

# DIVERSIDAD GENÉTICA EN PATRONES DE CÍTRICOS MEDIANTE MICROSATÉLITES AMPLIFICADOS AL AZAR (RAMs)

## GENETIC DIVERSITY ON CITRUS ROOTSTOCKS WITH RANDOM AMPLIFIED MICROSATELLITES (RAMs)

## DEVERSIDADE GENETICA DE PADROES DE CITROS USANDO MICROSSATELITES AMPLIFICADOS AO ACASO (RAMs)

JEISSON STEEVENS GALLEG0-COLONIA<sup>1</sup>, AYDA LILIA ENRÍQUEZ-VALENCIA<sup>1</sup>, ÁLVARO CAICEDO-ARANA<sup>2</sup>,  
ANDRÉS MAURICIO POSSO-TERRANOVA<sup>3</sup>, JAIME EDUARDO MUÑOZ-FLOREZ<sup>4</sup>

### RESUMEN

*Los patrones de cítricos son esenciales en la citricultura debido a que afectan más de veinte características agronómicas de las copas y frutos. La caracterización y documentación de las introducciones de un banco de germoplasma permiten evitar duplicados e identificar introducciones promisorias para procesos de selección, mejoramiento genético o procesos agroindustriales. Se evaluó la diversidad genética de 39 introducciones del banco de germoplasma de Cítricos de CORPOICA Centro de Investigación Palmira. Se utilizaron seis cebadores RAMs los cuales generaron 134 loci polimórficos que se usaron para estimar los parámetros de diversidad genética. La He y porcentaje de loci polimórficos para la colección fue de 0,38 y 92,54%, respectivamente. El análisis de similitud permite apreciar que los materiales se encuentran dispersos en el dendrograma, sin embargo a un nivel de similitud de 0,63 se agrupan las introducciones*

**Recibido para evaluación:** 17 de Julio de 2015. **Aprobado para publicación:** 25 de Julio de 2016.

- 1 Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ingeniera Agrónoma. Palmira, Colombia.
- 2 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Ingeniero Agrónomo. Palmira, Colombia.
- 3 Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ph.d. en Biología. Palmira, Colombia.
- 4 Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ph.d. Ciencias Agrarias. Palmira, Colombia

**Correspondencia:** [alenziquez.v@hotmail.com](mailto:alenziquez.v@hotmail.com).

*del género Poncirus y sus híbridos. La especie Clausena lansium fue la más distante del resto de las especies y se diferenció a un nivel de similitud de 0,54. Los resultados indican alta diversidad genética en el banco de germoplasma de patrones de cítricos, que puede ser utilizada en futuros trabajos de investigación.*

## RESUMO

*Os porta-enxertos de cítricos são essenciais na cultura de citros porque afetam mais de vinte características agrônômicas das cultivares-copa e dos frutos. A caracterização e documentação das introduções de um banco de germoplasma impedem duplicações e permitem identificar acessões promissoras para processos de seleção, melhoramento genético ou processos agroindustriais. Foi avaliada a diversidade genética de 39 acessões do banco de germoplasma de Citrus da Corporación Colombiana de Pesquisa Agropecuária (CORPOICA), centro de pesquisa Palmira. Foram usados seis primers RAMs, os quais geraram 134 loci polimórficos que foram utilizados para estimar os parâmetros de diversidade genética. A heterogeneidade esperada e a percentagem de loci polimórficos para a coleção foi de 0,38 e 92,54%, respectivamente. A análise de similaridade permitiu apreciar que os materiais estão dispersos no dendrograma, no entanto, num nível de similaridade de 0,63 estão agrupadas as acessões do gênero Poncirus e seus híbridos. A espécie Clausena Lansium foi o mais distante das outras espécies no dendrograma e diferiu num nível de similaridade de 0,54. Os resultados mostram alta diversidade genética no banco de germoplasma de padrões de citros de CORPOICA C.I. Palmira, que pode ser utilizada em futuros trabalhos de pesquisa.*

## ABSTRACT

*Citrus rootstocks are essential in the citrus industry because they affect more than twenty agronomic characteristics of the citrus and fruits. Characterization and documentation of germplasm bank introductions allow to avoid duplicates and to identify promising accessions for selection processes, breeding or agro-industrial processes. It was evaluated the genetic diversity of 39 accessions from the citrus rootstocks germplasm bank of the Colombian Corporation for Agricultural Research (Corpoica-Palmira). Six RAMs primers were used which generated 134 polymorphic loci that were used to estimate genetic diversity parameters. Expected heterogeneity and polymorphic loci percentage for the collection was 0,38 and 92,54%, respectively. Similarity analysis allow to appreciate that the materials are dispersed in the dendrogram, however a similarity level of 0,63 grouped the accessions of the genus Poncirus and their hybrids. The species Clausena lansium was the most distant from other species in the dendrogram and differed at a similarity level of 0,54. The results indicate a high genetic diversity in the citrus rootstocks germplasm bank of Corpoica that can be used in future research programs.*

### PALABRAS CLAVE:

Citrus, Biodiversidad, Caracterización, Germoplasma, Molecular.

### PALAVRAS-CHAVE:

Bancos, Biodiversidade, Caracterização, Germoplasma, Molecular.

### KEYWORDS:

Banks, Biodiversity, Characterization, Germplasm, Molecular.

## INTRODUCCIÓN

Los cítricos cultivados actualmente se caracterizan por estar formados por la unión de dos individuos por medio del injerto. El patrón constituye el sistema radical y una parte del tronco, sobre el cual se injerta la yema, vareta o púa que forma la copa o parte aérea la cual produce los frutos de interés comercial. El empleo del patrón no sólo ha logrado mejorar los rendimientos y la calidad de los frutos, sino que también ha permitido la siembra en sitios con características adversas para el normal desarrollo de la planta [1]. Los cítricos pertenecen a la familia Rutaceae, formada por siete subfamilias, una de ellas es Aurantioideae, la cual tiene dos tribus, Clauseneae y Citreae. Clauseneae consiste de tres subtribus, entre ellas Clauseninae donde se destaca el género Clausena [2]. Las especies del género *Poncirus* hibridan libremente con las especies de cítricos generando grupos de híbridos, que son citranges (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), citrandarinas (*Poncirus trifoliata* x *Citrus reticulata*), citremones (*Poncirus trifoliata* x *Citrus limonia*) y citrumelos (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*), que también reconoce a los tangores como el cruce interespecífico entre mandarina (*Citrus reticulata*) y naranja (*Citrus sinensis*) [3].

En los bancos de germoplasma vegetal, la caracterización y documentación de las introducciones permiten evitar duplicados e identificar introducciones promisorias para procesos de selección, mejoramiento genético o procesos agroindustriales [3]. En el banco de germoplasma de cítricos de CORPOICA C.I. (Palmira), se encuentran 40 introducciones de patrones de *Citrus* y géneros relacionados, establecidos en materas tipo bonsái, muchos de origen desconocido, razón por la cual es necesario hacer estudios moleculares que evalúen la diversidad genética de este banco de germoplasma.

El uso de marcadores moleculares ha sido un instrumento valioso y preciso para la evaluación de la diversidad genética en cítricos y géneros relacionados, incluyendo marcadores isoenzimáticos [4], SRAP [5], RAPD [6], AFLP [7]. En Colombia, se evaluó la diversidad genética del banco de germoplasma de cítricos en naranjas *Citrus sinensis* [8, 9], sin embargo en la colección de patrones de cítricos aún es desconocido. Hasta la fecha los reportes acerca de la medición de la diversidad genética de cítricos y géneros relacionados usados como patrones son escasos.

Los marcadores moleculares RAMs son útiles para medir la diversidad genética en plantas y animales, diferencia entre familias, entre especies y al interior de la especie [10]. El objetivo de este estudio fue determinar el nivel y organización de la diversidad genética de patrones de cítricos del banco de germoplasma de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA C.I. Palmira, usando marcadores moleculares RAMs.

## MÉTODO

### Material vegetal

Se colectó hojas jóvenes de 39 accesiones de patrones de cítricos procedentes del banco de germoplasma de CORPOICA C.I. Palmira (cuadro 1), localizada en Palmira, Valle del Cauca, Colombia, a 1001 msnm, con una precipitación anual de 1.174 mm y temperatura promedio de 25°C. La colección de estudio cuenta con materiales pertenecientes a tres géneros de la familia Rutaceae: *Citrus*, *Poncirus* y *Clausena*.

### Extracción de ADN y amplificación con cebadores RAMs

El tejido vegetal se maceró en nitrógeno líquido y se realizó la extracción de ADN siguiendo la metodología [11] con algunas modificaciones. Para la evaluación de la calidad y cantidad del ADN obtenido se realizaron geles de agarosa al 0,8% corridos en buffer TBE 0,5X (Tris-borato 0,045 M; EDTA (ácido etildiaminotetraacético 0,001M) a 100 voltios durante 50 minutos, teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/mL, y visualizados bajo luz ultravioleta.

Las concentraciones se determinaron por comparación con concentraciones conocidas de ADN del bacteriófago lambda. El ADN cuantificado se diluyó en agua HPLC hasta tener la concentración final de 10 ng/µL. El ADN de las accesiones se almacenó en cajas criogénicas a -20°C, con sus respectivas identificaciones, en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

Para la caracterización molecular se utilizaron siete cebadores RAMs, teniendo en cuenta su habilidad para revelar polimorfismo, el número de bandas polimórficas y su reproducibilidad (cuadro 2). La concentración de la reacción fue: Tampón Taq 1X, dNTPs 0,2 mM (para cada uno), cebadores 4 µM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, una

**Cuadro 1.** Patrones de cítricos del banco de germoplasma de CORPOICA C.I. (Palmira), utilizados para la caracterización molecular con microsatélites RAMs.

ENTRADA	NOMBRE COMUN	ESPECIE
UNP - C00	Satinga /SxE	Citrus sunki
UNP - C01	Limón rugoso	Citrus jambhiri Lush
UNP - C02	English large	Poncirus trifoliata (L.) Raf.
UNP - C03	Ponkan	Citrus reticulata Blanco
UNP - C04	Rusk	(P. trifoliata x C. sinensis)
UNP - C05	Arizona	Citrus limon (L.) Burm
UNP - C06	cod. 1449	Poncirus trifoliata x Citrus limón
UNP - C07	Crenatifolia	Citrus crenatifolia Lush.
UNP - C08	Rich 21-3	Poncirus trifoliata (L.) Raf.
UNP - C09	Kryder 15-3	Poncirus trifoliata (L.) Raf.
UNP - C10	Sacaton	C. paradisi x P. Trifoliata
UNP - C11	Cleopatra	Citrus reshni Hort. ex Tan.
UNP - C12	Sunky x Jacobson	C. sunky x P. Trifoliata
UNP - C13	Sunky x English	C. sunky x P. Trifoliata
UNP - C14	Pomeroy	Poncirus trifoliata (L.) Raf.
UNP - C15	cod. 1449	Poncirus trifoliata x Citrus limón
UNP - C16	Naranja agrio	C. aurantium L.
UNP - C17	Clausena	Clausena lansium (Lour.) Skeels.
UNP - C18	Rangpur	Citrus limonia Osb.
UNP - C19	C - 35	C. sinensis (var. Ruby) x P. trifoliata (clon Webber-Fawcett)
UNP - C20	Pomelo África	Citrus paradisi Macf.
UNP - C21	Amblycarpa	Citrus amblycarpa (Hassk.) Ochse.
UNP - C22	Parson special	Citrus reticulata Blanco.
UNP - C23	Citrus lycopersicum	Citrus lycopersicae
UNP - C25	H - 56	C. reticulata x C. sinensis
UNP - C26	Salerna	Citrus sinensis (L.) Osbeck.
UNP - C27	C. sunki	Citrus sunky Hort. ex Tan.
UNP - C28	CPB 4475	Citrus paradisi (Pomelo Duncan) x Poncirus trifoliata
UNP - C29	Volkameriana	Citrus volkameriana Ten. & Pasq.
UNP - C30	Troyer	Citrus sinensis (Washington navel) x Poncirus trifoliata
UNP - C31	Webberi	Citrus webberii Wester.
UNP - C32	Yuma	C. sinensis x P. trifoliata
UNP - C33	Rangpur x Swingle	C. limonia x (C. paradisi x P. trifoliata)
UNP - C34	Tangor dweet	C. reticulata x C. sinensis
UNP - C35	Armenia	Citrus aurantifolia Burn.
UNP - C36	Milan	Citrus jambhiri Lush.
UNP - C37	Natsudaikai	Citrus natsudaikai Hayata.
UNP - C39	Fly dragon	Poncirus trifoliata var. monstrosa T. ito
UNP - C40	Carrizo	C. sinensis x P. trifoliata

**Cuadro 2.** Cebadores utilizados en la técnica Microsatélites RAMs.

Cebador	Secuencia (5' A 3')	Temperatura hibridación
CCA	DDBCCACCACCACCACCA	55°C
CT	DYDCTCTCTCTCTCTCTC	55°C
AG	HBHAGAGAGAGAGAGAGA	48°C
GT	VHVGTGTGTGTGTGTA	58°C
CA	DBDACACACACACACACA	50°C
TG	HVHTGTGTGTGTGTGTGT	55°C
CGA	DHBCGACGACGACGACGA	58°C

Las siguientes designaciones se usan para los sitios degenerados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); V (G ó A ó C) y D (G ó A ó T). Tomado de Morillo et al (2009).

unidad de Taq polimerasa y 10 ng de ADN en un volumen final de 25 µL. La amplificación se realizó en un termociclador (PTC-100 Programable Thermal Controller), con las siguientes condiciones: 95°C por 5 minutos, seguido de 37 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50-58°C por 45 segundos (de acuerdo al cebador utilizado (cuadro 2), 72°C por 2 minutos y una extensión final de 72°C por 7 minutos.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (37:1 acrilamida – bisacrilamida) en una cámara Biometra, corridos a 150 voltios y 400 mA, durante una hora y 10 minutos. La tinción se realizó utilizando sales de plata (figura 1) [12].

### Análisis de datos

La lectura de las bandas se realizó considerando como locus polimórfico aquel en el cual el alelo más común tiene una frecuencia menor al 95% [13]. Se gene-

ró una matriz binaria de presencia (uno) y ausencia (cero). A partir de esta matriz y usando los programas SIMQUAL del paquete NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy System for Personal Computer, versión 2.02 PC*) y el programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis) se realizaron los análisis estadísticos.

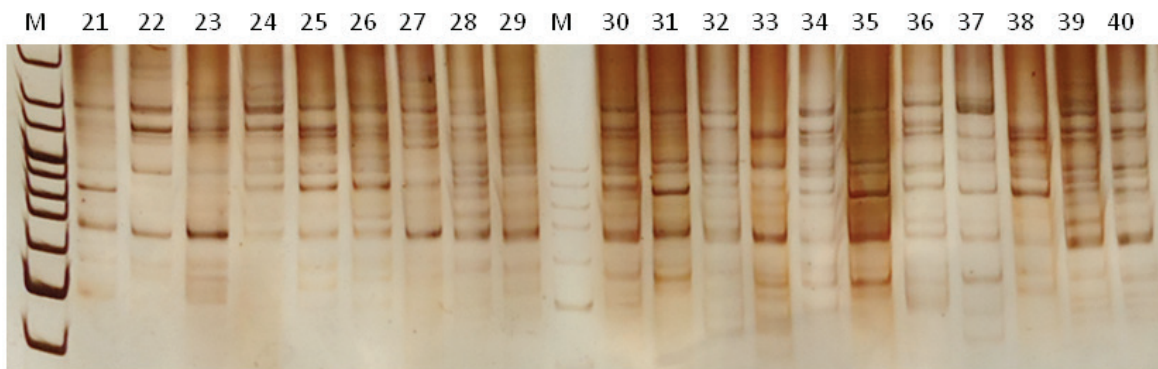
Para cada cebador se obtuvo el número de bandas totales y bandas polimórficas. La similitud genética se calculó mediante el coeficiente de Dice Nei-Li [14]:  $S = (2a/2a + b + c)$  donde a = bandas compartidas por ambos individuos, b = bandas presentes en el individuo (1) pero no en (2), y c = bandas presentes en el individuo (2) pero no en (1). El análisis de agrupamiento se realizó con el programa SAHN de NTSYS-pc (versión 2) utilizando el método UPGMA, método gráfico de agrupamiento por parejas, que usa el promedio aritmético no ponderado. El dendrograma se construyó con el programa TREE de NTSYS-pc. Para estimar la diversidad genética se utilizaron los parámetros de heterocigosidad promedio esperada (He) y el porcentaje de loci polimórficos (P), los cuales se estimaron sobre todos los loci y el promedio de los mismos de acuerdo con la fórmula no sesgada de [15].

## RESULTADOS

### Marcadores moleculares RAM's

Se seleccionaron seis cebadores RAM's de los siete inicialmente considerados para el estudio. El cebador CGA se descartó del análisis debido a que no amplificó para la mayoría de las muestras. Los seis cebadores generaron 134 bandas que oscilaron entre 17 para el cebador GT y 26 para el cebador CA (cuadro 3), lo cual también coincide con el número de loci polimórficos,

**Figura 1:** Gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, cebador AG.



**Cuadro 3.** Numero de loci polimórficos, Heterocigosidad promedio estimada y porcentaje de loci polimórficos para los seis cebadores RAMs evaluados en 39 introducciones de patrones de cítricos.

Cebador	No. Loci polimórficos	He estimada	% Loci polimórficos (95%)
AG	19	0,41	100,00
CCA	18	0,28	75,00
CT	24	0,41	95,83
GT	17	0,40	100,00
TG	24	0,38	91,67
CA	26	0,41	92,31
Población total		0,38	92,54

con excepción del cebador CCA que género 18 loci polimórficos de un total de 20 loci.

Las condiciones de amplificación para los cebadores RAM's se tomaron en cuenta de acuerdo a lo descrito por [10]. Sin embargo, las condiciones de amplificación pueden variar dependiendo de la especie estudiada. En este estudio se hizo una variación en la temperatura de hibridación del primer AG (48°C) (figura 1).

### Análisis de Diversidad Genética

La heterocigosidad esperada (He) para las 39 introducciones de patrones de Cítricos fue de 0,38, indicando un alto nivel de diversidad genética en la colección (cuadro 3). Teniendo en cuenta que  $0 \leq He \leq 0,3$  [16], este valor puede estar asociado a que se evaluaron tres géneros diferentes, *Citrus*, *Poncirus* y *Clausena*, y al interior de ellos diferentes especies y cruzamientos (híbridos). En la caracterización molecular con RAM's del grupo de naranjas del banco de germoplasma de cítricos de CORPOICA, se encontró un valor de He de 0,31 [8], el cual también es alto y similar a lo encontrado en este estudio para patrones de cítricos.

El porcentaje de loci polimórfico encontrado para la colección fue de 92,54%, indica alta diversidad genética, lo cual se debe posiblemente a que la colección está formada por introducciones de tres géneros diferentes y además la mayoría de estos materiales son híbridos intergenéricos e interespecíficos. Los valores de He y porcentaje de loci polimórficos para cada uno de los cebadores RAM's fueron altos. Los valores de He variaron entre 0,41 para AG, y 0,28 para CCA, y valores intermedios importantes fueron registrados en

CT y CA: 0,41, GT: 0,40, TG: 0,38. El porcentaje de loci polimórficos osciló entre 75% para CCA, y 100% para AG y GT; de igual forma se registraron valores importantes en los cebadores CT: 95,83%, CA: 92,31%, TG: 91,67%. Los cebadores con secuencias repetidas de dos pares de bases fueron más polimórficos que CCA con tres pares de bases. De manera general hubo correlación entre He y polimorfismo en los cebadores evaluados. Los resultados indican que los seis cebadores evaluados realizaron un aporte significativo al estudio de la diversidad genética de patrones de cítricos constituyéndose en marcadores moleculares útiles para futuros trabajos de investigación.

La colección está compuesta por especies e híbridos de tres géneros diferentes, por lo tanto ésta se organizó en tres grupos: el grupo uno corresponde a materiales del género *Poncirus* y sus híbridos con el género *Citrus*; el grupo dos compuesto por introducciones del género *Citrus* e híbridos interespecíficos (tangores); y el grupo tres formado por un material del género *Clausena*. Debe aclararse que este último no es un grupo como tal debido a que está formado por un solo material y por lo anterior no registró valores de heterocigosidad y porcentaje de loci polimórficos. Estos valores para el grupo uno fueron de 0,34 y 82,09%, respectivamente; mientras que para la población dos, fueron de 0,37 y 90,30%, respectivamente. Estos resultados indican que el grupo dos tiene la mayor diversidad genética de la colección. Lo anterior puede ser explicado debido a que este grupo se compone de mandarinas, naranjas, limones, pomelos, híbridos, y otros materiales que no están incluidos dentro de los grupos anteriores, por ejemplo *Citrus lycopersicae*.

En mandarina *Citrus reticulata* Blanco, se encontró alta heterogeneidad genética (86% polimorfismo) utilizando AFLP a pesar de considerar introducciones altamente relacionadas [17]. Utilizando otras técnicas moleculares, isoenzimas [18], RFLP, RAPD [19] y microsatélites [20] se ha concluido que este grupo reporta mayor diversidad genética dentro del género *Citrus*.

En naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck, se desarrollaron y caracterizaron marcadores moleculares microsatélites polimórficos, encontraron valores de He promedio de 0,50, y de heterocigosidad observada (Ho) promedio de 0,99 [21], que son valores altos que justifican la diversidad genética del género *Citrus*. Sin embargo, en otros estudios con RAM's y microsatélites, se encontraron valores de He de 0,22 y 0,25, respectivamente, y porcentaje de loci polimórficos de 49% y 64,8%, res-

pectivamente [8, 9], los cuales son bajos y contrastan con el presente estudio debido a que las introducciones evaluadas son cultivares clonados de naranjas no híbridas, mientras que en este estudio de la diversidad genética de patrones de cítricos la colección cuenta con materiales híbridos (dos tangores y siete citranges) y una accesión de naranja no híbrida (Salerma).

Los pomelos *Citrus paradisi*, se caracterizan por presentar baja diversidad entre ellos, sin embargo, al ser comparados con otras especies del género *Citrus*, como es el caso del presente estudio, se obtiene alta diversidad. Se evaluaron la variabilidad genética de 38 introducciones de *Citrus paradisi* usando RAPD y SSR encontrando bajo polimorfismo entre los materiales (49%) [22]. Esto sugiere que el polimorfismo morfológico observado entre los pomelos debe estar asociado con mutaciones somáticas, las cuales no son detectadas por los marcadores moleculares utilizados.

A pesar que la mayor diversidad se encontró en el grupo de *Citrus* (He 0,37 y 90,30% loci polimórficos) se debe tener en cuenta que la diversidad del grupo uno (*Poncirus* y sus híbridos con *Citrus*) también es alta (He 0,34 y 82,09% loci polimórficos). Lo anterior puede atribuirse a que éste grupo incluye citranges, citremones, citrumelos, citrandarinas, que son materiales provenientes del cruce entre dos géneros (Cuadro 1).

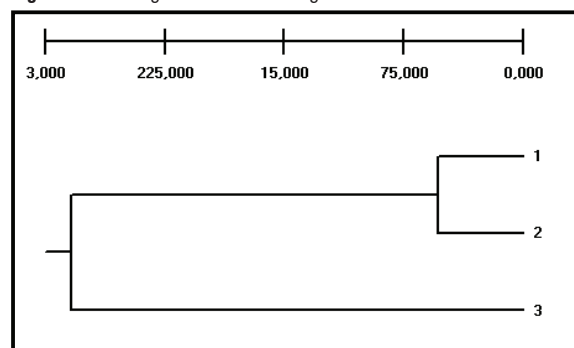
### Distancia Genética

Los valores de distancia genética calculados con el índice de Nei [14] mostraron que los grupos 1 y 2, *Poncirus* y *Citrus*, respectivamente, son más cercanos entre ellos (0,05), al ser comparadas con *Clausena lansium* (0,28) (figura 2). Lo anterior puede ser explicado debido a que los géneros *Poncirus* y *Citrus* pertenecen a la misma subtribu (*Citrinae*), dentro de la tribu Citreae, mientras que el género *Clausena* se incluye en la subtribu Clauseninae, dentro de la tribu Clauseneae, ubicándose lejos taxonómicamente.

### Análisis de Similitud Genética

El análisis mediante el coeficiente de Dice Nei-Li permite apreciar que los materiales del banco de germoplasma se encuentran dispersos en el dendrograma (figura 3). La falta de agrupamientos puede deberse a que en este estudio no se evaluó una sola especie, sino varias especies e híbridos pertenecientes a tres géneros diferentes. Además, este banco, está compuesto por introducciones de diferentes partes del

Figura 2. Dendrograma de distancia genética.

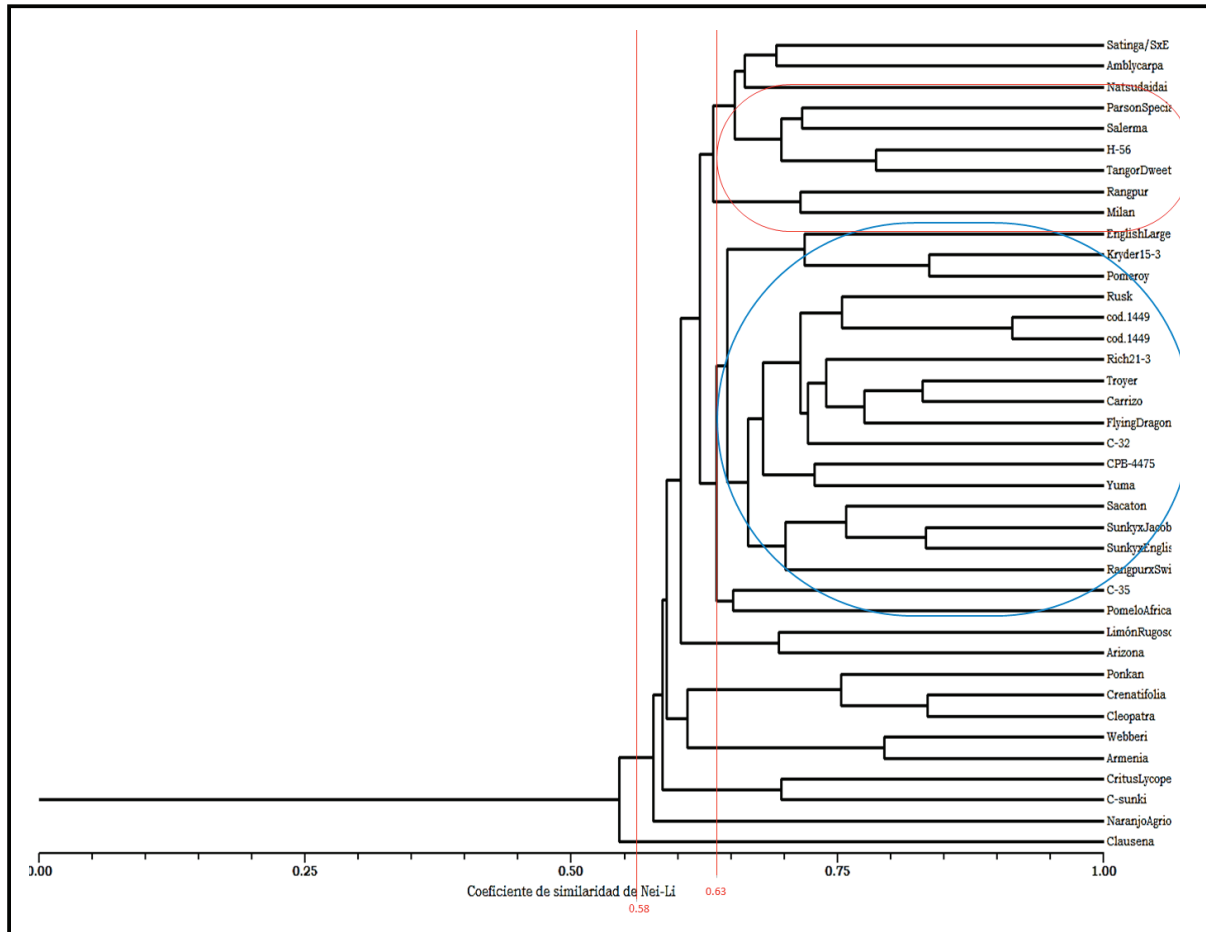


Distancia genética calculado con el índice de Nei (1978) construido con el método UPGMA para los tres grupos formados. 1) *Poncirus* y sus híbridos con *Citrus*, 2) *Citrus* e híbridos intragenéricos, 3) *Clausena lansium*.

mundo, en particular de Riverside - California, Florida (E.U), Valencia (España), Embrapa (Brasil), entre otros centros de investigación, universidades y fincas de agricultores lo cual hace que la diversidad de la colección sea más amplia.

Sin embargo, a un nivel de similitud de 0,63 se agrupan todos los materiales trifoliados, los cuales corresponden a *Poncirus* y sus híbridos. La influencia de *Poncirus trifoliata* es fuerte en los citranges evidenciado por la naturaleza trifoliada de sus hojas, así como la acidez y amargura de sus frutos y la resistencia al frío [23]. Este nivel de similitud es consistente con el estudio de (5) donde utilizaron marcadores SRAP con el fin de detectar polimorfismo entre 86 materiales de *Citrus* y especies cercanas en la subfamilia Aurantioidea el grupo de *Poncirus* y sus híbridos se agrupó a un nivel de similitud de 0,55. "Pomelo Africa" (*Citrus paradisi*) fue la única accesión del género *Citrus* que se agrupó con los materiales trifoliados. Lo anterior puede ser explicado debido a que "Pomelo Africa" puede estar compartiendo características en común con los materiales de este grupo, el cual posee híbridos de *Citrus paradisi* con *Poncirus trifoliata*.

Dentro del grupo de los materiales trifoliados, a un nivel de similitud del 0,66 se diferencia un subgrupo el cual lo conforman tres materiales *Poncirus trifoliata* ("English large", "Kryder 15-3" y "Pomeroy"). Otro subgrupo al mismo nivel de similitud reúne materiales *Poncirus trifoliata* e híbridos. Dentro de este subgrupo están dos citremones 1449 (*Poncirus trifoliata* x *Citrus limon*), los cuales inicialmente se pensaba que se trataba del mismo material en el banco de germoplasma, pero la técnica RAM's permitió la diferenciación de

**Figura 3.** Dendrograma de la estructura genética.

Dendrograma de la estructura genética de 39 introducciones de patrones de cítricos del banco de germoplasma de Corpoica basado en el Coeficiente de Nei-Li, y calculado de los datos de 6 cebadores microsatélites RAMs.

estos materiales. Estos citremones tienen el nivel de similitud más alto del análisis (0,92).

Los citrangeros “Troyer” y “Carrizo” (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), importantes patrones en la citricultura, se agrupan a un nivel de similitud de 0,83, lo que demuestra que estos materiales son cercanos como lo revela la técnica RAMs en este estudio. Con marcadores SRAP, se encontró que “Troyer” y “Carrizo” fueron casi idénticos (0,99) [5]. “Troyer” y “Carrizo” son en realidad un clon único el cual se originó como una plántula zigótica (CPB 4-5019) proveniente del cruce de naranja “Washington navel” *Citrus sinensis* y “naranja trifoliada” *Poncirus trifoliata*, en lugar de las dos plantas hermanas como se había supuesto [24]. Aunque morfológicamente son casi idénticos, el citrange “Carrizo” tiene ventajas agronómicas que han desplazado el uso del citrange “Troyer” [25].

Las citrandarinas “Sunky x Jacobson” y “Sunky x English” (*Citrus sunky* x *Poncirus trifoliata*), se agruparon a un nivel de similitud de 0,84. Este resultado se esperaba, considerando que ambas introducciones tienen un parental en común (*Citrus sunky*) y dos líneas hermanas: Jacobson e English (*Poncirus trifoliata*). Fuera de este gran grupo de materiales trifoliados (*Poncirus* y sus híbridos), los demás materiales pertenecientes a *Citrus* forman agrupaciones interesantes.

Las limas y limones no forman una agrupación clara, no obstante hay algunas tendencias. La lima “Rangpur” y el limón “Milan” tienden a agruparse a un nivel de similitud de 0,62 con el grupo que reúne mandarina, naranja, pomelo, e híbridos, descrito anteriormente. La lima “Rangpur”, es bastante diferente morfológicamente y genotípicamente de las limas y fue considerada como *Citrus reticulata* [21]. El origen y los paren-



tales de los rangpurs son inciertos, pero generalmente han sido clasificados con las mandarinas en estudios previos [5]. “Rangpur” es un híbrido de citrón y mandarina (*Citrus medica* x *Citrus reticulata*) [26].

Naranja agrio *Citrus aurantium*, fue distante de los demás materiales (0,57), lo cual puede explicarse dado que es una de las especies más primitivas de los cítricos reportados en la historia después del cidro (*Citrus medica*). Su proceso de evolución y domesticación no ha estado tan marcado como el naranja dulce y la naranja trifoliada [7].

*Clausena lansium*, única especie representativa del género *Clausena*, fue la especie más distante del resto de las especies en el dendrograma, con un nivel de similitud de 0,54. Esto puede ser debido a que *Clausena lansium* pertenece a la tribu Clauseneae, una de las dos tribus de la subfamilia Aurantioideae, la cual también incluye la tribu Citreae. La tribu Citreae incluye los géneros *Citrus* y *Poncirus* [2]. Con marcadores SRAP, separaron a un nivel de similitud de 0,32 a *Clausena lansium* de los géneros de la subtribu Citrineae, entre ellos, *Poncirus* y *Citrus* [5], y por lo tanto, los resultados obtenidos están de acuerdo a lo reportado anteriormente.

## CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares RAMs son útiles para la evaluación de la diversidad genética en *Citrus* y géneros relacionados, debido a que mostraron altos niveles de polimorfismo, además, pudieron diferenciar el género *Citrus* de sus parientes distantes. La Técnica RAMs fue eficiente en la discriminación de los tres géneros que componen a los patrones de cítricos del banco de germoplasma CORPOICA (*Citrus*, *Poncirus* y *Clausena*). La distancia genética entre *Citrus* y *Poncirus* fue menor en comparación con el género *Clausena*, debido a que se incluyen taxonómicamente en tribus diferentes.

Se esperaba que el grupo uno (*Poncirus* y sus híbridos) tuviese la mayor diversidad genética porque incluye materiales provenientes del cruce de dos géneros, sin embargo se encontró que *Citrus* tenía la mayor diversidad genética debido a que este grupo se compone de mandarinas, naranjas, limones, pomelos, híbridos, y otros materiales que no están incluidos dentro de los grupos anteriores. El análisis de similitud permite apreciar que los materiales del banco de germoplasma se encuentran dispersos

en el dendrograma, no obstante las introducciones trifoliadas se agrupan y algunas de *Citrus* tienden a formar agrupaciones. La técnica RAM's tiene potencial en futuros estudios de distancia genética entre los patrones de cítricos estudiados y las principales copas usadas comercialmente, los cuales permitirán entender varios fenómenos como la compatibilidad y afinidad copa-patrón, y el impacto que esto tiene en el desarrollo del árbol.

## REFERENCIAS

- [1] ORDUZ, R.J.O y MATEUS, C.D.M. Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia [online]. 2012. Disponible: <http://hdl.handle.net/10567/561> [citado 4 de Agosto de 2015].
- [2] HYNIEWTA, M., KUMAR, M.S. and RAMA, R.S. 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, 2014, p. 237–251.
- [3] GANOPOULOS, I., XANTHOPOULOU, A., MASTROGIANNI, A., DROUZAS, A., KALIVAS, A., BLETSOS, F., KROMMYDAS, K., RALLI, P., TSAFTARIS, A. and MADESIS, P. 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, 2015, p. 64-71.
- [4] POONDLA, A.V., BANDIKARI, A.R., SUBRAMANYAM, B.R.A. and SARATHI, O. V.R. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 2015, p. 70–76.
- [5] UZUN, A., YESILOGLU, T., AKA-KACAR, Y., TUZCU, O. and GULSEN, O. Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). *Scientia Horticulturae*, 121, 2009, p. 306-312.
- [6] HYNIEWTA, M., KUMAR, M.S. and RAMA, R.S. 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, 2014, p. 237–251.

- [7] LEÓN, J. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. San José (Costa Rica): IICA/Catie, 1987, p. 84.
- [8] LI, Y., CHEN, W., MA, D. and WU, Y. cDNA-AFLP Analysis revealed genes potentially implicated in *Catharanthus roseus* flowers during wheat blue dwarf phytoplasma infection. *Physiological and molecular plant pathology*, 84, 2013, p. 1-9.
- [9] MORILLO, A.C., MORILLO, Y., CHAGÜEZA, Y., CAICEDO, A. y MUÑOZ, J.E. 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), 2009, p. 234-244.
- [10] MORILLO, Y., MORILLO, A.C., CHAGÜEZA, Y., CAICEDO, A. y MUÑOZ, J.E. Caracterización mediante microsatélites de 34 introducciones de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck del Banco de Germoplasma de Corpoica-Palmira. *Acta Agronómica*, 59(1), 2010, p. 9-19.
- [11] MUÑOZ, J.E., MORILLO, A.C. y MORILLO, Y. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta agronómica*, 57(4), 2008, p. 219-226.
- [12] DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. and HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: Versión II. *Plant. Molecular Biology Reports*, 14, 1983, p. 19-21.
- [13] MAURYE, P., BASU, A. and GUPTA, A. Simple and cost effective apparatus for silver staining of polyacrylamide gels with sequential reagents addition and real time monitoring. *Bioscience and Bioengineering*, 117, 2014, p. 769-774.
- [14] BERG, E. and HAMRICK, J. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian of Forest Research*, 27, 1997, p. 415-424.
- [15] NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 1978, p. 583-590.
- [16] NEI, M. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, 1973, p. 3321-3326.
- [17] MEDINA, F.H.P., BORDIGNON, R. and SIQUEIRA, W.J. Segregações gaméticas de locos isoenzimicos em porta-enxertos de citros e suas contribuições alélicas na formação de híbridos. *Bragantia*, 62, 2013, p. 357-367.
- [18] YAHMEDA, J.B.B., NOVILLO, B.P., GARCIA, B.A., TALONB, M. and MORILLON, R. Salt tolerance traits revealed in mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) are mainly related to root-to-shoot Cl<sup>-</sup> translocation limitation and leaf detoxification processes. *Scientia Horticulturae*, 191, 2015, p. 90-100.
- [19] SANGA, W., HUANGB, Z.R., YANGA, L.T., GUOA, P. and CHENA L.S. An investigation of boron-toxicity in leaves of two citrus species differing in boron-tolerance using comparative proteomics. *Proteomics*, 123, 2015, p. 128-146.
- [20] WANG, L.Q., YANG, L.T., GUO, P., CHEN, E.J. and CHEN, L.S. Leaf cDNA-AFLP analysis reveals novel mechanisms for boron-induced alleviation of aluminum-toxicity in *Citrus grandis* seedlings. *Ecotoxicology and environmental safety*, 120, 2015, p. 349-359.
- [21] MAHJBI, A., BARAKET, G., OUESLATI, A. and SALHI-HANNACHI, A. Start Codon Targeted (SCoT) markers provide new insights into the genetic diversity analysis and characterization of Tunisian Citrus species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61, 2015, p. 390-398.
- [22] WANG, J., HAO, H., LIU, R., MA, Q., CHENG, Y. and DENG, X. Comparative analysis of surface wax in mature fruits between Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis*) from the perspective of crystal morphology, chemical composition and key gene expression. *Food Chemistry*, 153, 2014, p. 177-185.
- [23] BASTOS, P.M.D., RAYNAUD, M., VENANCIO, A.L., BASSANEZI, R.B. and REDON, R. Identification of citrus varieties using laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS). *Computers and Electronics in Agriculture*, 95, 2013, p. 11-18.
- [24] HALL, D.G., JUSTIN, G. and STEPHEN, L.L. Further investigations on colonization of *Poncirus trifoliata* by the Asian citrus psyllid. *Crop Protection*, 72, 2015, p. 112-118.
- [25] DISTEFANO, G., CIRILLI, M., THOMAS, B. and MULEO, R. Ectopic expression of Arabidopsis phytochrome B in Troyer citrange affects photosynthesis and plant morphology. *Scientia Horticulturae*, 159, 2013, p. 1-7.
- [26] ALBRECHT, U., GREG, M.C. and BOWMAN, K.D. Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). *Scientia Horticulturae*, 138, 2012, p. 210-220.
- [27] RODRIGUEZ, M.J., ALQUÉZAR, B., ALÓS, E. and ZACARÍAS, L. Biochemical bases and molecular regulation of pigmentation in the peel of Citrus fruit. *Scientia Horticulturae*, 163, 2013, p. 46-62.