

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR CON MARCADORES ISSR DE LA COLECCIÓN DE CÍTRICOS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS

## MOLECULAR CHARACTERIZATION WITH ISSR MARKERS OF THE CITRUS COLLECTION FROM THE UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS

<sup>1</sup>**Christian Camilo Castañeda-Cardona**, <sup>2</sup>**Rogelio Portela-Puerta**,  
<sup>3</sup>**Yacenia Morillo-Coronado**

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo, Esp. en Biotecnología Agraria. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Universidad de los Llanos. Villavicencio, Colombia. <sup>2</sup> Estudiante de Ingeniería Agronómica. Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. <sup>3</sup> Ingeniera Agrónoma. Doctora en Mejoramiento Genético de Plantas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. AGROSAVIA. Palmira, Colombia.

<sup>1</sup>christian.castaneda@unillanos.edu.co, <sup>2</sup>rogelio.portela@unillanos.edu.co,  
<sup>3</sup>ymorillo@agrosavia.co

**Citación:** Castañeda-Cardona, C., Portela-Puerta, R., y Morillo-Coronado, Y. (2021). Caracterización molecular con marcadores ISSR de la colección de cítricos de la UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 12(2), 67 – 84. DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.3884>

### RESUMEN

**Contextualización:** los cítricos son una de las especies arbóreas más cultivadas en todo el mundo. Poseen una gran importancia económica por su producción es mayor a cualquier otro frutal.

**Vacío de conocimiento:** pese a la gran demanda de cítricos en Colombia, se conoce muy poco acerca del origen y la diversidad genética. Asimismo, no se han realizado estudios de caracterización molecular de las variedades de cítricos de la colección de la Universidad de los Llanos, los cuales son importantes para implementar estrategias de conservación y uso potencial de los recursos genéticos.

**Propósito del estudio:** evaluar la diversidad genética de cuatro variedades de cítricos (Naranja Tangelo, Naranja Valencia, Mandarina Arrayana y Limón Castilla), establecidas en la Universidad de los Llanos con siete cebadores ISSR.

**Metodología:** la caracterización molecular se realizó en los laboratorios de Biotecnología Vegetal y Genética y Reproducción Animal de la Universidad de los Llanos. Se generó una matriz binaria de ausencia y presencia. La similitud genética entre los individuos se calculó utilizando el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979). El análisis clúster se realizó por el método UPGMA y se generó un dendrograma utilizando el paquete

estadístico NTSYS, versión 2.02 PC. Se estimó la heterocigosidad incesgada, el porcentaje de loci polimórficos y el  $f$  estadístico incesgado con un intervalo de confianza del 95%, utilizando el paquete estadístico TFGA, versión 1.3.

**Resultados y conclusiones:** se obtuvo un total de 80 bandas, de las cuales el 86.25% fueron polimórficas. La heterocigosidad estimada promedio para la población total fue de 0.29, que evidencia una moderada diversidad genética. Los cebadores CGA y AG fueron los de mayor aporte a la estimación del polimorfismo genético. Se encontró poca diferenciación genética ( $F_{st} = 0.03$ ). A un nivel de similitud de 0.42 se formaron siete grupos, siendo los grupos 1 y 2 los que agruparon la mayor cantidad de genotipos de las cuatro especies, siendo en su mayoría de mandarina Arrayana y de naranja Tangelo. Los siete cebadores fueron significativos para la estimación de la diversidad genética en cítricos y constituyen una herramienta con gran potencial para posteriores trabajos de mejoramiento en esta especie.

**Palabras Clave:** *Citrus*; Diferenciación genética; Germoplasma; Microsatélites; Variabilidad Genética

## ABSTRACT

**Contextualization:** Citrus trees are one of the most cultivated tree species in the world. They are of great importance since their production is greater than that of any other fruit tree.

**Knowledge gap:** Despite the great demand for citrus fruits in Colombia, there is limited knowledge about the origin and genetic diversity. Likewise, molecular characterization studies of citrus varieties established in the work collection of the Universidad de los Llanos have not been carried out, which is of vital importance to implement conservation strategies and potential use of genetic resources.

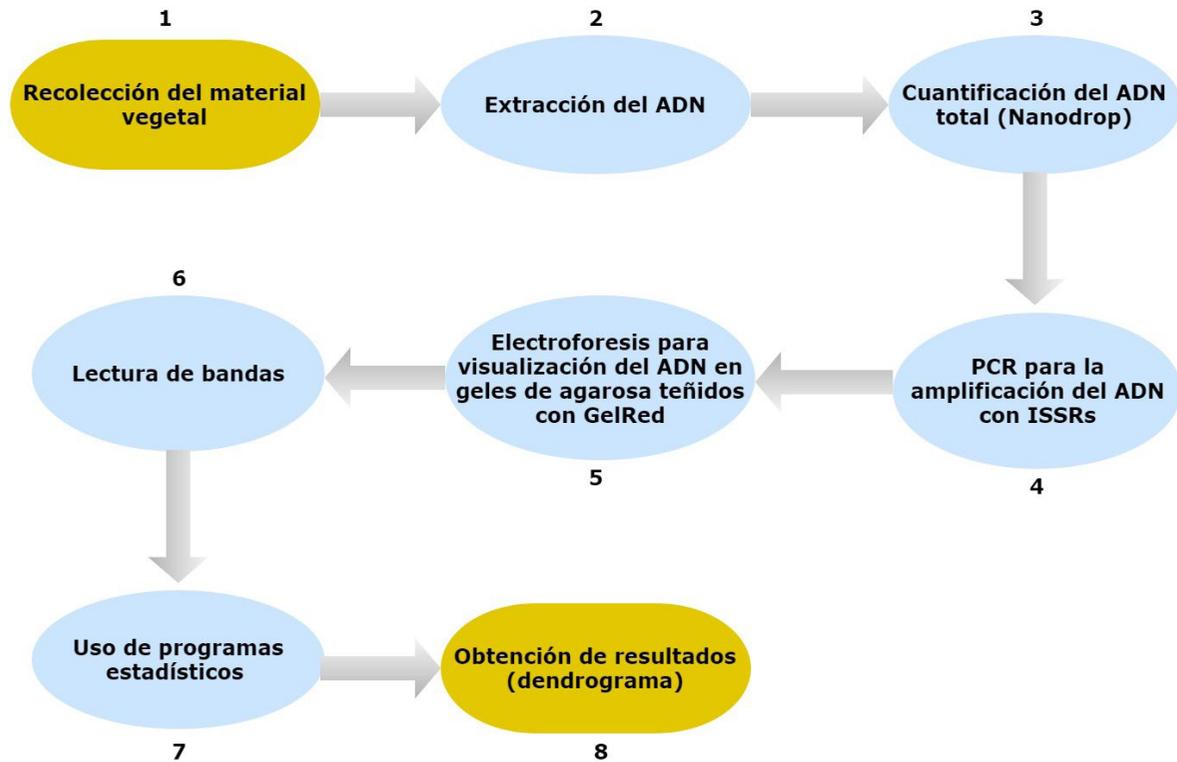
**Purpose:** to evaluate the genetic diversity of four citrus varieties (Tangelo orange, Valencia orange, Arrayana mandarin and Castilla lemon), established at the University of the Llanos with seven ISSR primers.

**Methodology:** The molecular characterization was carried out in the Plant Biotechnology and Animal Reproduction and Genetics laboratories of the Universidad de los Llanos Universidad de los Llanos. A binary matrix of absence and presence was generated. The genetic similarity between the individuals was calculated using the coefficient of similarity of Nei and Li (1979). The cluster analysis was performed by the UPGMA method and a dendrogram was generated using the NTSYS statistical package, version 2.02 pc. The unbiased heterozygosity, the percentage of polymorphic loci, and the unbiased  $f$  statistic were estimated with a 95% confidence interval, using the TFGA statistical package, version 1.3.

**Results and conclusions:** A total of 80 bands were obtained, of which 86.25% were polymorphic. The average estimated heterozygosity for the total population was 0.29, which shows a moderate genetic diversity. The CGA and AG primers were the ones with the greatest contribution to the estimation of genetic polymorphism. Little genetic differentiation was found ( $F_{st} = 0.03$ ). At a level of similarity of 0.42, seven groups were formed, with groups 1 and 2 being the ones that grouped the largest number of genotypes of the four species, being mostly Arrayana mandarin and Tangelo orange. The seven primers were significant for the estimation of genetic diversity in citrus fruits and constitute a tool with great potential for further improvement work in this species.

**Keywords:** Citrus; Genetic Differentiation, Germplasm; Microsatellite; Genetic Variability

## RESUMEN GRÁFICO



Fuente: autores.

### 1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son un género que alberga 150 especies, de las que se destacan la naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck), la mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), el limón (*Citrus limon* L. Osbeck), la lima (*Citrus aurantifolia* Christm) y la toronja (*Citrus paradisi* Macfad), originarias del sudeste asiático, en los territorios de Malasia, China, Filipinas e Indonesia (Anderson *et al.*, 1996). Son de gran importancia a nivel mundial, ubicándose entre las 11 frutas más producidas en el mundo; en el cuarto puesto está la naranja, en el sexto las mandarinas, tangerinas y clementinas, y en el undécimo, las limas y limones (FAOSTAT, 2017). En el año 2016 se produjeron más de 124 millones de toneladas de cítricos en el mundo, donde Colombia aportó 239 mil toneladas (FAOSTAT, 2017).

En Colombia, la producción de cítricos tuvo su máxima producción en el año 2013 con 650 mil toneladas en un área de 38 mil hectáreas. Después, hubo una reducción en el área de siembra en el año 2015 que redujo la producción en 100 mil toneladas; sin embargo, en años posteriores hasta el año 2018 el sector cítrico se recuperó llegando a las 600 mil toneladas. Este cultivo se concentra en la zona de Piedemonte Llanero y en la región frutícola del Ariari. Para el año 2018 el departamento del Meta tuvo un área de 6650.6 ha; siendo el primero con la mayor área total sembrada en el país, equivalente al 17.68%, alcanzando una producción de 104.79 t, y un rendimiento de 1.76 t/ha. Este departamento ocupó el tercer puesto en producción con el 17.46% sólo siendo antecedido

por los departamentos del Valle y el Quindío (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019; Sánchez et al., 2020). La citricultura en el departamento del Meta tiene una trayectoria de más de 50 años. Desde la introducción de las primeras especies por parte de colonos, se ha logrado una adecuada adaptabilidad, dando lugar a cultivares con diferentes niveles de productividad y rentabilidad entre los que se destacan en orden de importancia, la naranja Valencia, la lima ácida Tahití y la mandarina Arrayana (Orduz et al., 2012).

Los recursos fitogenéticos son de gran importancia a nivel mundial ya que proporcionan la seguridad alimentaria y se sustenta a través de ellos el desarrollo de la agricultura para responder a los cambios ambientales y socioeconómicos de determinado país o determinada región (FAO, 2020). Los Bancos de germoplasma con mayor número de colecciones de cítricos se encuentran ubicados en Japón, China, EEUU, Francia y España; siendo Japón el país con mayor número de especies conservadas, manteniendo seis colecciones de más de 1200 genotipos (García, 2013). Los bancos de germoplasma con mayor número de colecciones de cítricos en Colombia están a cargo de Corpoica (actualmente Agrosavia), con 205 accesiones diferentes, de las cuales 44 son materiales nacionales y 161 materiales extranjeros, que incluyen variedades mejoradas, variedades obsoletas y variedades de agricultores (Valencia et al., 2010). Los recursos fitogenéticos de los cítricos en el departamento del Meta se concentran en los cultivos establecidos en el Piedemonte Llanero, donde se han evaluado por el Centro de Investigación La Libertad de Corpoica (Agrosavia) 13 variedades provenientes de tres especies (*C. sinensis* (L.) Osbeck, *C. paradisi* Macf., *C. reticulata* Blanco) y dos híbridos (*C. sinensis* (L.) Osbeck x *C. reticulata* Blanco y *C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macf.) del género *Citrus* (Orduz et al., 2012).

El uso de marcadores moleculares es ya una actividad permanente para la caracterización y el manejo de los bancos de germoplasma (Barkley et al., 2006). Estas técnicas permiten detectar duplicados en las colecciones, corroborar la identidad de las entradas, establecer relaciones genéticas entre introducciones, realizar estudios taxonómicos y de diversidad genética, entre otros.

Varios marcadores han sido utilizados para caracterizar la diversidad genética en cítricos, como los reportados por Al-Nadabi et al. (2018), quienes evaluaron la relación genética de 27 cultivares de cítricos y seis accesiones silvestres utilizando AFLP. Los marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) han sido utilizados para identificar especies de cítricos (Munankarmi et al., 2014; Shahzadi et al., 2016). Se han realizado varios estudios filogenéticos utilizando SNP, que van desde 67 a 1457 (Curk et al., 2016; Garcia-Lor et al., 2015; Ollitrault et al., 2012); además, también se han utilizado este tipo de marcadores para estudios de diversidad genética y análisis de la estructura poblacional en germoplasma de cítricos como los llevados a cabo por Yu et al. (2018). Igualmente, los marcadores SSR han sido ampliamente utilizado en estudios filogenéticos de cítricos (Barkley et al., 2006; Garcia-Lor et al., 2012), así como en la identificación de híbridos de *Citrus aurantifolia* con *Citrus limon* (Bermúdez et al., 2017) e híbridos de limón (Carrillo et al., 2018). Más recientemente, diferentes marcadores moleculares como los de secuencia polimórfica amplificada y cortada (CAPS) de cpDNA (Yamamoto et al., 2013; Ninomiya et al., 2015; Fujii et al., 2016; Nonaka et al., 2017; Dorji y Yapwattanaphun, 2015; Froelicher et al., 2011), se han utilizado para la identificación, análisis de parentesco y filogenia de especies o cultivares de cítricos.

Entre las técnicas de marcadores basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los marcadores conocidos como Inter-Secuencias Simples Repetitivas (ISSRs), son uno de los más sencillos y ampliamente utilizados (Singh et al., 2014). Su iniciador para PCR está compuesto de una secuencia microsatélite como (GACA) $_n$  anclada al extremo 3' o 5' por dos a cuatro nucleótidos arbitrarios usualmente degenerados (Zietkiewicz et al., 1994). De esta manera se amplifica una región situada entre dos microsatélites cercanos que incluyan los nucleótidos complementarios. Estos marcadores son polimórficos en la naturaleza, abundantes en el genoma, y combinan los beneficios de los marcadores AFLP y SSR con la universalidad de los marcadores RAPD (Henareh et al., 2016). Los marcadores ISSR son informativos sobre las especies de las que no se dispone de secuencias del genoma y presentan una alta reproducibilidad (Morillo et al., 2018), y tienen la capacidad de examinar y diferenciar rápidamente entre individuos estrechamente relacionados entre sí (Zietkiewicz et al., 1994). El mayor inconveniente de los marcadores de la ISSR es que son dominantes y se heredan en forma Mendeliana, por lo que pueden influir en la estimación de la diversidad genética.

Los marcadores ISSR se han utilizado para el mejoramiento genético de plantas, en lo relacionado con la caracterización del germoplasma de especies vegetales y la evaluación de la diversidad genética (Castañeda-Cardona et al., 2020; Vargas et al., 2020, Martínez et al., 2020); estudios filogenéticos de diferentes especies (Varshney et al., 2005); para la identificación de marcadores de ADN vinculados a rasgos agronómicos; entre otros. Shasavary et al. (2007) y Yang et al.

(2010), son algunos de los que han empleado estos marcadores en cítricos, para estudios de diversidad genética y las relaciones filogenéticas entre especies del género Citrus. Sharafi et al. (2017), evaluaron la diversidad genética de 19 cultivares de cítricos utilizando marcadores microsatélites SSR, ISSR y marcadores de secuencias polimórficas amplificadas (CAPs).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar cuatro variedades de cítricos (Naranja Tangelo, Mandarina Arrayana, Naranja Valencia, Limón Castilla) de la colección de trabajo de la Universidad de los Llanos con marcadores ISSR, con el fin de contribuir al conocimiento de la diversidad genética de los cítricos más usados en la región, y planear estrategias de manejo y conservación de los recursos fitogenéticos, así como el establecimiento de programas de mejoramiento de la especie.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Para la caracterización molecular de la diversidad genética se evaluaron 44 genotipos de cítricos pertenecientes a la colección de trabajo de la Unidad Agrícola Experimental Barcelona de la Universidad de los Llanos (Villavicencio/Meta, Colombia), localizada a 4°04'30" latitud Norte y 73°34' 58" de longitud Oeste, a 469 m.s.n.m. Los 44 genotipos se distribuyeron en cuatro variedades así: 11 de Naranja Valencia (NV), 18 de Mandarina Arrayana (MA), 10 de Naranja Tangelo (NT) y cinco de Limón Castilla (LC) (Tabla 1). Para la extracción de ADN se tomaron al azar de cada genotipo dos a tres hojas jóvenes y en buen estado fitosanitario, las cuales se almacenaron en bolsas ziploc que contenía sílica gel, para ser llevadas al laboratorio para su análisis respectivo.

**Tabla 1.** Genotipos de cítricos utilizados en la caracterización molecular con marcadores ISSR.

Muestra	Especie	Identificación de la muestra	Muestra	Especie	Identificación de la muestra
1	Naranja Valencia	NV1	23	Naranja Valencia	NV7
2	Mandarina Arrayana	MA1	24	Mandarina Arrayana	MA10
3	Naranja Valencia	NV2	25	Mandarina Arrayana	MA11
4	Naranja Tangelo	NT1	26	Naranja Tangelo	NT6
5	Naranja Tangelo	NT2	27	Naranja Valencia	NV8
6	Naranja Tangelo	NT3	28	Naranja Tangelo	NT7
7	Mandarina Arrayana	MA2	29	Naranja Valencia	NV9
8	Mandarina Arrayana	MA3	30	Naranja Valencia	NV10
9	Naranja Valencia	NV3	31	Limón Castilla	LC3
10	Mandarina Arrayana	MA4	32	Mandarina Arrayana	MA12
11	Naranja Valencia	NV4	33	Mandarina Arrayana	MA13
12	Mandarina Arrayana	MA5	34	Mandarina Arrayana	MA14
13	Mandarina Arrayana	MA6	35	Naranja Tangelo	NT8
14	Naranja Tangelo	NT4	36	Naranja Tangelo	NT9
15	Limón Castilla	LC1	37	Limón Castilla	LC4
16	Mandarina Arrayana	MA7	38	Mandarina Arrayana	MA15
17	Mandarina Arrayana	MA8	39	Naranja Tangelo	NT10
18	Limón Castilla	LC2	40	Mandarina Arrayana	MA16
19	Naranja Tangelo	NT5	41	Mandarina Arrayana	MA17
20	Naranja Valencia	NV5	42	Mandarina Arrayana	MA18
21	Naranja Valencia	NV6	43	Naranja Valencia	NV11
22	Mandarina Arrayana	MA9	44	Limón Castilla	LC5

Fuente: Autores

### Extracción de ADN y amplificación de marcadores ISSR

El ADN genómico se obtuvo mediante el protocolo de extracción de ADN propuesto por Doyle & Doyle (1990). Para la evaluación de la calidad y cantidad el ADN obtenido se realizaron geles de agarosa al 0.8% corridos en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 0.045M; EDTA 0.001M) a 80 voltios, 400 mA por 45 minutos y teñidos con GelRed®, utilizando para ello una cámara horizontal marca Maxicell Primo EC-340. Para la cuantificación de ADN total se utilizó el método de espectrofotometría en ácidos nucleicos a través del Nanodrop. El ADN cuantificado se diluyó en agua tipo HPLC a un volumen total de 100 µL a 20 ng/µL y se almacenó a -20 °C.

Para el estudio de diversidad genética se utilizaron siete cebadores ISSR (Tabla 2). El coctel de amplificación se preparó en un tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 ml y consistió de Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, DNTPs 0.2 mM, Taq Polimerasa 1U, cebador 2 µM y ADN genómico 20ng, para un volumen final de 25 µL por muestra. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador marca THERMO SCIENTIFIC modelo TCA0001. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de una nueva desnaturalización a 95 °C por 30 segundos; hibridación a una temperatura comprendida entre 50 °C y 58 °C por 45 segundos (dependiendo del cebador utilizado, ver tabla 2); elongación a 72 °C por 2 minutos, 37 ciclos desde la desnaturalización a la elongación; y por último una extensión final a 72 °C por 7 minutos. En cada ensayo de amplificación se incluyó un control negativo o blanco sin ADN para verificar la ausencia de contaminación. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% a 100V, en solución de TBE 0.5X (Tris-Borato-EDTA), durante 90 minutos.

Posteriormente, se visualizaron en un transiluminador U/V Scientific modelo GL-3120.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados para estudiar la diversidad genética en *Citrus* spp.

Cebador	Secuencia (5' a 3') *	T° hibridación
CCA	DDB(CCA)5	55
CGA	DHB(CGA)5	58
AG	HBH(AG)7A	50
CT	DYD(CT)7C	55
TG	HVH(TG)7T	55
CA	DBDA(CA)7	50
ACA	BDB(ACA)5	50

\*Las designaciones son usadas para los sitios degenerados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); V (G ó A ó C); D (G ó A ó T); Y (C ó T).

**Fuente:** Autores.

### Análisis estadístico

Se generó una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0) con base en la información de las amplificaciones. La similitud genética entre los genotipos se estimó con el coeficiente de Nei y Li (1979). El análisis de agrupamiento se realizó con el programa SAHN de NTSYS (Numerical Taxonomy System for personal Computer, versión 2.02 PC) utilizando el método UPGMA, método gráfico de agrupamiento por parejas, que usa el promedio aritmético no ponderado. El dendrograma que indica la agrupación de los genotipos se construyó con el programa TREE de NTSYS -pc. Se calculó el coeficiente de correlación cofenética, que es una medida entre los valores de similitud del dendrograma y los de la matriz original de similitud. Este análisis se realizó utilizando los procesos COPH y MXCOMP del

paquete NTSYS-pc. Se realizó un análisis de correspondencia múltiple (ACM) para asociar columnas y filas de la matriz binaria determinando el nivel de asociación o determinar proximidad (Joseph, 1992).

Para estimar la diversidad genética se utilizaron los parámetros de heterocigosidad incesgada ( $H_e$ ), número y porcentaje de loci polimórficos utilizando el programa estadístico TFGA (Tools For Population Genetic Analyses, versión 1.3, 1997) y se determinó el  $f$  estadístico incesgado con un intervalo de confianza del 95% (Wright, 1978). Igualmente, con este programa se construyó un dendrograma obtenido de la mezcla de los

datos de todos los individuos dentro de las variedades, con el fin de observar el nivel de similitud entre ellas. Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el programa GenAlex versión 6.2 (Peakall y Smouse, 2012) con 999 permutaciones, con el fin de determinar las diferencias entre y dentro de los grupos formados.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Diversidad genética

Los siete cebadores ISSR generaron 80 patrones de bandas, de las cuales 69 fueron polimórficas. El número de bandas oscilaron entre ocho para el cebador CA y 14 para los cebadores AG y CT (Tabla 3).

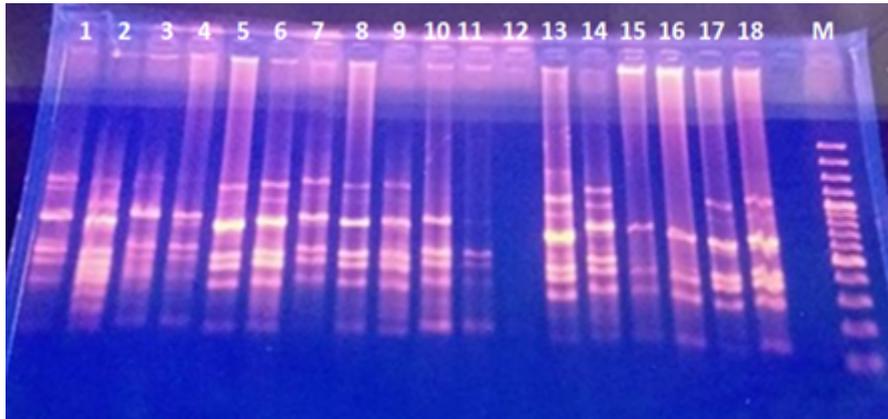
**Tabla 3.** Número de bandas, número y porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad estimada ( $H_e$ ), coeficiente de diferenciación genética ( $F_{st}$ ) de siete cebadores ISSR evaluados en 44 genotipos de cítricos.

Cebador	No. bandas totales	No. de Loci Polimórficos	% Loci polimórficos	$H_e$	$F_{st}$
ACA	11	10	90.91	0.285	0.035
CA	8	7	87.5	0.281	0.012
CCA	11	10	90.9	0.317	0.091
TG	9	9	100	0.347	0.006
AG	14	11	78.57	0.252	0.031
CGA	13	12	92.31	0.293	0.007
CT	14	10	71.43	0.227	0.026
Total	80	69	87.374	0,286	0.030

**Fuente:** Autores.

Los cebadores AG y CGA fueron los que obtuvieron el mayor número de bandas polimórficas con valores de 11 y 12, respectivamente.

En la figura 1 se visualiza el patrón de bandas generado por el cebador AG.



**Figura 1.** Patrón de bandas generadas por el cebador ISSR (AG)<sub>n</sub>. **M:** marcador molecular; **12:** Control.

**Fuente:** Autores.

La heterocigosidad estimada ( $H_e$ ) estuvo comprendida entre 0.22 y 0.34 para los cebadores CT y TG, respectivamente, donde el promedio total para población evaluada fue de 0.29. Esto evidencia una moderada diversidad genética, indicando de esta manera la existencia de una importante fuente de diversidad en cítricos que puede ser explotada en programas de mejoramiento actuales y futuros. Un alto valor de polimorfismo fue detectado con los siete cebadores evaluados (87.37%), donde el cebador TG fue el que presentó el mayor porcentaje de loci polimórficos (100), seguido por el cebador AG (92.31%). Estos cebadores podrían ser considerados de gran utilidad para detectar polimorfismo, no solo en cítricos sino en especies relacionadas. El menor valor lo obtuvo CT correspondiente al 71.43%.

Los resultados encontrados son similares a los reportados por Munankarmi et al. (2018), quienes, al evaluar la diversidad genética en 60 cultivares de lima ácida (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) colectados en diferentes localidades del este de Nepal, utilizando 21

marcadores polimórficos ISSR, encontraron una moderada diversidad genética, con valores de  $H_e$  que fluctuaron entre 0.173 y 0.215.

Por su parte Kumar et al. (2010), encontraron una baja heterocigosidad estimada de 0,12 en su estudio de diversidad de *Citrus indica*, con marcadores moleculares ISSR, lo que indica un bajo nivel de diversidad genética en esta especie. Sin embargo, estos marcadores lograron diferenciar el origen de cada uno de las introducciones dentro de cada taxón con un polimorfismo moderado (38-56%).

En contraste, Al-Nadabi et al. (2018), en su estudio de diversidad genética de 27 cultivares de cítricos y seis accesiones silvestres con marcadores AFLP, utilizando combinaciones de cuatro pares de cebadores, encontraron que todos los cultivares y accesiones de cítricos presentaron una baja diversidad genética ( $H = 0.0281$  a  $0.1300$ ), con porcentajes de loci polimórficos que fluctuaron entre 8 y 35%. Las poblaciones de las seis accesiones de cítricos silvestres mostraron un nivel muy bajo

de diversidad genética ( $<0.0700$ ). Igualmente, Martínez (2013) en su estudio de diversidad genética y estructura poblacional de 111 genotipos de *Citrus* spp. (99 individuos de mandarinas, 5 Tangelos, 4 Naranjas, 1 toronja y 2 limas ácidas), con ocho marcadores RAM's también conocidos como ISSR y 14 marcadores microsatélites, encontró una heterocigosidad promedio esperada ( $H_e$ ), para toda la población de 0.36, y un porcentaje de loci polimórficos del 96%, lo que indica una alta diversidad genética de los genotipos evaluados. Según Scarano (2003), la variabilidad genética en los cítricos está relacionada con el alto número de unidades taxonómicas (especies e híbridos), apomixis, alta compatibilidad sexual entre los cítricos con especies relacionadas y la alta frecuencia de mutaciones.

Algunas hipótesis sobre el origen de los cultivares de naranjas, toronjas y limones, argumentan que estos se originaron a partir de plántulas nucleares; en consecuencia, la diversidad genética en estos grupos es relativamente baja (Luro et al., 2008). Por el contrario, en los cultivares de mandarinas, pomelos y cidros se encuentran altos niveles de diversidad genética, debido a que muchas de sus variedades surgieron a través de la hibridación sexual. Para el caso de los grupos de los limones, mediante análisis isoenzimático, se han reportado bajas tasas de polimorfismo intraespecífico y son relativamente homocigotos (Nicolosi et al., 2007; Ollitrault et al., 2010).

El coeficiente de diferenciación genética ( $F_{st}$ ), obtenido al evaluar los 44 genotipos de cítricos pertenecientes a la colección de trabajo de la Universidad de los Llanos, con siete marcadores ISSR, fue de 0.03, con una desviación estándar de 0.0047, lo que indica poca

diferenciación genética de acuerdo con Wright (1978), donde los valores de  $F_{st}$  comprendidos entre 0.0 y 0.05 muestran poca diferenciación genética (Tabla 3). Lo anterior puede también explicarse por el flujo de genes entre las especies evaluadas. La baja diferenciación genética encontrada en *C. sinensis*, al igual que en los géneros como *Fortunella* y *Poncirus*, se debe a que cada una de sus numerosas formas cultivadas ha sido propagada a partir de un progenitor único por vía asexual mediante injertos, esquejes, acodos y embrionía nucelar, lo que asegura el mantenimiento de la misma constitución genética en la descendencia que forma una variedad hortícola (cultivar) o clonal (Webber, 1943).

En un estudio de diversidad genética con 51 introducciones de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck), Morillo et al. (2009) encontraron un valor de  $F_{st}$  de 0.07, con una desviación estándar de 0.01, los cebadores que mayor aporte hicieron a la diferenciación genética fueron CCA y CA, con un  $F_{st}$  de 0.11 para cada uno, lo que indica poca diferenciación genética. Los resultados se deben posiblemente a que las naranjas tienen una estrecha base genética, y que la variabilidad puede deberse a diversos factores como la hibridación, mutación o tipo de reproducción.

### Análisis clúster

El análisis clúster basado en el coeficiente de similitud de Nei-Li (1979) usando el método de agrupamiento genético promedio (UPGMA) diferenció los 44 genotipos de cítricos en siete grupos a un nivel de similitud del 42% (Figura 2). Se encontró un coeficiente ( $r$ ) de correlación cofenética de 0.96, lo cual indica que el dendrograma representa fielmente los valores de la matriz de similitud.

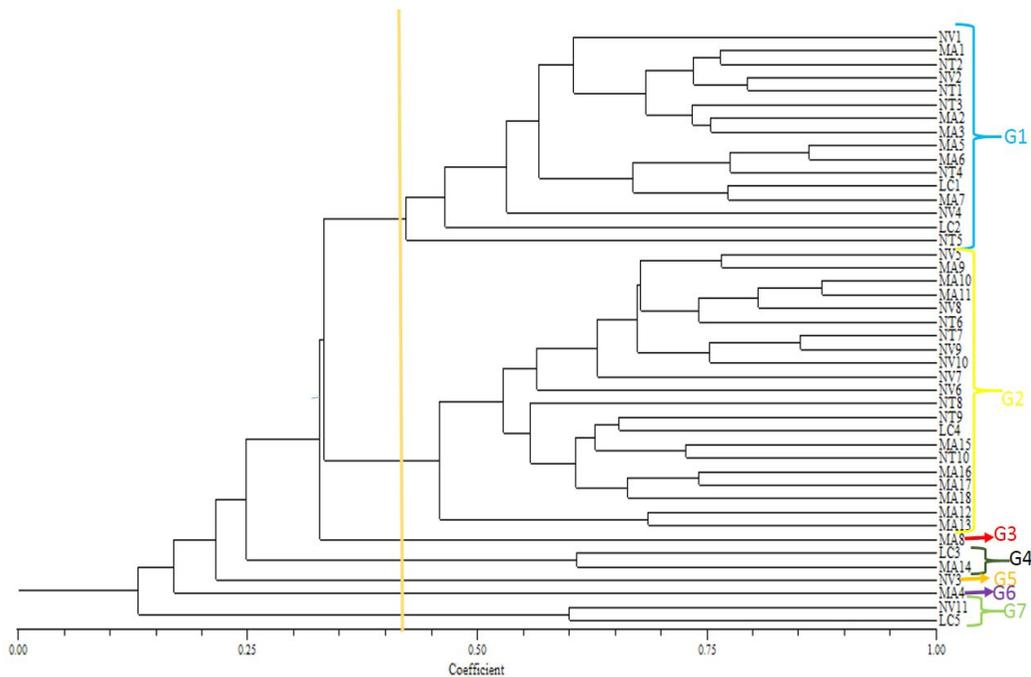
Como se puede observar en la figura 2, los grupos 1 y 2 son los que concentran la mayor cantidad de genotipos evaluados pertenecientes a las variedades de Naranja Tangelo (NT), Naranja Valencia (NV), Mandarina Arrayana (MA) y Limón Castilla (LC), donde el grupo 1 contó con 16 genotipos, en tanto que el grupo 2 con 21. Cabe resaltar que este último concentró la mayor cantidad de genotipos de mandarina (*C. reticulata*). El resto de grupos (G3 al G7) estuvieron representados por un bajo número de genotipos. Los grupos 4 y 7 fueron los que se presentaron un mayor valor de similitud correspondiente al 60%.

En general, los agrupamientos no mostraron una diferencia relevante entre las cuatro variedades de cítricos consideradas en este estudio, lo cual es consistente con el valor de Fst de 0.03 encontrado; sin embargo, la técnica ISSR proporcionó una información valiosa sobre las relaciones genéticas entre las variedades establecidas en la colección. No se observó un patrón claro que diferencie a los genotipos, es muy probable que eso se deba a la utilización de una variedad común para la realización de los injertos, ya que los genotipos incluidos en este estudio estaban injertados sobre mandarina cleopatra (*Citrus x reshni*. ex Tanaka), siendo este patrón el más utilizado como portainjertos para especies comerciales de mandarinas, naranjas y limas ácidas (Martínez, 2013).

En el dendrograma, los individuos pertenecientes a naranja, mandarina y limón, se

distribuyen a lo largo de los siete grupos formados, lo cual es el resultado de los diferentes cruzamientos entre distintas especies de cítricos, principalmente cidros, mandarinas, naranjo amargo, naranjo dulce, pummelos, y micranthas. Carbonell-Caballero et al. (2015) muestran que los genomas del cloroplasto del género *Citrus* contienen una "memoria" de la herencia paterna además de la materna, lo cual ha permitido construir y reforzar los conocimientos sobre las relaciones filogenéticas existentes dentro de este género. De este modo se puede conocer el origen de los principales grupos varietales de cítricos que se comercializan actualmente (Ibañez et al., 2015).

Algunos estudios basados en caracteres bioquímicos (Scora, 1975) y morfológicos (Barrret y Rhodes, 1976) sugieren que la mayoría de especies del género *Citrus* son probablemente híbridos directos o híbridos sucesivos de tres especies ancestrales (*C. medica* L. -cidro-, *C. reticulata* -mandarinas- y *C. maxima* (Burm.) Merr. -zamboas-). Estudios basados en diversidad morfológica (Ollitrault et al., 2003) y en metabolitos secundarios (Fanciullino et al., 2006) confirmaron la importancia de estas tres especies en el origen de la mayoría de cítricos comestibles y la contribución mayor de la diferenciación entre estas especies en la diversidad fenotípica global de los cítricos. Además, *C. micrantha* Wester (Papeda) es considerado un ancestro de la lima mejicana (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing) (Federici et al., 1998; Nicolosi et al., 2000; Ollitrault et al., 2012).

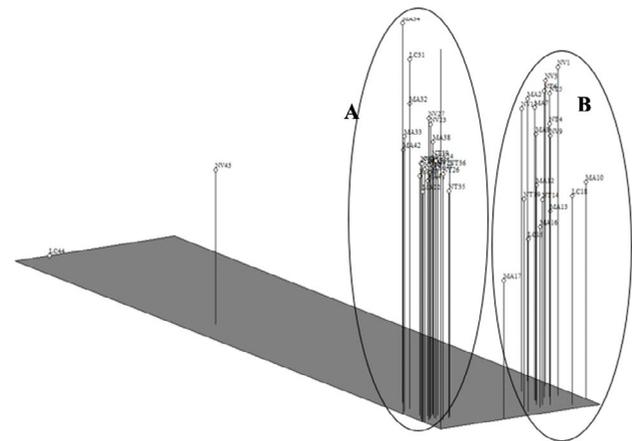


**Figura 2.** Dendrograma de la estructura genética de 44 genotipos de cítricos basado en el coeficiente de Nei -Li y calculado de los datos combinados de siete marcadores ISSR.

**Fuente:** Autores.

En el Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM), se corrobora nuevamente lo presentado en el dendrograma. No se observó un patrón claro que diferencie a los genotipos, originando de esta forma dos grandes grupos (A y B), conteniendo cada uno de ellos individuos representantes de las cuatro variedades (MA, NT, NV y LC) (Figura 3). Lo anterior, posiblemente se deba a la presencia de alelos compartidos entre los individuos, así como también a un ancestro común.

Lo anterior es consistente con lo encontrado por Morillo et al. (2009), en su estudio de caracterización molecular de 34 accesiones de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck del Banco de Germoplasma Corpoica-Palmira (actualmente Agrosavia) con 19 marcadores microsatélites, donde los agrupamientos no mostraron una marcada diferenciación en cuanto a la clasificación de las naranjas en blancas, navel y sanguíneas.

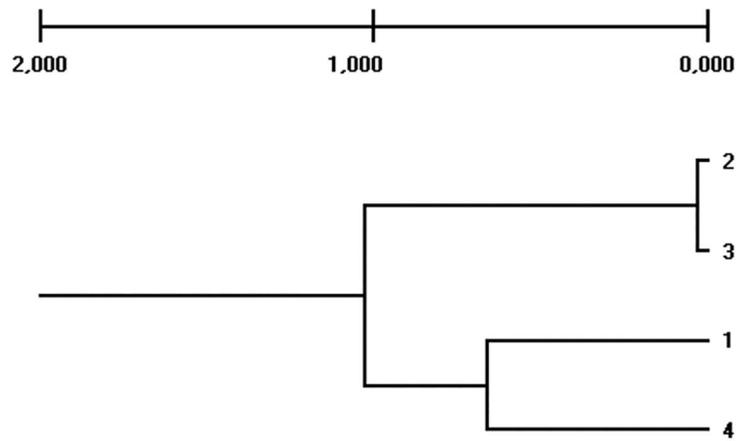


**Figura 3.** Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM) de 44 genotipos de *Citrus* spp. evaluados y construido con los datos obtenidos de siete marcadores ISSR.

**Fuente:** Autores.

Al analizar las cuatro variedades se puede observar que el Limón Castilla y la Naranja Valencia fueron las que presentaron una mayor similitud, lo que las permitió unirse en un solo grupo (Figura 4). Esto confirma las relaciones genéticas entre estas especies. Nicolosi et al. (2000) propuso que el limón surgió del cruce directo entre el naranjo

amargo (*C. aurantium*) y un cidro (*C. medica*). Esta teoría fue apoyada por Gulsen y Roose (2001) y Ollitrault et al. (2012). La Mandarina Arrayana se agrupó con la Naranja Tangelo. Este agrupamiento obedece a que la Naranja Tangelo es producto del cruzamiento entre la mandarina (*C. reticulata*) y el pomelo (*C. paradisi*).



**Figura 4.** Dendrograma obtenido con el método UPGMA usando el programa TFPGA para las cuatro variedades de cítricos establecidas en la colección de trabajo de la Universidad de los Llanos (Villavicencio, Meta).

1. Limón Castilla. 2. Mandarina Arrayana. 3. Naranja Tangelo. 4. Naranja Valencia.

**Fuente:** Autores.

Existen varias teorías acerca del origen de las naranjas dulces donde algunos autores afirman que *C. sinensis* (L.) Osb., está emparentado con *C. reticulata*, pero muestran rasgos introgresados en su genoma, procedentes del ancestro *Citrus maxima* (Nicolosi, 2007 y Ollitrault et al., 2012). La relación más cercana con *C. reticulata* sugiere que los naranjos dulces no son híbridos directos, sino que probablemente sean híbridos retrocruzados de primera o segunda generación con el genoma de mandarina (Barrett y Rhodes, 1976; Nicolosi et al., 2000). Roose et al. (2009) sugieren que *C. sinensis* proviene de un retrocruce 1 (BC1) [(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*]. La publicación de los genomas de referencia nuclear (Xu et al., 2013; Wu et al., 2014) y

cloroplástico (Bausher et al., 2006) de los cítricos, permite realizar estudios mucho más detallados y profundos sobre el origen, la domesticación y las relaciones filogenéticas del género *Citrus*.

El análisis de Varianza Molecular (AMOVA) realizado para las cuatro variedades evaluadas, mostró que el 99% de la variación observada se explica por el componente dentro de los grupos, y el 1% se explica por la diferenciación entre los grupos (Tabla 4). Esto pone de evidencia la necesidad de incrementar el número mayor de individuos dentro de las variedades de cítricos, que presenten una amplia variabilidad genética, con el fin de explotar el potencial genético existente, e identificar variantes alélicas que pueden

generar nuevas combinaciones favorables para las características de importancia económica en cítricos. Además, el alto nivel de variación a nivel

intraespecífico, podría ser utilizado para planear estrategias de manejo y conservación de este importante recurso fitogenético.

**Tabla 4.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre y dentro de los grupos utilizando siete cebadores ISSR.

Fuente de variación	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Componentes de variación	%
Entre grupos	3	52.801	17.6	0.227	1%
Dentro grupos	40	609.881	15.247	15.247	99%
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>662.682</b>		<b>15.474</b>	<b>100%</b>

Fuente: Autores

#### 4. CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares son herramientas poderosas para dilucidar la diversidad genética, determinar el parentesco y revelar las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies de cítricos. Mediante el análisis con marcadores tipo ISSR se encontró una gran similitud genética entre las variedades de naranjas Tangelo y Valencia, mandarina Arrayana y Limón Castilla de la colección de la Universidad de los Llanos y, por ende, una moderada diversidad genética, que se podría aprovechar en futuros trabajos de mejoramiento genético de la especie, encaminados a la obtención de nuevas variedades de cítricos de alta calidad y rendimiento, que respondan a las necesidades de los productores y demás actores de la cadena productiva, además de optimizar la conservación y uso de estos recursos genéticos existentes, que son de gran importancia económica en el departamento del Meta.

Igualmente, el entendimiento de la taxonomía, las relaciones filogenéticas y la diversidad genética del género *Citrus*, permitirá ampliar la oferta de materiales para aumentar las zonas de cultivo.

#### CONTRIBUCIÓN DE LA AUTORÍA

**Primer autor:** metodología, investigación, análisis de datos, conceptualización, escritura – borrador original. **Segundo autor:** investigación, conceptualización, Trabajo de laboratorio, escritura. **Tercer autor:** análisis de datos, conceptualización, revisión y edición.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de los estudiantes Sergio Rivera y Daniela Oyola por su asistencia en la colecta del material vegetal y el apoyo en las actividades de laboratorio. A la Universidad de los Llanos, principalmente al Laboratorio de Biotecnología y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela de Ingeniería en Ciencias Agrícolas por la disponibilidad de sus instalaciones y del personal dedicado en apoyar la academia y la investigación.

#### LITERATURA CITADA

Al-Nadabi, H., Khan, M., Al-Yahyai, R., y Al-Sadi, A. (2018). AFLP Fingerprinting Analysis of Citrus Cultivars and Wild Accessions from Oman Suggests the Presence of Six Distinct Cultivars, Agriculture (Pol'nohospodárstvo), 64(4), 173-182. <https://doi.org/10.2478/agri-2018-0018>

- Anderson, C. M., Banfi, G., Beñatena, H., Casafus, C. M., Costa, N. B., Danos, E., Fabiani, A., Garran, S. M., Larocca, L., Marco, G., Messina, M., Mika, R., Mousques, J., Plata, M. I., Ragone, M., Rivas, R., Vaccaro, N. C., y Vazquez, Daniel. (1996). Manual para productores de naranja y mandarina INTA, & R. M. Anahí Fabiani (Ed.), Manual para productores de naranja y mandarina de la región del río Uruguay (págs. 1-6). Argentina: Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación. Recuperado el 15 de abril de 2020, de [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_manual\\_citricultura\\_cap1.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_manual_citricultura_cap1.pdf)
- Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R., y Federici, C.T. (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*, 112(8): 1519-1531. Doi: 10.1007/s00122-006-0255-9
- Barrett, H.C., y Rhodes, A.M. (1976). A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Systematic Botany*, 1, 105-136. <https://doi.org/10.2307/2418763>
- Bausher, M.G., Singh, N.D., Lee, S.B., Jansen, R.K., y Daniell H. (2006). The complete chloroplast genome sequence of Citrus sinensis (L.) Osbeck var 'Ridge Pineapple': organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Plant Biology*, 6, 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-21>
- Bermúdez-Guzmán, M., Guzmán-Rodríguez, L., García-Mariscal, K., Palmeros-Suárez, P., y Orozco-Santos, M. (2017). Identificación de híbridos de Citrus aurantifolia×Citrus limon utilizando marcadores de secuencias simples repetidas (SSR). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(6): 1397-1408. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342017000601397&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342017000601397&lng=pt&nrm=iso)
- Carbonell-Caballero, J., Alonso, R., Ibañez, V., Terol, J., Talon, M., y Dopazo, J. (2015). A phylogenetic analysis of 34 chloroplast genomes elucidates the relationships between wild and domestic species within the genus Citrus. *Molecular Biology and Evolution*, 32(8): 2015-2035. Doi: 10.1093/molbev/msv082
- Carrillo-Medrano, S., Gutierrez-Espinosa, M., Robles M., y Izquierdo, S. (2018). Identificación de híbridos de limón mexicano mediante marcadores moleculares SSR. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 9. 11. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.844>
- Castañeda-Cardona, C. C., Morillo-Coronado, Y., y Morillo, A. C. (2020). Assessing the genetic diversity of Dioscorea alata and related species from Colombia through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 80(4): 608-616. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392020000400608>
- Curk, F., F. Ollitrault, A. Garcia-Lor, F. Luro, L. Navarro, y P. Ollitrault. (2016). Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Annals of Botany*. 117(4): 565-583. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw005>
- Dorji, K., y Yapwattanaphun, C. (2015). Assessment of the genetic variability amongst mandarin (Citrus reticulata blanco) accessions in bhutan using AFLP markers. *BMC Genetics*, 16(1):39-48. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0198-8>
- Doyle, J. – Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. In *Focus*, 12(1): 13-15. JJ Doyle, JL Doyle - Focus, 1990 - researchgate.net
- Fanciullino, A.L., Dhuique-Mayer, C., Luro, F., Casanova, J., Morillon, R., y Ollitrault, P. (2006). Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4397-4406. <https://doi.org/10.1021/jf0526644>
- Food and Agriculture Organization. (2020). Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura: Recursos fitogenéticos. Recuperado de: <http://www.fao.org/cgrfa/topics/plants/es/>
- Food and Agriculture Organization Statistical. (2017). Citrus fruit fresh and processed statistical bulletin 2016. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>
- Federici, C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W., y Roose, M.L. (1998). Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 812-822. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s001220050807>
- Froelicher, Y., Mouhaya, W., Bassene, JB., Costantino, G., Kamiri, M., Luro, F., Morillon, R., y Ollitrault, P. (2011). New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics and Genomes*, 7: 49-61. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0314-x>

- Fujii, H., Ohta, S., Nonaka, K., Katayose, Y., Matsumoto, T., Endo, T., Yoshioka, T., Omura, M., y Shimada, T. (2016). Parental diagnosis of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) revealed by nuclear and cytoplasmic markers. *Breeding Science*, 66(5): 683–691. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.16060>
- García, A. (2013). Organización de la diversidad genética de los cítricos. Universitat Politècnica de València: Departamento de biotecnología. Valencia: España. Tesis doctoral, 1(1), 18. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/31518/Versi%C3%B3n3.Tesis%20Andr%C3%A9s%20Garc%C3%ADa-Lor.pdf>
- García-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., y Ollitrault, P. (2012). Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity: a perspective for genetic association studies. *Molecular Genetics and Genomics*, 28: 77-94. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0658-4>
- García-Lor, A., Luro, F., Ollitrault, P. & Navarro, L. (2015). Genetic diversity and population structure analysis of mandarin germplasm by nuclear, chloroplastic and mitochondrial markers. *Tree Genetics & Genomes* 11(6):1-15. <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0951-1>
- Gulsen O, Roose ML. (2001). Chloroplast and nuclear genome analysis of the parentage of lemons. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 210-215. <https://doi.org/10.21273/JASHS.126.2.210>
- Henareh, M., Dursun, A., Abdollahi-Mandoulakani, B., y Haliloğlu, K. (2016). Assessment of genetic diversity in tomato landraces using ISSR markers. *Genetika*, 48: 25-35. <https://doi.org/10.2298/GENSR1601025H>
- Ibañez, V., García Usach, A., Carbonell Caballero, J., Alonso, R., Terol, J., Dopazo, J., y Talón, M. (2015). El origen de las especies cultivadas de cítricos. *Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos*, 426, 74-79. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5145911>
- Joseph, H. A. R. T. R. B. W., (1992). *Multivariate data*. 3 Ed. s.l.: Analysis with Readings.
- Kumar, S., Narayan, S., Narayanan, J., y Nair K. (2010). ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. *Scientia Horticulturae*, 123(3): 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.10.008>
- Luro, F., G. Constantino, J. Terol, X. Argout, T. Allario, Wincker P., M. Talon, Ollitrault, P., y Morillon R. (2008). Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other citrus species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics* 9, 287. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-287>
- Martínez, M. F. (2013). Caracterización molecular de genotipos de mandarinas *Citrus* spp. mediante marcadores RAM's (Microsatélites Amplificados al Azar) y Microsatélites. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, 141 págs. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/12773/1/7609502.2013.pdf>
- Martínez, M. A., Morillo, A. C., y Reyes-Ardila, W. (2020). Characterization of the genetic diversity in *Passiflora* spp. in the Boyacá Department, Colombia. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 80(3): 342-351. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392020000300342>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). Agronet. Recuperado el 15 de abril de 2020, de Agronet: <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>
- Morillo, A.C., Morillo, Y., Chagüeza, Y., Caicedo, A., y Muñoz, J.E. (2009). Caracterización de la diversidad genética en naranja y comparación del polimorfismo de microsatélites amplificados al azar (RAM's) usando electroforesis de poliacrilamida y agarosa. *Acta Agronómica*, 58(4): 234-244. Recuperado de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28122009000400002&script=sci\\_abstract&lng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28122009000400002&script=sci_abstract&lng=es)
- Morillo, A.C., González, J., y Morillo, Y. (2018). Caracterización de la diversidad genética de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 16, 26-33. Doi: 10.18684/bsaa.v16n1.631.
- Munankarmi, N.M.; Shrestha, R.L.; Rana, N.; Shrestha, J.K.C.; Shrestha, S.; Koirala, R.; Shrestha, S. (2014). Genetic diversity assessment of Acid lime (*Citrus aurantifolia*, Swingle) landraces of Nepal using RAPD markers. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 2(3): 315-327. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v2i3.10950>
- Munankarmi, Nabin., Rana, Neesha., Bhattarai, Tribikram., Shrestha, Ra., Joshi, Bal., Baral, Bikash y Shrestha, Sangita. (2018). Characterization of the Genetic Diversity of Acid Lime (*Citrus*

- aurantifolia (Christm.) Swingle) Cultivars of Eastern Nepal Using Inter-Simple Sequence Repeat Markers. *Plants*, 7, 46. <https://doi.org/10.3390/plants7020046>
- Nei, M., y Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasa. *Proceedings of the National Academic of Sciences of United states of America*, 79, 5267-5273. Doi: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Nicolosi, E., Deng, Zn., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., y Tribulato, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers", *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8): 1155-1166. Doi: 10.1007/s001220051419
- Nicolosi, E. (2007). "Origin and taxonomy" in, *Citrus Genetics Breeding and Biotechnology Chapter 3*. Ed. I. Ahmad Khan. 19-43. Doi: 10.1079/9780851990194.0000
- Ninomiya, T., Shimada, T., Endo, T., Nonaka, K., Omura, M., y Fujii, H. (2015). Development of citrus cultivar identification by caps markers and parentage analysis. *Horticultural Research*. (Japan), 14: 127-133. Doi: 10.2503/hrj.14.127
- Nonaka, K., Fujii, H., Kita, M., Shimada, T., Endo, T., Yoshioka, T., y Omura, M. (2017). Identification and parentage analysis of citrus cultivars developed in japan by caps markers. *The Horticulture Journal*, 86(2): 208-221. <https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-026>
- Ollitrault, F., Terol, J., Martin, A., Pina, J.A., Navarro, L., Talon, M., y Ollitrault, P. (2012). Development of InDel markers from Citrus clementina (Rutaceae) BAC-end sequences and interspecific transferability in Citrus. *American Journal of Botany*, 99: 268-273. Doi: 10.3732/ajb.1100569
- Ollitrault, F., Terol, J., Pina, J.A., Navarro, L., Talon, M., y Ollitrault, P. (2010). Development of SSR markers from Citrus clementina (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in Citrus. *American Journal of Botany*, 97, e124-9. Doi: 10.3732/ajb.1000280
- Ollitrault, P., Jacquemond, C., Dubois, C., y Luro, F. (2003). Citrus. In: Hannon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC (eds). *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Montpellier/Enfield, NH: CIRAD/Science Publishers, Inc., 193-217.
- Ollitrault, P., Terol, J., Garcia-Lor, A. et al. (2012). SNP mining in C. clementina BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *BMC Genomics*, 13(13). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-13>
- Peakall, R., y Smouse, P. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537-2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Orduz, J., y Mateus, D. (2012). Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia. cap 2. Pp. 49-88. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10567/561>
- Roose, M., Federici, C., Mu, L., Kwok, K., y Vu, C. (2009). Map-based ancestry of sweet orange and other citrus variety groups. In: Gentile A, Tribulato E. (eds.) *Second International Citrus Biotechnology Symposium*. Catania, Italy, 28. Doi: 10.1007/s001220051419
- Sánchez de Prager, M., Perea Morera, E., Prager Mosquera, M., Ángel Sánchez, D., Ortiz Ríos, J.C., Gallego, J.M. y Sanclemente Reyes, O.E. (2020). Capítulo 2. Biodiversidad del suelo. Su importancia para el manejo sustentable de agroecosistemas. En S. Sarandón (Ed.). *Biodiversidad, agroecología y agricultura sustentable*. La Plata, Argentina. ISBN: 978-950-34-1948-9. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). Pp 37- 51. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/109141>
- Scarano, M., Tusa, N., Abbate, L., Lucretti, S., Nardi, L., y Ferrante, S. (2003). Flow cytometry, SSR and modified AFLP markers for the identification of zygotic plantlets in backcrosses between 'Femminello' lemon hybrids (2n and 4n) and a diploid clone of 'Femminello' lemon (Citrus limon L. Burm. F.) tolerant to mal secco disease. *Plant Science*, 164: 1009-1017. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00088-8)
- Scora RW. (1975). On the history and origin of citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 102, 369-375. <https://doi.org/10.2307/2484763>
- Shahsavari, A., Izadpanah, K., Tafazoli, E., y Tabatabaei, B. S. (2007). Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae*, 112(3), 310-314. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.039>
- Shahzadi, K., Naz, S., y Ilyas, S. (2016). Genetic diversity of citrus germplasm in Pakistan based on

- random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. In *Journal of Animal and Plant Sciences*, (26), 1094-1100. Recuperado de: <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-26-04/27.pdf>
- Sharafi, A., Asadi, A., y Sharafi, Ali. (2017). Molecular genetic diversity assessment of Citrus species grown in Iran revealed by SSR, ISSR and CAPS molecular markers. *Journal of Science and Research*, 2(8): 22-27. <https://doi.org/10.26910/issn.2528-8083vol2iss8.2017pp22-27>
- Singh, P.K. H., Sharam, N., Srivastava., y Bhagyawant, S. (2014). Analysis of genetic diversity among wild and cultivated chickpea genotypes employing ISSR and RAPD markers. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 676-682. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.55082>
- Valencia, R., Lobo, M., y Ligarreto, G. (2010). Estado del arte de los recursos genéticos vegetales en Colombia: Sistema de Bancos de Germoplasma. *Agrobiodiversidad, Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu*, 11(1): 85-94. Recuperado de <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/198/203>
- Vargas, J. E. E., Aguirre, N. C., y Coronado, Y. M. (2020). Study of the genetic diversity of tomato (*Solanum* spp.) with ISSR markers. *Revista Ceres*, 67(3): 199-206. Doi: <https://doi.org/10.1590/0034-737x202067030005>
- Varshney, R.K., Graner, A., y Sorrells, M.E. (2005). Genetic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in Biotechnology*. 23, 48-55. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005>
- Webber, H. J. (1943). Plant characteristics and climatology. En: H.J. Webber y L.D. Batchelor, dirs. *The Citrus Industry*. Berkeley: University of California. Press. 1:41-69.
- Wright, S. (1978). Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations, Vol. 4. 590.
- Wu, G., Terol, J., Ibanez, V. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature* 554: 311-316. <https://doi.org/10.1038/nature25447>
- Xu, Q., Chen, L., y Ruan, X. (2013). The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature genetics* 45: 59-66. <https://doi.org/10.1038/ng.2472>
- Yamamoto, M., Tsuchimochi, Y., Nonaka, T., Koga, T., Kitajima, A., Yamasaki, A., Inafuku-Teramoto, S., Yang, X., Yang, X., y Zhong, G. (2013). Diversity of chloroplast DNA in various mandarins (*Citrus* spp.) and other citrus demonstrated by CAPS analysis. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 82(2):106-113. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.82.106>
- Yang, Y., YueZhi, P., Xun, G., y MouTian, F. (2010). Genetic variation in the endangered Rutaceae species *Citrus hongheensis* based on ISSR fingerprinting. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57: 1239-1248. <https://doi.org/10.1007/s10722-010-9571-7>
- Yu, Y., Chen, C., Huang, M., Yu, Q., Du, D., Mattia, M. R., y Gmitter, F. G. (2018). Genetic Diversity and Population Structure Analysis of Citrus Germplasm with Single Nucleotide Polymorphism Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 143(6), 399-408. <https://doi.org/10.21273/JASHS04394-18>
- Zietkiewicz E, Rafalski A., y Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-18. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>

**Conflicto de Intereses**

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

**Licencia de Creative Commons**

Revista de Investigación Agraria y Ambiental is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 International License.