



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora  
de la Agrodiversidad Valenciana

Escola Tècnica Superior d'Engenieria  
Agronòmica i del Medi Natural (ETSIAMN)

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Estudio del sistema de  
autoincompatibilidad en pepino dulce  
(*Solanum muricatum*) y especies  
relacionadas**

CURSO ACADÉMICO 2015-2016

**Autor:** Camilo Perales Morales

**Tutor académico:** Santiago Vilanova Navarro

**Co-tutor externo:** Carlos Romero Salvador

**Director experimental:** Francisco Javier Herraiz García

València, Julio de 2016



### Datos personales

**Nombre y apellidos:** Camilo Perales Morales

### Datos del Trabajo de Fin de Grado

**Título:** Estudio del sistema de autoincompatibilidad en pepino dulce (*Solanum muricatum*) y especies relacionadas

**Tutor académico:** Santiago Vilanova Navarro

**Co-tutor externo:** Carlos Romero Salvador

**Director experimental:** Francisco Javier Herraiz García

**Localidad y fecha:** València, Julio de 2016

### Resumen

Los sistemas de auto-incompatibilidad (SI) en angiospermas evitan la autofecundación promoviendo la polinización cruzada y favoreciendo la generación de diversidad genética. En Solanáceas, Rosáceas y Plantagináceas la SI está controlada por un sistema gametofítico controlado por la interacción entre un determinante masculino (SFL) y un determinante femenino (S-RNasa). Se sabe que los dos genes que codifican para estas proteínas se encuentran en un locus hipervariable llamado locus-S. En Solanáceas, las S-RNasas presentan cinco dominios conservados, dos regiones hipervariables y un intrón. Se ha descrito que estos genes presentan un amplio número de alelos que varían tanto en sus regiones hipervariables como en el tamaño del intrón. La detección de estos alelos permite conocer de antemano qué plantas van a ser compatibles entre sí, permitiendo una mejor planificación de los programas de mejora.

Se ha visto en especies como tomate que la transición de la auto-incompatibilidad a la auto-compatibilidad es un rasgo característico de la domesticación, pues una planta auto-compatibilizada facilita enormemente la fijación de caracteres de interés. Esto suele ser debido a la selección de individuos que presentan mutaciones en alguno de los dos determinantes, permitiendo así saltarse el control de rechazo del polen. En el marco de los programas de mejora es común el uso de especies silvestres que aporten nuevos caracteres de interés en las especies cultivadas. Sin embargo, estas especies suelen ser auto-incompatibles, lo que dificulta su uso para el desarrollo de nuevos materiales.

El pepino dulce (*Solanum muricatum* Aiton) es un cultivo herbáceo de origen andino que se cultiva por sus frutos comestibles, jugosos y aromáticos. Pertenece a la familia de las Solanáceas, siendo filogenéticamente cercano a otras especies importantes como el tomate y la patata. El pepino dulce es auto-compatible pero dentro la sección *Basarthurum* a la que pertenece, encontramos tanto especies auto-incompatibles como especies auto-compatibles.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar diferentes alelos de incompatibilidad amplificando regiones de las S-RNAs tanto en la especie cultivada (*Solanum muricatum*), como en diversas especies silvestres de la sección Basarthrum (*S. caripense*, *S. tabanoense*, *S. catilliflorum*, *S. Trachycarpum* y *S. perlongistylum*). Por otra parte, se intentó identificar si existe alguna alteración en las S-RNAs en la especie cultivada que pudiera ser responsable de la auto-compatibilidad. También se realizaron diferentes cruces dirigidos en invernadero para poder establecer los niveles de compatibilidad de las diferentes especies, así como para confirmar la relación entre los alelos de las S-RNAs y la compatibilidad cruzada de las plantas. Se pudieron determinar distintos alelos de incompatibilidad para el conjunto de las especies estudiadas, aunque no se pudo obtener la secuencia de las S-RNAs de todas las especies, incluyendo en la especie cultivada. Los cruzamientos en el invernadero sugirieron que no se pudieron caracterizar todos los alelos de incompatibilidad presentes en las especies.

#### **Palabras clave**

Pepino dulce, *Solanum muricatum*, Sistema de auto-incompatibilidad gametofítica, S-RNasa

### Title

Study of the self-incompatibility system in *Pepino dulce* (*Solanum muricatum*) and related species

### Abstract

The self-incompatibility (SI) systems in angiosperms avoid selfing, promoting cross-pollination and the generation of genetic diversity. In Solanaceae, Rosaceae and Plantaginaceae self-incompatibility is controlled by a gametophytic system controlled by the interaction between a male determinant (SFL) and a female determinant (S-RNase). It is known that both genes codifying these proteins are located in a hypervariable locus named the S-locus. In Solanaceae, S-RNases comprise five conserved domains, two hypervariable regions and an intron. It has been described that these genes show a wide number of alleles that vary in their hypervariable regions as well as in the size of their intron. The detection of these alleles allows to know beforehand which plants are going to be incompatible, allowing for a better planning of breeding programs.

It has been observed in species such as tomato that transition from self-incompatibility to self-compatibility is a characteristic trait of domestication, as a self-compatible plant makes the fixation of interesting traits much easier. This is usually due to the selection of plants that have mutations in one of the two determinants, allowing them to bypass the rejection of pollen control. In breeding programs is common to use wild species that contribute with new interesting traits for the cultivated species. However, these species usually are self-incompatible, which makes their use in the development of new materials difficult.

*Pepino* (*Solanum muricatum* Aiton) is a species of shrub of Andean origin cultivated for its edible, juicy and aromatic fruits. It belongs to the Solanaceae family, and is phylogenetically close to other relevant species such as tomato and potato. The *pepino* is self-compatible, but inside the section *Basarthurum*, to which it belongs, there are self-incompatible species as well as self-compatible species.

The main objective of this work was to determine different incompatibility alleles by amplifying regions in the S-RNases of the cultivated species (*Solanum muricatum*) and of different wild species of section *Basarthurum* (*S. caripense*, *S. tabanoense*, *S. catilliflorum*, *S. Trachycarpum* y *S. perlongistylum*). Moreover, it was tried to identify if there is any alteration in the S-RNases of the cultivated species that might be the cause of self-compatibility. Different directed cross-pollinations were made in the greenhouse to assess the level of incompatibility in the different species, and as to confirm the relation between the alleles of the S-RNases and the cross-compatibility between plants. Diverse alleles of incompatibility could be determined for the studied species, although the sequence of the S-RNase of all species could not be obtained, including that of the cultivated species. The greenhouse crosses suggested that not all of the alleles present in the species could be determined.

### Key words

*Pepino*, *Solanum muricatum*, Gametophytic self-incompatibility system, S-RNase

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no hubiera sido posible sin toda la gente del laboratorio, que siempre ha estado ahí para ayudarme con cualquier cosa. Muchísimas gracias, por contestar a mis preguntas, por enseñarme todo lo que no sabía y simplemente por estar ahí, a Cris, a Mariola, a Pietro, a Jaume, a Ramsés, a Francesco, a Dionís, a Sileia y a todo el resto. Muchísimas gracias a Santi y a Javi, por encaminarme y ayudarme en prácticamente todo, y porque sin ellos esto no hubiera salido adelante ni la mitad de bien.

Moltíssimes gràcies també a la meua família, que encara que no entengueren res del que estava fent, sempre m'han donat tot el seu suport i m'han aguantat setmanes i setmanes de aparèixer com un zombi per casa. D'ací poc menjarem pepinos dolços.

Y, como no podía ser menos, a todos los amigos que he hecho a lo largo de este bonito infierno que llaman grado en biotecnología. El cómo he podido conocer a tanta gente tan especial nunca lo entenderé. Y, sobre todo, gracias a los limones, por los cientos de horas de biblioteca y por los cientos de horas de simplemente ser nosotros. *YMJ.*

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1-9
1.1. El pepino dulce.....	1
1.2. Barreras de cruzabilidad .....	4
1.3. La auto-incompatibilidad gametofítica basada en S-RNasas.....	5
1.4. Ejemplos de auto-compatibilidad.....	8
2. OBJETIVOS .....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	11-14
3.1. Material vegetal.....	11
3.2. Extracción de DNA .....	11
3.3. Diseño de cebadores.....	12
3.4. Amplificación de las S-RNasas.....	12
3.5. Caracterización de los alelos de las S-RNasas.....	13
3.6. Polinizaciones controladas.....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	15-31
4.1. Diseño de cebadores.....	15
4.2. Optimización de la amplificación de las S-RNasas.....	16
4.3. Secuenciación de las S-RNasas .....	18
4.4. Caracterización de los alelos de las S-RNasas.....	21
4.5. Evaluación de la auto-incompatibilidad de las entradas.....	25
4.6. Cruzamientos .....	27
4.6.1 Auto-compatibles .....	27
4.6.2 Auto-incompatibles .....	28
4.7. Discusión general.....	30
5. CONCLUSIONES.....	32
6. BIBLIOGRAFÍA .....	33-36
7. ANEXOS .....	37-39
7.1. Anexo 1 .....	37
7.2. Anexo 2 .....	38
7.3. Anexo 3 .....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Pepino dulce de la variedad El Camino. ....	1
<b>Figura 2.</b> Representación cerámica de frutos del pepino dulce de la cultura Moche. ....	3
<b>Figura 3.</b> Frutos de <i>S. muricatum</i> maduros. ....	4
<b>Figura 4.</b> Modelo esquemático del <i>Collaborative Non-Self Recognition Model</i> en <i>Petunia</i> . Los SLFs de cada haplotipo-S aparecen conectados por flechas a las S-RNAsas con las que interactúan. Los SLFs de la derecha todavía no se han descrito. Fuente: Kubo <i>et al.</i> , 2010. ....	7
<b>Figura 5.</b> Preparación de una flor de <i>S. muricatum</i> para una polinización manual. <b>a)</b> Racimo con flores cerradas en su extremo. <b>b)</b> Flor aislada y abierta. <b>c)</b> Flor emasculada, preparada para recibir polen en el estigma. ....	14
<b>Figura 6.</b> Alineamiento de las secuencias de la S <sub>8</sub> -RNasa de tomate (Solyc01g055200.1.1) y la S <sub>F11</sub> -RNasa de patata (XM_006347185.1). Los nucleótidos conservados se indican con un asterisco (*). Los cebadores seleccionados están resaltados con colores según la leyenda. ....	15
<b>Figura 7.</b> Electroforesis en gel de agarosa de la PCR para optimizar la combinación de cebadores. Cada carril corresponde a, de izquierda a derecha, 37-A pl. 1, El Camino pl. 3, E-34 pl. 3, P-80 pl. 5, EC-40 pl. 6, E-7 pl. 7, E-257 pl. 8, EC-26 y P-62 pl. 4. Se incluyen un marcador de peso molecular y controles negativos. ....	17
<b>Figura 8.</b> Combinación de temperatura de annealing (T <sub>m</sub> , °C) y concentración de cloruro de magnesio ([MgCl <sub>2</sub> ], mM) de las distintas PCRs. El DNA de cada carril corresponde a, de izquierda a derecha, 37-A pl. 1, El Camino pl. 3, E-34 pl. 3, P-80 pl. 5, EC-40 pl. 6, E-7 pl. 7, E-257 pl. 8 y P-62 pl. 4. ....	18
<b>Figura 9.</b> <i>Arriba:</i> Cromatograma de la secuenciación de P-80 pl. 5. Se puede observar el desfase y el alto fondo de la secuenciación. <i>Abajo:</i> Cromatograma de la secuenciación de EC-40 pl. 6, donde se puede apreciar la calidad de la lectura. ....	19
<b>Figura 10. a)</b> Resultado de los mejores alineamientos del BLASTn con la secuencia de la S-RNasa de EC-40 ( <i>S. caripense</i> ). El resultado de la entrada E-7 fue muy similar. <b>b)</b> Los cinco alineamientos encontrados en el BLASTn de la secuencia obtenida de E-257 ( <i>S. tabanoense</i> ). ....	20
<b>Figura 11.</b> Zona de hibridación de los cebadores FI y RI con los genes de las S-RNAsas secuenciadas. Los nucleótidos que coinciden entre secuencia y cebador aparecen en azul, y los nucleótidos que no coinciden se resaltan en rojo. ....	20
<b>Figura 12.</b> Alineamiento múltiple de las proteínas traducidas a partir de las secuencias obtenidas y las secuencias de tomate y patata utilizadas para el diseño de cebadores. Se indican las regiones conservadas (C2, C3 y C4) y las hipervariables (Hva y Hvb). Los corchetes en azul indican la zona donde hibridan los cebadores internos en la secuencia nucleotídica, los aminoácidos resaltados en azul delimitan el principio y el final del intrón y las histidinas catalíticas conservadas están resaltadas en gris. También se incluye un árbol de distancia genética entre las secuencias. ....	21
<b>Figura 13.</b> <i>Nested</i> PCR de las entradas 37-A y El Camino ( <i>S. muricatum</i> ). 37-A pl. 1 y pl. 2, El Camino pl. 1 y pl. 2, E-34 pl. 1 y pl. 2, P-80 pl. 1 y pl. 2, EC-40 pl. 1 y pl. 2, E-7 pl. 1 y pl. 2, E-257	

pl. 1 y pl. 2, P-62 pl. 1 y EC-26. Aunque la cantidad de producto amplificado fue variable, en todas las entradas se consiguió amplificar la banda deseada. .... 22

**Figura 14. a.** Electroferograma de los fragmentos amplificados (intensidad de fluorescencia (u.a.) respecto a tamaño de fragmento (bp)). **b.** Diferencia entre los electroferogramas de individuos homocigotos y heterocigotos. **c.** Muestra del desfase de unas pocas bases entre distintos análisis de los mismos individuos..... 23

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Auto-incompatibilidad (SI) o auto-compatibilidad (SC) del pepino dulce y especies relacionadas de la serie <i>Caripensa</i> (Anderson y Bernardello, 1991; Anderson <i>et al.</i> , 2006; Anderson, 1975, 1977).....	2
<b>Tabla 2.</b> Relación de accesiones empleadas. ....	11
<b>Tabla 3.</b> Componentes y programa térmico de la reacción de PCR. La concentración de MgCl <sub>2</sub> y la Tm variaron en cada reacción entre los rangos indicados. ....	12
<b>Tabla 4.</b> Cebadores seleccionados, su tamaño y su Tm. ....	16
<b>Tabla 5.</b> Alelos-S identificados según su tamaño en las plantas descritas auto-compatibles (a) y auto-incompatibles (b). De las plantas E-34 pl. 8, El Camino pl. 7 y P-62 pl. 6 no se obtuvieron picos claros en los electroferogramas. **: P-62 aparece descrita como auto-incompatible, pero en este trabajo los resultados indicaron que era auto-compatible. ....	24
<b>Tabla 6.</b> Resultado de las auto-fecundaciones en el conjunto de plantas de cada entrada y número de flores cuajadas sin intervención manual. *No se obtuvieron datos de auto-polinizaciones de las plantas de las entradas El Camino y EC-26. ** <i>S. perlongistylum</i> aparece descrita como SI, pero los resultados indican que es SC. ....	26
<b>Tabla 7.</b> Cruzamientos de las entradas de <i>S. muricatum</i> .....	27
<b>Tabla 8.</b> Cruzamientos de las entradas de <i>S. trachycarpum</i> , <i>S. catilliflorum</i> y <i>S. perlongistylum</i> .....	28
<b>Tabla 9.</b> Cruzamientos de la entrada EC-40 de <i>S. caripense</i> . ....	29
<b>Tabla 10.</b> Cruzamientos de la entrada E-7 de <i>S. caripense</i> . ....	29
<b>Tabla 11.</b> Cruzamientos de la entrada E-257 de <i>S. tabanoense</i> . ....	30

## ABREVIATURAS

**μL:** Microlitro

**μM:** Micromolar (micromol/litro)

**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool

**bp:** *Base pairs* (Par de bases)

**g:** Gramos

**GSI:** *Gametophytic Self-incompatibility* (Auto-incompatibilidad gametofítica)

**min:** Minutos

**mM:** Milimolar (milimol/litro)

**ng:** Nanogramos

**nm:** Nanómetros

**°C:** Grados centígrados

**PCR:** *Polimerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

**pl.:** Planta

**s:** Segundos

**SC:** *Self-compatible* (Auto-compatible)

**SI:** *Self-incompatible* (Auto-incompatible)

**SSI:** *Sporophytic Self-incompatibility* (Auto-incompatibilidad esporofítica)

**Tm:** Temperatura de *melting* o de *annealing*

# **1. Introducción**

### 1.1. El pepino dulce

El pepino dulce (*Solanum muricatum* Aiton) (Figura 1) es una especie perteneciente a la familia de las Solanáceas originaria de la región andina (zonas de Colombia, Perú y Chile). Se cultiva por sus frutos, muy apreciados por su sabor agradable y refrescante y por su forma y color atractivos; estos frutos pueden consumirse como fruta de postre o en ensalada según su madurez. En su zona de origen el pepino dulce era un cultivo muy extendido antes de la llegada de los colonos españoles. A diferencia de otras solanáceas como el tomate o la patata, el pepino dulce no se extendió por todo el mundo, quedando hasta fechas recientes como cultivo marginal en su región de origen. Aunque allí su cultivo es modesto y se limita a pequeñas áreas y cultivo local, el cultivo ocasional en mercados norteamericanos, europeos y japoneses ha tenido una acogida aceptable, y se comercializa con éxito en Nueva Zelanda y el oeste de Australia.



Figura 1. Pepino dulce de la variedad El Camino.

Su nombre común, pepino dulce, viene de la costumbre de los españoles colonizadores de Sudamérica de utilizar nombres de plantas del continente europeo para designar plantas desconocidas del Nuevo Mundo, en este caso el del *pepino* (*Cucumis sativus* L.), una cucurbitácea bastante alejada del pepino dulce. Aunque su nombre más extendido es *pepino dulce*, el cultivo también recibe otros nombres en distintas regiones, como *melón pepino*, *melon pear* o *tree melon*.

El pepino dulce pertenece al género *Solanum*, junto con especies como la patata, la berenjena o el tomate. Dentro del género, pertenece al subgénero *Potatoe*, a la sección *Basarthrum* y a la serie *Muricata*, de la cual es el único miembro. Su nombre científico, *Solanum muricatum*, le fue dado por William Aiton, del Royal Botanic Garden de Kew de Londres, en 1789. *Muricatum* significa “con protuberancias cortas y duras” (Aiton, 1813), lo que probablemente hace referencia al crecimiento de raíces adventicias en el tallo al crecer en condiciones de alta humedad.

En la sección *Basarthrum* se incluyen 22 especies, de las cuales solo se cultiva el pepino dulce. En la actualidad, tras haberse llevado a cabo análisis morfológicos y moleculares, entre otros, todavía se desconoce la especie o especies ancestro del pepino dulce, lo que sugiere que o bien el ancestro o se ha extinguido o que la diferenciación durante el proceso de domesticación ha sido considerable (Blanca *et al.*, 2007; Prohens *et al.*, 2006). En cualquier caso, el pepino dulce

se encuentra estrechamente relacionado con las especies de la serie *Caripensa* de la sección *Basarthrum*, que probablemente sean las especies más involucradas en su origen, entre las que se incluyen *S. caripense*, *S. tabanoense*, *S. basendopogon*, *S. cochoae*, *S. perlongistylum*, *S. catilliflorum* y *S. trachycarpum*. Algunas de estas especies están descritas como auto-incompatibles, mientras que otras lo están como auto-compatibles, como *S. muricatum* (Anderson y Bernardello, 1991; Anderson *et al.*, 2006; Anderson, 1975, 1977), según se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Auto-incompatibilidad (SI) o auto-compatibilidad (SC) del pepino dulce y especies relacionadas de la serie *Caripensa* (Anderson y Bernardello, 1991; Anderson *et al.*, 2006; Anderson, 1975, 1977).

<b>Especie</b>	<b>Auto-incompatibilidad</b>	<b>Especie</b>	<b>Auto-incompatibilidad</b>
<i>S. muricatum</i>	SC	<i>S. cochoae</i>	SI
<i>S. caripense</i>	SI	<i>S. perlongistylum</i>	SI
<i>S. tabanoense</i>	SI	<i>S. catilliflorum</i>	SC
<i>S. basendopogon</i>	SI	<i>S. trachycarpum</i>	SC

Entre las especies cercanas al pepino dulce, *S. caripense* Humb. y Bonpl. ex Dunal es una especie ampliamente distribuida en la zona andina y variable morfológicamente, con algunos morfotipos muy similares a *S. muricatum*. Es la especie de la sección que presenta menos diferencias con el pepino dulce, tiene un cariotipo más similar que el de las otras especies (Bernardello y Anderson, 1990), y ambas especies se cruzan fácilmente, por lo que se ha aprovechado para la mejora clásica del pepino dulce (Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2011). Es la principal especie candidata a ser el ancestro del pepino dulce. *S. tabanoense* Correll tiene frutos más parecidos a los del pepino dulce que *S. caripense*, pero la descendencia de los cruces entre ambas especies es menos fértil que los híbridos de pepino dulce y *S. caripense* (Nuez y Ruiz, 1996). *S. basendopogon* Bitter es morfológicamente similar al pepino dulce, pero sus híbridos no son fértiles (Anderson, 1977). Los cruces de *S. cochoae* G.J. Anderson y Bernardello y pepino dulce son muy poco viables, pero las pocas semillas híbridas que se recuperan son muy fértiles. *Solanum perlongistylum* G. J. Anderson, Martine, Prohens y Nuez y *S. catilliflorum* G. J. Anderson, Martine, Prohens y Nuez son especies muy cercanas a *S. tabanoense* (Anderson *et al.*, 2006). Aunque *S. caripense* aparece como el ancestro más probable del pepino dulce, no se puede descartar la intervención de otras especies de la sección *Caripensa*.

Algo que sí está más claro es la antigüedad de la domesticación del pepino dulce. Esta idea está apoyada por la ausencia de un ancestro directo claro, ya que tanto como si este se ha extinguido como si el pepino dulce se ha diferenciado mucho, ambos son procesos que requieren una gran cantidad de tiempo. Además, cuando los españoles llegaron al continente americano existía una gran variedad de cultivares, fruto de un periodo de cultivo extenso. Finalmente, se conservan representaciones en cerámica del fruto del pepino dulce de la cultura Paracas o Moche (Figura 2), que datan de aproximadamente 500 a.C. (Vargas, 1962).

La antigüedad de la domesticación del pepino dulce sirve como testigo de la importancia y la extensión del cultivo en su zona de origen, que sorprendió especialmente a los cronistas españoles que llegaron al territorio del imperio Inca. A pesar de esto, si los españoles intentaron llevar el pepino dulce a la península, no existe constancia de ello o los intentos no tuvieron éxito. El primer registro de la introducción del pepino dulce en España viene de la expedición botánica

de Ruiz y Pavón a los reinos de Perú y Chile en el siglo XVIII, en la que se hicieron varios envíos de plantas y semillas. A raíz de estos, el cultivo aparece en los catálogos del Jardín Botánico de Madrid de 1785 y en los del Jardín Botánico de Tenerife. Mientras que en la península no se extendió, en las Canarias el cultivo se adoptó con facilidad y sigue a día de hoy. Además, es más que probable que alguno de los envíos de esta expedición llegara a Francia, donde Aiton le dio su nombre científico actual. En la actualidad, los países donde el pepino dulce se cultiva comercialmente son principalmente Chile y Nueva Zelanda, donde se introdujo en 1906 y se han desarrollado variedades adaptadas a sus condiciones de cultivo (Nuez y Ruiz, 1996; Prohens *et al.*, 1996).



**Figura 2.** Representación cerámica de frutos del pepino dulce de la cultura Moche. Museo Arqueológico Rafael Larco Herrera.

La poca extensión del cultivo del pepino dulce es sorprendente, pues sus frutos son muy atractivos por su sabor y aromas frescos y agradables, similares a los del melón, y su aspecto y color son llamativos. Los frutos maduros son de color amarillento con jaspes y con vetas longitudinales de color morado (Figura 3). Aunque su valor nutritivo es escaso, tienen propiedades diuréticas, seguramente por su alto contenido en agua (puede llegar a más del 92 %), un bajo contenido calórico y alto contenido en potasio, vitamina C, y carotenoides (Di Scala *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2011; Rodríguez-Burruezo *et al.*, 2011). También se le han descrito propiedades nutraceuticas (alto contenido en compuestos vegetales complejos con efectos beneficiosos para la salud) que hacen que sea interesante como “alimento funcional”. El pepino dulce tiene un elevado contenido en polifenoles y flavonoides (Sudha *et al.*, 2012), y se le ha atribuido una actividad anti-diabética considerable (Hsu *et al.*, 2011; Orhan *et al.*, 2014).

Algunos aspectos que pueden contribuir a su cultivo limitado son su ciclo de cultivo y producción de frutos no agrupada. En zonas templadas como la nuestra sería interesante obtener variedades con un ciclo de cultivo más corto para obtener frutos maduros antes del verano, mientras que en zonas más frías interesa obtener frutos antes de las heladas. Por otra parte, al no madurar los frutos de forma agrupada la recolección puede alargarse durante varios meses, lo que repercute negativamente en los costes del cultivo y en la producción. En ambos casos existen fuentes de variabilidad genética que se pueden aprovechar para solucionar o paliar estos problemas, como es el caso de una variedad desarrollada a partir de un cultivar chileno mutante

cuya precocidad permite su cultivo en el norte de Estados Unidos (Gomberoff, 1991; Prohens, 1997).



**Figura 3.** Frutos de *S. muricatum* maduros.

En definitiva, el pepino dulce es un cultivo prometedor para su introducción en el mercado agrícola a nivel mundial. Su aspecto atrayente, sus características organolépticas, sus propiedades beneficiosas y sus variados usos culinarios hacen del pepino dulce un cultivo atractivo para el público general y, además, sus especies cercanas suponen una fuente considerable de variación genética para la mejora del cultivo.

La existencia de especies cercanas al pepino dulce, con diferentes sistemas reproductivos, proporciona unos importantes recursos para el estudio de los mecanismos de incompatibilidad en esta sección dentro las Solanáceas. Igualmente, permite su comparación con otras especies de Solanáceas mucho más estudiadas como el tomate. Conocer los mecanismos que rigen los sistemas de incompatibilidad en las especies silvestres de la sección *Basarthurum* facilitará el uso de estos recursos fitogenéticos en programas de mejora del pepino dulce.

## **1.2. Barreras de cruzabilidad**

Muchas plantas con flor (Angiospermas) han desarrollado mecanismos para favorecer la variabilidad genética y prevenir la auto-polinización, evitando la depresión consanguínea. Entre estos se incluyen la separación física (hercogamia) o temporal (dicogamia) de los intermediarios en la reproducción sexual. Sin embargo, en la mayor parte de los casos las especies son hermafroditas y homomórficas, por lo que en ellas operan sistemas de rechazo del polen basados en interacciones proteína-proteína, en los que el pistilo rechaza el polen propio (genéticamente idéntico) pero permite el crecimiento del tubo polínico genéticamente diferente. De entre ellos, los más comunes son los controlados por un único locus multialélico, el locus-S, que presenta dos regiones codificantes principales que se expresan en el pistilo (determinante femenino) o en el polen (determinante masculino). Existen numerosos alelos diferentes de ambos determinantes en una población, dando lugar a poblaciones de individuos con haplotipos-S diferentes. En su forma más sencilla, la interacción entre un determinante femenino y uno masculino del mismo haplotipo desencadena el mecanismo de SI, mientras que

la interacción de dos determinantes de distinto haplotipo permite el avance de la polinización (Franklin *et al.*, 1995).

Los mecanismos de SI se dividen comúnmente en SI gametofítica (GSI) y SI esporofítica (SSI), según si el fenotipo SI del polen está determinado por el gametofito o el esporofito. Se han descrito otros mecanismos de SI, como la GSI controlada por 2 loci o la SI heteromórfica, pero están limitados a taxones concretos y están mucho menos estudiados (de Nettancourt, 2001).

La GSI está presente en familias muy alejadas filogenéticamente como las Solanáceas, Rosáceas, Plantagináceas y Rubiáceas. En este mecanismo el fenotipo SI del polen (el gametofito masculino) lo determina su genotipo haploide. En estas familias el producto del determinante femenino es una RNasa, denominada S-RNasa, mientras que el producto del locus-S masculino es una proteína con un motivo F-box en su extremo N-terminal (Sijacic *et al.*, 2004). La interacción entre determinantes masculinos y femeninos del mismo alelo de SI activa la S-RNasa, degradando el RNA ribosómico del tubo polínico (Franklin-Tong y Franklin, 2003). Aunque es el mecanismo más extendido, la GSI basada en S-RNasas no es el único tipo de GSI. En las Papaveráceas el mecanismo se incluye dentro de la GSI pero a nivel bioquímico es completamente distinto (Franklin-Tong y Franklin, 2003).

### 1.3. La auto-incompatibilidad gametofítica basada en S-RNasas

La GSI basada en S-RNasas fue descrita por primera vez por Bredemeijer y Blaas (1981), y en subsiguientes estudios se observó que familias distintas conservaban el patrón del mecanismo, con dos genes multialélicos, pero con genes S completamente distintos entre sí (Foote *et al.*, 1994), lo que sugiere que los sistemas de GSI evolucionaron de forma independiente más de una vez. De hecho, algunos autores proponen la GSI y otros mecanismos de SI como factores cruciales en el éxito evolutivo de las angiospermas (Olmstead, 1989; Zavada, 1984).

En Solanáceas la GSI actúa mediante el mecanismo de la S-RNasa, que es el determinante femenino. La S-RNasa se expresa exclusivamente en el pistilo, fundamentalmente en el segmento superior del estilo. Al reconocer un grano de polen con un determinante masculino del mismo haplotipo-S la S-RNasa degrada el RNA del tubo polínico, impidiendo la autofecundación. Las secuencias de las S-RNasas de distintas Solanáceas son considerablemente variables entre sí, con una identidad de secuencia de aminoácidos variable entre el 38% y el 98%, pero contienen cinco regiones altamente conservadas que tienen función catalítica. Dos de ellas, C2 y C3, son muy similares a la RNasa fúngica T2 y contienen residuos de histidina catalíticos. En las S-RNasas de Solanáceas hay también dos regiones hipervariables, HVa y HVb, que en la conformación nativa de la proteína se encuentran espacialmente cercanas y localizadas en la superficie molecular (Ida *et al.*, 2001), lo que sugiere su participación en la interacción con el determinante masculino. La importancia de las regiones hipervariables en la determinación de la especificidad de cada haplotipo-S se comprobó con experimentos de intercambio de dominios en *S. chacoense*, donde el intercambio de las regiones HVa y HVb de plantas  $S_{11}$ -RNasa por los de plantas  $S_{13}$ -RNasa, que diferían en solo 4 aminoácidos, resultaba en que las plantas transformada adquirirían fenotipo  $S_{13}$ , rechazando polen  $S_{13}$  pero no polen  $S_{11}$  (Matton *et al.*, 1997).

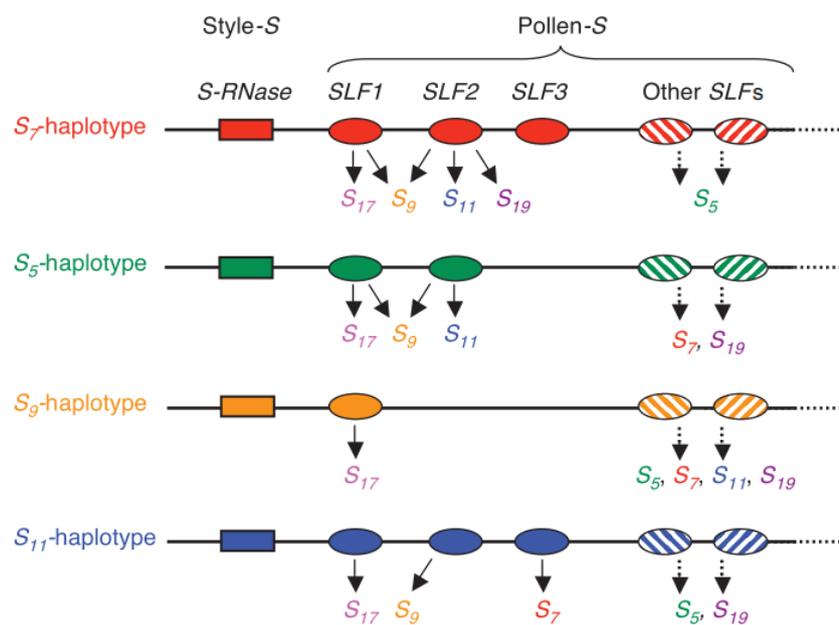
Los genes de las S-RNasas de Solanáceas presentan un intrón en la región HVa. Este intrón también es una zona muy variable, y es habitual que los intrones de S-RNasas de distintos alelos-S tengan distinto tamaño. Esto se ha aprovechado para desarrollar estrategias de genotipado de alto rendimiento de alelos de incompatibilidad, basadas en la medida del tamaño del intrón, tanto en Rosáceas (Romero *et al.*, 2004; Sonneveld *et al.*, 2006) como en Solanáceas (Miller y Kostyun, 2011).

La identificación del determinante masculino de la GSI en Solanáceas presentó numerosas dificultades, ya que la estructura de la región del locus-S, en la región subcentromérica y rodeada por numerosas secuencias repetitivas, dificultó su análisis genómico. Finalmente el determinante masculino se identificó mediante el análisis de una región de 328 kb de *Petunia inflata* clonada en un clon BAC (Bacterial Artificial Chromosome) que contenía la secuencia codificante de una  $S_2$ -RNasa. A 161 kb aguas abajo de la S-RNasa se encontró un ORF que denominaron *PiSLF<sub>2</sub>*, cuya proteína predicha contenía un motivo F-box que cumplía todas las condiciones para ser el determinante masculino: estaba localizada en la región del locus-S, presentaba una diversidad específica de haplotipo elevada y se expresaba específicamente en polen. La hipótesis se demostró mediante experimentos de transformación, transformando plantas  $S_1S_1$ ,  $S_1S_2$  y  $S_2S_3$  con el alelo  $S_2$  de *PiSLF<sub>2</sub>*. Por el fenómeno conocido como “interacción competitiva”, que ocurre cuando una planta SI posee dos haplotipos-S (bien por una duplicación o bien porque se hayan convertido en tetraploides), los granos de polen que contienen dos alelos-S distintos superan la barrera de la SI, mientras que los que tienen dos alelos-S iguales no la superan. Al autopolinizarse las plantas transformadas, el polen que portaba el transgén con el alelo  $S_2$  de *PiSLF<sub>2</sub>* superaba la barrera de la SI, y las plantas pasaban a ser auto-compatibles. Además, se observó que solo los granos de polen  $S_1$  y  $S_3$  con el transgén *PiSLF<sub>2</sub>*, pero no los granos de polen  $S_2$  con el transgén *PiSLF<sub>2</sub>*, se convertían en SC. Este experimento demostró que *SLF/SFB* (S-Locus F-box/S-haplotype-specific F-Box), más tarde rebautizado como *SLF1*, es el determinante masculino de la GSI en Solanáceas (Sijacic *et al.*, 2004).

No obstante, resultados posteriores confirmaron que *SLF1* es, efectivamente, el determinante masculino, pero que no es el único que actúa en el reconocimiento entre polen y pistilo. Por una parte, la diversidad de secuencia entre distintos alelos de *SLF1* es mucho menor que la presente en los mismos alelos de la S-RNasa, algo sorprendente debido a que alelos de SI nuevos tienden a aumentar de frecuencia en una población y, por tanto, la diversidad de alelos de ambos determinantes debería ser alta. Además, en experimentos de transformación similares a los de Sijacic *et al.* (2004) también en *P. inflata*, la transformación de  $S_3$ -*SLF1* en plantas  $S_2S_3$  no rompía la auto-incompatibilidad del polen  $S_2$ , y la transformación con  $S_7$ -*SLF1* rompía la SI en algunos alelos pero no en otros. Adicionalmente, se observó que la secuencia de aminoácidos de los alelos  $S_7$ -*SLF1* y  $S_{19}$ -*SLF1* era idéntica, siendo las secuencias aminoacídicas de las  $S_7$ - y  $S_{19}$ -RNasas eran solo un 45 % idénticas y comprobando mediante cruzamientos que los haplotipos  $S_7$  y  $S_{19}$  son distintos en cuanto a control genético de la SI (Kubo *et al.*, 2010). Estos resultados por una parte confirman la implicación de *SLF1* en la SI pero por otra parte indican que no es el único determinante masculino.

Este modelo denominado *Collaborative Non-Self Recognition Model* propone la participación de distintas proteínas SLF en la especificidad SI del polen: para un haplotipo-S determinado, cada tipo de proteína SLF reconoce un subconjunto de S-RNasas, mediando su ubiquitinación y

degradación, y se requieren distintos tipos de proteínas SLF para reconocer todas las S-RNAs no-propias. Además, ninguna de las proteínas SLF de un haplotipo-S interactúa con ninguna S-RNasa propia (Figura 4). Se demostró experimentalmente que una proteína SLF determinada reconoce un subconjunto concreto de S-RNAs no-propias, mediante la expresión de una proteína de fusión  $S_7$ -SLF2:FLAG en polen transgénico y co-inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-FLAG. Se observó que  $S_7$ -SLF2:FLAG co-precipitaba con la  $S_9$ -RNasa y la  $S_{11}$ -RNasa, pero no con la  $S_5$ -RNasa ni la  $S_7$ -RNasa. También se comprobó que la expresión de  $S_7$ -SLF2 rompía la SI en polen  $S_9$  y  $S_{11}$ , pero no en polen  $S_5$  ni  $S_7$ . Esto explica, por ejemplo, porqué la expresión de  $S_3$ -SLF1 en plantas  $S_2S_3$  no rompe la SI del polen  $S_2$ , y porqué las secuencias de las SLF no son tan divergentes como las de las S-RNAs, ya que el reconocimiento colaborativo hace que cada proteína SLF solo tenga que interactuar con unas pocas S-RNAs (Kubo *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Modelo esquemático del Collaborative Non-Self Recognition Model en *Petunia*. Los SLFs de cada haplotipo-S aparecen conectados por flechas a las S-RNAs con las que interactúan. Los SLFs de la derecha todavía no se han descrito. Fuente: Kubo *et al.*, 2010.

En cuanto al mecanismo de actuación de las proteínas SLF, las proteínas F-box promueven la degradación de otras proteínas por la vía de degradación mediada por ubiquitina y por el proteosoma 26S (Craig y Tyers, 1999), sugiriendo que al reconocer e interactuar una proteína SLF con una S-RNasa no-propia se produce la degradación de esta última, permitiendo el avance del tubo polínico.

A día de hoy aún quedan muchos aspectos por dilucidar en la SI basada en S-RNAs. Por ejemplo, el mecanismo de entrada de las S-RNAs al tubo polínico para que puedan ejercer su efecto citotóxico, un paso crucial en el sistema, sigue sin conocerse. En el crecimiento del tubo polínico participan numerosos eventos de endocitosis, exocitosis y transportadores de membrana, como en la toma de SCA (stigma/stylecysteine-rich adhesin), una proteína que guía el crecimiento del tubo polínico hasta el ovario y que se internaliza mediante endocitosis dependiente de clatrina (Chae *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006). Los principales candidatos para la

introducción de las S-RNasas en el tubo polínico son los transportadores ABC (ATP-Binding Cassete), transportadores activos que consumen ATP y que participan en procesos muy diversos tanto como exportadores o importadores. Recientemente, se demostró en manzana (*Malus doméstica*), perteneciente a la familia de las Rosáceas, que uno de estos transportadores, MdABCF, participa de forma clave en la importación de las S-RNasas. MdABCF se localiza en la membrana del tubo polínico, interacciona con las S-RNasas tanto propias como no-propias y su silenciamiento impedía la entrada de las S-RNasas al tubo polínico (Meng *et al.*, 2014). Otros aspectos todavía por estudiar en profundidad son la formación de complejos entre distintas proteínas SLF o la ruta de degradación exacta de las S-RNasas no-propias en el tubo polínico (Williams *et al.*, 2015).

#### 1.4. Ejemplos de auto-compatibilidad

La transición de auto-incompatibilidad a auto-compatibilidad (la ruptura de la SI) es una de las transiciones evolucionarias más comunes en angiospermas, documentada en muchas especies diferentes. Esta transición es habitual en las poblaciones localizadas en los límites del rango geográfico de la especie o en islas oceánicas (Busch, 2005). En estas condiciones, en ausencia de polinizadores o con dificultad para la polinización cruzada, una mutación que rompa la SI se extenderá eventualmente a toda la población.

Un ejemplo de pérdida de la SI en Solanáceas es el de las nueve especies de la sección *Lycopersicon*, que incluye el tomate cultivado (*S. lycopersicum*) y especies silvestres relacionadas. Cinco de estas especies son SC, incluyendo el tomate cultivado, mientras que las otras cuatro son SI (Bretó *et al.*, 1993). La pérdida de la SI parece haber evolucionado de forma independiente entre las especies, pues la SC tiene un origen molecular distinto en especies distintas. Por ejemplo, en *S. peruvianum* la secuencia de la S-RNasa del alelo  $S_C$  presenta una mutación puntual que da lugar a la sustitución de la histidina de la posición 33 de la proteína por asparagina. Esta histidina es una de los dos histidinas catalíticas conservadas entre todas RNasas de la familia T2, entre las que se incluyen las S-RNasas (Royo *et al.*, 1994). En cambio, en *S. lycopersicum* la pérdida de la SI está asociada a cambios tanto en la S-RNasa como en la proteína HT, accesoria al mecanismo de SI (Kondo *et al.*, 2002).

El cultivar siciliano “Kronio” de cerezo dulce (*Prunus avium*), de la familia de las Rosáceas, presenta el genotipo de incompatibilidad  $S_5S_6$ , que se ha descrito como auto-compatible de forma natural. El grupo de Marchese *et al.* (2007) caracterizó la causa de la auto-compatibilidad de este genotipo mediante cruces controlados, análisis de S-RNasas, y análisis molecular y secuenciación de los alelos de SI. La auto-fecundación del cultivar “Kronio” fue exitosa en 157 de 400 flores (~39%), mientras que la polinización con el cultivar “Colney”, también de genotipo  $S_5S_6$ , no fue compatible en ninguno de los casos. En cambio, el cruce “Colney”x”Kronio”, utilizando polen de “Kronio”, dio lugar a 6 frutos de 100 flores. El análisis por PCR de los alelos de la progenie de la auto-fecundación de “Kronio” reveló que la segregación de alelos era aproximadamente 1:1  $S_5S_5$  y  $S_5S_6$ , lo que indica que el alelo  $S_5$  está mutado. Dado que el cruzamiento “Kronio”x”Colney” es incompatible y el cruzamiento “Colney”x”Kronio” es compatible, la mutación debe encontrarse en el determinante masculino. La clonación y secuenciación de la  $S_5$ -RNasa y la  $S_6$ -RNasa y su comparación con las S-RNasas de “Colney”

mostró una ligera variación entre las secuencias, pero solo en el intrón, mientras que la clonación y secuenciación de  $S_5$ -SFB y  $S_6$ -SFB reveló un codón de stop prematuro en la secuencia de la  $S_5$ -SFB, debido a una mutación puntual A:G en la posición 972 de la secuencia nucleotídica, que produce la pérdida de 80 aminoácidos en  $S_5$ -SFB (Marchese *et al.*, 2007). Este mecanismo entra en conflicto con el modelo colaborativo, debido a que este no es aplicable al género *Prunus*: en *Prunus* solo existe un determinante masculino (el SFB), mientras que en el género *Solanum* hay varios genes SFL en el locus-S, cada uno con especificidades diferentes.

La pérdida de la SI también puede deberse a cambios fuera del locus-S, como es el caso del cultivar "Cristobalina" de *Prunus avium*. Todos los análisis moleculares y cruzamientos realizados apuntaban a que ambos determinantes del locus-S eran funcionales en todos los genotipos auto-compatibles. Aunque todavía no se han sugerido genes candidatos responsables de la pérdida de la SI en este caso, sí se ha encontrado un microsatélite ligado a la SC, que delimita la zona responsable a la parte baja del grupo de ligamiento LG3 del mapa genético disponible para *Prunus avium*. Esta zona del genoma es sinténica con regiones de otras especies donde se localizan locus de SI (Cachi y Wünsch, 2011; Wang *et al.*, 2015).

Como se ha visto, la pérdida de la SI puede tener orígenes muy distintos y que afectan a distintos componentes del sistema.

## **2. Objetivos**

El propósito general de este trabajo es dar una primera aproximación al mecanismo de auto-incompatibilidad del pepino dulce y las especies relacionadas, algo que todavía no se ha estudiado. Con este fin, los objetivos de este trabajo son:

- 1.** Amplificar y secuenciar las S-RNAsas de *S. muricatum* y especies relacionadas de la sección *Basarthrum*.
- 2.** Caracterizar y diferenciar los diferentes alelos de las S-RNAsas de una selección de individuos de cada especie en base a las diferencias de tamaño del intrón de las S-RNAsas.
- 3.** Intentar relacionar el genotipo del locus-S de cada individuo con la compatibilidad o incompatibilidad de cruzamientos dirigidos y auto-fecundaciones realizadas en invernadero.

### **3. Materiales y Métodos**

### 3.1. Material vegetal

Las 64 plantas utilizadas para los ensayos moleculares y los cruzamientos provienen de 9 accesiones del banco de germoplasma del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) de la Universitat Politècnica de València y de la colección de la University of Connecticut (UCONN). Las 9 accesiones corresponden a especies distintas de la serie *Caripense*, incluyendo pepino dulce (*Solanum muricatum*) y especies relacionadas (*Solanum caripense*, *Solanum tabanoense*, *Solanum perlongistylum*, *Solanum catilliflorum* y *Solanum trachycarpum*).

Las plantas se obtuvieron de colecciones de semillas conservadas en bancos de germoplasma (Tabla 2). Para cada entrada se germinaron 15-20 semillas al azar en sustrato húmedo. Se seleccionaron 8 plantas de cada entrada y se trasplantaron en los invernaderos del COMAV en la UPV, con arena como sustrato. Las plantas se condujeron por entutorado con hilos verticales. El riego fue por goteo con fertirrigación. El ciclo de cultivo fue de primavera/verano.

Durante el crecimiento, las planta 37-A pl. 3 y EC-40 pl. 4 se secaron y murieron, mientras que de la entrada EC-26 solamente se obtuvo una planta.

**Tabla 2.** Relación de accesiones empleadas.

Especie	Accesión	Colector	Nº Plantas	Auto-Comp.*
<i>Solanum muricatum</i>	37-A <sup>a</sup>	F. Nuez	7	SC
<i>Solanum muricatum</i>	El Camino <sup>a</sup>	Variedad Comercial	8	SC
<i>Solanum trachycarpum</i>	E-34 <sup>a</sup>	F. Nuez y J. Prohens	8	SC
<i>Solanum catilliflorum</i>	P-80 <sup>a</sup>	F. Nuez y J. Prohens	8	SC
<i>Solanum caripense</i>	EC-40 <sup>b</sup>	F. Nuez y J. Prohens	8	SI
<i>Solanum caripense</i>	E-7 <sup>a</sup>	F. Nuez y J. Prohens	8	SI
<i>Solanum tabanoense</i>	E-257 <sup>a</sup>	F. Nuez y J. Prohens	8	SI
<i>Solanum tabanoense</i>	EC-26 <sup>a</sup>	F. Nuez y J. Prohens	1	SI
<i>Solanum perlongistylum</i>	P-62 <sup>a</sup>	F. Nuez y J. Prohens	8	SI

<sup>a</sup>: Accesiones de la colección de J. Prohens. Semillas conservadas en el banco de germoplasma del COMAV. <sup>b</sup>: Accesiones de la colección de G.J. Anderson. Semillas conservadas en el banco de germoplasma de la UCONN. \* La auto-compatibilidad o auto-incompatibilidad se muestra según lo descrito en la bibliografía (Anderson *et al.*, 2006; Anderson, 1975, 1977).

### 3.2. Extracción de DNA

El DNA genómico para los ensayos moleculares se extrajo a partir de hoja joven antes de trasladar las plantas al invernadero. Se tomaron 50-70 g de material vegetal por planta. El protocolo de extracción utilizado fue el del método CTAB (Doyle y Doyle, 1987).

Mediante un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies) se cuantificó la cantidad de DNA extraído y se evaluó su calidad mediante las relaciones de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm. En aquellos casos en que la cantidad de DNA lo permitió, la concentración se ajustó a 50 ng/μL. La integridad del DNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% tiñendo el DNA con GelRed (Biotium) y revelando el gel con luz UV

mediante un captador de imágenes Gel Doc (BioRad) utilizando el software Quantity One (BioRad).

### 3.3. Diseño de cebadores

Al no disponer de secuencia genómica, los cebadores se diseñaron a partir de alineamientos de genes de S-RNasas de especies relacionadas, que se obtuvieron de las bases de datos NCBI RefSeq (accesión XM\_006347185.1) y Sol Genomics Network (accesión Solyc01g055200.1.1). El software utilizado para los alineamientos fue el Clustal Omega (EMBL-EBI).

Los cebadores se diseñaron con bases degeneradas, con una longitud de unas 20 bp y que tuvieran una temperatura de *annealing* ( $T_m$ ) de entre 50 y 60 °C, utilizando el software Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000).

Se diseñaron cebadores a distintas alturas. Los más externos permitieron amplificar y secuenciar parte del gen, mientras que los más internos que se utilizaron para la amplificación del intrón.

### 3.4. Amplificación de las S-RNasas

Los genes de las S-RNasas se amplificaron a partir del DNA genómico extraído mediante una reacción de PCR. Los componentes que se utilizaron fueron buffer de PCR (Kapa Biosystems),  $MgCl_2$  (Kapa Biosystems), dNTPs (Roche), cebador directo (Integrated DNA Technologies), cebador reverso (Integrated DNA Technologies), KAPA Taq polimerasa (Kapa Biosystems) y agua MilliQ, con los volúmenes y concentraciones indicados en la Tabla 3. Se utilizó un termociclador (Eppendorf Mastercycler) con el programa térmico que también se incluye en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Componentes y programa térmico de la reacción de PCR. La concentración de  $MgCl_2$  y la  $T_m$  variaron en cada reacción entre los rangos indicados.

Componente	Volumen ( $\mu$ L)	Concentración final	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Duración
Agua MilliQ			94	3 min
Buffer PCR	2	1X	94	30 s
$MgCl_2$	x	1.5-2.5 mM	52-58	30 s
dNTPs	0.4	0.2 mM	72	40 s
Cebador directo	0.8	0.4 $\mu$ M	72	10 min
Cebador reverso	0.8	0.4 $\mu$ M	12	$\infty$
Taq polimerasa	0.08	1 U		
DNA	2	~ 100 ng/ $\mu$ L		
<b>Total</b>	20			

Los resultados de la PCR se comprobaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, tiñendo el DNA con GelRed (Biotium) y revelando el gel con luz UV mediante un captador de imágenes Gel Doc (BioRad) utilizando el software Quantity One (BioRad). Se incluyó un marcador peso molecular de 100 bp DNA ladder (NIPPON Genetics) y un control negativo con agua MilliQ en lugar de DNA.

### **3.5. Caracterización de los alelos de las S-RNasas**

Los distintos alelos de las S-RNasas se intentaron diferenciar por el tamaño de su intrón. Para medir la longitud de los fragmentos amplificados, se hizo una *nested* PCR con marcaje fluorescente.

Para el marcaje fluorescente se incluyó en un cebador interno la cola M13 (TGTAACGACGGCCAGT), una secuencia de 18 nucleótidos, en su extremo 5', de forma que los productos de la *nested* PCR se podían marcar con fluoróforos unidos a una cola complementaria a la M13. Para el marcaje M13 se emplearon los fluoróforos FAM (azul), PET (rojo), VIC (verde) y NED (amarillo) (Applied Biosystems).

La longitud de los productos se visualizó con un secuenciador automático ABI/PRISM 3100 (Applied Biosystems), mediante electroforesis capilar, emisión a la longitud de onda de excitación de los fluoróforos y detección de fluorescencia a distintas longitudes de onda.

En la reacción de PCR en lugar de cebadores externos se utilizaron los cebadores más internos (FI-RI), y en lugar de 0.8  $\mu$ L de cebador directo se utilizaron 0.08  $\mu$ L de cebador directo y 0.32  $\mu$ L de cola complementaria a la M13 marcada con fluoróforo. Como DNA a amplificar se utilizó el producto de la primera PCR a una dilución 1:100. En la secuenciación se incluyó un marcador de peso molecular Liz-500 marcado con un fluoróforo naranja (Applied Biosystems). Las lecturas se analizaron con los programas GeneScan (Applied Biosystems) y Genotyper (Applied Biosystems).

### **3.6. Polinizaciones controladas**

Para evaluar la auto-incompatibilidad de cada planta y la compatibilidad cruzada entre plantas de la misma entrada se realizaron cruzamientos y auto-fecundaciones controlados.

Para realizar auto-fecundaciones de las plantas bastó con dejar que siguieran su desarrollo normal, etiquetando cuidadosamente el número inicial de flores cerradas para hacer un recuento del cuajado de fruto. Para evitar posibles polinizaciones con otras plantas en caso de entrada accidental de un insecto polinizador al invernadero se puede embolsar con una bolsa ligera de papel un racimo de flores cerradas, pero esto supone un estrés mecánico, que junto con la falta de corriente de aire puede afectar negativamente al desarrollo y cuajado de la flor. Por este motivo, la mayoría de las auto-fecundaciones se realizaron sin embolsar.

Para realizar cruzamientos controlados se seleccionaron flores todavía cerradas pero que fueran a abrirse en 1-2 días. Las flores se abrieron separando los pétalos y se emasculó la flor, con cuidado de no dañar el estilo (Figura 5). El polen del parental se masculino obtuvo golpeando una flor sobre un portaobjetos. A continuación, el polen se puso en contacto con el estigma de la flor emasculada, quedando retenido en su superficie. Finalmente se etiquetó la flor y, en algunos casos, se embolsó con una bolsa ligera de papel. De nuevo, la mayoría de los cruzamientos se dejaron sin embolsar por el posible daño mecánico a la flor.



**Figura 5.** Preparación de una flor de *S. muricatum* para una polinización manual. **a)** Racimo con flores cerradas en su extremo. **b)** Flor aislada y abierta. **c)** Flor emasculada, preparada para recibir polen en el estigma.

## **4. Resultados y Discusión**



Debido a la presencia de regiones conservadas en las S-RNAs de distintas especies, se pudieron diseñar cebadores con un máximo de dos nucleótidos degenerados respecto al alineamiento, con una longitud de alrededor de 20 nucleótidos y con una temperatura de *annealing* ( $T_m$ ) similar (Ver Tabla 4). Se diseñaron 6 cebadores distintos, 3 directos y 3 reversos, para probar distintas combinaciones de cebadores y averiguar cuál funcionaba mejor.

Al cebador FI se le añadió en su extremo 5' una secuencia adicional de 18 nucleótidos, la cola M13 (TGTAACGACGGCCAGT), que más adelante se utilizó para marcar por fluorescencia los productos amplificados, según el método de Schuelke (2000).

**Tabla 4.** Cebadores seleccionados, su tamaño y su  $T_m$ .

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño (bp)	$T_m$ (°C)
<b>FE</b>	ACWTGGCCACCATCMTTTTGC	21	57.7
<b>RE</b>	TCGCATGTWYACTTTGACGAC	22	54.5
<b>F3</b>	GATTCACGGTCTTTGGCCSGA	21	57.1
<b>R3</b>	GGTAWAACATATGCCTATCTC	22	50.2
<b>FI</b>	M13-ACGATTCACGGTCTTTGGCCSGA	(18)+23	68.5
<b>RI</b>	TATCTTTAAGYGCAWGGCTA	21	50.6

#### 4.2. Optimización de la amplificación de las S-RNAs

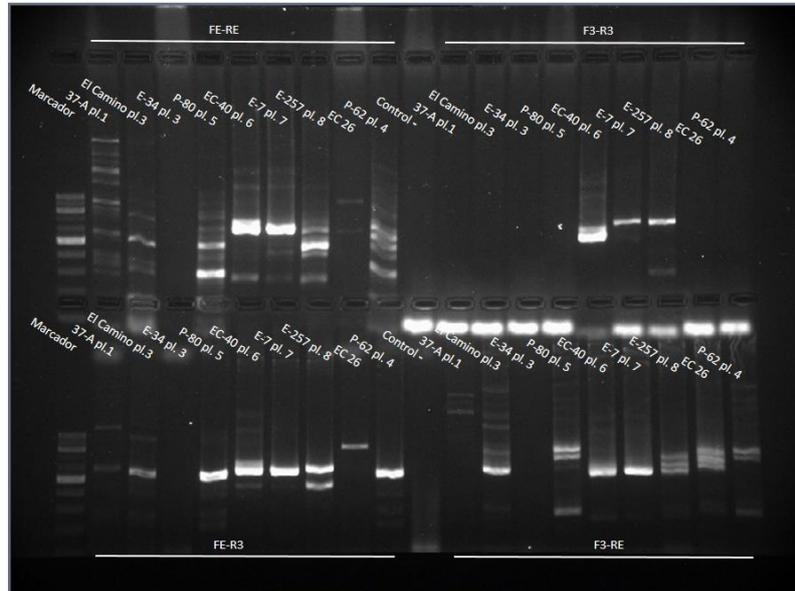
Debido a los cebadores degenerados y al desconocimiento de la secuencia exacta de las S-RNAs de las distintas especies, la reacción de PCR se optimizó probando distintas combinaciones de cebadores, temperaturas de *annealing* y concentraciones de  $MgCl_2$ .

Tanto la  $T_m$  como la concentración de  $MgCl_2$  influyen en la especificidad de la reacción de PCR. Ambos parámetros se optimizaron de forma que las condiciones de la reacción fueran lo suficientemente restrictivas como para no amplificar productos inespecíficos pero que se amplificara un producto de unas 400-500 bp, la longitud estimada del fragmento en base a lo caracterizado en otras especies.

En los primeros ensayos se observó en muchos casos la amplificación de productos inespecíficos. Para intentar maximizar la amplificación de las S-RNAs, se decidió hacer una *nested* PCR en dos pasos, realizando una primera amplificación con cebadores externos, y a partir de los productos de esta una segunda amplificación con cebadores más internos.

Para escoger los cebadores externos se hicieron cuatro reacciones de PCR en condiciones medianamente restrictivas ( $T_m = 52^\circ C$ , concentración de  $MgCl_2 = 2mM$ ), cada una con un individuo representativo de cada entrada (9 individuos en total) y con distintas combinaciones de los cebadores externos (FE, RE, F3 y R3). El resultado de la electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de PCR se muestra en la Figura 7. Se observó el efecto que tiene el usar unos cebadores u otros sobre los productos amplificados. La PCR con los cebadores FE-RE destacó especialmente por la cantidad de bandas inespecíficas, mientras que la PCR con la combinación F3-R3 fue demasiado restrictiva y no amplificó nada en varias entradas. De las dos combinaciones restantes, FE-R3 fue la que dio mejor resultados, con bandas intensas y definidas en la mayoría de las entradas.

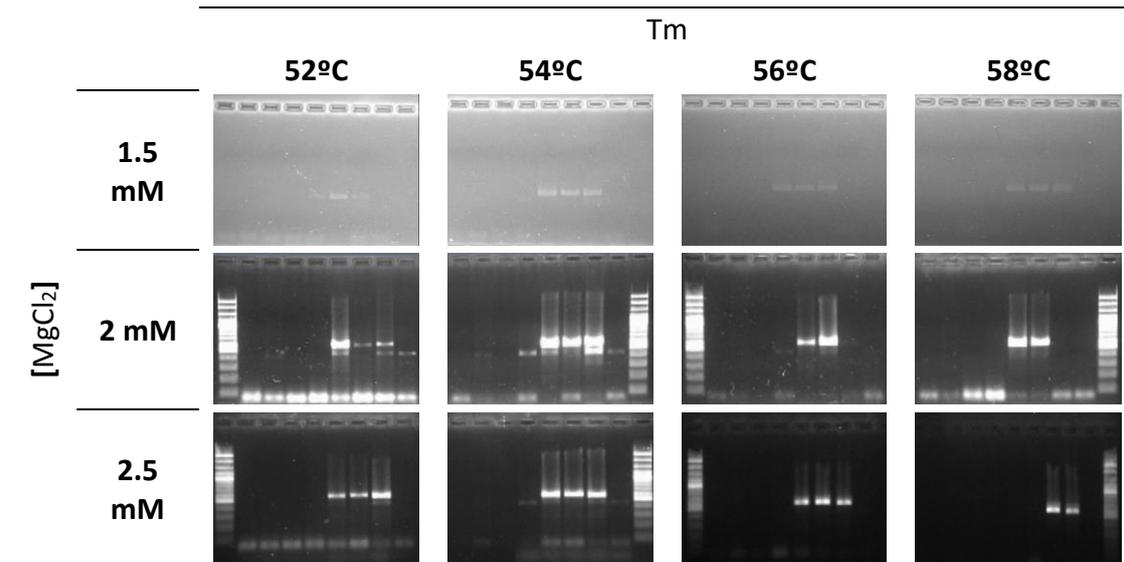
Esto se debió probablemente a diferencias entre las secuencias de los distintos cebadores y a las diferencias entre las secuencias de las distintas S-RNAs que se observaron más adelante cuando se secuenciaron las S-RNAs. Por cuestión de complementariedad, los cebadores hibridaron mejor con unas secuencias que con otras.



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa de la PCR para optimizar la combinación de cebadores. Cada carril corresponde a, de izquierda a derecha, 37-A pl. 1, El Camino pl. 3, E-34 pl. 3, P-80 pl. 5, EC-40 pl. 6, E-7 pl. 7, E-257 pl. 8, EC-26 y P-62 pl. 4. Se incluyen un marcador de peso molecular y controles negativos.

Una vez seleccionada la combinación de cebadores más adecuada, se optimizaron la  $T_m$  y la concentración de  $MgCl_2$ . Para ello, se llevaron a cabo 12 reacciones de PCR con los cebadores FE-R3, cada una con distinta  $T_m$  (52, 54, 56 o 58 °C) y concentración de  $MgCl_2$  (1.5, 2 y 2.5 mM).

La combinación de  $T_m$  y concentración de  $MgCl_2$  que mejor funcionó fue 52°C y 2 mM (Figura 8). Aunque la cantidad de producto de amplificación específico fue muy variable entre plantas, la PCR con estas condiciones dio lugar a bandas definidas en la mayoría de las entradas. En las plantas representativas de *S. muricatum* (37-A pl. 1, El Camino pl. 3) y de *S. catilliflorum* (P-80 pl. 5) las bandas fueron muy poco apreciables, pero lo suficientemente intensas para la re-amplificación con los cebadores internos.



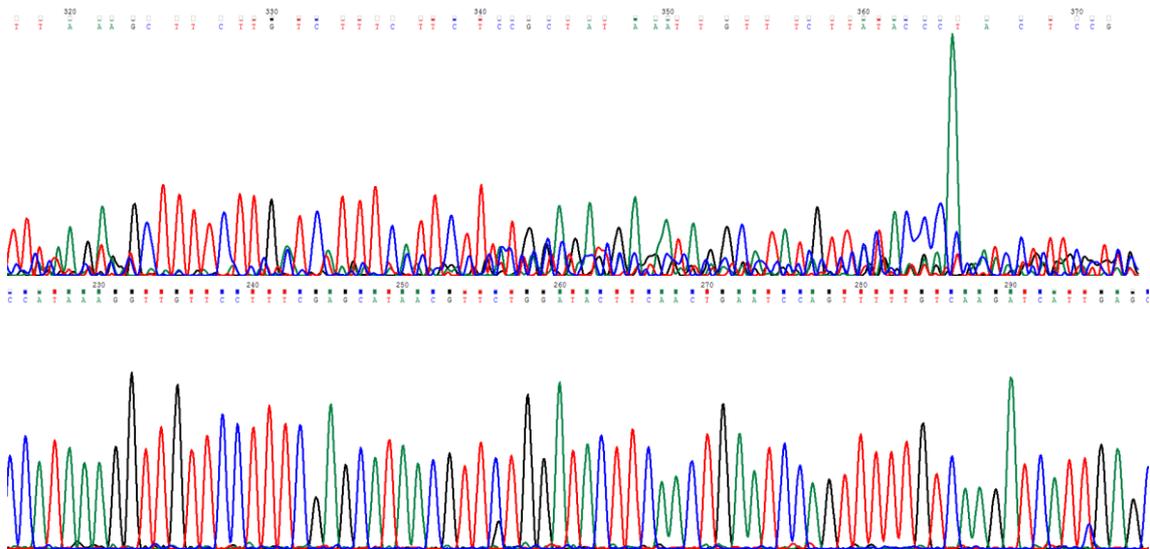
**Figura 8.** Combinación de temperatura de annealing ( $T_m$ , °C) y concentración de cloruro de magnesio ([MgCl<sub>2</sub>], mM) de las distintas PCRs. El DNA de cada carril corresponde a, de izquierda a derecha, 37-A pl. 1, El Camino pl. 3, E-34 pl. 3, P-80 pl. 5, EC-40 pl. 6, E-7 pl. 7, E-257 pl. 8 y P-62 pl. 4.

Se observó que en general la amplificación de las S-RNAsas fue mucho menor en las entradas descritas como SC (37-A pl. 1, El Camino pl. 3, P-80 pl. 5) y en la previamente descrita como SI *S. perlongistylum* (P-62 pl. 4), que en las entradas SI (EC-40 pl. 6, E-7 pl. 7 y E-257 pl. 8). Esto sugiere que la causa de la auto-compatibilidad en las especies SC podría deberse a algún cambio en los genes de las S-RNAsas de las especies.

#### 4.3. Secuenciación de las S-RNAsas

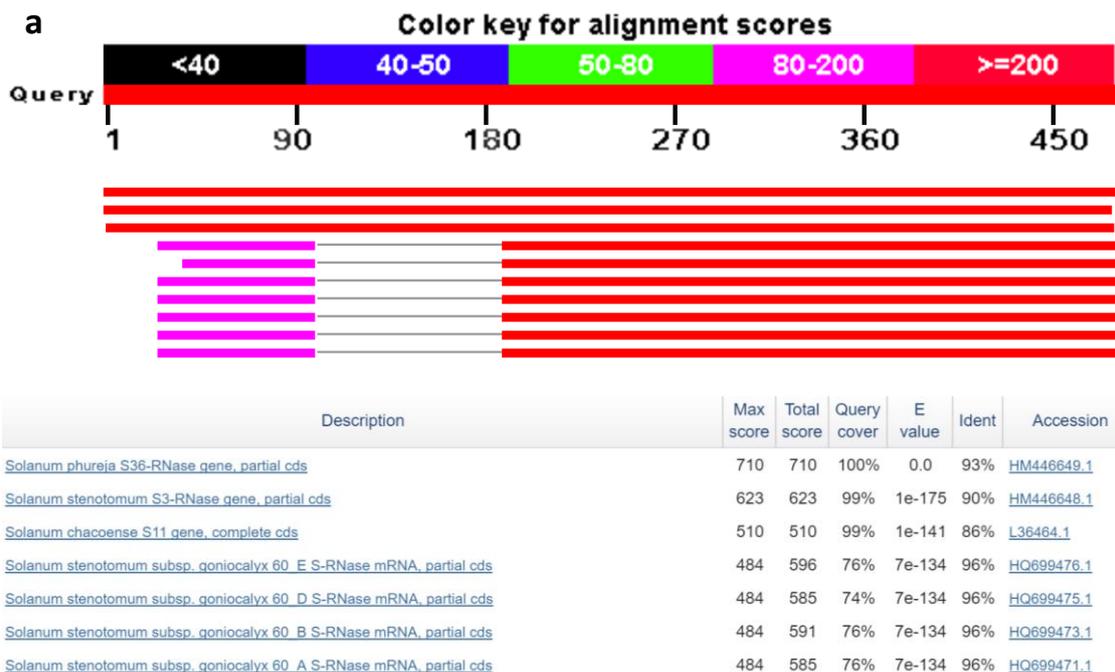
Para comprobar que la secuencia que se amplificó se trataba realmente de la *S-RNasa* se secuenciaron los productos de la PCR con las condiciones seleccionadas. Las secuencias se leyeron en las dos direcciones, utilizando los cebadores FE y R3, para obtener una secuencia consenso. El distinto tamaño del intrón de los alelos hizo que hubiera un desfase en la secuenciación a partir de la zona en que sus longitudes difieren. La lectura por ambos extremos permitió obtener una secuencia fiable de las zonas codificantes.

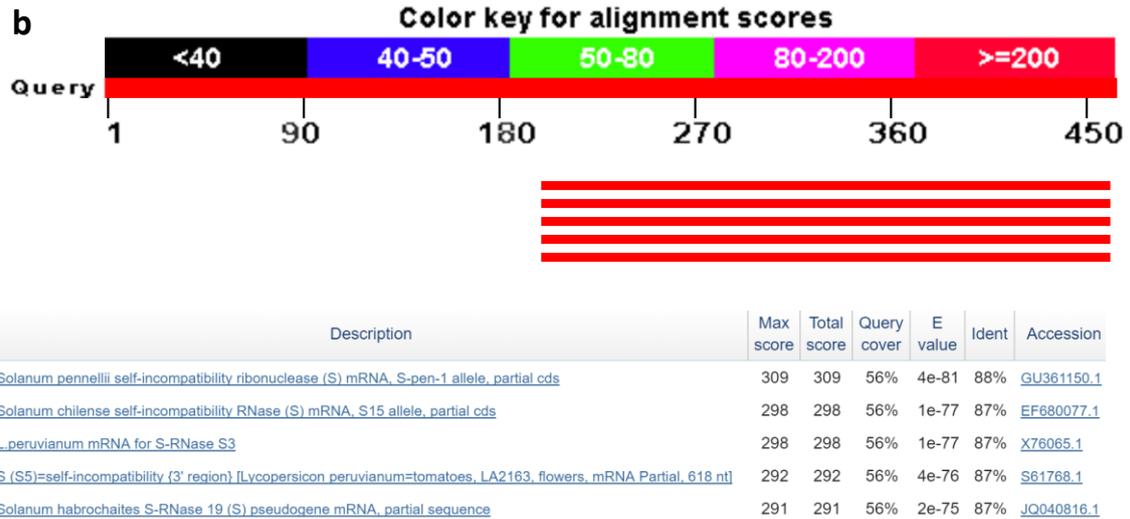
Los individuos que se secuenciaron fueron P-80 pl. 5, EC-40 pl. 6, E-7 pl. 7, E-257 pl. 8 y P-62 pl. 4. Solo se pudieron secuenciar con éxito los individuos EC-40 pl. 6, E-7 pl. 7 y E-257 pl. 8. El resto de los cromatogramas que se obtuvieron no tenían calidad suficiente para proporcionar una secuencia fiable, probablemente debido a un bajo éxito en la amplificación (Figura 9).



**Figura 9.** Arriba: Cromatograma de la secuenciación de P-80 pl. 5. Se puede observar el desfase y el alto fondo de la secuenciación. Abajo: Cromatograma de la secuenciación de EC-40 pl. 6, donde se puede apreciar la calidad de la lectura.

Las secuencias obtenidas de las entradas EC-40, E-7 (*S. caripense*) y E-257 (*S. tabanoense*) se incluyen en el Anexo 1. Una búsqueda de alineamiento con el software BLASTn (NCBI) contra la base de datos no redundante del NCBI confirmó que se estaban amplificando las S-RNasas. Para las dos entradas de *S. caripense* los mejores alineamientos fueron con S-RNasas de *S. phureja*, *S. chacoense* y *S. stenotomum*, tres especies relacionadas con la patata (*S. tuberosum*), y con las secuencias más similares hubo homología incluso en la zona del intrón. La secuencia obtenida de *S. tabanoense* alineó con solo cinco accesiones de la base de datos, todas ellas S-RNasas de especies de la sección *Lycopersicon*, relacionadas con el tomate, y los alineamientos solo incluyeron el exón 2 (Figura 10).





**Figura 10. a)** Resultado de los mejores alineamientos del BLASTn con la secuencia de la S-RNasa de EC-40 (*S. caripense*). El resultado de la entrada E-7 fue muy similar. **b)** Los cinco alineamientos encontrados en el BLASTn de la secuencia obtenida de E-257 (*S. tabanoense*).

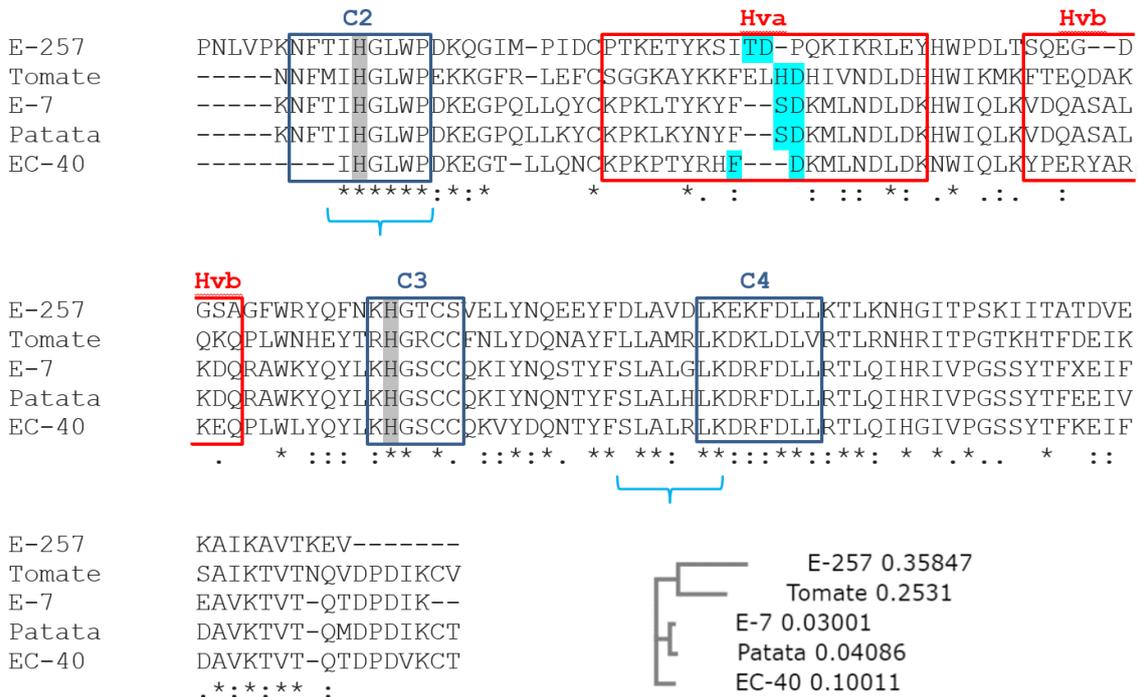
En las secuencias obtenidas se incluía la zona de hibridación de los cebadores internos que se utilizaron más adelante en la *nested* PCR. Como se observa en la Figura 11, los cebadores, aun siendo degenerados, no hibridan con las S-RNasas con total complementariedad, sino que presentan múltiples desapareamientos. La secuencia obtenida para la entrada E-257 de *S. tabanoense* es especialmente divergente respecto a los cebadores, con 6 nucleótidos diferentes en el cebador interno directo y 4 en el cebador interno reverso. Esto fue probablemente un factor decisivo en la dificultad de la amplificación de las S-RNasas.



**Figura 11.** Zona de hibridación de los cebadores FI y RI con los genes de las S-RNasas secuenciadas. Los nucleótidos que coinciden entre secuencia y cebador aparecen en azul, y los nucleótidos que no coinciden se resaltan en rojo.

Alineando las S-RNasas traducidas a proteína a partir de las secuencias obtenidas con las secuencias de tomate y patata utilizadas para el diseño de cebadores, y basándose en los alineamientos de un gran número de S-RNasas de distintas especies del género *Solanum* realizados por Brisolará-Corrêa *et al.* (2015), se pudieron delimitar las características estructurales de los fragmentos amplificados (Figura 12).

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

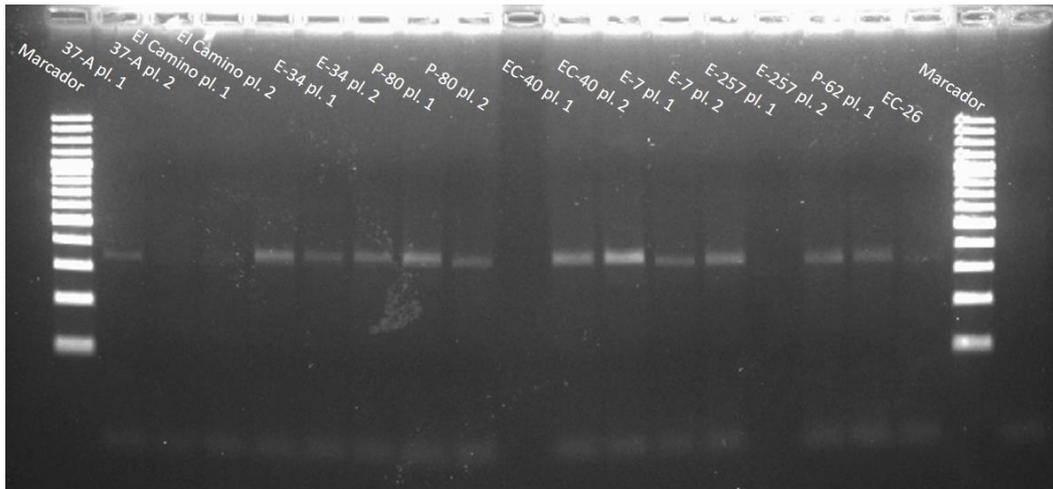


**Figura 12.** Alineamiento múltiple de las proteínas traducidas a partir de las secuencias obtenidas y las secuencias de tomate y patata utilizadas para el diseño de cebadores. Se indican las regiones conservadas (C2, C3 y C4) y las hipervariables (Hva y Hvb). Los corchetes en azul indican la zona donde hibridan los cebadores internos en la secuencia nucleotídica, los aminoácidos resaltados en azul delimitan el principio y el final del intrón y las histidinas catalíticas conservadas están resaltadas en gris. También se incluye un árbol de distancia genética entre las secuencias.

#### 4.4. Caracterización de los alelos de las S-RNasas

Una vez optimizadas las condiciones de la primera amplificación, se realizó una PCR de las 64 plantas con los cebadores FE-R3, a una Tm de 52°C y con una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2 mM. El producto de esta reacción se diluyó 1:100 con agua MilliQ y se utilizó como DNA molde para realizar la *nested* PCR. La reacción se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa, con los resultados esperados.

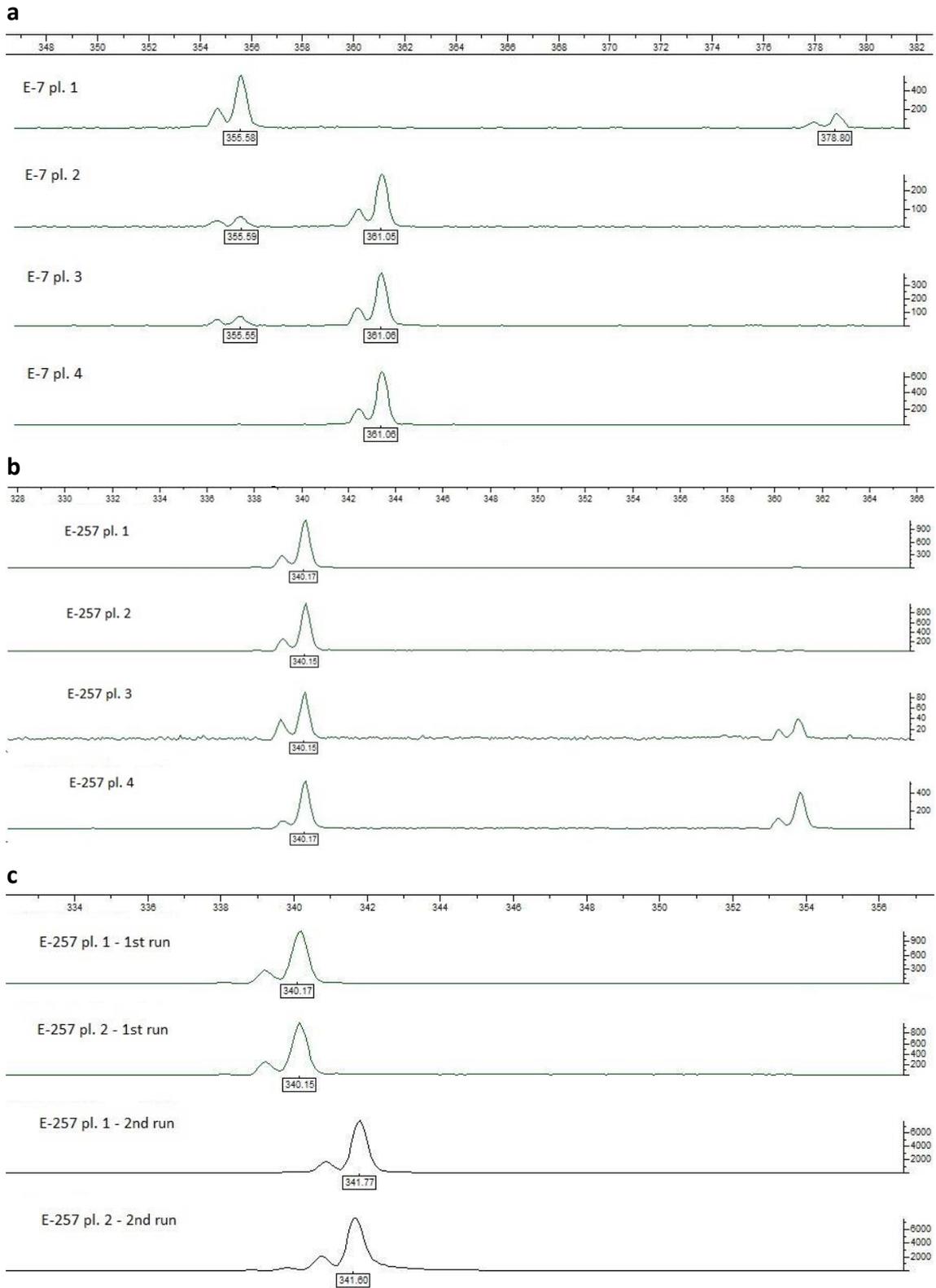
En primer lugar se probó la reacción con los cebadores FI-RI con 16 individuos representativos de todas las entradas, con una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2 mM y a una Tm de 56°C. Además, se incluyó el oligo complementario a la cola M13 marcado con el fluoróforo FAM, para que las condiciones fueran las mismas que en la PCR de marcaje final. Se corrió un gel de electroforesis para comprobar que la amplificación con los cebadores internos hubiera funcionado, con resultados positivos (Figura 13).



**Figura 13.** *Nested* PCR de las entradas, de izquierda a derecha, 37-A pl. 1 y pl. 2, El Camino pl. 1 y pl. 2, E-34 pl. 1 y pl. 2, P-80 pl. 1 y pl. 2, EC-40 pl. 1 y pl. 2, E-7 pl. 1 y pl. 2, E-257 pl. 1 y pl. 2, P-62 pl. 1 y EC-26. Aunque la cantidad de producto amplificado fue variable, en todas las entradas se consiguió amplificar la banda deseada.

Para caracterizar los alelos de las S-RNasas de cada planta se utilizó la metodología descrita por Schuelke (2000). Se hizo una *nested* PCR con todas las plantas para marcar con fluorescencia los productos de amplificación, aprovechando la cola M13 del cebador FI. Cada PCR individual se marcó con uno de los fluoróforos disponibles (FAM, PET, VIC o NED). Esto permitió medir la longitud de fragmentos amplificados de hasta cuatro plantas distintas por pocillo en una electroforesis capilar mediante un analizador de fragmentos.

Tras un primer análisis de fragmentos, en aquellas plantas en las que la intensidad de fluorescencia era demasiado baja o en aquellas en las que hubiera dudas sobre qué picos del electroferograma eran los correctos se repitió el análisis, marcándolas con un fluoróforo distinto. Los resultados del segundo análisis se ajustaron a los de la primera utilizando repeticiones como control interno, pues puede haber un pequeño desfase de unas pocas bases entre análisis (Figura 14).



**Figura 14. a.** Electroferograma de los fragmentos amplificados (intensidad de fluorescencia (u.a) respecto a tamaño de fragmento (bp)). **b.** Diferencia entre los electroferogramas de individuos homocigotos y heterocigotos. **c.** Muestra del desfase de unas pocas bases entre distintos análisis de los mismos individuos.

En la Tabla 5 se muestran los alelos-S identificados para cada planta según el tamaño del fragmento amplificado.

**Tabla 5.** Alelos-S identificados según su tamaño en las plantas descritas auto-compatibles (a) y auto-incompatibles (b). De las plantas E-34 pl. 8, El Camino pl. 7 y P-62 pl. 6 no se obtuvieron picos claros en los electroferogramas. \*\*: P-62 aparece descrita como auto-incompatible, pero en este trabajo los resultados indicaron que era auto-compatible.

**a. Auto-compatibles**

Línea	Planta	Alelos-S	Línea	Planta	Alelos-S
<b>37-A</b> <i>Solanum muricatum</i>	1	342, 360	<b>E-34</b> <i>Solanum trachycarpum</i>	1	342, 363
	2	342		2	342, 363
	4	339		3	342, 363
	5	339, 360		4	342, 363
	6	339, 360		5	342, 363
	7	342		6	342, 363
	8	339, 360		7	342, 363
	8	339, 360		8	342, 363
<b>El Camino</b> <i>Solanum muricatum</i>	1	339, 360	<b>P-80</b> <i>Solanum catilliflorum</i>	1	342, 363
	2	339, 360		2	342, 363
	3	339, 360		3	342, 363
	4	339, 360		4	342, 363
	5	339, 360		5	342, 363
	6	339, 360		6	342, 363
	7	339, 360		7	342, 362
	8	339, 360		8	342, 363

**b. Auto-incompatibles**

Línea	Planta	Alelos	Línea	Planta	Alelos
<b>EC-40</b> <i>Solanum caripense</i>	1	340, 361	<b>E-257</b> <i>Solanum tabanoense</i>	1	342, 363
	2	340		2	342, 363
	3	350, 360		3	342, 363
	4	360		4	342, 363
	5	340		5	342, 363
	6	340		6	342, 363
	7	360		7	342, 363
	8	340		8	342, 363
<b>E-7</b> <i>Solanum caripense</i>	1	356, 379	<b>P-62</b> <i>Solanum perlongistylum</i> **	1	342, 363
	2	356, 361		2	342, 363
	3	356, 361		3	342, 363
	4	361		4	342, 363
	5	356, 361		5	342, 363
	6	356, 379		6	342, 363
	7	356, 361		7	342, 363
	8	356, 361		8	342, 363
<b>EC-26</b> <i>Solanum tabanoense</i>	1	339, 342			

En general, en otras especies SI, se mantiene una amplia diversidad de alelos-S debido a la selección negativa dependiente de la frecuencia en las poblaciones. Los individuos con alelos poco frecuentes tienen una ventaja reproductiva, por lo que en una población en equilibrio se

mantienen la diversidad alélica (Miller y Kostyun, 2011). En primera instancia, si la causa de la pérdida de la SI en las especies auto-compatibles fuera una S-RNasa mutada la presión de selección de los alelos poco frecuentes se perdería, y sería de esperar una baja variabilidad de alelos-S en las especies SC. Efectivamente, se observó que en los 36 individuos de las cinco entradas SC solo aparecían 5 alelos distintos, los alelos 339, 342, 360, 363 y 362. Sin embargo, lo contrario no se cumplió: aunque en las especies SI la variabilidad alélica fue mayor, el número de alelos-S fue menor de lo esperado. Solo se identificaron 9 alelos en 25 individuos de cuatro entradas. En un experimento similar, en un conjunto de 30 individuos de una población SI de *Solanum peruvianum* se identificaron 14 alelos de S-RNAsas distintos (Miller y Kostyun, 2011).

Además, en dicho estudio todos los individuos eran heterocigotos, que es lo que cabría esperar puesto que el sistema de GSI impide que un alelo-S esté en homocigosis. En este trabajo, en cambio, de las 25 plantas SI analizadas 12 fueron homocigotas para el alelo-S. En una población representativa de una generación proveniente de unos pocos cruzamientos debe haber, como mínimo, tres alelos de auto-incompatibilidad, ya que si hubiera solo dos alelos implicaría que todos los parentales tenían el mismo genotipo-S, por lo que serían incompatibles entre sí y el cruzamiento no podría darse. Por este motivo, la baja diversidad de alelos caracterizados en las plantas auto-incompatibles fue inesperada. Estos resultados se discuten más adelante, después de presentar los datos de las auto-fecundaciones y cruzamientos.

Un alelo que apareció muy frecuentemente en homocigosis tanto en entradas SC como en entradas SI es el 342. Apareció en todas las entradas excepto en El Camino y en las entradas de *S. caripense*, y todas las plantas analizadas de *S. trachycarpum*, *S. catilliflorum*, *S. tabanoense* y *S. perlongistylum* lo poseían. Llamó la atención el hecho de que de las 35 veces que apareció, 10 veces estuviera en homocigosis. Debido a esto, el alelo 342 es un buen candidato a estudiar en más profundidad. No obstante, el que estuviera ausente en El Camino podría indicar que no se trate de un alelo responsable de la SC. En 37-A sí estuvo presente, pero 37-A parece provenir de un cruzamiento con alguna especie silvestre, ya que presenta características morfológicas y moleculares a medio camino entre el pepino dulce y especies silvestres (Herráiz, 2016). Estos resultados son acordes con la idea del origen silvestre, en parte, de 37-A. Que el alelo 342 apareciera en homocigosis con frecuencia pudo deberse a que este alelo tuviera una secuencia especialmente similar a los cebadores diseñados en este trabajo en comparación con otros alelos, que podrían quedar enmascarados en la amplificación.

#### 4.5. Evaluación de la auto-incompatibilidad de las entradas

Las auto-fecundaciones de las plantas se realizaron para comprobar la auto-incompatibilidad o auto-compatibilidad de las entradas. En la bibliografía, *S. muricatum*, *S. trachycarpum* y *S. catilliflorum* aparecen como especies SC, mientras que *S. caripense*, *S. tabanoense* y *S. perlongistylum* están descritas como especies SI (Anderson *et al.*, 2006; Anderson, 1975, 1977).

En la Tabla 6 se recogen los resultados de las auto-fecundaciones. Las 4 entradas SC presentaron unos porcentajes de cuajado dentro de lo esperable, excepto la entrada El Camino, en la cual no se pudieron hacer auto-fecundaciones debido a la floración tardía de las plantas. En las entradas de *S. caripense* no cuajó ninguna flor, confirmando su SI. Las entradas de *S. tabanoense*

presentaron un desarrollo considerablemente menor al resto de entradas, y la floración fue muy tardía. Para la entrada EC-26 no se pudo realizar ninguna auto-fecundación por falta de flores, aunque sí para la entrada E-257, de las cuales no cuajó ninguna, lo que parece confirmar su SI.

Los resultados de la entrada P-62 de *S. perlongistylum* contradicen los de la bibliografía. Según la descripción original de *S. perlongistylum* (Anderson *et al.*, 2006), “esta especie de estilo largo nunca cuajó ningún fruto tras la auto-polinización de más de 100 flores (en Valencia)”. En este trabajo cuajaron 29 flores sin polinización controlada y un 14.6% de las auto-fecundaciones controladas. Aunque este porcentaje de cuajado no se considera como un claro fenotipo de auto-compatibilidad según algunos autores (Alonso y Company, 2005), difiere mucho de lo descrito originalmente, teniendo en cuenta que cuajaron 35 flores en 8 plantas. Además, en la descripción de *S. perlongistylum* se incluye que la longitud de su estilo es mayor que la de las otras especies registradas de la sección *Basarthrum*, cuando las especies SC de dicha sección se caracterizan por poseer estilos cortos en relación a los estambres. Aun así, en la Tabla 5 se observa que las plantas de P-62 presentaron los mismos alelos que algunas entradas SC y en los geles de las electroforesis se observa que la amplificación de las S-RNAs de P-62 es más similar a la de las entradas SC que a la de las entradas SI (Figuras 7 y 8). Estos resultados sugieren que la entrada de *S. perlongistylum* es auto-compatible, lo que podría indicar que existe variación dentro de la especie para la auto-incompatibilidad. Se requerirían más estudios para confirmar este aspecto.

**Tabla 6.** Resultado de las auto-fecundaciones en las plantas de cada entrada y número de flores cuajadas sin intervención manual. \*No se obtuvieron resultados de auto-polinizaciones de las plantas de las entradas El Camino y EC-26. \*\* *S. perlongistylum* aparece descrita como SI, pero los resultados indican que es SC.

Especie	Entrada	Flores auto-fecundadas	Flores cuajadas	% Cuajado	Flores cuajadas sin polinización manual	
SC	<i>S. muricatum</i>	37-A	19	8	42,1	18
		El Camino*	-	-	-	-
	<i>S. trachycarpum</i>	E-34	5	3	60,0	12
	<i>S. catilliflorum</i>	P-80	28	10	35,7	27
SI	<i>S. caripense</i>	E-7	50	0	0,0	2
		EC-40	47	0	0,0	1
	<i>S. tabanoense</i>	E-257	16	0	0,0	0
		EC-26*	-	-	-	-
**	<i>S. perlongistylum</i>	P-62	41	6	14,6	29

Cabe destacar que el desarrollo vegetativo de las plantas limitó los resultados obtenidos. El desarrollo de las entradas de pepino dulce fue considerablemente menor al de las entradas silvestres, especialmente el de El Camino. Lo mismo sucedió en las entradas de *S. tabanoense*. Debido a esto, no se pudo confirmar con certeza la auto-incompatibilidad de E-257 y EC-26, ya que el no-cuajado del fruto pudo deberse a factores no relacionados con el sistema de SI, sino a las condiciones de cultivo. El ciclo de cultivo fue el de primavera/verano, mientras que el ciclo

de cultivo óptimo para el pepino dulce, que es más sensible a las condiciones de cultivo que las especies silvestres, es el de otoño/invierno (Prohens *et al.*, 2000).

#### 4.6. Cruzamientos dirigidos

Se realizaron cruzamientos entre distintas plantas de la misma entrada para comprobar si la compatibilidad o incompatibilidad cruzada entre plantas se correspondía con los resultados obtenidos en la caracterización de alelos.

En el Anexo 2 se muestran los resultados completos de los cruzamientos realizados, y en el Anexo 3 se muestra un resumen de los resultados junto con los alelos caracterizados en cada planta. Un aspecto a tener en cuenta es que el pequeño tamaño de las flores (que dificulta su manipulación) y la fragilidad del estilo pudieron afectar negativamente al cuajado del fruto, aunque el cruzamiento fuera compatible. El embolsado del racimo también influye negativamente en la viabilidad del cruzamiento. Por este motivo, los resultados negativos no son completamente fiables.

Debido al mecanismo de la GSI, los cruzamientos de plantas con el mismo genotipo-S deben ser incompatibles. Sin embargo, esto no se cumple en el caso de las plantas SC, cuando está presente un alelo que confiere auto-compatibilidad.

##### 4.6.1 Auto-compatibles

En las dos entradas de pepino dulce, a diferencia de lo esperado, ninguno de los cruzamientos funcionó (Tabla 7). Sin embargo, esto se podría atribuir con toda probabilidad a una combinación del efecto de la polinización manual, la mayor fragilidad de las plantas en comparación con las especies silvestres y las condiciones de cultivo no idóneas. Por ejemplo, en la planta 37-A pl. 6, con genotipo 339/360, cuajaron flores auto-fecundadas, mientras que en el cruce 37-A pl.6 × pl. 5, ambas con el mismo genotipo 339/360, no cuajó ninguna flor.

**Tabla 7.** Cruzamientos de las entradas de *S. muricatum*.

Línea	Planta	×	Parental ♂	Cuajados (%)
<b>37-A</b> <i>Solanum muricatum</i>	1		8	0,0
	2		1	0,0
	5		8	0,0
	6		5	0,0
	7		6	0,0
	8		6	0,0
	1		6	0,0
	2		1	0,0
<b>EC</b> <i>Solanum muricatum</i>	4		2	0,0
	5		4	0,0
	7		6	0,0
	8		5	0,0

Los cruzamientos en el resto de entradas de SC (Tabla 8) sí dieron resultados más acordes con lo esperado. En el cruzamiento de las plantas E-34 pl. 5 × pl. 7, ambas con el mismo genotipo 342/363, cuajaron todos los frutos. La mayoría de los cruzamientos entre plantas de la entrada P-80 fueron compatibles, teniendo la mayoría de plantas los mismos alelos. En la entrada P-62, en la que 5 de las 7 plantas analizadas compartían el mismo genotipo 342/346, todos los cruzamientos fueron compatibles excepto en los que las plantas P-62 pl. 7 y P-62 pl. 8 actuaban como parental femenino, lo que probablemente se debiera al desarrollo menor en comparación con las otras plantas de la entrada.

De nuevo, cabe destacar la naturaleza preliminar de los resultados. Un ejemplo de la baja fiabilidad de los resultados negativos es el de los cruzamientos con P-80 pl. 4 como parental femenino: al utilizar P-80 pl. 1 como parental masculino se produjo el cuajado de frutos, mientras que al utilizar polen de P-80 pl. 2 no cuajó ningún fruto. Todos los parentales presentaban el mismo genotipo, 342/363. El resultado del cruzamiento P-80 pl. 4 × pl. 2 fue negativo a pesar de que, con toda probabilidad, fuera compatible.

**Tabla 8.** Cruzamientos de las entradas de *S. trachycarpum*, *S. catilliflorum* y *S. perlongistylum*.

Línea	Planta	×	Parental ♂	Cuajados (%)
<b>E-34</b> <i>Solanum trachycarpum</i>	1		8	100,0
	5		7	100,0
<b>P-80</b> <i>Solanum catilliflorum</i>	1		2	100,0
	2		6	50,0
	3		7	0,0
	4		1	33,3
	4		2	0,0
	5		2	33,3
	6		5	66,7
	7		2	0,0
<b>P-62</b> <i>Solanum perlongistylum</i>	8		4	33,3
	1		5	50,0
	2		1	50,0
	3		2	66,7
	4		3	33,3
	5		4	33,3
	6		7	50,0
	7		8	0,0
	8		1	0,0

#### 4.6.2 Auto-incompatibles

En la entrada EC-40, 5 de los 8 cruzamientos los resultados (Tabla 9) fueron acordes con los alelos-S de cada planta. Sin embargo, el resto de resultados fueron inesperados. De acuerdo con el modelo del mecanismo de la GSI en Solanáceas más completo actualmente (Kubo *et al.*, 2010), en el cruzamiento EC-40 pl. 1 × pl. 6 (alelos 340/361 × 340/340) el determinante masculino SLF<sub>340</sub> debería degradar las S-RNasas no propias y no interactuar con la S<sub>340</sub>-RNasa, lo que resultaría en el rechazo del polen de la pl. 6. A pesar de esto, las dos flores cruzadas cuajaron. En el caso del cruzamiento EC-40 pl. 3 × pl. 7, que es similar (alelos 350/360 × 360/360), no se produjo cuajado,

pero solo se polinizó una flor y por tanto el resultado negativo no es fiable. También es destacable los cruzamientos EC-40 pl. 5 × pl. 6 y EC-40 pl. 8 × pl. 2, siendo las cuatro plantas homocigotas para el alelo 340. En ambos cruzamientos hubo cuajado de fruto.

El hecho de que el locus-S no pueda aparecer en homocigosis en especies auto-incompatibles, el que los cruzamientos entre plantas “homocigotas” fueran compatibles y el que el cruzamiento teóricamente incompatible de EC-40 pl.1 × pl. 6 también fuera compatible parece apoyar la hipótesis de que en realidad las plantas que se caracterizaron como homocigotas no lo fueran en realidad, bien por amplificación preferencial por el alelo 340 en las PCRs o bien porque distintos alelos presentan la misma longitud del intrón. Este es el caso, por ejemplo, de los alelos-S identificados como  $S_2$  y  $S_7$  en *Prunus avium*, cuya secuencia es distinta pero el tamaño del intrón es de 345 en ambos (Sonneveld *et al.*, 2006).

**Tabla 9.** Cruzamientos de la entrada EC-40 de *S. caripense*.

Línea	Planta	×	Parental ♂	Cuajados (%)
<b>EC-40</b> <i>Solanum caripense</i>	1		6	100,0
	2		3	100,0
	3		7	0,0
	4		1	100,0
	5		6	100,0
	6		4	0,0
	7		1	100,0
	8		2	33,3

Los resultados de los cruzamientos de la entrada E-7 (Tabla 10) fueron consistentes con los alelos caracterizados en cada planta (asumiendo que no se dieran falsos negativos) excepto en un caso, el del cruzamiento E-7 pl. 5 × pl. 2. Ambas plantas poseen el genotipo 356/361, por lo que el cruzamiento debería ser incompatible, pero cuajó una de las dos flores polinizadas. Esto se puede explicar, de nuevo, por la incapacidad de distinguir alelos en base a su tamaño, por lo que probablemente el alelo 356 o el 361 sea en realidad dos alelos con distinta secuencia y misma longitud de intrón.

**Tabla 10.** Cruzamientos de la entrada E-7 de *S. caripense*.

Línea	Planta	×	Parental ♂	Cuajados (%)
<b>E-7</b> <i>Solanum caripense</i>	1		4	66,7
	2		3	0,0
	3		5	0,0
	4		7	0,0
	5		2	50,0
	6		1	0,0
	7		6	50,0
	8		3	0,0

Para la entrada E-257 solo se pudieron realizar tres cruzamientos (Tabla 11), debido a la floración escasa y tardía de las plantas. Los cruzamientos E-257 pl. 4 × pl. 6 y E-257 pl. 5 × pl. 6 (ambos 342/363 × 342/363) fueron incompatibles, como se esperaba, aunque los resultados negativos

son especialmente poco fiables en esta línea debido su bajo desarrollo. El cruzamiento E-257 pl. 2 × pl. 3 (342/342 × 342/363) debería haber sido compatible, aunque en este caso tanto la falta de cuajado como la homocigosis de E-257 pl. 2 (342/342) no son del todo fiables.

**Tabla 11.** Cruzamientos de la entrada E-257 de *S. tabanoense*.

Línea	Planta	×	Parental ♂	Cuajados (%)
<b>E-257</b> <i>Solanum tabanoense</i>	2		3	0,0
	4		6	0,0
	5		6	0,0

Con la otra entrada de *S. tabanoense*, EC-26, no se pudo hacer ningún cruzamiento, de nuevo por el escaso desarrollo de la planta.

#### 4.7. Discusión general

Integrando los resultados de la amplificación y caracterización de alelos y los resultados de las auto-fecundaciones y cruzamientos en el invernadero, todavía existen incongruencias entre genotipado y fenotipado. Los resultados sugieren que no se pudieron caracterizar todos los alelos presentes en las entradas.

Es importante destacar el carácter preliminar de los resultados. Debido a restricciones temporales, solo se pudieron realizar experimentos en una generación de plantas, y algunas plantas no alcanzaron un desarrollo completo o no florecieron a lo largo de este periodo de tiempo. Esto se debió seguramente a las elevadas temperaturas que se alcanzan en el invernadero en el ciclo de primavera/verano, que influyen negativamente en el cuajado de fruto. Como ya se ha comentado, para su cultivo en invernadero, el ciclo más apropiado para el pepino dulce es el de otoño/invierno (Prohens *et al.*, 2000). Los daños mecánicos al manipular las flores para las polinizaciones dirigidas fueron probablemente también un factor determinante en los resultados negativos de algunos cruzamientos y auto-polinizaciones.

El origen artificial de la población también influyó en los resultados, pues las plantas no eran representativas de una población silvestre, sino que eran selecciones muestrales que se habían cruzado consigo mismas al menos una vez durante su conservación en el banco de germoplasma. Esto implica inevitablemente una reducción de la variabilidad genética, especialmente en un locus que depende tanto del genotipo de los parentales.

En cuanto al genotipado, en los alineamientos múltiples se observa la variabilidad de las S-RNAsas secuenciadas, tanto a nivel nucleotídico como de proteína. Incluso en las zonas más conservadas, hay cambios puntuales que dificultan la amplificación de distintas S-RNAsas con los mismos cebadores. Probablemente, los cebadores diseñados en este trabajo no lograron amplificar todo el conjunto de S-RNAsas presentes en las entradas, lo que explica algunas de las incongruencias entre el genotipo y la compatibilidad cruzada de algunas plantas.

Finalmente, aunque en otros cultivos el análisis del tamaño del intrón de las S-RNAsas es viable como método de genotipado del locus-S (Marchese *et al.*, 2007; Sonneveld *et al.*, 2006), esta

metodología puede no ser capaz de diferenciar todos los alelos-S, como ya se ha comentado. Estos alelos de distinta secuencia codificante e idéntica longitud de intrón se podrían diferenciar utilizando datos de secuencia, pero la ventaja de la metodología empleada en este trabajo es su sencillez, eficacia y el hecho de que sea más económica que otras estrategias de secuenciación, una vez puesta a punto.

Para mejorar la amplificación de todas las S-RNAsas distintas, en futuros experimentos habría que diseñar cebadores específicos para cada alelo en lugar de intentar utilizar cebadores universales, ya que la elevada variabilidad en las secuencias de distintos alelos muy probablemente dé lugar a la amplificación preferencial de algunos alelos y a la no-amplificación de otros alelos. Para ello habría que secuenciar todas las S-RNAsas, algo que en este trabajo se ha observado que es difícil mediante la secuenciación de productos de PCR. Una alternativa sería clonar los genes de las S-RNAsas en vectores, lo que supondría la ventaja añadida de separar los alelos en distintas reacciones de secuenciación. Otro experimento interesante para futuros estudios sería la obtención de la secuencia codificante íntegra de al menos algunas S-RNAsas, como la identificada como alelo 342. No obstante, el clonaje de los genes del locus-S tampoco es fácil debido a su localización centromérica y a que están rodeados de secuencias muy repetitivas (Kubo *et al.*, 2010).

Finalmente, también sería conveniente adaptar las condiciones del cultivo en invernadero para optimizar el desarrollo de las plantas, y aumentar los individuos analizados de cada entrada. Asimismo, sería interesante genotipar los descendientes de los cruzamientos realizados para evaluar la segregación de los alelos-S, lo que proporcionaría más datos para identificar alelos implicados en la auto-compatibilidad.

## **5. Conclusiones**

- 1.** Se consiguió por primera vez amplificar parte de los genes de las S-RNasas en todos los individuos de pepino dulce y especies silvestres relacionadas de la sección *Basarthrum*.
- 2.** Se pudieron caracterizar distintos alelos-S en cada especie utilizando cebadores universales, y se pudo obtener la secuencia de algunas S-RNasas. Se pudo genotipar el locus-S de la mayoría de los individuos.
- 3.** La compatibilidad o incompatibilidad de los cruzamientos coincidió en algunos casos con los genotipos-S de los parentales, mientras que en otros los resultados no se correspondieron con los alelos identificados. No obstante, los resultados sugieren que no se identificaron todos los alelos presentes en las plantas, lo que explicaría las incongruencias observadas entre los resultados genotípicos y fenotípicos.

## **6. Bibliografía**

- AITON, W. (1813). *Hortus kewensis, or, A catalogue of the plants cultivated in the Royal Botanic Garden at Kew* (Vol. v.5 (1813)). London :Longman, Hurst, Rees, Orme, and Brown,.
- ALONSO, J. M., Y COMPANY, R. S. (2005). Identification of the S<sub>3</sub> self-incompatibility allele in almond by specific primers. *Spanish Journal of Agricultural Research* 3(3), 296-303.
- ANDERSON, G. J. (1975). The variation and evolution of selected species of *Solanum* section *Basarthurum*. *Brittonia*, 27(3), 209–222.
- ANDERSON, G. J. (1977). The Variation and Evolution of Selected Species of *Solanum* Section *Basarthurum* (Solanaceae). II. *Brittonia*, 29(1), 116.
- ANDERSON, G. J., Y BERNARDELLO, L. M. (1991). The Relationships of *Solanum* cochoae (Solanaceae), a New Species from Peru. *Novon*, 1(3), 127.
- ANDERSON, G. J., MARTINE, C. T., PROHENS, J., Y NUEZ, F. (2006). *Solanum perlongistylum* and *S. catilliflorum*, New Endemic Peruvian Species of *Solanum*, Section *Basarthurum*, Are Close Relatives of the Domesticated Pepino, *S. muricatum*. *Novon*, 16(2), 161–167.
- BERNARDELLO, L. M., Y ANDERSON, G. J. (1990). Karyotypic Studies in *Solanum* Section *Basarthurum* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 77(3), 420.
- BLANCA, J. M., PROHENS, J., ANDERSON, G. J., ZURIAGA, E., CAÑIZARES, J., Y NUEZ, F. (2007). AFLP and DNA sequence variation in an Andean domesticate, pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae): implications for evolution and domestication. *American Journal of Botany*, 94(7), 1219–29.
- BREDEMEIJER, G., Y BLAAS, J. (1981). S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Theoretical and Applied Genetics*, 59, 185-190.
- BRETÓ, M. P., ASINS, M. J., Y CARBONELL, E. A. (1993). Genetic variability in *Lycopersicon* species and their genetic relationships. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(1), 113–120.
- BRISOLARA-CORRÊA, L., THOMPSON, C. E., FERNANDES, C. L., Y DE FREITAS, L. B. (2015). Diversification and distinctive structural features of S-RNase alleles in the genus *Solanum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(3), 987–1002.
- BUSCH, J. W. (2005). The evolution of self-compatibility in geographically peripheral populations of *Leavenworthia alabamica* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 92(9), 1503–12.
- CACHI, A. M., Y WÜNSCH, A. (2011). Characterization and mapping of non-S gametophytic self-compatibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1847–1856.
- CHAE, K., ZHANG, K., ZHANG, L., MORIKIS, D., KIM, S. T., MOLLET, J.-C., ... LORD, E. M. (2007). Two SCA (stigma/style cysteine-rich adhesin) isoforms show structural differences that correlate with their levels of in vitro pollen tube adhesion activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33845–58.
- CRAIG, K. L., Y TYERS, M. (1999). The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Progress in Biophysics y Molecular Biology*, 72, 299–328.
- DE NETTANCOURT, D. (2001). Breakdown of the Self-Incompatibility Character, S Mutations and the Evolution of Self-Incompatible Systems. In *Incompatibility and Incongruity in Wild and*

*Cultivated Plants* (pp. 151–215). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

DI SCALA, K., VEGA-GÁLVEZ, A., URIBE, E., OYANADEL, R., MIRANDA, M., VERGARA, J., ... LEMUS-MONDACA, R. (2011). Changes of quality characteristics of pepino fruit (*Solanum muricatum* Ait) during convective drying. *International Journal of Food Science y Technology*, 46(4), 746–753.

DOYLE, J., Y DOYLE, J. L. (1987). Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem Bull*, 19(11), 11–15.

FOOTE, H. C. C., RIDE, J. P., FRANKLIN-TONG, V. E., WALKER, E. A., LAWRENCE, M. J., CHRISTOPHER, F., ... HESLOP-HARRISON, J. (1994). Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L, 91, 2265–2269.

FRANKLIN, F. C. H., LAWRENCE, M. J., Y FRANKLIN-TONG, V. E. (1995). Cell and Molecular Biology of Self-Incompatibility in Flowering Plants. *International Review of Cytology*, 158, 1–64.

FRANKLIN-TONG, V. E., Y FRANKLIN, F. C. H. (2003). The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1434), 1025–32.

GOMBEROFF, I. (1991). Pepino plant, Cascade Gold. *Plant patent - United States Patent and Trademark Office (USA)*.

HERRÁIZ, F. J. (2016). *Desarrollo de herramientas morfológicas y genómicas para el estudio del pepino dulce (Solanum muricatum) y especies relacionadas. Caracterización de su valor nutracéutico*. Universitat Politècnica de València.

HERRAIZ, F. J., BLANCA, J., ZIARSOLO, P., GRAMAZIO, P., PLAZAS, M., ANDERSON, G. J., ... VILANOVA, S. (2016). The first de novo transcriptome of pepino (*Solanum muricatum*): assembly, comprehensive analysis and comparison with the closely related species *S. caripense*, potato and tomato. *BMC Genomics*, 17(1), 321.

HSU, C., GUO, Y., WANG, Z., Y YIN, M. (2011). Protective effects of an aqueous extract from pepino (*Solanum muricatum* Ait.) in diabetic mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1517–22.

IDA, K., NORIOKA, S., YAMAMOTO, M., KUMASAKA, T., YAMASHITA, E., NEWBIGIN, E., ... SATO, M. (2001). The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana alata* SF11-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *Journal of Molecular Biology*, 314(1), 103–112.

KIM, S. T., ZHANG, K., DONG, J., Y LORD, E. M. (2006). Exogenous free ubiquitin enhances lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix and may facilitate endocytosis of SCA. *Plant Physiology*, 142(4), 1397–411.

KONDO, K., YAMAMOTO, M., MATTON, D. P., SATO, T., HIRAI, M., NORIOKA, S., ... KOWYAMA, Y. (2002). Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *Plant Journal*, 29(5), 627–636.

KUBO, K., ENTANI, T., TAKARA, A., WANG, N., FIELDS, A. M., HUA, Z., ... TAKAYAMA, S. (2010). Collaborative Non-Self Recognition System in S-RNase-Based Self-Incompatibility. *Science*, 330(6005), 796–799.

MARCHESE, A., BOŠKOVIĆ, R. I., CARUSO, T., RAIMONDO, A., CUTULI, M., Y TOBUTT, K. R. (2007). A new self-compatibility haplotype in the sweet cherry “Kronio”, S5', attributable to a pollen-part mutation in the SFB gene. *Journal of Experimental Botany*, 58(15-16), 4347–4356.

- MATTON, D. P., MAES, O., LAUBLIN, G., XIKE, Q., BERTRAND, C., MORSE, D., Y CAPPADOCIA', M. (1997). Hypervariable Domains of Self-Incompatibility RNases Mediate Allele-Specific Pollen Recognition. *The Plant Cell American Society of Plant Physiologists*, 9, 1757–1766.
- MENG, D., GU, Z., LI, W., WANG, A., YUAN, H., YANG, Q., Y LI, T. (2014). Apple MdABCF assists in the transportation of S-RNase into pollen tubes. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 78(6), 990–1002.
- MILLER, J. S., Y KOSTYUN, J. L. (2011). Functional gametophytic self-incompatibility in a peripheral population of *Solanum peruvianum* (Solanaceae). *Heredity*, 107(1), 30–39.
- NUEZ, F., Y RUIZ, J. J. (1996). *El pepino dulce y su cultivo*. FAO, Roma (Italia).
- OLMSTEAD, R. G. (1989). The origin and function of self-incompatibility in flowering plants. *Sexual Plant Reproduction*, 2(3), 127–136.
- ORHAN, N., ORHAN, D. D., ASLAN, M., Y ERGUN, F. (2014). Effect of Exotic Fruit “Pepino” (*Solanum muricatum* Aiton.) on Blood Glucose Level. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 196–202.
- PROHENS, J. (1997). *Mejora Del Cuajado y De La Precocidad En Pepino Dulce (Solanum muricatum Aiton)*. Universitat Politècnica de València.
- PROHENS, J., ANDERSON, G. J., BLANCA, J. M., CAÑIZARES, J., ZURIAGA, E., Y NUEZ, F. (2006). The Implications of AFLP Data for the Systematics of the Wild Species of *Solanum* Section *Basarthrum*. *Systematic Botany*, 31(1), 208–216.
- PROHENS, J., RUIZ, J. J., Y NUEZ, F. (1996). The Pepino (*Solanum muricatum*, Solanaceae): A “New” Crop with a History. *Economic Botany*, 50(4), 355–368.
- PROHENS, J., RUIZ, J. J., Y NUEZ, F. (2000). Growing cycles for a new crop, the pepino, in the Spanish mediterranean. *Acta Horticulturae*, 523(523), 53–60.
- RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A., PROHENS, J., Y FITA, A. M. (2011). Breeding strategies for improving the performance and fruit quality of the pepino (*Solanum muricatum*): A model for the enhancement of underutilized exotic fruits. *Food Research International*, 44(7), 1927–1935.
- ROMERO, C., VILANOVA, S., BURGOS, L., VICENTE, M., LLA, G., Y BADENES, M. L. (2004). Analysis of the S -locus structure in *Prunus armeniaca* L. Identification of S -haplotype specific S-RNase and F-box genes, 145–157.
- ROYO, J., KUNZT, C., KOWYAMAI, Y., ANDERSON, M., CLARKE, A. E., Y NEWBIGIN, E. (1994). Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Cell Biology*, 91, 6511–6514.
- SCHUELKE, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2), 233–234.
- SIJACIC, P., WANG, X., SKIRPAN, A. L., WANG, Y., DOWD, P. E., MCCUBBIN, A. G., ... KAO, T. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, 429(6989), 302–305.
- SONNEVELD, T., ROBBINS, T. P., Y TOBUTT, K. R. (2006). Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron polymerase chain reaction products. *Plant Breeding*, 125(3), 305–307.

- SUDHA, G., PRIYA, M. S., SHREE, R. B. I., Y VADIVUKKARASI, S. (2012). Antioxidant activity of ripe and unripe pepino fruit (*Solanum muricatum* Aiton). *Journal of Food Science*, 77(11), C1131–5.
- SUN, P., WILLIAMS, J. S., LI, S., Y KAO, T. (2014). Sexual Reproduction in Animals and Plants. In H. Sawada, N. Inoue, y M. Iwano (Eds.) (pp. 289–303). Tokyo: Springer Japan.
- VARGAS, C. (1962). Phytomorphic Representations of the Ancient Peruvians. *Economic Botany*, 16(2), 106–115.
- VILANOVA, S., BADENES, M. L., BURGOS, L., MARTINEZ-CALVO, J., LLACER, G., Y ROMERO, C. (2006). Self-Compatibility of Two Apricot Selections Is Associated with Two Pollen-Part Mutations of Different Nature. *PLANT PHYSIOLOGY*, 142(2), 629–641.
- WANG, J., ZHANG, K., ZHANG, X., YAN, G., ZHOU, Y., FENG, L., ... MCCURDY, D. (2015). Construction of Commercial Sweet Cherry Linkage Maps and QTL Analysis for Trunk Diameter. *PLOS ONE*, 10(10), e0141261.
- WILLIAMS, J. S., WU, L., LI, S., SUN, P., Y KAO, T.-H. (2015). Insight into S-RNase-based self-incompatibility in *Petunia*: recent findings and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 6, 41.
- ZAVADA, M. S. (1984). The Relation Between Pollen Exine Sculpturing and Self-Incompatibility Mechanisms. *Plant Systematics and Evolution*, 147, 63–78.

## **7. Anexos**

**ANEXO 1****Secuencias parciales de las S-RNAs obtenidas**

>E-7\_7, *S. Caripense*. Exon1: 1-113, Intron:114-201, Exon2:202-489  
 CATTGTCAACGCATAGTTCAAAAACTTTACGATCCACGGTCTTTGGCCGGATAAGGAGG  
 GACCACAGCTGCTGCAGTACTGCAAGCCAAAACCTTACCTATAAAATATTTTCAGTGTAACA  
 GCTTTATTATTTTCTCCAGAACCTAATCCTTTTTTTTGTCTGTAAATTTACTGAAACGA  
 TTATTTTTGAATTGCTTTCAGGATAAGATGCTCAATGATCTTGACAAACACTGGATTTCAG  
 TTGAAGGTTGATCAAGCTTCTGCTCTAAAGGACCAACGAGCATGGAAATATCAATATCTA  
 AAGCATGGATCCTGTTGTGCGAAAAATCTACAATCAAAGTACGTATTTTAGTTTAGCCTTG  
 GGCTTAAAAGATAGTTTGTGATCTGCTGAGAACTCTCCAAATACATCGAATTGTTCCCTGGA  
 TCAAGTTATACATTTGAYGAAATCTTTGAGGCCGTAAAGACAGTTACTCAGACGGATCCT  
 GACATCAAGTG

>E-257\_8, *S. Tabanoense*. Exon1:1-105, Intron:106-192, Exon2:193-465  
 CCAAATCTAGTTCCGAAAAATTTACCATCCATGGGCTATGGCCTGATAAACAGGGAATA  
 ATGCCGATTGACTGCCCGACCAAGAAACCTATAAAAGTATTACGGTAATACTATTTCTT  
 CTTCTTTTCAGCAATTTTTCTTTTCAATTTTGACCTTTTACTAATTGGAGTATCATCC  
 TAACGTTACAGGACCCCCAAAAATCAAACGACTGGAGTATCACTGGCCCGATTTGACC  
 TCCAAGAAGGTGATGGTAGTGCAGGTTTCTGGAGATATCAATTCATAAGCATGGAACG  
 TGTAGTGTGGAACATATACAATCAAGAAGAAATATTTTGATTTAGCTGTGGACTTAAAAGAG  
 AAGTTTGTATCTTTTAAAAACCTCAAAAAATCACGGAATTACTCCATCAAAAAATTATTACA  
 GCTACAGATGTGAAAAAGCCATCAAGGCAGTACTAAAGAGGTCCC

>EC-40\_6, *S. Caripense*. Exon1: 1-100, Intron: 101-189, Exon2: 190-483  
 GCGAATAGCTCCAAACAACCTTTACGATTCACGGGCTTTGGCCGGATAAAGAGGGAACACT  
 GCTGCAGAAGTCAAGCCAAAACCTACGTATAGACATTTTCAGGGTAAACAACAGCATTAT  
 TTTCTGCAGAACCTATACCTCTTCTATCTGTTCAATCTACTTAATAGGTTCTTTTCGAAA  
 TGCTTACAGGATAAGATGCTCAATGATCTTGACAAAAACTGGATTTCAGTTGAAGTATCCA  
 GAACGTTATGCTCGAAAGGAACAACCTTTATGGCTTTATCAATATCTAAAGCATGGATCC  
 TGTTGTCAGAAAGTCTACGATCAAAACACATATTTTAGTTTAGCTTTGCGCTTGAAAGAC  
 AGGTTTGTATCTTCTGAGAACTCTCCAAATACATGGAATTGTTCCCTGGATCAAGTTATACA  
 TTTAAAAGAAATCTTTGATGCCGTCAAGACAGTTACTCAAACAGATCCTGATGTCAAGTGT  
 ACA

## ANEXO 2

## Resultados completos de los cruces y autofecundaciones

Línea	Planta	Cruces				Autofecundación			Sin manipulación
		Parental ♂	Nº Flores	Cuajadas	%	Nº Flores	Cuajadas	%	
37-A	1	8	3	0	0,0	7	5	71,4	5
	2	1	3	0	0,0	6	0	0,0	
	EC-26								
	4					6	3	50,0	
	5	8	4	0	0,0				
	6	5	3	0	0,0				
	7	6	2	0	0,0				
	8	6	3	0	0,0				
EC	1	6	3	0	0,0				
	2	1	3	0	0,0				
	3								
	4	2	3	0	0,0				
	5	4	3	0	0,0				
	6								
	7	6	3	0	0,0				
	8	5	3	0	0,0				
E-34	1	8	2	2	100,0	2	2	100,0	0
	2								0
	3								6
	4								0
	5	7	2	2	100,0				0
	6								1
	7								1
	8					3	0	0,0	4
P-80	1	2		3		2	2	100,0	6
	2	6	2	1	50,0	4	4	100,0	
	3	7	2	0	0,0	6	0	0,0	0
	4	1/2	3/1	1/0	33,3/0,0	2	2	100,0	4
	5	2	3	1	33,3	3	1	33,3	1
	6	5	3	2	66,7	3	0	0,0	6
	7	2	2	0	0,0	4	0	0,0	10
	8	4	3	1	33,3	4	1	25,0	
EC-40	1	6	2	2	100,0	8/4	0/0	0,0	
	2	3	2	2	100,0	2	0	0,0	
	3	7	1	0	0,0	4	0	0,0	
	4	1	1	1	100,0	6	0	0,0	
	5	6	3	3	100,0	8	0	0,0	1
	6	4	2	0	0,0	4	0	0,0	
	7	1	2	2	100,0	5	0	0,0	
	8	2	3	1	33,3	6	0	0,0	
E-7	1	4	3	2	66,7	4	0	0,0	
	2	3	3	0	0,0	5	0	0,0	
	3	5	3	0	0,0	10	0	0,0	2
	4	7	4	0	0,0	6	0	0,0	
	5	2	2	1	50,0	7	0	0,0	
	6	1	3	0	0,0	7	0	0,0	
	7	6	4	2	50,0	5	0	0,0	
	8	3	3	0	0,0	6	0	0,0	
E-257	1					5	0	0,0	
	2	3	1	0	0,0	2	0	0,0	
	3								
	4	6	1	0	0,0	5	0	0,0	
	5	6	1	0	0,0				
	6								
	7					4	0	0,0	
	8								
P-62	1	5	2	1	50,0	2	1	50,0	8
	2	1	2	1	50,0	6	0	0,0	9
	3	2	3	2	66,7	3	0	0,0	0
	4	3	3	1	33,3	4	0	0,0	4
	5	4	3	1	33,3	5	4	80,0	8
	6	7	2	1	50,0	7	1	14,3	
	7	8	2	0	0,0	7	0	0,0	0
	8	1	1	0	0,0				0

**ANEXO 3**

**Resumen de los resultados de los cruzamientos, auto-fecundaciones y alelos caracterizados**

Línea	Planta	Alelos		Línea	Planta	Cruces		Autofecundación	Sin manipulación		
						Parental ♂	Cuajados (%)	%			
37-A	1		342	360	37-A	1	8	0,0	71,4	5	
	2		342			2	1	0,0	0,0		
	EC-26	339	342			EC-26					
	4	339				4			50,0		
	5	339		360		5	8	0,0			3
	6	339		360		6	5	0,0			4
	7		342			7	6	0,0			6
	8	339		360		8	6	0,0			0
EC	1	339			EC	1	6	0,0			
	2	339				2	1	0,0			
	3	339	360			3					
	4	339	360			4	2	0,0			
	5	339	360			5	4	0,0			
	6	339	360			6					
	7					7	6	0,0			
	8	339	360			8	5	0,0			
E-34	1	342			E-34	1	8	100,0	100,0	0	
	2	342	363			2				0	
	3	342	363			3				6	
	4	342	363			4				0	
	5	342	363			5	7	100,0		0	
	6	342	363			6				1	
	7	342	363			7				1	
	8					8			0,0		
P-80	1	342	363		P-80	1	2	100,0	100,0	6	
	2	342	363			2	6	50,0	100,0		
	3	342				3	7	0,0	0,0	0	
	4	342	363			4	1/2	33,3/0,0	100,0	4	
	5	342	363			5	2	33,3	33,3	1	
	6	342	363			6	5	66,7	0,0	6	
	7	342	362			7	2	0,0	0,0	10	
	8	342				8	4	33,3	25,0		
EC-40	1	340		361	EC-40	1	6	100,0	0,0		
	2	340				2	3	100,0	0,0		
	3		350	360		3	7	0,0	0,0		
	4			360		4	1	100,0	0,0		
	5	340				5	6	100,0	0,0	1	
	6	340				6	4	0,0	0,0		
	7			360		7	1	100,0	0,0		
	8	340				8	2	33,3	0,0		
E-7	1	356		379	E-7	1	4	66,7	0,0		
	2	356	361			2	3	0,0	0,0		
	3	356	361			3	5	0,0	0,0	2	
	4		361			4	7	0,0	0,0		
	5	356	361			5	2	50,0	0,0		
	6	356		379		6	1	0,0	0,0		
	7	356	361			7	6	50,0	0,0		
	8	356	361			8	3	0,0	0,0		
E-257	1	342			E-257	1			0,0		
	2	342				2	3	0,0	0,0		
	3	342	363			3					
	4	342	363			4	6	0,0	0,0		
	5	342	363			5	6	0,0			
	6	342	363			6					
	7	342				7			0,0		
	8	342	363			8					
P-62	1	342	363		P-62	1	5	50,0	50,0	8	
	2	342	363			2	1	50,0	0,0	9	
	3	342				3	2	66,7	0,0	0	
	4	342	363			4	3	33,3	0,0	4	
	5	342				5	4	33,3	80,0	8	
	6					6	7	50,0	14,3		
	7	342	363			7	8	0,0	0,0	0	
	8	342	363			8	1	0,0		0	