

Análisis de la diversidad genética de patrones de cítricos mediante microsatélites amplificados al azar (RAMs)

Analysis of the genetic diversity of citrus rootstocks using random amplified microsatellites (RAMs)

Juan Martínez Medina¹, María Genoveva Álvarez Ojeda², Víctor Pecina Quintero³, Raúl Rodríguez Guerra¹, Isidro Humberto Almeyda León¹

¹Campo Experimental General Terán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 31 Carr. Montemorelos-China, CP 67400, General Terán, Nuevo León, México. ²Campo Experimental Río Bravo, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 61 Carretera Matamoros-Reynosa, C.P. 88900, Río Bravo, Tamaulipas, México. ³Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 6.5 Carr. Celaya-San Miguel de Allende, C.P. 38010, Celaya, Guanajuato, México.

Autor de correspondencia: almeyda.isidro@inifap.gob.mx

Resumen

Los materiales de cítricos que se mantienen en los bancos de germoplasma, y que son usados como patrones, en muchas ocasiones son de origen desconocido, razón por la cual, es necesario realizar estudios para conocer su diversidad genética y detectar introducciones promisorias para procesos de selección y mejoramiento genético. El objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética de patrones de cítricos del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán. En el estudio se incluyeron 10 materiales de cítricos, los cuales, se utilizan tradicionalmente como patrones y dos variedades comerciales. El análisis de la diversidad genética se realizó mediante la técnica de Microsatélites Amplificados al Azar, y para las amplificaciones se utilizaron cuatro marcadores. Se observó un alto nivel de polimorfismo con todos los iniciadores utilizados con valores que fluctuaron del 92.31 al 96.00%, lo cual, permitió diferenciar a todos los materiales involucrados en el estudio. El índice de Shannon calculado fluctuó de 0.5552 a 0.7809, lo cual, es indicativo de que existe baja diversidad genética entre los patrones evaluados. Sin embargo, los atributos calculados (PIC, EMR, MI, RP e ID) para los marcadores utilizados registraron valores de medios a altos. El marcador que presentó mayor poder resolutivo fue CA con un valor de 11.66 y el índice de diversidad obtenido fue del 84%. Estos resultados permiten inferir que la técnica de Microsatélites Amplificados al Azar, se constituye como una herramienta útil para trabajos de caracterización genética de cítricos.

Palabras clave: Portainjertos, Marcadores, Amplificación, Polimorfismo, Diversidad.

Abstract

The citrus materials that are kept in the germplasm banks, and that are used as rootstocks on many occasions, are of unknown origin, reason why, it is necessary to carry out studies to know their genetic diversity and detect promising introductions for selection processes and genetic improvement. The objective of this study was to analyze the genetic diversity of citrus rootstocks of the germplasm bank of the General Teran Experimental Field. The study included 10 citrus materials, which are traditionally used as rootstocks and two commercial varieties. The analysis of genetic diversity was performed using the Random Amplified Microsatellites technique, and four markers were used for the amplifications. A high level of polymorphism was observed with all the primers used with values that ranged from 92.31 to 96.00%, which allowed to differentiate all the materials involved in the study. The calculated Shannon index fluctuated from 0.5552 to 0.7809, which is indicative that there is low genetic diversity among the evaluated rootstocks. However, the calculated attributes (PIC, EMR, MI, RP and ID) for the markers used registered medium to high values. The marker that presented the highest resolving power was CA with a value of 11.66 and the diversity index obtained was 84%. These results allow us to infer that the Random Amplified Microsatellites technique is a useful tool for genetic characterization of citrus.

Keywords: Rootstock, Markers, Amplification, Polymorphism, Diversity.

Introduction

The citrus are natives to Southeast Asia and India and probably evolved from a bitter fruit plant 20 million years ago, located where the Malay archipelago is today.

Introducción

Los cítricos son originarios del sureste asiático y la India y probablemente evolucionaron de una planta de frutos amargos hace 20 millones de años, localizada donde hoy se encuentra el archipiélago Malayo. Las especies modernas se desarrollaron en China, en este país existe la mayor diversidad de variedades de cítricos en el mundo, así como sus parásitos. Los cítricos pertenecen a la familia Rutaceae, formada por siete subfamilias, una de ellas es Aurantioideae, la cual tiene dos tribus, Clauseneae y Citreae. Clauseneae consiste de tres subtribus, entre ellas Clauseninae donde se destaca el género *Clausena* (Hynniewta, *et al.*, 2014). Los géneros que constituyen los verdaderos árboles de cítricos son seis, de los cuales tres tienen importancia comercial: *Poncirus*, *Fortunella* (kumquat) y *Citrus* (Hui, 1999). Las especies del género *Poncirus* hibridan libremente con las especies del género *Citrus*, generando grupos de híbridos que son: citranges (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), citrandarinas (*Poncirus trifoliata* x *Citrus reticulata*), citremones (*Poncirus trifoliata* x *Citrus limonia*) y citrumelos (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*), que también reconoce a los tangores como el cruce interespecífico entre mandarina (*Citrus reticulata*) y naranja (*Citrus sinensis*) (Hynniewta, *et al.*, 2014).

La mayoría de las huertas de cítricos constan de árboles formados por dos partes, el patrón o portainjerto y la variedad los cuales combinan atributos favorables. El portainjerto es el que proporciona el sistema radical, mediante el cual el árbol establece su sistema de soporte, permite absorción del agua y nutrimentos, almacenamiento de carbohidratos producidos en las hojas y de la síntesis de algunos reguladores del crecimiento, adaptando a la variedad a una condición particular de suelo y, además, potencialmente proporciona tolerancia a algunas enfermedades (Padrón y Rocha, 2008a). El empleo del portainjerto tiene como principales propósitos la reducción de la juvenilidad, la adaptación ambiental a diferentes condiciones de suelo y clima, así como el comportamiento hortícola entre el portainjerto y la variedad que esté injertada (Castle *et al.*, 1993). De esta manera, no sólo se ha logrado mejorar los rendimientos y la calidad de los frutos, sino que también ha permitido la siembra en sitios con características adversas para el normal desarrollo de la planta (Orduz y Mateos, 2012). Existen más de 20 características hortícolas que son influenciadas por el patrón, incluyendo tamaño y vigor del árbol,

The modern species developed in China, in this country there is the greatest diversity of citrus varieties in the world, as well as their parasites. The citrus belong to the Rutaceae family, made up of seven subfamilies, one of them is Aurantioideae, which has two tribes, Clauseneae and Citreae. Clauseneae consists of three subtribes, among them Clauseninae where the genus *Clausena* stands out (Hynniewta, *et al.*, 2014). The genera that constitute the true citrus trees are six, of which three are commercially important: *Poncirus*, *Fortunella* (kumquat) and *Citrus* (Hui, 1999). The species of the genus *Poncirus* freely hybridize with the species of the genus *Citrus* generating groups of hybrids that are: citranges (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), citrandarines (*Poncirus trifoliata* x *Citrus reticulata*), citremones (*Poncirus trifoliata* x *Citrus limonia*) and citrumelos (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*), which also recognizes tangores as the interspecific cross between mandarin (*Citrus reticulata*) and orange (*Citrus sinensis*) (Hynniewta, *et al.*, 2014).

Most citrus orchards consist of trees made up of two parts, the rootstock and the variety, which combine favorable attributes. The rootstock is the one that provides the root system, through which the tree establishes its support system, allows absorption of water and nutrients, storage of carbohydrates produced in the leaves and the synthesis of some growth regulators, adapting the variety to a particular soil condition and, in addition, potentially provides tolerance to some diseases (Padrón and Rocha, 2008a). The use of the rootstock has as its main purposes the reduction of juvenility, the environmental adaptation to different soil and climate conditions, as well as the horticultural behavior between the rootstock and the variety that is grafted (Castle *et al.*, 1993). In this way, it has not only been possible to improve the yields and the quality of the fruits, but it has also allowed the sowing in sites with adverse characteristics for the normal development of the plant (Orduz and Mateos, 2012). There are more than 20 horticultural characteristics that are influenced by the rootstock, including tree size and vigor, rooting depth, frost tolerance, adaptation to certain soil conditions, such as salinity or pH, or excess water, resistance or tolerance to nematodes and diseases related to *Phytophthora* and fruit yield, size, texture, internal quality and time of maturity (Davies and Albrijo, 1994; Padrón-Chávez and Rocha-Peña, 2008b).

In the plant germplasm banks, many of the materials are

profundidad de enraizamiento, tolerancia a las heladas, adaptación a ciertas condiciones de suelo, tales como salinidad o pH, o exceso de agua, resistencia o tolerancia a nematodos y enfermedades relacionadas con *Phytophthora* y rendimiento de fruta, tamaño, textura, calidad interna y tiempo de madurez (Davies y Albrigo, 1994; Padrón-Chávez y Rocha-Peña, 2008b).

En los bancos de germoplasma vegetal, muchos de los materiales son de origen desconocido, razón por la cual, es necesario realizar estudios para la caracterización y documentación de las introducciones que permitan evitar duplicados e identificar introducciones promisorias para procesos de selección, mejoramiento genético o procesos agroindustriales (Ganopoulos *et al.*, 2015). Sin embargo, la caracterización de los bancos de germoplasma, la variación genética y el mejoramiento en naranjas y otras especies de *Citrus* no han sido exitosos debido a las características relacionadas con la biología reproductiva de estas especies, por ejemplo, alta fertilidad interespecífica, reproducción apomítica, poliembriónia, muchos casos de esterilidad, inter y autocompatibilidad, elevada heterocigosis, una larga fase juvenil y la escasez de marcadores de ADN polimórficos (Bretó *et al.*, 2001; Corazza-Nunes *et al.*, 2002).

El mejoramiento genético de los cítricos mediante métodos convencionales se encuentra limitado debido a sus características genéticas y reproductivas. Además, se desconoce el modo de herencia de la mayor parte de caracteres agronómicos de interés (Grosser y Gmitter, 1990). Las técnicas moleculares han permitido el desarrollo de marcadores de ADN asociados con características de interés, así como el desarrollo del mapa de ligamiento de los cítricos, los cuales han mostrado ser útiles en la realización de una selección temprana en la progenie con los caracteres deseados en programas de mejoramiento clásico (Cai *et al.*, 1994).

Los marcadores moleculares tales como el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), microsátélites e isoenzimas han sido desarrollados para estudiar la diversidad genética y domesticación, establecer mapas moleculares, caracterizar variedades y ayudar en los programas de mejoramiento (Golein *et al.*, 2005; Novelli *et al.*, 2006). Estas técnicas moleculares ha sido un instrumento valioso y preciso para la evaluación de la diversidad

of unknown origin, therefore it is necessary to carry out studies for the characterization and documentation of the introductions to avoid duplicates and identify promising introductions for selection processes, genetic improvement or agro-industrial processes. (Ganopoulos *et al.*, 2015). However, the characterization of germplasm banks, genetic variation and improvement in oranges and other *Citrus* species have not been successful due to the characteristics related to the reproductive biology of these species, for example, high interspecific fertility, apomictic reproduction, polyembryony, many cases of sterility, inter and self-compatibility, high heterozygosity, a long juvenile phase and the scarcity of polymorphic DNA markers (Bretó *et al.*, 2001; Corazza-Nunes *et al.*, 2002).

The genetic improvement of citrus by conventional methods is limited due to its genetic and reproductive characteristics. Furthermore, the mode of inheritance of most agronomic traits of interest is unknown (Grosser and Gmitter, 1990). Molecular techniques have allowed the development of DNA markers associated with characteristics of interest, as well as the development of the linkage map of citrus, which have been shown to be useful in carrying out an early selection in progeny with the desired characters in classical breeding programs (Cai *et al.*, 1994).

The molecular markers such as Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), microsattellites and isoenzymes have been developed to study genetic diversity and domestication, establish molecular maps, characterize varieties and assist in breeding programs (Golein *et al.*, 2005; Novelli *et al.*, 2006). These molecular techniques have been a valuable and precise instrument for the evaluation of genetic diversity in citrus and related genera, including isoenzymatic markers, SRAP (Uzun *et al.*, 2009), RAPD (Hynniewta, *et al.*, 2014), AFLP (León, 1987).

The repeats of simple sequences or microsattellites (SSR), are intervals of DNA with penta, tetra, tri, di or mononucleotic units repeated in tandem (1-6 base pairs) (Crouch, *et al.*, 1998), arranged throughout the genome in most eukaryotic species (Zhao and Kochert, 1993). Genetic studies with SSR markers are used to a great extent because they are highly polymorphic and codominant (Zane *et al.*, 2002), they are useful in the improvement and evaluation of the diversity and

genética en cítricos y géneros relacionados, incluyendo marcadores isoenzimáticos, SRAP (Uzun *et al.*, 2009), RAPD (Hynniewta, *et al.*, 2014), y AFLP (León, 1987).

Las repeticiones de secuencias simples o microsatélites (SSR), son intervalos de ADN con unidades penta, tetra, tri, di o mononucleóticas repetidas en tándem (1-6 pares de bases) (Crouch, *et al.*, 1998), dispuestas en todo el genoma en la mayoría de las especies eucarióticas (Zhao y Kochert, 1993). Los estudios genéticos con marcadores SSR se usan en gran medida porque son altamente polimórficos y son codominantes (Zane *et al.*, 2002), son útiles en el mejoramiento y evaluación de la diversidad e identificación de cultivares, así como en la conservación de germoplasma (Rivera *et al.*, 1999). Los SSR, se consideran marcadores ideales para el mapeo genético y físico del genoma, discriminación de genotipos, estudios de genética de poblaciones, caracterización de líneas endocriadas, estudios de diversidad (Rossetto *et al.*, 1999), flujo de genes, sistemas de cruzamientos (Chase *et al.*, 1996) y análisis de paternidad (Streiff *et al.*, 1999). Estos marcadores en su modalidad de Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs), son útiles para medir la diversidad genética en plantas y animales, con poder discriminatorio entre familias y especies e igualmente de manera intraespecífica (Morillo *et al* 2010; Muñoz *et al.*, 2008), muestran la base de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas dentro de molécula de ADN para estudios específicos, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado y permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no lo hace (Mahuku *et al.*, 2002). El objetivo de este estudio fue analizar mediante la técnica de Microsatélites Amplificados al Azar, la diversidad genética de los patrones de cítricos del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán.

Materiales y métodos

Material vegetal. Se colectaron hojas jóvenes y sanas de 10 accesiones de patrones de cítricos, así como de una variedad de limón (*Citrus lemon* L.) y una variedad de toronjo (*Citrus paradisi* L.) (Cuadro 1), mantenidas en el banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán, ubicado en el Km 31 Carretera Montemorelos-China, General Terán, N.L., localizado en las coordenadas 25° 02' y 25° 30' de latitud norte; los meridianos 99° 00' y 99° 48' de longitud oeste, a una altitud de 267 msnm.

identification of cultivars, as well as in the conservation of germplasm (Rivera *et al.*, 1999). The SSRs are considered ideal markers for genetic and physical mapping of the genome, genotype discrimination, population genetic studies, characterization of inbred lines, diversity studies (Rossetto *et al.*, 1999), gene flow, crossing systems (Chase *et al.*, 1996) and paternity analysis (Streiff *et al.*, 1999). These markers, in their form of Random Amplified Microsatellites (RAMs), are useful to measure genetic diversity in plants and animals, with discriminatory power between families and species and also in an intraspecific way (Morillo *et al* 2010; Muñoz *et al.*, 2008), show the basis of the variation of individuals, allow the selection of specific regions within the DNA molecule for specific studies, the number of detectable polymorphisms is theoretically unlimited, and allow the analysis of both the information that is expressed as the one that does not (Mahuku *et al.*, 2002). The objective of this study was to analyze by means of the Random Amplified Microsatellites technique, the genetic diversity of the citrus rootstocks of the germplasm bank of the General Teran Experimental Field.

Materials and methods

Vegetal material. Young and healthy leaves were collected from 10 accessions of citrus rootstocks, as well as a variety of lemon (*Citrus lemon* L.) and a variety of grapefruit (*Citrus paradisi* L.) (Table 1), kept in the germplasm bank of the General Teran Experimental Field, located at Km 31 Montemorelos-China highway, General Teran, N.L., located at coordinates 25° 02' and 25° 30' north latitude; meridians 99° 00' and 99° 48' of west longitude, at an altitude of 267 masl.

Cuadro 1. Patrones, variedad de limón y variedad de toronja del banco de germoplasma de cítricos del Campo Experimental General Terán, utilizados en el análisis de diversidad genética.

Table 1. Rootstocks, lemon variety and grapefruit variety from the citrus germplasm bank of the General Teran Experimental Field, used in the analysis of genetic diversity.

No. de accesión	Nombre común o variedad	Nombre científico
32	Koethan Sweet	<i>Citrus sinensis</i> L.
33	Citrange Morton	Cruza entre <i>C. sinensis</i> L. x <i>P. trifoliata</i> L.
34	Naranja Chinotto	<i>Citrus myrtifolia</i> L.
35	Mandarina Cleopatra	<i>Citrus reshni</i> L.
36	Naranja Agrio	<i>Citrus aurantium</i> L.
37	Citrange carrizo	Cruza entre <i>C. sinensis</i> L. x <i>P. trifoliata</i> L.
38	Tangelo Sunshine	<i>Citrus tangelo</i> L.
39	Carrizo Troyer	Cruza entre <i>C. sinensis</i> L. x <i>P. trifoliata</i> L.
40	Citrus taiwanica	<i>Citrus taiwanica</i> L.
75	Limón rugoso	<i>Citrus jambhiri</i> L.
80	Limón Villa Franca	<i>Citrus lemon</i> L.
82	Toronja Río Red	<i>Citrus paradisi</i> L.

Extracción de ADN. La extracción del ADN de los materiales colectados se realizó a partir de la metodología reportada por Almeyda *et al.* (2001). Se pesaron 150 mg de la muestra, se colocaron en tubos Eppendorf de 2.0 mL y se trituraron mecánicamente. Se agregaron 750 µl de solución de extracción CTAB/2-ME precalentada a 65 °C (CTAB 2 % p/v, Tris-HCl pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.0 20 mM, NaCl 1.4 M, polivinylpyrrolidona 40,000 1 % p/v), (a la solución se le agrega 2-ME para que quede a una concentración final de 0.2 %) y se incubó durante 45 minutos a 65 °C. Posteriormente se le agregó un volumen (de acuerdo al volumen de la muestra recuperada) de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se agregó 0.5 volumen de acetato de amonio (7.5 M), dejándolo 10 min en hielo y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente. Para precipitar el ADN, al volumen recuperado se le agregó 0.6 volumen de isopropanol y se dejó precipitar durante 60 min a temperatura ambiente.

Extraction of DNA. The extraction of DNA from the collected materials was carried out using the methodology reported by Almeyda *et al.* (2001). One hundred and fifty mg of the sample was weighed, placed in 2.0 mL Eppendorf tubes, and mechanically ground. One hundred and fifty µl of CTAB/2-ME extraction solution preheated to 65 °C were added (CTAB 2% w/v, Tris-HCl pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.0 20 mM, NaCl 1.4 M, polyvinylpyrrolidone 40,000 1% w/v), (2-ME is added to the solution so that it remains at a final concentration of 0.2%) and it was incubated for 45 minutes at 65 °C. Subsequently, a volume of chloroform-isoamyl alcohol 24:1 (according to the volume of the recovered sample) was added and it was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at room temperature. The aqueous phase was recovered and 1 volume of chloroform-isoamyl alcohol 24:1 was added and it was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at room temperature. The aqueous phase was recovered and 0.5 volume of ammonium acetate (7.5 M) was added, leaving it on ice for 10 min and centrifuged for 10 min at 14,000 rpm at room temperature. To precipitate the DNA, 0.6 volume of isopropanol was added to the recovered volume and it was allowed to precipitate for

Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante, el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70 % frío (centrifugando a 10,000 rpm durante 15 min), el precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µl de agua ultrapura estéril y fue almacenado a 4 °C hasta su uso. Para establecer la calidad del ADN extraído, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %, se tiñó con el colorante GelRed® y se analizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs). Para la amplificación se utilizaron cuatro marcadores RAMs (Cuadro 2). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo: Buffer de PCR (1X), MgCl₂ (4.0 mM), dNTP's (0.2 mM), Iniciador (0.4 µM), Taq™ DNA-polimerasa (1 U), y ADN (50 ng). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (BioRad Thermal Cycler) y el programa utilizado fue: un ciclo a 95 °C por 5 minutos, seguido de 37 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 50-55 °C (de acuerdo al iniciador utilizado) por 30 segundos, 72 °C por 2 minutos y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Los fragmentos amplificados en las PCR's se fraccionaron en geles de agarosa al 2.0 %, durante una hora treinta minutos a 100 V. Los geles fueron teñidos con el colorante GelRed® y analizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

60 min at room temperature. Subsequently, it was centrifuged at 10,000 rpm for 20 minutes and the supernatant was removed, the precipitate was washed twice with cold 70% ethanol (centrifuging at 10,000 rpm for 15 min), the precipitate was dried at room temperature and resuspended in 100 µl of sterile ultrapure water and was stored at 4 °C until use. To establish the quality of the extracted DNA, an electrophoresis was carried out on a 0.8% agarose gel, stained with the GelRed® dye and analyzed in an ultraviolet light transilluminator.

Random Amplified Microsatellites (RAMs). Four RAMs markers were used for amplification (Table 2). The PCR reactions were carried out in a final volume of 25 µl containing: PCR Buffer (1X), MgCl₂ (4.0 mM), dNTP's (0.2 mM), primer (0.4 µM), Taq™ DNA-polymerase (1 U), and DNA (50 ng). The amplifications were carried out in a thermal cycler (BioRad Thermal Cycler) and the program used was: One cycle at 95 °C for 5 minutes, followed by 37 cycles of 95 °C for 30 seconds, 50-55 °C (according to the primer used) for 30 seconds, 72 °C for 2 minutes and a final extension at 72 °C for 10 minutes. The fragments amplified in the PCR's were fractionated in 2.0% agarose gels, for one hour and thirty minutes at 100 V. The gels were stained with GelRed® dye and analyzed in an ultraviolet light transilluminator.

Cuadro 2. Marcadores utilizados en la técnica de Microsatélites Amplificados al Azar.

Table 2. Markers used in the Random Amplified Microsatellites technique.

Marcador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de alineamiento
CCA	DDBCCACCACCACCA	55 °C
CT	DYDCTCTCTCTCTC	55 °C
CA	DBDACACACACACA	50 °C
TG	HVHTGTGTGTGTGTGT	55 °C

Análisis estadístico. Se aplicó un análisis clúster mediante el coeficiente de Nei y Li (1979) y el método de aglomeración UPGMA y se corroboró con un método de remuestreo Jackknifing con 1000 remuestreos de un fragmento y se generó un árbol de consenso (Núñez-Colín y Escobedo-López, 2014).

Relaciones genéticas. Para cada iniciador RAMS, se generó una matriz binaria de unos y ceros, para la presencia "1" y ausencia "0" de cada una de las bandas en cada accesión. Matrices de similitud por parejas fueron generadas para los datos moleculares utilizando la versión FreeTree v0.9.1.50 (Pavliček *et al.*, 1999). Se construyó un dendrograma, el cual, fue dibujado con la ayuda de TreeViewX v0.5-1 (Page, 1996).

Además, se generó un Análisis de Coordenadas Principales para hacer la representación tridimensional de las accesiones en un plano euclidiano (Peña-Caballero *et al.*, 2020) utilizando NTSYSpc v2.2 (Rolfh, 2005).

Adicionalmente, para determinar la funcionalidad de los iniciadores se calcularon el porcentaje de polimorfismo mediante la fórmula:

Para cada fragmento se calculó el índice de Shannon (Shannon, 1948) y se promediaron los valores de cada fragmento para cada iniciador para calcular el valor promedio por iniciador.

El índice de Shannon se calculó mediante la fórmula:

Donde p es la proporción de presencia del fragmento en las accesiones.

Para determinar cuál marcador era más informativo, se calcularon algunos parámetros propuestos por Laurentini y Karlovsky (2007), tales como: Contenido de Información Polimórfica (PIC), Índice de Marcador (MI), Poder de Resolución (PR) e Índice de Diversidad (DI).

El valor de PIC para cada marcador se calculó con la formula $PIC = 2fi(1-fi)$, propuesta por Roldán-Ruiz *et al.* (2000). Dónde: PIC es el contenido de información

Statistical analysis. A cluster analysis was applied using the coefficient of Nei and Li (1979) and the UPGMA agglomeration method and it was corroborated with a Jackknifing resampling method with 1000 resamples of a fragment and a consensus tree was generated (Núñez-Colín and Escobedo-López, 2014).

Genetic relationships. For each RAMS primer, a binary matrix of ones and zeros was generated, for the presence "1" and absence "0" of each of the bands in each accession. Pairwise similarity matrices were generated for the molecular data using the Free Tree version v0.9.1.50 (Pavliček *et al.*, 1999). A dendrogram was constructed, which was drawn with the help of TreeViewX v0.5-1 (Page, 1996).

In addition, a Principal Coordinate Analysis was generated to make the three-dimensional representation of the accessions in a Euclidean plane (Peña-Caballero *et al.*, 2020) using NTSYSpc v2.2 (Rolfh, 2005).

Additionally, to determine the functionality of the initiators, the percentage of polymorphism was calculated using the formula:

For each fragment the Shannon index (Shannon, 1948) was calculated and the values of each fragment for each primer were averaged to calculate the average value per primer.

The Shannon index was calculated using the formula:

Where p is the proportion of presence of the fragment in the accessions.

To determine which marker was more informative, some parameters proposed by Laurentini and Karlovsky (2007) were calculated, such as: Polymorphic Information Content (PIC), Marker Index (MI), Resolution Power (PR) and Diversity Index (DI).

The PIC value for each marker was calculated with the formula $PIC = 2fi(1-fi)$, proposed by Roldán-Ruiz *et al.* (2000). Where: PIC is the polymorphic information content of marker i , fi the frequency of marker fragments that were present and $1-fi$ the frequency of marker

polimórfica del marcador i , f_i la frecuencia de los fragmentos del marcador que estaban presentes y $1 - f_i$ la frecuencia de los fragmentos del marcador que estaban ausentes. El PIC fue un promedio de los fragmentos para cada marcador.

El MI se calculó con la fórmula $MI = PIC \times EMR$ (Varshney *et al.*, 2007). Donde: EMR es la proporción múltiple efectiva, (E) se define como el producto del número total de loci / fragmentos por marcador (n) y la fracción de loci polimórficos / fragmentos (\hat{a}), ($E = n \cdot \hat{a}$).

El PR de cada marcador, se calculó con la fórmula $PR = \hat{O}Ib$ (Prevost y Wilkinson 1999). Donde: Ib representa la informatividad del fragmento. La Ib se puede representar en una escala 0 - 1 por la siguiente fórmula: $Ib = 1 - [2 \times (0.5 - p)]$. Donde: p es la proporción de las 12 accesiones que contienen el fragmento.

El índice de diversidad genética de germoplasma, se calculó sobre la base de la fórmula $DI = 1 - \sum Pi^2$ (Powell *et al.*, 1996). Donde Pi es la frecuencia del alelo i , cada alelo individual es considerado único en sí mismo y un fragmento de amplificación.

Resultados

Amplificación de fragmentos con los marcadores utilizados. Los cuatro marcadores utilizados generaron fragmentos de diferente peso molecular de acuerdo a las condiciones de amplificación utilizadas (Figura 1), proporcionando información para evaluar la diversidad genética de los materiales considerados en este estudio.

fragments that were absent. The PIC was an average of the fragments for each marker.

The MI was calculated with the formula $MI = ICP \times EMR$ (Varshney *et al.*, 2007). Where: EMR is the effective multiple ratio, (E) is defined as the product of the total number of loci / fragments per marker (n) and the fraction of polymorphic loci / fragments (\hat{a}), ($E = n \cdot \hat{a}$).

The PR of each marker was calculated with the formula $PR = \hat{O}Ib$ (Prevost and Wilkinson 1999). Where: Ib represents the informativeness of the fragment. Ib can be represented on a 0 - 1 scale by the following formula: $Ib = 1 - [2 \times (0.5 - p)]$. Where: p is the proportion of the 12 accessions that contain the fragment.

The germplasm genetic diversity index was calculated based on the formula $DI = 1 - \sum Pi^2$ (Powell *et al.*, 1996). Where Pi is the frequency of the i allele, each individual allele is considered unique in itself and an amplification fragment.

Results

Amplification of fragments with the markers used.

The four markers used generated fragments of different molecular weight according to the amplification conditions used (Figure 1), providing information to evaluate the genetic diversity of the materials considered in this study.

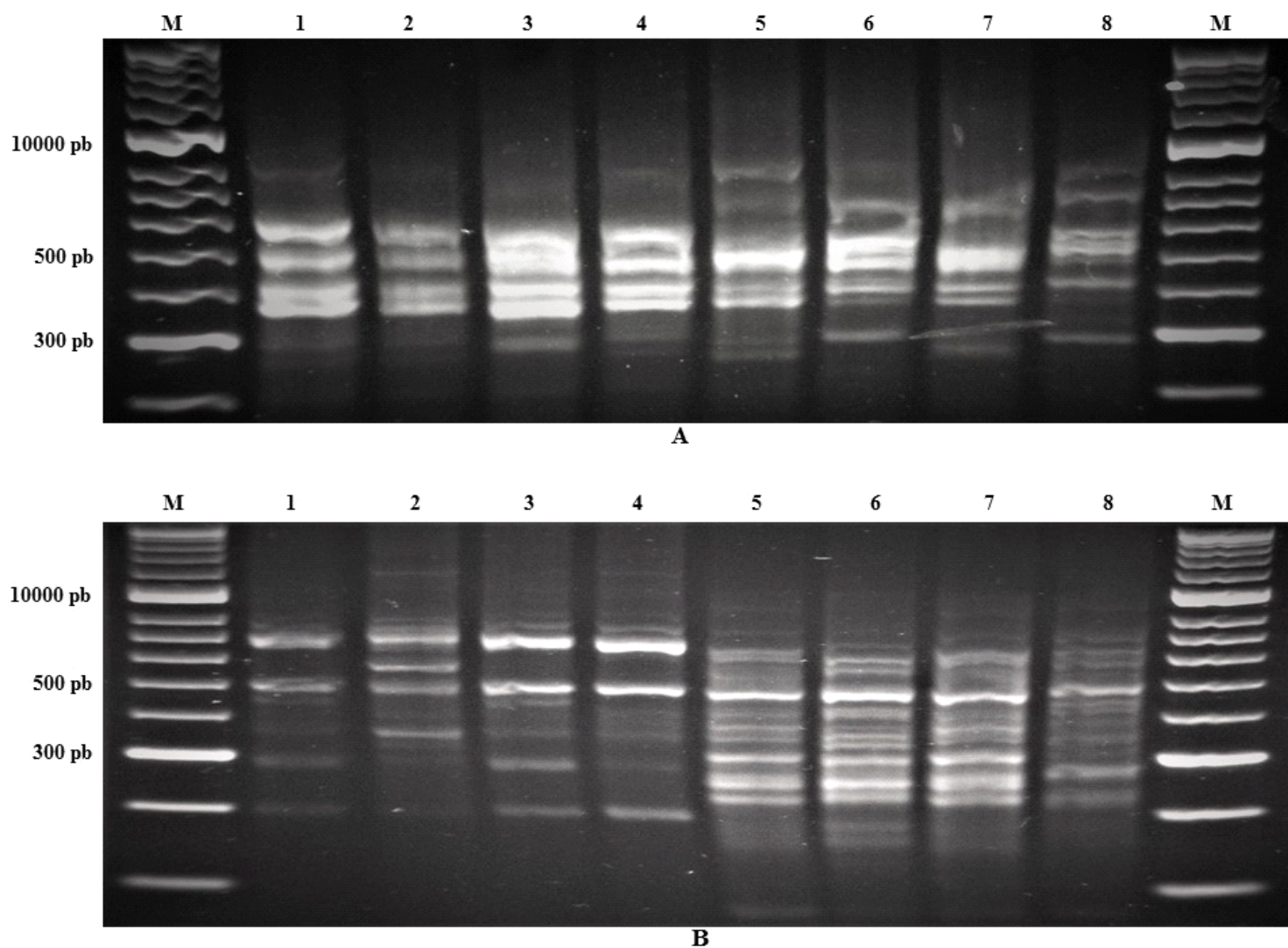


Figura 1. Amplificaciones por PCR, a partir del ADN extraído de diferentes patrones de cítricos y cuatro marcadores mediante la técnica de Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs). **A.** Carriles M: Marcador de peso molecular, Carril 1: Citrange Morton, Carril 2: Naranja Chinotto, 3: Mandarina Cleopatra, 4: Naranja Agrio, con el marcador CCA, 5: Citrange Morton, 6: Mandarina Cleopatra, 7: Tangelo Sunshine, 8: Limón rugoso, con el marcador CT. **B.** Carriles M: Marcador de peso molecular, Carril 1: Citrange Morton, Carril 2: Mandarina Cleopatra, 3: Naranja Agrio, 4: Tangelo Sunshine, con el marcador TG, 5: Naranja Chinotto, 6: Mandarina Cleopatra, 7: Naranja Agrio, 8: Citrange Carrizo, con el marcador CA.

Figure 1. PCR amplifications, from DNA extracted from different citrus rootstocks and four markers using the Random Amplified Microsatellites (RAMs) technique. A. Lanes M: Molecular weight marker, Lane 1: Citrange Morton, Lane 2: Chinotto orange, 3: Cleopatra mandarin, 4: Sour orange, with the CCA marker, 5: Citrange Morton, 6: Cleopatra mandarin, 7: Tangelo Sunshine, 8: Rough lemon, with the CT marker. B. Lanes M: Molecular weight marker, Lane 1: Citrange Morton, Lane 2: Cleopatra mandarin, 3: Sour orange, 4: Sunshine Tangelo, with the TG marker, 5: Chinotto orange, 6: Cleopatra mandarin, 7: Sour orange, 8: Citrange reed, with the CA marker.

Los cuatro marcadores generaron 66 fragmentos, que oscilaron de 13 para los marcadores CCA y TG, a 25 para el marcador CA (Cuadro 3). Estos resultados, demuestran la funcionalidad de estos marcadores en la técnica de RAMs para el análisis de un mayor número de accesiones de cítricos, teniendo en consideración que el número de fragmentos amplificados puede variar dependiendo de las condiciones de amplificación utilizadas y el material genético implicado en el estudio.

Análisis de la diversidad genética. El porcentaje de polimorfismo fue superior al 92 % para cada uno de los marcadores utilizados en este estudio (Cuadro 3), lo valores más altos se detectaron con los iniciadores CA y CT, diseñados sobre secuencias repetidas de dos pares de bases. Los valores del índice de Shannon calculados fluctuaron de 0.5552 a 0.7809 (Cuadro 3), lo cual, es indicativo de que la diversidad genética entre los patrones evaluados es relativamente baja.

The four markers generated 66 fragments, ranging from 13 for the CCA and TG markers, to 25 for the CA marker (Table 3). These results demonstrate the functionality of these markers in the RAM technique for the analysis of a greater number of citrus accessions, taking into consideration that the number of amplified fragments may vary depending on the amplification conditions used and the genetic material involved in the study.

Analysis of genetic diversity. The percentage of polymorphism was higher than 92% for each of the markers used in this study (Table 3), the highest values were detected with the CA and CT primers, designed on repeated sequences of two base pairs. The Shannon index values calculated ranged from 0.5552 to 0.7809 (Table 3), which is indicative that the genetic diversity among the evaluated patterns is relatively low.

Cuadro 3. Análisis de comparación de iniciadores con base en el número de fragmentos, porcentaje de polimorfismo e índice de Shannon medio de los fragmentos.

Table 3. Analysis of comparison of primers based on the number of fragments, percentage of polymorphism and mean Shannon index of the fragments.

Marcador	Número de fragmentos	% de polimorfismo	Índice de Shannon
CCA	13	0.9231	0.7809
CT	15	0.9333	0.5812
CA	25	0.9600	0.6912
TG	13	0.9231	0.5552

El valor de PIC para los cuatro marcadores varió de 0.237 a 0.374, con un promedio de 0.295, el EMR registro valores de 13.0 a 25.0, con un promedio de 16.5, el MI presentó valores de 3.08 a 7.88 con un promedio de 4.90, mientras que el RP vario de 4.00 a 11.66 con un promedio de 7.24. El DI vario de 71 al 84 %, con un promedio fue del 78 % (Cuadro 4). De esta manera, con los valores obtenidos, se considera al marcador CA como el más resolutivo de los marcadores utilizados en este estudio.

The PIC value for the four markers ranged from 0.237 to 0.374, with an average of 0.295, the EMR registered values from 13.0 to 25.0, with an average of 16.5, the MI presented values from 3.08 to 7.88 with an average of 4.90, while that the RP ranged from 4.00 to 11.66 with an average of 7.24. The DI varied from 71 to 84%, with an average of 78% (Table 4). In this way, with the values obtained, the CA marker is considered the most decisive of the markers used in this study.

Cuadro 4. Atributos de los marcadores RAMs utilizados e índice de diversidad genética.

Table 4. Attributes of the RAMs markers used and genetic diversity index.

Marcador	PIC ^a	EMR ^b	MI ^c	RP ^d	DI ^e
CCA	0.374	13.0	4.86	8.00	0.75
CT	0.253	15.0	3.79	5.33	0.82
CA	0.315	25.0	7.88	11.66	0.84
TG	0.237	13.0	3.08	4.00	0.71
Media	0.295	16.5	4.90	7.24	0.78

^a Contenido de Información Polimórfica.

^b Proporción múltiple efectiva.

^c Índice de marcador.

^d Poder de resolución.

^e Índice de diversidad

Análisis de similitud genética. Mediante el coeficiente de Nei-Li, se generó un dendrograma, el cual, quedo conformado por cuatro grandes grupos o nodos principales (Figuras 2 y 3). En dos de estos nodos quedaron agrupados todos los citranges que son materiales resultantes de la cruce entre *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*, el mayor coeficiente de similitud se observó entre el citrange carrizo y el carrizo troyer. El citrange Morton que también fue incluido en este estudio, fue el que quedo más separado de los otros dos citranges y se ubicó mucho más cercano al naranjo chinotto. La mandarina Cleopatra, a pesar de que pertenece al género *Citrus* se ubicó dentro del grupo de los trifoliados, (Figura 2), lo anterior, es indicativo de que pueden compartir algún ancestro.

Genetic similarity analysis. Using the Dice Nei-Li coefficient, a dendrogram was generated, which was made up of four large groups or main nodes (Figures 2 and 3). In two of these nodes were grouped all the citranges that are materials resulting from the cross between *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*, the highest coefficient of similarity was observed between the citrange reed and the reed troyer. The citrange Morton, which was also included in this study, was the one that remained the most separated from the other two citranges and was located much closer to the Chinotto orange. The Cleopatra mandarin, although it belongs to the *Citrus* genus, was located within the trifoliolate group (Figure 2), the above is indicative that they may share some ancestor.

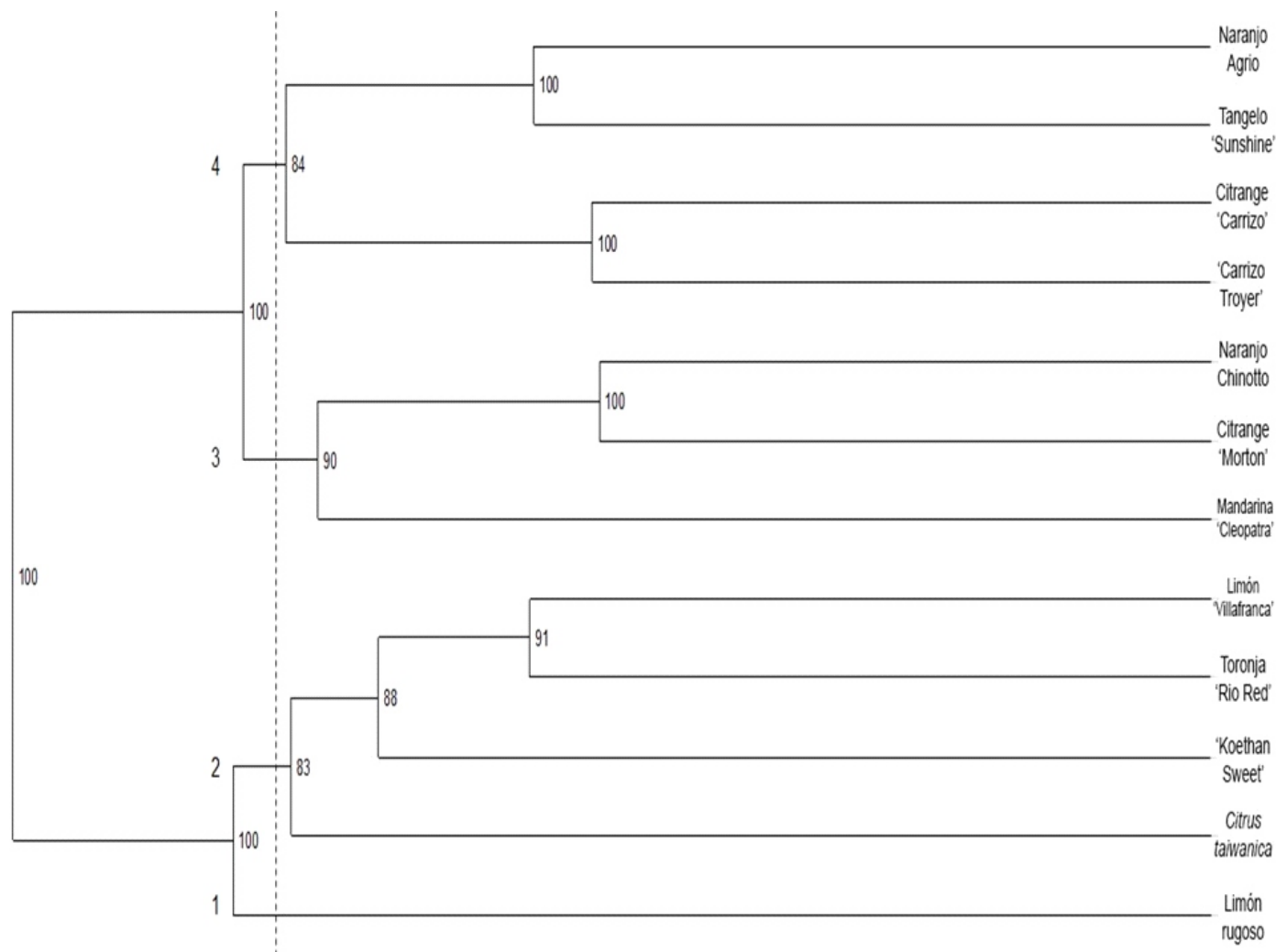


Figura 2. Relaciones genéticas entre diferentes patrones y dos variedades de cítricos del banco de germoplasma del CEGET en Nuevo León, México, basado en el coeficiente de Nei-Li y calculado con base en los datos generados con cuatro marcadores RAMs. Los cuatro grupos formados se indican en la figura con los números 1, 2, 3 y 4.

Figure 2. Genetic relationships between different rootstocks and two citrus varieties from the CEGET germplasm bank in Nuevo León, Mexico, based on the Nei-Li coefficient and calculated based on the data generated with four RAMs markers. The four groups formed are indicated in the figure by the numbers 1, 2, 3 and 4.

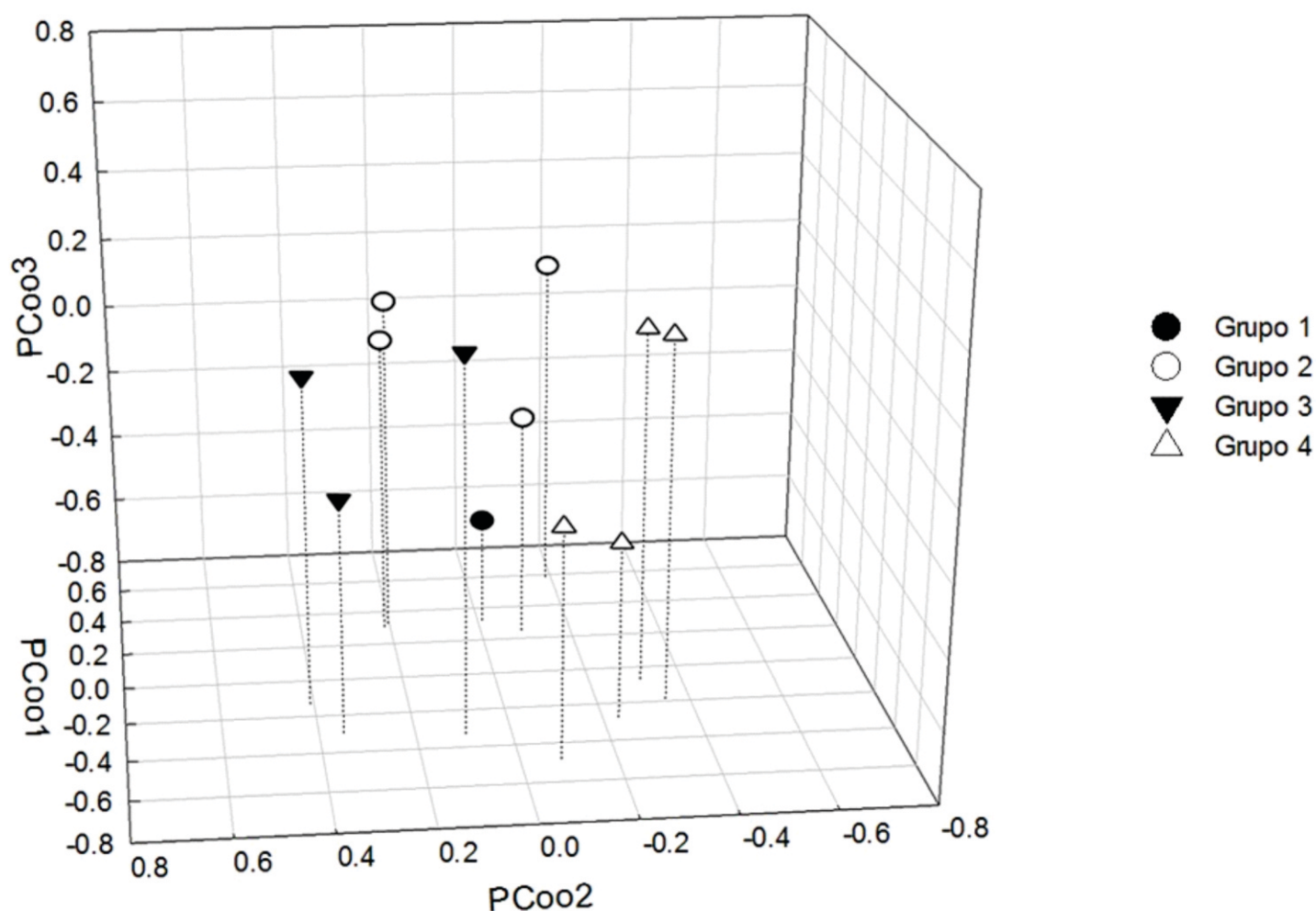


Figura 3. Análisis de coordenadas principales de diferentes patrones y dos variedades de cítricos del banco de germoplasma del CEGET en Nuevo León, México, utilizando NTSYSpc v2.2.

Figure 3. Principal Coordinate Analysis of different patterns and two citrus varieties from the CEGET germplasm bank in Nuevo León, Mexico, using NTSYSpc v2.2.

Los materiales pertenecientes al género *Citrus* quedan agrupadas de manera muy dispersa (Figuras 2 y 3). La mayoría de ellos conformaron dos nodos, el limón Villafranca, la toronja Rio Red, la naranja Koethan Sweet y la naranja *Citrus taiwanica*, conformaron un grupo. El limón rugoso *Citrus jambhiri* L, fue la especie más divergente de este género y formó un grupo único (Figura 2). El naranjo agrio que también pertenece al género *Citrus*, quedó bastante separado de los grupos conformados por las otras especies de este género, su ubicación fue más cercana al tangelo Sunshine que también es un híbrido (Figura 2).

The materials belonging to the genus *Citrus* are grouped in a very dispersed way (Figures 2 and 3). Most of them made up two nodes, the Villafranca lemon, the Rio Red grapefruit, the Koethan Sweet orange and the *Citrus taiwanica* orange, made up a group. The rough lemon *Citrus jambhiri* L, was the most divergent species of this genus and formed a unique group (Figure 2). The sour orange that also belongs to the *Citrus* genus, was quite separated from the groups made up of the other species of this genus, its location was closer to the Sunshine tangelo, which is also a hybrid (Figure 2).

Discusión

Los valores de polimorfismo registrados en este trabajo fueron altos para cada uno de los marcadores utilizados en la técnica de RAMs, lo que en primera instancia permite inferir la existencia de alta heterocigosidad entre los materiales analizados, tal y como lo señalan Morillo *et al.* (2010), quienes encontraron una fuerte asociación entre el nivel de polimorfismo con la heterocigosidad registrada en un estudio sobre la caracterización genética de un banco de germoplasma de naranja, coincidiendo con lo reportado por Gallego *et al.* (2017) a partir de un estudio de la diversidad genética de patrones de cítricos en Colombia. Los valores del índice de Shannon calculados fluctuaron de 0.5552 a 0.7809, lo cual, es indicativo de que la diversidad genética entre los patrones evaluados es relativamente baja y el alto nivel de polimorfismo detectado se debe a que probablemente los materiales corresponden mayormente a híbridos intergenéricos e interespecíficos tal y como lo señalan Gallego *et al.* (2017). Sin embargo, Morillo *et al.* (2010), consideran que valores de 0.150 del coeficiente de diferenciación genética corresponden a un nivel de intermedio de diversidad genética. Lo anterior, coincide con los valores registrados para los atributos de los marcadores utilizados en este estudio, ya que dos de los marcadores CA y CCA presentaron valores considerados como altos tanto para PIC como para RP, incluso el marcador CA registró un DI de 84 %, el cual se considera un valor alto para cualquier especie vegetal como lo señalan Gallegos *et al.* (2017) en patrones de cítricos, así como Gutiérrez *et al.* (2015) en aguacate criollo.

El valor de diversidad genética bajo encontrado con base al índice de Shannon puede estar dado por el bajo número de individuos evaluados o por las características inherentes de la especie o a la multiplicación a partir de pocos individuos introducidos. Sin embargo, en virtud a que los cuatro marcadores evaluados en este estudio generaron un alto porcentaje de polimorfismo y se pudieron diferenciar todos los materiales involucrados en el estudio, estos se consideran como marcadores útiles para futuros trabajos de caracterización genética de cítricos mediante la técnica de RAMs.

El mayor coeficiente de similitud se observó entre el citrange carrizo y el carrizo troyer, estos híbridos son tan cercanos genéticamente que incluso mediante el uso de marcadores SRAP, se determinó que estos dos materiales son casi idénticos, (Uzun *et al.*, 2009), pero

Discussion

The polymorphism values recorded in this work were high for each of the markers used in the RAMs technique, which in the first instance allows us to infer the existence of high heterozygosity between the analyzed materials, as pointed out by Morillo *et al.*, (2010), who found a strong association between the level of polymorphism with the heterogeneity recorded in a study on the genetic characterization of an orange germplasm bank, coinciding with that reported by Gallego *et al.* (2017) from a study of the genetic diversity of citrus patterns in Colombia. The calculated Shannon index values ranged from 0.5552 to 0.7809, which is indicative that the genetic diversity among the evaluated patterns is relatively low and the high level of polymorphism detected is due to the fact that the materials probably correspond mainly to intergeneric and interspecific hybrids as indicated by Gallego *et al.* (2017). However, Morillo *et al.* (2010), consider that values of 0.150 of the genetic differentiation coefficient correspond to an intermediate level of genetic diversity. The above coincides with the values registered for the attributes of the markers used in this study, since two of the CA and CCA markers presented values considered as high for both PIC and PR, even the CA marker registered an ID of 84%, which is considered a high value for any plant species as indicated by Gallegos *et al.* (2017) in citrus patterns, as well as Gutiérrez *et al.* (2015) in creole avocado.

The low genetic diversity value found based on the Shannon index may be given by the low number of individuals evaluated or by the inherent characteristics of the species or the multiplication from few introduced individuals. However, since the four markers evaluated in this study generated a high percentage of polymorphism and all the materials involved in the study, these are considered as useful markers for future work on genetic characterization of citrus using the RAMs technique.

The highest coefficient of similarity was observed between the citrange reed and the reed troyer, these hybrids are so close genetically that even through the use of SRAP markers, it was determined that these two materials are almost identical, (Uzun *et al.*, 2009), but in reality they are a unique clone which originated as a zygotic seedling (CPB 4-5019) from the crossing of the orange variety "Washington navel" *Citrus sinensis* and the trifoliate orange *Poncirus trifoliata*, instead of the

en realidad son un clon único el cual se originó como una plántula zigótica (CPB 4-5019) proveniente del cruce de la variedad de naranja "Washington navel" *Citrus sinensis* y la naranja trifoliada *Poncirus trifoliata*, en lugar de las dos plantas hermanas como se había supuesto (Hall, *et al.*, 2015). La influencia de *Poncirus trifoliata* es fuerte en los citranges, lo cual queda evidenciado por la naturaleza trifoliada de sus hojas, así como la acidez y amargura de sus frutas y la resistencia al frío (Bastos *et al.*, 2013). Aunque morfológicamente son casi idénticos, el citrange carrizo tiene ventajas agronómicas que han desplazado el uso de citrange troyer (Distefano *et al.*, 2013).

La mandarina Cleopatra, aunque pertenece al género *Citrus* se ubicó dentro de los grupos conformados por los cítricos híbridos. Lo anterior, es indicativo de que pueden compartir algún ancestro. ya que algunos materiales híbridos como los tangores son originados por el cruce interespecífico entre mandarina (*Citrus reticulata*) y naranja (*Citrus sinensis*) (Morillo *et al.*, 2010). La mayor similitud registrada entre el limón Villafranca y la toronja Rio Red en comparación con los otros materiales que conforman el mismo nodo, puede deberse a que comparten algún gen asociado a la acidez, ya que los otros integrantes del nodo se consideran cítricos dulces. El naranjo agrio, fue otro de los materiales que quedó bastante separado de los grupos conformados por el género *Citrus*, lo anterior, puede deberse a que es una de las especies más primitivas de los cítricos después del cidro *Citrus medica*, su proceso de evolución y domesticación no ha estado tan marcado como en el caso del naranjo dulce y la naranja trifoliada, un factor que puede establecer su cercanía con los citranges en su nivel de acidez, y amargura, lo cual, es característico de estos cítricos híbridos.

Conclusiones

La diversidad genética observada entre los patrones de cítricos evaluados con el índice de Shannon fue baja. Sin embargo, los cuatro marcadores utilizados en la técnica de RAMs, revelaron un alto nivel de polimorfismo, permitiendo diferenciar todos los materiales evaluados, tanto los pertenecientes al género *Citrus*, así como los híbridos generados a partir de las cruces entre este género y *Poncirus trifoliata*. Además, los valores calculados para PIC, EMR, MI, RP y el DI, fueron altos, lo cual, permite inferir el uso de estos marcadores como herramienta útil en futuros trabajos de mejoramiento genético de cítricos.

two plants sisters as had been assumed (Hall, *et al.*, 2015). The influence of *Poncirus trifoliata* is strong on citranges, which is evidenced by the trifoliolate nature of its leaves, as well as the acidity and bitterness of its fruits and resistance to cold (Bastos *et al.*, 2013). Although morphologically they are almost identical, reed citrange has agronomic advantages that have displaced the use of troyer citrange (Distefano *et al.*, 2013).

The Cleopatra mandarin, although it belongs to the *Citrus* genus, was located within the groups made up of hybrid citrus. The above is indicative that they may share an ancestor. since some hybrid materials such as tangores are originated by the interspecific cross between mandarin (*Citrus reticulata*) and orange (*Citrus sinensis*) (Morillo *et al.*, 2010). The greater similarity recorded between the Villafranca lemon and the Rio Red grapefruit compared to the other materials that make up the same node, may be due to the fact that they share some gene associated with acidity, since the other members of the node are considered sweet citrus. The sour orange was another of the materials that remained quite separate from the groups made up of the *Citrus* genus, the above, may be due to the fact that it is one of the most primitive species of citrus after the *Citrus medica* citron, its evolution process and domestication has not been as marked as in the case of the sweet orange and the trifoliolate orange, a factor that can establish its proximity with the citranges in their level of acidity and bitterness, which is characteristic of these hybrid citrus.

Conclusions

The genetic diversity observed between the citrus rootstocks evaluated with the Shannon index was low. However, the four markers used in the RAMs technique revealed a high level of polymorphism, allowing to differentiate all the evaluated materials, both those belonging to the genus *Citrus*, as well as the hybrids generated from the crosses between this genus and *Poncirus trifoliata*. In addition, the calculated values for PIC, EMR, MI, RP and DI were high, which allows us to infer the use of these markers as a useful tool in future work on the genetic improvement of citrus.

Acknowledgments

We are grateful to the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research, for financing this research as part of project No. 1411235201: "Citrus germplasm bank".

Agradecimientos

Se agradece al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, por el financiamiento de esta investigación como parte del proyecto No. 1411235201: "Banco de germoplasma de cítricos".

Referencias

- Almeyda, L.I.H., Rocha, P.M.A., Piña, R.J. and Martínez, S.J.P. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization in different plant species in México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(1): 1-9.
- Bastos, P.M.D., Raynaud, M., Venancio, A.L., Bassanezi, R.B. and Redon, R. 2013. Identification of citrus varieties using laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS). *Computers and Electronics in Agriculture* 95: 11–18.
- Bretó, M.P., Ruiz, C., Pina, J.A. and Asíns, M.J. 2001. The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21: 285-293.
- Cai Q, Guy CL, Moore GA 1994. Extension of the linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theor Appl Genet* 89:606-614.
- Castle, W.S., Tucker, D.P.H., Krezdorn, A.H. and Youtsey, C.O. 1993. Rootstocks for Florida citrus. Rootstock selection: The first step to success. Circular SP-42. Univ. Florida. IFAS. Gainesville. Florida. 92 pages.
- Chase, M., Kesseli, M.R. and Bawa, K.S. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *Amer. J. Bot.* 83(1): 51-57.
- Corazza-Nunes, M.J., Machado, M.A., Nunes, W.M., Cristofani, M. and Targon M.L. 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (*C. paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSRs markers. *Euphytica* 126: 169-176.
- Crouch, H.K; Crouch, J.H; Jarret, R.L; Cregan, P.B. and Ortiz, R. 1998. Segregation of microsatellite loci from haploid and diploid gametes in Musa. *Crop Sci.* 38(1): 211-217.
- Davies, F.S. and Albrigo, L.G. 1994. Citrus. CAB International. Great Britain. 254 págs.
- Distefano, G., Cirilli, M., Thomas, B. and Muleo, R. 2013. Ectopic expression of Arabidopsis phytochrome B in Troyer citrange affects photosynthesis and plant morphology. *Scientia Horticulturae* 159: 1-7.
- Gallego, C.J.E., Enriquez V.A.L., Caicedo. A.A., Posso, T.A.M. and, Muñoz. F.J.E. 2017. Diversidad genética en patrones de cítricos mediante microsatélites amplificados al azar (RAMs). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 15(1): 85-94.
- Ganopoulos, I., Xanthopoulou, A., Mastrogiani, A., Drouzas, A., Kalivas, A., Bletsos, F., Krommydas, K., Ralli, P., Tsaftaris, A. and Madesis, P. 2015. High Resolution Melting (HRM) analysis in eggplant (*Solanum melongena* L.): A tool for microsatellite genotyping and molecular characterization of a Greek Genebank collection. *Biochemical Systematics and Ecology* 58: 64-71.
- Golein, B., Koltunow, A.M., Talaie, A., Zamani, Z. and Ebadi, A. 2005. Isolation and characterization of microsatellites loci in the lemon (*Citrus limon*). *Mol. Ecol. Notes* 5: 253 - 255.
- Grosser, J.W. and Gmitter, Jr. F.G. 1990. Protoplast fusion and *Citrus* improvement. *Plant Breeding Review* 8: 339 - 374.
- Gutiérrez, D.A., Sánchez, G.J.A., Torres, C.J.A., Cerda, H.I.M. and Ojeda, Z.Ma.C. 2015. Genetic diversity of Mexican avocado in Nuevo Leon. *In: Molecular Approaches to Genetic Diversity*. Mahmut Caliskan, Guul Cevahir Oz, I. Halil Kavakli and Birguul Ozcan (editors). Publisher: In Tech. pp. 141-159. doi: 10.5772/59795.
- Hall, D.G., Justin, G. and Stephen, L.L. 2015. Further investigations on colonization of *Poncirus trifoliata* by the Asian citrus psyllid. *Crop Protection* 72: 112-118.
- Hynniewta, M., Kumar, M.S. and Rama, R.S. 2014. Genetic diversity and phylogenetic analysis of *Citrus* (L) from north-east India as revealed by meiosis, and molecular analysis of internal transcribed spacer region of rDNA. *Meta Gene* 2: 237-251.
- Hui, S. 1999. Sweet Oranges: The Biogeography of *Citrus sinensis*. URI: . Vancouver, British Columbia, Canadá.
- Laurentini, H. and Karlovsky, P. 2007. AFLP fingerprinting of sesame (*Sesamum indicum*L.) cultivars: Identification,

- genetic relationship and comparison of AFLP informativeness parameters. *Genetics Resources and Crop Evolution* 54: 1437–1446. .
- León, J. 1987. *Botánica de los cultivos tropicales*. 3 ed. San José (Costa Rica): Iica/Catie, 84 págs.
- Mahuku, G.S., Henríquez, M.A., Muñoz, J.E. and Buruchara, R.A. 2002. Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the Bean Angular Leaf Spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytopathology* 96(6): 580-589.
- Morillo, Y., Morillo, A.C., Chagüeza, Y., Caicedo, A. and Muñoz, J.E. 2010. Caracterización mediante microsatélites de 34 introducciones de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck del Banco de Germoplasma de Corpoica-Palmira. *Acta Agronómica* 59(1): 9-19.
- Muñoz, J.E., Morillo, A.C. and Morillo, Y. 2008. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica* 57(4): 219-226.
- Nei, M., Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 76: 5269-5273. DOI: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Novelli, V.M., Cristofani, M., Souza, A.A. and Machado, M. A. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Gen. Mol. Biol.* 29(1): 90-96.
- Núñez-Colín, C.A. and Escobedo-López, D. 2014. Caracterización de germoplasma vegetal: La piedra angular en el estudio de los recursos fitogenéticos. *Acta Agrícola y Pecuaria* 1(1): 1-6.
- Orduz, R.J.O and Mateus, C.D.M. 2012. Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia [online]. Disponible: .
- Padrón-Chávez, J.E. and Rocha, P.M.A. 2008a. Cultivares y portainjertos de cítricos. En: Rocha-Peña, M.A., y Padrón-Chávez, J.E. (Editores). 2008. *El cultivo de los cítricos en el estado de Nuevo León*. Libro Científico No. 1. INIFAP. CIRNE. Campo Experimental General Terán. General Terán, Nuevo León. México. 563 p.
- Padrón-Chávez, J.E., and Rocha, P.M.A., 2008b. Patrones cítricos para Nuevo León. Folleto Técnico No. 9. INIFAP. CIRNE. Campo Experimental General Terán. General Terán, Nuevo León. México. 29 pp.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358. DOI: 10.1093/bioinformatics/12.4.357.
- Pavliček, A., Hrdá, S. and Flegr, J. 1999. Free-Tree--freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica (Praha)* 45(3): 97-99
- Peña-Caballero, V., Morales-Vargas, A.T. and Núñez-Colín, C.A. 2020. Eigenanálisis aplicado a diferentes áreas de las ciencias agrícolas y biotecnología: una revisión. *Acta Agrícola y Pecuaria* 6: e0061009. doi: 10.30973/aap/2020.6.0061009.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Voguel, J., Tingey, Scott. and Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-228.
- Prevoost, A., and Wilkinson, M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 107-112. .
- Rivera, R., Edwards, K.J., Barker, J.H.A., Arnold, G.M., Ayad, G., Hodgkin, T. and Karp, A.A. 1999. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. *Genoma* 42(2): 668-675.
- Roldán, R.I., Dendaum, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A., and De Loose, M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium ssp.*). *Molecular Breeding* 6: 125-134. .
- Rolfh, F.J. 2005. NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.2. Getting Started Guide. Exeter Software. New York, USA.
- Rossetto, M., Mclaunchlan, A., Harriss, F.C.L., Henry, R.J., Baverstock, P.R., Lee, L.S., Maguire, T.L. and Edwards, K.J. 1999. Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae). *Theor. Appl. Genet.* 98: 1091-1098.
- Shannon, C.E. 1948. A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal* 27: 379-423, 623-656. DOI: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x
- Streiff, R., Ducouso, A., Lexer, C., Steinkellner, H., Glossl, J. and Kremer, A. 1999. Pollen dispersal inferred from

- paternity analysis in mixed oak stands of *Quercus robur* L and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. Mol. Ecol. 8: 831-841.
- Uzun, A., Yesiloglu, T., Aka-Kacar, Y., Tuzcu, O. and Gulsen, O. 2009. Genetic diversity and relationships within Citrus and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). Scientia Horticulturae 12: 306-312.
- Varshney, R.K., Chabane, K., Hendre, P.S., Aggarwal, R.K. and Graner, A. 2007. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barley. Plant Science 173: 638-649. doi:10.1016/j.plantsci.2007.08.010.
- Zane, L., Bargelloni, L. and Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. Mol. Ecol. 11(11): 1-16.
- Zhao, X. and Kochert, G. 1993. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). Plant Mol. Biol. 21(4): 607-614.