

Caracterización molecular de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) Moore & Stearn)

Molecular characterization of zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) Moore & Stearn)

T.J. Rodríguez-Rojas¹, M. Andrade-Rodríguez², I. Alia-Tejagal²,
V. López-Martínez², S. Espinosa-Zaragoza³, H. Esquinca-Avilés³

¹Estudiante graduado de Ingeniería Hortícola, ²Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001. 62209. Chamilpa. Cuernavaca. Morelos. Tel. 01 (777) 3297046.

³Facultad Ciencias Agrícolas, CIV Huehuetán, Chiapas. Universidad Autónoma de Chiapas.

Resumen

En México se tienen 1.416 ha con zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn) propagado por semilla con una amplia diversidad genética, por lo cual es necesario caracterizar los materiales genéticos sobresalientes, con el fin de tener la información necesaria para el registro de variedades y la protección de los recursos fitogenéticos. El objetivo fue caracterizar mediante RAPDs árboles de zapote mamey seleccionados previamente. Se seleccionaron muestras de 150 mg de hojas jóvenes y sanas de árboles de zapote mamey, se efectuó la extracción de ADN y la amplificación usando 10 iniciadores RAPDs. Los datos moleculares fueron analizados por determinación de tamaño de fragmentos, la comparación de patrones de bandeo y la presencia o ausencia de bandas. Los resultados mostraron que los 10 iniciadores seleccionados para la caracterización de 15 árboles de zapote mamey generaron 165 fragmentos RAPDs los cuales variaron de 220 a 3445 pb. El 82,4% de los fragmentos fueron polimórficos y permitieron caracterizar a 10 de los 15 árboles estudiados (6, V3, V6, 109, U1, U2, C2, C11, 21, y 64) con 27 fragmentos marcadores. En los árboles 1, 4, V5, U3, y C1, no se obtuvieron fragmentos marcadores que permitirán su caracterización con los 10 iniciadores usados. Los marcadores RAPDs permitieron caracterizar a 10 de los 15 árboles de zapote mamey.

Palabras clave: marcadores moleculares, RAPDs, extracción de ADN, caracterización de árboles frutales.

Abstract

Mexico has planted 1,416 ha with (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn), because this fruit tree is propagated by seed and has a wide genetic diversity, that is the main reason for why it is necessary to characterize the outstanding genetic materials, in order to have the information necessary for the registration of varieties and the protection of plant genetic resources. The objective was to characterize previously selected zapote mamey trees with the RAPD technique. Samples of 150 mg of healthy young zapote mamey leaves were taken in order to extract DNA, the amplification of DNA was done using 10 RAPD primers. Molecular data were analyzed by size fragments determination, the comparison of banding patterns and the presence or absence of bands. The results showed that 10 selected primers characterized 15 zapote mamey trees and generates 165 RAPD fragments which were ranged from 220 to 3445 pb. The 82.4% of the fragments were polymorphic and allowed characterizing 10 of the 15 studied trees (6, V3, V6, 109, U1, U2, C2, C11, 21 to 64) with 27 markers fragments. In the trees 1, 4, V5, U3, and C1, no marker fragments were obtained to allow their characterization with the 10 primers used. The RAPD markers allowed characterizing 10 of the 15 zapote mamey trees studied.

Key words: molecular marker, RAPDs, DNA extraction, characterization of fruit trees.

Introducción

La fruticultura de México cuenta con 63 especies comerciales y 220 con potencial alimenticio (Borys y Borys, 2001), entre las cuales están las del género *Pouteria*; de éstas, el zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) Moore & Stearn) destaca por su exquisito sabor y valor nutritivo. Actualmente se tienen establecidas 1,511 ha distribuidas en varios estados de la República Mexicana; los principales son Yucatán, Guerrero, Chiapas, Michoacán, Tabasco, Puebla, Veracruz, Estado de México, Oaxaca y Morelos (SIAP, 2010).

La propagación de esta especie es por semilla principalmente, lo cual ha generado una amplia diversidad genética de la que se pueden obtener

Introduction

Fruit farming in Mexico has 63 commercial species and 220 with food potential (Borys and Borys, 2001), among which are those of *Pouteria* genre, from these, zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) Moore & Stearn) outstand by their exquisite taste and nutritional value. Currently, are established 1,511 ha distributed in different states of Mexico Republic; the main are Yucatán, Guerrero, Chiapas, Michoacán, Tabasco, Puebla, Veracruz, estado de Mexico, Oaxaca and Morelos (SIAP, 2010).

The propagation of this specie is mainly by seed, which has generated a wide genetic diversity where can be obtain outstanding varieties, selecting based on the organoleptic, agronomic

variedades sobresalientes, mediante selección con base a las características organolépticas, agronómicas y morfológicas. Esta actividad ha sido llevada a cabo por productores de zapote mamey de forma empírica por más de 1.000 años, información que ha servido de base para identificar los materiales de zapote mamey más promisorios que ha sido utilizada por investigadores de Costa Rica, Guatemala, Estados Unidos de Norte América, el Salvador y México, para recolectar los más sobresalientes.

El conocimiento de la variabilidad genética de las especies permitirá el desarrollo de programas orientados a la conservación de germoplasma de forma *in situ* o *ex situ*, así como ampliar el uso de material vegetal trascendente (Azurdia, 2006), programas de certificación (Nascimento *et al.*, 2008), así como proporcionar a los productores una amplia selección de plantas (Carrara *et al.*, 2004).

En el estado de Morelos se han reportado 27,28 ha de zapote mamey en los municipios de Coatlán del Río y Tetecala de la Reforma (Gaona-García *et al.*, 2004), recientemente se reportaron 38 ha (SIAP, 2010) con material seleccionado por los productores por características de rendimiento y calidad de fruto. No obstante, las huertas carecen de uniformidad en términos de rendimiento y calidad de fruto, por lo que la generación de variedades mediante reproducción vegetativa ayudaría a mejorar la producción de zapote mamey.

Los primeros estudios de caracterización de sapotáceas utilizaron caracteres morfológicos, fenológicos, y agronómicos; sin embargo, la clasifi-

and morphologic characteristics. This activity has been carried out by zapote mamey producers empirically for more than 1,000 years, information that serves as base to identify the more promissory zapote mamey materials that have been used by researches in Costa Rica, Guatemala, United States, Salvador and México, to collect the most remarkable.

The knowledge of the genetic variability of the species will allow the development of programs oriented to the preservation of the germplasm *in situ* and *ex situ*, as well as widening the usage of transcending vegetal matter (Azurdia, 2006), certification programs (Nascimento *et al.*, 2008), as well as providing the producers with a great selection of plants (Carrara *et al.*, 2004).

In Morelos state, 27.28 ha of zapote mamey have been reported in Coatlán del Río and Tetecala de la Reforma parishes (Gaona-García *et al.*, 2004), recently have been reported 38 ha (SIAP, 2010) with material selected by the producers by yield characteristics and quality of the fruits. Nevertheless, orchards lack of uniformity in terms of yield and quality of the fruit, thus, the generation of varieties through vegetative reproduction would help the production of zapote mamey.

The first characterization researches of Sapotaceae used morphological, phenological and agronomical characteristics; however, the classification based on these characteristics can be confused because these are affected by environmental factors. The use of isoenzymes can be of higher utility, on

cación con base en estos caracteres puede ser confusa porque los mismos son afectados por factores ambientales. El uso de isoenzimas puede ser de mayor utilidad; al respecto, fueron aplicadas para estudiar la variabilidad de 37 accesiones de *P. sapota* en Guatemala (Azurdia *et al.*, 1997); sin embargo, éstas pueden ser afectadas por el ambiente y la etapa fenológica de la planta; Zane *et al.* (2002) indicaron que los RAPDs, SSR y AFLP son herramientas fundamentales para estudiar la variabilidad genética.

Otra técnica empleada es la secuenciación del gen del cloroplasto *ndhF* para estudiar la filogenia en la familia (Anderberg y Swenson, 2003). Las secuencias simples repetidas (SSR) fueron utilizadas para el análisis de la variabilidad del DNA del cloroplasto en *Manilkara hubery* (Rennó, 2007). Los RAPDs fueron utilizados para determinar el efecto de las condiciones ambientales en el genotipo de *M. sapota* (Heaton *et al.*, 1999), determinar la estructura genética espacial de *Chrysophyllum sanguinolentum* (Degen *et al.*, 2001), estudiar la diversidad genética de *Vitellaria paradoxa* (Fontaine *et al.*, 2004). En el caso de *P. sapota* también se han usado los AFLPs para estudiar la variación genética de selecciones cultivadas (Carrara *et al.*, 2004). Majourhat *et al.* (2008) utilizaron los RAPDs y las SSR para caracterizar morfotipos de *Argania spinosa* y observaron que los RAPDs presentaron alto polimorfismo y mayor cantidad de información que las SSR.

El objetivo de la investigación fue caracterizar molecularmente árboles de zapote mamey seleccionados previa-

mente a este respecto, estos fueron aplicados para estudiar la variabilidad de 37 accesiones de *P. sapota* en Guatemala (Azurdia *et al.*, 1997); sin embargo, estas pueden ser afectadas por el ambiente, y la fase fenológica de la planta; Zane *et al.* (2002) indicaron que los RAPDs, SSR y AFLP son herramientas fundamentales para estudiar la variabilidad genética.

Otra técnica empleada es la secuenciación del gen del cloroplasto *ndhF* para estudiar la filogenia en la familia (Anderberg y Swenson, 2003). Las secuencias simples repetidas (SSR) fueron utilizadas para el análisis de la variabilidad del DNA del cloroplasto en *Manilkara hubery* (Rennó, 2007). Los RAPDs fueron utilizados para determinar el efecto de las condiciones ambientales en el genotipo de *M. sapota* (Heaton *et al.*, 1999), determinar la estructura genética espacial de *Chrysophyllum sanguinolentum* (Degen *et al.*, 2001), estudiar la diversidad genética de *Vitellaria paradoxa* (Fontaine *et al.*, 2004). En el caso de *P. sapota*, AFLPs han sido utilizados para estudiar la variación genética de selecciones cultivadas (Carrara *et al.*, 2004). Majourhat *et al.* (2008) utilizaron los RAPDs y las SSR para caracterizar morfotipos de *Argania spinosa* y observaron que los RAPDs presentaron alto polimorfismo y mayor información que las SSR.

El objetivo de esta investigación fue caracterizar molecularmente árboles de zapote mamey, previamente seleccionados en Coatlán del Río y Telecal de la Reforma, Morelos, México, utilizando la técnica de RAPDs.

Materials and methods

15 zapote mamey trees were selected considering for the selection: the fruit's taste, better yield, size and

mente en Coatlán del Río y Tetecala de la Reforma, Morelos, México, utilizando la técnica de RAPDs.

Materiales y métodos

Se seleccionaron 15 árboles de zapote mamey tomando en cuenta para la selección: el sabor del fruto, mayor rendimiento, tamaño y calidad, mediante entrevistas con los productores realizadas por Gaona-García *et al.* (2008) en Coatlán del Río y Tetecala de la Reforma, Morelos, México. Los árboles fueron 1, 4, 6, 21, 64, 109, C1, C2, C11, U1, U2, U3, V3, V5 y V6.

Recolecta del material vegetal

Se recolectaron muestras de hojas jóvenes y sanas de 15 árboles de zapote mamey seleccionados previamente por Gaona-García *et al.* (2008), con base en las características morfológicas y organolépticas. Las hojas fueron colocadas en bolsas de plástico, marcadas con la clave de cada árbol y transportadas, a temperatura ambiente, a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Las hojas fueron lavadas y se eliminó el agua de la superficie, posteriormente se pesaron 150 mg de hoja de cada árbol y se congelaron a -20°C hasta la extracción del ADN.

Aislamiento del ADN genómico

Se usaron muestras de 150 mg de hojas de cada uno de los 15 árboles de zapote mamey para extraer el ADN de acuerdo a la metodología reportada por Andrade *et al.* (2005), sustituyendo el alcohol isoamílico por octanol. En el último paso de la metodología de extracción, el ADN obtenido se disol-

quality, with surveys for the producers performed by Gaona-García *et al.*, (2008) in Coatlán del Río and Tetecala de la Reforma, Morelos, México. Los árboles fueron 1, 4, 6, 21, 64, 109, C1, C2, C11, U1, U2, U3, V3, V5 y V6.

Recollection of the vegetal matter

Samples of young and healthy leaves from 15 zapote mamey samples were recollected and previously selected by Gaona-García *et al.* (2008) based on the morphological and organoleptic characteristics. The leaves were put on a plastic bag, marked and transported at environment temperature to the Agricultural Science Faculty of the Universidad Autónoma del estado de Morelos state. Leaves were washed and the water of the surface was eliminated, later were weighted 150 mg of every tree leaf, and frozen to -20°C until extracting the DNA.

DNA genome isolation

Samples of 150 mg were used from leaves of each of the 15 zapote mamey trees for extracting the DNA according to the methodology reported by Andrade *et al.* (2005), substituting the isoamyl alcohol to octanol. In the last step of the extraction methodology, the DNA obtained was diluted in 25 mL de 0.1 TE (1 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA) with 20 ng. μL^{-1} of ARNasa, heating at 37°C for 40 minutes and stored at -20°C until its usage.

The integrity of the DNA of all trees was estimated by electrophoresis in agarose gel (ultra pure GIBCO) at 1% for what was used 1 mL of the DNA sample. The electrophoresis was done at environment temperature in

vió en 25 μL de 0,1 TE (1 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA) con 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de ARNasa, calentado a 37°C por 40 minutos y almacenado a -20°C hasta su utilización.

La integridad del ADN de todos los árboles se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa (ultrapura GIBCO) al 1% para lo cual se usó 1 μL de muestra de ADN. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en buffer TAE (0,04M Tris-base, ácido acético glacial, 1 mM EDTA) a 75 voltios durante dos horas. El gel se tiñó con bromuro de etidio (1 $\text{mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Las muestras de ADN se visualizaron y se documentaron en un analizador de geles (Syngene GVM20).

La concentración del ADN y su pureza fueron cuantificadas en un espectrofotómetro Genesys 6[®] de luz ultravioleta, para lo cual se preparó una dilución de 1:150 [5 μL de ADN de la muestra más 745 μL de TE 10X (10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0)]. La concentración se determinó mediante la fórmula:

$$[\text{ADN} (\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1})] = (\text{DO}_{260}) (\text{FD}) (50 \text{ mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}).$$

Donde:

DO_{260} = Densidad óptica de la solución de ADN leída a la longitud de onda de 260 nm.

FD = Factor de dilución.

50 $\text{mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ = Concentración de ADN determinada para un valor de 1,0 a 260 nm.

La pureza se evaluó como la proporción de las lecturas a longitudes de onda de 260 y 280 nm (260/280). Los valores entre 1,8 y 2,0 de densidad óptica (DO) indicaron alto grado de pureza. Valores menores a 1,8 indicaron

buffer TAE (0.04M Tris-Base, glacial acetic acid, 1mM EDTA) at 75 volts for 2 hours. The gel was colored with ethidium bromide (1 $\text{mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). The DNA samples were visualized and documented in a gels analyzer (Syngene GVM20).

The DNA concentration and its pureness were quantified in a Genesys 6[®] spectrophotometer with ultraviolet light, for which was prepared a dilution of 1:150 [5 μL of DNA of the sample plus 745 μL of TE 10X (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)]. The concentration was determined using this formula:

$$[\text{ADN} (\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1})] = (\text{DO}_{260}) (\text{FD}) (50 \text{ mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}).$$

Where:

DO_{260} = Optic density of the DNA solution read at a wave longitude of 260 nm

FD = Dilution factor

50 $\text{mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ = DNA concentration determined for a value of 1.0 to 260 nm

The pureness was evaluated as the proportion of the readings at waves longitudes of 260 and 280 nm (260/280). Values from 1.8 to 2.0 of optical density (DO) indicated high degree of pureness. Lower values to 1.8 indicated contamination of the DNA sample with proteins and/or elements absorbers of UV light. While, values higher to 2.0 indicated contamination by chloroform, phenol or other organic substances. Once obtained the reading for each of the DNA samples, the solutions were prepared at 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

RAPD analysis

30 initiators were used: 20 with the sequences of the B kit, the A-08 (Operon Technologies Inc.) and eight

contaminación de la muestra de ADN con proteínas y/u otros elementos absorbentes de luz UV. Mientras que valores mayores a 2,0 indicaron contaminación por cloroformo, fenol u otra sustancia orgánica. Una vez obtenida la lectura para cada muestra de ADN, se prepararon las soluciones de trabajo a 20 ng.µL⁻¹.

Análisis RAPD

Se utilizaron 30 iniciadores: 20 con las secuencias del kit B, el A-07, el A-08 (Operon Technologies Inc.) y ocho con las secuencias diseñadas por Andrade en 2006 (cuadro 1) para esta investigación, todos con secuencia arbitraria de 10 nucleótidos, de los cuales se seleccionaron 10 que presentaron el mayor número de productos amplificados y con bandas más brillantes.

La mezcla de reacción y programa de amplificación se utilizó para cada una de las 15 muestras de ADN de los árboles de zapote mamey, con los 10 iniciadores seleccionados; la cual consistió de 10 µL de dNTPs (5 µM de cada dNTP), 2,5 µL amortiguador PCR (10X), 1,5 mL de MgCl₂ (75 mM), 2,0 µL de iniciador (20 pmol), 0,3 µL DNA polimerasa nativa INVITROGEN (1,5 U), 4 µL de ADN (80 ng) ajustando a un volumen de 25 µL con 4,7 µL de agua destilada deionizada estéril. La amplificación del ADN se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Techne TC-412. El programa del termociclador consistió de un ciclo de predesnaturalización de ADN a 94°C por 4 min y 35 ciclos integrados por las etapas siguientes: 1 min a 94°C para separar hélices de ADN, 1 min a 36°C para la alineación de iniciador, 2 min a 72°C para la polimerización de

with the sequences designed by Andrade in 2006 (table 1) for this research, all with randomized sequence of 10 nucleotides, from which were selected 10 that presented the highest number of amplified products and with brighter bands.

The reaction mix and amplification program was used for each of the 15 DNA samples of zapote mamey trees with the 10 initiators selected, which consisted on 10 µL of dNTPs (5 µM of each dNTP), 2.5 µL rear PCR (10X), 1.5 mL of MgCl₂ (75 mM), 2.0 µL of initiator (20 pmol), 0.3 µL DNA native polymerase INVITROGEN (1.5 U), 4 µL of ADN (80 ng) adjusting at a volume of 25 µL with 4.7 µL of distilled sterile deionised water. The DNA amplification was done with the chain reaction of polymerase (PCR) in a thermal cyler Techne TC-412. The thermal cyler program consisted on a pre-denaturalization cycle of DNA at 94°C for 4 min and 35 integrated cycles for the following phases: 1 min at 94°C to divide the DNA helixes, 1 min at 36°C for aligning the initiator, 2 min at 72°C for the polymerization of the DNA and a final extension cycle of 10 min at 72°C.

The separation of amplified fragments was done by electrophoresis in ultrapure agarose gel (INVITROGEN) at 1.5% (p/v). The electrophoresis was done with a rear TAE 1X applying 75 volts for 4.5 hours. The gels were tinted with ethidium bromide (1 mg.mL⁻¹) to provide the DNA bands, later, were photographed with a photodocumentator Syngene GVM0. The size of the DNA fragments produced by RAPDs, were obtained

Cuadro 1. Secuencia de ocho de los iniciadores utilizados en la caracterización molecular de árboles de zapote mamey, diseñadas por Andrade en 2006, para este trabajo.

Table 1. Sequence of eight of the initiators used in the molecular characterization of zapote mamey trees designed by Andrade in 2006 for this research.

Iniciador	Clave	Secuencia de bases	Iniciador	Clave	Secuencia de bases
23	SAP-01	5' ATGCGAACCG 3'	27	SAP-05	5' TATAGGCCCT 3'
24	SAP-02	5' GACACATCGG 3'	28	SAP-06	5' CCTACTCCAG 3'
25	SAP-03	5' TGGGACCTC C 3'	29	SAP-07	5' TGGGAATCCC 3'
26	SAP-04	5' GGAGCTACCT 3'	30	SAP-08	5' GCCCCTACTA 3'

ADN y un ciclo final de extensión de 10 min a 72°C.

La separación de fragmentos amplificados se hizo por electroforesis en gel de agarosa ultrapura (INVITROGEN) al 1,5% (p/v). La electroforesis se efectuó con amortiguador TAE 1X aplicando 75 voltios durante 4,5 horas. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 mg.mL⁻¹) para evidenciar las bandas de ADN, posteriormente se fotografiaron con el fotodocumentador Syngene GVM20. El tamaño de los fragmentos de ADN, producidos por RAPDs, se obtuvo utilizando el programa Gen Tools versión 3.06 de Syngene.

El análisis de los datos moleculares para la caracterización de las 15 selecciones de zapote mamey se realizó a través de la comparación de patrones de bandas generados por cada árbol. Se consideraron las bandas producidas por los 10 iniciadores seleccionados.

Resultados y discusión

Los iniciadores seleccionados fueron OPB-05, OPB-06, OPB-07, OPB-09, OPB-10, OPB-11, OPB 12, OPB-15, OPB-17, y SAP-04 por presentar el mayor número de productos amplificados, con bandas más brillantes y mejor definidas. Estos iniciadores generaron 165 fragmentos RAPD que variaron de 220 a 3.445 pb. El 82,4% de los fragmentos fueron polimórficos y permitieron caracterizar a 10 de los árboles estudiados (6, V3, V6, 109, U1, U2, C2, C11, 21, y 64) con 27 fragmentos marcadores (cuadro 2). En los árboles 1, 4, V5, U3, y C1, no se obtuvieron fragmentos marcadores que per-

using the Gen Tools program, 3.06 version of Syngene.

The molecular data analysis for characterizing 15 zapote mamey selections was done comparing the bands' pattern generated by each tree. The bands produced by the 10 selected initiators were considered.

Results and discussion

The selected initiators were OPB-05, OPB-06, OPB-07, OPB-09, OPB-10, OPB-11, OPB 12, OPB-15, OPB-17, and SAP-04 by presenting the highest number of amplified products with brighter and better defined bands. These indicators generated 165 RAPD fragments which varied from 220 to 3.445 pb. 82.4% of the fragments were polymorphic and allowed characterizing 10 of the studied trees (6, V3, V6, 109, U1, U2, C2, C11, 21, and 64) with 27 marker fragments (table 2). In trees 1, 4, V5, U3, and C1, were not obtained marker fragments that allow their characterization to the initiators used.

The electrophoresis generated by the tree 11 with the 10 initiators, was characterized by being different from the rest of the 14 trees (figure 1), which indicated a different genetic precedence. Tree 21 produced a different electrophoresis profile compare to the rest of the trees when using the initiators OPB-17 (5'AGG GAA CGA G 3') and SAP-04 (5'GGA GCT ACC T 3') (table 2).

The initiators that allowed identifying a higher number of zapote mamey trees (three each) were OPB-09, OPB-10, OPB-17 and SAP-04. On the contrary, OPB-05, OPB-06, OPB-

Cuadro 2. Fragmentos amplificados y caracterización molecular mediante RAPDs de árboles de zapote mamey en Morelos, México.

Table 2. Amplified fragments and molecular characterization with RAPDs of zapote mamey trees in Morelos, Mexico.

Iniciador	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos	Polimorfismo (%)	Marcadores (pb)	Árbol caracterizado
OPB05 TGCGCCCTTC	16	14	87	a: 1 354	U2
OPB06 TGCTCTGCC	16	12	75	a: 931	21
OPB07 GGTGACGCAG	15	13	86	p: 512	6
OPB09 TGGGGGACTC	16	13	81	a: 727	V6
				a: 1 636	C2
				p: 597	21
OPB10 CTGCTGGGAC	19	15	78	a: 1150	64
				a: 1468	U2
				p: 733	21
OPB11 GTAGACCCGT	18	14	77	p: 686	U1
OPB12 CCTTGACGCA	17	15	88	a: 475, 1470	U2
				p: 572	21
OPB15 GGAGGGTGTT	13	11	84	a: 652	6
				a: 536	U2
OPB17 AGGGAACGAG	21	19	90	a: 636, 2253	109
				p: 1018	V3
SAP-04 GGAGCTACCT	14	10	71	p: 313, 698, 1184, 1775	21
				a: 325	U2
				a: 688	C11
Total	165	136	82.4	p: 879, 1129, 1639	21
				27	10

pb: pares de bases; a: Ausencia; p: Presencia.

mitieran su caracterización con los iniciadores usados.

El perfil de electroforesis generado por el árbol 11 con los 10 iniciadores, se caracterizó por ser distinto de los 14 árboles restantes (figura 1), lo que indicó procedencia genética diferente. En tanto que el árbol 21 produjo un perfil de electroforesis distinto en comparación con los demás árboles al usar los iniciadores OPB-17 (5'AGG GAA CGA G 3') y SAP-04 (5'GGA GCT ACC T 3') (cuadro 2).

Los iniciadores que permitieron identificar mayor número de árboles de zapote mamey (tres cada uno) fueron el OPB-09, el OPB-10, el OPB-17 y SAP-04. En contraste, el OPB-05, el OPB-06, el OPB-07 y el OPB-11 fueron útiles para identificar un árbol por cada iniciador. De los 27 marcadores

07 and OPB-11 were useful to identify a tree per each initiator. Out of the 27 obtained markers, most (14) were by absence of bands that were presented in the rest of the trees, and 13 were fragments that were not present in the electrophoretic in the other trees.

The methodology used allowed identifying molecular markers for 10 trees, among these the 21 showed a higher presence of markers (11 fragments), the same produced with six initiators (table 3). This indicated that the DNA of the tree presented the highest number of particular DNA sequences which were complementary to the initiators OPB-06, OPB-09, OPB-10, OPB-12, OPB-17 and SAP-04. U2 tree had six markers fragments generated by oligonucleotides OPB-05, OPB-10, OPB-12, OPB-15 and SAP-04

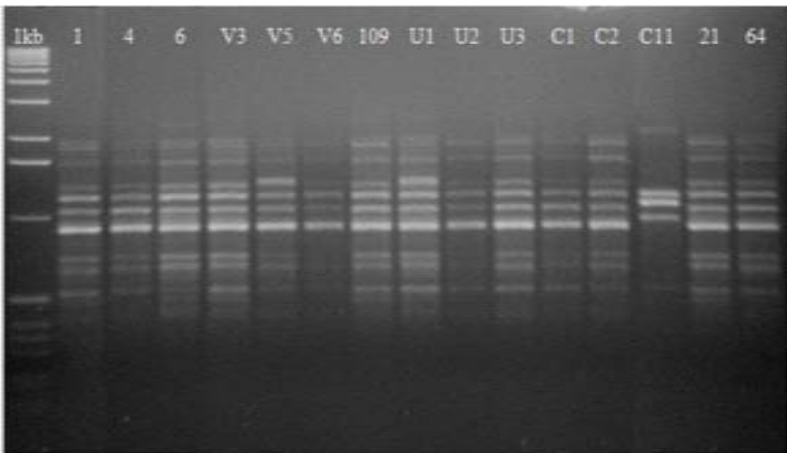


Figura 1. Patrón de bandeo generado por el iniciador OPB-06 para 15 árboles de zapote mamey del estado de Morelos, México. 1Kb: marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder.

Figure 1. Banding pattern generated by the initiator OPB-06 for 15 zapote mamey trees of estado de Morelos, Mexico. 1Kb: marker of molecular weight 1Kb DNA Ladder.

obtenidos, la mayoría (14) fueron por ausencia de bandas que se presentaban en los demás árboles, y 13 fueron fragmentos que no se encontraron presentes en los perfiles electroforéticos en los otros árboles.

La metodología utilizada permitió identificar marcadores moleculares para 10 árboles, entre éstos el 21 fue el que reflejó mayor presencia de marcadores (11 fragmentos), los mismos que fueron producidos con seis iniciadores (cuadro 3). Esto indicó que el ADN de este árbol presentó el mayor número secuencias de ADN particula-

(table 3). Trees 21 and U2 were morphologically less high (less than 20 m) and presented lower size of flowers (non shown data). On the opposite, trees 1, 4, V5, U3 and C1 did not produce any marker, the latter meant that a DNA molecule of these trees did not present any particular DNA sequence that would identify it to the bases sequences of the evaluated initiators.

The organoleptic characteristics of fruits were not evaluated, however, a degustation of the mesocarp was done outstanding in taste the fruits of trees 1, 4, U1, U2, 21, C1, C1 and C11;

Cuadro 3. Fragmentos de marcadores moleculares para 15 árboles de zapote mamey del Estado de Morelos, México, en paréntesis se indica el tamaño de los fragmentos amplificadas por los iniciadores correspondientes.

Table 3. Fragments of molecular markers for 15 zapote mamey trees of estado de Morelo, Mexico, in parentheses is indicated the size of the amplified fragments by the corresponding initiators.

Árbol	Fragmentos marcadores
1	_____
4	_____
6	OPB 07 (512), OPB 15 (652)
V3	OPB 17 (1018)
V5	_____
V6	OPB 09 (727)
21	OPB 06 (931), OPB 09 (597), OPB 10 (733), OPB 12(572), OPB 17 (313) (698) (1184) (1775), SAP 04 (879) (1129) (1639).
64	OPB 10 (1150)
U1	OPB 11 (686)
U2	OPB 05 (1354), OPB 10 (1468), OPB 12 (475) (1470), OPB 15 (536), SAP 04 (325)
U3	_____
109	OPB 17 (636) (2253)
C1	_____
C2	OPB 09 (1636)
C11	SAP 04 (688)

res que fueron complementarias a los iniciadores OPB-06, OPB-09, OPB-10, OPB-12, OPB-17 y SAP-04. El árbol U2 tuvo seis fragmentos marcadores, generados por los oligonucleótidos OPB-05, OPB-10, OPB-12, OPB-15 y SAP-04 (cuadro 3). Los árboles 21 y U2 fueron morfológicamente de menor altura (menor a 20 m), y presentaron menor tamaño de flores (datos no presentados). En contraste, los árboles 1, 4, V5, U3 y C1 no produjeron ningún marcador, lo anterior significó que la molécula de ADN de estos árboles no presentó las secuencias de ADN particulares que los identificaran con las secuencias de bases de los iniciadores evaluados.

Las características organolépticas de los frutos no se evaluaron; sin embargo, se realizó la degustación del mesocarpo destacando en sabor los frutos de los árboles 1, 4, U1, U2, 21, C1, C2 y C11; no obstante, no se tuvieron marcadores para todos los árboles (cuadro 3).

La metodología RAPDs permitió la caracterización del 66% de los árboles de zapote mamey. La posibilidad de encontrar marcadores moleculares para todos los árboles aumentó en función de la cantidad de iniciadores usados.

Los fragmentos RAPDs totales y polimórficos obtenidos en la caracterización de los árboles de zapote mamey fueron mayores a los obtenidos por Fontaine *et al.* (2004) quienes observaron un total de 67 loci RAPDs polimórficos y 15 monomórficos que variaron de 1.670 a 280 pb, en 179 individuos de la sapotacea *V. paradoxa*, con los iniciadores OPB-07, OPB-11, OPN-15, OPR-15, OPW-9, OPW-12, OPW-13, OPX-3, OPX-6, OPX-11,

nevertheless, none markers were obtained for all trees (table 3).

The RAPDs methodology allowed characterizing 66% of zapote mamey trees. The possibility of finding molecular markers for all trees increased in function of the quantity of the used initiators.

The fragments of total and polymorphic RAPDs obtained in the characterization of zapote mamey trees were higher to the ones obtained by Fontaine *et al.* (2004) who observed a total of 67 loci polymorphic RAPDs and 15 mono-morphic that varied from 1,670 to 280 pb, in 179 individuals of sapotacea *V. paradoxa*, with the initiators OPB-07, OPB-11, OPN-15, OPR-15, OPW-9, OPW-12, OPW-13, OPX-3, OPX-6, OPX-11, OPY-6, OPY-13, OPY-20, OPW-5 and OPW-19. In this research, the number of bands varied from 13 to 21, while Fontaine *et al.* (2004) only obtained from one to six. Also, Majourhat *et al.* (2008), when characterizing *A. spinosa* only obtained from four to nine fragments; with the initiator OPB-07 obtained four fragments and with OPB-11 observed six amplified fragments, on the opposite, in this research were obtained 15 and 18 fragments respectively for such indicators.

Regarding the number of marker fragments, in this research were obtained 27 different to the use of 10 initiators, while Heaton *et al.* (1999) when studying chicozapote (*M. zapota* (L.) P. Royen) using RAPDs with 80 indicators only obtained 28 different bands.

In this research were obtained 136 polymorphic fragments, and Degen *et al.* (2001) using the same

OPY-6, OPY-13, OPY-20, OPW-5 y OPW-19. En esta investigación, el número de bandas varió de 13 a 21, mientras que Fontaine *et al.* (2004), sólo obtuvieron de una a seis. También Majourhat *et al.* (2008), al hacer la caracterización de *A. spinosa* obtuvieron sólo de cuatro a nueve fragmentos; con el iniciador OPB-07 obtuvieron cuatro fragmentos y con el OPB-11 observaron siete fragmentos amplificados, en contraste en esta investigación se obtuvieron 15 y 18 fragmentos, respectivamente para tales iniciadores.

En cuanto al número de fragmentos marcadores, en esta investigación se obtuvieron 27 diferentes con el uso de 10 iniciadores, mientras que Heaton *et al.* (1999) al estudiar chicozapote (*M. zapota* (L.) P. Royen) mediante RAPDs con 80 iniciadores sólo obtuvieron 28 bandas diferentes.

En esta investigación se obtuvieron 136 fragmentos polimórficos, en tanto que Degen *et al.* (2001), utilizando la misma metodología para estudiar 68 individuos de *C. sanguinolentum* con 11 iniciadores (OPE-02, OPE-05, OPE-07, OPY-04, OPY-06, OPY-07, OPY-10, OPY-13, OPY-14, OPY -15 y OPY-16) obtuvieron sólo 48 fragmentos polimórficos. Sin embargo, Smedmark y Anderberg (2007) obtuvieron 308 fragmentos polimórficos en *N. polynesicum* (Sapotaceae) mediante SSR.

La cantidad de fragmentos amplificados por la utilización de iniciadores RAPDs varía de acuerdo a la especie a estudiar. La posibilidad de obtener marcadores moleculares para la caracterización de árboles aumenta al

methodology to study 68 individuals of *C. sanguinolentum* with 11 initiators (OPE-02, OPE-05, OPE-07, OPY-04, OPY-06, OPY-07, OPY-10, OPY-13, OPY-14, OPY -15 and OPY-16) only obtained polymorphic fragments. However, Smedmark and Anderberg (2007) obtained 308 polymorphic fragments in *N. polynesicum* (Sapotaceae) using SSR.

The quantity of amplified fragments by the usage of RAPDs initiators varies according to the specie to study. The possibility of obtaining molecular markers for characterizing the trees increases when using a higher quantity of RAPDs initiators in the researches.

The information generated on the molecular characterization of zapote mamey is one of the first characteristics references of DNA for trees with outstanding characteristics that might be useful to initiate the registration process of this fruit's varieties in Mexico.

Conclusions

The molecular characterization of zapote mamey trees located in Coatlán del Río and Telecala de la Reforma is appeared using 10 RAPDs indicators, which generated a high percentage of polymorphic fragments, obtaining the molecular characterization of more than 60% of the studied trees. The selected initiators allowed characterizing molecularly only 10 to 15 studied trees, and the ones that generated the highest quantity of markers were OPB-09, OPB-10, IOPB-17 and SAP-04. RAPDs were useful for the

usar mayor cantidad de iniciadores RAPDs en las investigaciones.

La información generada sobre la caracterización molecular del zapote mamey es una de las primeras referencias de características de ADN, para árboles con caracteres de frutos sobresalientes, que pueden ser de utilidad para iniciar el proceso de registro de variedades de esta especie frutal en México.

Conclusiones

La caracterización molecular de los árboles de zapote mamey ubicados en Coatlán del Río y Tetecala de la Reforma se evidenció con la utilización de 10 iniciadores de RAPDs los cuales generaron un alto porcentaje de fragmentos polimórficos, lográndose la caracterización molecular de más del 60% de los árboles estudiados. Los iniciadores seleccionados sirvieron para caracterizar molecularmente sólo a 10 de los 15 árboles estudiados, los que generaron mayor cantidad de marcadores fueron el OPB-09, el OPB-10, el OPB-17 y el SAP-04. Los RAPDs fueron de utilidad para la caracterización de 10 árboles de zapote mamey. El árbol C11 presentó un patrón de bandedo diferente, lo que indicó que tuvo distinta procedencia.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo de PROMEP a través del proyecto 103.5/05/1901 Caracterización morfológica y molecular de selecciones de tres especies de sapotáceas en el estado de Morelos y al SNI (Exp. 34643). A los productores de zapote mamey del es-

characterization of 10 zapote mamey trees. Tree C11, presented a different banding pattern, which indicated that it had a different precedence.

Acknowledgment

The authors acknowledge the support given by PROMED with the Project 103.5/05/1901 Morphological and molecular characterization of three Sapotaceae species in estado de Morelos and to SNI (Exp. 34643). The producers of zapote mamey producers of estado de Morelos by allowing the access to orchards and share experiences, time and cohabitation.

End of english version

tado de Morelos por permitir el acceso a sus huertas y compartir experiencias, tiempo y convivencia.

Literatura citada

- Anderberg, A. y A. Swenson. 2003. Evolutionary lineages in sapotaceae (Ericales): a cladistic analysis based on *ndhF* sequence data. International Journal Plant Science 164:763-773.
- Andrade-Rodríguez, M., A. Villegas-Monter, M.A. Gutiérrez-Espinosa, G. Carrillo-Castañeda y A. García-Velázquez. 2005. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus. Agrociencia 39:371-383.
- Azurdia, C., L. Mejía y B. Nufio. 1997. Variabilidad en frutales tropicales nativos de *Pouteria* (Sapotaceae) utilizando marcadores isoenzimáticos. Ciencia y Tecnología 2:3-25.

- Azurdia, C. 2006. Tres especies de Sapote en América Tropical. Southampton Centre for Under utilised Crops, Universidad de Southampton. Southampton, UK. 231 p.
- Borys M., W. y H.L. Borys. 2001. El potencial genético frutícola de la República Mexicana. Fundación Salvador Sánchez Colín. Coatepec Harinas, México. 48 p.
- Carrara, S., R. Campbell y R. Schnell. 2004. Genetic variation among cultivated selections of mamey sapote (*Pouteria* spp. [Sapotaceae]. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 117:195-200.
- Degen, B., H. Caron, E. Bandou, L. Magia, M.H. Chevallier, A. Leveau y A. Kremer. 2001. Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. *Heredity* 87:497-507.
- Fontaine, C., P.N. Lovett, H. Sanou, J. Maley y J.M. Bouvet. 2004. Genetic diversity of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaerth), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity* 93:639-648.
- Gaona-García, A., J.E. Álvarez-Vargas, I. Alía-Tejagal, V. López-Martínez y C.M. Acosta-Durán. 2004. El cultivo del zapote mamey (*Pouteria sapota*) en la región suroeste del estado de Morelos. *Investigación Agropecuaria* 2:14-19.
- Gaona-García, A., I. Alía-Tejagal, V. López-Martínez, M. Andrade-Rodríguez, M.T. Colinas-León y O. Villegas-Torres. 2008. Caracterización de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en el suroeste del estado de Morelos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14:41-47.
- Heaton, H.J., R. Whitkusy A. Gómez-Pompa. 1999. Extreme ecological and phenotypic differences in the tropical tree chicozapote (*Manilkara zapota* (L.) P. Royen) are not matched by genetic divergence: a random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Molecular Ecology* 8:627-632.
- Majourhat, K., Y. Jobbar, A. Hafidi y P. Martínez-Gómez. 2008. Molecular characterization and genetic relationships among most common identified morphotypes of critically endangered rare Moroccan species *Argania spinosa* (Sapotaceae) using RAPD and SSR markers. *Annals of Forest Science* 65:805.
- Nascimento, V.E., A.B.G. Martins y R.H. Hojo. 2008. Caracterização física e química de fruto de mamey. *Revista Brasileira de Fruticultura* 30:953-957.
- Rennó, A.V.C. 2007. Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae. Tesis de doctorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília. Brasil.
- SIAP. Sistema de información agroalimentaria y pesquera. 2010. En línea: <http://www.siap.gob.mx/index.php>. Consultado en febrero de 2012.
- Smedmark, J.E.E. y A.A. Anderberg. 2007. Boreotropical migration explains hybridization between geographically distant lineages in the pantropical clade Sideroxyloae (Sapotaceae). *American Journal of Botany* 94: 1491-1505.
- Zane, L., L. Bargelloni y T. Patarnello. 2002. Strategies of microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.