

Identificación de alelos S asociados con autoincompatibilidad en individuos de capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) mediante la amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa

Milton Gordillo¹, José Tobar¹, Venancio Arahana¹ y María de Lourdes Torres^{1*}

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito.
Diego de Robles s/n y Vía Interoceánica, Quito- Ecuador.

*Autor principal/Corresponding author, correo electrónico: ltorres@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 2015/03/09. Aceptado/Accepted: 2015/04/13.

Publicado en línea/Published online: 2015/05/22. Impreso/Printed: 2015/06/01.

Identification of S alleles associated with self-incompatibility in capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) samples by amplification of the Intrón I of the S-RNasa gene

Abstract

In plants, gametophytic self-incompatibility is a genetic mechanism regulated by the S locus, which has evolved to prevent self-fertilization. In fruit crops, information regarding the allelic composition of the S locus is essential for the establishment of productive orchards, as this allelic composition defines compatible combinations between individuals. The identification and cloning of S-RNase genes in *Prunus* species has allowed the development of molecular techniques for the characterization of S genotypes in wild and less-studied species of the genus. In this study we evaluated 80 individuals of capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) collected from 8 provinces of the Ecuadorian highlands to determinate the degree of allelic diversity of the S locus in this species. The molecular characterization of S loci was performed using degenerate primers designed from conserved regions of the S-RNase gene of several *Prunus* species. PCR products were separated on agarose gels, classified based on band size and sequenced. Our results reveal the presence of 11 alleles across sampled individuals. Generally, identified alleles showed a high percentage of identity with S-locus sequences reported for other species of the genus and it can be speculated that these derive from a common ancestor. By contrast, sequences with a lower percentage of identity may have originated independently following the diversification of *Prunus* species. The results obtained in this study should be complemented with field tests to confirm the phenotypic behavior of the capulí individuals analyzed.

Keywords. *Prunus serotina*, self-incompatibility, S-alleles, consensus primers.

Resumen

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

Palabras Clave. *Prunus serotina*, auto-incompatibilidad, alelos S, primers consenso

Introducción

Las especies frutales de la Familia Rosaceae se caracterizan por presentar autoincompatibilidad gametofítica, un mecanismo controlado genéticamente que permite a los estilos rechazar el polen cuando éste proviene de la misma planta [1]. Este sistema promueve la polinización cruzada y por tanto contribuye a la ampliación de la diversidad genética. La autoincompatibilidad gametofítica vegetal está controlada por un locus multialélico altamente polimórfico, denominado locus S. Este locus abarca 2 genes que se encuentran físicamente próximos en el genoma, fuertemente ligados, y por tanto se los considera como un solo locus. Uno de estos genes codifica para la determinante masculina (una proteína con caja F) y es expresado únicamente en el polen, mientras que el otro codifica para la determinante femenina (una glicoproteína de tipo RNasa conocida como S-RNasa), que expresa selectivamente en los órganos femeninos [2]. Cuando el producto del alelo S expresado en el grano de polen haploide es el mismo que alguno de los productos de los alelos S expresados en el pistilo diploide, el desarrollo del tubo polínico es truncado y por tanto la fertilización de los óvulos no es posible [3, 4].

Varias técnicas tradicionales han sido desarrolladas para determinar el fenotipo S de individuos y cultivares en especies del género *Prunus*; entre ellas: determinación del porcentaje de formación de frutos, y el cálculo del porcentaje de desarrollo del tubo polínico en cruces controlados [7–9]. Adicionalmente, con el hallazgo de que el fenotipo de autoincompatibilidad está determinado por proteínas estilares con actividad ribonucleasa, y que estas proteínas pueden ser separadas utilizando electroforesis basada en el punto isoeléctrico (IEF), varios autores han determinado el fenotipo S en cultivares de distintas especies del género *Prunus* [10, 11]. Actualmente, varios alelos del gen que codifica para la S-RNasa de distintas especies del género *Prunus* han sido secuenciados y analizados [12]. Estos análisis revelaron la presencia de 2 intrones altamente polimórficos (tanto en secuencia como en tamaño) ubicados al interior de la secuencia del gen de la S-RNasa. Además, las secuencias de estos 2 intrones poseen mutaciones específicas para cada alelo S. A partir de estos resultados, se han desarrollado metodologías basadas en PCR para el genotipado. Varios sets de primers se han diseñado a partir de las regiones conservadas del gen de la S-RNasa flanqueantes a estos 2 intrones con el objetivo de determinar la identidad alélica del locus S de cultivares de cerezo [13] y almendro [14]. El mecanismo de incompatibilidad gametofítica desempeña un rol vital en la formación de frutos en especies del género *Prunus* puesto que para obtener buenos rendimientos en el campo, al menos dos cultivares compatibles con tiempos de floración similares deben ser plantados conjuntamente [15].

El capulí, *Prunus serotina* es una especie frutal arbórea originaria de Norteamérica y distribuida a lo largo

del continente americano, desde Canadá hasta el sur de Bolivia. En América del Sur, debido al gran tamaño de su fruto y su agradable sabor, el capulí ocupa un puesto muy importante dentro de la dieta de grupos locales de la región [16, 17]. Se lo suele consumir crudo o en conserva, mientras que el fruto fermentado se utiliza en la elaboración de bebidas alcohólicas [16]. En Ecuador, el capulí está presente a lo largo del callejón interandino, entre los 1800 a 3400 m.s.n.m, desde la provincia del Carchi localizada al norte, hasta la provincia de Loja ubicada al sur. *P. serotina* es una especie que ha sido poco estudiada pero que presenta un gran potencial en el mercado tanto por sus propiedades farmacológicas como por su apetecido fruto [5].

En el caso de *P. serotina* en el territorio ecuatoriano, no se han reportado cultivares establecidos comercialmente, puesto que este frutal ha sido plantado de manera informal en jardines, parcelas familiares y en los bordes de carreteras [16]. Sin embargo, el conocimiento de la identidad alélica del locus S de individuos portadores de características agrícolas interesantes es esencial para el diseño cruces eficientes, el establecimiento de plantaciones productivas de capulí y el desarrollo de programas de mejoramiento genético en esta especie. Este estudio pretende establecer un método eficiente de identificación de alelos S en 80 muestras de *P. serotina* recolectadas en 8 provincias de la Sierra ecuatoriana.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

Para la presente investigación se utilizaron muestras de ADN de capulí de estudios previos realizados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito [5, 6]. Se escogió un total de 80 muestras correspondientes a distintos individuos de *P. serotina* subs. *capuli* distribuidos en 8 provincias de la Sierra ecuatoriana: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo, Tungurahua, Azuay y Cañar. En la Tabla 1 se indica los códigos utilizados para las muestras empleadas en esta investigación.

Amplificación del Intrón I del gen de la S-RNasa mediante PCR y electroforesis en geles de agarosa

El ADN de las 80 muestras fue amplificado mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando un par de primers diseñado a partir de regiones conservadas flanqueantes al Intrón I del gen de la S-RNasa; este Intrón se caracteriza por ser una región altamente polimórfica tanto en tamaño como en secuencia [15]. El “primer forward” PaConsI-F fue diseñado por Sonneveld a partir de la región péptido señal de varias S-RNasas de cerezo [13]. El “primer reverse” EM-PC1consRD fue diseñado por Ortega *et al.* a partir de la región conservada C1 de 22 secuencias publicadas de S-RNasas de varias especies del género *Prunus*, entre ellas *P. avium*, *P. dulcis*, *P. mume*, *P. salicina* y *P. cerasifera* [15]. La concentración de los reactivos usados

Provincia	Código Provincia	Número* de Individuo
Carchi	CAR	003, 004, 005, 006, 007, 008, 009, 010, 011, 012
Imbabura	IMB	003, 004, 006, 007, 008, 009, 010, 011, 014, 015
Pichincha	PIC	002, 003, 007, 010, 012, 014, 016, 018, 019, 023
Cotopaxi	X	001, 003, 008, 009, 012, 013, 014, 015, 017, 019
Tungurahua	T	004, 005, 006, 012, 013, 020, 022, 024, 030, 034
Chimborazo	H	001, 006, 013, 014, 016, 018, 023, 025, 031, 035
Azuay	AZU	001, 002, 005, 010, 011, 015, 021, 022, 027, 029
Cañar	CAN	001, 003, 007, 009, 011, 014, 017, 021, 022, 024

* Número: indica el número de individuo recolectado en esa provincia [5, 6].

Tabla 1: Códigos de las muestras de capulí analizadas.

en la reacción de PCR fue la siguiente: MgCl₂ 2.5 mM, Buffer de PCR 1X, BSA 0.1 mg/ul, dNTPs 0.2 mM, 0.3 uM de cada primer, Taq-Polimerasa InvitrogenTM 0.5 U, DNA 20 ng. El volumen final de cada reacción fue de 20 ul. La reacción de amplificación se efectuó en un termociclador marca Biometra T-Personal y el programa de ciclado consistió de una denaturación inicial del ADN a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de denaturación a 94°C durante 10 segundos, una temperatura de annealing de 58°C durante 2 minutos y una extensión a 68 °C por 2 minutos, con un incremento de 10 segundos por ciclo en el paso de extensión, a partir del décimo ciclo [15].

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3 %, corridos por 4 horas a 40 voltios. Los geles fueron fotografiados con el Foto-documentador Gel Doc XR (BIORAD). El tamaño en pares de bases (pb) de cada amplicón se determinó mediante regresiones logarítmicas en relación al ladder 100 pb (Invitrogen).

Análisis de datos e identificación de secuencias

Debido a la condición tetraploide de *P. serotina*, el número máximo de bandas polimórficas posibles para un individuo es de cuatro. Para poder diferenciar las bandas polimórficas amplificadas en un mismo individuo se optó por usar la nomenclatura A, B, C, D, siendo A la banda de mayor tamaño en pares de bases (Tabla 2). Los productos de PCR fueron enviados a Funcional Biosciences, Inc. (Madison EE.UU.), donde fueron limpiados utilizando el protocolo de Exo/Sap (Affymetrix, Inc.) y secuenciados en ambas direcciones con un secuenciador de ADN ABI 3730xl (Applied Biosciences). Con la secuencia consenso de cada alelo, se realizó una búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos del GenBank. El tipo de algoritmo seleccionado fue Megablast, con la finalidad de determinar la identidad de los alelos S en base a la secuencia de nucleótidos obtenida para el Intrón I del gen de la S-RNasa. De los resultados obtenidos al realizar el BLAST para cada secuencia, se tomó como alelo putativo a aquel que presentó el mayor puntaje otorgado por el algoritmo.

Resultados

Muestras amplificadas, alelos encontrados y selección de bandas para secuenciamiento

Del total de muestras analizadas (80), 75 amplificaron al menos una banda para la región analizada. El número total de bandas amplificadas en las 75 muestras fue de 122. El tamaño de las bandas amplificadas fluctuó entre los 310 y 1155 pares de bases. Se encontró un total de 10 alelos (nombrados como I-X), esto corresponde a un total de 10 bandas polimórficas clasificadas diferencialmente en cuanto a tamaño en pares de bases. La Tabla 2 presenta un resumen con el rango en pb establecido para cada alelo, el número de bandas amplificadas para cada alelo y las bandas seleccionadas para secuenciamiento. El número total de bandas seleccionadas para secuenciamiento fue de 15, número que abarca a los 10 alelos encontrados en la muestra analizada.

Análisis de las secuencias y resultados de búsqueda mediante BLAST

La lectura del secuenciador fue legible para 13 de las 15 bandas secuenciadas. Las 13 secuencias analizadas coinciden con alelos S reportados en diferentes especies del género *Prunus*; entre ellas: *P. webbii* (wild almond), *P. avium* (cerezo dulce), *P. dulcis* (almendro), *P. armeniaca* (albaricoque), *P. tenella* (dwarf russian almond), *P. salicina* (ciruelo chino), *P. persica* (durazno), *P. fenzliana*, *P. cerasifera* (ciruelo mirabolano), *P. amygdalus* (almendro) y *P. mume* (ciruelo chino). El porcentaje de identidad con las secuencias encontradas oscila entre 83

Alelo	Tamaño (pb)	No. bandas amplificadas	Bandas seleccionadas para secuenciación
I	(1155-1117)	12	H025A, CAR012A*
II	(447-442)	8	AZU015A
III	(426-420)	16	CAN011A
IV	(401-398)	13	CAN022A, PIC019A
V	(389-386)	20	CAR007A
VI	(380-377)	12	IMB011A, CAR011A
VII	(365-361)	21	CAN009A, IMB011B
VIII	(358-355)	8	H014A
IX	(349-344)	11	CAN009B, CAN022B
X	310	1	CAR011B
Total		122	15

*La letra indica la banda seleccionada dentro del grupo de bandas amplificadas en un mismo individuo.

Tabla 2: Alelos, tamaño de bandas (pb), número de bandas amplificadas y bandas seleccionadas para secuenciamiento.

Alelos	Tamaño (pb)	Resultados BLAST					Accesión
		Match	Query Cover	Identidad	Puntaje	Sequence ID	
CAR012A (I)	1100	Secuencia ilegible					
H025A (I)	1100	Secuencia ilegible					
AZU015A (II)	445	<i>Prunus webbii</i> S5	100 %	83 %	385	EU294326.1	<i>Prunus webbii</i> S5-RNase gene partial cds.
CAN011A (III)	410	<i>Prunus dulcis</i> S23 Cultivar Ramillete	97 %	90 %	420	FN429354.1	<i>Prunus dulcis</i> partial s-RNase gene for S-ribonuclease allele S23 cultivar Ramillete exons 1-3.
PIC019A (IV)	402	<i>Prunus armeniaca</i> S52	100 %	85 %	396	KF951503.1	<i>Prunus armeniaca</i> S locus S-RNase 52 (S-RNase) gene complete cds.
CAN022A (IV)	402	<i>Prunus armeniaca</i> S52	100 %	85 %	396	KF951503.1	<i>Prunus armeniaca</i> S locus S-RNase 52 (S-RNase) gene complete cds.
CAR007A (V)	387	<i>Prunus dulcis</i> S7	100 %	97 %	656	KC800707.1	<i>Prunus dulcis</i> genotype 23.5-16 S7-RNase gene exons 1 2 and partial cds.
IMB011A (VI) *	382	<i>Prunus salicina</i> Sj	93 %	92 %	496	AB093132.1	<i>Prunus salicina</i> gene for Sj-RNase partial cds.
CAR011A (VI) *	382	<i>Prunus webbii</i> S10	100 %	88 %	448	EU294324.1	<i>Prunus webbii</i> S10-RNase gene partial cds.
IMB011B (VII)	363	<i>Prunus webbii</i> S3	100 %	93 %	525	EU294325.1	<i>Prunus webbii</i> S3-RNase gene partial cds.
CAN009A (VII)	363	<i>Prunus webbii</i> S3	100 %	93 %	525	EU294325.1	<i>Prunus webbii</i> S3-RNase gene partial cds.
H014A (VIII)	358	<i>Prunus dulcis</i> S6	100 %	96 %	577	HQ622705.1	<i>Prunus dulcis</i> ribonuclease S6 precursor (s-RNase) gene s-RNase-S6 allele exons 1 through 3 and part cds.
CAN009B (IX)	353	<i>Prunus avium</i> Cult. Aydın S10	100 %	85 %	353	JQ280519.1	<i>Prunus avium</i> cultivar Aydın Siyahi S10-ribonuclease (S-RNase) gene S-RNase-S10 allele partial cds.
CAN022B (IX)	353	<i>Prunus avium</i> Cult. Aydın S10	100 %	85 %	359	JQ280519.1	<i>Prunus avium</i> cultivar Aydın Siyahi S10-ribonuclease (S-RNase) gene S-RNase-S10 allele partial cds.
CAR011B (X)	320	<i>Prunus amygdalus nairica</i> S9	100 %	92 %	453	HM003180.1	<i>Amygdalus nairica</i> ribonuclease S9 (S-RNase) gene partial sequence.

*De acuerdo al tamaño calculado (382 pb) tanto IMB011A como CAR011A representan al mismo alelo (VI), sin embargo, las secuencias obtenidas para ambos fragmentos son diferentes. Por consiguiente, a este grupo alélico no se le puede asignar un alelo putativo.

Tabla 3: Resultados del BLAST realizado con las secuencias consensus obtenidas para cada uno de los alelos. La secuencia que reporta mayor puntaje de acuerdo al algoritmo de búsqueda utilizado, es considerada como el alelo putativo de la secuencia analizada. El tamaño presentado en esta tabla es el tamaño del fragmento secuenciado.

y 98 % mientras que el Query Cover de las secuencias oscila entre 93 y 100 %. La Tabla 3 presenta el resultado de los coincidencias más relevantes encontrados para cada secuencia y asigna como alelo putativo a aquella secuencia del GenBank que presentó mayor puntaje de acuerdo al algoritmo del BLAST. Las secuencias de las bandas IMB011A y CAR011A, correspondientes al alelo VI, a pesar de tener un tamaño igual reportado por el secuenciador (382pb), presentaron una secuencia distinta. Esto se pudo apreciar luego de analizar los coincidencias asignados por el BLAST: Sj *P. salicina* para IMB011A, y S10 *P. webbii* para CAR011A. Adicionalmente, un posterior alineamiento de ambas secuencias utilizando el algoritmo CLUSTAL W en el software MEGA 5.1 mostró la discrepancia entre estas secuencias: mutaciones de tipo SNP, inserciones y deleciones (datos no mostrados). En consecuencia, a pesar de haber encontrado 10 bandas polimórficas, el total de alelos presentes en los individuos de capulí analizados fue de 11.

Para el caso de las bandas correspondientes al alelo I (CAR012A y H025A), cuya secuencia fue ilegible para el secuenciador y por tanto no pudieron ser analizadas

mediante la búsqueda BLAST, su tamaño fue relacionado con las bandas de 1100 pb reportadas por Ortega et al. para el alelo S14 de *P. dulcis* [15].

Genotipos putativos asignados

La Tabla 4 presenta un resumen de todos los genotipos putativos encontrados en la muestra analizada, así como el genotipo correspondiente a cada individuo de acuerdo a los resultados obtenidos en el BLAST. El alelo putativo (Sj *P. salicina*/S10 *P. webbii*) hace referencia a las bandas correspondientes al alelo VI como se describió anteriormente. Se encontró un total de 35 genotipos únicos en el total de individuos analizados.

Discusiones

Amplificación con primers consenso degenerados

No existen reportes previos de detección de alelos S en *P. serotina* mediante la técnica de PCR. Este es el primer estudio que correlaciona alelos de S-RNasas reportadas en otras especies del género *Prunus* con secuencias del Intrón I del gen de la S-RNasa encontradas en

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

*P: Prunus

Tabla 4: Genotipos putativos encontrados en las muestras de capulí analizadas.

individuos de *P. serotina*. La amplificación de 122 bandas en 75 de las 80 muestras de *P. serotina* analizadas confirma el adecuado funcionamiento del par de primers PaConsI-F /EM-PC1consRD entre las especies del género *Prunus*. Esta situación puede deberse a los orígenes evolutivos comunes de los alelos S en las especies de este género [18].

Este par de primers igualmente ha sido empleado exitosamente en la genotipificación de cultivares de almendro (*Prunus dulcis*) [19], individuos silvestres de almendro, y otras especies del género *Prunus* [20]. Los resultados obtenidos en esta investigación complementan la información obtenida para el Intrón I del gen de la S-Rnasa del género *Prunus*. El tamaño de los amplicones obtenidos utilizando el par de primers PaConsI-F /EM-PC1consRD en este estudio, oscila entre 310 pb y 1155 pb, donde la mayoría de los alelos se encontraron entre los 340 y 440 pb. Rahemi et al. [20] reportan para especies silvestres de almendro amplicones que oscilan entre los 196 y 1148 pb, la mayoría encontrados entre los 200 y 400 pb. Por otra parte, Ortega et al. et al., [19], reportan para cultivares de *P. dulcis* tamaños de amplicones que oscilan entre los 122 y 1064 pb, la mayoría de ellos

entre 122 y 346 pb. En este mismo estudio, se reportan adicionalmente dos amplicones de gran tamaño: uno de 799 pb para el alelo S1 y otro de 1064 pb para el alelo S14.

En este estudio se encontraron 11 alelos para el Intrón 1 del gen de la S-RNasa, este número es menor al reportado en otros estudios. De Cuyper et al. [21] analizan 65 accesiones de cerezo silvestre colectadas en Bélgica y reportan 17 alelos empleando el mismo set de primers. Por otro lado, Rahemi et al. [20] reportan un total de 23 alelos encontrados en 96 accesiones de almendro silvestre y otras especies silvestres del género *Prunus*. Esta menor cantidad de alelos encontrados en la muestra analizada puede estar relacionada con los resultados de moderada diversidad genética encontrados para individuos de *P. serotina* en la Sierra ecuatoriana [5, 6] en comparación con el nivel de variabilidad genética observado para *P. serotina* en su centro de origen (América del Norte) [22].

Similitudes con intrones de S-RNasas de otras especies del género *Prunus*

Los resultados de la búsqueda en el GenBank realizada con el BLAST para las 13 secuencias analizadas muestra similitudes con S-RNasas exclusivamente del género *Prunus*, entre ellas: *P. webbii*, *P. avium*, *P. dulcis*, *P. armeniaca*, *P. tenella*, *P. salicina*, *P. fenzliana*, *P. persica*, *P. cerasifera*, *P. amygdalus* y *P. mume*. Aquellas secuencias que presentan el mayor porcentaje de identidad con secuencias reportadas en el GenBank son: CAR007A (97 %) con el alelo S7 de *P. dulcis* reportado por Halász et al. [23], H014A (96 %) con el alelo S6 de *P. dulcis* reportado por Ortega et al., [19]. A continuación se encuentran IMB011B y CAN009A con un 93 % de identidad compartida con el alelo S3 de *P. webbii* reportado por Banovic et al., [24]. Finalmente se encuentra CAR011B, alelo que comparte un 92 % de identidad con la secuencia del alelo S9 de *P. amygdalus* reportado por Rahemi et al. [20]. De acuerdo con los hallazgos reportados por Ortega et al. [19], al comparar sus secuencias obtenidas con la base de datos del European Bioinformatics Institute (EBI), muchas de ellas presentaban elevada homología interespecífica con varias especies del género *Prunus*. En muchos casos las identidades superaban el 97 %. La secuencia del alelo S11 encontrado en su estudio sorprendentemente presentó una identidad del 100 % con la secuencia del alelo S1 reportado por Sonneveld et al., [25] para *P. avium* (cerezo). Adicionalmente la secuencia del alelo S6 de *P. dulcis* fue 98 % idéntica a la secuencia MSRN-2 reportada por Yaegaki et al. [26] para *P. mume*, y la secuencia del alelo S13 de *P. dulcis* fue 97.5 % idéntica a la reportada como alelo Sd en *P. salicina*, reportada por Beppu et al., [27]. Además, al comparar las secuencias encontradas en *P. dulcis* con las encontradas en otras especies del género *Prunus*, Ortega et al. [19] encontraron que en algunos casos las similitudes interespecíficas de las secuencias analizadas eran mucho más altas que las similitudes intraespecíficas; lo que podría sugerir que la divergencia de los alelos S antecedió a la especiación dentro de la familia Rosaceae. El mismo caso está reportado por Iøerger et al. [28] para la familia Solanaceae.

Conclusiones

El presente estudio comprobó la funcionalidad de los primers PaConsI-F/EM-PC1consRD para amplificar el Intrón I del gen de la S-RNasa en la especie *P. serotina* subsp. *capuli*. Los resultados obtenidos al utilizar el set de primers PaConsI-F/EM-PC1consRD para amplificar ADN de *P. serotina* indican que existen polimorfismos tanto de tamaño como de secuencia dentro de la región amplificada. El análisis de las secuencias mediante la búsqueda en el BLAST reporta identidades únicamente con secuencias provenientes de S-RNasas del género *Prunus*. Las secuencias obtenidas en este estudio permitieron identificar 11 alelos putativos para el Intrón I del gen de la S-RNasa presentes en los individuos de *P. serotina* analizados. Podría ser que las secuencias encon-

tradas en *P. serotina* que presentan un alto porcentaje de identidad con las secuencias reportadas en otras especies del género fueron heredadas a partir de un ancestro común que ya las poseía, mientras que, las secuencias que presentan un menor porcentaje de identidad con las reportadas en las bases de datos habrían evolucionado de manera independiente en *P. serotina*.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por la IFS, International Foundation For Science (Suecia), y por la Universidad San Francisco de Quito USFQ (Ecuador) (Chancellor Grant). Agradecemos a Juan José Guadalupe, Damaris Intriago, Viviana Jaramillo y Estefanía Rojas por su apoyo y contribuciones durante la ejecución de este proyecto. A Andrés Torres por sus comentarios y aportes a este manuscrito.

Referencias Bibliográficas

- [1] De Nettancourt, D. 2001. "Incompatibility and and Incongruity in Wild and Cultivated Plants". Springer-Verlar, Berlin, : 322.
- [2] Newbiggin, E.; Anderson, A.; Clarke, A. 1993. "Gametophytic self-incompatibility systems". *The Plant Cell*, 5:1315-1324.
- [3] Haring, V.; Gray, J.; McClure, B.; Anderson, M.; Clarke, A. 1990. "Self-incompatibility: a self-recognition system in plants". *Science*, 250:937-941.
- [4] Kao, T.; McCubbin, A. 1996. "How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93:12059-12065.
- [5] Intriago, D. 2013. "Análisis de la diversidad genética del capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) en la región interandina del Ecuador mediante marcadores microsatélites". *Universidad San Francisco de Quito, Tesis de Pregrado: Quito-Ecuador*.
- [6] Guadalupe, J. 2013. "Estudio preliminar de la diversidad genética del capulí en cinco provincias de la región andina del Ecuador". *Universidad San Francisco de Quito, Tesis de Pregrado: Quito-Ecuador*.
- [7] Crane, M.; Brown, A. 1937. "Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium*". *J Pomol Hort Sci*, 15:86-116.
- [8] Crossa-Raynaud, P.; Grasselly, C. 1985. "Existence de groupes d'interste'rilité' chez l'amandier". *Options Me'diterrane'ennes. Serie E' tudes*, 1:43-45.
- [9] Kester, D.; Gradziel, T.; Micke, W. 1994. "Identifying pollen incompatibility groups in California almond cultivars". *Journals of the American Society for Horticultural Science*, 119:106-109.
- [10] Boskovic, R.; Tobutt, K.; Battle, I.; Duval, H. 1997. "Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond". *Euphytica*, 97:167-176.

- [11] Boskovic, R.; Tobutt, K. 2001. "Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stylar ribonucleases". *Theor Appl Genet*, 103:475–485.
- [12] 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 S-RNases in Rosaceae". *Molecular Genetics*, 260:261–268.
- [13] Sonneveld, T.; Tobutt, K. 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*, 107(6):1059–1070.
- [14] Tamura, M.; Ushijima, K.; Sassa, H.; Hirano, H.; Tao, R.; Gradziel, T.; Dandekar, A. 2000. "Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis". *Theoretical and Applied Genetics*, 101(3):344–349.
- [15] Ortega, E.; Sutherland, B.; Dicenta, F.; Boskovic, R.; Tobutt, 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*, 124(2):188–196.
- [16] Popenoe, W.; Pachano, A. 1922. "The Capulín Cherry". *Journal of Heredity*, 13:50–62.
- [17] Mille, L. 1942. "El Capulí". *FLORA-Instituto de Ciencias Naturales del Ecuador*, 2:50–51.
- [18] Wu, J.; Gu, C.; Khan, M.; Gao, Y.; Wang, C.; Zhang, S. 2013. "Molecular Determinants and Mechanisms of Gametophytic Self-Incompatibility in Fruit Trees of Rosaceae". *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(1):53–68.
- [19] Ortega, E.; Bosković, R.; Sargent, D.; Tobutt, K. 2006. "Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic". *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 276(5):413–426.
- [20] Rahemi, A.; Fatahi, R.; Ebadi, A.; Taghavi, T.; Hassani, D.; Gradziel, T.; Chaparro, J. 2010. "Genetic variation of S-alleles in wild almonds and their related *Prunus* species". *Australian Journal of Crop Science*. Retrieved from <http://www.highbeam.com/doc/1P3-2243615241.html>.
- [21] De Cuyper, B.; Sonneveld, T.; Tobutt, K. 2005. "Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries". *Molecular Ecology*, 14(4):945–955.
- [22] Downey, S.; Iezzoni, A. 2000. "Polymorphic DNA Markers in Black Cherry (*Prunus serotina*) Are Identified Using Sequences from Sweet Cherry, Peach, and Sour Cherry". *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(1):76–80.
- [23] Halász, J.; Fodor, A.; Hegedűs, A.; Pedryc, A. 2008. "Identification of a new self-incompatibility allele (S31) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection". *Scientia Horticulturae*, 116(4):448–451.
- [24] Banović, B.; Survanovsky, N.; Konstantinovic, M.; Maksimovic, V. 2007. "Basic RNases of wild almond (*Prunus webbii*): cloning and characterization of six new S-RNase and one non-S RNase genes". *Journal of Plant Physiology*, 166(4):395–402.
- [25] Sonneveld, T.; Robbins, T.; Boskovic, R.; Tobutt, K. 2001. "Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection". *Theoretical and Applied Genetics*, 102:1046–1055.
- [26] Yaegaki, H.; Shimada, T.; Moriguchi, T.; Hayama, H.; Haji, T.; Yamaguchi, M. 2001. "Molecular characterization of S-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume*)". *Sexual Plant Reproduction*, 13(5):251–257.
- [27] Beppu, K.; Yamane, H.; Yaegaki, H.; Yamaguchi, M.; Kataoka, I. 2002. "Diversity of S-RNase genes and S-haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.)". *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77:658–665.
- [28] Ioerger, T.; Clark, A.; Kao, T. 1990. "Polymorphism at the self-incompatibility locus in Solanaceae predates speciation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24):9732–9735.