



CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE CLONES DE LA LIMA DULCE
[*Citrus atifolia*] UTILIZANDO MARCADORES ISSR
[Inter Simple Sequence Repeats]

Simón Vásquez ^{1a*}, Rosemarie Serrano ^{1b}

^{1a} Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Biotecnólogo Vegetal, Panamá

^{1b} Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Asistente de Investigación, Panamá

 *simon.vasquez@up.ac.pa <https://orcid.org/0000-0002-0952-6055>, rosemarie.serrano@up.ac.pa

RESUMEN

El Limón Persa (*Citrus latifolia*) es una especie atractiva a los productores e inversionistas panameños. La Diversidad Genética de 16 clones de Limón Persa procedentes de dos viveros oficiales; 11 del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA) y 5 del Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) fue estimada mediante marcadores moleculares Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá. Se seleccionaron 13 de 17 cebadores ISSR evaluados que generaron 30 bandas polimórficas. Se utilizó el Programa Computacional PopGene[®] para la generación de los resultados. Los resultados reflejaron existencia de 3 duplicados entre las 11 muestras evaluadas procedentes de Divisa y que 2 de las 5 muestras provenientes de Rio Hato se encuentran también establecidas en Divisa con identificaciones diferentes. No se encontraron duplicados dentro de las muestras de Rio Hato. Se concluye las muestras de Divisa (1 y 4) (8 y 10) y (3 y 6) son los mismos genotipos. Igualmente se pudo determinar que las muestras; Divisa 9 y Rio Hato 13, aunque tienen diferente identificación, en realidad son las mismas. Situación que se repite con las muestras Divisa 11 y Rio Hato 12.

PALABRAS CLAVES: *Citrus latifolia*, diversidad genética, marcadores ISSR, PCR.

GENETIC DIVERSITY CHARACTERIZATION OF SWEET LIMA [*Citrus Latifolia*] CLONES
USING ISSR MARKERS [Inter Simple Sequence Repeats]

ABSTRACT

The Persian Lemon (*Citrus latifolia*) is an attractive species to Panamanian producers and investors. The Genetic Diversity of 16 Persian Lemon clones from two official nurseries; 11 of the Ministry of Agricultural Development (MIDA) and 5 of the Institute of Agricultural Innovation of Panama (IDIAP) was estimated using molecular markers Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) in the Molecular Biology Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Panama. 13 out of 17 evaluated ISSR primers were selected that generated 30 polymorphic bands. The PopGene® Computational Program was used to generate the results. The results reflected the existence of 3 duplicates among the 11 samples evaluated from Divisa and that 2 of the 5 samples from Rio Hato were also established in Divisa with different identifications. No duplicates were found within the Rio Hato samples. It is concluded the samples of Currency (1 and 4) (8 and 10) and (3 and 6) are the same genotypes. It was also possible to determine that the samples; Currency 9 and Rio Hato 13, although they have different identification, they are the same. Situation that is repeated with the samples Currency 11 and Rio Hato 12.

KEYWORDS: *Citrus latifolia*, Genetic diversity, ISSR markers, primers, PCR.

INTRODUCCIÓN

El territorio panameño tiene un enorme potencial para producir un sinnúmero de especies frutales tropicales. Se reconoce también que existe demanda a lo interno y externo del país para la producción y comercialización de frutas cítricas, sin embargo, para manejar eficientemente la Producción Citrícola Nacional, la Certificación de la Sanidad Vegetal aunada a la Identidad Genética son fundamentales, sin estas condicionantes la rentabilidad de la actividad productiva no logrará alcanzar los niveles potenciales que tiene, aun aplicando las más eficientes tecnologías productivas ya que además de la Sanidad Vegetal, la Identidad Genética es fundamental para la comercialización del rubro, muy especialmente si es para fines de exportación. Para ello se requiere del apoyo de instituciones oficiales y de otras entidades certificadoras debidamente acreditadas.

Basado en lo anterior, en el año 2015, la Dirección Nacional de Agricultura del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA) gestionó a través de la oficina de Panamá del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) la introducción de yemas certificadas de cítricos provenientes de la Universidad de California (E.U.A.) en su sede de Riverside, con el objetivo multiplicarlas y distribuidas entre viveristas registrados y a partir de allí potencializar la actividad. Dentro de este grupo se incluyeron yemas de Limón Persa, destinadas al vivero del Instituto de Innovación Agropecuaria (IDIAP) en su sede de Río Hato, provincia de Coclé como en el del MIDA en Divisa provincia Herrera.

El objetivo de la presente investigación fue comparar la diversidad genética de clones de Lima Dulce (*Citrus latifolia*) establecidos en los viveros del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) en su sede de Río Hato y en el del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA) en su sede de Divisa, utilizando marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) con el fin de identificar duplicados y/o genotipos compartidos entre las muestras de *C. latifolia* existentes en ambos viveros.

Actualmente existen varias técnicas disponibles que permiten el estudio de la diversidad genética en plantas, incluyendo marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares (Vashishtha *et al.*, 2013).

La comprensión de la efectividad de diferentes marcadores moleculares es un paso clave para caracterizar y clasificar la planta (Scariot *et al.*, 2007).

Los más exitosos que se han desarrollado son los marcadores moleculares basados en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como Simple Sequence Repeat (SSR), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) e Inter. -Simple Sequence Repeat (ISSR) (Semagn *et al.*, 2006).

Los ISSRs son un tipo de marcador genético que nos permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tandem de motivos simples como (CT) n ó (CA) n , ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Los motivos repetidos, llamados también SSRs (simple sequence repeats) pueden ser penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos. (Cornejo, 2010)

Las secuencias repetitivas inter-simple (ISSR) son marcadores moleculares que se han utilizado con mucho éxito en especies cítricas. El marcador ISSR delimita fragmentos de ADN amplificados entre dos microsatélites en direcciones opuestas (Santos *et al.*, 2013). Además, los ISSR son considerados como marcadores dominantes y altamente reproducibles (Bornet y Branchard, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recibieron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá por parte del personal del Programa de Frutales del MIDA, dieciséis (16) muestras de hojas jóvenes de los materiales de *C. lantifolia* existentes (cinco de ellas) de los viveros del IDIAP Río Hato, y (once) del MIDA, Divisa.

Las actividades se dividieron en tres fases; la primera de ellas consistió en la extracción y purificación del ADN genómico. La segunda correspondió el proceso de amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la tercera fase consistió en el análisis y registro

de los productos de la amplificación (PCR) para su posterior ingreso al Programa Computacional PopGene®, y a partir de sus salidas interpretar los resultados.

I Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo de las hojas jóvenes provenientes de dieciséis accesiones de Lima Dulce. Cinco de ellas existentes en el vivero del IDIAP-Río Hato y las once restantes obtenidas en el vivero del MIDA-Divisa.

Se utilizó el protocolo de extracción CTAB (Doyle y Doyle, 1990). Para cada una de las accesiones se pesaron segmentos de hojas de 0.2 g, luego de colocarlas en un mortero se le añadió nitrógeno líquido para proceder a su maceración hasta obtener un polvo fino. Las muestras maceradas fueron colocadas en sendos tubos Eppendorf de 1.5 ml, para dar inicio al protocolo de extracción.

La cantidad y calidad del ADN se evaluó mediante análisis comparativo de las muestras en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR green.

Las muestras de ADN se diluyeron en agua ultrapura, y se estandarizaron a 5 ng / μ L para luego congelarse a -20 °C hasta el inicio de la etapa de amplificación.

II Amplificación de ADN's

Se evaluaron un total de 24 cebadores ISSR reportados por Santos *et al.* (2013) con la finalidad de detectar polimorfismos. La selección de los cebadores polimórficos se hizo a partir de la evaluación de estos, sobre cinco accesiones (Río Hato1, Río Hato 4, Divisa 3, Divisa 7 y Divisa 10) seleccionadas al azar como muestra representativa del material en estudio.

Se seleccionaron los cebadores que revelaron polimorfismos claros y seguros (mayor nitidez y repetitividad) siempre y cuando las bandas polimórficas no correspondieran a los extremos por considerarlas no confiables. En la Tabla 1, se presentan los cebadores polimórficos utilizados con sus respectivas secuencias de nucleótidos.

Se prepararon las mezclas de reactivos para las reacciones de amplificación ISSR a un volumen final de 25 μ L y conteniendo los siguientes reactivos; tampón enzimático 1X (50 KCl mM y Tris-HCl 10 mM, pH 8,3), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM (dATP, dTTP, dGTP, y dCTP), 0,4 μ M de cada cebador, 10 ng de ADN genómico y 1 U de ADN Taq polimerasa (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador 2700 de Applied Biosystems® de 96 pozos utilizando el siguiente programa: Un paso inicial a 94 ° C durante 3 minutos. 35 ciclos de 94 ° C durante 40s. 40s a una temperatura de recocido que varió entre 48 ° a 60 ° C (dependiendo de la temperatura de anidamiento del cebador) y 72 ° C durante 1 minuto, seguido de un paso de extensión final de 72 ° C durante 5 min.

TABLA 1. *Secuencias de cebadores ISSR, número de bandas polimórficas (NBP), número de bandas monomórficas (NBM) y número total de bandas (NTB) utilizados en el estudio de diversidad genética de Limones Persa.*

CEBADOR (ISSR)	SECUENCIA	NBP	NBM	NTB
DiCA 3'RG	CACACACACACACAR'G	3	5	8
TriCAC 3'RC	CACCACCACCACCACRC	2	5	7
TriTGT 3'YC	TGTTGTTGTTGTTGY'C	2	4	6
TriTGT 5'CR	CRTGTTGTTGTTGTTGT	2	6	8
TriAAC 3'RC	AACAACAACAACAACRC	5	2	7
TriAAG 3'RC	AAGAAGAAGAAGAAGRC	1	2	3
TriATC 3'RC	ATCATCATCATCATCRC	2	3	5
TriACG 3'RC	ACGACGACGACGACGRC	4	2	6
TriAGA 3'RC	AGAAGAAGAAGAAGARC	3	3	6
TriTTG 3'RC	TTGTTGTTGTTGTTGRC	2	3	5
TriTCT 3'RC	TCTTCTTCTTCTTRC	2	2	4
TriTGA 3'RC	TGATGATGATGATGARC	1	4	5
TriCAA 3'RC	CAACAACAACAACAARC	1	3	4
TOTAL		30	44	74
%		40,5	59,4	100

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2,0%. Los geles fueron teñidos con SYBR green y fotografiados utilizando el sistema de captura de imágenes.

III Registro de los Productos de las Amplificaciones.

Los productos de las amplificaciones de las muestras con cada uno de los 13 cebadores se registraron en una matriz binaria en función de la presencia (+) o ausencia (0) de las bandas amplificadas para cada una de las muestras evaluadas. Los datos tabulados fueron posteriormente ingresados al Programa Computacional PopGene® (Yeh *et al.*, 1997). El programa computacional generó las salidas correspondientes a los índices de diversidad genética, frecuencias alélicas y dendogramas (árboles de asociación entre las muestras). A partir de estas salidas se interpretaron y discutieron los resultados de esta investigación.

RESULTADOS

Los resultados reflejan la existencia de 3 duplicados entre las 11 muestras evaluadas procedentes de Divisa. Se constató que 2 de las 5 muestras provenientes de Río Hato se encuentran también establecidas en Divisa. No se encontraron duplicados dentro de las muestras de Río Hato.

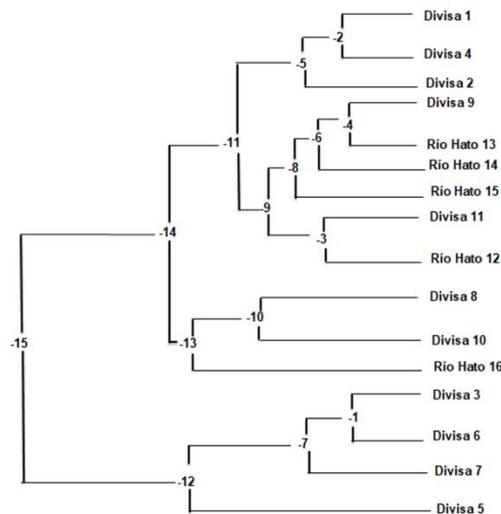


Figura 1. Dendrograma basado en el método UPGMA para 16 muestras de Limón Persa a partir de 30 bandas polimórficas de marcadores ISSR.

DISCUSIÓN

Mediante el programa PopGene (Yeh *et al.*, 1997) se generó un dendograma (Figura 1) donde se pueden apreciar los patrones que exhiben las agrupaciones de las accesiones sometidas a estudio. En el mismo muestra la conformación de dos grupos claramente definidos y diferenciados en su diversidad genética. El primer grupo (nodo 12) está conformado por las muestras 3, 5, 6 y 7 procedentes del vivero del MIDA (Divisa). El segundo grupo (nodo 14) se asocian las muestras del MIDA (Divisa) 1, 2, 4, 8, 9, 10 y 11 junto con las cinco muestras procedentes del vivero del IDIAP (Rio Hato).

Al analizar la Figura 1., se aprecia la existencia de duplicados dentro del conjunto de los materiales procedentes de Divisa ya que presentan idénticos grados de diversidad genética (Divisa 3 y 6) (Divisa 8 y 10) y (Divisa 1 y 4).

No se encontraron duplicados dentro del conjunto de materiales procedentes de Rio Hato.

Se pudo establecer que las dos de las cinco muestras provenientes de Rio Hato se encuentran también establecidas en Divisa con identificaciones diferentes; Divisa 9 con Rio Hato 13; lo mismo que Divisa 11 con Rio Hato 12. Estas parejas comparten el mismo nivel de diversidad genética, por lo que se estable que son los mismos genotipos.

CONCLUSIONES

A partir del uso de marcadores moleculares ISSR se logró valorar la diversidad genética de las 16 muestras de Limones Persa provenientes de los viveros del IDIAP Rio Hato y del MIDA Divisa.

Existen tres duplicados dentro del conjunto de muestras procedentes de Divisa (3,6) (8,10) y (1,4)

Ambos viveros (Divisa y Rio Hato) comparten genotipos comunes (Divisa 9 con Rio Hato 13) y (Divisa 11 con Rio Hato 12)

AGRADECIMIENTOS

La Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá agradece el vital apoyo recibido de parte del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA-Panamá) al facilitar los reactivos y materiales necesarios para realizar el presente trabajo de investigación cuyos resultados son de marcado interés para la Dirección Nacional de Agricultura del Ministerio de Desarrollo Agropecuario de la República de Panamá.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bornet, B., & Branchard, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting *Plant Molecular Biology Reporter* 19, 209–215.
- Cornejo R. A., Serrato D. A., Rendón B. A., & Rocha M. G. (editores) 2014. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Blvd. Adolfo Ruiz Cortines 4209. Col. Jardines en la Montaña C.P. 14210. Delegación Tlalpan, México, D.F.
- Doyle J. J., & Doyle J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus Rockville* 12, 13-15.
- Santos, M. G., Passos, O. S., Soares, Filho, W. S., Girardi, E. A., Gesteira, A. S., & Ferreira, C. F. (2013). Variability analysis of ‘Persian’ acid lime tree selections using agronomic and molecular markers. *Genet. Mol. Res.* 12 (4), 4604-4614
- Scariot, V., De Keyser, E., Handa, T., & De Riek, J. (2007). Comparative study of the discriminating capacity and effectiveness of AFLP, STMS and EST markers in assessing genetic relationships among evergreen azaleas. *Plant Breed.* 126, 207-212.
- Semagn, K., Bjornstad, Å., Skinnes, H., Maroy, A. G, Tarkegne, T., & William, M. (2006). Distribution of DArT, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled haploid hexaploid wheat population. *Genome* 49, 545–555
- Vashishtha, A., Jehan, T., & Lakhanpaul, S. (2013). Diversidad genética y estructura poblacional de *Butea monosperma* (Lam.) Taub. - un posible árbol de leguminosas medicinales. *Fisiología y biología molecular de las plantas*, 19 (3), 389-397.
- Yeh, F. C., Yang, R., & Boyle, T. (1997). Popgene version 1,2.1. Microsoft windowsbased freeware for population genetic analysis. University of Alberta. Canada