

Caracterización y diversidad genética de naranjos dulces (*Citrus sinensis* L.) del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán

Characterization and genetic diversity of sweet oranges (*Citrus sinensis* L.) from the germplasm bank of the General Terán Experimental Station

Isidro Humberto Almeyda León^{1*}, Víctor Pecina Quintero², María Genoveva Álvarez Ojeda³ Raúl Rodríguez Guerra¹, Efraín Acosta Díaz⁴, Carlos Alberto Núñez Colín⁵

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 Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,

Agrícolas y Pecuarias. Km 6.5 Carr. Celaya-San Miguel de Allende, C.P. 38010, Celaya, Guanajuato, México.

³Campo Experimental Río Bravo, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Km 61 Carretera Matamoros-Reynosa, C.P. 88900, Río Bravo, Tamaulipas, México. ⁴Investigador Asociado al Campo Experimental General Terán. ⁵Programa de Ingeniero en Biotecnología, Departamento de Ingeniería, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

*Autor para correspondencia: almeyda.isidro@inifap.gob.mx

RESUMEN

La citricultura representa un segmento económico muy importante en la agricultura mexicana, ya que genera una derrama económica superior a los 375 millones de dólares. Sin embargo, las amenazas fitosanitarias emergentes en el cultivo de los cítricos, como es el caso del Huanglongbing, requieren la generación de variedades con resistencia o tolerancia a estas enfermedades. Los bancos de germoplasma representan una alternativa para encontrar y/o generar nuevas variedades de interés, pero se requiere que los materiales que albergan sean caracterizados para conocer la diversidad genética existente y en lo posible, identificar germoplasma promisorio para procesos de selección y mejoramiento genético. El objetivo del presente estudio fue caracterizar y conocer la diversidad genética de las accesiones de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.) resguardadas bajo condiciones de invernadero en el banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán, N.L. Se evaluaron 33 variedades de naranjo dulce y también se incluyó una variedad de limón y una de toronjo. La caracterización genética se realizó mediante la técnica de Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs) y se utilizaron cuatro marcadores. Se registró un alto porcentaje de polimorfismo y se pudieron diferenciar todos los materiales involucrados en el estudio. Además, se generaron fragmentos raros y/o únicos, lo cual establece el alto poder resolutivo de los cuatro marcadores utilizados. Los altos valores registrados en la diversidad genética, permite inferir la existencia de una amplia base genética en el germoplasma de naranjo dulce incluido en este estudio, misma que puede ser utilizada en programas de mejoramiento genético para la generación de nuevas variedades con características de interés fitosanitario, agronómico y/o comercial.

ABSTRACT

Citriculture represents a very important economic segment in Mexican agriculture, since it generates an economic income of more than 375 million dollars. However, emerging phytosanitary threats in citrus cultivation, such as Huanglongbing, require the generation of varieties with resistance or tolerance to these diseases. Germplasm banks represent an alternative to find and/or generate new varieties of interest, but the materials included need to be characterized in order to know the existing genetic diversity and, if possible, identify promising germplasm for selection processes and genetic improvement. The objective of this study was to characterize and determine the genetic diversity of sweet orange (*Citrus sinensis* L.) accessions from the germplasm bank of the General Terán Experimental Station, N.L. Thirty-three varieties of sweet orange were evaluated, and one lemon and a grapefruit variety were included. Genetic characterization was performed using the Random Amplified Microsatellites (RAMs) technique and four markers were used. A high percentage of polymorphism was registered and all the materials involved in the study could be differentiated. In addition, rare and/or unique fragments were generated, which establishes the high resolving power of the four markers used. The high values registered in genetic diversity allow us to infer the existence of a broad genetic base in the sweet orange germplasm included in this study, which can be used in genetic improvement programs for the generation of new varieties with characteristics of phytosanitary interest, agronomic and/or commercial.

Keywords: Citrus, germplasm, markers, polymorphism, diversity.

Palabras clave: Cítricos, germoplasma, marcadores, polimorfismo, diversidad.

INTRODUCCIÓN

La historia ubica el origen de los cítricos hace 20 millones de años, mucho antes de la aparición de los seres humanos, desde entonces, hasta la actualidad han sufrido numerosas modificaciones, ya que los cítricos que hoy se conocen distan mucho de sus ancestros (Medina, 2015). El hombre comenzó a seleccionarlos y a domesticarlos para incorporarlos como alimento desde hace 6.000 a 10.000 años (Gómez *et al.*, 2020). El género *Citrus* y los géneros relacionados (*Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* y *Microcitrus*), pertenecen a la familia Rutaceae, subfamilia Aurantoideae, los cuales están ampliamente distribuidos a través de la región del monzón desde el oeste de Pakistán hasta el centro-norte de China y al sur a través del archipiélago de las Indias Orientales hasta Nueva Guinea y el Archipiélago Bismarck, noreste de Australia, Nueva Caledonia, Melanesia y las islas de la Polinesia Occidental (Swingle and Reece, 1967). Los hábitats nativos de los cítricos y géneros relacionados se ubican en las regiones anteriormente señaladas, aunque el origen geográfico y la época de dispersión de las especies de cítricos a través del sureste de Asia permanece incierta. El mayor obstáculo para resolver esta incertidumbre es la escasa comprensión de su compleja genealogía debido a la mezcla existente entre los cítricos cultivados como se ha demostrado recientemente (Wu *et al.*, 2014).

Los cítricos se cultivan en casi todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo dentro de la franja comprendida entre los 40° de latitud N y S, con una producción que supera los 100 millones de toneladas por año, se constituyen como el principal cultivo frutal a nivel mundial (Gómez *et al.*, 2020). A pesar de que se cultivan en más de 130 países, cerca del 70 % de la producción se concentra solo en cinco (China, Brasil, Estados Unidos, India y México) lo que pone en evidencia claros contrastes en la escala productiva (Gómez *et al.*, 2020). En México, la cítricultura representa un segmento económico muy importante en la agricultura mexicana, ya que genera una derrama económica superior a los 375 millones de dólares (González *et al.*, 2020). En los últimos años, la superficie cultivada con cítricos en el país se ha incrementado en 8 % al registrarse 620,000 ha en 2021 con respecto a las 569,914 ha existentes en 2010. La especie con mayor importancia en México es la naranja dulce, principalmente por la superficie sembrada (340 mil ha) y producción (rendimientos promedio de 13.95 ton ha⁻¹), con un valor superior a los 10.18 mil millones de pesos (Rivera *et al.*, 2020).

En los bancos de germoplasma vegetal, los materiales albergados requieren ser caracterizados, documentar la introducción y su existencia como parte de la colección. Esta información es fundamental para evitar duplicidad y confusión en el acervo, así como para identificar

INTRODUCTION

History places the origin of citrus fruits 20 million years ago, long before the appearance of human beings. Since then, they have undergone numerous modifications up to the present, since the citrus fruits that are known today are far from their ancestors (Medina, 2015). Man began to select and domesticate them to incorporate them as food from 6,000 to 10,000 years ago (Gómez *et al.*, 2020). The genus *Citrus* and related genera (*Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* and *Microcitrus*), belong to the family Rutaceae, subfamily Aurantoideae, which are widely distributed throughout the monsoon region from western Pakistan to north-central China and south through the East Indies archipelago to New Guinea and the Bismarck Archipelago, north-eastern Australia, New Caledonia, Melanesia and the islands of Western Polynesia (Swingle and Reece, 1967). The native habitats of citrus and related genera are located in the regions noted above, although the geographic origin and timing of the dispersal of citrus species through Southeast Asia remains uncertain. The biggest obstacle to resolving this uncertainty is the poor understanding of its complex genealogy due to existing mixing among cultivated citrus as recently demonstrated (Wu *et al.*, 2014).

Citrus fruits are grown in almost all tropical and subtropical regions of the world within the range between 40° N and S latitude, with a production that exceeds 100 million tons per year, they are the main crop fruit worldwide (Gómez *et al.*, 2020). Despite the fact that they are cultivated in more than 130 countries, close to 70 % of the production is concentrated in only five (China, Brazil, the United States, India and Mexico), which shows clear contrasts in the productive scale (Gómez *et al.*, 2020). In Mexico, citrus farming represents a very important economic segment in Mexican agriculture, since it generates an economic income of more than 375 million dollars (González *et al.*, 2020). In recent years, the area cultivated with citrus in the country has increased by 8 %, registering 620,000 ha in 2021 compared to the 569,914 ha existing in 2010. The most important species in Mexico is the sweet orange, mainly due to the planted area (340 thousand ha) and production (average yields of 13.95 tons ha⁻¹), with a value of more than 10.18 billion pesos (Rivera *et al.*, 2020).

In plant germplasm banks, the materials need to be characterized, documenting the introduction and their existence as part of the collection. This information is essential to avoid duplication and confusion in the collection, as well as to identify promising introductions for selection processes, genetic improvement or agro-industrial processes (Ganopoulos *et al.*, 2015). However, both in the genetic characterization and in the improvement of different species, there has not been as much success as that achieved in annual crop improvement programs, mainly due to the characteristics related to the reproductive biology of these species, for example, high interspecific fertility,

introducciones promisorias para procesos de selección, mejoramiento genético o procesos agroindustriales (Ganopoulos *et al.*, 2015). Sin embargo, tanto en la caracterización genética como en el mejoramiento de diferentes especies no se ha tenido el éxito como el alcanzado en programas de mejoramiento de cultivos anuales, debido principalmente a las características relacionadas con la biología reproductiva de estas especies, por ejemplo, alta fertilidad interespecífica, reproducción apomítica, poliembrionía, casos numerosos de esterilidad, ínter y autocompatibilidad, heterocigosis elevada, una fase juvenil prolongada y la escasez de marcadores de ADN polimórficos (Bretó *et al.*, 2001; Corazza-Nunes *et al.*, 2002; Ganopoulos *et al.*, 2015).

Las técnicas moleculares han permitido el desarrollo de marcadores de ADN asociados con características de interés, así como el desarrollo del mapa de ligamiento, 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. 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 genética en cítricos y géneros relacionados, incluyendo marcadores isoenzimáticos (Medina *et al.*, 2003), SRAP (Uzun *et al.*, 2009), RAPD (Hynniewta *et al.*, 2014), y AFLP (León, 1987).

Las repeticiones de secuencias simples o microsátélites (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).

Las Secuencias Simples Repetidas (SSR), se consideran marcadores ideales para la discriminación de genotipos; éstos en su modalidad de Microsátélites 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

apomictic reproduction, polyembryony, numerous cases of sterility, inter- and self-compatibility, high heterozygosity, a prolonged juvenile phase and a paucity of polymorphic DNA markers (Bretó *et al.*, 2001; Corazza-Nunes *et al.*, 2002; Ganopoulos *et al.*, 2015).

Molecular techniques have allowed the development of DNA markers associated with characteristics of interest, as well as the development of the linkage map, which have shown to be useful in carrying out an early selection in the progeny with the desired characters in classic breeding programs. 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 help 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 (Medina *et al.*, 2003), SRAP (Uzun *et al.*, 2009), RAPD (Hynniewta *et al.*, 2014), and AFLP (León, 1987).

Simple sequence repeats, or microsatellite repeats (SSRs), are DNA intervals with tandemly repeated penta, tetra, tri, di, or mononucleotide units (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 widely used because they are highly polymorphic and codominant (Zane *et al.*, 2002), they are useful in breeding and diversity assessment and cultivar identification, as well as in germplasm conservation (Rivera *et al.*, 1999). SSRs are considered ideal markers for genetic and physical mapping of the genome, genotype discrimination, population genetics studies, characterization of inbred lines, diversity studies (Rossetto *et al.*, 1999), gene flow, crossbreeding systems. (Chase *et al.*, 1996) and paternity analysis (Streiff *et al.*, 1999).

Simple Sequence Repeats (SSR) are considered ideal markers for genotype discrimination; these in their Random Amplified Microsatellites (RAMs) modality are useful for measuring genetic diversity in plants and animals, with discriminatory power between families and species and also intraspecifically (Morillo *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2008), they show the basis of individual variation, they allow the selection of specific regions within the DNA molecule for specific studies, the number of detectable polymorphisms is theoretically unlimited, and they allow analysis of both the information that is expressed and that which is not (Mahuku *et al.*, 2002). This technique has been a valuable and accurate tool for the evaluation of genetic diversity in citrus and related genera (Hynniewta *et al.*, 2014). Based on the above, the objective of this study was to characterize with marker RAMs and determine the genetic diversity of the accessions of sweet orange (*Citrus sinensis* L.) from the germplasm bank of the General Terán Experimental Station.

(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). Esta técnica ha sido un instrumento valioso y preciso para la evaluación de la diversidad genética en cítricos y géneros relacionados (Hynniewta *et al.*, 2014). Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio, fue caracterizar con marcadores RAMs y conocer la diversidad genética de las accesiones de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.) del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron hojas jóvenes y sanas de 33 accesiones (dos árboles por accesión) de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.), así como de una variedad de limón (*Citrus lemon* L.) y una variedad de toronjo (*Citrus paradisi* L.) (Cuadro 1), del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán, ubicado en el Km 31 Carretera Montemorelos-China, General Terán, Nuevo León, México, 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.

Extracción de ADN

La extracción del ADN de los materiales colectados se realizó a partir de la metodología reportada por Almeyda *et al.* (2001).

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.

MATERIALS AND METHODS

Vegetal material

Young and healthy leaves were collected from 33 sweet orange (*Citrus sinensis* L.) accessions (two trees per accession), as well as from a lemon variety (*Citrus lemon* L.) and a grapefruit variety (*Citrus paradisi* L.) (Table 1), from the germplasm bank of the General Terán Experimental Station, located at Km 31 Montemorelos-China Highway, General Terán, Nuevo León, México, located at coordinates 25° 02' and 25° 30' north latitude; the meridians 99° 00' and 99° 48' west longitude, at an altitude of 267 meters above sea level.

Extraction of DNA

The extraction of DNA from the collected materials was performed using the methodology reported by Almeyda *et al.* (2001).

Random Amplified Microsatellites (RAMs)

Four RAM markers were used for amplification (Table 2). PCR reactions were performed 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 thermocycler (BioRad Thermal Cycler) and the program used was: One cycle at 95 °C for 5 minutes, followed by 37 cycles at 95 °C for 30 seconds, 50-55 °C (according to the initiator used) for 30 seconds, 72 °C for 2 minutes and a final extension at 72 °C for 10 minutes. The amplified fragments in the PCR's were fractionated in 2.0 % agarose gels for one hour thirty minutes at 100 V. The gels were stained with the GelRed® dye and analyzed in an ultraviolet light transilluminator.

Cuadro 1. Accesiones de variedades de naranjo dulce, limón y toronjo del banco de germoplasma del Campo Experimental

General Terán, N.L.

Table 1. Accessions of sweet orange, lemon and grapefruit from the germplasm bank of the General Terán Experimental Station, N.L.

No. de accesión	Variedad	Nombre científico
1	Queen	<i>Citrus sinensis</i> L.
2	Hamlin O.L.	<i>Citrus sinensis</i> L.
3	Parson Brown	<i>Citrus sinensis</i> L.
4	Temprana L.R.	<i>Citrus sinensis</i> L.
5	Hamlin L.R.	<i>Citrus sinensis</i> L.
6	Moro	<i>Citrus sinensis</i> L.
7	Salustian	<i>Citrus sinensis</i> L.
8	Marrs	<i>Citrus sinensis</i> L.
9	Tarocco	<i>Citrus sinensis</i> L.
10	Pineapple	<i>Citrus sinensis</i> L.
11	San Miguel L.R.	<i>Citrus sinensis</i> L.
12	Jaffa	<i>Citrus sinensis</i> L.
13	Valencia	<i>Citrus sinensis</i> L.
14	Campbell O.L.	<i>Citrus sinensis</i> L.
15	Cadenera	<i>Citrus sinensis</i> L.
16	Fisher navel	<i>Citrus sinensis</i> L.
17	Washington navel	<i>Citrus sinensis</i> L.
41	Valencia Frost	<i>Citrus sinensis</i> L.
42	Valencia Cutter	<i>Citrus sinensis</i> L.
56	Cara Cara navel	<i>Citrus sinensis</i> L.
57	Carter navel	<i>Citrus sinensis</i> L.
58	Leng navel	<i>Citrus sinensis</i> L.
59	Dream navel	<i>Citrus sinensis</i> L.
60	Atwood navel	<i>Citrus sinensis</i> L.
61	Río Grande navel Nuc.	<i>Citrus sinensis</i> L.
62	Washington Frost navel	<i>Citrus sinensis</i> L.
63	Fukumoto navel	<i>Citrus sinensis</i> L.
64	Cluster Sport navel	<i>Citrus sinensis</i> L.
66	Valencia olinda Nuc.	<i>Citrus sinensis</i> L.
67	Valencia Delta	<i>Citrus sinensis</i> L.
68	Valencia Dom Joao	<i>Citrus sinensis</i> L.
17A	Washington navel IVIA	<i>Citrus sinensis</i> L.
17B	Rocky Hill navel	<i>Citrus sinensis</i> L.
80	Limón Villa Franca	<i>Citrus lemon</i> L.
82	Toronja Río Red	<i>Citrus paradisi</i> L.

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
CA	DBDACACACACACACA	50 °C
CCA	DDBCCACCACCACCA	55 °C
CT	DYDCTCTCTCTCTCTC	55 °C
TG	HVHTGTGTGTGTGTGTGT	55 °C

Análisis estadísticos

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 fórmula $PIC = 2f_i(1-f_i)$, propuesta por Roldán-Ruiz *et al.* (2000). Donde: PIC es el contenido de información 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 RP de cada marcador, se calculó con la fórmula $RP = \sum I_b$ (Prevost y Wilkinson 1999). Donde: I_b representa la informatividad del fragmento. La I_b se puede representar en una escala 0 - 1 por la siguiente fórmula: $I_b = 1 - [2 \times (0.5 - p)]$. Donde: p es la proporción de las 35 accesiones que contienen el fragmento.

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

Relaciones genéticas

Cada iniciador RAMs recibió una puntuación, '1' para presencia o '0' para ausencia de bandas en cada accesión, y se generó una matriz binaria. Se generaron matrices de similitud por pares mediante el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979), los datos moleculares se adaptaron utilizando la versión 2.11 de NTSYS-PC (Rolfh, 2005). Se construyó un dendrograma utilizando el método de grupos de pares no ponderados con un método de promedio aritmético (UPGMA) y el análisis de coordenadas principales se realizó utilizando NTSYS PC versión 2.11 (Applied Biostatistics Inc, Setauket, EE. UU.). Se realizó un remuestreo bootstrap para determinar la robustez del dendrograma, y se obtuvieron mil réplicas de arranque de los datos originales de los 35 genotipos evaluadas y se generó un árbol de consenso (Núñez-Colín y Escobedo-López, 2014). A partir de estas matrices de 1000, se determinaron los límites de confianza para cada comparación por pares (Felsenstein, 1985). También, 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). Para cada fragmento se calculó el índice de Shannon (Shannon, 1948) y se

Statistical analysis

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), Resolving Power (PR) and Diversity Index (DI).

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

The MI was calculated with the formula $MI = PIC \times RME$ (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 RP of each marker was calculated with the formula $RP = \sum I_b$ (Prevost and Wilkinson 1999). Where: I_b represents the informativeness of the fragment. The I_b can be represented on a 0 - 1 scale by the following formula: $I_b = 1 - [2 \times (0.5 - p)]$. Where: p is the proportion of the 35 accessions that contain the fragment.

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

Genetic relationships

Each RAMs primer was given a score, '1' for presence or '0' for absence of bands in each accesión, and a binary matrix was generated. Pairwise similarity matrices were generated using the similarity coefficient from Nei and Li (1979), the molecular data were fitted using NTSYS-PC version 2.11 (Rolfh, 2005). A dendrogram was constructed using the unweighted pairwise group method with an arithmetic average method (UPGMA) and principal coordinate analysis was performed using NTSYS PC version 2.11 (Applied Biostatistics Inc, Setauket, USA). A bootstrap resampling was performed to determine the robustness of the dendrogram, and a thousand bootstrap replicates of the original data of the 35 genotypes evaluated were obtained and a consensus tree was generated (Núñez-Colín and Escobedo-López, 2014). From these matrices of 1000, confidence limits were determined for each pairwise comparison (Felsenstein, 1985). In addition, a Principal Coordinate Analysis was generated to make the three-dimensional representation of the accesiones in a Euclidean plane (Peña-Caballero *et al.*, 2020) using NTSYSpc v2.2 (Rolfh, 2005). 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.

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:

$$SI = -1 * [p * \log_2(p) + (1 - p) * \log_2(1 - p)]$$

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

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, proporcionando información para evaluar la diversidad genética de los materiales considerados en el estudio. En la Figura 1 se muestran las amplificaciones obtenidas con algunas de las variedades de naranjo dulce con los marcadores CA y CCA.

Se generaron 97 fragmentos, que oscilaron de 22 para los marcadores CCA y TG, a 24 y 29 para los marcadores CT y CA respectivamente (Cuadro 3). En el análisis de frecuencia y distribución de los fragmentos polimórficos se observó que 14 fragmentos fueron específicos o únicos (Cuadro 3). El genotipo Cluster Sport navel presentó tres fragmentos únicos y el genotipo Hamlin O.L. dos con el mismo marcador CA. El genotipo Jaffa presentó dos fragmentos con el marcador TG. Otros siete genotipos presentaron un fragmento único, Parson Brown con el marcador CA, Limón Villa Franca, Atwood navel y Marrs con el marcador CT, Rocky Hill navel, Washington Frost navel y Cara Cara navel con el marcador CCA.

Los resultados anteriores, demuestran la funcionalidad de los marcadores con la técnica de RAMs para el análisis de diferentes especies de cítricos, teniendo en consideración que el número de fragmentos amplificados puede variar dependiendo de las condiciones de amplificación utilizadas y el material genético utilizado en el estudio. Por otra parte, no se debe perder la importancia de los fragmentos raros y/o únicos ya que a partir de estos se pueden diseñar iniciadores específicos para identificar algún genotipo en particular.

El valor de PIC varió entre 0.227 (CA) y 0.280 (CT) con un promedio de 0.252. La proporción múltiple efectiva (EMR) presentó valores de 22 (CCA y TG) a 29 (CA), con un promedio de 24. El índice de marcador (MI) presentó valores de 5.1 (TG) a 6.6 (CA) con un promedio por combinación de 6. Para evaluar el poder discriminatorio entre los marcadores RAMs utilizados, se calculó el poder de resolución (RP), el cual se ubicó entre 16.16 (TG) y 39.28 (CT), con un promedio de 31.74. Mientras que el índice de diversidad (DI) varió de 69 a 83 %, con un promedio de 78 % (Cuadro 4). De esta manera, con los valores obtenidos, se considera al marcador CT como el más resolutivo de los marcadores utilizados en este

The Shannon index was calculated using the formula:

$$SI = -1 * [p * \log_2(p) + (1 - p) * \log_2(1 - p)]$$

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

RESULTS

Amplification of fragments with the markers used

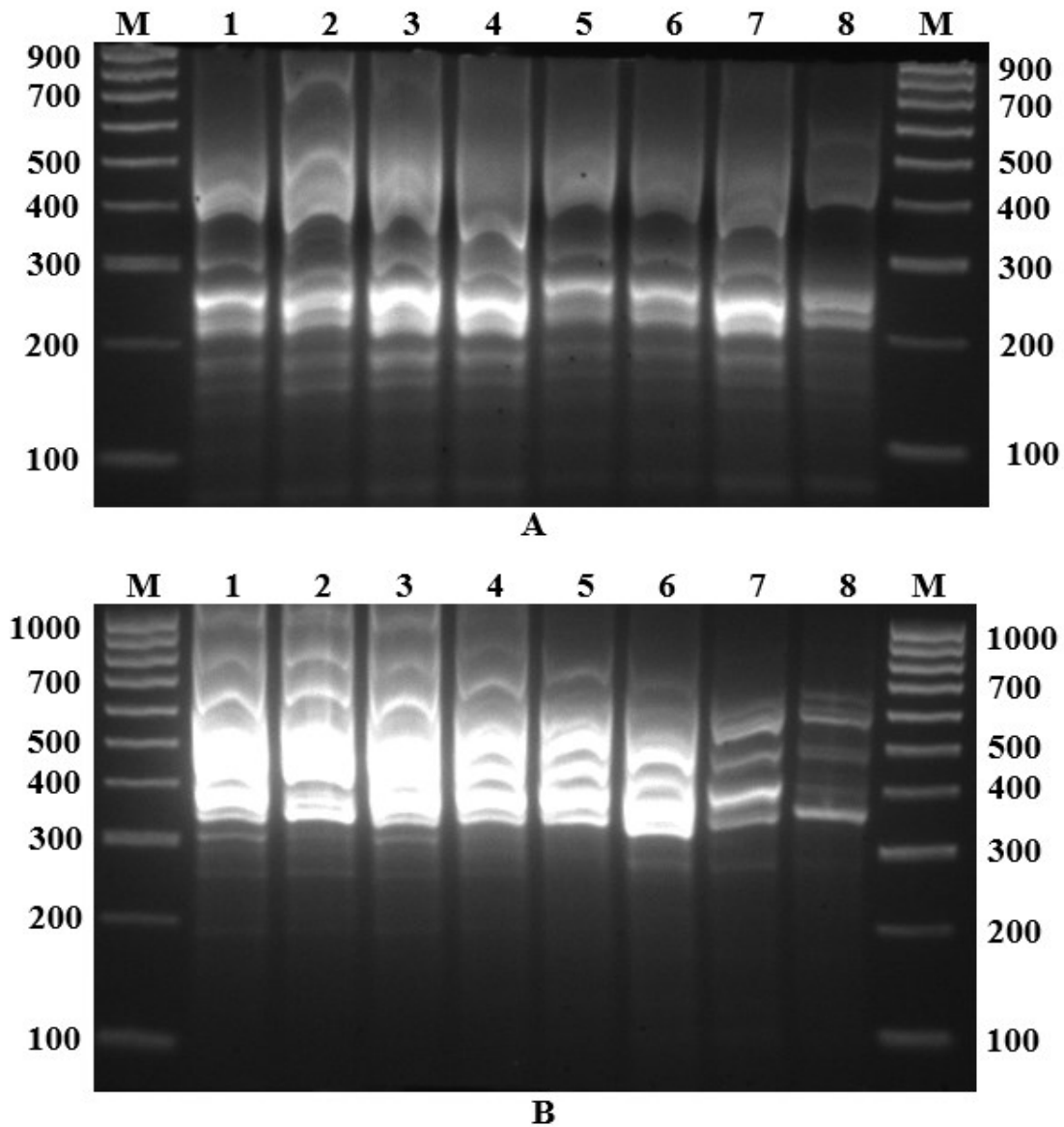
The four markers used generated fragments of different molecular weights according to the amplification conditions used, providing information to assess the genetic diversity of the materials considered in the study. The Figure 1 shows the amplifications obtained with some of the sweet orange varieties with the CA and CCA markers. Ninety-seven fragments were generated, ranging from 22 for the CCA and TG markers to 24 and 29 for the CT and CA markers, respectively (Table 3). In the analysis of frequency and distribution of polymorphic fragments, it was observed that 14 fragments were specific or unique (Table 3). The Cluster Sport navel genotype presented three unique fragments and the Hamlin O.L. two with the same CA marker. The Jaffa genotype presented two fragments with the TG marker. Seven other genotypes presented a single fragment, Parson Brown with the CA marker, Limón Villa Franca, Atwood navel and Marrs with the CT marker, Rocky Hill navel, Washington Frost navel and Cara Cara navel with the CCA marker.

The previous results demonstrate the functionality of the markers with the RAMs technique for the analysis of different citrus species, taking into consideration that the number of amplified fragments may vary depending on the amplification conditions used and the genetic material used in the study. On the other hand, the importance of rare and/or unique fragments should not be lost, since specific primers can be designed from these to identify a particular genotype.

The PIC value varied between 0.227 (CA) and 0.280 (CT) with an average of 0.252. The effective multiple ratio (EMR) presented values from 22 (CCA and TG) to 29 (CA), with an average of 24. The marker index (MI) presented values from 5.1 (TG) to 6.6 (CA) with an average per combination of 6. To evaluate the discriminatory power between the RAMs markers used, the resolving power (RP) was calculated, which it was located between 16.16 (TG) and 39.28 (CT), with an average of 31.74. While the diversity index (DI) varied from 69 to 83%, with an average of 78% (Table 4). In this way, with the values obtained, the CT marker is considered the most resolute of the markers used in this study, while the TG marker was the least resolving.

Figura 1. Amplificaciones por PCR a partir del ADN extraído de diferentes accesiones de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.) y dos marcadores mediante la técnica de Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs). **A.** Carriles M: Marcador de peso molecular, Carril 1: Hamlin O.L., Carril 2: Moro, 3: Marrs, 4: San Miguel L.R., 5: Washington navel, 6: Cara Cara navel, 7: Dream navel, 8: Rocky Hill navel, con el marcador CA. **B.** Los diferentes carriles, corresponden a los mismos materiales con el marcador CCA.

Figure 1. PCR amplifications from DNA extracted from different accessions of sweet orange (*Citrus sinensis* L.) and two markers using the Random Amplified Microsatellites (RAMs) technique. **A.** Lanes M: Molecular Weight Marker, Lane 1: Hamlin O.L., Lane 2: Moro, 3: Marrs, 4: San Miguel L.R., 5: Washington navel, 6: Cara Cara navel, 7: Dream navel, 8: Rocky Hill navel, with the marker CA. **B.** The different lanes correspond to the same materials with the CCA marker.



Cuadro 3. Análisis de comparación de iniciadores con base en el número de fragmentos, fragmentos raros y fragmentos únicos.

Table 3. Comparison analysis of primers based on number of fragments, rare fragments, and unique fragments.

Marker	Number of fragments	Rare fragments	Unique fragments
CCA	22	2	3
TG	22	3	2
CT	24	1	3
CA	29	1	6

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.

Marker	PIC ^a	EMR ^b	MI ^c	RP ^d	DI ^e
CCA	0.268	22	5.9	37.14	0.82
CT	0.280	23	6.4	39.28	0.83
CA	0.227	29	6.6	34.80	0.78
TG	0.232	22	5.1	16.16	0.69
Average	0.252	24	6.0	31.74	0.78

^a Polymorphic information content.

^b Effective multiple ratio.

^c Marker index.

^d Resolving power.

^e Diversity index

Análisis de similitud genética

El dendrograma construido a partir de las matrices de similitud de Dice, mostró la formación de ocho grupos principales de genotipos (Figura 2), lo cual sugiere la existencia de una amplia base genética en el germoplasma utilizado. El grupo 1 lo componen 11 genotipos, aunque se observan pequeños grupos con base a su origen genético (Valencia), este grupo quedo constituido por los genotipos Cadenera, Campbell OL, Fisher navel, Valencia Cutler, Valencia Frost, Leng navel, Valencia Delta, Valencia Dom Joao, Valencia Olinda Nuc, Rio Grande navel Nuc y Cluster Sport navel. El grupo 2 lo integraron diez genotipos e inicia con Marrs, Pineapple, Salustan, Hamlin LR, Hamlin OL, Parson Brown, Tarocco, Temprana LR, Queen y San Miguel LR. En los grupos 3, 4 5 y 6, se observan genotipos estrechamente emparentados por su origen genotipo derivados de Navel, el grupo 3 quedó conformado por Limón Villa Franca, Toronja Rio Red, Rocky Hill navel, Washington navel IVIA, el grupo 4 quedó integrado por Cara Cara navel, Carter navel y Washington navel, el grupo 5 quedó constituido por Fukimoto navel, Washington Frost navel, el grupo 6 incluyó a Dream navel, Valencia y Atwoo

Genetic similarity analysis. The dendrogram built from Dice's similarity matrices showed the formation of eight main groups of genotypes (Figure 2), which suggests the existence of a broad genetic base in the germplasm used. The group 1 is made up of 11 genotypes, although small groups are observed based on their genetic origin (Valencia), this group was made up of the Cadenera, Campbell OL, Fisher navel, Valencia Cutler, Valencia Frost, Leng navel, Valencia Delta, Valencia Dom Joao, Valencia Olinda Nuc, Rio Grande navel Nuc and Cluster Sport navel genotypes. The group 2 was made up of ten genotypes and started with Marrs, Pineapple, Salustan, Hamlin LR, Hamlin OL, Parson Brown, Tarocco, Temprana LR, Queen and San Miguel LR. In groups 3, 4, 5 and 6, genotypes closely related by their genotype origin derived from Navel are observed, group 3 was made up of Limón Villa Franca, Toronja Rio Red, Rocky Hill navel, Washington navel IVIA, group 4 was integrated by Cara Cara navel, Carter navel and Washington navel, group 5 was made up of Fukimoto navel, Washington Frost navel, group 6 included Dream navel, Valencia and Atwood navel. The most divergent genotypes formed two separate groups: group 7 for Jaffa and group 8 for Moro (Figure 2).

navel. Los genotipos más divergentes formaron dos grupos separados el grupo 7 por Jaffa y el grupo 8 por Moro (Figura 2).

El Análisis de Coordenadas Principales (ACP), muestra que las tres primeras Coordenadas explican el 36 % de la varianza total observada, lo cual confirma lo observado en el dendrograma y muestra la dispersión de los genotipos, así como la presencia de dos genotipos muy divergentes Jaffa y Moro (Figura 3).

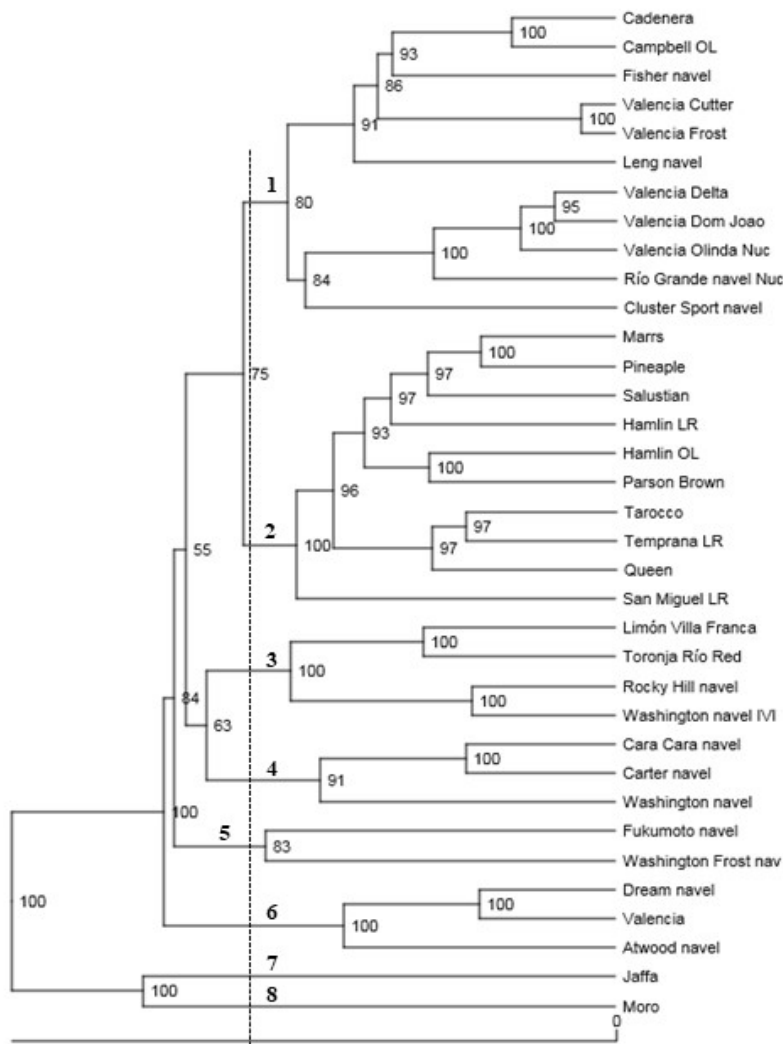


Figura 2. Relaciones genéticas entre 33 variedades de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.), una de limón (*Citrus lemon* L.) y una de toronjo (*Citrus paradisi* L.) del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán, N.L., basado en el coeficiente de Nei-Li y calculado con base en los datos generados con cuatro marcadores RAMs. Los ocho grupos formados se indican con los números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

Figure 2. Genetic relationships between 33 varieties of sweet orange (*Citrus sinensis* L.), one of lemon (*Citrus lemon* L.) and one of grapefruit (*Citrus paradisi* L.) from the germplasm bank of the General Teran Experimental Station, N.L., based in the Nei-Li coefficient and calculated based on the data generated with four RAM markers. The numbers 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 indicates the eight groups formed.

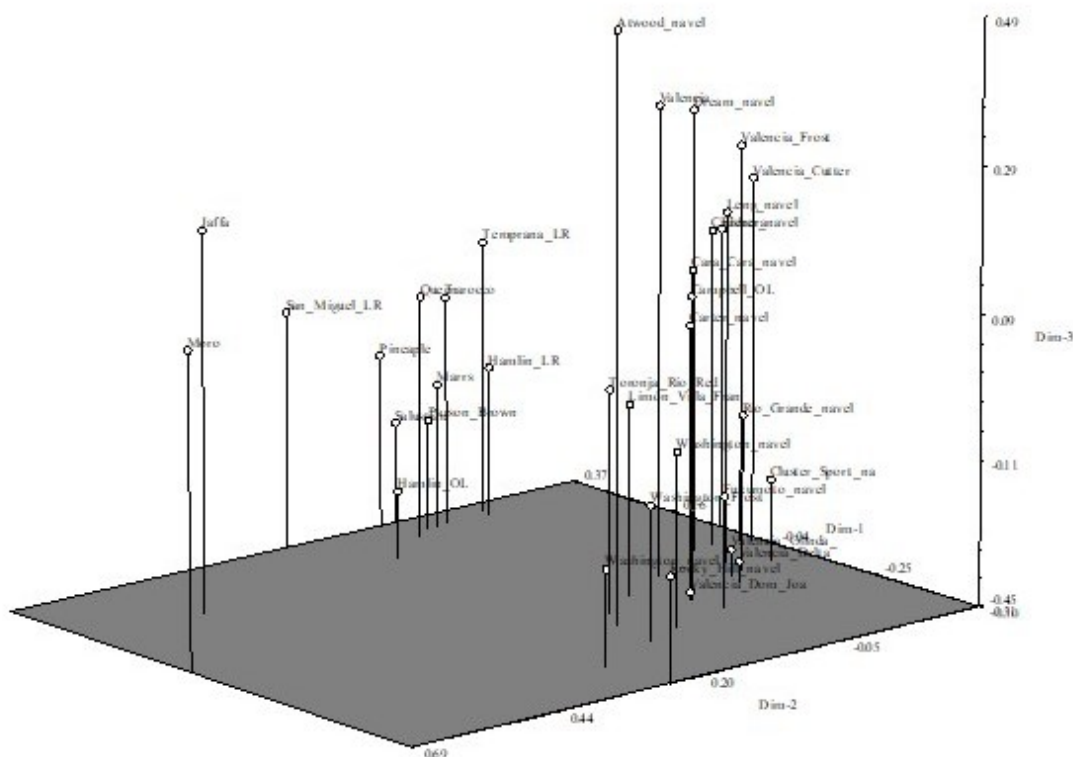


Figura 3. Análisis de coordenadas principales de 33 variedades de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.), una de limón (*Citrus lemon* L.) y una de toronjo (*Citrus paradisi* L.) del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán, N.L., utilizando NTSYSpc v2.2.
Figure 3. Analysis of principal coordinates of 33 varieties of sweet orange (*Citrus sinensis* L.), one of lemon (*Citrus lemon* L.) and one of grapefruit (*Citrus paradisi* L.) from the germplasm bank of the General Terán Experimental Station, N.L., using NTSYSpc v2.2.

DISCUSIÓN

El polimorfismo registrado en este trabajo fue alto para cada uno de los marcadores utilizados en la técnica de RAMs, lo que sugiere la existencia de una amplia base genética en el germoplasma analizado. Por lo tanto, se puede inferir la existencia de alta heterocigosidad entre los materiales analizados, tal y como lo señalan Morillo *et al.* (2010) y Gallego *et al.* (2017) que encontraron una fuerte asociación entre el nivel de polimorfismo con la heterocigosidad registrada en estudios de la caracterización genética de un banco de germoplasma de naranja y de la diversidad genética de patrones de cítricos. Estos resultados coinciden con los valores registrados para los atributos de los marcadores utilizados en el presente estudio, ya que todos los marcadores presentaron valores considerados como altos para PIC y RP e incluso el marcador CT registró un DI de 83 %, el cual se considera un valor alto para cualquier especie vegetal como lo consignaron Gallegos *et al.* (2017) en patrones de cítricos y Gutiérrez *et al.* (2015) en aguacates criollos. Los cuatro marcadores evaluados generaron un alto porcentaje de polimorfismo y se pudieron diferenciar todos los materiales involucrados en el estudio. Se obtuvieron 14

DISCUSSION

The polymorphism registered in this work was high for each one of the markers used in the RAMs technique, which suggests the existence of a broad genetic base in the analyzed germplasm. Therefore, the existence of high heterozygosity among the analyzed materials can be inferred, as pointed out by Morillo *et al.* (2010) and Gallego *et al.* (2017) who found a strong association between the level of polymorphism with the heterozygosity registered in studies of the genetic characterization of an orange germplasm bank and the genetic diversity of citrus rootstocks. These results coincide with the values registered for the attributes of the markers used in the present study, since all the markers presented values considered high for PIC and RP and even the CT marker registered a DI of 83 %, which is considered a high value for any plant species as reported by Gallegos *et al.* (2017) in citrus patterns and Gutiérrez *et al.* (2015) in creole avocados. The four evaluated markers generated a high percentage of polymorphism and it was possible to differentiate all the materials involved in the study. Fourteen unique fragments and seven rare fragments were obtained, where the Cluster Sport navel, Hamlin O.L and

fragmentos únicos y 7 fragmentos raros, en donde destacaron los genotipos Cluster Sport navel, Hamlin O.L y Jaffa con tres y dos fragmentos únicos, respectivamente. Agrama y Tuinstra (2003) mencionan que los alelos específicos y raros son de gran importancia e interés ya que pueden estar ligados a un genotipo en particular y servir para diagnosticar las diferencias de un genotipo o una región específica del genoma (Fernández *et al.*, 2002). Con base en esta tendencia, se pueden considerar a los marcadores utilizados en este estudio para futuros trabajos de caracterización genética de cítricos mediante la técnica de RAMs.

Mediante el análisis del coeficiente de Nei-Li, los materiales de cítricos evaluados conformaron ocho grupos, esta conformación sin duda está determinada por su base u origen genético. Es del conocimiento general que las naranjas dulces tienen una estrecha base genética y que la variabilidad puede ser producida por diversos factores tales como hibridación, mutación y tipo de reproducción (Morillo *et al.*, 2009), sin olvidar que en ocasiones los bancos de germoplasma pueden estar conformadas de introducciones de otros países del mundo, lo cual puede ayudar a que la diversidad genética sea mayor. Por otra parte, la baja diversidad intraespecífica contrasta con la alta variabilidad en cuanto a características de importancia agronómica tales como período de maduración, tamaño y color de los frutos (Webber, 1943), como en este caso donde el grupo 2 está conformado por variedades que presentan maduración temprana, entre las que se pueden citar a las variedades Marrs, Parson Brown y Temprana L.R. En contraste, la variedad Moro fue la más divergente de todos los materiales evaluados y su mayor disimilitud se registró con la variedad Fisher navel, lo cual es altamente deseable en programas de mejoramiento genético, ya que lo más recomendable es realizar trabajos de cruzamiento con materiales que presenten la mayor disimilitud genética tal y como como lo señalan Gómez *et al.* (2020).

Por otra parte, la variabilidad genética determinada entre el germoplasma evaluado en este estudio, permite inferir la existencia de modificación en su estructura genética, lo cual se considera una ventaja que puede ser aprovechada en programas de mejoramiento genético para la generación de nuevas variedades con características de interés fitosanitario, agronómico e industrial, por lo tanto, no escapa a nuestro conocimiento que además de la caracterización genética es necesario realizar la caracterización agronómica y morfológica de los materiales en estudio. La modificación en la estructura genética puede estar asociada al evento conocido como mutación, el cual, ocasiona cambios o modificaciones en la secuencia genómica de los organismos vivos, en donde dichos cambios ocurren por errores en la división celular o exposición a ciertas condiciones del medio ambiente. Esto no es raro, ya que la mayoría de los genotipos comerciales que se conocen en la actualidad de *C. sinensis*, *C. paradisi* y *C. limón*, no constituyen especies biológicamente

Jaffa genotypes stood out with three and two unique fragments, respectively. Agrama and Tuinstra (2003) mention that specific and rare alleles are of great importance and interest since they can be linked to a particular genotype and serve to diagnose the differences of a genotype or a specific region of the genome (Fernández *et al.*, 2002). Based on this trend, the markers used in this study can be considered for future work on the genetic characterization of citrus using the RAMs technique.

Through the analysis of the Nei-Li coefficient, the evaluated citrus materials formed eight groups; this conformation is undoubtedly determined by its genetic base or origin. It is common knowledge that sweet oranges have a narrow genetic base and that variability can be produced by various factors such as hybridization, mutation, and type of reproduction (Morillo *et al.*, 2009), without forgetting that germplasm banks sometimes they can be made up of introductions from other countries in the world, which can help to increase genetic diversity. On the other hand, the low intraspecific diversity contrasts with the high variability in terms of characteristics of importance such as ripening period, size and color of the fruits (Webber, 1943), as in this case where group 2 is made up of varieties that present early maturation, among which we can mention the varieties Marrs, Parson Brown and Temprana L.R. In contrast, the Moro variety was the most divergent of all the materials evaluated and its greatest dissimilarity was recorded with the Fisher navel variety, which is highly desirable in genetic improvement programs, since it is most advisable to carry out crossbreeding work with materials that present the greatest genetic dissimilarity as indicated by Gómez *et al.* (2020).

On the other hand, the genetic variability determined among the germplasm evaluated in this study allows us to infer the existence of a modification in its genetic structure, which is considered an advantage that can be used in genetic improvement programs for the generation of new varieties with characteristics of phytosanitary, agronomic and industrial interest, therefore, it does not escape our knowledge that in addition to genetic characterization it is necessary to carry out agronomic and morphological characterization of the materials under study. The modification in the genetic structure may be associated with the event known as mutation, which causes changes or modifications in the genomic sequence of living organisms, where said changes occur due to errors in cell division or exposure to certain environmental conditions. This is not uncommon, as most of the currently known commercial genotypes of *C. sinensis*, *C. paradisi* and *C. limon* do not constitute biologically defined species, as many cultivars within each group originated from somatic mutations (Gómez *et al.*, 2020).

definidas, ya que muchos cultivares dentro de cada grupo se originaron a partir de mutaciones somáticas (Gómez *et al.*, 2020). Bajo este precepto, en el mundo existen más de nueve millones de hectáreas plantadas con cítricos y todas las especies comestibles como las mandarinas, naranjas, pomelos y limones recurren a la apomixis (mecanismo reproductivo que permite a la planta clonarse mediante sus semillas), una característica excepcional en el reino vegetal, cuyo origen fue una mutación de hace 1,6 millones de años, y que pasó de especie a especie (Wu *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

Los altos valores registrados en el nivel de polimorfismo y la diversidad genética, permite inferir la existencia de una amplia base genética en el germoplasma de naranjo dulce incluido en el presente estudio, misma que puede ser utilizada en programas de mejoramiento genético para la generación de nuevas variedades con características de interés fitosanitario, agronómico y/o agroindustrial. Los marcadores utilizados en la técnica de RAMs se consideran eficientes para conocer la diversidad genética en cítricos, ya que presentan una amplia capacidad resolutoria y permitieron diferenciar a todas las variedades utilizadas, además de que se registraron fragmentos raros o únicos que se pueden usar para la detección de alguna característica o genotipo en particular.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, por el financiamiento de esta investigación como parte del proyecto No. 13193835528: "Producción de yema de cítricos".

Under this precept, in the world there are more than nine million hectares planted with citrus and all edible species such as tangerines, oranges, grapefruit and lemons resort to apomixis (reproductive mechanism that allows the plant to clone itself through its seeds), an exceptional characteristic in the plant kingdom, whose origin was a mutation of 1.6 million years ago, and that passed from species to species (Wu *et al.*, 2018).

CONCLUSIONS

The high values registered in the level of polymorphism and genetic diversity allow us to infer the existence of a broad genetic base in the sweet orange germplasm included in the present study, which can be used in genetic improvement programs for the generation of new varieties with characteristics of phytosanitary, agronomic and/or agro-industrial interest. The markers used in the RAMs technique are considered efficient to know the genetic diversity in citrus, since they present a wide resolving capacity and allowed to differentiate all the varieties used, in addition to the fact that rare or unique fragments were recorded that can be used for the detection of a particular characteristic or genotype.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research, for financing this research as part of project No. 13193835528: "Citrus bud production".

Referencias

- Agrama, H.A., and Tuinstra, M.R. 2003. Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. *African Journal of Biotechnology* 2, 334–340. doi.org/10.5897/AJB2003.000-1069
- 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.
- 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. [doi: 10.1006/mpev.2001.1008](https://doi.org/10.1006/mpev.2001.1008)
- 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. doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb13873.x
- 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. [doi:10.1023/A:1016332030738](https://doi.org/10.1023/A:1016332030738)
- 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. doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800010035X
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist* 125(1): 35-42. doi.org/10.1086/284325.
- Fernández, M, Figueiras, A. and Benito C. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin, *Theor Appl Genet* 104:845–851. [doi:10.1007/s00122-001-0848-2](https://doi.org/10.1007/s00122-001-0848-2).
- Gallego, C.J.E., Enríquez 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): 8594. [doi.org/10.18684/BSAA\(15\)85-94](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)85-94)
- Ganopoulos, I., Xanthopoulou, A., Mastrogianni, A., Drouzas, A., Kalivas, A., Bletsos, F., Krommydas, K., Ralli, P., Tsafaris, 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. doi.org/10.1016/j.bse.2014.11.003
- 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. doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00896.x
- Gómez, R.L., Sendín, L.S., Ledesma, V.A., Romero L.A. and Filippone. M.P. 2020. Mejoramiento genético de los cítricos: millones de años de evolución. *Rev. Agron. Noroeste Argentina* 40(2): 71-90. <https://ranar.faz.unt.edu.ar/index.php/ranar/article/view/74>.
- González, Á, Guillén, D, Alia, I, López, V, Juárez, P, and Bárcenas, D. 2020. Comportamiento de variedades de naranja injertadas en diferentes portainjertos en Xalostoc, Morelos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11(5): 1123-1134. doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2316
- 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, Gul Cevahir Oz, I. Halil Kavakli and Birguul Ozcan (editors). Publisher: In Tech. pp. 141-159. [doi: 10.5772/59795](https://doi.org/10.5772/59795).
- 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. doi.org/10.1016/j.mgene.2014.01.008
- 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. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10722-006-9128-y>.
- León, J. 1987. *Botánica de los cultivos tropicales*. 3 ed. San José (Costa Rica): Ilica/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. doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.6.580.
- Medina, F.H.P., Bordignon, R. and Siqueira, W.J. 2003. Segregações gaméticas de locos isoenzimicos em porta-enxertos de citros e suas contribuições alélicas na formação de híbridos. *Bragantia* 62: 357-367.
- Medina J. 2015. Cultivo de los cítricos. Conference Paper-Julio 2015. Mexico.

- Morillo, C.A.C., Morillo, C.Y., Chagüeza, V.Y., Caicedo, A.Á., Jaramillo, V.J., Muñoz, R.O.J., Arcos, A.L., Vásquez, A.H.D and Muñoz, F.J.E. 2009. Caracterización de la diversidad genética en naranja y comparación del polimorfismo de microsatélites amplificados al azar (RAMs) usando electroforesis de poliacrilamida y agarosa. *Acta Agronómica* 58(4): 234-244. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169916220002>.
- Morillo, C.Y., Morillo, C.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. www.redalyc.org/articulo.oa?id=169916223002.
- 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. and 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](https://doi.org/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. doi: [10.1590/S1415-47572006000100018](https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000100018)
- 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.
- 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](https://doi.org/10.30973/aap/2020.6.0061009).
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-228. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00564200>.
- Prevost, 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. <https://doi.org/10.1007/s001220051046>.
- Rivera, S, Perales, A. Del Valle, M. and Caamal, I. 2020. Panorama de la producción y comercialización de naranja en México. *Agro productividad* 13(7): 9-14. doi: [10.32854/agrop.vi.1614](https://doi.org/10.32854/agrop.vi.1614)
- 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. doi: [10.1139/g98-170](https://doi.org/10.1139/g98-170).
- Roldán-Ruiz, 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. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1009680614564>.
- Rolfh, F.J. 2005. NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.2. Getting Started Guide. Exeter Software. New York, USA.
- Rossetto, M., Mclachlan, 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. doi: [10.1007/s001220051172](https://doi.org/10.1007/s001220051172).
- 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](https://doi.org/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. doi: [10.1046/j.1365-294X.1999.00637.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00637.x)
- Swingle, W.T. and Reece, P.C. 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. En: *The Citrus Industry* Reuther W., Webber H.J., Batchelor L.D., (Eds.). University of California, Berkeley. EEUU. 1: 190-430.
- 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. doi: [10.1016/j.scienta.2009.02.018](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.02.018)
- 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](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.08.010).
- Webber, H. J. 1943. Plant characteristics and climatology. En: H.J. Webber y L.D. Batchelor, dirs. *The Citrus Industry*. Berkeley: University of California. Press. 1:41-69.

- Wu, G.A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., Perrier, X., Ruiz, M., Scalabrin, S., Tero, J., Takita, M.A., Labadie, K., Poulain, J., Couloux, A., Jabbari, K., Cattonaro, F., Del Fabbro, C., Pinosio, S., Zuccolo, A., Chapman, J., Grimwood, J., Tadeo, F.R., Estornel, L.H., Muñoz-Sanz, J.V., Ibanez, V., Herrero-Ortega, A., Aleza, P., Pérez-Pérez, J., Ramón, D., Brune, D., Luro, F., Chen, Ch., Farmerie, W.G., Desany, B., Kodira, Ch., Mohiuddin, M., Harkins, T., Fredrikson, K., Burns, P., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Reforgiato, G., Freitas-Astúa, J., Quetier, F., Navarro, L., Roose, M., Wincker, P., Schmutz, J., Morgante, M., Machado, M.A., Talon, M., Jaillon, O., Ollitrault, P., Gmitter, F. and Rokhsar, D. 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nat. Biotechnol.* **32**: 656–662. [doi:10.1038/nbt.2906](https://doi.org/10.1038/nbt.2906).
- Wu, G.A., Terol, J., Ibanez, V., López, G.A., Pérez, R.E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F.R., Carbonell, C.J., Alonso, R., Curk, F., Du, D., Ollitrault, P., Mikeal, L., Roose, M.L., Dopazo, J., Gmitter, Jr.F.G., Rokhsar, D.S. and Talon, M. 2018. Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature* 554: 311-316. [doi:10.1038/nature25447](https://doi.org/10.1038/nature25447).
- Zane, L., Bargelloni, L. and Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. *Mol. Ecol.* 11(11): 1-16. doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x
- 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. doi.org/10.1007/BF00014544.