

## Identificación de híbridos de limón mexicano mediante marcadores moleculares SSR

Silvia Heréndira Carrillo-Medrano<sup>1§</sup>  
M. Alejandra Gutierrez-Espinosa<sup>1</sup>  
M. Manuel Robles-González<sup>2</sup>  
Serafin Cruz-Izquierdo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados-*Campus* Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5. CP. 56230. Texcoco, Estado de México. México. Tel. 01(595) 9520200. (alexge@colpos.mx; seracruz@colpos.mx).

<sup>2</sup>Campo Experimental Tecomán-INIFAP. Carretera Colima-Manzanillo km 35. Tecomán, Colima, México. CP. 28930. Tel. 01 (800) 0882222, ext. 84332. (robles.manuel@inifap.gob.mx).

§Autora para correspondencia: carrillo.silvia@colpos.mx.

### Resumen

El desarrollo de variedades tolerantes puede ayudar a enfrentar y reducir los impactos de enfermedades que amenazan al cultivo de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle]. Se han generado plantas híbridas interespecíficas e intergenéricas, en busca de genotipos con resistencia o mayor tolerancia a VTC, HLB y antracnosis. Debido a que la mayoría de los cítricos son apomícticos y poliembriónicos se requiere la identificación de plantas híbridas por medio de técnicas tales como los marcadores genéticos moleculares. El objetivo del estudio fue identificar híbridos de limón mexicano mediante marcadores moleculares denominados microsátélites (SSR). Se utilizó una población de 203 individuos de cruces realizadas de 2009 a 2012, en el Campo Experimental Tecomán-INIFAP. El ADN genómico se realizó de acuerdo con el método CTAB 2%. La reacción de PCR se hizo con un volumen de 20µl conteniendo 10 µl de iTaq™ Universal Probes supermix y 2.5 µl de cada iniciador Forward y Reverse. Los iniciadores utilizados fueron TAA41, TAA45, cAGG9 y TAA52. Los productos amplificados, se analizaron en gel de poliacrilamida al 8% y se tiñeron con nitrato de plata al 0.2%. La identificación de plantas híbridas se realizó mediante la comparación de bandas producidas por los híbridos con los progenitores. Los cuatro iniciadores permitieron la identificación de plantas híbridas. El mayor número de plantas identificadas se obtuvieron con los iniciadores TAA45 y cAGG9 con 145 y 130 respectivamente. La identificación de híbridos de la población en estudio a través del análisis de marcadores moleculares, permitirá que los programas de mejoramiento genético sean eficientes, que implica la obtención de un gran número de plántulas derivadas de las cruces realizadas.

**Palabras clave:** *Citrus aurantifolia*, antracnosis, HLB, microsátélites, VTC.

Recibido: diciembre de 2017

Aceptado: enero de 2018

## Introducción

En los últimos años el cultivo del limón mexicano se encuentra seriamente amenazado por la llegada de enfermedades que ponen en riesgo su permanencia como la actividad agrícola más importante para el estado de Colima y de gran relevancia para los estados de Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Destacan las enfermedades de tipo fungoso como la antracnosis (*Colletotrichum acutatum*), se presenta durante el periodo de lluvias y afecta el rendimiento y la calidad de fruta en los meses de otoño-invierno. Virus tristeza de los cítricos (VTC), enfermedad de tipo viral de mayor importancia económica que afecta al cultivo de los cítricos a nivel mundial y el huanglongbing (HLB) considerada actualmente como la más devastadora siendo más peligrosa que el VTC.

El desarrollo de variedades tolerantes puede ayudar a enfrentar y reducir los impactos de estas enfermedades. El programa de mejoramiento genético de limón mexicano del INIFAP- Tecomán ha generado plantas híbridas interespecíficas e intergenéricas, en la búsqueda de genotipos con resistencia o mayor tolerancia a estas enfermedades y de esa forma poder conservar el cultivo de limón mexicano en el país.

Los programas de mejoramiento genético de cítricos en varias partes del mundo, están enfocados principalmente a la generación de variedades de fruta sin semilla, producción de genotipos para uso como portainjertos que integren además de buena compatibilidad con las variedades, tolerancia a patógenos y adaptación a suelos con salinidad y carbonatos de calcio (Tusa *et al.*, 1996; Grosser *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2000; Cristofani *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2002; Grosser y Gmitter, 2005; Shi-Ping *et al.*, 2009).

Algunos reportes indican que es posible obtener segregantes triploides (3x) al cruzar genotipos de cítricos diploides (2x) con genotipos tetraploides (4x) (Cameron y Burnett 1978; Cameron y Soost 1969; Esen y Soost, 1972; Oiyama, 1991; Starrantino y Recupero, 1982). Las evidencias más recientes de variedades de cítricos triploides que se obtuvieron por hibridación sexual interploide son las variedades de toronja (*C. maxima* (Burm) Merrill), 'Oro Blanco' y 'Melogold' que fueron desarrolladas en California (Soost y Cameron, 1980; 1985). Al igual que la mayoría de los cítricos, el limón mexicano es diploide (2x). Al cruzar esta especie vía hibridación sexual con genotipos tetraploides (2n= 4x) que contengan características de tolerancia a problemas sanitarios antes mencionados es posible generar variedades triploides sin semillas tolerantes.

El mejoramiento convencional de cítricos tiene importantes limitaciones debido a la compleja biología reproductiva de estas especies. La mayoría de los genotipos son apomícticos y desarrollan embriones adventicios directamente de las células nucelares que limitan o excluyen el desarrollo de embriones cigóticos, (Kobayashi *et al.*; 1979; Soost y Roose, 1996; Ruiz, *et al.*; 2000, Yildis, *et al.*, 2013). Estos contienen el mismo material genético que la planta madre, además pueden provocar que la mayoría de los cultivares poliembriónicos produzcan pocas plantas híbridas. Por otra parte, es difícil distinguir las plantas nucelares y cigóticos en una etapa temprana de desarrollo (De Lange y Vincent, 1977). Por lo que la identificación de embriones sexuales es importante y requieren de análisis como la citología, citometría de flujo, isoenzima, o análisis molecular (Tusa *et al.*, 2002).

Según Yildiz *et al.* (2013) muchos estudios dirigidos a la separación de distintos tipos y variedades de cítricos y la identificación de las plantas nucelares y cigóticas, comenzaron utilizando caracterización morfológica (Furr y Reece, 1946; Cameron, 1979), espectrofotometría (Pieringer y Edwards, 1967) y técnicas cromatográficas (Albach y Redman, 1969; Stanley y Jurd, 1971; Tatum *et al.*, 1974; Weinbaum *et al.*, 1982). También se utilizaron varios métodos bioquímicos, incluyendo el oscurecimiento enzimático (Esen y Soost, 1974).

Ninguno de estos métodos confirmó de manera eficiente la identidad de las verdaderas plántulas nucelares (Ruiz *et al.*, 2000; Tusa *et al.*, 2002). Más tarde, se emplearon isoenzimas (Iglesias *et al.*, 1974; Moore y Castle, 1988; Ashari *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1991). Sin embargo, ya que los productos de la expresión génica fueron utilizados en estos casos, los resultados pudieron ser influenciados por el entorno o por la etapa de desarrollo de la planta y sus órganos, por lo que este método fue poco fiable para la identificación de plántulas cigóticas.

El uso de polimorfismos de ADN para la identificación de plantas híbridas es importante en programas de mejoramiento de cítricos y otras leñosas, pues con esto se acelera el proceso de detección de la progenie. Varios estudios recientes han descrito el uso de marcadores SSR como método alternativo para distinguir plántulas sexuales de nucelares en cítricos (Mullis *et al.*, 1986; Ruiz *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2008; Shareefa *et al.*, 2009; Yildiz, *et al.*, 2013).

En este estudio se describe la identificación de híbridos de limón mexicano basado en el análisis molecular de marcadores SSR.

## Materiales y métodos

### Material biológico

Para el estudio se utilizó una población de 203 plantas originadas de 13 cruza de limón mexicano con limones italianos, citrangeres e híbridos somáticos entre citrangeres y naranjo dulce (Cuadro 1), realizadas de 2009 a 2012 en el Campo Experimental Tecomán del INIFAP.

**Cuadro 1. Lista de progenies híbridas de limón mexicano utilizadas en el estudio.**

Número de cruza	Cruza	Número de muestras	Año de cruza
1	Rosenberg (2x) X Colimex (2x)	20	2009
2	Colimex (2x) X Rosenberg (2x)	14	2009
3	Mex13 (4x) X Limoneira 8a (2x)	12	2010
4	Mex13 (4x) X Rosenberg (2x)	19	2010
5	Mex13 (4x) X Eureka (2x)	10	2010
6	Rosenberg (2x) X Mex20 (4x)	8	2010
7	Rosenberg (2x) X Mex13 (4x)	7	2010
8	Mex13 (4x) X C-35 (2x)	50	2011
9	Colimex (2x) X HS11 (4x)	21	2011
10	Colimex (2x) X Limequat (2x)	6	2012
11	Colimex (2x) X C-32 (2x)	17	2012
12	Colimex (2x) X C-swingle (2x)	8	2012
13	Colimex (2x) X Yuma (2x)	11	2012

## Extracción de ADN genómico

El ADN total fue extraído a partir de hojas jóvenes de acuerdo con el método de Doyle y Doyle, 1987, con modificaciones Hernández-Nava (2013). En un tubo eppendorf se depositó 0.1 g de tejido vegetal junto con 600 µl de buffer salino y se trituró en un disruptor Retsch® MM400 a 25 frecuencias (f/s) por tres min. Posteriormente se resuspendió en buffer de extracción CTAB 2% (1.4 M NaCl, 100 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 8) y 3 µl de β-Mercaptoetanol a 100%. Se mezcló el contenido del tubo en vortex por 10 segundos y se incubó a 55 °C por 30 min.

A continuación se agregó 400 µl de fenol: cloroformo: alcoholisoamílico en una proporción 25:24:1 respectivamente, mezclando la muestra en vortex por 10 segundos. Se centrifugó la muestra por 10 min a 14 000 rpm a 4 °C y se colectó 500 µl de la fase acuosa evitando que las fases se mezclaran. Posteriormente se agregó 50 µl de acetato de amonio y 500 µl de isopropanol y se incubó la muestra por 10 min a temperatura de -20 °C. A continuación se centrifugó por 10 min a 14 000 rpm a 4 °C y se decantó el sobrenadante sin perder la pastilla que se formó. Se adicionó 1 ml de etanol a 70% y se centrifugó por 1 min a 14 000 rpm a 4 °C. Transcurrido el tiempo, se secó la muestra a temperatura ambiente hasta la evaporación del etanol. Finalmente se resuspendió la pastilla en 50 µl de agua libre de ARNasa y se almacenó la muestra a -20 °C. La calidad y pureza de ADN obtenido se cuantificó en Nanodrop 2000.

## Amplificación porPCR

La amplificación por PCR de segmentos específicos de ADN mediante juegos de oligos reportados por Kijas *et al.* (1997) (Cuadro 2), se realizó en un volumen total de 20 µl utilizando 10 µl de iTaq™ Universal Probes supermix (dNTPs, iTaq ADN polimerasa, MgCl<sub>2</sub>, potenciadores, estabilizantes, colorantes y normalización ROX) y 2.5 µl de cada iniciador Forward y Reverse. El programa de amplificación consistió en un ciclo a 94 °C durante 5 min, seguido de 32 ciclos de 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min. Una extensión final de 4 min a 72 °C. La temperatura de hibridación se redujo a 45 °C durante 30 s para promover la amplificación del cebador TAA52.

**Cuadro 2. Iniciadores de microsatélites utilizados en la detección de híbridos de limón mexicano.**

Nombre	Secuencia 5'-3'	Secuencia 3'-5'
TAA41	AGGTCTACATTGGCATTGTC	ACATGCAGTGCTATAATGAATG
TAA45	GCACCTTTTATACCTGACTCGG	TTCAGCATTGAGTTGGTTACG
TAA52	GATCTTGACTGAACTTAAAG	ATGTATTGTGTTGATAACG
cAGG9	AATGCTGAAGATAATCCGCG	TGCCTTGCTCTCCACTCC

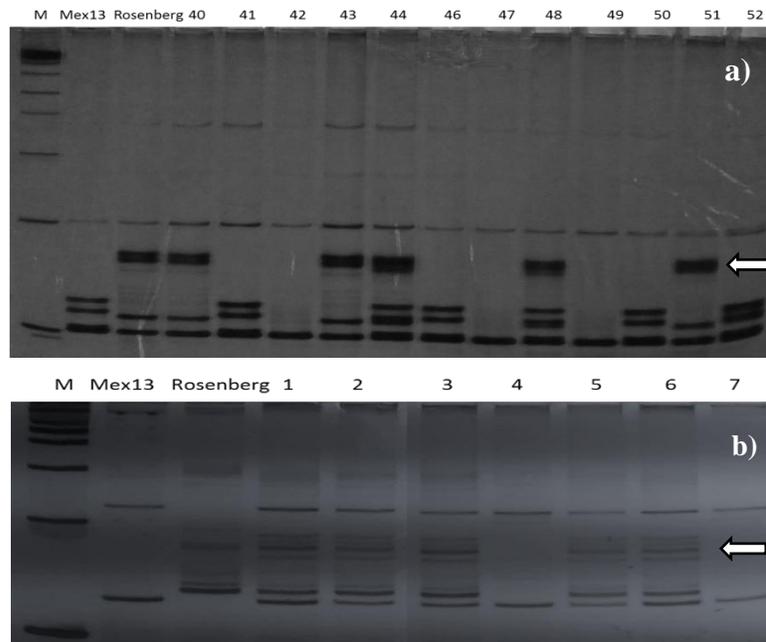
La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó en un termociclador Bio-Rad T100™ Thermal Cycler. Los productos usados en la amplificación de PCR, se analizaron en gel de acrilamida a 8% y se revelaron con nitrato de plata al 0.2%. Se usó un marcador de peso molecular de 1kb (invitrogen). Las condiciones de corrida de las muestra fueron 190 V y 200 mA por 90 min.

## Análisis de datos

Se realizaron dendogramas a partir de la identificación de presencia (1) o ausencia (0) de bandas utilizando los cuatro iniciadores, a través del método de agrupamiento pareado no ponderado con medias aritméticas (UPGMA) y distancia Eucladiana al cuadrado. Los análisis se realizaron con el uso del paquete estadístico Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-pc 2.21) (Rohlf, 2000).

## Resultados y discusión

Las plantas híbridas se determinaron por la presencia de bandas del progenitor masculino amplificadas por PCR utilizando cuatro iniciadores. En la Figura 1a y b, se muestran algunos de los híbridos identificados con los iniciadores cAGG9 y TAA45 en una de las cruzas evaluadas, (Mex13 (4x) x Rosenberg (2x)). De 203 plantas obtenidas de las diferentes cruzas realizadas el mejor iniciador logró identificar 145 (71%) plantas cigóticas. Los resultados obtenidos son similares a los repostados por algunos autores. Frost y Soost (1967) informaron de frecuencias cigóticas de 78.7% y 14% en tangerinas 'King' y 'Willowleaf' respectivamente, usando a *P. trifoliata* como progenitor masculino.



**Figura 1.** Gel de poliacrilamida mostrando el análisis con SSR de progenie obtenida de cruzas de limón mexicano. a) Iniciador cAGG9; b) iniciador TAA45 marcador 1kb (M), progenitor femenino Mex13, masculino Rosenberg.

Otros autores como Hearn (1973) encontró que la selección de naranja dulce 'Mediterranean' produjo 62% de plántulas cigóticas cuando se utilizó como progenitor masculino a *P. trifoliata*. En otros reportes (Soost *et al.*, 1980) encontraron una frecuencia cigótica de aproximadamente 85% cuando usaron como progenitor femenino a la mandarina 'King' y maculino a 'Parson

Special'. Varios estudios han demostrado que la frecuencia de plántulas cigóticas no excede 15%, pero esto va a depender de la especie y en algunos casos se obtienen solamente individuos nucelares (Cameron y Soost, 1980; Hirai *et al.*, 1986; Ashari *et al.*, 1988; Roose y Traugh, 1988).

Varios niveles de plántulas cigóticas se han observado en otras especies y cruzas de cítricos. Algunos otros autores, entre ellos. Hwang y Yeuh (1989) reportaron frecuencias cigóticas de 42.8% y 66.7% en cruzas de mandarina 'Tankan' x *P. trifoliata*. Hwang (1991) informó que, en plántulas identificadas por morfología de la hoja, obtuvo 73% de plántulas cigóticas de limón 'Eureka' en cruzas con naranja trifoliada y 38% a 56% en cultivares de limón 'Eureka' y 'Lisboa' en cruzas con naranja dulce. En otros trabajos como en el de Moore y Castillo (1988), se identificaron solo 24% de plántulas cigóticas de limón 'Volkameriana', estos resultados fueron utilizando marcadores basados en isoenzimas.

Con el uso de marcadores SSR, Ruiz *et al.* (2000), clasificó 86.95% de plántulas híbridas de cruzas entre 'Flying Dragon' y tangor 'Ortanique'. Sin embargo, Yildiz *et al.* (2013), identificaron 86 plántulas (36.91%) nucelares y 63% cigóticas en cruzas con mandarina 'Fremont' como progenitor femenino y la variedad 'Rio Red' como progenitor masculino. Estos mismos autores señalan que cuando utilizaron a la mandarina 'Robinson' como el progenitor femenino, esta proporción fue de 31.09% de plántulas nucelares y 69% cigóticas.

Datos que difieren a los obtenidos en este estudio, fueron reportados por Yun *et al.* (2007), que obtuvieron 0% a 13.4% plántulas híbridas en cruzas donde se utilizó a las mandarinas 'Miyagawa Wase', 'Okitsu Wase' y 'Shiranuhi' como progenitores femeninos y mandarina 'Ponkan' y citrumelo 'Swingle' como progenitores masculinos. Otros autores como Rao *et al.* (2008) cruzaron diferentes cultivares de mandarinas y toronjas para obtener portainjertos alternativos a la naranja agria y con marcadores SSR identificaron 22.2% de plántulas híbridas de estas cruzas.

De acuerdo con García *et al.* (1999) los embriones cigóticos producidos por autopolinización son menos vigorosos y pueden no ser competitivos con los nucelares. Los porcentajes de progenie cigótica encontrado en varios híbridos de cítricos dependen de la semilla del progenitor utilizado (Spiegel-Roy *et al.*, 1977), el origen del polen (Cameron y Soost, 1980; Soares-Filho *et al.*, 1995) y las influencias ambientales (Khan y Roose, 1988; Moore y Castle, 1988; Roose y Traugh, 1988).

Las plantas obtenidas diploides, triploides y tetraploides de cada combinación fueron evaluadas utilizando iniciadores SSR. Los cuatro lograron identificar plantas híbridas (Cuadro 3). Con el iniciador TAA45 fue posible identificar el mayor número de híbridos (145) siendo este el mejor de todos, seguido del cAGG9 y el TAA52 con 130 y 125 híbridos respectivamente. Caso contrario a los resultados obtenidos en este estudio, se reportaron por Yildiz *et al.* (2013) en sus investigaciones localizaron en una población en estudio que los cebadores AG14 y TAA03 fueron más eficaces para distinguir individuos cigóticos y el cebador TAA45 no fue capaz de identificar las plántulas cigóticas.

**Cuadro 3. Plantas híbridas identificadas con cuatro de los marcadores moleculares reportados por Kijas *et al.* (1997).**

Cruza	Iniciador cAGG9	Iniciador TAA41	Iniciador TAA45	Iniciador TAA52
Colimex X Yuma	16	8	7	5
Colimex X C-swingle	2	9	2	2
Colimex X híbrido somático 11	25	20	20	14
Colimex X Limequat	5	0	2	2
Colimex X Rosenberg	7	8	11	12
Colimex X C-32	3	2	16	2
Mex13 X Eureka	4	5	7	9
Mex13 X Limoneira 8a	7	8	10	3
Mex13 X Rosenberg	12	15	13	17
Mex13 X C-35	39	32	48	53
Rosenberg X Colimex	7	6	3	2
Rosenberg X Mex13	1	1	0	1
Rosenberg X Mex20	2	0	6	3
Total de plantas híbridas	130	114	145	125

Con respecto al iniciador TAA41, fue este el que menos plantas identificó (114). Resultados similares fueron encontrados por Yildiz *et al.* (2013), reportaron que en combinaciones donde utilizaron la mandarina 'Fremont' como progenitor femenino, el iniciador TAA41 fue capaz de identificar solo 47 plantas cigóticas que el resto de los cebadores SSR utilizados. Estos mismos autores reportan que, en combinaciones donde se utilizó la mandarina 'Robinson' como el progenitor femenino, los iniciadores AG14 y TAA03 identificaron 59 y 58 plantas cigóticas respectivamente, más que el iniciador TAA41. En contraste, los iniciadores CAT01, TAA01, TAA45 y TAA52 (cuando se utilizó a la mandarina 'Fremont' y 'Robinson' como progenitores femeninos) no fueron útiles en la determinación de la identidad de plantas cigóticas.

En las poblaciones que son derivadas de una cruce, todos los individuos que son cigóticos muestran un genotipo diferente al de la madre en cualquier locus de discriminación, esto va a ocurrir siempre y cuando el padre tenga alelos diferentes a los de la madre (Ruiz *et al.*, 2000). La variación en el número de bandas amplificadas por diferentes iniciadores puede deberse a factores como la estructura del iniciador, la cantidad de plantilla y el número de sitios reconocidos en el genoma (Muralidharan y Wakeland, 1993).

Otros autores, entre ellos Nageswara *et al.* (2008) identificaron 77.8% plántulas nucelares y 22.2% plántulas cigóticas, con marcadores EST-SSR, en híbridos de introgresión de mandarina (*C. reticulata* Blanco) y pomelo (*C. maxima* Merr.). Otros autores como Mei-lian *et al.* (2007) reportan en cruces de tangerina roja (*C. reticulata* Blanco) X naranja trifoliada (*P. trifoliata* L.) 111 individuos híbridos a través de rescate de embriones y verificados por marcadores SSR y 44 plantas híbridas a partir de cruces de mandarina Satsuma (*C. unshiu* Marc) X naranja trifoliada (*P. trifoliata* L.).

De la misma manera Oliveira *et al.* (2002), reportan la identificación de híbridos derivados de cruzas entre tangor 'Murcott' [*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* (L.) Osb.] y naranja dulce 'Pera'. [*C. sinensis* (L.) Osb.], con análisis de marcadores SSR. Siragusa *et al.*, 2006, identificaron y evaluaron la variabilidad genética de accesiones de naranja dulce con marcadores moleculares SSR. También Aleza *et al.*, 2012, identificaron híbridos que muestran el alelo específico del progenitor masculino con marcadores moleculares SSR en cruzas 4x X 2x de varios cítricos. Aleza *et al.* (2010) utilizaron marcadores de SSR para demostrar que todas las plantas recuperadas de semillas no desarrolladas obtenidas a partir de hibridaciones sexuales 2x X 4x fueron resultado del embrión cigótico.

En los cítricos, los marcadores SSR pueden distinguir fácilmente entre las especies o variedades que surgen de la hibridación sexual (Barkley *et al.*, 2006; Luro *et al.*, 2008). Por el contrario, la diferenciación de genotipos derivados de mutaciones espontáneas es muy difícil, como en el caso de las clementinas (Bretó *et al.*, 2003) o naranjas dulces (Fang y Roose, 1997). Mediante el uso de varios marcadores heterocigotos diferenciando los progenitores masculinos y femeninos, también se puede encontrar una buena probabilidad de diferenciar entre plantas cigóticas independientes.

Fang y Roose (1997) mencionan que las mutaciones en la mayoría de los casos pueden causar cambios significativos en la morfología de árbol, pero con las modificaciones que ocurren en la secuencia de ADN, son difíciles de detectar. Novelli *et al.* (2000, 2006) también informaron que, a pesar de considerables diferencias morfológicas, hay pocos polimorfismos RFLP, RAPD y SSR. Sobre la base de marcadores SSR, pues Cao *et al.* (2007) no pudieron detectar diferencias entre 16 mandarinas Satsuma y por tanto el posible origen de la mutación de estas variantes.

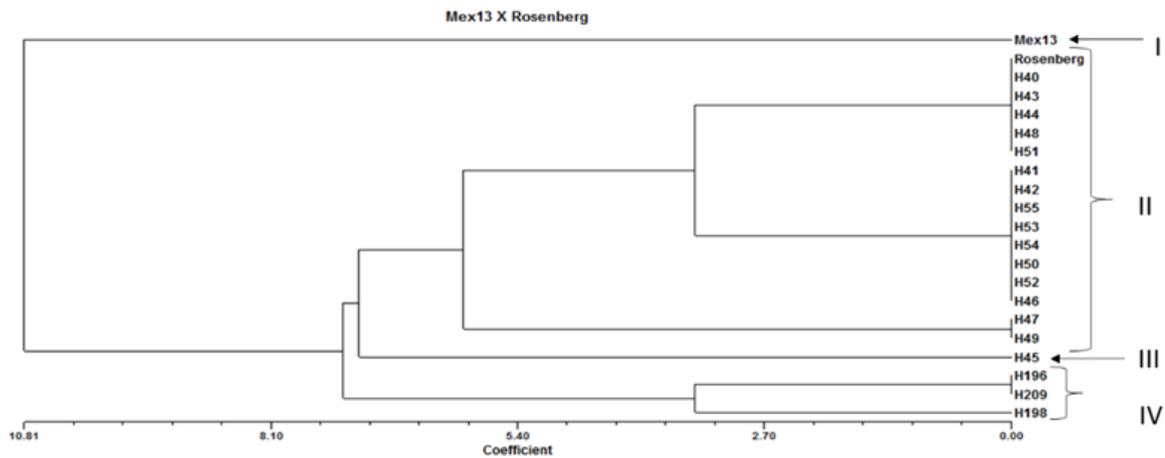
Las plántulas siempre tienen un valor de similitud más alto con sus progenitores femeninos, de ese modo se indica la disminución de los antecedentes genéticos, el aumento de la endogamia puede ser la causa del bajo rendimiento del árbol en diversas condiciones ambientales (Fehr, 1993).

Al realizar los dendogramas con los datos de los cuatro marcadores SSR de los individuos obtenidos con las distintas cruzas se pudo detectar que el coeficiente de similitud de la distancia euclidiana varió desde 0 a 999.09 entre los 203 individuos que se analizaron. Esto se debe a la gran variabilidad generada en estos cruzamientos, ya que se combinaron los genomas de distintas especies e inclusive de géneros distintos.

Por otra parte, tanto los limones mexicanos como los limones italianos están en forma heterocigótica y por lo tanto al segregar los alelos en los gametos y luego al recombinarse en el cruzamiento, están generando nuevas combinaciones genéticas. Por su parte, los citranges están formados por el genoma de *C. sinensis* y *P. trifoliata*, también en condición altamente heterocigótica, lo que aumenta la diversidad genética. Este resultado coincide con lo reportado por Herrero *et al.* (1996) quienes señalan que las limas y limones muestran un alto porcentaje de heterocigosidad.

La Figura 2 muestra uno de los 18 dendogramas construido con los perfiles de SSR obtenidos en el análisis de conglomerados (UPGMA) El dendograma de la cruce Mex13 x Rosenberg se separó en cuatro grupos. El primero lo formó el progenitor femenino Mex13. En el segundo se

encuentran los individuos H40, H43, H44, H48, H51, H41, H42, H55, H53, H54, H50, H52, H46, H47, H49 y el progenitor masculino Rosenberg. El tercer grupo lo formó el individuo H45. Y en el último se encuentran los individuos H196, H209 y H198. En esta cruce se observó que todos los individuos analizados fueron identificados como híbridos. Los individuos H40, H43, H44, H48 Y H51 son genéticamente similares a Rosenberg, lo que indica que los cuatro iniciadores lograron identificar regiones semejantes al progenitor masculino.



**Figura 2. Dendrograma generado con datos de cuatro marcadores SSR de individuos obtenidos de la cruce de 'Mex13' x 'Rosenberg' construido con el método UPGMA.**

El resto de los híbridos fueron identificados por tres de los iniciadores utilizados. En un estudio de germoplasma de cítricos, Shahsavari *et al.* (2007) reportaron que los limones (*C. limon* L. Burm. F.), 'Lisboa', 'limón Rock' y 'limón forma de pera' se separaron de otros genotipos al analizar el polimorfismo con marcadores moleculares ISSR con valor de similitud de 0.65. En este mismo trabajo estos autores reportan que las poblaciones de plantas estudiadas exhiben características morfológicas muy similares; sin embargo, los fenotipos moleculares revelaron diferencias sustanciales de similitud entre los híbridos y los progenitores.

## Conclusiones

Se identificaron plantas híbridas de limón mexicano con limones italianos e híbridos somáticos entre citrangeros y naranjo dulce.

Los cuatro iniciadores permitieron la identificación de plantas híbridas. El mayor número de plantas híbridas se identificaron con los iniciadores TAA45 y cAGG9.

La identificación de los híbridos de la población en estudio a través del análisis de marcadores moleculares, permitirá ahorrar tiempo y reducir los costos de mantenimiento de material en campo en los programas de mejoramiento genético que implican la obtención de un gran número de plántulas derivadas de las cruces realizadas.

Los resultados de este estudio sugieren que el análisis de marcadores moleculares puede contribuir significativamente a los programas de mejoramiento de cítricos

### Literatura citada

- Albach, R. F. and Redman, G. H. 1969. Composition and inheritance of flavanones in citrus fruit. *Phytochemistry* 8:127-143.
- Aleza, P.; Juárez, J.; Cuenca, J.; Ollitrault, P. and Navarro, L. 2010. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x 3 2x sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. *Plant Cell Rep.* 29:1023-1034.
- Aleza, P.; Juárez, J.; Hernández, M.; Ollitrault, P. and Navarro, L. 2012. Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on 4x×2x sexual hybridisations. *Tree Genetics and Genomes.* 8:1293-1306.
- Anderson, C. M.; Castle, W. S. and Moore, G. A. 1991. Isozymic identification of zygotic seedlings in Swingle citrumelo *Citrus paradise* and *Poncirus trifoliata* nursery and field populations. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 116:322-236.
- Ashari, S.; Aspinall, D. and Sedgley, M. 1988. Discrimination of zygotic and nucellar seedlings of five polyembryonic citrus rootstocks by isozyme analysis and seedling morphology. *J. Hort. Sci.* 63:695-703.
- Barkley, N. A.; Roose, M. L.; Krueger, R. R. and Federici, C. T. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor. Appl. Genet.* 112:1519-1531.
- Breto', 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 E.* 21:285-293.
- Cameron, J. W. 1979. Sexual and nucellar embryony in F1 hybrids and advanced crosses of *Citrus* and *Poncirus*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 104:408-410.
- Cameron, J. W. and Soost, R. K. 1980. Mono and poly embryony among tetraploid *Citrus* hybrids. *HortSci.* 15:730-731.
- Cameron, J. W. and Burnett, R. H. 1978. Use of sexual tetraploids seed parent for production of triploids citrus hybrids. *HortScience.* 13:167-169.
- Cameron, J. W. and Soost, R. K. 1969. Characters of new populations of citrus polyploids and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny. *Proc. First int. Citrus Symposium.* 1: 199-205.
- Cao, Q. Q.; Meng, H. J.; Wen, X. P.; Yi, H. L. and Deng, X. X. 2007. Genetic diversity of male sterile and low fertility germplasm of Citrus revealed using SSR markers. *Chin. J. Agr. Biotec.* 4:99-104.
- Cristofani, M. and Machado, M. A. 1998. Utilização de marcadores moleculares na identificação de plântulas zigóticas e nucelares em sementeira de limão 'Cravo'. *Laranja* 19:147-158.
- Cristofani, M.; Machado, M. A.; Targon, M. P. L. N. and Takita, M. A. 2002. Tristeza tolerance by improvement methods. *In: 7<sup>th</sup> International citrus seminar: improvement.* (Eds.). Donadio, L. C. y Sanches-Stuchi, E. Citrus Experimental station of Bevedoro, SF Brazil. 71-73 pp.
- De Lange, J. H. and Vincent, A. P. 1977. Citrus breeding: new techniques in stimulation of hybrid production and identification of zygotic embryos and seedlings. *Second Meeting of the International Society of Citriculture.* Florida, USA. 2:589-595.

- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. Arapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Esen, A. and Soost, R. K. 1974. Inherence of browning of young-shoot extracts of *Citrus*. *J. Hered.* 65:97-100.
- Esen, A. and Soost, R. K. 1972. Tetraploids progenies from 2x x 4x crosses in *citrus* and their origin. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97:410-414.
- Fang, D. Q. and Roose, M. L. 1997 Identification of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat marker. *Theor. Appl. Genet.* 95:408-417.
- Fehr, W. R. 1993. Principles of cultivar development. Macmillian Publishing Company. USA.
- Frost, H. B. and Soost, R. K. 1967. Seed reproduction: development of gametes and embryos. *In: Reuther, W.; Batchelor, L. D.; Webber, H. J. (Eds.). The Citrus industry.* University of California Press, Berkeley, USA. 290-324 p.
- Furr, J. R. and Reece, P. C. 1946. Identification of hybrid and nucellar citrus seedlings by a modification of the rootstock color test. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 48:141-146.
- Garcia, R.; Asin, M. J.; Forner, J. and Carbonell, E. A. 1999. Genetic analysis of apomixes in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 99:511-518.
- Grosser, J. W.; Ollitrault, P. and Olivares, F. O. 2000. Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 36:434-449.
- Grosser, J. W. and Gmitter, F. G. 2005. SIVB Congress Symposium Proceedings “Thinking outside the cell”: applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. *In vitro cell Dev. Biol. Plant* 41: 220-225.
- Hearn, C. J. 1973. Recently released cultivars and the development of new hybrids of *Citrus* fruits in Florida. First Meeting of the International Society of Citriculture, Murcia-Spain. 81-85 pp.
- Hernandez, N. G. A. 2013. Prevalencia de *Toxoptera citricida* y tasa de adquisición del *Citrus tristeza virus* en la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 83 p.
- Herrero, R.; Asins, M. J.; Carbonell, E. A. and Navarro, L. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* 92:599-609.
- Hirai, M.; Kozaki, I. and Kajiura, I. 1986. The rate of spontaneous inbreeding of trifoliolate orange and some characteristics of the inbred seedlings. *Jpn. J. Breed.* 36:138-146.
- Hwang, A. S. 1991. The polyembryony and identification of zygotic seedlings of lemon. *J. Agr. Res. China.* 40:225-232.
- Hwang, A. S. and Yeuh, C. S. 1989. Studies on polyembryony and improvement of breeding efficiency of oranges. *Tai Agr. Res. Ins. Spe. Pub.* 27:28-38.
- Iglesias, L.; Lima, H. and Simon, J. P. 1974. Isozyme identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. *J. Hered.* 65:81-84.
- Iwamasa, M.; Nito, N. and Ling, J. T. 1988. Intra and inter generic hybridization in the orange subfamily Aurantioidea. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1:123-130.
- Khan, I. A. and Roose, M. L. 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliolate orange. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113:105-110.
- Kijas, J. M. H.; Thomas, M. R.; Fowler, J. C. S. and Roose, M. L. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theor. Appl. Genet.* 94:701-706.
- Kobayashi, S.; Ieda, I. and Nakantani, M. 1979. Studies on the nucellar embryogenesis in *Citrus* II. Formation of the primordium cell of the nucellar embryo in the ovule of the flower bud, and its meristematic activity. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 48:179-185.

- Luro, F.; Costantino, G.; Terol, J. F.; Argout, X.; Allario, T.; Wincker, P.; Talon, M.; Ollitrault, P.; and Morillon, R. 2008. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina*).
- Mei, L. T.; Jian, K. S. and Xiu, X. D. 2007 Production of two mandarin trifoliolate orange hybrid.
- Moore, G. A. and Castle, W. S. 1988. Morphological and isozymic analysis of open-pollinated Citrus rootstock populations. *J. Hered.* 79:59-63.
- Morgante, M. and Olivieri, A. M. 1993 PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. *Plant J* 3:175-182.
- Mullis, K.; Fallona, S.; Schraf, S.; Saiki, R.; Horn, G. and Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51:263-273.
- Muralidharan, K. and Wakeland, E. K. 1993. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *Biotechniques* 14:362-390.
- Nageswara, M. R.; Soneji, J. R.; Chen, C.; Huang, S. and Gmitter, F. G. Jr. 2008. Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers *Tree Genetics Gen.* 4:113-124.
- Nassar, N. M. A. and Collevatti, R. G. 2005 Microsatellite markers confirm high apomixis level in cassava bred clones. *Hereditas.* 142:33-37.
- Navarro, L.; Olivares, F. O.; Juárez, J.; Aleza, P.; Piña, J.; A. Cerrera, M.; Fagoaga, C.; Pérez, R. M. and Peña, L. 2002. *Citrus* improvement in Spain through triploid breeding, somatic hybridization and genetic transformation. *In: 7<sup>th</sup> International citrus seminar: Improvement.* (Eds.). Donadio, L. C. y Sanches-Stuchi, E. *Citrus* Experimental station of Bevedoro, SF Brazil. 57-70 pp.
- 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.* 29:90-96.
- Novelli, V. M.; Machado, M. A. and Lopes, C. R. 2000. Isoenzymatic polymorphism in *Citrus* spp. and *P. trifoliata* (L.) Raf. (Rutaceae). *Genetics and Molecular Biology* 23:163-168.
- Oiyama, I. 1991. Use of pollen from somatic hybrid between *Citrus* and *Poncirus* in the production of triploids. *HortSci.* 1082.
- Oliveira, A. C.; Garcia, A. N.; Cristofani, M. and Machado, M. A. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica* 128:397-403.
- Ollitrault, P.; Dambier, D.; Vanel, F. and Froelicher, Y. 2000. Creation of triploid Citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. *Proceedings of First International Citrus Biotechnology Symposium. Acta Hort.* 535:191-198.
- Pieringer, A. P. and Edwards, G. J. 1967. Identification of nucellar and zygotic citrus seedlings by infrared spectroscopy. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 86:226-234.
- Rao, M. N.; Soneji, J. R.; Chen, C.; Huang, S. and Gmitter, F. G. 2008. Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like *Citrus* rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Gen. Genom.* 4:113-124.
- Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.10e. Exeter Ltd., Setauket.
- Roose, M. L. and Traugh, S. N. 1988. Identification and performance of Citrus trees on nucellar and zygotic rootstocks. *J Am. Soc. Hort. Sci.* 113:100-105.
- Ruiz, C.; Breto, M. P. and Asíns, M. J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica.* 112:89-94.

- Shahsavari A. R.; Izadpanah, K.; Tafazoli, E. and Sayed, T. B. E. 2007. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Sci. Hortic.* 112:310-314.
- Shareefa, M.; Singh, A. K.; Manish, S. and Dubey, A. K. 2009. Differentiation of nucellar and zygotic seedlings in citrus using ISSR markers. *Ind. J. Agr. Sci.* 79:884-889.
- Shi, P. Z.; Jian, K. S.; Zhi, Y. H.; TAN, B.; Zong, Z. X.; Hua, L. Y.; Xiu, S. S. and Rajam, V. M. 2009. *Citrus* biotechnology: achievements, limitations and future directions. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 15(1).
- Siragusa, M.; Depascuale, F.; Abbate, L. and Tusa, N. 2006. Identification of sour orange accessions and evaluation of their genetic variability by molecular marker analyses. *HortSci.* 41(1):84-89.
- Soares, F. W. dos S.; Lee, L. M. and da Cunha, S. A. P. 1995. Influence of pollinators on polyembryony in *Citrus*. *Acta Hortic.* 403:256-265.
- Soost, R. K.; Williams, T. E. and Torres, A. M. 1980. Identification of nucellar and zygotic seedlings of *Citrus* with leaf isozymes. *HortSci.* 15:728-729.
- Soost, R. K. and Cameron, J. W. 1980. 'Oroblanco', a triploid pummelo grapefruit hybrid. *HortScience.* 15:667-669.
- Soost, R. K. and Cameron, J. W. 1985. 'Melogold' a triploid pummelo-grapefruit hybrid. 20:1134-1135.
- Soost, R. K. and Roose, M. L. 1996. *Citrus*, chapter 6. *In: Janick, J. and Moore, J. N. (Eds.). Fruit breeding: tree and tropical fruits.* Wiley, New York. 257-323 pp.
- Spiegel, R. P.; Bardi, A. and Shani, A. 1977. Peroxidase isozymes as a tool for early separation of nucellar and zygotic citrus seedlings. *In: Second Meeting of the International Society of Citriculture. Florida-USA.* 2:619-624.
- Stanley, W. L. and Jurd, L. 1971. *Citrus* coumarins. *J. Agr. Food Chem.* 19:1106-1110.
- Starrantino, A. and Recuperero, G. 1982. Citrus hybrids obtained in vitro from 2x females by 4x males. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1:31-32.
- Tatum, J. H.; Berry, R. E. and Hearn, C. J. 1974. Characterization of *Citrus* cultivars and separation of nucellar and zygotic seedlings by thin layer chromatography. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 87:75-81.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucl Acid Res* 17:6463-6471.
- Tusa, N.; Abbate, L.; Ferrante, S.; Lucretti, S. and Scarano, M. T. 2002. Identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus* interploid crosses by means of isozymes, flow cytometry and ISSR-PCR. *Cel and Mol Bio Letters* 7:703-708.
- Tusa, N.; Fatta del Bosco, S.; Nardi, L. and Lucretti, S. 1996. Obtaining triploid plants by crossing citrus lemon cv. 'Femminello' 2N x 4N allotetraploid somatic hybrids. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1:133-136.
- Weinbaum, S. A.; Cohen, E. and Spiegel, R. P. 1982. Rapid screening of 'Satsuma' mandarin progeny to distinguish nucellar and zygotic seedlings. *Hort. Sci.* 17:239-240.
- Yildiz, E.; Kaplankiran, M.; Demirköser T.; Uzun, H. A. and Toplu, C. 2013. Identification of Zygotic and Nucellar Individuals Produced from Several Citrus Crosses Using SSRs Markers. *Not. Bot. Hort. Agrobot.* 41(2):478-484.
- Yun, J. U.; Yang, H. B.; Jung, Y. H.; Yun, S. H.; Kim, K. S.; Kim, C. S. and Song, K. J. 2007. Identification of zygotic and nucellar mandarin seedlings using randomly amplified polymorphic DNA. *Hort. Environ. Bio.* 48:171-175.