

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR CON MICROSATÉLITES ALEATORIOS RAMs DE 30 ACCESIONES DE MANDARINA (*Citrus reticulata*) DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE CORPOICA-PALMIRA

MOLECULAR CHARACTERIZATION WITH RANDOM AMPLIFIED MICROSATELLITES
RAMs OF 30 MANDARIN (*Citrus reticulata*) ACCESSIONS FROM THE GERMPLASM
BANK OF CORPOICA-PALMIRA

**Sebastián Mora-Vivas¹, Yacenia Morillo-Coronado^{1*}, Ana Cruz Morillo-Coronado¹,
Álvaro Caicedo-Arana², Jaime Eduardo Muñoz-Florez¹**

¹Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. A.A 237. Palmira, Valle del Cauca, Colombia.
www.unal.edu.co. semorav@gmail.com, ymorilloc@unal.edu.co, acmorilloc@unal.edu.co,
jemunozf@unal.edu.co

⁴CORPOICA. Centro de Investigación Palmira. Km 1. Palmira, Valle del Cauca, Colombia.
www.corpoica.org.co. alvarocaicedo@gmail.com

*Autor responsable.

RESUMEN

Se utilizaron siete marcadores microsatélites RAMs para caracterizar 30 accesiones de mandarina *Citrus reticulata* del banco de Germoplasma de Corpoica-Palmira. El estudio de diversidad genética con microsatélites RAMs diferenció las 30 accesiones en seis grupos con una similaridad de 0.75 y una heterocigosidad de 0.31, lo que revela gran polimorfismo genético. En el grupo 1 se ubicaron dos accesiones correspondientes a los tipos de mandarinos Satsuma y Tangor denominados Satsuma Okitsu y Ortanique, respectivamente. En el grupo 2 se agruparon ocho accesiones que pertenecen al grupo de las Clementinas:

Clementina fina, Clementina 85, Clementina 88, Clementina 92, Oroval, Marisol, Cremenules y Oneco. En el grupo 3 con un nivel de similaridad de 0.72 se agruparon las accesiones ICA Jamundí, ICA Amaime e ICA-Bolo. En el grupo 4 se ubicaron los híbridos: Pixie, Arrayana, Osceola, Fairchild, Beauty, Page, Lee, Santander, Corsica 1 y Corsica 2. En el grupo 5 con un nivel de similaridad de 0.67 se ubicaron los híbridos Fortune, Kinnow, Kara, Fremont y Fortune mandarin. Los tangelos 'Minneola' y 'Orlando' se diferenciaron del resto de las accesiones evaluadas (nivel de similaridad de 0.60), esto posiblemente obedezca a sus características morfológicas claramente distinguibles. La técnica RAMs permitió agrupar las accesiones de mandarina según los tipos

reportados (Mandarino Satsuma, Mandarinos Clementinos e Híbridos), por lo cual puede ser una herramienta molecular útil para evaluar la diversidad genética en *Citrus*.

Palabras clave: *Citrus spp*, marcadores RAMs, variabilidad genética, banco de germoplasma.

ABSTRACT

Seven microsatellite markers RAMs were used to characterize 30 accessions of mandarin *Citrus reticulata* from Germplasm Bank of Corpoica-Palmira. The study of genetic diversity with RAMs differed the 30 accessions in six groups with a similarity of 0.75 and a heterozygosity of 0.31, indicating high genetic polymorphism. In the group 1 were located two accessions corresponding for the types of mandarin Satsuma and Tangor called Satsuma Okitsu and Ortanique, respectively. In group 2, eight accessions were grouped belonging to the Clementines: Clementina fina, Clementina 85, Clementina 88, Clementina 92, Oroval, Marisol, Cremenules and Oneco. In group 3 with a level of similarity of 0.72 were grouped the accessions ICA Jamundí, ICA Amaime and ICA-Bolo. In group 4 were located the hybrids: Pixie, Arrayana, Osceola, Fairchild, Beauty, Page, Lee, Santander, Corsica 1 and Corsica 2. In the group 5 with a level of similarity of 0.67 were located the hybrids Fortune, Kinnow, Kara, Fremont and Fortune mandarin. Tangelos 'Minneola' and 'Orlando' differed from the rest of the accessions evaluated (level of similarity of 0.60), likely to their morphological characteristics clearly distinguishable. The technique RAMs allowed grouped the accessions according to type mandarin reported (Mandarino Satsuma, Mandarino Clementinos and Híbridos), it

may be a useful molecular tool to evaluate the genetic diversity in *Citrus*.

Key words: *Citrus spp*, markers RAMs, genetic variation, germplasm bank.

INTRODUCCIÓN

El género *Citrus* ($2n=18$) es nativo del Sudeste de Asia y del archipiélago Indo-Malayo (Avilán *et al.*, 1989), contiene la mandarina *Citrus reticulata*, el limón *C. limon* y el pomelo *C. paradisi* Macf, los cuales son los ancestros de las especies comerciales. La apomixis facultativa es predominante en *C. reticulata* y ha sido determinante en la evolución de *Citrus*.

La mandarina *Citrus reticulata* junto con la toronja *C. paradisi* L. y el limonero *C. limon* L. son consideradas las tres especies verdaderas de cítricos. La mandarina es el segundo grupo de cítricos más importante en el mundo entero, con la más alta adaptación climática entre los cítricos cultivados. El grupo de las mandarinas está formado por numerosas especies, así como también híbridos intergenéricos e interespecíficos de ahí que se consideren como el grupo fenotípicamente más heterogéneo de los *Citrus* (Moore, 2001).

Tradicionalmente, los caracteres morfológicos han sido utilizados para identificar los cítricos; sin embargo, existe un alto nivel de variabilidad genética que dificulta algunas veces hacer una separación precisa de cada variedad. La caracterización de los bancos de germoplasma, la variación genética y el mejoramiento en naranjas y otras especies de *Citrus* no han sido exitosos debido a las características relacionadas con la biología reproductiva de estas especies, por ejemplo, alta fertilidad interespecífica, reproducción apomíctica, poliembrionía, una larga fase juvenil y la escasez de marcadores de ADN polimórficos (Bretó *et al.*, 2001; Corazza-Nunes *et al.*, 2002).

El uso de marcadores moleculares ha sido un instrumento valioso y preciso

para asistir el programa de mejoramiento de especies de *Citrus*. Los análisis isoenzimáticos han sido utilizados para identificar embriones zigóticos (Torres et al., 1982) y cultivares de naranja trifoliata (Khan y Roose, 1988; Fang et al., 1997). Los marcadores RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) han sido reportados como altamente polimórficos en *Citrus* (Liou et al., 1996) y utilizados en estudios filogenéticos entre especies de *Citrus* (Green et al., 1986; Nicolosi et al., 2000). Los análisis RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) han sido utilizados en la caracterización de germoplasma, estudios de diversidad genética, identificación de mutantes en limón (Deng et al., 1995), quimeras (Sugarawa y Oowada, 1995), híbridos somáticos (Guo et al., 2000) y poliembriónía (Ramalho et al., 2000; Andrade-Rodríguez et al., 2004). Marcadores AFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados) han sido usados para la identificación de mandarina Clementina (Bretó et al., 2001).

En *Citrus* y géneros relacionados, los microsatélites han sido empleados para estudios filogenéticos (Fang and Roose, 1997; Pang et al., 2003), estudios de variabilidad genética en los niveles interespecífico, intraespecífico e intrapoblacional (Kijas et al., 1995; Corazza-Nunes et al., 2002; Koehler-Santos et al., 2003; Thomas et al., 1998), identificación de plantas zigóticas (Ruiz et al., 2000; Cristofani et al., 2001; Oliveira et al., 2002) y construcción e integración de mapas de ligamiento (Kijas et al., 1997; Cristofani et al., 2003) pero es todavía difícil identificar variabilidad intraespecífica en algunas especies de *Citrus*. La caracterización de marcadores microsatélites ha sido ya publicada en *Citrus limon* (Golein et al., 2005), *Citrus sinensis* (Ahmad et al., 2003; Novelli et al., 2006), *Citrus limonia* x *Poncirus trifoliata* (Kijas et al., 1997) y *Citrus reticulata* (Koehler-Santos et al., 2003).

Los marcadores moleculares conocidos como los RAMs son útiles para medir la diversidad genética en plantas y

animales, diferencia entre familias, entre especies y al interior de la especie (Muñoz et al., 2008), muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado y permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no lo hace (Mahuku et al., 2002). Esta metodología es factible para pequeños laboratorios en términos de equipos y facilidades de costo, no requiere el conocimiento previo de secuencias, ni el uso de isótopos radioactivos. Los marcadores obtenidos por los RAMs se pueden usar para estudios de poblaciones (Hantula et al., 1996).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente accesiones de mandarina *Citrus reticulata* del banco de germoplasma de Corpoica-Palmira mediante marcadores microsatélites RAMs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se evaluaron 30 accesiones de mandarina pertenecientes al Banco de Germoplasma de Corpoica-Palmira (Cuadro 1).

Caracterización molecular

La caracterización molecular se hizo en el Laboratorio Integrado de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Dellaporta et al. (1983).

Los ADN totales se visualizaron en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio en una cámara Maxicell Primo EC-340 Electroforesis Gel System. Para determinar la concentración de ADN de cada accesión se hizo una curva de dilución con ADN del bacteriófago Lambda de concentración inicial 20 ng/μl y se llevó

a concentraciones finales de 20, 40, 60, 80 y 100 ng/μl. El ADN cuantificado se diluyó en agua tipo HPLC a un volumen total de 100 μl a 10 ng/μl y se almacenó a -20 °C.

Para el análisis RAMs se utilizaron siete cebadores sintetizados por Technologies Inc. (Cuadro 2).

Para la reacción de amplificación con RAMs se preparó el cóctel en un tubo estéril de microcentrifuga (1.5 ml) para un volumen final de 25 μl. La mezcla de reacción se preparó con buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, DNTPs 0.2 mM, Taq Polimerasa 1U, cebador 2 μM y ADN genómico 10ng.

Cuadro 1. Accesiones de mandarina *Citrus reticulata* del banco de Germoplasma de Corpoica utilizadas para la caracterización molecular con microsatélites RAMs.

NOMBRE	CIENTÍFICO	COLECTA
ICA Jamundí	<i>Citrus reticulata</i>	Valle del Cauca
ICA Bolo	<i>Citrus reticulata</i>	Valle del Cauca
ICA Amaime	<i>Citrus reticulata</i>	Valle del Cauca
Orlando	Híbrido	IPEACS Río Janeiro-Brasil
Arrayana	<i>Citrus reticulata</i>	Sevilla-Valle del Cauca
Clementina Fina	<i>Citrus clementina</i>	IVIA-Valencia-España
Clementina 85	<i>Citrus clementina</i>	Córcega-Francia
Clementina 88	<i>Citrus clementina</i>	Córcega-Francia
Clementina 92	<i>Citrus clementina</i>	Córcega-Francia
Corsica 1	<i>Citrus clementina</i>	Córcega-Francia
Corsica 2	<i>Citrus clementina</i>	Córcega-Francia
Fortune Mandarin	<i>Citrus reticulata</i>	IRFAD CIRAD Francia
Híbrido Page	Híbrido	IRFAD CIRAD Francia
Minneola	Híbrido	Desconocido
Ortanique	Híbrido	Córcega-Francia
Satsuma Okitsu	<i>Citrus satsuma</i>	IRFAD CIRAD Francia
Oneco Nucelar	<i>Citrus reticulata</i>	U. California-Riverside
Fortune	<i>Citrus reticulata</i>	U. California-Riverside
Kara	<i>Citrus reticulata</i>	U. California-Riverside
Kinnow	<i>Citrus reticulata</i>	U. California-Riverside
Fremont	<i>Citrus reticulata</i>	U. California-Riverside
Osceola	Híbrido	Riverside-California
Lee	<i>Citrus reticulata</i>	U. California-Riverside
Fairchild	Híbrido	U. California-Riverside
Fixie	<i>Citrus reticulata</i>	U. California-Riverside
Santander	<i>Citrus reticulata</i>	Lebrija-Santander
Beauty	<i>Citrus tangerina</i>	IRFA CIRAD Francia
Clemenulles	<i>Citrus clementina</i>	IVIA-Valencia-España
Oroval	<i>Citrus clementina</i>	Córcega-Francia
Marisol	<i>Citrus clementina</i>	Córcega-Francia

Cuadro 2. Cebadores utilizados en la técnica Microsatélites RAMs.

Cebador	Secuencia (5'a 3')
CCA	DDB(CCA) ₅
CGA	DHB(CGA) ₅
GT	VHV(GT) ₅ G
AG	HBH(AG) ₇ A
CT	DYD(CT) ₇ C
TG	HVH(TG) ₇ T
CA	DBDA(CA) ₇

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

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC 100 Programmable Thermal Controller (MJ. Research, Inc). La desnaturalización inicial fue a 95 °C durante 5 minutos; desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, hibridación a una temperatura de 50 °C (cebador AG y CA), 55 °C (cebador CCA-TG-CT) y 58 °C (cebador GT-CGA) durante 45 segundos, una extensión de 72 °C por 2 minutos, 37 ciclos desde la desnaturalización a extensión y por último una extensión a 72 °C durante 7 minutos.

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida 37:1 (acrilamida:bisacrilamida) al 7 % a 150 voltios por 1 hora en una cámara pequeña de DNA Sequencing System, FB-SEQ-3545 de FisherBiotech. La tinción se realizó usando sales de plata.

Análisis Estadístico

Se generó una matriz binaria de ausencia (cero) y presencia (uno). La similitud genética entre los individuos se calculó utilizando el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979) también conocido como DICE (1945) (Sneath y Sokal, 1973). El análisis cluster se realizó por el método UPGMA y se generó un dendrograma utilizando el paquete estadístico NTSYS (Numerical Taxonomy System for personal Computer, versión

2.02 PC). Para evaluar la diversidad genética se estimó la heterocigosidad incesgada y el porcentaje de loci polimórficos utilizando el paquete estadístico TFPGA (Tools For Population Genetic Analices, versión 1.3, 1997). Se determinó el f estadístico incesgado con un intervalo de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de diversidad Genética

Los siete cebadores RAMs utilizados para la caracterización molecular en mandarina generaron un total de 106 bandas; que fluctuaron entre 10 para el cebador CT y 20 para el cebador CA. El número de loci polimórficos varió entre 7 y 17 para los cebadores CT y GT, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Heterocigosidad promedio estimada (He) y porcentaje de loci polimórficos para los siete cebadores RAMs evaluados en 30 accesiones de mandarina.

Cebador	No. Loci polimórficos	He estimada	% Loci polimórficos (95 %)
CGA	11	0.29	84.6
TG	10	0.36	91.3
CCA	9	0.23	52.9
CA	15	0.30	85.0
GT	17	0.36	93.0
CT	7	0.28	70.0
AG	12	0.36	88.9
Población total		0.31	83.96

La heterocigosidad promedio (H) para la población total fue de 0.3107, lo que revela gran polimorfismo genético. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Tapia *et al.* (2005) quienes evaluaron 63 cultivares de mandarina (*Citrus spp.*) usando marcadores morfológicos y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Se usaron 20 caracteres cuantitativos y 10 cualitativos de hojas,

flores y frutos. Las mejores combinaciones de iniciadores AFLP fueron la Mse +CAG más Eco +ACA, y Mse +CAA más Eco +AGG, dando un total de 109 bandas con un 86 % de polimorfismo. Tanto los marcadores morfológicos como los moleculares mostraron un alto grado de variación entre los individuos analizados, lo que indica una importante fuente de diversidad genética que puede ser utilizada en futuros programas de mejoramiento genético. Aunque la comparación de los datos morfológicos y moleculares usando la prueba de Mantel no mostró una correlación significativa ($r=0.31$), ambas técnicas parecen ser complementarias para la caracterización de mandarinas. Los AFLP usados en este trabajo fueron capaces de discriminar entre todas las accesiones de mandarina analizadas, incluyendo las que presentaban el mismo nombre común. Esta alta discriminación entre accesiones altamente relacionadas es el resultado de la alta heterogeneidad en el grupo de mandarina (Tapia et al., 2005).

El nivel de variación en mandarina ha sido reportado por varios autores utilizando diferentes técnicas incluyendo isoenzimas (Torres et al., 1978; Torres et al., 1982), ISSR (Fang and Roose, 1997; Fang et al., 1998), RFLP and RAPD (Federici et al., 1998) y microsatélites (Koehler-Santos et al., 2003). Estos investigadores encontraron una alta heterogeneidad dentro del grupo de mandarina y concluyeron que este grupo es el más variable de las tres especies de *Citrus* (*C. grandis*, *C. medica* y *C. reticulata*). Bretó et al. (2001) analizaron 24 accesiones de mandarina Clementina por AFLP y encontraron un bajo nivel de polimorfismo entre las accesiones; sin embargo, este resultado fue lógico porque todos los cultivares de mandarina Clementina fueron derivados de una sola planta y así el nivel de variabilidad genética fue bajo.

En el trabajo de Golein et al. (2005) se reporta el aislamiento y caracterización de 7 loci microsatélites polimórficos en *Citrus*. Estos marcadores produjeron de 4 a 9 alelos por locus (con

un promedio de 6.14) en los 32 cultivares de *Citrus limon* evaluados. Los valores de heterocigosidad promedio observada estuvieron comprendidos entre 0.43 a 0.72. Los niveles de polimorfismo encontrados en este estudio sugieren que estos loci microsatélites pueden ser una herramienta importante para estudios genéticos en *Citrus*.

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 y especies relacionadas, la alta frecuencia de mutaciones y una larga historia de cultivo y gran dispersión (Scora, 1988). Las naranjas dulces *C. sinensis* (L.) Osbeck son propagadas vegetativamente y nuevos cultivares son obtenidos después de una selección cuidadosa de mutaciones somáticas espontáneas. A diferencia del grupo de las naranjas dulces en la cual casi todos los cultivares han surgido por mutación somática, la variación genética en el grupo de la mandarina *C. reticulata* está asociada con la hibridación sexual entre un gran número de especies e híbridos intraespecíficos (Cameron y Frost, 1968).

El alto nivel de heterocigosidad encontrado en mandarina (0.3107), contrasta con el estudio de Morillo et al. (2009) quienes evaluaron la diversidad genética en 51 accesiones de naranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck del banco de germoplasma de Corpoica-Palmira utilizando microsatélites RAMs. La técnica RAMs diferenció las 51 accesiones en siete grupos con una similaridad de 0.75 y una heterocigosidad de 0.25, lo que revela bajo polimorfismo genético, que puede estar asociado con la propagación clonal de la especie, la poliembrionía, la cual tiende a disminuir la ocurrencia de genotipos altamente heterocigotos.

Es reconocido que las naranjas dulces tienen una estrecha base genética y que la variabilidad puede ser producida por diversos factores tales como hibridación, mutación y tipo de reproducción (preferencialmente apomíctica),

la baja diversidad intraespecífica contrasta con la alta variabilidad en cuanto a características de importancia agronómica tales como período de maduración, tamaño y color de los frutos (Herrero et al., 1996).

El coeficiente de diferenciación genética (F_{st}) obtenido al evaluar las 30 accesiones de mandarina con los 7 microsatélites RAMs fue de 0.45 con una desviación estándar de 0.04 (Cuadro 4). Según Wright (1978), valores mayores de 0.25 muestran gran diferenciación genética.

El cebador CCA fue el que mayor aporte hizo a la variación, F_{st} de 0.54, lo que significa que puede ser útil para lograr mayor diferenciación entre los materiales de mandarina *Citrus reticulata* (Figura 1).

El análisis mediante el coeficiente de Nei-Li, a un nivel de Similaridad de 0.75, diferenció la población en 7 grupos (Figura 2).

El problema de la clasificación botánica de los agrios adquiere especial

notoriedad en el caso de las mandarinas. Mientras Swingle (1967) las agrupa en tres especies, Tanaka (1954) reconoce al menos 36 especies en cinco grupos taxonómicos. De acuerdo a la clasificación comercial que rige los mandarinos se agrupan en tres grandes grupos: Mandarino Satsuma, Mandarinos Clementinos e Híbridos (Agusti, 2003).

Cuadro 4. Diferenciación poblacional, estadístico F_{st} para 30 accesiones de mandarina con los siete cebadores RAMs evaluados.

Cebador	FST	SD
CGA	0.50	0.04
TG	0.39	0.04
CCA	0.54	0.04
CA	0.35	0.04
GT	0.53	0.04
CT	0.42	0.04
AG	0.44	0.05
Población total	0,45	0,04

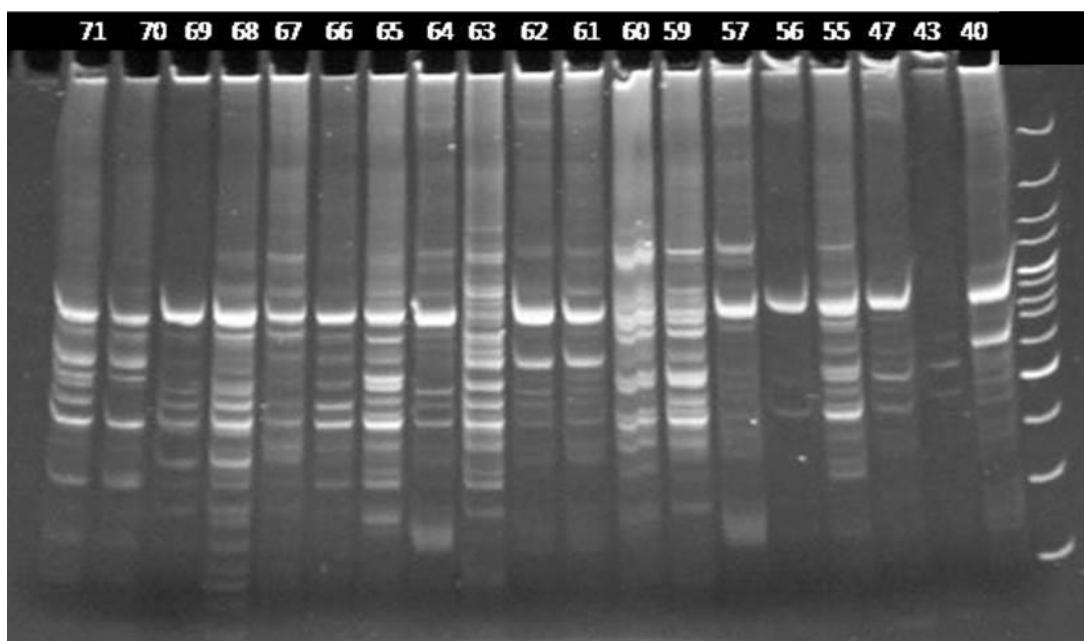


Figura 1. Patrones de bandas en *Citrus reticulata* generadas por el cebador microsatélite RAM (CCA)_n.

El grupo 1 está conformado por dos tipos de mandarinos: Satsuma y Tangor. Satsuma Okitsu es un clon nucelar de mandarina Satsuma originado por polinización controlada de la variedad 'Miyagawa' con *Poncirus trifoliata*, es un árbol de porte mediano y pendular, poco vigoroso, de follaje poco denso. Tiene algunas espinas y es muy productivo. Los tangors son el resultado del cruce entre mandarina *C. reticulata* y naranjo dulce *C. sinensis* (L.) Osbeck. De cruces con parentales poco conocidos tenemos variedades como: Ellendale, Murcot y Ortanique. Ortanique es un tangor de origen natural, originario de Jamaica, donde se conoce desde 1920. Sus árboles son grandes, vigorosos, con hojas grandes de color verde oscuro, y productivos. Los frutos son de tamaño medio a grande, ligeramente aplanados por su zona estilar, de corteza ligeramente rugosa, gruesa, de color rojizo intenso y muy adherida a la pulpa, que dificulta seriamente su pelado a mano, y un elevado contenido en zumo, de buen sabor.

En el grupo 2 se encuentran ocho accesiones que pertenecen al grupo de las Clementinas denominadas: Clementina fina, Clementina 85, Clementina 88, Clementina 92, Oroval, Marisol, Cremenules y Oneco. Con el nombre de Clementinas se conoce a un grupo de mandarinas, clasificadas así más por cuestiones comerciales que por razones botánicas, de tamaño de fruto entre pequeño y mediano, originadas por mutaciones espontáneas unas de otras, y cuyo origen inicial es el mandarina común *Citrus reticulata*. Es una variedad muy interesante, que tiene a su favor la precosidad y excelente calidad de sus frutos, muy apreciado sobre todo en ciertos mercados, como en el francés. Su principal desventaja es la falta de productividad, que se atribuye al exceso de vigor de la planta y a ser ésta muy exigente en condiciones de medio y cultivo (González-Sicilia de Juan, 1960).

Los grupos 3, 4, 5 y 6 que corresponden a 20 accesiones están principalmente integrados por diferentes

híbridos de mandarina. En el grupo 3 con un nivel de similaridad de 0.72 se agruparon las accesiones ICA Jamundí, ICA Amaime e ICA-Bolo, variedades mejoradas colectadas en el Valle del Cauca. En el grupo 4 se encuentran los híbridos: Pixie, Arrayana, Osceola, Fairchild, Beauty, Page, Lee y Santander. Fairchild y Osceola son híbridos procedentes del cruce de Mandarina Clementina y Tangelo Orlando. Page es híbrido procedente del cruce de Tangelo Mineola y Mandarina Clementina. Beauty es un material introducido de IRFA CIRAD Francia y Pixie y Lee son materiales introducidos de la Universidad de Riverside, California. Igualmente, los híbridos Corsica 1 y Corsica 2 introducidos de Córcega, Francia, mostraron un alto nivel de similaridad de 0.75 y se ubicaron en el grupo número 4.

En el grupo 5 con un nivel de similaridad de 0.67 se ubicaron los híbridos Fortune (Mandarina Clementina x Mandarina Dancy), Kinnow (Mandarina King x Willow. leaf), Kara (Satsuma Owari x mandarina King), Fremont material introducido de Riverside, California y Fortune mandarin introducido de IRFA CIRAD Francia.

El hecho que los géneros de la subfamilia *Auratioideae*, tribu *Citreae*, subtribu *Citrinae*, hibriden con facilidad, ha creado un interesante grupo de plantas. La presencia de híbridos intergenéricos es frecuente entre ellas, aunque raro en el reino vegetal, lo que explica la dificultad de la clasificación botánica de los agrios.

De entre los híbridos de los agrios, los citranges *C. sinensis* x *P. trifoliata* y los citrumelos *C. paradisi* x *P. trifoliata* son los de mayor importancia comercial por su utilización como portainjertos. Otros, como los tangelos, los tangor y los híbridos de mandarinas, han visto extendido su cultivo como una "variedad" más por su semejanza con las mandarinas o con las naranjas, comercializándose como tales.

A un nivel de similaridad de 0.60 se encuentra dos tangelos, los cuales se diferenciaron del resto de las accesiones

evaluadas, esto posiblemente obedezca a sus características morfológicas claramente distinguibles (grupo 6). Los tangelos con híbridos de mandarina *C. reticulata* y pomelo *C. paradisi* Macf. Los más importantes, 'Minneola', de maduración tardía, y 'Orlando', de maduración precoz, ambos híbridos de pomelo 'Duncan' x mandarina 'Dancy'. En las pocas plantaciones que existen su comportamiento agronómico es adecuado, vegetando bien y dando elevadas cosechas de frutos de buen tamaño. Su sabor, ligeramente ácido, su dificultad de pelado, la presencia de semillas y

cierta existencia a la alternancia de cosechas, son los principales problemas con los que se encuentra su expansión (Agusti, 2005).

El dendrograma (Figura 2) mostró que todas las accesiones de mandarinas están estrechamente relacionadas. Aunque las mandarinas han sido agrupadas en diferentes grupos, la similitud genética entre las 30 accesiones evaluadas fue relativamente alta (0.75), sugiriendo que la base genética del germoplasma de mandarina es bastante estrecha.

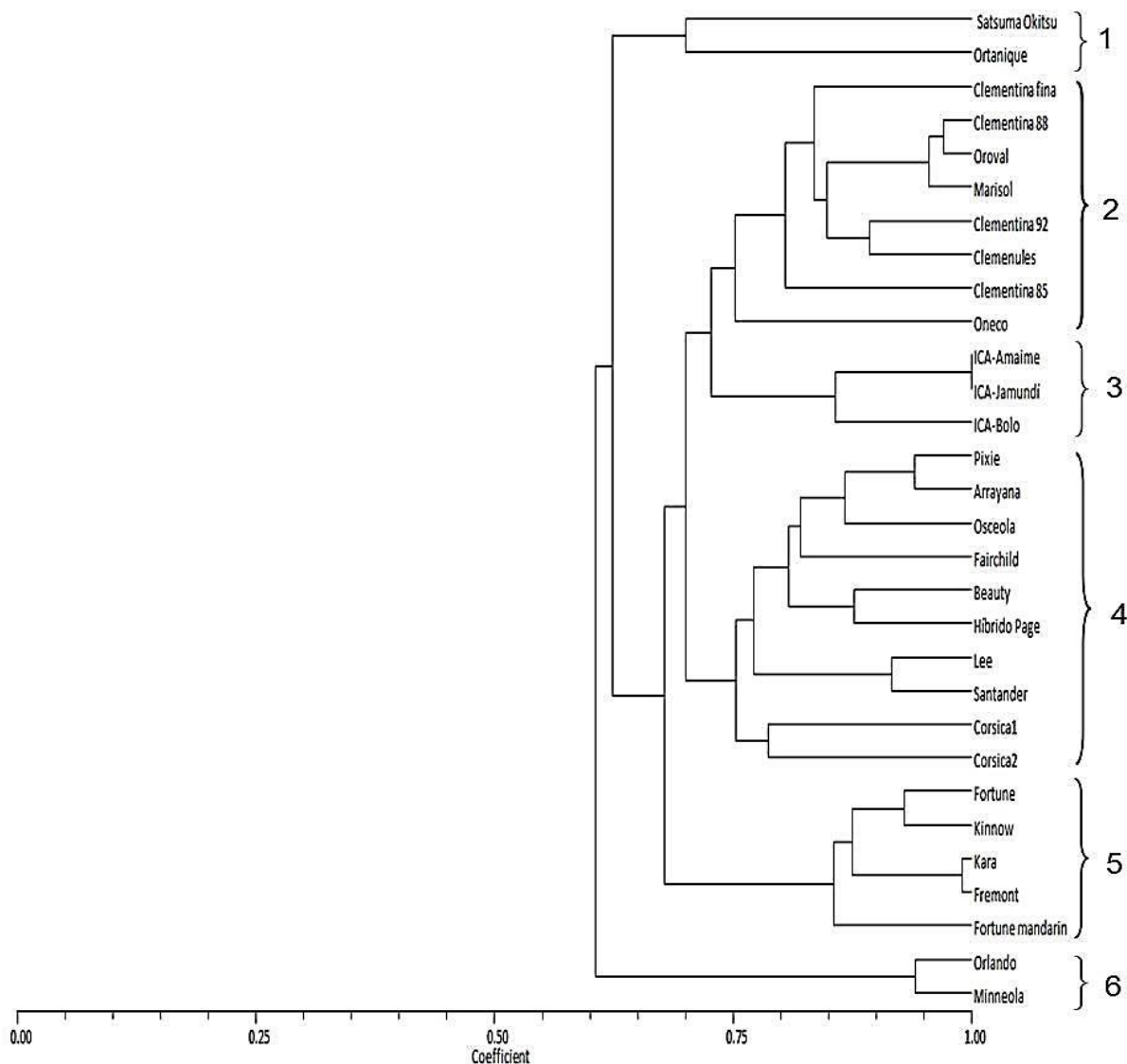


Figura 2. Dendrograma de la estructura genética de 30 accesiones de mandarina (*C. reticulata*) basado en el Coeficiente de Nei-Li, y calculado de los datos combinados de los siete cebadores Microsatélites RAMs.

Los resultados concuerdan con lo encontrado por Coletta Filho *et al.* (1998), quienes utilizaron 22 marcadores RAPDs para evaluar la diversidad genética entre 35 accesiones de mandarina, incluyendo 10 especies y 7 híbridos. Los marcadores RAPDs obtenidos fueron suficientes para generar algunos marcadores específicos de accesiones, los cuales las separaron en varios grupos, donde muchos de ellos concordaron con las unidades sistemáticas propuestas por Tanaka o Weber. La similaridad genética dentro del grupo de mandarina fue alta (0.77), sugiriendo que los cultivares de mandarina tienen una estrecha base genética.

Coletta Filho *et al.* (1998), Federici *et al.* (1998) and Fang *et al.* (1998) proponen que las mandarinas constituyen una sola especie *C. reticulata*, compuesta por varios individuos morfológica y genéticamente diferentes y un gran número de híbridos, más que un gran número de especies como lo proponen algunos estudios taxonómicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, la técnica RAMs puede ser una herramienta útil para caracterizar la diversidad genética de diferentes accesiones dentro del género *Citrus*, además es una técnica que no necesita información previa, utiliza un cebador, puede ser reproducible por el tamaño del cebador, diferencia entre especies y variaciones intraespecíficas, hay relaciones entre grupos biológicos y grupos formados por la técnica, es de bajo costo y de fácil implementación (Muñoz *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

A pesar de la alta diversidad presente en el grupo de mandarina, sólo un pequeño grupo de cultivares son utilizados comercialmente, de ahí que es importante explotar esa diversidad genética presente en las colecciones *in situ* para futuros programas de mejoramiento.

La información de la caracterización molecular encontrada en este trabajo puede ser utilizada para el manejo del germoplasma, protección de variedades y nuevas investigaciones para el mejoramiento del género *Citrus*.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de Diversidad Biológica de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira y al Centro de Investigación CORPOICA-Palmira.

LITERATURA CITADA

- Agusti, M. 2003. Citricultura. Segunda Edición. Ediciones Mundi-Prensa Barcelona. 422 pp.
- Ahmad, R., Struss, D., Southwick, S.M. 2003. Development and characterization of microsatellite markers in *Citrus*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 128: 584 - 590.
- Andrade-Rodríguez, M., Villegas-Monter, A., Carrillo-Castañeda, G., García-Velásquez, A. 2004. Polyembryony and identification of volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. Pesq. Agropec. Bras. 39: 551-559.
- Avilán, L., F. Leal, y D. Bautista. 1989. Manual de fruticultura. América, Caracas. pp. 1316-1317.
- Bretó, M.P., Ruiz, C., Pina, J.A and Asíns, M.J. 2001. The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. Molecular Phylogenetics and Evolution 21: 285-93.
- Cameron, S.W. and H.B. Frost. 1968. Genetic, breeding and nucellar embryony. *In*: Reuther, W., L.D. Batchelor and H.J. Webber (eds.), *The Citrus Industry*, Vol. 2, pp. 325-89. University of California, USA.
- Coletta Filho, H.D., Machado, M.A., Targon, M.L.P.N., Moreira, M.C.P.Q.D.G. and Pompeu, Jr., J. 1998. Analysis of phylogenetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. *Euphytica* 102: 133-139.

- Corazza-Nunes, M.J., Machado, M.A., Nunes, W.M.C., Cristofani, M and Targon M.L.P.N. 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (*C. paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSRs markers. *Euphytica* 126:169-76.
- Cristofani, M., Novell, V.M., Oliveira, A.C., Otaviano, A.R., Souza, A.A and Machado, M.A. 2001. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. *Laranja* 22: 231-241.
- Cristofani, M., Machado, M.A., Novelli, V.M., Souza, A.A. and Targon, M.L.P.N. 2003. Construction of linkage maps of *Poncirus trifoliata* and *Citrus sunki* based on microsatellite markers. Proceedings of the 9th International Society of Citriculture Congress, Orlando, Flórida, 2000, V. 1, pp: 175-178.
- Dellaporta, S.I., Wood, J., and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Versión II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1 (14): 19-21.
- Deng, Z.N., Gentile, A., Nicolosi, E., Vardi, A., Tribulato, E. 1995. Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers. *J. Hort. Sci.* 70: 117-125.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*. 26: 297-302.
- Fang, D.Q. and Roose, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 408-17.
- Fang, D., Roose, M.L., Krueger, R.R, and Federici, C.T. 1997. Fingerprinting trifoliata orange germplasm accessions with isozymes, RFLP's, and inter simple sequence repeat markers. *Theor Appl. Genet.* 97: 211-219.
- Fang, D., Krueger, R.R, and Roose, M.L. 1998. Phylogenetic relationships among selected citrus germplasm accessions revealed by Inter.-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123: 612-617.
- Federici, C.T., Fang, D.Q, and Scora, R.W. 1998. Phylogenetic relationships within de genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor Appl Genet.* 96: 812-822.
- Golein, B., Koltunow A.M., Talaie, A., Zamani, Z, and Ebadi, A. 2005. Isolation and characterization of microsatellites loci in the lemon (*Citrus limon*). *Molecular Ecology Notes*, 5: 253-255.
- González-Sicilia de Juan, E. 1960. El cultivo de los agrios. Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas. Madrid, España. 806 pp.
- Green, R.M, Vardi, A, and Galun, E. 1986. The plastome of citrus cultivars and species a comparison with related genera. *Theor. Appl. Genet.* 72: 170-177.
- Guo, W.W., Deng, X.X, and Yi, H.L. 2000. Somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis*) and grapefruit (*C. paradisi*) for seedless triploid breeding. *Euphytica* 116: 281-285.
- Hantula, J.; Dusabenyagasani, M.; Hamelin, R. C. 1996. Random Amplified Microsatellites (RAMs) a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur. J. For. Path.* 26: 159-166.
- Herrero, R., Asíns, M.J., Pina, J.A., Carbonell, E.A. and Navarro, L. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1327-1334.
- Khan, I.A, and Roose, M.L. 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedling in three cultivars of trifoliata orange. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 113: 105-110.
- Kijas, J.M.H., Fowler, J.C.S. and Thomas, M.R. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome* 38: 349-55.
- 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*. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 701-706.
- Koehler-Santos, P., Dornelles, A.L. and Freitas, L.B. 2003. Characterization of mandarin citrus germplasm from southern Brazil by morphological and molecular analyses. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38: 797-806.
- Liou, P.C., Gmitter, F.G, and Moore, G.A. 1996. Characterization of the citrus genome through analysis of restriction fragment length polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 92: 425-435.

- Mahuku, G.S., Henríquez, M. A., Muñoz, J.E and Buruchara, R.A. 2002. Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the Bean Angular Leaf Spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytopathology*, 96 (6): 580-589.
- Moore, G.A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of citrus from molecular markers. *TRENDS in Genetics* 17: 536-540.
- Morillo, C.A., Morillo, C.Y., Chagüeza, V.Y, Caicedo, A.A., Jaramillo, V.J., Muñoz, R.O., Arcos, A.L., Vásquez, H.D. y Muñoz, J.E. 2009. Caracterización de la diversidad genética en naranja y comparación del polimorfismo de Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs) usando electroforesis de poliacrilamida y agarosa. *Acta Agronómica*. 58 (4): 234-244.
- Muñoz, J. E.; Morillo, C. A.; Morillo, C. Y. 2008. Microsatélites Amplificados al Azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agron (Palmira)*. 57 (4): 219-226.
- Nei, M.; Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restricción endonucleasa. *Proc Nat Acad Sci* 79: 5267 – 5273.
- Nicolosi, E., Deng, Z.N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G. and Tribulato, E. 2000. *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1155-1166.
- Novelli, V.M., Cristofani, Mariangela., Souza, Alessandra A. and Machado, Marcos A. 2006. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology* 29 (1): 90-96.
- 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.
- Pang, X.M., Hu, C.G and Deng, X.X. 2003. Phylogenetic relationships among *Citrus* and its relatives as revealed by SSR markers. *Acta Genetica Sinica* 30: 81-87.
- Ramalho, L.D., Duarte, V.A., Dos Santos, S.F.W, and De Jesus, B.C. 2000. Identificacao de seedlings zigóticos de citros mediante o uso de marcadores RAPD. *Rev. Bras. Frutic.* 22: 181-185.
- Ruiz, C., Bretó, M.P. & Asins, M.J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica* 112: 89-94.
- Scora, R.W., 1988. Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated *Citrus*. In: Goren R. and K. Mendel, (eds.). *Proc Int Soc Citricult*, 1: 277-89.
- Sneath, P.H.A., and Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. W.H. Freeman & Co., San Francisco. 573 pp.
- Sugarawa, K, and Oowada, A. 1995. Identification of Citrus chimeras by RAPD analysis. *Hort. Science* 30: 1276-1278.
- Swingle, W.T. 1967. The botany of citrus and its wild relatives. In: W. Reuther, H.J. Webber & L.D. Batchelor (Eds), *The Citrus Industry*, pp. 190–430. Vol. 1 (second edition). University of California, USA.
- Tanaka, T. 1954. *Species Problem in Citrus*. Japanese Society for the Promotion of Science, Tokyo.
- Tapia, C.E., Espinosa, G. M.A., Warburton, L. M., Varela, S. A and Monter, V.A. 2005. Characterization of mandarin (*Citrus spp.*) using morphological and AFPL markers.
- Thomas, M.R., Scout, N.S., Botta, R., Kijas, J.M.H. 1998. Sequence-tagged site markers in grapevine and citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, Tokyo, 67(6): 1189-1192.
- Torres, A.M., Soost, R.K., and Mau-Lastovicka, T. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. *Amer. J. Bot.* 65: 869-881.
- Torres, A.M., Soost, R.K., and Mau-Lastovicka, T. 1982. Citrus isozymes. *J. Hered.* 73: 335-339.
- Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations, Vol 4. University of Chicago.