

## Identificación de híbridos de *Citrus aurantifolia*×*Citrus limon* utilizando marcadores de secuencias simples repetidas (SSR)\*

### Identifying hybrids of *Citrus aurantifolia*×*Citrus limon* using simple sequence repeats (SSR) markers

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán<sup>1§</sup>, Luis Felipe Guzmán Rodríguez<sup>2</sup>, Karina de la Paz García Mariscal<sup>1</sup>, Paola Andrea Palmeros Suárez<sup>3</sup> y Mario Orozco Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INIFAP-Campo Experimental Tecomán. Carretera Colima-Manzanillo km 35, Tecomán, Colima, México. (garcia.karina@inifap.gob.mx; orozco.mario@inifap.gob.mx).

<sup>2</sup>INIFAP-Centro Nacional de Recursos Genéticos. (guzman.luis@inifap.gob.mx). <sup>3</sup>Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. (pandreapalmeros@gmail.com). §Autor para correspondencia: bermudez.manuel@inifap.gob.mx.

#### Resumen

La apomixis es un tipo de reproducción asexual donde la formación de semillas porta embriones genéticamente idénticos al progenitor, constituyendo un obstáculo en programas de mejoramiento genético de muchas especies vegetales, incluyendo cítricos. La identificación de plantas híbridas se realiza mediante caracteres morfológicos, ensayos isoenzimáticos y marcadores moleculares. Estos últimos se han utilizado con mayor frecuencia debido a su precisión, destacando el uso del DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD, “Random Amplified Polymorphic DNA”) y Secuencias Simples Repetidas (SSR, Simple Sequence Repeats). En limón mexicano (*C. aurantifolia*) únicamente se han utilizado marcadores RAPD para la identificación de híbridos, por lo que no existen reportes que hagan uso de marcadores SSR para este fin. El objetivo del presente trabajo fue identificar híbridos derivados de la polinización controlada entre *C. aurantifolia* var. “Colimex”×*C. limon* var. “Rosenberg” y su recíproca utilizando marcadores moleculares SSR. Durante el año 2014- 2016 se colectaron hojas de árboles de limón de aproximadamente 12 meses de edad, que se encuentran establecidos en el Campo

#### Abstract

Apomixis is a type of asexual reproduction where the seeds formation carries genetically identical embryos to the parent, constituting an obstacle in breeding programs for many plant species, including citrus. The identification of hybrid plants is carried out by morphological characters, isoenzymatic assays and molecular markers. The latter have been used more frequently because of their accuracy, standing out the use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and Simple Sequence Repeats (SSR). In Mexican lime (*C. aurantifolia*) RAPD markers have only been used for hybrid identification, so there are no reports that use SSR markers for this purpose. The aim of this paper was to identify hybrids derived from controlled pollination between *C. aurantifolia* var. “Colimex”×*C. limon* var. “Rosenberg” and its reciprocal using SSR molecular markers. During the 2014-2016 years, leaves of lime trees of approximately 12 months of age were collected, which are established in the Campo Experimental Tecomán of the INIFAP. A total of eight SSR molecular markers were evaluated on the progenitors used in this study and the TAA45 and cAGG09 oligonucleotides were selected for the hybrids identification in the two progeny

\* Recibido: marzo de 2017  
Aceptado: junio de 2017

Experimental Tecomán del INIFAP. Se evaluaron en total ocho marcadores moleculares SSR sobre los progenitores utilizados en este estudio y fueron seleccionados los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 para la identificación de híbridos en las dos poblaciones progenie. De un total de 40 y 43 individuos F1 procedentes de la cruce bidireccional entre “Colimex”×“Rosenberg”, se lograron identificar 17 y 35 plantas híbridas, respectivamente. Los resultados indican que los marcadores SSR son eficientes y confiables para la identificación de híbridos de limón mexicano.

**Palabras clave:** apomixis, cítricos, marcadores moleculares, microsatélites.

## Introducción

Los cítricos se desarrollan en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En México, la agroindustria cítrica representa una de las más importantes, generando una derrama económica superior a los 375 millones de dólares (SIAP, 2016). El mejoramiento genético de este cultivo constituye una actividad rutinaria que se lleva a cabo en varios países con el objetivo de mejorar la calidad de la fruta o conseguir tolerancia a estrés biótico y abiótico (Tozlu *et al.*, 1999; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2011; Omura y Shimada, 2016).

Las especies del género *Citrus* presentan poliembrionia y apomixis, que generan alteraciones en el proceso de reproducción sexual entre organismos vegetales, en el que múltiples embriones se encuentran en una semilla o donde varios embriones derivados del progenitor receptor del polen se origina del tejido nucelar que rodea al embrión cigótico (Koltunow *et al.*, 1996; Kepiro y Roose 2007). La mayoría de los cítricos comerciales de todo el mundo se propagan como árboles injertados con la variedad de interés en un portainjerto (Wutscher y Hill, 1995; Khan y Kender, 2007).

La mayor parte de estos portainjertos son apomícticos, por lo que si se requiere mantener la homogeneidad genética puede resultar ventajosa esta condición como un proceso de multiplicación clonal. De esta forma, se pueden producir plantas uniformes a partir de semillas a bajo costo. Por otra parte, cuando es deseable generar variabilidad mediante recombinación genética para la obtención de híbridos,

populations. From a total of 40 and 43 F1 individuals from the bi-directional cross between “Colimex”×“Rosenberg”, 17 and 35 hybrid plants were identified, respectively. The results indicate that SSR markers are efficient and reliable for the identification of Mexican lime hybrids.

**Keywords:** apomixis, citrus, microsatellites, molecular markers.

## Introduction

Citrus fruits are grown in the tropical and subtropical regions of the world. In México, citrus agro-industry represents one of the most important, generating an economic outflow of more than 375 million dollars (SIAP, 2016). Genetic improvement of this crop is a routine activity carried out in several countries with the aim of improving the quality of the fruit or to achieve tolerance to biotic and/or abiotic stress (Tozlu *et al.*, 1999; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2011; Omura and Shimada, 2016).

Species of the genus *Citrus* present polyembryony and apomixis, generating disturbances in the process of sexual reproduction between vegetable organisms, in which multiple embryos are found within a seed or where several embryos derived from the pollen receptor of the parent are originated from nuclear tissue surrounding the zygotic embryo (Koltunow *et al.*, 1996; Kepiro and Roose 2007). Most commercial citrus worldwide propagate as grafted trees with the variety of interest in a rootstock (Wutscher and Hill, 1995; Khan and Kender, 2007).

Most of these rootstocks are apomictic, so if it is required to maintain genetic homogeneity this condition may be advantageous as a process of clonal multiplication. In this way, uniform plants can be produced from seeds at low cost. On the other hand, when it is desirable to generate variability by genetic recombination for obtaining hybrids, with resistance to diseases for example, then apomixis represents an obstacle, since the plants are genetically identical to the pollen receptor parent (Khan and Kender, 2007). For the identification of zygotic plants in citrus, phenotypic markers have been used, which are based mainly on leaf morphology.

con resistencia a enfermedades por ejemplo, entonces la apomixis representa un obstáculo, ya que las plantas resultan genéticamente idénticas al progenitor receptor del polen (Khan y Kender, 2007). Para la identificación de plantas cigóticas en cítricos, se han utilizado marcadores fenotípicos, los cuales se basan principalmente en la morfología de las hojas.

Por otra parte, los ensayos isoenzimáticos y el empleo de la citometría de flujo también se han utilizado como herramientas para realizar este tipo de análisis (Anderson *et al.*, 1991; Ruiz *et al.*, 2000; Vilorio *et al.*, 2005); sin embargo, estas técnicas pueden presentar algunas limitaciones. En la actualidad, el uso de la biología molecular ha permitido ampliar las herramientas utilizadas para la identificación genética de especies vegetales mediante el uso de marcadores moleculares, entre los cuales destacan los ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) y SSR (Simple Sequence Repeat) por sus siglas en inglés (Bastianel *et al.*, 1998; Golein *et al.*, 2011; Yildiz *et al.*, 2013; Mondal y Saha, 2014; Mondal *et al.*, 2015).

En Turquía se ha reportado el uso eficiente de los oligonucleótidos AG14 y TAA03 de marcadores SSR para identificar y eliminar individuos nucelares en poblaciones de híbridos, resultado de cruzamientos entre variedades de mandarinas (*C. reticulata*), naranjas (*C. sinensis*) y toronjas (*C. paradisi*) (Yildiz *et al.*, 2013). Recientemente en la India se han empleado cuatro oligonucleótidos SSR con repeticiones AG: CCSM13, CCSM17, CCSM18 y CCSM147 para identificar plantas cigóticas y nucelares en una población de *C. reticulata* (Mondal *et al.*, 2015).

En México, las especies de *C. macrophylla* y *C. volkameriana* son comúnmente utilizadas como portainjertos para la propagación y establecimiento de árboles de limón mexicano. En el año 2004, Andrade-Rodríguez *et al.* (2004), realizaron un estudio para determinar el origen cigótico o nucelar en *C. volkameriana* utilizando marcadores RAPD, obteniéndose resultados satisfactorios. De la misma manera, en el caso del limón mexicano (*C. aurantifolia*), se han utilizado exitosamente marcadores RAPD, destacando el uso del decámero OPH15 (Mondal y Saha, 2014); sin que existan reportes en los que se haya empleado otro tipo de marcadores moleculares, como los SSR.

En el programa de mejoramiento genético del INIFAP, se realizan rutinariamente cruces entre limones mexicanos (*C. aurantifolia*) y limones italianos (*C. limon*), ya que se

Furthermore, isozyme tests and the use of flow cytometry have also been used as tools to perform this type of analysis (Anderson *et al.*, 1991; Ruíz *et al.*, 2000; Vilorio *et al.*, 2005); however, these techniques may present some limitations. Nowadays, the use of molecular biology has allowed to expand the tools used for the genetic identification of plant species through the use of molecular markers, among which are the ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) and SSR (Simple Sequence Repeat) (Bastianel *et al.*, 1998; Golein *et al.*, 2011; Yildiz *et al.*, 2013; Mondal and Saha, 2014; Mondal *et al.*, 2015).

Turkey has been reported in the efficient use of AG14 and TAA03 oligonucleotide of SSR markers to identify and eliminate nucellar individuals in hybrid populations resulting from crosses between tangerin varieties (*C. reticulata*), oranges (*Citrus sinensis*), grapefruit (*C. paradisi*) (Yildiz *et al.*, 2013). Recently in India four SSR oligonucleotides with repeats have been used AG: CCSM13, CCSM17, CCSM18 and CCSM147 to identify zygotic and nucellar plants in a population of *C. reticulata* (Mondal *et al.*, 2015).

In Mexico, the species of *C. macrophylla* and *C. volkameriana* are commonly used as rootstocks for propagation and establishment of Mexican lime trees. In 2004, Andrade-Rodríguez *et al.* (2004) conducted a study to determine the zygotic or nucellar origin in *C. volkameriana* using RAPD markers, with satisfactory results. Similarly, in the case of Mexican lime (*C. aurantifolia*), RAPD markers have been successfully used, especially the decamer OPH15 (Mondal and Saha, 2014); without there being reports in which other type of molecular markers, such as SSRs, have been used.

In the INIFAP breeding program, crosses between Mexican limes (*C. aurantifolia*) and Italian limes (*C. limon*), are routinely performed since it has been observed that the progeny exhibits some tolerance to HLB bacterial disease (Huanglongbing or yellow dragon disease), which causes one of the main phytosanitary problems affecting productivity in the Pacific region of México. Although there are many reports to identify zygotic citrus plants using molecular markers, in México no studies using SSR markers have been reported to identify hybrid plants of *C. aurantifolia*. In order to establish changes in the hybrids derived from controlled pollination between *C. aurantifolia* var. "Colimex"×*C. limon* var. "Rosenberg" and its reciprocal, the present research was carried out using SSR markers.

ha observado que la progenie presenta cierta tolerancia a la enfermedad bacteriana del HLB (Huanglongbing o enfermedad del dragón amarillo), la cual ocasiona uno de los principales problemas fitosanitarios que afectan la productividad en la región del Pacífico de México. A pesar de que existen muchos reportes para la identificación de plantas cigóticas en cítricos utilizando marcadores moleculares, en México no se han reportado estudios utilizando marcadores SSR para identificar plantas híbridas de *C. aurantifolia*. Con el objetivo de establecer las variaciones en los híbridos derivados de la polinización controlada entre *C. aurantifolia* var. "Colimex" × *C. limon* var. "Rosenberg" y su recíproca, se realizó el presente trabajo con el uso de marcadores SSR.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se colectaron hojas con apariencia sana de árboles de limón de dos poblaciones progenie para identificar individuos de origen cigótico y confirmar la condición híbrida de las plantas. La cruce *C. aurantifolia* (♀) × *C. limon* (♂) consistió de 40 individuos, mientras que la cruce *C. limon* (♀) × *C. aurantifolia* (♂) la constituyeron 43 individuos. El muestreo se realizó en árboles de 12 meses de edad, los cuales se encuentran establecidos en el campo dentro del programa de mejoramiento genético de limón mexicano del INIFAP Campo Experimental Tecomán, Colima, México, ubicado a 60 msnm.

### Extracción de DNA genómico

Se utilizó el método descrito por Bermúdez-Guzmán *et al.* (2016), con algunas modificaciones. Todas las centrifugaciones se llevaron a 4 °C y 13 500 rpm. Las hojas de las plantas se lavaron con agua y jabón corrientes. Enseguida se pesaron aproximadamente 100-200 mg de tejido foliar y se pulverizaron en un mortero conteniendo nitrógeno líquido y homogeneizados con 1 mL de solución amortiguadora CTAB [100 mM de Tris-HCl pH 8, 50 mM de EDTA pH 8, 1.4 M de NaCl, 3% (p/v) de CTAB y 1% (p/v) de PVP]. Posteriormente se adicionó 10 µL de 2-β-mercaptoetanol concentrado y 5 µL de proteínaasa K (20 mg mL<sup>-1</sup>).

Las muestras se incubaron durante 45 min a 65 °C en baño maría, se mezclaron por inversión cada 5-10 min, después se centrifugaron durante 3 min. La fase acuosa se recuperó en un

## Materials and methods

### Vegetal material

Healthy-looking leaves of lime trees from two progeny populations were collected to identify individuals of zygotic origin and to confirm the hybrid condition of the plants. *C. aurantifolia* (♀) × *C. limon* (♂) cross consisted of 40 individuals, while the *C. limon* (♀) × *C. aurantifolia* (♂) cross was constituted by 43 individuals. Sampling was performed on 12 months old trees, which are established in the field within the Mexican lime breeding program of the INIFAP Campo Experimental Tecomán, Colima, México, located at 60 masl.

### Extraction of genomic DNA

The method described by Bermúdez-Guzmán *et al.* (2016) was used, with some modifications. All centrifugations were carried out at 4 °C and 13 500 rpm. The leaves of the sampled plants were washed with running water and soap. Approximately 100-200 mg of foliar tissue were then weighed and pulverized in a mortar containing liquid nitrogen and homogenized with 1 mL of CTAB buffer solution [100 mM of Tris-HCl pH 8, 50 mM of EDTA pH 8, 1.4 M of NaCl, 3% (p/v) of CTAB and 1% (p/v) of PVP]. Subsequently, 10 µL of concentrated 2-β-mercaptoethanol and 5 µL of K proteinase (20 mg mL<sup>-1</sup>) were added.

Samples were incubated for 45 min at 65 °C in water bath, then mixed by inversion every 5-10 min, then centrifuged for 3 min. The aqueous phase was recovered in a new tube and 5 µL of 10 mg mL<sup>-1</sup> RNase A (Sigma Aldrich) was added at 37 °C for 10 min. Subsequently a volume of the phenol:chloroform:isoamyl alcohol solution (25:24:1) was added, and vigorously mixed using a vortex and then centrifuged for 10 min.

The recovered supernatant was placed in 1.5 mL tubes and the DNA precipitated with 0.6 volumes of cold isopropanol and 0.1 volumes of 3 M sodium acetate pH 5.2 at -20 °C for 30 min. The mixture was centrifuged for 10 min, the supernatant was decanted and the DNA was washed with 500 µL of 70% ethanol; the tubes were centrifuged for 2 min the aqueous phase was decanted and the tubes were inverted on absorbent paper to remove excess ethanol. The DNAs were dried at room temperature, resuspended in 80 µL of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH, 8) and finally stored at -20 °C.

nuevo tubo y se agregó 5  $\mu\text{L}$  de RNasa A 10  $\text{mg mL}^{-1}$  (Sigma Aldrich) a 37 °C durante 10 min. Posteriormente se adicionó un volumen de la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló vigorosamente usando un vórtex y se centrifugaron durante 10 min.

El sobrenadante recuperado se colocó en tubos de 1.5 mL y el DNA se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol frío y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 a -20 °C durante 30 min. La mezcla se centrifugó durante 10 min, el sobrenadante se decantó y el DNA se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%; los tubos se centrifugaron durante 2 min la fase acuosa se decantó y se invirtieron los tubos sobre papel absorbente para retirar el exceso de etanol. Los DNA se secaron a temperatura ambiente, resuspendidos en 80  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH,8) y finalmente, almacenados a -20 °C.

### Cuantificación, pureza e integridad del DNA genómico

La concentración del DNA ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) se cuantificó con un espectrofotómetro (NanoDrop Thermo Scientific). La pureza se midió considerando las relaciones de  $A_{260:280}$  y  $A_{260:230}$ . La integridad de los ácidos nucleicos se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (Sigma Aldrich) al 1% cargando 5  $\mu\text{L}$  de DNA genómico de cada muestra. El gel se tiñó con Bromuro de etidio 10  $\text{mg mL}^{-1}$  (Sigma Aldrich) y visualizó con luz ultravioleta en un fotodocumentador (UVP).

### Análisis de marcadores SSR

Los progenitores *C. aurantifolia* y *C. limon* se analizaron con ocho juegos de oligonucleótidos descritos por Kijas *et al.* (1997) (Cuadro 1) para identificar aquellos que generan polimorfismos diferenciales en ambas especies. Los oligonucleótidos seleccionados se utilizaron para analizar las dos poblaciones progenie de *C. aurantifolia*×*C. limon* y su recíproca.

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen de 15  $\mu\text{L}$  conteniendo 7.5  $\mu\text{L}$  de REDTaq ReadyMix™ (Sigma Aldrich), 5  $\mu\text{L}$  de DNA genómico (20  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido y 0.5  $\mu\text{L}$  agua grado molecular. Las condiciones de amplificación para la PCR se llevaron a cabo en un termociclador MultiGene Labnet y fueron las descritas por Kijas *et al.* (1997) con algunas modificaciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min. La extensión final fue de 72 °C por 10 min.

### Quantification, purity and integrity of genomic DNA

The DNA concentration ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) was quantified using a spectrophotometer (NanoDrop Thermo Scientific). The purity was measured considering the relations of  $A_{260:280}$  and  $A_{260:230}$ . Integrity of nucleic acids was verified by 1% agarose gel electrophoresis (Sigma Aldrich) adding 5  $\mu\text{L}$  of genomic DNA from each sample. The gel was stained with 10  $\text{mg mL}^{-1}$  ethidium bromide (Sigma Aldrich) and visualized with ultraviolet light in a photodocumentator (UVP).

### Analysis of SSR markers

Parents *C. aurantifolia* and *C. limon* were analyzed with eight sets of oligonucleotides described by Kijas *et al.* (1997) (Table 1) in order to identify those that generate differential polymorphisms in both species. The selected oligonucleotides were used to analyze the two progeny populations of *C. aurantifolia*×*C. Lemon* and its reciprocal.

Amplification reactions by PCR were performed in a volume of 15  $\mu\text{L}$  containing 7.5  $\mu\text{L}$  of RedTaq ReadyMix™ (Sigma Aldrich), 5  $\mu\text{L}$  of genomic DNA (20  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  of each oligonucleotide and 0.5  $\mu\text{L}$  molecular grade water. Amplification conditions for PCR were performed in a MultiGene Labnet thermocycler and were described by Kijas *et al.* (1997) with some modifications: initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 min. The final extension was 72 °C for 10 min.

Vertical polyacrylamide gel electrophoresis was used under non-denaturing conditions using the “PerfectBlue” double gel system (PeQlab). 1  $\mu\text{L}$  of molecular weight marker of 25 and 50 base pairs (bp) (Bioline) and 3  $\mu\text{L}$  of the PCR product of each sample was loaded. The gels were prepared in a 30 mL volume containing 6% acrylamide/bis-acrylamide (29:1), TBE 1 X buffer, 140  $\mu\text{L}$  of 25% APS, 35  $\mu\text{L}$  of TEMED and sterile distilled water, then run at 200 V for 50 min. Finally stained with silver solution according to Sanguinetti *et al.* (1994) with some modifications: 10 min in fixing solution (10% ethanol and 0.5% acetic acid), 1 rinse with distilled water, 10 min in staining solution (0.2%  $\text{AgNO}_3$ ), one rinse with distilled water, 10 to 15 min in developer solution (3% NaOH and 0.5% formaldehyde) and a final rinse with distilled water. The gels were visualized in a transilluminator with white light for analysis.

**Cuadro 1. Oligonucleótidos SSR utilizados para detectar polimorfismos en *C. aurantifolia* y *C. limon*.**  
**Table 1. SSR oligonucleotides used to detect polymorphisms in *C. C. aurantifolia* and *C. limon*.**

No	Nombre del oligonucleótido	Secuencias (5'-3')	Total de amplicones	Bandas polimórficas
1	TAA3	F-AGAGAAGAAACATTTGCGGAGC R-GAGATGGGACTTGGTTCATCACG	4	0
2	CAC33	F-GGTGATGCTGCTACTGATGC R-CAATTGTGAATTTGTGATTCCG	4	0
3	cAGG09	F-AATGCTGAAGATAATCCGCG R-TGCCTTGCTCTCCACTCC	6	4
4	TAA45	F-GCACCTTTTATACCTGACTCGG R-TTCAGCATTGAGTTGGTTACG	9	5
5	TAA41	F-AGGTCTACATTGGCATTGTC R-ACATGCAGTGCTATAATGAATG	-	-
6	TAA15	F-GAAAGGGTTACTTGACCAGGC R-CTTCCCAGCTGCACAAGC	4	0
7	TAA52	F-GATCTTGACTGAACTTAAAG R-ATGTATTGTGTTGATAACG	0	0
8	TAA01	F-GACAACATCAACAACAGCAAGAGC R-AAGAAGAAGAGCCCCATTAGC	6	2

Se utilizó la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturizantes utilizando el sistema de dobles geles "PerfectBlue" (PeQlab). Se cargó 1 µL de marcador de peso molecular de 25 y 50 pares de bases (pb) (Bioline) y 3 µL del producto de PCR de cada muestra. Los geles se prepararon en un volumen de 30 mL conteniendo acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 6%, amortiguador TBE 1 X, 140 µL de APS al 25%, 35 µL de TEMED y agua destilada estéril, después se corrieron a 200 V durante 50 min. Finalmente se tiñeron con solución de plata de acuerdo Sanguinetti *et al.*, (1994) con algunas modificaciones: 10 min en solución fijadora (10% de etanol y 0.5% de ácido acético), 1 enjuague con agua destilada, 10 min en solución de tinción (0.2% de AgNO<sub>3</sub>), 1 enjuague con agua destilada, 10-15 min en solución reveladora (3% de NaOH y 0.5% de formaldehído) y un último enjuague con agua destilada. Los geles se visualizaron en un transiluminador con luz blanca para su análisis.

## Resultados y discusión

Se evaluaron ocho oligonucleótidos para detectar bandas diferenciales en los progenitores *C. aurantifolia* y *C. limon* utilizados en la investigación (Cuadro 1). Los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 se seleccionaron debido a que permitieron la

## Results and discussion

Eight oligonucleotides were evaluated for differential bands in *C. aurantifolia* and *C. limon* parents used in this paper (Table 1). The TAA45 and cAGG09 oligonucleotides were selected because they allowed the amplification of polymorphic bands of easy interpretation; four of the oligonucleotides amplified mostly non-informative and low resolution monomorphic bands and therefore were not used for the detection of hybrids in the populations analyzed. TAA41 initiator generated very diffuse bands that were not recorded. On the other hand, the TAA52 primer did not allow the amplification of some segment of DNA in the analyzed samples (Figure 1).

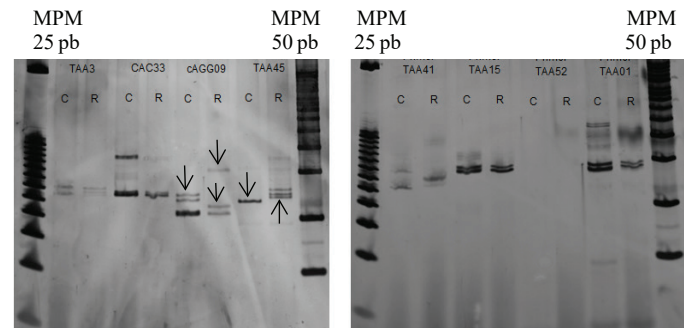
The oligonucleotides of the TAA series described by Kijas *et al.* (1997) have been widely used in the detection of hybrids between crossings of several citrus species such as grapefruit (*C. paradisi*), trifoliolate orange (*C. trifoliata*), sweet orange (*Citrus sinensis*) and tangerine (*C. reticulata*) (Ruiz *et al.*, 2000; Ahmad *et al.*, 2012; Yildiz *et al.*, 2013; Mondal *et al.*, 2015). However, there are no reports of its use in Mexican lime (*C. aurantifolia*) and Italian lemon (*C. limon*), so these results are the first report on these species to determine its potential as hybrid detectors for genetic improvement programs.

amplificación de bandas polimórficas de fácil interpretación; cuatro de los oligonucleótidos amplificaron mayormente bandas monomórficas no informativas y de baja resolución, por lo que no se utilizaron para la detección de híbridos en las poblaciones analizadas. El iniciador TAA41 generó bandas muy difusas que no se registraron. Por otra parte, el cebador TAA52 no permitió la amplificación de algún segmento de DNA en las muestras analizadas (Figura 1).

Los oligonucleótidos de la serie TAA descritos por Kijas *et al.* (1997) se han utilizado ampliamente en la detección de híbridos entre cruzamientos de varias especies de cítricos como toronja (*C. paradisi*), naranjo trifoliado (*C. trifoliata*), naranjo dulce (*C. sinensis*) y mandarina (*C. reticulata*) (Ruiz *et al.*, 2000; Ahmad *et al.*, 2012; Yildiz *et al.*, 2013; Mondal *et al.*, 2015). Sin embargo, no hay reportes de su uso en limón mexicano (*C. aurantifolia*) y limón italiano (*C. limon*), por lo que estos resultados constituyen el primer reporte en estas especies para determinar su potencial como detectores de híbridos en los programas de mejoramiento genético.

En las poblaciones de 40 y 43 individuos procedentes de las cruza de *C. aurantifolia* var. “Colimex”×*C. limon* var. “Rosenberg” y su recíproca, respectivamente, se lograron detectar un total de 52 híbridos con los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 (Cuadro 2). El marcador TAA45 amplificó dos alelos polimórficos, uno presente en “Colimex” y ausente en “Rosenberg” de aproximadamente 100 pb y otro presente en “Rosenberg” y ausente en “Colimex” de 110 pb. Este último fragmento en algunos geles se visualizó como una única banda; sin embargo, se trataba de tres bandas polimórficas con pesos moleculares muy similares, por lo que en ocasiones no alcanzaban a separarse. En la Figura 2a se observan los híbridos detectados con el marcador TAA45 (722, 724, 736, 742 y 828), el cual también amplificó otras bandas polimórficas que no se tomaron en cuenta para la identificación de híbridos debido a su baja resolución.

El iniciador cAGG09 amplificó cuatro bandas polimórficas en las poblaciones analizadas, con pesos moleculares aproximados de 90, 100, 110 y 170 pb. En ambas poblaciones, con este marcador, se amplificó una banda monomórfica de 80 pb no informativa. Los híbridos de “Colimex” se identificaron por los alelos de 90 y 170 pb (Figura 2b, carriles 722, 724, 736, 738 y 742), los cuales están presentes en “Rosenberg” (donador del polen) y ausentes en “Colimex” (receptor del polen).



**Figura 1. Evaluación de oligonucleótidos de marcadores SSR a partir de DNA de progenitores.** C= *Citrus aurantifolia* var. “Colimex”. R= *Citrus limon* var. “Rosenberg”. MPM= marcador de peso molecular 25 y 50 pb (Bioline).

**Figure 1. Oligonucleotides assessment of SSR markers from parents DNA.** C= *Citrus aurantifolia* var. “Colimex”. R= *Citrus limon* var. “Rosenberg”. MPM= 25 and 50 pb molecular weight marker (Bioline).

In populations of 40 and 43 individuals from the crosses of *C. aurantifolia* var. “Colimex”×*C. limon* var. “Rosenberg” and its reciprocal, respectively, a total of 52 hybrids were detected with the TAA45 and cAGG09 oligonucleotides (Table 2). The TAA45 marker amplified two polymorphic alleles, one present in “Colimex” and absent in “Rosenberg” of approximately 100 bp and another present in “Rosenberg” and absent in “Colimex” of 110 bp. The latter fragment on some gels was visualized as a single band; however, they were three polymorphic bands with very similar molecular weights, reason why sometimes they did not separate. Figure 2a shows the hybrids detected with the TAA45 marker (722, 724, 736, 742 and 828), which also amplified other polymorphic bands that were not taken into account for the identification of hybrids due to their low resolution.

The cAGG09 primer amplified four polymorphic bands in the analyzed populations, with approximate molecular weights of 90, 100, 110 and 170 bp. In both populations, with this marker, a non-informative 80 bp monomorphic band was amplified. The “Colimex” hybrids were identified by 90 and 170 bp alleles (Figure 2b, lanes 722, 724, 736, 738 and 742), which are present in “Rosenberg” (pollen donor) and absent in “Colimex” (pollen receptor).

Similarly, the “Rosenberg” hybrids were identified by 105 and 115 bp alleles, which are present in “Rosenberg” and absent in “Colimex”. In this sense, it is considered that a hybrid can be determined by identifying a single codominant locus for which the parents do not share alleles, i.e., crosses of the configuration aa×bb, ab×cc or ab×cd.

**Cuadro 2. Origen cigótico o nucelar de las poblaciones de *C. aurantifolia*×*C. limon* y su recíproca mediante análisis SSR utilizando dos pares de oligonucleótidos. C= cigótico; N= nucelar; I= indeterminado.**

**Table 2. Zygotic or nucellar origin of *C. aurantifolia*×*C. limon* populations and its reciprocal by SSR analysis using two pairs of oligonucleotides. C= zygotic; N= nucelar; I= indeterminate.**

<i>C. aurantifolia</i> (♀)× <i>C. limon</i> (♂)				<i>C. limon</i> (♀)× <i>C. aurantifolia</i> (♂)			
Número	Muestra	cAGG9	TAA45	Número	Muestra	cAGG9	TAA45
1	722	C	C	1	770	N	C
2	724	C	C	2	773	N	N
3	729	N	I*	3	783	C	C
4	731	N	N	4	787	C	C
5	736	C	C	5	789	C	C
6	737	N	N	6	795	N	N
7	738	C	N	7	797	C	C
8	742	C	C	8	799	C	C
9	820	N	N	9	810	C	C
10	827	N	N	10	811	C	C
11	828	C	C	11	812	C	C
12	829	N	C	12	813	N	C
13	743	N	N	13	814	C	N
14	745	C	N	14	815	C	C
15	747	N	N	15	816	C	C
16	748	C	I*	16	817	C	C
17	750	C	N	17	818	C	C
18	752	C	C	18	819	C	C
19	754	N	N	19	821	N	N
20	761	N	N	20	825	N	N
21	788	N	N	21	840	C	N
22	790	C	C	22	841	C	C
23	794	C	C	23	842	N	N
24	796	N	N	24	843	C	C
25	798	N	I*	25	844	C	N
26	800	N	N	26	845	C	C
27	804	N	N	27	846	N	N
28	766	N	N	28	847	C	C
29	767	C	C	29	848	C	C
30	771	N	N	30	849	C	C
31	775	C	N	31	850	C	C
32	776	N	N	32	851	C	C
33	778	N	N	33	852	C	C
34	780	N	N	34	723	C	C
35	781	C	C	35	730	C	N
36	784	C	C	36	734	C	C
37	831	N	N	37	739	C	N
38	833	N	N	38	744	C	C
39	838	N	N	39	746	C	C
40	839	C	C	40	749	C	C
-	-	-	-	41	751	C	C
-	-	-	-	42	755	C	C
-	-	-	-	43	760	C	C
Número de plantas cigóticas		17 (42.5%)	13 (32.5%)	Número de plantas cigóticas		35 (81.4%)	32 (74.42%)
Número de plantas nucleares		23 (57.5%)	24 (60%)	Número de plantas nucleares		8 (18.6%)	11 (25.58%)

\*= no amplificó o presentó barrido el carril del gel.



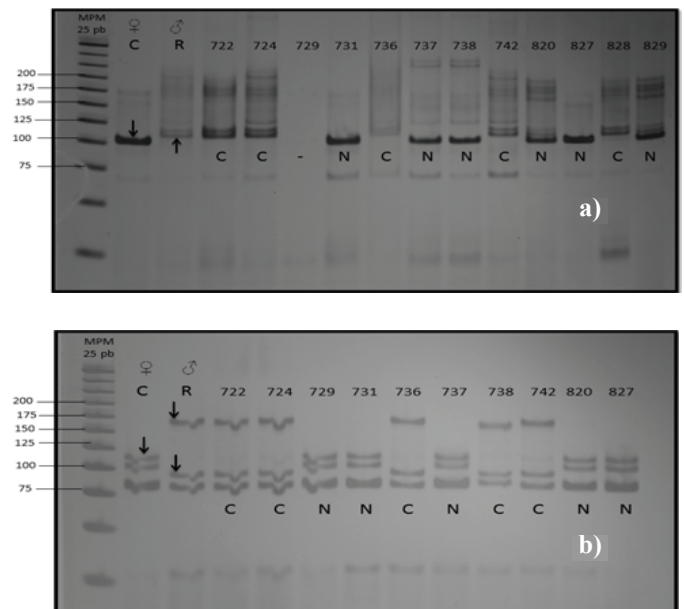
De manera similar, los híbridos de “Rosenberg” se identificaron por los alelos de 105 y 115 pb, los cuales están presentes en “Rosenberg” y ausentes en “Colimex”. En este sentido, se considera que un híbrido puede ser determinado identificando un solo locus codominante para el cual los progenitores no comparten alelos; es decir, cruza de la configuración  $aa \times bb$ ,  $ab \times cc$  o  $ab \times cd$ . También se pueden usar marcadores dominantes, como RAPD e ISSR, si el progenitor receptor del polen es 00 (banda ausente) y el donador del polen es 11 (banda homocigótica presente) (Kepiro y Roose, 2007). Sin embargo, la confirmación con un segundo locus es siempre deseable para confirmar la condición híbrida del individuo, lo cual se realizó en el presente trabajo con el uso de los marcadores TAA45 y cAGG09, cuyos polimorfismos de cada progenitor segregaron en la descendencia según la población correspondiente.

Los marcadores SSR constituyen una herramienta útil para el estudio de la diversidad genética de cítricos por su eficacia e información (Amara *et al.*, 2011; Biswas *et al.*, 2011). Su empleo para la detección de híbridos (Ruiz *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2012; Yildiz *et al.*, 2013; Mondal *et al.*, 2015) resulta más práctico, efectivo y ventajoso, debido que los trabajos que utilizaron RAPD e ISSR (Bastianel *et al.*, 1998; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004; Golein *et al.*, 2011) por lo general obtienen una gran cantidad de bandas monomórficas no informativas que pueden dificultar el análisis de los datos. Los RAPD e ISSR, al ser marcadores dominantes no permiten diferenciar individuos heterocigotos a diferencia de SSR que son marcadores codominantes.

Además, los RAPD presentan una baja reproducibilidad, ya que pequeñas modificaciones en la técnica tales como concentración de DNA molde, grado de pureza y fidelidad de la enzima DNA polimerasa, entre otros factores, pueden alterar el patrón de fragmentos amplificados de DNA generados para una muestra. Adicionalmente, los RAPD no son locus-específicos, por lo que perfiles electroforéticos de bandas no pueden ser interpretados en términos de loci y alelos, y fragmentos de tamaño similar pueden no ser homólogos (Martínez *et al.*, 2010; Kumari y Thakur, 2014).

En este estudio se realizaron cruzamientos bidireccionales de *C. aurantifolia*×*C. limon*, obteniéndose 42.5% de plantas híbridas cuando se utilizó a “Colimex” como receptor del polen, y 81.4% cuando se empleó a “Rosenberg” con el mismo propósito (Cuadro 2). Las toronjas, naranjas y

Also dominant markers, such as RAPD and ISSR, can be used if the pollen receptor is 00 (absent band) and the pollen donor is 11 (homozygous band present) (Kepiro and Roose, 2007). However, confirmation with a second locus is always desirable to confirm the hybrid condition of the individual, which was performed in this research using the TAA45 and cAGG09 markers, whose polymorphisms of each progenitor segregated into the offspring according to the corresponding population.



**Figura 2. Perfiles electroforéticos obtenidos con los oligonucleótidos TAA45 (A) y cAGG09 (B).** MPM: marcador de peso molecular 25 pb (Bioline). ♀= planta receptora de polen. ♂= planta donadora de polen. C= *C. aurantifolia* var. “Colimex”. R= *C. limon* var. “Rosenberg”. N= origen nucelar. C= origen cigótico (híbridos). Los números corresponden a diferentes muestras progenie.

**Figure 2. Electrophoretic profiles obtained with the TAA45 (A) and cAGG09 (B) oligonucleotides.** MPM: 25 bp molecular weight marker (Bioline). ♀= pollen receiving plant. ♂= pollen donor plant. C= *C. aurantifolia* var. “Colimex”. R= *C. limon* var. “Rosenberg”. N= nucellar origin. C= zygotic origin (hybrids). The numbers correspond to different progeny samples.

SSR markers are a useful tool for the study of genetic diversity of citrus by its effectiveness and information generated (Amara *et al.*, 2011; Biswas *et al.*, 2011). Its use for detecting hybrids (Ruiz *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2012; Yildiz *et al.*, 2013; Mondal *et al.*, 2015) is more practical, effective and advantageous because the

mandarinas presentan más de 90% de embrionía nucelar, dependiendo de la variedad. En limón mexicano, la proporción de plántulas nucleares es 78%, mientras que para limones italianos es 32-33% (Frost y Soost, 1968). Los resultados de este trabajo tuvieron porcentajes ligeramente inferiores, 57.5 y 18.6% de embrionía nucelar en “Colimex” y “Rosenberg”, respectivamente. Estos valores bajos a los reportados previamente, podrían deberse a factores nutricionales y a la interacción genotipo-ambiente (Kepiro y Roose 2007).

En este estudio se consideraron como híbridos aquellos individuos con origen cigótico, ya que las polinizaciones se controlaron, evitándose eventos de autofecundación. Ambos marcadores, cAGG09 y TAA45, coinciden en 80 y 83.72% en las plantas determinadas como híbridos para las poblaciones de *C. aurantifolia* × *C. limon* y su recíproca, respectivamente. Las muestras en las que ambos marcadores no coincidieron con el origen cigótico o nucelar de la progenie, se consideró el resultado del oligonucleótido cAGG09 debido a que amplificó bandas polimórficas bien definidas.

Por otro lado, se ha comparado la eficacia de las isoenzimas y marcadores SSR para detectar híbridos, concluyendo que los marcadores moleculares son más eficientes para este fin. En esta misma investigación utilizaron los oligonucleótidos empleados en este trabajo: TAA41 y TAA45 obteniendo polimorfismos que permitieron identificar el origen cigótico en poblaciones de *C. reticulata* × *C. sinensis* y autopolinización de *Poncirus trifoliata* (Ruiz *et al.*, 2000). Aunque en el presente trabajo el uso del iniciador TAA41 amplificó patrones de bandas difusas no informativas. En otro estudio, combinaron el empleo de marcadores morfológicos asistido por marcadores moleculares SSR de la serie CCSM para detectar híbridos derivados de *C. reticulata* y *C. sinensis* (Oliveira *et al.*, 2002).

Sin embargo, únicamente confirmaron la condición híbrida de las plantas detectadas por morfología, por lo que queda en duda la posible existencia de más individuos con origen sexual que pudieran ser detectados por los marcadores SSR. Por su parte Ahmad *et al.* (2012) emplearon los iniciadores: TAA15, TAA27, TAA33 y otros más de la serie CCSM para detectar híbridos en tres poblaciones F1 de varias cruza de naranjas y mandarinas, logrando detectar 23 y 5 híbridos de las cruza de las variedades “NARC 05-18” × “Tarocco” y NARC 05-17 × “Sanguinello”, respectivamente. Adicionalmente, identificaron 35 híbridos

researches that used RAPD and ISSR (Bastianel *et al.*, 1998; Andrade-Rodríguez *et al.*, 2004; Golein *et al.*, 2011) usually get a lot of uninformative monomorphic bands that may hinder the analysis of the data. The RAPD and ISSR, being dominant markers do not allow to differentiate heterozygous individuals unlike the SSR that are codominant markers.

In addition, RAPDs exhibit low reproducibility, as small modifications in the technique such as DNA template concentration, degree of purity and fidelity of the DNA polymerase enzyme, among other factors, may alter the pattern of amplified DNA fragments generated for a sample. Additionally, RAPD are not locus-specific, so electrophoretic band profiles can not be interpreted in terms of loci and alleles and fragments of similar size may not be homologous (Martínez *et al.*, 2010; Kumari and Thakur, 2014).

In this paper bidirectional crossbreeding of *C. aurantifolia* × *C. limon* were performed, yielding 42.5% of hybrid plants when “Colimex” was used as pollen receiver, and 81.4% when “Rosenberg” was used for the same purpose (Table 2). Grapefruits, oranges and tangerines have more than 90% of nucellar embryos, depending on the variety. In Mexican lemon, the proportion of nucellar seedlings is 78%, while for Italian lemons it is 32-33% (Frost and Soost, 1968). The results of this research showed slightly lower percentages, 57.5 and 18.6% of nucellar embryos in “Colimex” and “Rosenberg”, respectively. These lower values than previously reported could be due to nutritional factors, as well as genotype-environment interaction (Kepiro and Roose 2007).

In this research, individuals with zygotic origin were considered as hybrids, since the pollinations were controlled, avoiding self-fertilization events. Both markers, cAGG09 and TAA45 coincide in 80 and 83.72% in plants determined as hybrid for *C. aurantifolia* × *C. limon* populations and its reciprocal. Samples in which both markers did not coincide with the zygotic or nucellar origin of the progeny were considered the result of cAGG09 oligonucleotide because it amplified well-defined polymorphic bands.

On the other hand, the effectiveness of isoenzymes and SSR markers for detecting hybrids has been compared, concluding that molecular markers are more efficient for this purpose. In this same research they used the oligonucleotides used in this paper: TAA41 and TAA45 obtaining polymorphisms which identified the zygotic origin in populations of *C. reticulata* × *C. sinensis* and *Poncirus trifoliata* self-pollination (Ruiz *et al.*, 2000). Although in this research the

más de “Kinnow”×“Tarocco” con el marcador CCSM147. Yildiz *et al.* (2013) utilizaron los iniciadores TAA01, TAA3, TAA41, TAA45, TAA52, CAC33 y cAGG09 para detectar híbridos en varias poblaciones empleando como receptores del polen a las mandarinas y realizando cruzamientos con naranjas y toronjas.

De los 500 individuos que constituían las progenies de las diversas cruza, los iniciadores AG14 y TAA3 fueron los más efectivos para identificar individuos cigóticos. Las mandarinas “Fremont” y “Robinson” produjeron 36.91 y 31.09% de plantas nucelares, respectivamente. Finalmente, Mondal *et al.* (2015) recientemente hicieron uso de los oligonucleótidos TAA15, TAA27 y TAA33 para detectar híbridos de *C. reticulata* y reportaron que ninguno de estos iniciadores permitió la identificación del origen sexual en la progenie evaluada, por lo que recurrieron a los iniciadores de la serie CCSM para su identificación.

A pesar de que los marcadores SSR proveen información útil para la identificación de plantas híbridas en diferentes especies de cítricos, para este propósito se requiere de la implementación de técnicas como tecnología de diversidad por arreglos (DArT, “diversity array technology”), polimorfismos de nucleótido simple (SNP, “single nucleotide polymorphism”) o fusión de alta resolución (HRM, “high resolution melt”); sin embargo, actualmente resultan muy costosas.

## Conclusiones

Los marcadores SSR permitieron la identificación eficiente de plantas cigóticas y nucelares en poblaciones progenie de limón mexicano “Colimex” y limón italiano “Rosenberg”. Con el uso del cebador cAGG09 se identificó la amplificación de 4 alelos polimórficos, suficientes para determinar el origen sexual de las plantas de limón mexicano; sin embargo, la confirmación con un segundo locus es siempre deseable para confirmar la condición híbrida de los individuos.

Se lograron identificar un total de 52 híbridos en las poblaciones de las cruza *C. aurantifolia* (♀)×*C. limon* (♂) y *C. limon* (♀)×*C. aurantifolia* (♂). Además, los híbridos identificados pueden ser infectados con HLB en condiciones de campo para determinar el nivel de tolerancia a la enfermedad.

use of the TAA41 primer amplified diffuse non-informative bands patterns. In another study, they combined the use of morphological markers assisted by SSR molecular markers of the CCSM series to detect hybrids derived from *C. reticulata* and *C. sinensis* (Oliveira *et al.*, 2002).

However, they only confirmed the hybrid status of the plants detected by morphology, so the possible existence of more individuals with a sexual origin that could be detected by the SSR markers is doubted. Meanwhile Ahmad *et al.* (2012) used the initiators TAA15, TAA27, TAA33 and others from the CCSM series to detect hybrids in three F1 populations of several orange and tangerine crosses, detecting 23 and 5 hybrids of the “NARC 05-18”×“Tarocco” and NARC 05-17×“Sanguinello” crosses respectively. In addition, they identified 35 more hybrids of “Kinnow”×“Tarocco” with the CCSM147 marker. Yildiz *et al.* (2013) used the primers TAA01, TAA3, TAA41, TAA45, TAA52, CAC33 and cAGG09 to detect hybrids in several populations using tangerines as pollen receptor and crossing them with oranges and grapefruit.

Of the 500 individuals constituting the progenies of the various crosses, primers AG14 and TAA3 were the most effective for identifying zygotic individuals. The “Fremont” and “Robinson” tangerines produced 36.91 and 31.09% of nucellar plants, respectively. Finally, Mondal *et al.* (2015) recently made use of TAA15, TAA27 and TAA33 oligonucleotides for detecting hybrids of *C. reticulata* and reported that none of these primers allowed the identification of sexual origin in the evaluated progeny, so they resorted to the initiators of the MRCC series for identification purposes.

Although SSR markers provide useful information for the identification of hybrid plants in different citrus species, for this purpose it is necessary to implement techniques such as diversity array technology (DArT), single nucleotide polymorphism (SNP), or high resolution melt (HRM), however, these are currently very expensive.

## Conclusions

SSR markers allowed the efficient identification of zygotic and nucellar plants in progeny populations of Mexican lime “Colimex” and Italian lemon “Rosenberg”. With the use of the cAGG09 primer, the amplification of 4 polymorphic

## Literatura citada

- Ahmad, M.; Javaid, A.; Rahman, H.; Hussain, S. I.; Ramzan, A. and Ghafoor, A. 2012. Identification of mandarin×orange hybrids using Simple Sequence Repeat markers. *J. Agric. Res.* 50(2):225-232.
- Amara, M. H.; Biswas, M. K.; Zhang, Z. and Guoa, W. W. 2011. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of citrus germplasm collection. *Sci. Hortic.* 128(3):220-227.
- Anderson, C. M.; Castle, W. S. and Moore, G. A. 1991. Isozymic identification of zygotic seedlings in Swingle citrumelo *Citrus paradisi*×*Poncirus trifoliata* nursery and field populations. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 116(2):322-326.
- Andrade, R. M.; Villegas, M. A.; Gutiérrez, E. M. A.; Carrillo, C. G. and García, V. A. 2004. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus. *Agrociencia.* 39(4):371-383.
- Bastianel, M.; Schwarz, S. F.; Filho, H. D. C.; Lin, L. L.; Machado, M. and Koller, O. C. 1998. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. *Gen. Mol. Biol.* 21(1):123-127.
- Biswas, M. K.; Chai, L.; Amar, M. H.; Zhang, X. and Deng, X. 2011. Comparative analysis of genetic diversity in citrus germplasm collection using AFLP, SSAP, SAMPL and SSR markers. *Sci. Hortic.* 129(4):798-803.
- Frost, H. B. and Soost, R. K. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. *In:* W. Reuther, L. D. Batchelor and H. J. Webber (Eds.). *The citrus industry.* University of California Press. Berkeley, California. 1:290-324.
- Golein, B.; Fifaï, R. and Ghasemi, M. 2011. Identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus interspecific crosses by inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Afr. J. Biotechnol.* 10(82):18965-18970.
- Kepiro, J. L. and Roose, M. L. 2007. Nucellar embryony. *In:* Khan, I. (Eds.). *Citrus genetics, breeding and biotechnology.* CABI. UK. 141-149 pp.
- Khan, I. Q. and Kender, W. J. 2007. Citrus breeding: Introduction and objectives. *In:* Khan, I. (Eds.). *Citrus genetics, breeding and biotechnology.* CABI. UK. 1-8 pp.
- Kijas, J. M. H.; Fowler, J. C. S.; Thomas, M. R. and Roose, M. L. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theoretical and Applied Genetics.* 94: 701-706.
- Koltunow, A. M.; Hidaka, T. and Robinson, S. P. 1996. Polyembryony in citrus. *Plant Physiol.* 110:599-609.
- Kumari, N. and Thakur, S. K. 2014. Random amplified polymorphic DNA. A brief review. *American Journal Animal Veter. Sci.* 9(1):6-13.
- Machado, M. A.; Cristofani, Y. M. and Bastianel, M. 2011. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. *Rev. Bras. Frutic. Jabot. -SP.* 158-172.
- Martínez, M. C.; Helguera, M. y Carrera, A. 2010. Marcadores moleculares. *In:* Levitus, V.; Echenique, G.; Rubinstein, C.; Hopp E. y Mroginski L. (Eds.). *Biología y mejoramiento vegetal II.* INTA. Argentina. 70-85 pp.
- alleles, sufficient to determine the sexual origin of Mexican lemon plants, was identified; however, confirmation with a second locus is always desirable to confirm the hybrid condition of individuals.
- A total of 52 hybrid in the populations from crosses *C. aurantifolia* (♀)×*C. limon* (♂) and *C. limon* (♀)×*C. aurantifolia* (♂) were identified. Additionally, identified hybrids may be infected with HLB in field conditions to determine the level of tolerance to the disease.

*End of the English version*



- Mendoza, R. M. F.; Cervera, G. M. T.; Cabezas, M. J. A.; Cenis, J. L. y Martínez, Z. J. M. 2001. Utilización de marcadores AFLP y SAMPL en la identificación genética de especies y variedades de cítricos. *Biología Vegetal.* 1:11-96.
- Mondal, B. and Saha, R. 2014. Identification of zygotic and nucellar seedling of *Citrus aurantifolia* and *Citrus reticulata* using RAPD. *Inter. J. Adv. Biotechnol. Res.* 15(1):25-30.
- Mondal, B.; Pramanick, S.; Saha, R. and Karmakar, M. 2015. Application of simple sequence repeat markers for demarcation of *Citrus reticulata* nucellar and hybrid seedlings. *Inter. J. Biosci.* 6(2):128-133.
- Oliveira, A. C.; Novac, G. A.; Cristofani, M. and Machado, M. A. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR. *Euphytica.* 128:337-339.
- Omura, M. and Shimada, T. 2016. Citrus breeding, genetics and genomics in Japan. *Breed. Sci.* 66(1):3-17.
- Ruiz, C.; Paz, B. M. and Asins, M. J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedling in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica.* 112:89-94.
- Sanguinetti, C. J.; Neto, E. D. and Simpson, A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 17(5):915-919.
- SIAP. 2016. Atlas agroalimentario 2016. Primera edición. [www.gob.mx/siap](http://www.gob.mx/siap).
- Tozlu, I.; Guy, C. L. and Moore, G. A. 1999. QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC1 progeny of Citrus and Poncirus under saline and non-saline environments. *Genome.* 42(5):1020-1029.
- Viloria, Z. and Grosser, J. W. 2005. Acid citrus fruit improvement via interploid hybridization using allotetraploid somatic hybrid and autotetraploid breeding parents. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130(3):392-402.
- Wutscher, H. K. and Hill, L. L. 1995. Performance of 'Hamlin' orange on 16 rootstocks in east-central Florida. *HortScience.* 30(1):41-43.
- Yildiz, E.; Klaplankiran, M.; Demirköser, T. H.; Uzun, A. and Toplu, C. 2013. Identification of zygotic and nucellar individuals produced from several Citrus crosses using SSRs markers. *Notulae Bot. Hort. Agrobot.* 41(2):478-484.