

## Caracterización y diversidad genética de cítricos del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán

### Characterization and genetic diversity of citrus from the germplasm bank of the General Teran Experimental Station

Ángel Ismael Narváez Rodríguez<sup>1</sup>, Víctor Pecina Quintero<sup>2</sup>, María Genoveva Álvarez Ojeda<sup>3</sup> Raúl Rodríguez Guerra<sup>4</sup>, Carlos Alberto Núñez Colín<sup>5</sup> Isidro Humberto Almeйда León<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Zaragoza 910, Los Ángeles tercer sector, C.P. 66478, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. <sup>2</sup>Campo 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.

<sup>3</sup>Campo Experimental Río Bravo, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Km 61 Carretera Matamoros-Reynosa, C.P. 88900, Río Bravo, Tamaulipas, México.

<sup>4</sup>Campo Experimental General Terán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 31 Carr. Montemorelos-China, CP 67400, General Terán, Nuevo León, México.

<sup>5</sup>Programa de Ingeniero en Biotecnología, Departamento de Ingeniería, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

**\*Autor para correspondencia:** [almeйда.isidro@inifap.gob.mx](mailto:almeйда.isidro@inifap.gob.mx)

#### RESUMEN

Los cítricos son uno de los cultivos frutales más extendidos a nivel mundial y constituyen un grupo muy complejo de especies con gran diversidad fenotípica. En México, la citricultura representa un segmento económico muy importante en la agricultura, ya que genera una derrama económica superior a los 375 millones de dólares y en los últimos años la superficie cultivada con cítricos en el país se ha incrementado en 8.8 % al registrarse 620,000 ha en 2021 con respecto a las 569,914 ha registradas en 2010. Como todos los cultivos, los cítricos no están exentos de diversos problemas, donde destacan los parasitológicos, así como una baja oferta de variedades a los productores que les permitan ser más competitivos y favorecer mayor sostenibilidad a la actividad citrícola en el país. Una alternativa, es la generación de nuevos materiales con características de importancia agronómica o industrial, para lo cual se puede utilizar el germoplasma resguardado en los bancos de germoplasma. El objetivo de este estudio fue caracterizar y conocer la diversidad genética que existe entre los materiales de mandarina, toronja y limón resguardados en el banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. En total, se evaluaron 35 variedades de cítricos;

#### ABSTRACT

The citrus are ones of the most widespread fruit crops worldwide and constitute a very complex group of species with great phenotypic diversity. In Mexico, citrus farming represents a very important economic segment in agriculture, since it generates an economic benefit of more than 375 million dollars and in recent years, the area cultivated with citrus in the country has increased by 8.8 %, registering 620,000 ha in 2021 compared to the 569,914 ha registered in 2010. Like all crops, citrus is not exempt from various problems, where parasitological problems stand out, as well as a low supply of varieties to producers that allow them to be more competitive and promote greater sustainability of citrus activity in the country. An alternative is the generation of new materials with characteristics of agronomic or industrial importance, for which the germplasm stored in germplasm banks, can be used.

The objective of this study was to characterize and understand the genetic diversity that exists among the mandarin, grapefruit and lemon materials stored in the germplasm bank of the General Teran Experimental Station of the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research (INIFAP-Mexico). In total, 35 citrus varieties were evaluated; 20 of mandarin, eight of grapefruit

20 de mandarina, ocho de toronja y siete de limón. La caracterización genética se realizó mediante la técnica de Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs) utilizando cinco marcadores. El nivel de polimorfismo registrado fue alto y la diversidad genética detectada, permite inferir la existencia de una amplia base genética en el germoplasma de mandarina, toronja y limón incluidos en el presente estudio, misma que puede ser utilizada en programas de mejoramiento genético para la generación de nuevas variedades con características de interés agronómico y agroindustrial.

**Palabras clave:** Mandarinas, toronjas, limones, marcadores, polimorfismo, diversidad.

## INTRODUCCIÓN

Los cítricos forman parte de la familia Rutaceae, una de las 21 familias que forman el orden Geraniales y son uno de los cultivos frutales más populares, con una producción mundial de más de 157 millones de toneladas de fruta al año. Se conoce que alrededor del 75% de la producción total de cítricos, se utiliza principalmente en fresco y el 25% restante se utiliza para el desarrollo de productos comerciales. Una amplia variedad de especies (aproximadamente 1300) se integran bajo el género *Citrus*, entre ellas, *C. limon* (limón), *C. sinensis* (naranja), *C. reticulata* (mandarina), especies que son las más consumidas en todo el mundo (Vikas, 2022). 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).

Los hábitats nativos de los cítricos y géneros relacionados se ubican en 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 Bismarak, noreste de Australia, Nueva Caledonia, Melanesia y las islas de la Polinesia Occidental (Swingle and Reece, 1967). Sin embargo, 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). Muchas décadas de investigación y desarrollo dedicados en todo el mundo han producido un rico legado de conocimiento que aborda cuestiones fundamentales que respaldan el concepto de cítricos. La noción actual del género *Citrus*, sin embargo, incluye un número difícil de alcanzar de especies porque sus límites y composición han sido objeto de controversia duran-

and seven of lemon. Genetic characterization was carried out using the Random Amplified Microsatellite (RAMs) technique and five markers were used. The level of polymorphism recorded was high and the genetic diversity detected allows us to infer the existence of a broad genetic base in the germplasm of mandarin, grapefruit and lemon included in the present study, which can be used in genetic improvement programs for the generation of new varieties with characteristics of agronomic and agroindustrial interest.

**Keywords:** Mandarins, grapefruits, lemons, markers, polymorphism, diversity.

## INTRODUCTION

The citrus are part of the Rutaceae family, one of the 21 families that make up the order Geraniales and are one of the most popular fruit crops, with a global production of more than 157 million tons of fruit per year. It is known that around 75% of the total citrus production is used mainly fresh and the remaining 25% is used for the development of commercial products. A wide variety of species (approximately 1,300) are included under the *Citrus* genus, including *C. limon* (lemon), *C. sinensis* (orange), *C. reticulata* (mandarin), species that are the most consumed throughout the world (Vikas, 2022). History places the origin of citrus fruits 20 million years ago, long before the appearance of human beings, since then until today they have undergone numerous modifications, 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 native habitats of citrus and related genera are located in the monsoon region from western Pakistan to north-central China and south through the East Indies Archipelago to New Guinea and the Bismarak Archipelago, northeastern Australia, New Caledonia, Melanesia and the islands of Western Polynesia (Swingle and Reece, 1967). However, the geographical origin and timing of dispersal of citrus species across Southeast Asia remains uncertain. The biggest obstacle to resolving this uncertainty is the poor understanding of its complex genealogy due to the existing mixing among cultivated citrus as has been recently demonstrated (Wu *et al.*, 2014). Many decades of dedicated research and development around the world have produced a rich legacy of knowledge that addresses fundamental questions underpinning the citrus concept. The current notion of the genus *Citrus*, however, includes an elusive number of species because its boundaries and composition have been the subject of controversy over the past century and are still not well defined. Hundreds or even thousands of years of citrus cultivation have generated countless plants that have been crossed or artificially selected by humans and therefore display complex mixtures of botanical characters that are difficult to classify (Talón, 2020).

The citrus are grown in almost all tropical and sub-

te el pasado siglo y todavía no están bien definidos. Cientos o incluso miles de años de cultivo de cítricos han generado innumerables plantas que han sido cruzadas o seleccionadas artificialmente por humanos y, por lo tanto, muestran mezclas complejas de caracteres botánicos que son difíciles de clasificar (Talón, 2020).

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 170 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 (Maya, 2017; Gómez *et al.*, 2020). En México, 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 (González *et al.*, 2020). En los últimos años, la superficie cultivada con cítricos en el país se ha incrementado en 8.8 % al registrarse 620,000 ha en 2021 con respecto a las 569,914 ha existentes en 2010. La mandarina se siembra en 19 estados, con una producción anual de 300 mil 065 toneladas, teniendo como principales estados productores a: Veracruz con más de 149 mil toneladas, Puebla con más de 55 mil toneladas y Nuevo León con más de 52 mil toneladas. El valor anual de la producción de mandarina se estima en más de 813 millones de pesos (SADER, 2022). La toronja se siembra en 22 mil hectáreas y su producción depende principalmente del estado de Veracruz ya que de las 488 mil 380 toneladas que se producen a nivel nacional con un valor 1,898 millones de pesos, la entidad aporta 284 mil 380 toneladas, más del cincuenta por ciento; por su parte Michoacán se coloca en el segundo sitio con 74 mil 482 toneladas y Tamaulipas aporta 39 mil 565 toneladas (SADER, 2022). El limón se siembra en más de 10 estados del país, abarcando una superficie de 219 mil hectáreas, con una producción anual de 3 millones 101 mil toneladas y un valor de 28, 141 millones de pesos, destacando los estados de Veracruz, Michoacán, Colima, Oaxaca y Tamaulipas (SADER 2022).

Cuando se tiene el interés de comenzar con un programa de mejoramiento genético, surge la necesidad de generar información sobre el valor genético de los bancos de germoplasma y de las colecciones de trabajo, razón por la cual, se requiere una identificación genética que permita identificar duplicados, detectar genes de interés para después asociarlos con sus características agronómicas y generar información que represente la diversidad genética y maximice los recursos para conservarlos y utilizarlos (Martínez, 2013). Los materiales albergados en los bancos de germoplasma, 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 introduc-

tropical regions of the world within the range between 40° N and S latitude, with a production that exceeds 170 million tons per year, they are the main crop fruit tree worldwide (Gómez *et al.*, 2020). Although they are grown in more than 130 countries, about 70% of production is concentrated in only five (China, Brazil, the United States, India and Mexico), which highlights clear contrasts in the productive scale (Maya, 2017; Gómez *et al.*, 2020). In Mexico, citrus farming represents a very important economic segment in Mexican agriculture, since it generates an economic benefit of more than 375 million dollars (González *et al.*, 2020). In recent years, the area cultivated with citrus in the country has increased by 8.8 %, registering 620,000 hectares in 2021 compared to the 569,914 hectares existing in 2010. The mandarin is planted in 19 states, with an annual production of 300,065 tons, with the main producing states being: Veracruz with more than 149 thousand tons, Puebla with more than 55 thousand tons and Nuevo León with more than 52 thousand tons. The annual value of mandarin production is estimated at more than 813 million pesos (SADER, 2022). The grapefruit is planted on 22 thousand hectares and its production depends mainly on the state of Veracruz since of the 488 thousand 380 tons that are produced nationally with a value of 1,898 million pesos, the entity contributes 284,380 tons, more than fifty percent; for its part Michoacán is in second place with 74,482 tons and Tamaulipas contributes 39,565 tons (SADER, 2022). The lemon is planted in more than 10 states of the country, covering an area of 219 thousand hectares, with an annual production of 3 million 101 thousand tons and a value of 28, 141 million pesos, highlighting the states of Veracruz, Michoacán, Colima, Oaxaca and Tamaulipas (SADER 2022).

When you are interested in starting a genetic improvement program, the need arises to generate information on the genetic value of germplasm banks and working collections, which is why genetic identification is required to identify duplicates, detect genes of interest and then associate them with their agronomic characteristics and generate information that represents genetic diversity and maximizes resources to conserve and use them (Martínez, 2013). The materials housed in germplasm banks need to be characterized, document 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 and improvement processes genetic or agroindustrial processes (Ganopoulos *et al.*, 2015). However, both in the genetic characterization and in the improvement of different perennial species, there has not been the success achieved in improvement programs for annual crops, mainly due to the characteristics related to the reproductive biology of these species, for example, high interspecific fertility, apomictic reproduction, polyembryony, numerous cases of sterility, inter- and self-compatibility, high heterozygosity, a prolonged juvenile phase and the scarcity of polymorphic DNA markers (Bretó *et al.*, 2001; Corazza-Nunes *et al.*,

ciones 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 perennes 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 apomíctica, 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).

Los marcadores basados en ADN han ganado popularidad recientemente en estudios genéticos entre especies y cultivares. Particularmente en cítricos, se han implementado marcadores moleculares a gran escala para la caracterización genómica, mapeo genético, estudios de germoplasma y evaluación de la variabilidad genética entre especies y dentro de una misma especie (Higashi *et al.*, 2000). Los marcadores moleculares tales como el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), microsatélites 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 han 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 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).

Las Secuencias Simples Repetidas (SSR), se consideran marcadores ideales para la discriminación de genotipos; éstos en su modalidad de Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs) son útiles para medir la diversidad genética en plantas y animales, con poder discri-

2002; Ganopoulos *et al.*, 2015).

DNA-based markers have recently gained popularity in genetic studies across species and cultivars. Particularly in citrus, large-scale molecular markers have been implemented for genomic characterization, genetic mapping, germplasm studies and evaluation of genetic variability between species and within the same species (Higashi *et al.*, 2000). Molecular markers such as Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), microsatellites 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 intervals of DNA with penta, tetra, tri, di or mononucleotide 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 largely used because they are highly polymorphic and are co-dominant (Zane *et al.*, 2002), they are useful in the improvement and evaluation of diversity and identification of cultivars, as well as in the conservation of germplasm (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, crossing 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 form of Randomly Amplified Microsatellites (RAMs) are useful for measuring genetic diversity in plants and animals, with discriminatory power between families and species and also intraspecifically (Muñoz *et al.*, 2008; Morillo *et al.*, 2010). They show the basis of the variation of individuals, 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 the analysis of both the information that is expressed and that which is not (Mahuku *et al.*, 2002). This technique has been a valuable and precise instrument for the evaluation of genetic diversity in citrus and related genera (Hynniewta *et al.*, 2014). The objective of this study was to characterize and understand the genetic diversity of the mandarin, grapefruit and lemon accessions from the gene bank of the General Teran Experimental Station of the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research (INIFAP-Mexico), using the Random Amplified Microsatellite (RAMs) technique.

minatorio entre familias y especies e igualmente de manera intraespecífica (Muñoz *et al.*, 2008; Morillo *et al.* 2010), 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). El objetivo del presente estudio, fue caracterizar y conocer la diversidad genética de las accesiones de mandarina, toronja y limón del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-México), utilizando la técnica de Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se colectaron hojas jóvenes y sanas de 20 accesiones (dos árboles por accesión) de mandarina (*Citrus reticulata* L.), ocho accesiones de toronja (*Citrus paradisi* L.) y siete accesiones de limón utilizados como patrones (*Citrus limon* L.) del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán (INIFAP-México) (Cuadro 1), 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 cinco marcadores RAMs (Cuadro 2). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo: Buffer de PCR (1X), MgCl<sub>2</sub> (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, 50-58 °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 acrilamida al 6 % durante cuatro horas a 110 V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y analizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

## MATERIALS AND METHODS

### Vegetal material

Young and healthy leaves were collected from 20 accessions (two trees per accession) of mandarin (*Citrus reticulata* L.), eight accessions of grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and seven accessions of lemon used as rootstocks (*Citrus limon* L.) from the bank of germplasm from the General Terán Experimental Station (INIFAP-México) (Table 1), located at Km 31 Montemorelos-China Highway, General Terán, Nuevo León, Mexico, 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 carried out using the methodology reported by Almeyda *et al.* (2001).

### Randomly Amplified Microsatellites (RAMs)

Five 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), MgCl<sub>2</sub> (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 of 95 °C for 30 seconds, 50-58 °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 fragments amplified in the PCRs were fractionated in 6 % acrylamide gels for four hours at 110 V. The gels were stained with ethidium bromide and analyzed in an ultraviolet light transilluminator.

### Analysis of data

From the electrophoretic profile, binary matrices of presence/absence of fragments were obtained. The similarity index of Nei and Li (1979) was calculated from this matrix and with this, a dendrogram was constructed using the UPGMA agglomeration method and the Bootstrap method with 1000 resamplings according to recommendations by Núñez-Colín and Escobedo-López (2014), using FreeTree (Hampl *et al.*, 2001). In addition, the similarity index matrix was centralized and a Principal Coordinate Analysis was obtained (Gower, 2005; Peña-Caballero *et al.*, 2020) and a projection of the accessions in a three-dimensional plane was generated using NTSYS version 2.2 (Rolfh, 2005). Additionally, the parameters number of fragments, unique fragments, as well as the Polymorphic Information Content (PIC) indices were calculated for the markers.

**Cuadro 1.** Accesiones de variedades de mandarina, limón y toronjo del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán, N.L. (INIFAP-México).

**Table 1.** Accessions of varieties of mandarin, grapefruit and lemon from the germplasm bank of the General Teran Experimental Station, N.L. (INIFAP-México).

No. de accesión	Variedad	Nombre científico
1	Lee	<i>Citrus reticulata</i> L.
2	Frua	<i>Citrus reticulata</i> L.
3	Algerian	<i>Citrus reticulata</i> L.
4	Dweet	<i>Citrus reticulata</i> L.
5	Ortanique	<i>Citrus reticulata</i> L.
6	Ponkan	<i>Citrus reticulata</i> L.
7	Murcott	<i>Citrus reticulata</i> L.
8	Clementina O.L.	<i>Citrus reticulata</i> L.
9	Minneola	<i>Citrus reticulata</i> L.
10	Fairchild	<i>Citrus reticulata</i> L.
11	Orlando	<i>Citrus reticulata</i> L.
12	Dancy	<i>Citrus reticulata</i> L.
13	Osceola	<i>Citrus reticulata</i> L.
14	Temple	<i>Citrus reticulata</i> L.
15	Wilking	<i>Citrus reticulata</i> L.
16	Sunburst	<i>Citrus reticulata</i> L.
23	Encore	<i>Citrus reticulata</i> L.
24	Clementina Monrreal	<i>Citrus reticulata</i> L.
25	Nova	<i>Citrus reticulata</i> L.
26	Clemenules	<i>Citrus reticulata</i> L.
17	Duncan	<i>Citrus paradisi</i> L.
18	Marsh Kelly	<i>Citrus paradisi</i> L.
19	Redblush	<i>Citrus paradisi</i> L.
20	Shambar	<i>Citrus paradisi</i> L.
21	Henderson Ruby	<i>Citrus paradisi</i> L.
22	Redblush Nuc.	<i>Citrus paradisi</i> L.
32	Chinesse Shaddock	<i>Citrus paradisi</i> L.
35	Río red	<i>Citrus paradisi</i> L.
27	Limón sin espinas	<i>Citrus limon</i> L.
28	Eureka Ross	<i>Citrus limon</i> L.
29	Nicaragua Sweet Lime	<i>Citrus limon</i> L.
30	Eureka Frost	<i>Citrus limon</i> L.
31	Eureka	<i>Citrus limon</i> L.
33	Villafranca	<i>Citrus limon</i> L.
34	Limón sin espinas 1	<i>Citrus limon</i> L.

**Análisis de datos**

A partir del perfil electroforético se obtuvieron matrices binarias de presencia/ausencia de fragmentos, a esta matriz se le calculó el índice de similitud de Nei y Li (1979) y con este se construyó un dendrograma utilizando el método de aglomeración UPGMA y el método Bootstrap con 1000 remuestros de acuerdo con recomendaciones de Núñez-Colín y Escobedo-López (2014), utilizando FreeTree (Hampl *et al.*, 2001). Además, la matriz del índice de similitud fue centralizada y se obtuvo un Análisis de Coordenadas Principales (Gower, 2005; Peña-Caballero *et al.*, 2020) y se generó una proyección de las accesiones en un plano tridimensional utilizando NTSYS versión 2.2 (Rolfh, 2005). Adicionalmente, para los marcadores se les calcularon los parámetros número de fragmentos, fragmentos únicos, así como los índices del Contenido de Información Polimórfica (PIC).

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

For each fragment, the Shannon index was calculated (Shannon, 1948) 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:

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

Where *p* is the proportion of presence of the fragment in the cultivars.

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

**Table 2.** Markers used in the Random Amplified Microsatellite technique.

Marcador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de alineamiento
CA	DBDACACACACACACA	50 °C
CCA	DDBCCACCACCACCA	55 °C
CT	DYDCTCTCTCTCTCTC	55 °C
TG	HVHTGTGTGTGTGTGTGT	55 °C
GT	VHVGTGTGTGTGTA	58 °C

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

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:

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

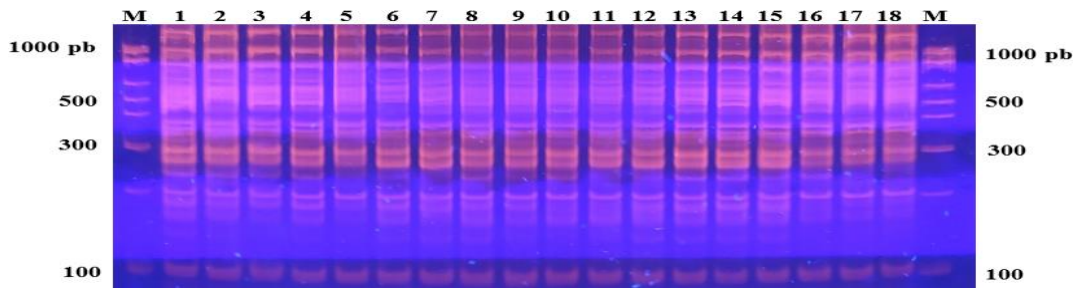
Donde *p* es la proporción de presencia del fragmento en los cultivares.

**RESULTS**

**Amplification of fragments with the markers used**

The five markers used generated fragments of different molecular weight according to the amplification conditions used, providing information to evaluate the genetic diversity of the materials considered in the study. Figure 1 shows the amplifications obtained with some of the cultivars evaluated with the CA marker.

One hundred and forty fragments were generated, 42 corresponded to the CA marker, 37 to the CT marker, 25 to the CCA marker, 22 to the TG marker and 14 to the GT marker (Table 3). In the analysis of frequency and distribution of polymorphic fragments, it was observed that 12 fragments were specific or unique for a particular accession (Table 3). The Lee and Wilking genotypes presented three unique fragments; the first of them presented two fragments with the CA marker and one with the CCA, while the Wilking genotype had two with the GT marker and one with the CT marker. Three genotypes were also observed



**Figura 1.** Amplificaciones por PCR a partir del ADN extraído de diferentes accesiones de mandarina (*Citrus reticulata* L.) y el marcador CA mediante la técnica de Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs). Carriles M: Marcador de peso molecular, Carril 1: Lee, Carril 2: Frua, Carril 3: Algerian, Carril 4: Dweet, Carril 5: Ortanique, Carril 6: Ponkan, Carril 7: Murcott, Carril 8: Clementina O.L., Carril 9: Minneola, Carril 10: Fairchild, Carril 11: Orlando, Carril 12: Dancy, Carril 13: Osceola, Carril 14: Temple, Carril 15: Wilking, Carril 16: Sunburst, Carril 17: Encore, Carril 18: Clementina Monrreal.

**Figure 1.** PCR amplifications from DNA extracted from different accessions of mandarin (*Citrus reticulata* L.) and CA marker using the Random Amplified Microsatellite (RAMs) technique. Lanes M: Molecular Weight Marker, Lane 1: Lee, Lane 2: Frua, Lane 3: Algerian, Lane 4: Dweet, Lane 5: Ortanique, Lane 6: Ponkan, Lane 7: Murcott, Lane 8: Clementina O.L., Lane 9: Minneola, Lane 10: Fairchild, Lane 11: Orlando, Lane 12: Dancy, Lane 13: Osceola, Lane 14: Temple, Lane 15: Wilking, Lane 16: Sunburst, Lane 17: Encore, Lane 18: Clementina Monrreal.

## RESULTADOS

### Amplificación de fragmentos con los marcadores utilizados

Los cinco 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 algunos de los cultivares evaluadas con el marcador CA.

Se generaron 140 fragmentos, 42 correspondieron al marcador CA, 37 al marcador CT, 25 al marcador CCA, 22 al marcador TG y 14 al marcador GT (Cuadro 3). En el análisis de frecuencia y distribución de los fragmentos polimórficos se observó que 12 fragmentos fueron específicos o únicos para una accesión en particular (Cuadro 3). Los genotipos Lee y Wilking presentaron 3 fragmentos únicos, el primero de ellos presentó dos fragmentos con el iniciador CA y uno con el CCA, mientras que el genotipo Wilking dos con el iniciador GT y uno con el iniciador CT. También se observaron tres genotipos con dos fragmentos únicos, la mandarina Clementina Monrreal con el iniciador CT, en tanto la toronja Chinesse Shaddock uno con el iniciador CA y el otro con el iniciador CCA, la toronja Rio Red presentó los dos fragmentos únicos con el iniciador CA. 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,

with two unique fragments, the Clementina Monrreal mandarin with the CT marker, while the Chinesse Shaddock grapefruit, one with the CA marker and the other with the CCA marker, the Rio Red grapefruit presented the two unique fragments with the AC 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.

To determine which microsatellite primers were most informative, polymorphic information content (PIC) was calculated. The PIC value varied between 0.200 (GT) and 0.332 (CA) with an average of 0.285. The effective multiple ratio (EMR) presented values from 4.46 (GT) to 12.2 (CCA) with an average of 9.2. The marker index (MI) presented values from 0.89 (GT) to 3.96 (CCA) with an average per combination of 2.75. While the diversity index (DI) varied from 49 to 72% with average of 64% (Table 4). In this way, with the values obtained, the CA and CCA markers are considered the most resolving and the GT marker the least resolving.



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.

**Genetic similarity analysis**

The dendrogram (Figure 2) constructed from the similarity matrix (Dice) showed the formation of three main groups of genotypes, which suggests the existence of a broad genetic base in the analyzed germplasm. Group 1 is made up

**Cuadro 3.** Análisis de comparación de iniciadores con base en el número de fragmentos amplificados y fragmentos únicos.

**Table 3.** Primer comparison analysis based on the number of amplified fragments and unique fragments.

Marcador	Número de fragmentos	Fragmentos únicos
CA	42	5
CT	37	3
CCA	25	2
TG	22	0
GT	14	2

Para determinar cuáles iniciadores microsatélites fueron más informativos se calculó el contenido de información polimórfica (PIC). El valor de PIC varió entre 0.200 (GT) y 0.332 (CA) con un promedio de 0.285. La proporción múltiple efectiva (EMR) presento valores de 4.46 (GT) a 12.2 (CCA) con promedio de 9.2. El índice de marcador (MI) presentó valores de 0.89 (GT) a 3.96 (CCA) con promedio por combinación de 2.75. Mientras el índice de diversidad (DI) vario de 49 a 72% con promedio de 64% (Cuadro 4). De esta manera, con los valores obtenidos, se considera a los marcadores CA y CCA como los más resolutivos y al marcador GT como el menos resolutivo.

of 18 genotypes, although small subgroups are observed based on their genetic origin, a subgroup is formed by the mandarins Dancy, Fairchild, Orlando, Ponkan, Ortanique, Clementina O.L., Murcott, Algerian, Dweet, Osceola, Temple, Minneola, Frua and Lee and two grapefruit genotypes Duncan and Marsh Kelly are intermixed followed by two tangerine Sunburst and Wilking. Group 2 is made up of four genotypes of mandarin Clementina Monrreal, Nova, Encore and Clemenules, and six of grapefruit Chinesse Shaddock, Henderson Ruby, Sambar, Redblush Nuc, Red Blush and Rio Red.

**Cuadro 4.** Atributos de los iniciadores microsatellites utilizados en el estudio de diversidad genética.

**Table 4.** Attributes of the microsatellite primers used in the genetic diversity study.

Marcador	PIC <sup>a</sup>	EMR <sup>b</sup>	MI <sup>c</sup>	DI <sup>d</sup>
CA	0.332	10.14	3.37	0.72
CCA	0.325	12.20	3.96	0.71
CT	0.274	7.78	2.13	0.62
TG	0.296	11.45	3.39	0.66
GT	0.200	4.46	0.89	0.49
<b>Media</b>	0.285	9.20	2.75	0.64

<sup>a</sup>Contenido de información polimórfica; <sup>b</sup>Proporción múltiple efectiva; <sup>c</sup>Índice de marcador; <sup>d</sup>Índice de diversidad de Shannon.

<sup>a</sup>Polymorphic information content; <sup>b</sup>Effective multiple ratio; <sup>c</sup>Marker index; <sup>d</sup>Shannon diversity index

**Análisis de similitud genética**

El dendrograma (Figura 2) construido a partir de la matriz de similitud (Dice) mostró la formación de tres grupos principales de genotipos, lo cual sugiere la existencia de una amplia base genética en el germoplasma analizado. El Grupo 1 lo componen 18 genotipos, aunque se observan pequeños subgrupos con base a su origen genético, un subgrupo lo forman las mandarinas Dancy, Fairchild, Orlando, Ponkan, Ortanique, Clementina O.L., Murcott, Algerian, Dweet, Osceola, Temple, Minneola, Frua y Lee y se entremezclan dos genotipos de toronja Duncan y Marsh Kelly seguido por dos de mandarina Sunburst y Wilking. El Grupo 2 lo componen cuatro genotipos de mandarina Clementina Monrreal, Nova, Encore y Clemenules, y seis de toronja Chinesse Shaddock, Henderson Ruby, Sambar, Redblush Nuc, Red Blush y Rio Red. El Grupo 3 está constituido solo por limones, Eureka, Eureka Frost, Eureka Ross, Limón sin espinas, Limón sin espinas 1, Villafranca y Nicaragua Sweet Lime, siendo esta última variedad es la más divergente entre las variedades de limón.

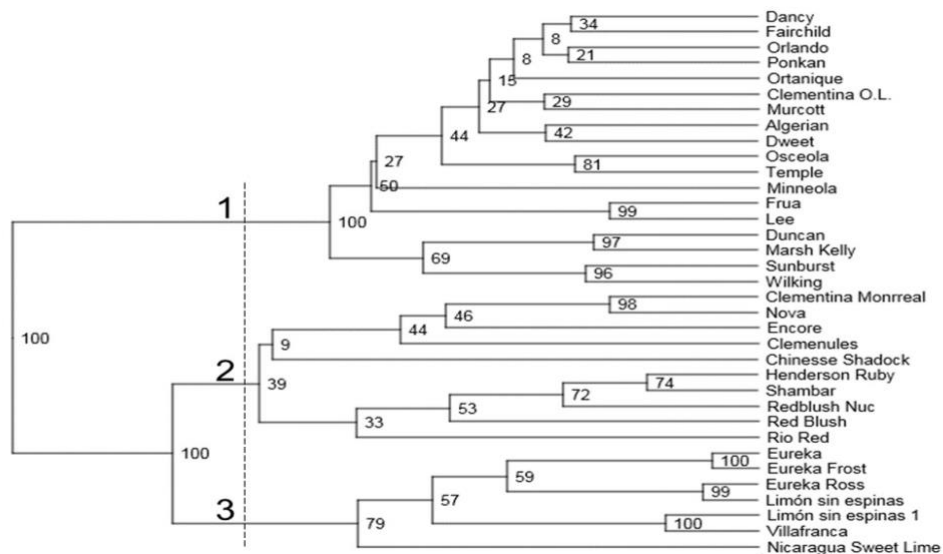
El Análisis de Coordenadas Principales (ACP) Figura 3, muestra que las tres primeras Coordenadas explican el 49 % de la varianza total observada y confirma lo observado en el dendrograma, donde la mayoría de los

Group 3 is made up only of lemons, Eureka, Eureka Frost, Eureka Ross, Limón sin espinas, Limón sin espinas 1, Villafranca and Nicaragua Sweet Lime, the latter variety being the most divergent among lemon varieties.

The Principal Coordinate Analysis (PCA), Figure 3, shows that the first three Coordinates explain 49% of the total observed variance and confirms what was observed in the dendrogram, where the majority of the genotypes are grouped according to the species to which they belong and it is also observed how the Duncan and Marsh Kelly grapefruit genotypes have greater similarity with the lemon genotypes than with the other genotypes of their species, as well as the presence of a Chinesse Shaddock grapefruit genotype.

**DISCUSSION**

The polymorphism recorded in this work was high for each of the markers used in the RAMs technique, which suggests the existence of a broad genetic base in the germplasm analyzed. 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

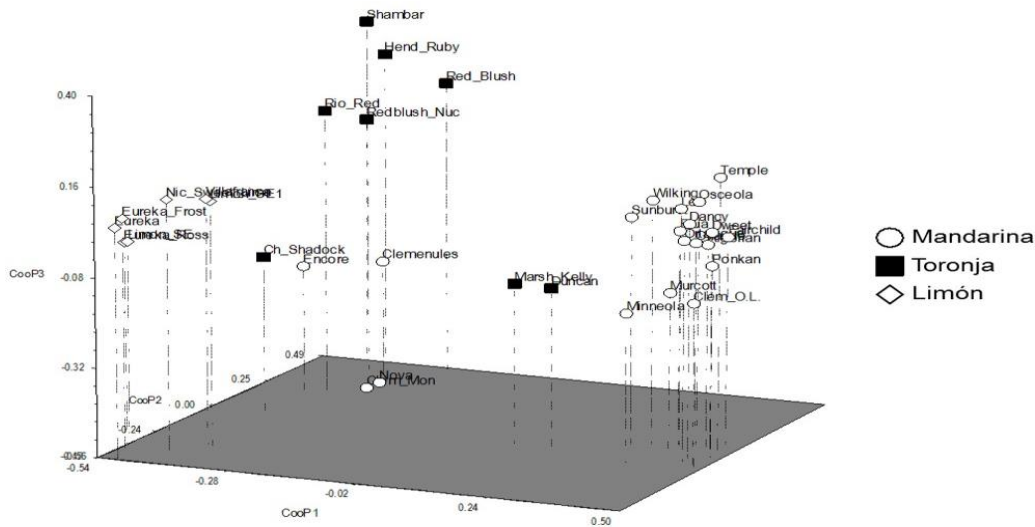


**Figura 2.** Relaciones genéticas entre 20 variedades de mandarina (*Citrus reticulata* L.), ocho variedades de toronja (*Citrus paradisi* L.) y siete variedades de limón (*Citrus limón* L.) del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán, N.L. (INIFAP-México), basado en el coeficiente de Nei-Li y calculado con base en los datos generados con cinco marcadores RAMs. Los tres grupos formados se indican con los números 1, 2 y 3.

**Figure 2.** Genetic relationships between 20 varieties of mandarin (*Citrus reticulata* L.), eight varieties of grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and seven varieties of lemon (*Citrus limón* L.) from the germplasm bank of the General Teran Experimental Station, N.L. (INIFAP-México), based in the Nei-Li coefficient and calculated based on the data generated with five RAMs markers. The three groups formed are indicated with the numbers 1, 2 and 3.

genotipos se agrupan de acuerdo con la especie a que pertenecen y se observa también como los genotipos Duncan y Marsh Kelly de toronja tienen mayor similitud con los genotipos de limón que con los otros genotipos de su especie, así como la presencia de un genotipo de toronja Chinese Shaddock.

the heterozygosity recorded in studies of the genetic characterization of an orange germplasm bank and the genetic diversity of citrus rootstocks. These results coincide with the values recorded for the attributes of the markers used in the present study, since all the markers presented values considered high for PIC and even the CA marker recorded a DI of 72%, which is considered a high value for



**Figura 3.** Análisis de coordenadas principales de 20 variedades de mandarina (*Citrus reticulata* L.), ocho variedades de toronja (*Citrus paradisi* L.) y siete variedades de limón (*Citrus limon* L.) del banco de germoplasma del Campo Experimental General Terán, N.L., (INIFAP-México) utilizando NTSYSpc v2.2.

**Figure 3.** Analysis of principal coordinates of 20 varieties of mandarin (*Citrus reticulata* L.), eight varieties of grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and seven varieties of lemon (*Citrus limon* L.) from the gene bank of the General Teran Experimental Station, N.L. (INIFAP-México), 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 que determina su alto nivel de parentesco, esta característica puede estar dada por la forma en que fueron existe una tendencia a la uniformidad en el proceso de

any plant species as stated by Gallegos *et al.* (2017) in citrus rootstocks and Gutiérrez *et al.* (2015) in creole avocados.

The five markers evaluated generated a high percentage of polymorphism and almost all the materials involved in the study could be differentiated, except for the lemon varieties Eureka and Eureka Frost, as well as the Limon sin espinas 1 and Villafranca, which presented 100% homology between them with the markers used, which determines their high level of relatedness, this characteristic may be given by the way in which they were originated (mutation, polyembryony, vegetative propagation, somatic or nuclear origin), as suggested by Morillo *et al.* (2010). In this regard, Webber (1943) points out that there is a tendency towards uniformity in the domestication process of each species and for this reason, between certain varieties there are so many similar-originadas (mutación, poliembrionía, propagación vegetativa, origen somático o nuclear), como lo sugieren Morillo *et al.* (2010). Al respecto, Webber (1943) señala que

domesticación de cada especie y por esta razón, entre ciertas variedades hay tantas semejanzas en lo que se refiere a los caracteres más visibles que resulta difícil diferenciarlos. Se obtuvieron 12 fragmentos únicos, destacándose los genotipos de mandarina Lee y Wilking con tres fragmentos únicos respectivamente, con dos fragmentos únicos se registró a la mandarina Clementina Monrreal y a los genotipos de toronja Chinesse Shaddock y Rio Red. 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).

Mediante el análisis del coeficiente de Nei-Li, los materiales de cítricos evaluados conformaron tres grupos, esta conformación está determinada con base a su origen genético. La conformación de los tres grupos está constituida en primera instancia por su origen genético (especie), sin embargo, en los grupos 1 y 2 se observaron mezclas de dos especies diferentes (mandarina y toronja) conformándose algunos subgrupos, aunque sin mezclarse las especies en los subgrupos. Con base en diferentes estudios, se consideran sólo cuatro especies puras o básicas: *C. reticulata* (mandarina), *C. maxima* (pomelo), *C. medica* (cidro) y *C. micrantha* (micranta), entre las cuales existe una alta compatibilidad sexual que ha permitido el cruzamiento espontáneo entre ellas, contribuyendo a un alto nivel de hibridación, a la complejidad del grupo, y a dificultar la clasificación taxonómica de cultivares (Curk *et al.*, 2016). La identificación reciente de un locus ubicado en el cromosoma 8 (0,3-2,2 Mb), cuyo gen estaría involucrado en la disminución de la acidez de todas las variedades de las mandarinas y naranjas dulces actuales de baja acidez, el cual habría sido introgresado del pomelo (Wu *et al.*, 2018). Es del conocimiento general que los cítricos 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), y el hecho de que de que la variabilidad genética de los bancos de germoplasma puede estar conformada de introducciones de otros países del mundo, ayuda a que la diversidad genética sea mayor. 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), 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 divergencia genética tal y como como lo señalan Gómez *et al.* (2020).

larities in terms of the most visible characters that it is difficult to differentiate them. Twelve unique fragments were obtained, highlighting the Lee and Wilking mandarin genotypes with three unique fragments respectively, with two unique fragments the Clementina Monrreal mandarin and the Chinesse Shaddock and Rio Red grapefruit genotypes were recorded. 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).

Through the analysis of the Nei-Li coefficient, the citrus materials evaluated formed three groups, this conformation is determined based on their genetic origin. The formation of the three groups is constituted in the first instance by their genetic origin. The formation of the three groups is constituted in the first instance by their genetic origin (species), however, in groups 1 and 2 mixtures of two different species (mandarin and grapefruit) were observed, forming some subgroups, although without mixing the species in the subgroups. Based on different studies, only four pure or basic species are considered: *C. reticulata* (mandarin), *C. maxima* (grapefruit), *C. medica* (citron) and *C. micrantha* (micranta), among which there is a high sexual compatibility that has allowed spontaneous crossing between them, contributing to a high level of hybridization, the complexity of the group and to making the taxonomic classification of cultivars difficult (Curk *et al.*, 2016). The recent identification of a locus located on chromosome 8 (0.3-2.2 Mb), whose gene would be involved in the decrease in acidity of all varieties of current low-acid mandarins and sweet oranges, which would have been introgressed from the grapefruit (Wu *et al.*, 2018). It is general knowledge that citrus fruits 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), and the fact that the genetic variability of germplasm banks can be made up of introductions from other countries in the world, help to increase genetic diversity. The low intraspecific diversity contrasts with the high variability in terms of characteristics of agronomic importance such as ripening period, size and color of the fruits (Webber, 1943), which is highly desirable in genetic improvement programs, since it is most advisable to carry out crossing work with materials that present the greatest genetic divergence, as pointed out by Gómez *et al.* (2020).

The genetic variability determined among the germplasm evaluated in this study allows us to infer the existence of modification in its genetic structure that can be used in genetic improvement programs for the generation of

La variabilidad genética determinada entre el germoplasma evaluado en este estudio, permite inferir la existencia de modificación en su estructura genética que puede ser aprovechada en programas de mejoramiento genético para la generación de nuevas variedades con características de interés fitosanitario, agronómico e industrial, pero 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 a mutación que 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. Las mutaciones son comunes en el género *Citrus*, por esta razón, la mayoría de los genotipos comerciales que se conocen en la actualidad de *C. sinensis*, *C. paradisi* y *C. limon*, no constituyen especies biológicamente definidas debido a que la mayoría de los cultivares de estas especies se originaron a partir de mutaciones somáticas (Gómez *et al.*, 2020), las cuales se propagaron asexualmente en virtud de que los cítricos presentan apomixis (mecanismo reproductivo que permite a la planta clonarse), 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 mandarina, toronja y limón incluidos 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 resolutive y permitieron diferenciar a prácticamente todas las variedades evaluadas, además de que se registraron fragmentos únicos que pueden ser útiles en 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. 9564336623: "Producción de yema de cítricos". division

new varieties with characteristics of phytosanitary, agronomic and industrial interest, but in addition to the genetic characterization, it is necessary to carry out the agronomic and morphological characterization of the materials under study. The modification in the genetic structure may be associated with mutation that causes changes or modifications in the genomic sequence of living organisms, where said changes occur due to errors in cell or exposure to certain environmental conditions. The mutations are common in the *Citrus* genus, for this reason, most of the currently known commercial genotypes of *C. sinensis*, *C. paradisi* and *C. limon* do not constitute biologically defined species because most of the cultivars of these species originated from somatic mutations (Gómez *et al.*, 2020), which were propagated asexually due to the fact that citrus present apomixis (reproductive mechanism that allows the plant to clone itself), an exceptional characteristic in the plant kingdom, whose origin was a mutation from 1.6 million years ago, and which passed from species to species (Wu *et al.*, 2018).

## CONCLUSIONS

The high values recorded in the level of polymorphism and genetic diversity allow us to infer the existence of a broad genetic base in the germplasm of mandarin, grapefruit and lemon 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 agroindustrial interest. The markers used in the RAMs technique are considered efficient to understand the genetic diversity in citrus, since they have a wide resolution capacity and allowed the differentiation of practically all the varieties evaluated, in addition to the fact that unique fragments were recorded that may be useful in the detection of some particular characteristic or genotype.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research for funding this research as part of project No. 9564336623: "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](https://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](https://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)
- Curk, F., Ollitrault, F., Garcia-Lor A., Luro, F., Navarro, L., and Ollitrault, P. 2016. Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Annals of Botany* 117 (4): 565-583.
- 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](https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800010035x)
- 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). *Biología y Agroindustria* 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., 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. [doi.org/10.1016/j.bse.2014.11.003](https://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](https://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](https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2316) .
- Gower, J.C. 2005. Principal Coordinates Analysis. In: P. Armitage & T. Colton (ed.) *Encyclopedia of Biostatistics*, 6, Chichester: John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/0470011815.b2a13070>
- 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).
- Hapl, V., Pavlíček, A. and Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- Higashi, h., Hironaga, T., Sennenbara, T., Kunitake, H. and Komatsu, H. 2000. Phylogenetic classification of *Fortunella* species using RAPD method. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 69:288.
- 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](https://doi.org/10.1016/j.mgene.2014.01.008)
- 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. [doi.org/10.1094/PHTO.2002.92.6.580](https://doi.org/10.1094/PHTO.2002.92.6.580).
- Martínez, M.F. 2013. Caracterización molecular de genotipos de mandarinas *Citrus* spp. mediante

- marcadores RAM's (Microsatélites Amplificados al Azar) y microsatélites. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas con especialidad en Biotecnología Vegetal. Universidad Nacional De Colombia, Sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira, Colombia. 127 Págs.
- Maya, C.J. 2017. "Cítricos mexicanos en el mercado japonés: experiencias y oportunidades para Sinaloa". México y la cuenca del pacífico. Vol. 6, no. 16, enero-abril, pp. 107-142.
- Medina, F.H.P., Bordignon, R. and Siqueira, W.J. 2003. Segregações gaméticas de locos isoenzímicos 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 poli(acrilamida 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](http://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).
- 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., Mclauchlan, 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).
- SADER. 2022. Mandarina, fruto que alegra la vida. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/mandarina>.
- 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.
- Talon, M, Wu, G.H., Gmitter, F.G. and Rokhsar, D.S. 2020. The origin of citrus. Chapter 2 -The Genus Citrus. Woodhead Publishing. 9-31.
- 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)
- 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.
- Vikas, K., Ramandeep, K., Poonam, A. and Gurvinder, S. 2022. Underutilized citrus species: An insight of their nutraceutical potential and importance for the development of functional food. *Scientia Horticulturae*. Volume 296.
- 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](https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x)
- Zhao, X. and Kochert, G. 1993. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)<sub>n</sub> microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 21(4): 607-614.