

# Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços  
e Possibilidades

Manuel Simões  
(organizador)

VOL II

 EDITORA  
ARTEMIS  
2023

# Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços  
e Possibilidades

Manuel Simões  
(organizador)

VOL II

 EDITORA  
ARTEMIS  
2023



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

<b>Editora Chefe</b>	Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira
<b>Editora Executiva</b>	M. <sup>a</sup> Viviane Carvalho Mocellin
<b>Direção de Arte</b>	M. <sup>a</sup> Bruna Bejarano
<b>Diagramação</b>	Elisangela Abreu
<b>Organizador</b>	Prof. Dr. Manuel Simões
<b>Imagem da Capa</b>	Vivilweb/123RF
<b>Bibliotecário</b>	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

#### Conselho Editorial

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”*, Cuba  
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil  
Prof. Dr. Agustín Olmos Cruz, *Universidad Autónoma del Estado de México*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amanda Ramalho de Freitas Brito, Universidade Federal da Paraíba, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Júlia Viamonte, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal  
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano*, Peru  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Ester Mallmann Centenaro, Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla*, Espanha  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Pimentel, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Catarina Castro, Universidade Nova de Lisboa, Portugal  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cirila Cervera Delgado, *Universidad de Guanajuato*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Neves, Universidade Aberta de Portugal  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Padovesi Fonseca, Universidade de Brasília-DF, Brasil  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil  
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid*, Espanha  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Deuzimar Costa Serra, Universidade Estadual do Maranhão, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dina Maria Martins Ferreira, Universidade Estadual do Ceará, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edith Luévano-Hipólito, *Universidad Autónoma de Nuevo León*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal  
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, Universidade de São Paulo (USP), Brasil  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, Universidade Federal de Roraima, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, México

Prof.ª Dr.ª Emilas Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*  
Prof.ª Dr.ª Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca, Espanha*  
Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República, Uruguay*  
Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara, México*  
Prof. Dr. Fernando Hitt, *Université du Québec à Montréal, Canadá*  
Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Gabriela Gonçalves, *Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal*  
Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, *Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil*  
Prof.ª Dr.ª Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis, Argentina*  
Prof.ª Dr.ª Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*  
Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, *Instituto Politécnico da Guarda, Portugal*  
Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*  
Prof. Dr. Håkan Karlsson, *University of Gothenburg, Suécia*  
Prof.ª Dr.ª Iara Lúcia Tescarollo Dias, *Universidade São Francisco, Brasil*  
Prof.ª Dr.ª Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura, Peru*  
Prof.ª Dr.ª Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*  
Prof. Dr. Ivan Amaro, *Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil*  
Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bio-Bio, Chile*  
Prof.ª Dr.ª Ivânia Maria Carneiro Vieira, *Universidade Federal do Amazonas, Brasil*  
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz, *University of Miami and Miami Dade College, Estados Unidos*  
Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha, Espanha*  
Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, *Universidade de Évora, Portugal*  
Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, *UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros, Brasil*  
Prof. Dr. Jorge Ernesto Bartolucci, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*  
Prof. Dr. José Cortez Godínez, *Universidad Autónoma de Baja California, México*  
Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Díaz, *Instituto Politécnico Nacional, México*  
Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid, Espanha*  
Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín, Colômbia*  
Prof. Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México*  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil*  
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, *Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil*  
Prof.ª Dr.ª Livia do Carmo, *Universidade Federal de Goiás, Brasil*  
Prof.ª Dr.ª Luciane Spanhol Bordignon, *Universidade de Passo Fundo, Brasil*  
Prof. Dr. Luis Fernando González Beltrán, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*  
Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*  
Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodríguez, *Universidad Santiago de Compostela, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Márcia de Souza Luz Freitas, *Universidade Federal de Itajubá, Brasil*  
Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, *Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil*  
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, *Universidade Federal de Sergipe, Brasil*  
Prof.ª Dr.ª Mar Garrido Román, *Universidad de Granada, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Margarida Márcia Fernandes Lima, *Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil*  
Prof.ª Dr.ª María Alejandra Arecco, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*  
Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida José de Oliveira, *Universidade Federal da Bahia, Brasil*  
Prof.ª Dr.ª Maria Carmen Pastor, *Universitat Jaume I, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Maria do Céu Caetano, *Universidade Nova de Lisboa, Portugal*  
Prof.ª Dr.ª Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, *Universidade Federal do Maranhão, Brasil*  
Prof.ª Dr.ª Maria Gracinda Carvalho Teixeira, *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil*



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lúcia Pato, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana*, Cuba  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mauriceia Silva de Paula Vieira, Universidade Federal de Lavras, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ninfa María Rosas-García, Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Odara Horta Boscolo, *Universidade Federal Fluminense*, Brasil  
Prof. Dr. Osbaldo Turpo-Gebera, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*, Peru  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia, Brasil  
Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará, Brasil  
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí, Brasil  
Prof. Dr. Sergio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí, Brasil  
Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca*, Argentina  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange Kazumi Sakata, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)- USP, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Stanislava Kashtanova, *Saint Petersburg State University*, Russia  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal  
Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil  
Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca*, Colômbia  
Prof. Dr. Xosé Somoza Medina, *Universidad de León*, Espanha

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

E82 Estudos em biociências e biotecnologia [livro eletrônico] : desafios, avanços e possibilidades: vol. II / Organizador Manuel Simões. – Curitiba, PR: Artemis, 2023.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilíngue

ISBN 978-65-87396-83-5

DOI 10.37572/EdArt\_310523835

1. Ciências biológicas. 2. Biotecnologia. 3. Biomedicina.  
I.Simões, Manuel.

CDD 574

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**





## PREFÁCIO

A investigação científica e o desenvolvimento tecnológico têm permitido criar soluções para os mais diversos problemas sociais. Contudo, os avanços científicos e tecnológicos não se podem distanciar das abordagens de disseminação relevantes, que permitam que o conhecimento seja disponibilizado de forma criteriosa e compreensível à comunidade académica, às empresas/indústria e ao público em geral.

O segundo volume da edição “Estudos em Biociências e Biotecnologia” é composto por 12 capítulos que descrevem avanços significativos das ciências e tecnologias biológicas aplicadas a diversas áreas de investigação, complementando os trabalhos publicados no primeiro volume. Em particular, este volume, reúne capítulos relacionados com as ciências biológicas nas seguintes áreas/tópicos: biomédica (capítulos 1 e 2); biologia funcional e biotecnologia de plantas (capítulos 3 a 6); produção e proteção de alimentos (capítulos 7 a 9); ambiente e biorrecursos (capítulos 10 a 12).

O leitor deste volume beneficiará de um conjunto de informação inovadora que, além de ser um excelente contributo científico, contribuiu para dar resposta a diversos objetivos de desenvolvimento sustentável estabelecidos pela Assembleia Geral das Nações Unidas.

Manuel Simões

## SUMÁRIO

### MEDICINA

#### **CAPÍTULO 1..... 1**

AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL PROVENIENTES DE POBLACIÓN MEXICANA: PERSPECTIVAS EN EL DESARROLLO DE TERAPIA CELULAR

Flor Yohana Flores Hernández  
Héctor Miguel Ramírez Bedoy  
Laura Susana Villa García Torres  
Gleira Liseth González Pelayo  
Luz Patricia Escobar Santibáñez

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3105238351](https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238351)

#### **CAPÍTULO 2..... 14**

ALTERACIÓN EN VIABILIDAD CELULAR, DAÑO EN ADN Y CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE HSP70 EN LEUCOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A RADIACIÓN UVA Y CALOR

David Alejandro García López  
Rosa Gabriela Reveles Hernández  
Rosa María Ramírez Santoyo  
Luz Elena Vidales Rodríguez  
María Argelia López Luna  
Sergio Hugo Sánchez Rodríguez

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3105238352](https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238352)

### BIOLOGIA FUNCIONAL E BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

#### **CAPÍTULO 3..... 26**

IDENTIFICACIÓN DE HÍBRIDOS DE *Citrus aurantifolia* X *Citrus limon* UTILIZANDO MARCADORES DE SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS (SSR)

Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán  
Mario Orozco Santos  
Claudia Yared Michel López  
Paola Andrea Palmeros Suárez  
Mayra Guadalupe Mena Enriquez

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3105238353](https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238353)

**CAPÍTULO 4..... 40**

DINÁMICA DE CALIDAD, CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE NOGAL PECANERA  
(*CARYA ILLINOINENSIS* KOCH)

Joe Luis Arias-Moscoso  
Francisco Cadena-Cadena  
Felipe Reynaga Franco  
Alejandro García Ramírez  
Gilberto Rodríguez Pérez  
Dulce Alondra Cuevas-Acuña  
José Eliseo Ortiz Enríquez  
Jesús Arnulfo Márquez Cervantes

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3105238354](https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238354)

**CAPÍTULO 5..... 45**

GERMINACIÓN *in vitro* DE TRES ESPECIES DE ORQUÍDEAS ENDÉMICAS DE LA  
REGIÓN SUROCCIDENTAL DEL ESTADO DE MICHOACÁN, MÉXICO

María Guadalupe Mendoza García  
Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán  
Susana de la Torre Zavala  
Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3105238355](https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238355)

**CAPÍTULO 6..... 63**

ANÁLISIS DE LA PROPORCIÓN DE SEXOS DE *DIAPHORINA CITRI* KUWAYAMA EN  
EL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO

Araceli Flores Aguilar  
Benito Hernández Castellanos  
Julio César Castañeda Ortega  
Diana Pérez Staples  
Lourdes Cocotle Romero

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3105238356](https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238356)

**PRODUÇÃO E PROTEÇÃO ALIMENTAR**

**CAPÍTULO 7..... 69**

EL POLVO DE DIATOMEAS ES UNA OPCION SUSTENTABLE PARA PROTECCIÓN DE  
MAIZ ALMACENADO

José Guadalupe Loya Ramírez



Félix Alfredo Beltrán Morales  
Sergio Zamora Salgado  
Francisco Higinio Ruiz Espinoza  
Jesús Navejas Jiménez

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3105238357](https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238357)

**CAPÍTULO 8.....75**

ANÁLISIS BIOECONÓMICO DEL CULTIVO INTENSIVO FOTO-HETEROTRÓFICO DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) EN ALTA SALINIDAD CON REPOSICIÓN MINIMA DE AGUA, PARA EL CICLO VERANO-OTOÑO

Luis Daniel Moreno-Figueroa  
Humberto Villarreal-Colmenares  
Alfredo Hernández-Llamas  
José Naranjo-Páramo  
Mayra Vargas-Mendieta

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3105238358](https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238358)

**CAPÍTULO 9.....82**

¿CÓMO VA EL CAMBIO DE ESTATUS DE LOS CULTIVOS/ALIMENTOS NUS EN CULTIVOS/ALIMENTOS NO-NUS?

Ximena Rocío Cadima Fuentes

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3105238359](https://doi.org/10.37572/EdArt_3105238359)

**AMBIENTE E BIORRECURSOS**

**CAPÍTULO 10..... 93**

DECOMPOSITION OF THE INVASIVE ACACIA *LONGIFOLIA* IN A PERI-URBAN STREAM

Manuela Abelho

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_31052383510](https://doi.org/10.37572/EdArt_31052383510)

**CAPÍTULO 11..... 105**

REMOCIÓN DE CINCO PRODUCTOS FARMACÉUTICOS CATALOGADOS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES EN MEDIO ACUOSO UTILIZANDO LA ESPECIE VETIVER (*Chrysopogon zizanioides*)

Miriam Checa-Artos  
Daynet Sosa del Castillo  
Eulalia Vanegas María

Omar Ruiz-Barzola

Milton Barcos-Arias

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_31052383511](https://doi.org/10.37572/EdArt_31052383511)

**CAPÍTULO 12 .....122**

**GIBBERELLIC ACID DETERMINATION IN AGRICULTURAL SOILS**

Gabriel Hernández-Morales

José Enrique Botello-Álvarez

Marcela Cárdenas-Manríquez

Ricardo Gómez-González

Pasiano Rivas-García

Brenda Ríos-Fuentes

Ramiro Rico-Martínez

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_31052383512](https://doi.org/10.37572/EdArt_31052383512)

**SOBRE O ORGANIZADOR.....132**

**ÍNDICE REMISSIVO .....133**

## CAPÍTULO 3

### IDENTIFICACIÓN DE HÍBRIDOS DE *Citrus aurantifolia* X *Citrus limon* UTILIZANDO MARCADORES DE SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS (SSR)<sup>1</sup>

Data de submissão: 30/03/2023

Data de aceite: 18/04/2023

#### **Manuel de Jesús Bermúdez Guzmán**

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)  
Campo Experimental Tecomán  
Laboratorio de Biotecnología  
Tecomán, Colima, México  
ORCID: 0000-0003-1949-1922

#### **Mario Orozco Santos**

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)  
Campo Experimental Tecomán  
Laboratorio de Fitopatología  
Tecomán, Colima, México  
ORCID: 0000-0002-9451-2626

#### **Claudia Yared Michel López**

Universidad Autónoma de Baja California (UABC)  
Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA)  
Ejido Nuevo León, Mexicali  
Baja California, México  
ORCID: 0000-0002-3595-1768

#### **Paola Andrea Palmeros Suárez**

Departamento de Producción Agrícola  
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA)  
Universidad de Guadalajara  
Zapopan, Jalisco, México  
ORCID: 0000-0002-5629-5990

#### **Mayra Guadalupe Mena Enriquez**

Centro de Investigación Multidisciplinario en Salud  
Centro Universitario de Tonalá  
Universidad de Guadalajara,  
Tonalá, Jalisco, México  
ORCID: 0000-0002-7241-7847

**RESUMEN:** La apomixis es un tipo de reproducción asexual donde la formación de semillas porta embriones genéticamente idénticos al progenitor, constituyendo un obstáculo en programas de mejoramiento genético de muchas especies vegetales, incluyendo cítricos. La identificación de plantas híbridas se realiza mediante caracteres morfológicos, ensayos isoenzimáticos y marcadores moleculares. Estos últimos se han utilizado con mayor frecuencia debido a su precisión, destacando el uso del DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD, “Random Amplified Polymorphic DNA”) y Secuencias Simples Repetidas (SSR, “Simple Sequence Repeats”). En limón mexicano (*C. aurantifolia*) únicamente se han utilizado

<sup>1</sup> Esta información corresponde a un trabajo publicado previamente en la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas y fue generada con el proyecto de investigación titulado “Generación de híbridos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) con mayor tolerancia al huanglongbing”, el cual fue financiado por recursos fiscales del INIFAP. La información adicional para esta publicación incluye un apartado de perspectivas del trabajo.

marcadores RAPD para la identificación de híbridos, por lo que no existen reportes que hagan uso de marcadores SSR para este fin. El objetivo del presente trabajo fue identificar híbridos derivados de la polinización controlada entre *C. aurantifolia* var. “Colimex” X *C. limon* var. “Rosenberg” y su recíproca utilizando marcadores moleculares SSR. Durante el año 2014-2016 se colectaron hojas de árboles de limón de aproximadamente 12 meses de edad. Se evaluaron en total ocho marcadores moleculares SSR sobre los progenitores utilizados en este estudio y fueron seleccionados los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 para la identificación de híbridos en las dos poblaciones progenie. De un total de 40 y 43 individuos F1 procedentes de la cruce bidireccional entre “Colimex” X “Rosenberg”, se lograron identificar 17 y 35 plantas híbridas, respectivamente. Los resultados indican que los marcadores SSR son eficientes y confiables para la identificación de híbridos de limón mexicano.

**PALABRAS CLAVE:** Apomixis. Cítricos. Marcadores moleculares. Microsatélites.

## IDENTIFYING HYBRIDS OF *Citrus aurantifolia* X *Citrus limon* USING SIMPLE SEQUENCE REPEATS (SSR) MARKERS

**ABSTRACT:** Apomixis is a type of asexual reproduction where the seeds formation carries genetically identical embryos to the parent, constituting an obstacle in breeding programs for many plant species, including citrus. The identification of hybrid plants is carried out by morphological characters, isoenzymatic assays and molecular markers. The latter have been used more frequently because of their accuracy, standing out the use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and Simple Sequence Repeats (SSR). In Mexican lime (*C. aurantifolia*) RAPD markers have only been used for hybrid identification, so there are no reports that use SSR markers for this purpose. The aim of this paper was to identify hybrids derived from controlled pollination between *C. aurantifolia* var. “Colimex” x *C. limon* var. “Rosenberg” and its reciprocal using SSR molecular markers. During the 2014-2016 years, leaves of lime trees of approximately 12 months of age were collected. A total of eight SSR molecular markers were evaluated on the progenitors used in this study and the TAA45 and cAGG09 oligonucleotides were selected for the hybrids identification in the two progeny populations. From a total of 40 and 43 F1 individuals from the bi-directional cross between “Colimex” x “Rosenberg”, 17 and 35 hybrid plants were identified, respectively. The results indicate that SSR markers are efficient and reliable for the identification of Mexican lime hybrids.

**KEYWORDS:** Apomixis. Citrus. Microsatellites. Molecular markers.

## 1 INTRODUCCIÓN

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

Machado et al., 2011; Omura y Shimada, 2016). Las especies del género *Citrus* presentan poliembriónía y apomixis, que generan alteraciones en el proceso de reproducción sexual entre organismos vegetales, en el que múltiples embriones se encuentran en una semilla o donde varios embriones derivados del progenitor receptor del polen se originan del tejido nucelar que rodea al embrión cigótico (Koltunow et al., 1996; Kepiro y Roose 2007). La mayoría de los cítricos comerciales de todo el mundo se propagan como árboles injertados con la variedad de interés en un portainjerto (Wutscher y Hill, 1995; Khan y Kender, 2007). La mayor parte de estos portainjertos son apomícticos, por lo que si se requiere mantener la homogeneidad genética puede resultar ventajosa esta condición como un proceso de multiplicación clonal. De esta forma, se pueden producir plantas uniformes a partir de semillas a bajo costo. Por otra parte, cuando es deseable generar variabilidad mediante recombinación genética para la obtención de híbridos, con resistencia a enfermedades, por ejemplo, entonces la apomixis representa un obstáculo, ya que las plantas resultan genéticamente idénticas al progenitor receptor del polen (Khan y Kender, 2007). Para la identificación de plantas cigóticas en cítricos, se han utilizado marcadores fenotípicos, los cuales se basan principalmente en la morfología de las hojas. Por otra parte, los ensayos isoenzimáticos y el empleo de la citometría de flujo también se han utilizado como herramientas para realizar este tipo de análisis (Anderson et al., 1991; Ruiz et al., 2000; Viloria et al., 2005), sin embargo, estas técnicas pueden presentar algunas limitaciones. En la actualidad, el uso de la biología molecular ha permitido ampliar las herramientas utilizadas para la identificación genética de especies vegetales mediante el uso de marcadores moleculares, entre los cuales destacan los ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) y SSR (Simple Sequence Repeat) por sus siglas en inglés (Bastianel et al., 1998; Golein et al., 2011; Yildiz et al., 2013; Mondal y Saha, 2014; Mondal et al., 2015).

En Turquía se ha reportado el uso eficiente de los oligonucleótidos AG14 y TAA03 de marcadores SSR para identificar y eliminar individuos nucleares en poblaciones de híbridos, resultado de cruzamientos entre variedades de mandarinas (*C. reticulata*), naranjas (*C. sinensis*) y toronjas (*C. paradisi*) (Yildiz et al., 2013). Recientemente en la India se han empleado cuatro oligonucleótidos SSR con repeticiones AG: CCSM13, CCSM17, CCSM18 y CCSM147 para identificar plantas cigóticas y nucleares en una población de *C. reticulata* (Mondal et al., 2015). En México, las especies de *C. macrophylla* y *C. volkameriana* son comúnmente utilizadas como portainjertos para la propagación y establecimiento de árboles de limón mexicano. En el año 2004, Andrade-Rodríguez et al. (2004), realizaron un estudio para determinar el origen cigótico o nucelar en *C.*

*volkameriana* utilizando marcadores RAPD, obteniéndose resultados satisfactorios. De la misma manera, en el caso del limón mexicano (*C. aurantifolia*), se han utilizado exitosamente marcadores RAPD, destacando el uso del decámero OPH15 (Mondal y Saha, 2014); sin que existan reportes en los que se haya empleado otro tipo de marcadores moleculares, como los SSR.

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

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

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

### 2.2 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

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



y 5 µL de proteína K (20 mg/mL). Las muestras se incubaron durante 45 min a 65 °C en baño maría, se mezclaron por inversión cada 5-10 minutos, después se centrifugaron durante tres minutos. La fase acuosa se recuperó en un nuevo tubo y se agregó 5 µL de RNasa A 10 mg/mL (Sigma Aldrich) a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente se adicionó un volumen de la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló vigorosamente usando un vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos. El sobrenadante recuperado se colocó en tubos de 1.5 mL y el DNA se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol frío y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 a -20 °C durante 30 min. La mezcla se centrifugó durante 10 min, el sobrenadante se decantó y el DNA se lavó con 500 µL de etanol al 70%; los tubos se centrifugaron durante 2 minutos, la fase acuosa se decantó y se invirtieron los tubos sobre papel absorbente para retirar el exceso de etanol. Los DNA se secaron a temperatura ambiente, resuspendidos en 80 µL de amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH,8) y finalmente, almacenados a -20 °C. 200 mg de tejido foliar fueron pulverizados con nitrógeno líquido hasta.

### 2.3 CUANTIFICACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD DEL DNA GENÓMICO

La concentración del DNA (ng/µL) se cuantificó con un espectrofotómetro (NanoDrop Thermo Scientific). La pureza se midió considerando las relaciones de A260:280 y A260:230. La integridad de los ácidos nucleicos se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (Sigma Aldrich) al 1% cargando 5 µL de DNA genómico de cada muestra. El gel se tiñó con Bromuro de etidio 10 mg/mL (Sigma Aldrich) y se visualizó con luz ultravioleta en un fotodocumentador (UVP).

### 2.4 ANÁLISIS DE MARCADORES SSR

Los progenitores *C. aurantifolia* y *C. limon* se analizaron con ocho juegos de oligonucleótidos descritos por Kijas et al., (1997) (Tabla 1) para identificar aquellos que generan polimorfismos diferenciales en ambas especies. Los oligonucleótidos seleccionados se utilizaron para analizar las dos poblaciones progenie de *C. aurantifolia* X *C. limon* y su recíproca. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un volumen de 15 µL conteniendo 7.5 µL de REDTaq ReadyMix™ (Sigma Aldrich), 5 µL de DNA genómico (20 ng/µL), 1 µL de cada oligonucleótido y 0.5 µL agua grado molecular. Las condiciones de amplificación para la PCR se llevaron a cabo en un termociclador MultiGene Labnet y fueron las descritas por Kijas et al., (1997) con algunas modificaciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min. La extensión final fue de 72 °C por 10 min.

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

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron ocho oligonucleótidos para detectar bandas diferenciales en los progenitores *C. aurantifolia* y *C. limon* utilizados en el presente estudio (Tabla 1). Los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 se seleccionaron debido a que permitieron la amplificación de bandas polimórficas de fácil interpretación; cuatro de los oligonucleótidos amplificaron mayormente bandas monomórficas no informativas y de baja resolución, por lo que no se utilizaron para la detección de híbridos en las poblaciones analizadas. El iniciador TAA41 generó bandas muy difusas que no se registraron. Por otra parte, el cebador TAA52 no permitió la amplificación de algún segmento de DNA en las muestras analizadas (Figura 1).

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

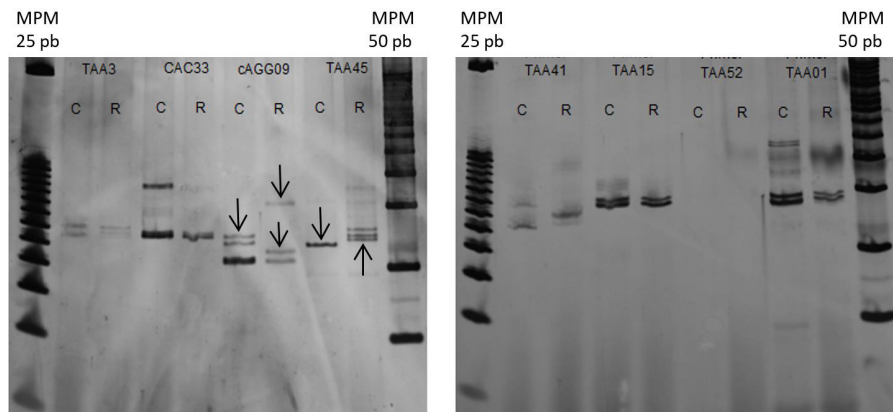
En las poblaciones de 40 y 43 individuos procedentes de las cruces de *C. aurantifolia* var. “Colimex” X *C. limon* var. “Rosenberg” y su recíproca, respectivamente, se lograron detectar un total de 52 híbridos con los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 (Tabla 2). El marcador TAA45 amplificó dos alelos polimórficos, uno presente en “Colimex”

y ausente en “Rosenberg” de aproximadamente 100 pb y otro presente en “Rosenberg” y ausente en “Colimex” de 110 pb. Este último fragmento en algunos geles se visualizó como una única banda, sin embargo, se trataba de 3 bandas polimórficas con pesos moleculares muy similares, por lo que en ocasiones no alcanzaban a separarse. En la figura 2 A se observan los híbridos detectados con el marcador TAA45 (722, 724, 736, 742 y 828), el cual también amplificó otras bandas polimórficas que no se tomaron en cuenta para la identificación de híbridos debido a su baja resolución.

Tabla 1. Oligonucleótidos SSR utilizados para detectar polimorfismos en *C. aurantifolia* y *C. limon*.

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

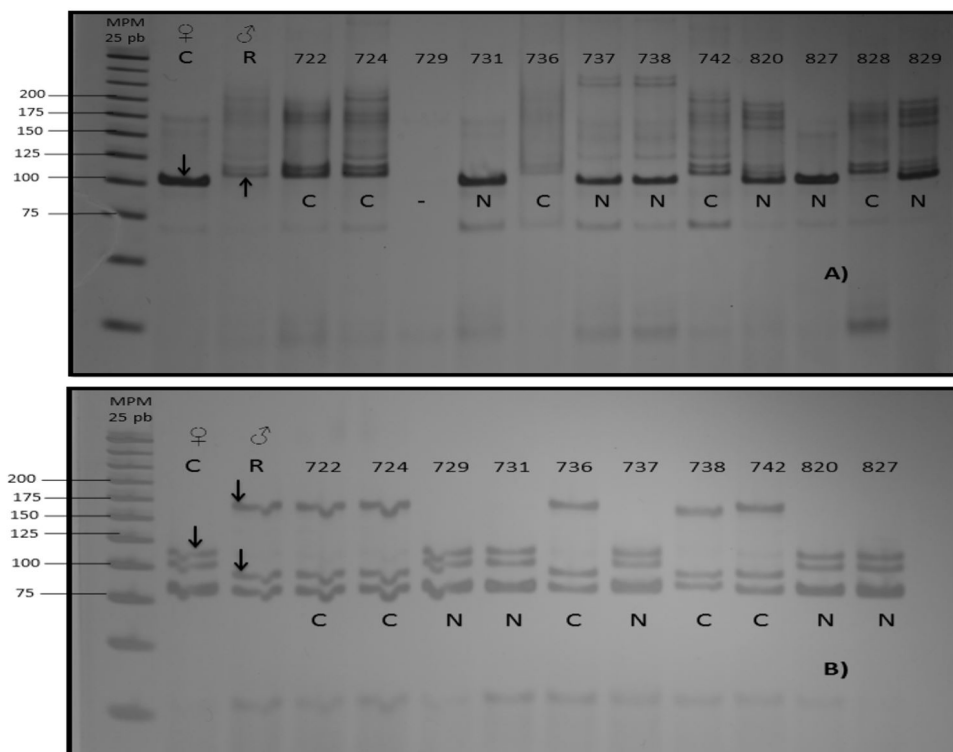
Figura 1. Evaluación de oligonucleótidos de marcadores SSR a partir de DNA de progenitores. C: *Citrus aurantifolia* var. “Colimex”. R: *Citrus limon* var. “Rosenberg”. MPM: Marcador de Peso Molecular 25 y 50 pb (Bioline).



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

De manera similar, los híbridos de “Rosenberg” se identificaron por los alelos de 105 y 115 pb, los cuales están presentes en “Rosenberg” y ausentes en “Colimex”. En este sentido, se considera que un híbrido puede ser determinado identificando un solo locus codominante para el cual los progenitores no comparten alelos, es decir, cruza de la configuración aa x bb, ab x cc o ab x cd. También se pueden usar marcadores dominantes, como RAPD e ISSR, si el progenitor receptor del polen es 00 (banda ausente) y el donador del polen es 11 (banda homocigótica presente) (Kepiro y Roose, 2007).

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



Sin embargo, la confirmación con un segundo locus es siempre deseable para confirmar la condición híbrida del individuo, lo cual se realizó en el presente trabajo con

el uso de los marcadores TAA45 y cAGG09, cuyos polimorfismos de cada progenitor segregaron en la descendencia según la población correspondiente.

Los marcadores SSR constituyen una herramienta útil para el estudio de la diversidad genética de los cítricos por su eficacia e información que generan (Amara et al., 2011; Biswas et al., 2011). Su empleo para la detección de híbridos (Ruiz et al., 2000; Oliveira et al., 2002; Ahmad et al., 2012; Yildiz et al., 2013; Mondal et al., 2015) resulta más práctico, efectivo y ventajoso, debido a que los trabajos que utilizaron RAPD e ISSR (Bastianel et al., 1998; Andrade-Rodríguez et al., 2004; Golein et al., 2011) por lo general obtienen una gran cantidad de bandas monomórficas no informativas que pueden dificultar el análisis de los datos. Los RAPD e ISSR, al ser marcadores dominantes no permiten diferenciar individuos heterocigotos a diferencia de los SSR que son marcadores codominantes. Además, los RAPD presentan una baja reproducibilidad, ya que pequeñas modificaciones en la técnica tales como concentración de DNA molde, grado de pureza y fidelidad de la enzima DNA polimerasa, entre otros factores, pueden alterar el patrón de fragmentos amplificados de DNA generados para una muestra. Adicionalmente, los RAPD no son locus-específicos, por lo que perfiles electroforéticos de bandas no pueden ser interpretados en términos de loci y alelos, y fragmentos de tamaño similar pueden no ser homólogos (Martínez et al., 2010; Kumari y Thakur, 2014).

En este estudio se realizaron cruzamientos bidireccionales de *C. aurantifolia* X *C. limon*, obteniéndose un 42.5% de plantas híbridas cuando se utilizó a “Colimex” como receptor del polen, y un 81.4% cuando se empleó a “Rosenberg” con el mismo propósito (Tabla 2). Las toronjas, naranjas y mandarinas presentan más de un 90% de embrionía nucelar, dependiendo de la variedad. En limón mexicano, la proporción de plántulas nucleares es de 78%, mientras que para los limones italianos es de 32-33% (Frost y Soost, 1968). Los resultados de este trabajo presentaron porcentajes ligeramente inferiores, 57.5 y 18.6% de embrionía nucelar en “Colimex” y “Rosenberg”, respectivamente. Estos valores más bajos a los reportados previamente podrían deberse a factores nutricionales, así como a la interacción genotipo-ambiente (Kepiro y Roose 2007).

Tabla 2. Origen cigótico o nucelar de las poblaciones de *C. aurantifolia* X *C. limon* y su reciproca mediante análisis SSR utilizando dos pares de oligonucleótidos. C: cigótico. N: nucelar. I: Indeterminado.

<i>C. aurantifolia</i> (♀) X <i>C. limon</i> (♂)				<i>C. limon</i> (♀) X <i>C. aurantifolia</i> (♂)			
No.	Muestra	cAGG9	TAA45	No.	Muestra	cAGG9	TAA45
1	722	C	C	1	770	N	C
2	724	C	C	2	773	N	N
3	729	N	I*	3	783	C	C
4	731	N	N	4	787	C	C

<i>C. aurantifolia</i> (♀) X <i>C. limon</i> (♂)				<i>C. limon</i> (♀) X <i>C. aurantifolia</i> (♂)			
No.	Muestra	cAGG9	TAA45	No.	Muestra	cAGG9	TAA45
5	736	C	C	5	789	C	C
6	737	N	N	6	795	N	N
7	738	C	N	7	797	C	C
8	742	C	C	8	799	C	C
9	820	N	N	9	810	C	C
10	827	N	N	10	811	C	C
11	828	C	C	11	812	C	C
12	829	N	C	12	813	N	C
13	743	N	N	13	814	C	N
14	745	C	N	14	815	C	C
15	747	N	N	15	816	C	C
16	748	C	I*	16	817	C	C
17	750	C	N	17	818	C	C
18	752	C	C	18	819	C	C
19	754	N	N	19	821	N	N
20	761	N	N	20	825	N	N
21	788	N	N	21	840	C	N
22	790	C	C	22	841	C	C
23	794	C	C	23	842	N	N
24	796	N	N	24	843	C	C
25	798	N	I*	25	844	C	N
26	800	N	N	26	845	C	C
27	804	N	N	27	846	N	N
28	766	N	N	28	847	C	C
29	767	C	C	29	848	C	C
30	771	N	N	30	849	C	C
31	775	C	N	31	850	C	C
32	776	N	N	32	851	C	C
33	778	N	N	33	852	C	C
34	780	N	N	34	723	C	C
35	781	C	C	35	730	C	N
36	784	C	C	36	734	C	C
37	831	N	N	37	739	C	N
38	833	N	N	38	744	C	C
39	838	N	N	39	746	C	C



<i>C. aurantifolia</i> (♀) X <i>C. limon</i> (♂)				<i>C. limon</i> (♀) X <i>C. aurantifolia</i> (♂)			
No.	Muestra	cAGG9	TAA45	No.	Muestra	cAGG9	TAA45
40	839	C	C	40	749	C	C
-	-	-	-	41	751	C	C
-	-	-	-	42	755	C	C
-	-	-	-	43	760	C	C
<b>No. plantas cigóticas</b>		17 (42.5%)	13 (32.5%)			35 (81.4%)	32 (74.42%)
<b>No. plantas nucelares</b>		23 (57.5%)	24 (60%)			8 (18.6%)	11 (25.58%)

\*I: No amplificó o presentó barrido el carril del gel.

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

Por otro lado, se ha comparado la eficacia de las isoenzimas y marcadores SSR para detectar híbridos, concluyendo que los marcadores moleculares son más eficientes para este fin. En esta misma investigación utilizaron los oligonucleótidos empleados en este trabajo: TAA41 y TAA45 obteniendo polimorfismos que permitieron identificar el origen cigótico en poblaciones de *C. reticulata* X *C. sinensis* y autopolinización de *Poncirus trifoliata* (Ruiz et al., 2000). Aunque en el presente trabajo el uso del iniciador TAA41 amplificó patrones de bandas difusas no informativas. En otro estudio, combinaron el empleo de marcadores morfológicos asistido por marcadores moleculares SSR de la serie CCSM para detectar híbridos derivados de *C. reticulata* y *C. sinensis* (Oliveira et al., 2002). Sin embargo, únicamente confirmaron la condición híbrida de las plantas detectadas por morfología, por lo que queda en duda la posible existencia de más individuos con origen sexual que pudieran ser detectados por los marcadores SSR. Por su parte Ahmad et al. (2012) emplearon los iniciadores: TAA15, TAA27, TAA33 y otros más de la serie CCSM para detectar híbridos en tres poblaciones F1 de varias cruces de naranjas y mandarinas, logrando detectar 23 y 5 híbridos de las cruces de las variedades "NARC 05-18" X "Tarocco" y NARC 05-17 X "Sanguinello", respectivamente. Adicionalmente, identificaron 35 híbridos más de "Kinnow" X "Tarocco" con el marcador CCSM147. Yildiz et al., (2013) utilizaron los iniciadores TAA01, TAA3, TAA41, TAA45, TAA52, CAC33 y cAGG09 para detectar híbridos en varias poblaciones empleando

como receptores del polen a las mandarinas y realizando cruzamientos con naranjas y toronjas. De los 500 individuos que constituían las progenies de las diversas cruzas, los iniciadores AG14 y TAA3 fueron los más efectivos para identificar individuos cigóticos. Las mandarinas “Fremont” y “Robinson” produjeron 36.91 y 31.09% de plantas nucelares, respectivamente. Finalmente, Mondal et al. (2015) recientemente hicieron uso de los oligonucleótidos TAA15, TAA27 y TAA33 para detectar híbridos de *C. reticulata* y reportaron que ninguno de estos iniciadores permitió la identificación del origen sexual en la progenie evaluada, por lo que recurrieron a los iniciadores de la serie CCSM para su identificación. A pesar de que los marcadores SSR proveen información útil para la identificación de plantas híbridas en diferentes especies de cítricos, para este propósito se requiere de la implementación de técnicas como Tecnología de Diversidad por Arreglos (DArT, “Diversity Array Technology”), Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP, “Single Nucleotide Polymorphism”) o Fusión de Alta Resolución (HRM, “High Resolution Melt”), sin embargo, actualmente resultan muy costosas.

#### 4 CONCLUSIONES

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

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

#### 5 PERSPECTIVAS

Con los datos generados en este trabajo se pueden aprovechar los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos TAA45 y cAGG09 para ser purificados del gel de poliacrilamida y secuenciarse. Conocer la secuencia de nucleótidos de los fragmentos polimórficos permitirá realizar un análisis BLAST en la base de datos de NCBI para conocer con que función biológica están relacionados. Paralelamente, al conocer la secuencia de nucleótidos se podrán diseñar oligonucleótidos específicos para su amplificación por PCR y posterior visualización en geles de agarosa, los cuales consumen menor tiempo y

son más económicos en comparación con los geles de poliacrilamida para los marcadores SSR. De esta forma, la presencia o ausencia estos alelos PCR específicos podrá indicar la condición cigótica o nucelar de las muestras de una manera más práctica dentro del programa de mejoramiento genético del limón mexicano del INIFAP.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, M.; Javaid, A.; Rahman, H.; Hussain, S. I.; Ramzan, A. and Ghafoor, A. 2012. Identification of mandarin X orange hybrids using Simple Sequence Repeat markers. *Journal of Agricultural Research*. 50(2): 225-232.

Amara, M. H.; Biswas, M. K.; Zhang, Z. and Guoa, W. W. 2011. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of citrus germplasm collection. *Scientia Horticulturae*. 128(3): 220-227.

Anderson, C. M.; Castle, W. S. and Moore, G. A. 1991. Isozymic identification of zygotic seedlings in Swingle citrumelo *Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata* nursery and field populations. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116(2): 322-326.

Andrade-Rodríguez, M.; Villegas-Monter, A.; Gutiérrez-Espinosa, M. A.; Carrillo-Castañeda, G. and García-Velázquez, A. 2004. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. *Agrociencia*. 39(4): 371-383.

Bastianel, M.; Schwarz, S. F.; Filho, H. D. C.; Lin, L. L.; Machado, M. and Koller, O. C. 1998. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. *Genetics and Molecular Biology*. 21(1): 123-127.

Biswas, M. K.; Chai, L.; Amar, M. H.; Zhang, X. and Deng, X. 2011. Comparative analysis of genetic diversity in citrus germoplasm collection using AFLP, SSAP, SAMPL and SSR markers. *Scientia Horticulturae*. 129(4): 798-803.

Frost, H. B. and Soost, R. K. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: W. Reuther, L. D. Batchelor and H. J. Webber (eds). *The Citrus Industry*, Vol. 1. University of California Press. Berkeley, California. pp. 290-324.

Golein, B.; Fifaei, R. and Ghasemi, M. 2011. Identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus* interspecific crosses by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*. 10(82): 18965-18970.

Kepiro, J. L. and Roose, M. L. 2007. Nucellar embryony. In: I. Khan (eds). *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CABI. UK. pp. 141-149.

Khan, I. Q. and Kender, W. J. 2007. Citrus breeding: Introduction and objectives. In: I. Khan (eds). *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CABI. UK. pp. 1-8.

Kijas, J. M. H.; Fowler, J. C. S.; Thomas, M. R and Roose, M. L. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. *Theoretical and Applied Genetics*. 94: 701-706.

Koltunow, A. M.; Hidaka, T. and Robinson, S. P. 1996. Polyembryony in citrus. *Plant Physiology*. 110: 599-609.

Kumari, N. and Thakur, S. K. 2014. Random Amplified Polymorphic DNA. A brief review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 9(1): 6-13.

- Machado, M. A.; Cristofani-Yaly, M. and Bastianel, M. 2011. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal-SP. Volume Especial, E: 158-172.
- Martínez, M. C.; Helguera, M. y Carrera, A. 2010. Marcadores moleculares. In: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (eds). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. INTA. Argentina. pp. 70-85.
- Mendoza-Rodríguez, M. F.; Cervera-Goy, M. T.; Cabezas-Martínez, J. A.; Cenis, J. L. y Martínez-Zapater, J. M. 2001. Utilización de marcadores AFLP y SAMPL en la identificación genética de especies y variedades de cítricos. *Biotecnología Vegetal*. 1: 11-96.
- Mondal, B. and Saha, R. 2014. Identification of Zygotic and Nucellar seedling of *Citrus aurantifolia* and *Citrus reticulata* using RAPD. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 15(1): 25-30.
- Mondal, B.; Pramanick, S.; Saha, R. and Karmakar, M. 2015. Application of Simple Sequence Repeat markers for demarcation of *Citrus reticulata* nucellar and hybrid seedlings. *International Journal of Bioscience*. 6(2): 128-133.
- Oliveira, A. C.; Novac, G. A.; Cristofani, M. and Machado, M. A. 2002. Identification of Citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR. *Euphytica*. 128: 337-339.
- Omura, M. and Shimada, T. 2016. Citrus breeding, genetics and genomics in Japan. *Breeding Science*. 66(1): 3-17.
- Ruiz, C.; Paz, B. M. and Asins, M. J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedling in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica*. 112: 89-94.
- Sanguinetti, C. J.; Neto, E. D. and Simpson, A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 17(5): 915-919.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2016. Atlas agroalimentario 2016. Primera Edición. [www.gob.mx/siap](http://www.gob.mx/siap). Fecha de consulta: 9 de febrero de 2017.
- Tozlu, I.; Guy, C. L. and Moore, G. A. 1999. QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC1 progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and non-saline environments. *Genome*. 42(5):1020-1029.
- Viloria, Z. and Grosser, J. W. 2005. Acid citrus fruit improvement via interploid hybridization using allotetraploid somatic hybrid and autotetraploid breeding parents. *Journal of the American Society Horticultural Science*. 130(3): 392-402.
- Wutscher, H. K. and Hill, L. L. 1995. Performance of 'Hamlin' orange on 16 rootstocks in east-central Florida. *HortScience*. 30(1): 41-43.
- Yildiz, E.; Klapankiran, M.; Demirkeser, T. H.; Uzun, A. and Toplu, C. 2013. Identification of zygotic and nucelar individuals produced from several *Citrus* crosses using SSRs markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 41(2): 478-484.

## SOBRE O ORGANIZADOR

**Manuel Simões** é licenciado em Engenharia Biológica e doutorado em Engenharia Química e Biológica. Atualmente é Professor Associado com Agregação e Pró-Diretor da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), e investigador sénior do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE) do Departamento de Engenharia Química da FEUP. Nos últimos anos esteve envolvido em 10 projetos nacionais (5 como investigador principal) e 6 projetos europeus. Foi membro do comité de gestão da ação COST BACFOODNET (Rede Europeia para Mitigação da Colonização e Persistência Bacteriana em Alimentos e Ambientes de Processamento de Alimentos) e esteve envolvido em outras 2 ações: iPROMEDAI e MUTALIG. Manuel Simões tem mais de 190 artigos publicados em revistas indexadas no Journal of Citation Reports, 4 livros (1 como autor e 3 como editor) e mais de 40 capítulos em livros. Ele é Editor Associado para o jornal Biofouling - The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research (o periódico mais antigo sobre pesquisa em biofilme), Editor Associado para o jornal Frontiers in Microbiology e Section Editor-in-Chief para o jornal Antibiotics. Seus principais interesses de pesquisa estão focados nos mecanismos de formação de biofilme e seu controlo com agentes antimicrobianos, particularmente usando novas moléculas antimicrobianas, e no uso de microalgas para tratamento de efluentes. É um dos investigadores mais citados do mundo (top 1%), tendo sido distinguido nos últimos dois anos no índice Essential Science Indicators, um dos mais prestigiados indicadores da qualidade de investigação.

Identificação SCOPUS: 55608338000; Nº orcid: 0000-0002-3355-4398

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Acacia 93, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104  
Agricultural soil 122, 123, 124, 128, 130  
Aguas residuales 105, 106, 107, 108, 109, 110, 117, 118  
Alder 93, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102  
Apomixis 26, 27, 28

### C

Camarón blanco 75, 76  
Candidatus Liberibacter spp 63, 64  
Carya illinoensis koch 40, 41  
Células madre 1, 2, 3, 4  
Cítricos 26, 27, 28, 29, 31, 34, 37, 39, 63, 64, 66, 67, 68  
Contaminantes emergentes 105, 106, 107, 108, 109, 110, 117  
Cultivo intensivo bioseguro 76  
Cultivos subutilizados 82

### D

dinámica de crecimiento 41, 42, 43  
dragón amarillo 29, 63

### E

Ecosystem functioning 93, 103  
Estrés 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 27

### F

Fitorremediación 106, 109, 110, 117  
Foto-heterotrófico 75, 76  
Frecuencia y formas de consumo 82

### G

Germinación 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62  
Gibberellic acid 46, 122, 123, 125, 128, 129, 130, 131  
Grano sano 69

### H

HPLC 123, 125



Hsp70 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 23, 24

Huanglongbing 26, 29, 63, 64, 67, 68

## L

Leaf litter 93, 95, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104

Leucocitos 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23

## M

Macroinvertebrates 93, 97, 100, 101, 102

Marcadores moleculares 26, 27, 28, 29, 36, 39

Micropropagación 46, 47, 51

Microsatélites 27

## N

Nogal pecanero 40, 41, 42, 44

## O

Orquídeas 45, 46, 47, 48, 51, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62

## P

Producción agrícola 26, 41, 68, 74

Productos farmacéuticos 105, 106, 107, 110, 118

Pulpa dental 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12

## R

Radiación ultravioleta 14, 15, 17, 23, 24

Regeneración 2, 11

Reguladores de crecimiento 45, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 59, 60

## S

Silicio 69, 70

Sitophilus zeamais 69, 70, 74

Sondeo rápido 82, 84

Superficie de respuesta 106, 112, 113, 118

## V

Vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) 105, 106, 107, 109, 110, 111, 117