

## Utilización de marcadores AFLP y SAMPL en la identificación genética de especies y variedades de cítricos

Milady Francisca Mendoza Rodríguez<sup>1\*</sup>, María Teresa Cervera Goy<sup>2,3</sup>, José Antonio Cabezas Martínez<sup>2,3</sup>, José Luis Cenís<sup>4</sup>, José Miguel Martínez-Zapater<sup>2,3</sup> \*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de las Villas Carretera a Camajuaní Km. 5<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: mmendoza@uclv.etecsa.cu

<sup>2</sup> Departamento de Genética Molecular de Plantas. Centro Nacional de Biotecnología, CSIC. Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, España.

<sup>3</sup> Departamento de Mejora Genética y Biotecnología, SGIT, INIA. Ctra. de la Coruña Km 7, 28049 Madrid, España.

<sup>4</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, 30150 La Alberca (Murcia), España.

### RESUMEN

Muchas especies del género *Citrus* son cultivos de gran importancia económica en regiones tropicales y subtropicales del mundo. La aplicación de marcadores moleculares ha facilitado y potenciado el análisis genético de plantas pudiendo resultar herramientas de gran ayuda en los programas de mejoramiento de cítricos. Se han empleado diversos tipos de marcadores moleculares para la caracterización del genoma de cítricos, pero este es el primer trabajo de empleo de AFLPs (Polimorfismos para la longitud de los fragmentos amplificados) y SAMPLs (Amplificación selectiva de loci polimórficos de microsatélites), en la identificación de variedades pertenecientes a especies del género *Citrus*, como son *C. sinensis*, *C. clementina*, *C. paradisi*, *C. aurantium*, y *C. limon*. Ambas técnicas fueron utilizadas para la identificación de muestras pertenecientes a la colección del CIDA-Murcia (España).

Palabras clave: AFLP, *citrus*, marcadores moleculares, SAMPL, diferenciación varietal

### ABSTRACT

Many species within the *Citrus* genus are economically important crops throughout tropical and subtropical regions of the world. Molecular marker technologies have eased and improved the genetic analysis of plants and promise to greatly assist *Citrus* breeding programs. Several types of molecular markers have been used to characterize the *Citrus* genome, but this is the first time where Amplified Restriction Fragment Polymorphism (AFLP) and Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci (SAMPL) techniques are used to identify varieties within species that belong to *Citrus* genus such as, *C. sinensis*, *C. clementina*, *C. paradisi*, *C. aurantium*, and *C. limon*. Both techniques were used to identify accessions belonging to the CIDA - Murcia, collection (Spain).

Key words: AFLP, *citrus*, molecular markers, SAMPL, variety differentiation

### INTRODUCCIÓN

Muchas especies del género *Citrus* son de gran importancia económica en regiones tropicales y subtropicales del mundo, donde han sido cultivadas durante cientos de años. Varios estudios han demostrado que la mayoría de las variedades de las diferentes especies de cítricos son altamente heterocigóticas y que el género es muy polimórfico. Sin embargo, la escasa variabilidad encontrada entre variedades de la misma especie pone de manifiesto que en muchos casos estas se han originado por mutaciones somáticas y variación nuclear. Debido a esta estrecha diversidad genética, marcadores

moleculares tradicionales tales como isoenzimas, (Oullitault *et al.*, 1995), RFLPs (Polimorfismos para la longitud de los fragmentos de restricción) (Albanese *et al.*, 1992), RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar) (Luro *et al.*, 1992), o SSRs (Secuencias simples repetidas) (Kijas *et al.*, 1995), no han permitido discriminar entre diferentes variedades de las especies *C. sinensis*, *C. clementina*, *C. paradisi*, *C. aurantium*, y *C. limon*. La técnica AFLP, desarrollada recientemente (Vos *et al.*, 1995), permite abordar el estudio de un elevado número de loci por experimento y podrá ser útil en la identificación clonal de especies leñosas (Cervera *et al.*, 1998).

La técnica AFLP está basada en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción obtenidos a partir de la digestión total del ADN genómico. Utilizando este método los fragmentos de restricción pueden ser visualizados por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), sin conocimiento previo de la secuencia nucleotídica, empleando cebadores complementarios a los adaptadores que se ligan a los extremos de dichos fragmentos. Este método se caracteriza por su elevada razón múltiple, dado que permite la co-amplificación específica de un gran número de fragmentos de restricción en cada experimento. Entre 60 y 120 fragmentos son amplificados por reacción y su detección se lleva a cabo separándolos en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y visualizándolos mediante exposición y revelado de films (cuando se emplea radioactividad) o sistemas automatizados de recogida de datos (empleando fluorocromos).

Se han utilizado distintos marcadores moleculares en la caracterización del genoma de cítricos, pero estos son los primeros resultados basados en el empleo de AFLPs y SAMPLs (marcadores basados en los AFLPs), para la identificación de variedades del género *Citrus*. Estos marcadores al igual que ocurre en otras especies, pueden resultar herramientas de gran ayuda en los programas de mejoramiento de cítricos, especialmente donde los caracteres monogénicos y poligénicos son difíciles de evaluar cuando se basan solamente en caracteres fenotípicos.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la utilidad de las técnicas AFLP y SAMPL en la diferenciación e identificación genética de los cítricos, empleando con este objetivo una colección de especies y variedades de cítricos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal utilizado y extracción de ADN

Se analizaron 31 muestras de cítricos de la colección del CIDA-Murcia (España), pertenecientes a 30 especies (Tabla 1). El ADN genómico total fue aislado de hojas congeladas utilizando el protocolo descrito por (Dellaporta *et al.*, 1983). El tampón de extracción fue suplementado con 1% de polyvinilpirrolidona para eliminar polifenoles (Lodhi *et al.*, 1994).

Para este estudio se utilizaron cuatro combinaciones de cebadores. 2 combinaciones AFLP: [2 *EcoRI* (+ACC +ACT) / *MseI* + CTC y 2 *EcoRI* (+ACC +ACT) / *MseI* + CTT] y 2 combinaciones SAMPL [*EcoRI* + AC / SAMPL 1 y *EcoRI* + AC / SAMPL 2].

### Protocolo AFLP para cítricos

El análisis AFLP se realizó según el protocolo descrito por Vos *et al.* (1995) con las modificaciones descritas más abajo (Cervera *et al.*, 1998). El ADN genómico se digirió con dos enzimas de restricción: *MseI* y *EcoRI*. La digestión fue realizada en un volumen final de 35 µl en 10 mM Tris-HAc, 10mM MgAc, 50 mM DTT, pH 7.5, 10 U de *EcoRI*, 8 U de *MseI* y 500 ng de ADN genómico durante 3 h a 37°C. Dos adaptadores diferentes de doble cadena, diseñados para evitar la reconstrucción de estos sitios de restricción, uno para el extremo cohesivo *EcoRI* (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' y 3'-CTGACGCATGGTTAA-5') y otro para el extremo cohesivo *MseI* (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' y 3'-TACTCAGGACTCAT-5'), se ligaron a los extremos de los fragmentos de ADN añadiendo a la digestión 5 µl de una mezcla que contenía 5 pmol del adaptador *EcoRI*, 50 pmol del adaptador *MseI*, 8 mM ATP, 10 mM Tris-HAc, 10 mM MgAc, 50 mM DTT, pH 7.5 y 1.4 U de T4 DNA Ligasa (Boehringer). La ligación se incubó durante 3 h a 37 °C y luego se mantuvo toda la noche a 4 °C.

Los fragmentos de ADN digeridos y ligados se diluyeron 5 veces para ser usados como molde en la reacción de pre-amplificación, donde se amplifican solo 1/16 de los fragmentos de restricción generados. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 20 µl en 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.2 mM de cada dNTP, 30 ng de cada cebador *EcoRI* + A y *MseI* + C, 0.4 U de Taq DNA polimerasa (Boehringer) y 3 µl de los fragmentos digeridos y ligados diluidos. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer 9600, utilizando 28 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 60 °C y 1 min a 72 °C.

Los productos de la pre-amplificación se diluyeron para ser empleados como molde en la amplificación radioactiva selectiva. Para esta segunda reacción de PCR sólo los cebadores *EcoRI* fueron marcados radioactivamente. Se realizaron dos tipos de reacciones. En ambas se utilizó una combinación constituida por dos cebadores *EcoRI*, que se diferenciaban únicamente en el último nucleótido selectivo (*EcoRI* + ACC y *EcoRI* + ACT), con uno *MseI* (*MseI* + CTT en la primera combinación y *MseI* + CTC en la segunda). Estos cebadores tenían la misma secuencia que los utilizados en la pre-amplificación pero con 3 nucleótidos de selección en el extremo 3'. De este modo se seleccionó 1/128 de los fragmentos pre-amplificados. La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 20 µl que contenía 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.08 mM de cada dNTP, 4 ng del cebador [<sup>33</sup>P]-*EcoRI*, 24 ng del cebador *MseI*, 0.4 U de Taq

DNA polimerasa (Boehringer) y 5 µl del ADN pre-amplificado diluido. La amplificación selectiva se llevó a cabo utilizando los siguientes parámetros, 1 ciclo de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C, 1 min a 72 °C, seguido por 12 ciclos en los cuales la temperatura de hibridación decrece 0.7 °C por ciclo, seguido por 23 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 s a 56 °C y 1 min a 72 °C.

Al concluir la amplificación selectiva, las muestras se desnaturalizaron añadiéndoles un volumen igual de tampón formamida (95 % formamida, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.05 % azul de bromofenol y 0.05 % xilen cianol) y calentándolas durante 3 minutos a 94 °C. Dos o tres microlitros de cada muestra se

cargaron en geles al 4.5 % de acrilamida/bisacrilamida (19:1), 7.5 M Urea y 1X TBE de 35 cm x 43 cm, que se expusieron empleando autoradiografías Hyperfilm™-MP (Amersham) para tras su revelado visualizar los fragmentos de ADN amplificados y separados electroforéticamente.

### Protocolo SAMPL

Los experimentos SAMPL se realizaron siguiendo el protocolo desarrollado por Du Pont (Witsenboer, 1997). La técnica SAMPL está basada en la técnica AFLPs. Para los SAMPLs se emplea un cebador AFLP y un oligo basado en un microsatélite.

Tabla 1. Muestras de cítricos analizadas, híbridos y especies relacionadas de la colección del CIDA-Murcia (España).

Número	Especie	Variedad****
1	<i>C. sinensis</i>	Valencia late
2	<i>C. sinensis</i>	Newhall
3	<i>C. sinensis</i>	Lanelate
4	<i>C. sinensis</i>	Cipo
5	<i>C. clementina</i>	Orogrande
6	<i>C. clementina</i>	Clemenulens
7	<i>C. clementina</i>	Marisol
8	<i>C. clementina</i>	Hernandina
9	<i>C. paradisi</i>	StarRuby
10	<i>C. paradisi</i>	Mars
11	<i>C. aurantium</i>	Bouquet Fleurs
12	<i>C. aurantium</i>	AFIN 1
13	<i>C. aurantium</i>	GTC
14	<i>C. limon</i>	Verna 51
15	<i>C. limon</i>	Fino 49
16	<i>C. limon</i>	Eureka
17	<i>C. limon</i>	Chaparro
18	<i>C. depressa</i>	
19	<i>C. grandis</i>	Chandler
20	<i>C. latifolia</i>	Bearss
21	<i>C. volkameriana</i>	
22	<i>C. medica</i>	sarcodactylis
23	<i>C. macrophylla</i>	
24	<i>C. moi</i>	
25	<i>Citrangquat*</i>	
26	<i>Citrangue**</i>	Troyer
27	<i>Citremon***</i>	1449
28	<i>C. mirtyfolia</i>	
29	<i>Fortunella japónica</i>	
30	<i>Microcitrus australasiaca</i>	
31	<i>Severina buxifolia</i>	

\* Híbrido entre Citrange X Kumquat

\*\* Híbrido entre *C. sinensis* X *Poncirus trifoliata*

\*\*\* Híbrido *C. limon* X *Poncirus trifoliata*

\*\*\*\* Variedad indicada cuando se conoce

### Análisis estadístico

Durante la lectura visual de los geles solo las bandas

de AFLP y SAMPL que mostraban polimorfismos claros se tuvieron en cuenta, contabilizándose como presentes (1) o ausentes (0). La similitud genética (SG)

entre parejas de muestras se estimó de acuerdo con el coeficiente de Dice (Sneath y Sokal, 1973);  $SG(ij) = 2a/(2a+b+c)$  donde  $SG(ij)$  es la media de la similitud genética entre los individuos  $i$  y  $j$ ,  $a$  es el número de bandas polimórficas compartidas por  $i$  y  $j$ ,  $b$  es el número de bandas presentes en  $i$  y ausentes en  $j$  y  $c$  es el número de bandas presentes en  $j$  y ausentes en  $i$ . El dendograma se construyó utilizando la versión 1.8 del programa informático NTSYS-PC (Rohlf, 1993), mediante el sistema de agrupamiento UPGMA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La utilización de las cuatro combinaciones de cebadores descritas permitió la detección de un total de 704 bandas amplificadas (Tabla 2). De ellas 568 (80.7 %) mostraron polimorfismos claros, por lo que fueron utilizadas en el estudio. Los niveles de polimorfismo detectados mediante ambas técnicas fueron similares.

Tabla 2. Número total de fragmentos amplificados y fragmentos polimórficos obtenidos del análisis AFLP y SAMPL con la utilización de cuatro combinaciones de cebadores.

Combinación de cebadores	bandas totales	bandas polimórficas	% bandas polimórficas
2 <i>EcoRI</i> (+ACC, +ACT) / <i>MseI</i> + CTC	148	121	81.7
2 <i>EcoRI</i> (+ACC, +ACT) / <i>MseI</i> + CTT	163	124	76.1
total AFLP	311	245	78.7
SAMPL 1 / <i>EcoRI</i> + AC	171	158	92.4
SAMPL 2 / <i>EcoRI</i> + AC	222	165	74.3
total SAMPL	393	232	82.2
total (AFLP + SAMPL)	704	568	80.7

La similitud genética entre las diferentes muestras basada en la presencia y ausencia de fragmentos amplificados fue calculada por el coeficiente de Dice (Sneath y Sokal, 1973).

Utilizando los datos de similitud genética obtenidos con los marcadores AFLP y SAMPL las muestras de cítricos fueron agrupadas como se muestra en el dendograma (Fig.1). De este modo se pudo observar como, excluyendo las tres especies que no pertenecen al género *Citrus* [*Fortunella japonica* (*Fortunella*), *Microcitrus australasiaca* (*Microcitrus*) y *Severina buxifolia* (*Severinia*)], el resto de entradas se distribuyó en dos grandes grupos. Por un lado, agrupados con un nivel de similitud genética por encima de 0.7, aparecen los limoneros (*C. limon*) junto a una serie de especies más o menos emparentadas.

En el segundo bloque, que engloba muestras con un nivel de similitud entre 0.65 y 1.00 se encuentran los naranjos dulces (*C. sinensis*), mandarinas (*C. clementina*), pomelos (*C. paradisi*) y naranjos amargos (*C. aurantium*), con algunos híbridos (*Citramon*, *Citrange*) y especies afines.

Estos agrupamientos coincidieron básicamente con los obtenidos mediante el empleo de otras técnicas moleculares como RFLPs (Albanese *et al.*, 1992), RAPDs (Luro *et al.*, 1992), o isoenzimas (Oullitault *et al.*, 1995).

Dada la elevada razón múltiple de las técnicas AFLP y SAMPL, que permite el muestreo rápido de un gran número de loci por experimento (una media de 176 en este trabajo), fue posible encontrar polimorfismos entre distintas variedades de las especies *C. sinensis*, *C. clementina*, *C. paradisi*, *C. aurantium*, y *C. limon*.

Este es el primer trabajo que describe polimorfismos inter-varietales ya que otras técnicas moleculares no han detectado diferencias entre distintas variedades de cítricos.

Estos resultados, aunque esperanzadores, son preliminares dado que deben ser contrastados mediante el análisis de un elevado número de variedades e individuos de cada variedad, que asegure que los marcadores, o combinaciones de marcadores identificados, cumplen los requisitos de distinción de la variedad, estabilidad y homogeneidad necesarios para su utilización.

Si estas diferencias se confirmaran en los posteriores análisis, se abrirá el camino hacia una posible identificación varietal mediante marcadores moleculares, que hasta ahora no se había podido realizar en cítricos, debido fundamentalmente al origen monoclonal de muchas de las variedades.

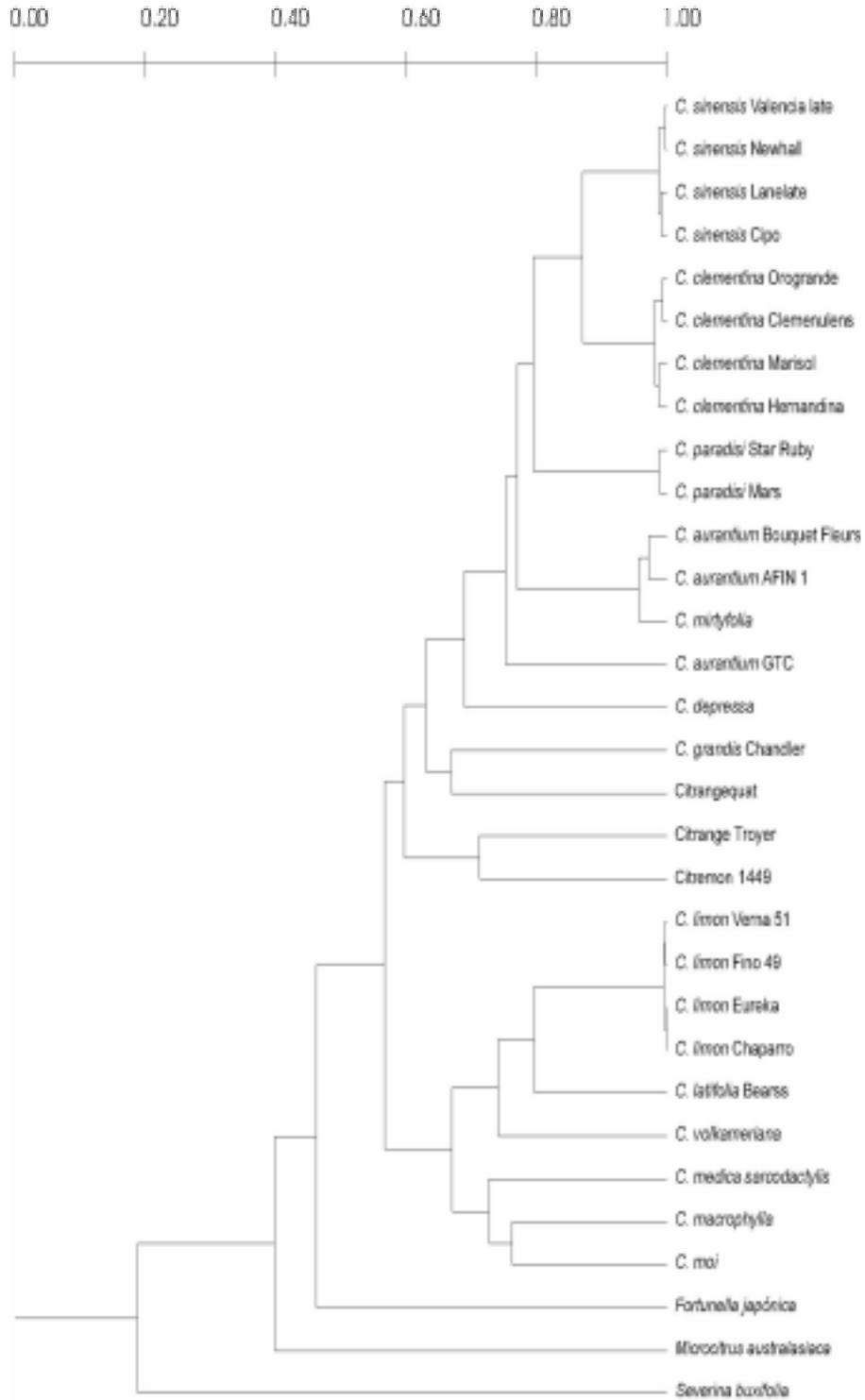


Figura 1. Dendrograma representando la similitud genética entre 31 muestras de cítricos. El dendrograma fue realizado utilizando el método de agrupamiento UPGMA mediante el coeficiente de Dice.

## CONCLUSIONES

Mediante este trabajo se puso de manifiesto la posible utilidad de los marcadores SAMPL y AFLP en la diferenciación e identificación genética de variedades de cítricos, algo que hasta ahora no se había logrado con otros marcadores moleculares. Empleando tan solo cuatro combinaciones de cebadores podrá ser posible la identificación de algunas variedades de las especies *C. sinensis*, *C. clementina*, *C. paradisi*, *C. aurantium*, y *C. limon*.

## REFERENCIAS

Albanese, G, Renis M y Reforgiato-Recupero G (1992) RFLP analysis of different lemon cultivars. Proc. Int Soc. Citriculture 1: 298-209

Cervera, MT, Cabezas JA, Sancha JC, Martínez de Toda F y Martínez-Zapater JM (1998) Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. Genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). Theor. Appl. Genet. 97: 51-59

Dellaporta, SL, Wood J y Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II Plant Mol Biol Rep 1: 19-21

Kijas, JMH, Fowler JCS y Thomas MR (1995) An evaluation of Sequence tagged microsatellite site markers for genetic

analysis within *Citrus* and related species. Genome 38: 349-355

Lodhi, MA, YE GN, Weeden NF y Reisch BI (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from Grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Mol Biol Rep 12: 6-13

Luro, F, Laigret F, Bov JM y Ollitrault P (1992) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to *Citrus* genetics and taxonomy. Proc Int. Soc. Citriculture 1: 225-228

Ollitrault, P, Faure X y Luro F (1995) Apport du polymorphisme enzymatique pour l'étude de l'organisation de la diversité génétique du genre *Citrus*. Proc. Symposium Mandarines. Corcega. pp. 45

Rohlf, FJ (1993) NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.8. Exeter Publications Setauket, New York

Sneath, PHA y Sokal RR (1973) The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco

Vos, P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Fritjers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414

Witsenboer, H, Vogel J y Michelmore RW (1997) Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.) Genome 40: 923-935