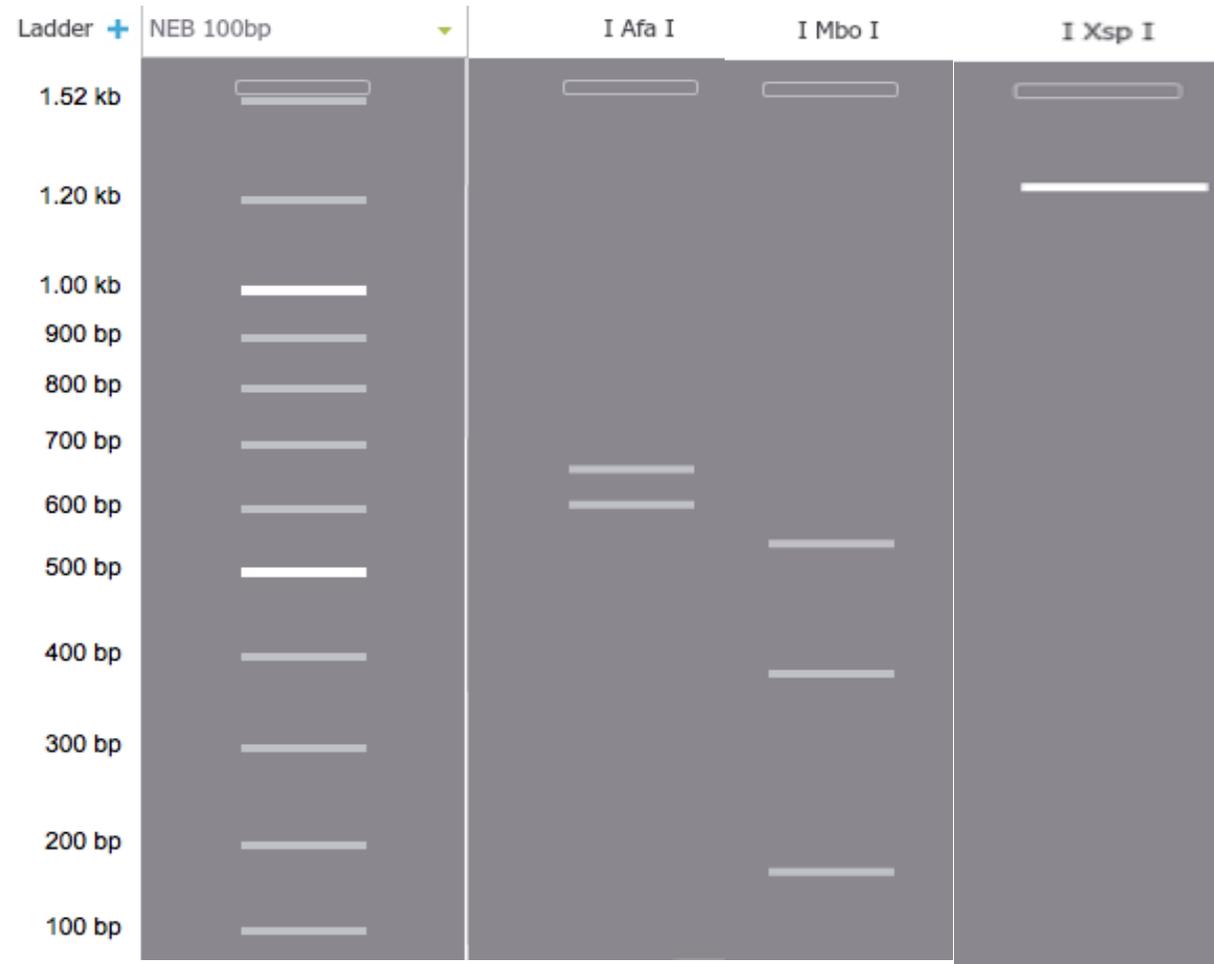
-----  
 TGAGCTCTGGTGAGTTGCATTACAATCTTTTTCCTCGTCATTTC AAGCTAAAAC TACGTACTTTATACATCAAATCCTTATTTA  
 AGATAACCATTAACCTTCTCACAAATATTTTCGAGGATCTTATG TGTATTTTCAATTTGTGCAACAATGGCCACCGACGACCTG  
 CAGACTTAGCAGCAAACCTTCCAACCAACACCGGCCATTACAAG ATTCACCATCCATGGCCATGGCCAAAGTAACTATTCA  
 AACCAAGGAAGCCAGTAATGCTATGGGTCGCGATTTAACTTTAC GAAAGTGGTATGTATTGTTTTTTTTTACTTACTCTT  
 TAGCATTTAGTTCTAAAAAATTAATTTGTCATCTGATGATAATT FACTTCTTGGTAGATAAAAATTGTAATGTTGGTTTTCTGG  
 TTAGGAACATTATTTGCATATTTACCTAATTATAAAAATTGGAAG TAAATTTATATAGGTAGTATATGAATTTATTACACACA  
 TATAATAAATGATCTGATAATCTAATTTGAAGGACCTCCATTTC TACTTGCCTATATTTTCAAAAATATGGTACCTGATTGGA  
 AGGATAAAAATAAAAATCAATTTAATACTCCCATTTTATCCGATA ATGAAAATCTATCCCTAAGGTATTTCTTTTTTTTTTC  
 TTTCTAAAAATATGTTATATATGGCTTGGATGTCTCAGTACCCT CAATTTGCGAAAACAACTGAAGATATCTTGGCCCGACGTG  
 GAAGGTGGCAATGATACAAAATTTGGGAAGGTGAATGGAACAAAC ATGGCACATGTTCCGAAGAGAGACTTAACCAAATG  
 CAATACTTCGAACGATCCCAACATGTGGATGTCGTACAATATTAC AGAGATCCTTAAAAACGCTTCAATCGTGCCGCATCC  
 GCACAAAACATGGAAGTACTCGGACATAGTATCACCCATTA AAAACAGCAACTGGAAGAACACCCCTCA

>XV (Secuencia incompleta)

-----  
 TTTCTTATGAGCACTGGTGATGGTGGGTTGCATTACAATCTTTT GCTCTATTGCATATCATCAGCATTGTATTTTTCTACTTTGT  
 ATTTTTTGTTCAGAGAACTATTGTTGGAATCATTGTTGTCCACAT CGGCTAGAGGGCCAAAGAGAAAAGTAGTTAAATAG  
 AAATACCCCTCTCTAACTAATACCGAGGCCTTTTGTGATAAAAAC CCACACCTGAGGATTGTGCAAGTGGTTAAGTGGGGACA  
 GTATCGGTGTTGTTGGAGTGGGCCCTCGGCCCGTCGACCTGAAA AATTTAACATGGTATCAGAGCCAGATTGCGGGCTCATT  
 TGCCACGTGATGGTGGGTCCCGTTTTGGCCCCGCGCATGGTGAGT CCCTATGGCTCCATGTAGGCCAAAGGTGCCACGTGA  
 TTGGTGGGTCCCATTTGGCCCCGCGCATGGTGGTGGTGGTGGTGG TGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
 CCCCATTGGCCCCGCGCATGGGTGAGTCTCCATGGCTCCACGTGG TTACCGATGTGTGGATCTCCACGTGTGACCCATAAAA  
 ATGGGGTCTCACGTGCGGGGGAGTGTGGAATCATTGTTGTCCAC ATCGGCTAGAGGGCCAAAGAGAAAAGTAGTTAAAT  
 AGAAATACCCCTCTCTAACTAATACCGAGGCCTTTTGTGATAAA ACCTCACACCTGAGGATTGTGCAGGTGGTTAGATGGGGA  
 CACTATCGGTGTTGTTGGAGTGGGCCCTCGGCCGTCGACCTGAAA AATTTAACAACTATTATGTATCGGCTAGAGGGCCAA  
 AGAGAAAAGTAGTTTAAATAGAAATACCCCTCTCTAACTAATAA CCAGGCCCTTTGTGATAAAAACCTCACACCTGAGGATTGTG  
 CAGGTGGTTAGATGGGGACACTATCGGTGTTGTTGGAGTGGGCCC TCGGCCGTCGACCTGAAAATTTAACAACTATTTATG  
 TGTGGATGATATTTACATGACATGCGGGTGTACTG A-----  
 TTTTGCCAAGGATGAGTAAGTATTTGGGGATTGTTGTTCTGCATT TCCTTTTTTATTTTACCCTCGTTTGTATTTCGGATAA  
 TTGTTGCAAT AAGTGCCCTCTATTCAACAATAATTTTTGCAGGAT CTACGACTATCTTCAATTTGTGCAACAATGGCCACC  
 GACCACCTGCAGAAATTCGCAAGAAATGCTCCAACCCCGGCCATT TCAATTTCTCACCATCCATGGCCATATGGCCAAGTAACT  
 ATTTCAAACCCAACGATTCCAGTAATGTCATCGGGTCGCAATTTA AGGAAAAGAATTTGGTATGTAATGTTTGTTTTTTGTG  
 CAATTACTCTTTAACATTTAGTTTTGAACAAATAGATTGTGCATGA AGATAATATAGTTTTTTTTTCAATAAACCTTGGGTATTAG  
 AGAAGATTTGATGTTGATCCTCTGTTGGGTTACTGTTTTGATTAT ACCTAAGTACAAATTTATAAATACATTATTTTTCT  
 ATCGTATATTAACTATGTACACATTTATAACAATGTGTCTAATCC TTAAATTAATGGGCCCTACCATTTTGAATTACGTATAT  
 ATTTAAAATATTGTACTTAATTTAAAAGGATCAAATTTAAATTTA ATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTA  
 TATCAAGAATGAAATCTAACTATCCTTTAAGTTTTCACTTTTCCC AAAATGTGTCAGTCCCCTAAATTTGCTATTGAAACTGA  
 AGAGATCCTGGCCGAACGTGGAAGGTGCCAATGATACAGATTTT GGGGAAGGCGAATGGAACAAACATGGTAGATGTTCCG  
 AACAGACACTTAACCAATGCAATACTTCCGGCGATCCCACGATAT GTGGAACCTCGTTAATATTACAGAGATCCTTAAAAAC  
 GCTTCAATCGTACCAAGTGGGACACAAAACATGGACCTACTCCG ACATAGTAGCACCCATTA AAAACAGCAACTAAAAGAACAC  
 AGCATCG

**Anexo 2: Alineamientos de secuencias obtenidas del gen de la S-RNasa para determinar la estructura del gen**



**Anexo 3: Digestiones enzimáticas *in silico* con enzimas RsaI (Afa I), MboI, y XspI para el intrón I**



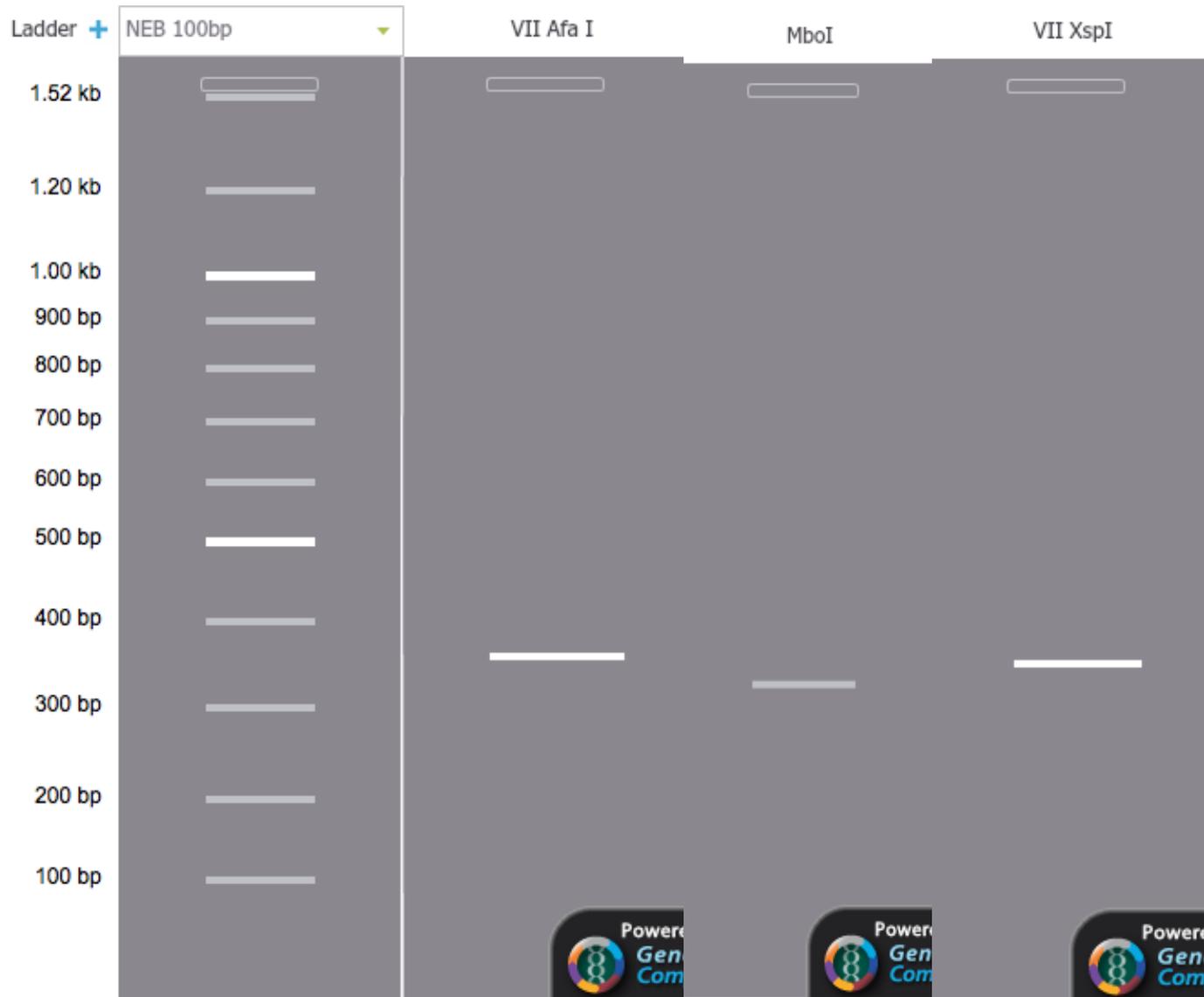














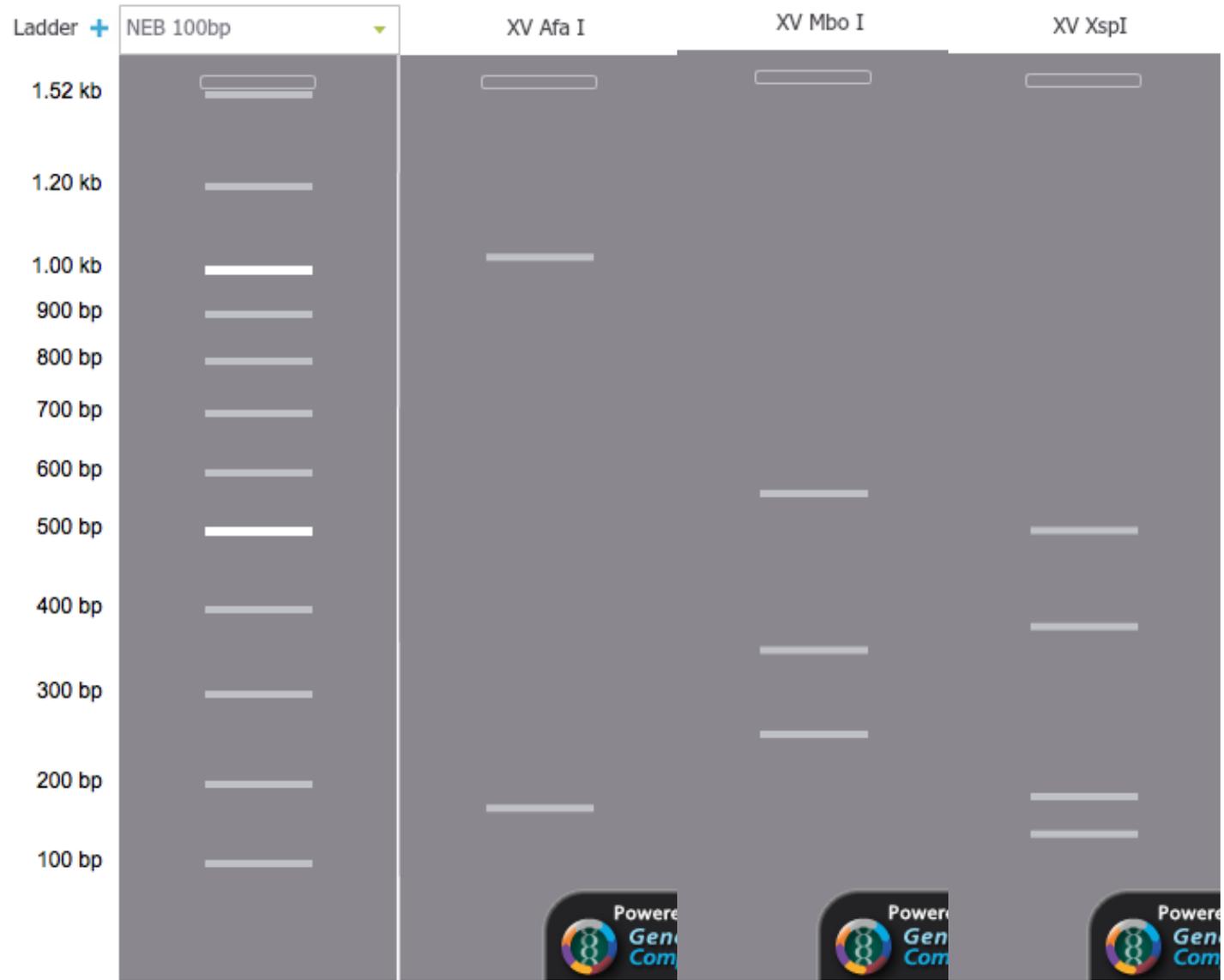












**Anexo 4: Digestiones enzimáticas *in silico* con enzimas RsaI (Afa I), MboI, y FspBI (Hinf I) para la región C2-C3**