

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Manilkara zapota* DE VERACRUZ, MÉXICO, CON MARCADORES SSR

GENETIC CHARACTERIZATION OF *Manilkara zapota* FROM VERACRUZ, MEXICO, WITH SSR MARKERS

Dolores González-Hernández^{1*}, Eliseo García-Pérez², Pablo Guntin-Marey³

¹Red de Biodiversidad y Sistemática, Instituto de Ecología, A. C. Carretera Antigua a Coatepec 351, El Haya, 91070. Xalapa, Veracruz. (dolores.gonzalez@inecol.edu.mx). ²Colegio de Post-graduados, Campus Veracruz, Km. 88.5 Carretera Federal Xalapa-Veracruz. (geliseo@colpos.mx). ³Centro Universitario Las Tunas. Av. Carlos J. Finlay s/n Rpto. Buena Vista, 75200. Las Tunas, Cuba. (guntin23@ult.edu.cu).

RESUMEN

Manilkara zapota, un fruto de las sapotáceas, es nativo de México y América Central y se cultiva en países tropicales. La variabilidad morfológica de la especie está documentada, pero la diversidad genética no se ha estudiado con marcadores moleculares co-dominantes. Los objetivos de este estudio fueron: 1) probar si los loci de microsatélites diseñados para *Manilkara huberi* pueden usarse para estudiar la variación genética en *M. zapota*, 2) conocer la variación de esta especie en ejemplares silvestres o aislados de plantaciones comerciales del estado de Veracruz, México y 3) identificar los individuos más contrastantes que puedan usarse en un programa de manejo a largo plazo. La variación genética se evaluó en 20 árboles adultos de diferentes regiones fisiográficas del estado de Veracruz. Los 12 loci de microsatélite desarrollados para *M. huberi* se probaron en *M. zapota*. Dos fueron monomórficos y tres no amplificaron. Los otros siete loci se usaron para el análisis genético. El número de alelos fue alto (media de 11.85); sin embargo, la heterocigosidad fue baja (media de 0.154). El análisis de agrupamiento formó un grupo con los ejemplares del norte y otro, con múltiples subgrupos, del sur y centro del estado. El análisis también mostró que la mayor variación se encuentra en áreas conservadas del estado. Los microsatélite empleados fueron útiles para conocer la variación genética de *M. zapota*.

Palabras clave: *Manilkara zapota*, *Manilkara huberi*, árbol tropical, recursos genéticos, marcadores moleculares, microsatélites.

ABSTRACT

Manilkara zapota is a fruit belonging to the Sapotaceae, native to Mexico and Central America and is cultivated in tropical countries. The morphological variability of the species has been documented, but its genetic diversity has not been studied with co-dominant molecular markers. The objectives of this study were: 1) to test whether microsatellite loci designed for *Manilkara huberi* could be used to study genetic variation in *M. zapota*, 2) to learn about the variation of this species in wild and isolated specimens from commercial plantations, in the state of Veracruz, Mexico, and 3) to identify the most contrasting individuals that could be used in a long-term management program. We assessed the genetic variation of 20 adult trees from different physiographic regions of the state of Veracruz. The 12 microsatellite loci developed for *M. huberi* were tested in *M. zapota*. Two were monomorphic and three did not amplify. The seven remaining loci were used for genetic analysis. The number of alleles was high (mean 11.85); however, the heterozygosity was low (mean 0.154). Cluster analysis formed a group with specimens from the north and the other, with multiple subgroups, from the south and center of the state. The analysis also showed that the biggest change occurred in conservation areas of the state. The microsatellites employed were useful to learn about the genetic variation of *M. zapota*.

Key words: *Manilkara zapota*, *Manilkara huberi*, tropical tree, genetic resources, molecular markers, microsatellites.

INTRODUCTION

The last inventory of Native American Tropical fruit contains 1100 species distributed in 282 genera and 66 families (IPGRI, 2001).

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: septiembre, 2011. Aprobado: octubre, 2012.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 46: 663-675. 2012.

INTRODUCCIÓN

El último inventario de frutales nativos de América Tropical contiene 1100 especies distribuidas en 282 géneros y 66 familias (IPGRI, 2001). Las sapotáceas son una familia de árboles y arbustos con distribución cosmopolita, aunque la mayoría de las especies está en regiones tropicales y subtropicales de Asia y América (Swenson y Anderberg, 2005). La familia contiene más de 50 géneros y unas 1250 especies y es importante ecológica y económicamente (Govaerts *et al.*, 2001). *Manilkara zapota* (L.) van Royen (chicozapote, zapotilla o zapota) produce frutos de calidad excelente, es nativa de México y Centro América pero se cultiva en otros países tropicales por su fruto, látex y madera (Meghala *et al.*, 2005). En México, el estudio y rescate de la biodiversidad y de los recursos naturales es prioritario. Por ello, se realizan estudios de variabilidad genética útiles para la conservación, mejoramiento y manejo racional de las especies (Serna-Lagunes *et al.*, 2012).

Existen distintos métodos para identificar las especies vegetales, evaluar su diversidad y filogenia. Los basados en la morfología son más usados (Bayuelo-Jiménez y Ochoa, 2006), aunque su expresión puede afectarse por el ambiente y disminuir el número que pudiera evaluarse sin ambigüedad (Phillips *et al.*, 1995). Marcadores como los citogenéticos y moleculares permiten analizar las diferencias entre los cromosomas, las proteínas o el ADN (Avisé, 2004) y se usan para complementar la información cuando la de los morfológicos es insuficiente (González, 1998). Los marcadores moleculares se usan para implementar programas de mejoramiento y manejo de cultivos (Xin-hua *et al.*, 2007). En dos estudios realizados con marcadores moleculares para detectar variación genética en *M. zapota* (Heaton *et al.*, 1999; Meghala *et al.*, 2005) se usaron marcadores RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNAs) para detectar variación. Los resultados fueron contrastantes porque Heaton *et al.* (1999) detectaron variación genética reducida entre las poblaciones mexicanas con diferentes hábitat y localidades geográficas que contrasta con la diversidad morfológica amplia observada. Además, Meghala *et al.* (2005) evaluaron la diversidad genética de los cultivares de la India y observaron diversidad genética amplia. Lo anterior

The Sapotaceae is a family of trees and shrubs with cosmopolitan distribution, although most species are in tropical and subtropical regions of Asia and America (Swenson and Anderberg, 2005). The family contains over 50 genera and about 1250 species and is important ecologically and economically (Govaerts *et al.*, 2001). *Manilkara zapota* (L.) van Royen (chicozapote, zapotilla or zapota) produce excellent quality fruit, is native to Mexico and Central America but is cultivated in other tropical countries for its fruit, latex and wood (Meghala *et al.*, 2005). In Mexico the study and recovery of biodiversity and natural resources is a priority. Therefore, studies of genetic variation are conducted for the preservation, enhancement and rational management of the species (Serna-Lagunes *et al.*, 2012).

There are different methods to identify plant species, assess their diversity and phylogeny. Those based on morphology are the most used (Bayuelo-Jiménez and Ochoa, 2006), though, their application may be affected by the environment and reduce the number that might be assessed unambiguously (Phillips *et al.*, 1995). Markers such as the cytogenetic and molecular allow to analyze the differences between chromosomes, proteins or DNA (Avisé, 2004) and are used to supplement the information when those of morphology are insufficient (Gonzalez, 1998). Molecular markers are widely used to implement breeding programs and crop management (Xin-hua *et al.*, 2007). In two studies conducted with molecular markers to identify genetic variation in *M. zapota* (Heaton *et al.*, 1999; Meghala *et al.*, 2005) RAPDs markers (Random Amplification of Polymorphic DNAs) were used to detect variation. Results were contrasting, since Heaton *et al.* (1999) detected reduced genetic variation among Mexican populations with different habitats and geographical localities in contrast with the wide morphological diversity observed. Furthermore, Meghala *et al.* (2005) assessed the genetic diversity of cultivars in India and observed extensive genetic diversity. This seems to contradict the probability that it is a crop introduced and the variation depends on the number of genotypes present.

Microsatellites (SSR, simple sequence repeats) are the most widely used molecular markers to detect genetic variation within and between populations. These markers consist of short repeated DNA sequences located along the genome of eukaryotic

parece contradecir la probabilidad de que sea un cultivo introducido y la variación dependa del número de genotipos presentes.

Los microsatélites (SSR; simple sequence repeats) son los marcadores moleculares más usados para detectar variación genética dentro y entre poblaciones. Estos marcadores consisten en secuencias cortas repetidas de ADN localizadas a lo largo del genoma de organismos eucariontes (Tautz *et al.*, 1986). La variabilidad y abundancia de los microsatélites es útil para medir el polimorfismo entre especies o variedades relacionadas cercanamente (Awise, 2004). Para *Manilkara* se han identificado regiones de microsatélites que permiten investigar parámetros de la estructura y variabilidad genética en *M. huberi* (Azevedo *et al.*, 2005). Los SSR son útiles para análisis genéticos detallados por su naturaleza co-dominante; pero muchos son especie-específicos (Perrier *et al.*, 2011). No obstante, hay presencia de estas secuencias en especies del mismo género e incluso de la misma familia (Pinhero *et al.*, 2009) en las que las medidas de polimorfismo pueden o no estar correlacionadas con la distancia evolutiva de las especies (Sun y Kirkpatrick, 1996).

Aunque el chicozapote es una especie económicamente importante en México, no hay información que permita generar programas apropiados para su mejoramiento y manejo. Los objetivos de esta investigación fueron: 1) probar si los marcadores moleculares de microsatélites identificados en *M. huberi* son útiles para estudiar la variación genética en *M. zapota*; 2) conocer la variación genética de esta especie en ejemplares silvestres o alejados de plantaciones comerciales del estado de Veracruz y 3) identificar los individuos más contrastantes que pudieran usarse para conservarlos y eventualmente integrarlos a un programa de mejoramiento genético a largo plazo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y material vegetal

El estado de Veracruz se localiza en la parte central de la vertiente del Golfo de México, entre 22° 28' N y 17° 09' S y 93° 36' E y 98° 39' O, en la zona tropical del hemisferio norte (Morrone, 2001), con climas y tipos de vegetación diversos. Para este estudio se recolectaron hojas jóvenes de 20 árboles de chicozapote, separados de plantaciones comerciales (con excepción

organisms (Tautz *et al.*, 1986). The variety and abundance of microsatellites are useful in measuring the polymorphism among closely related species or varieties (Awise, 2004). For *Manilkara*, regions of microsatellites have been identified enabling to investigate the parameters of *M. huberi* structure and genetic variability (Azevedo *et al.*, 2005). The SSRs are useful for detailed genetic analysis due to their co-dominant nature, but many are species-specific (Perrier *et al.*, 2011). However, there is presence of these sequences in species of the same genus and even the same family (Pinhero *et al.*, 2009) in which polymorphism measurements may or may not be correlated with the evolutionary distance of species (Sun and Kirkpatrick, 1996).

Although the sapodilla is an economically important species in Mexico, there is no information to generate appropriate programs for improvement and management. The objectives of this research were: 1) to test whether microsatellite molecular markers identified in *M. huberi* are useful to study genetic variation in *M. zapota*; 2) to understand the genetic variation of this species in wild specimens or those far from commercial plantations of Veracruz; 3) to identify the most contrasting individuals that could be used to preserve them and be eventually integrated into a long-term breeding program.

MATERIALS AND METHODS

Study area and plant material

The state of Veracruz is located in the central part of the Gulf of Mexico watershed, between 22° 28' N and 17° 09' S and 93° 36' E and 98° 39' W, in the tropical zone of the northern hemisphere (Morrone, 2001), with different climates and vegetation types. For this study, we collected young leaves from 20 sapodilla trees, separated from commercial plantations (except for the collection EZ-10), in different physiographic regions of the state (Table 1). The geographical location of the trees sampled was recorded with a global positioning device (GPS). The collected leaves were placed in ziploc bags with silica gel to keep them dry until arrival at the laboratory.

Extraction, purification and PCR with oligonucleotides for microsatellites

Before extracting DNA the leaves were disinfected with 75 % ethanol (aqueous v:v solution) and DNA extraction was

de la recolecta EZ-10), en diferentes regiones fisiográficas del estado (Cuadro 1). La ubicación geográfica de los árboles muestreados se registró con un equipo de posicionamiento global (GPS). Las hojas recolectadas se colocaron en bolsas ziploc con sílica gel para mantenerlas secas hasta su llegada al laboratorio.

Extracción, purificación y PCR con oligonucleótidos para microsatélites

Antes de extraer el ADN las hojas se desinfectaron superficialmente con alcohol etílico al 75 % (solución acuosa v:v) y la extracción se realizó con el método CTAB, modificado por González y Vovides (2002). La purificación del ADN genómico se efectuó en columnas con Sephadex G50 (Sigma-Aldrich).

Se realizó un ensayo preliminar con 12 loci de microsatélites detectados previamente en *M. huberi* (Azevedo *et al.*, 2005) en cinco de los ejemplares muestreados, para saber si sucedería la amplificación y conocer si eran polimórficos. De los 12 loci probados, tres no amplificaron y dos fueron monomórficos. Los siete loci restantes (Mh 04, Mh 06, Mh 07, Mh 08, Mh 12, Mh 17 y Mh 22) se usaron para conocer la variación genética en los 20 ejemplares de *M. zapota* (Cuadro 2).

La amplificación (PCR) se realizó en un volumen de 20 μ L con: amortiguador de pH Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM y Triton X-100 0.1 %, MgCl₂ 1.25 mM, oligonucleótidos

performed using the CTAB method, modified by González and Vovides (2002). We did genomic DNA purification on Sephadex G50 columns (Sigma-Aldrich); also a preliminary test with 12 microsatellite loci previously identified in *M. huberi* (Azevedo *et al.*, 2005), in five of the specimens sampled to see if amplification would occur and know if they were polymorphic. Of the 12 loci tested, three did not amplify and two were monomorphic. The seven remaining loci (Mh 04, Mh 06, Mh 07, Mh 08, Mh 12, Mh 17 and Mh 22) were used to determine the genetic variation in the 20 specimens of *M. zapota* (Table 2).

Amplification (PCR) was performed in a volume of 20 μ L with: pH buffer 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and Triton X-100 0.1 %, 1.25 mM MgCl₂, 1.0 oligonucleotides mM, dNTPs 250 mM, 25 ng of DNA and 2 U *Taq* polymerase (Gene Apex choice). The PCR was performed in a thermocycler (Labnet International) with initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 15 sec at 94 °C; 1 min at the annealing temperature of the specific oligonucleotide pair and extension of 30 sec at 72 °C and a final extension of 7 min at 72 °C. The amplification of PCR products (5 mL) was done using agarose gels at 0.8%, prior to electrophoresis on acrylamide gel. When there was no amplification, we performed three trials. The DNA concentration increased to 50 and 80 ng and 15 s to each segment of the PCR cycle.

Cuadro 1. Ubicación geográfica de los árboles de *Manilkara zapota* en el estado de Veracruz, México, incluidos en la exploración de la variación genética.

Table 1. Geographic location of the *Manilkara zapota* trees in the state of Veracruz, Mexico, included in the exploration of genetic variation.

Ejemplar	Municipio/Localidad	msnm	Latitud	Longitud
ch2	Tantoyuca, Tepetlán Grande	96	21° 18' 24.5"	98° 16' 31.5"
ch3	Papantla, Papantla	164	20° 27' 25.9"	97° 19' 10.8"
ch4	Tecolutla, Plan de Villa Cuahutemoc (El Negro)	17	20° 24' 49.0"	97° 00' 58.7"
ch5	Catemaco, La Perla	785	18° 32' 30.7"	95° 07' 21.3"
ch6	San Andrés Tuxtla, Balzapote	71	18° 37' 04.3"	95° 04' 43.5"
ch7	Hueyapan de Ocampo, Santa Rosa Cintepec	491	18° 18' 09.0"	95° 07' 05.1"
ch8	Las Choapas, El Chichón	65	17° 45' 13.7"	94° 06' 38.3"
ch9	Moloacán, Acalapa 2	44	17° 58' 19.2"	94° 13' 48.6"
ch10	Cosoleacaque, Calzada km 15	29	18° 07' 32.4"	94° 32' 22.4"
ch13	Playa Vicente, Tierra Nueva	69	17° 54' 15.0"	95° 39' 10.3"
ch14	Playa Vicente, Zapotal	73	17° 44' 44.0"	95° 48' 21.9"
ch15	Yanga, Loma de San Pedro	518	18° 49' 08.2"	96° 49' 09.0"
ch16	Manlio Fabio Altamirano, Tepetates	24	19° 11' 40.7"	96° 20' 33.3"
ch18	Paso de Ovejas, Angostillo	265	19° 12' 58.0"	96° 32' 36.0"
G2	Apazapan, Agua Caliente	227	19° 19' 18.5"	96° 38' 16.2"
NB-1	Emiliano Zapata	277	19° 23' 54.7"	96° 38' 55.8"
EZ-2	Emiliano Zapata	277	19° 23' 52.15"	96° 38' 52.05"
C3	Cuajilote	166	19° 18' 43.4"	96° 34' 39.3"
A7	Apazapan	314	19° 19' 44.8"	96° 43' 32.7"
EZ-10	Emiliano Zapata	277	no determinadas	

**Cuadro 2. Microsatélites de *Manilkara huberi* polimórficos en *Manilkara zapota*.
Table 2. Polymorphic *Manilkara huberi* microsatellites in *Manilkara zapota*.**

Locus	Secuencia del oligonucleótido (5'-3') F="forward"; R="reverse"	Núm. de accesión en GenBank
Mh 04	F: GCACTCTCCATGGTTCCAGT R: AAAGAGTCAATGGCGTGAGC	AY514006
Mh 06	F: ACACGCACAAAACAAACCAA R: TTCTTGAAGGAGGGTTGCTC	AY514007
Mh 07	F: ATTGCAGCATATCCACACCA R: GCAAAGGGTGATGGGTTAGA	AY514008
Mh 08	F: GTAATGGGAGCCGTTTGAGA R: CTGGGTAGCATTGTGTCAT	AY514009
Mh 12	F: TGCGGAAGTGTGAAAAGAGT R: ATCCACAGCAATGACTGACG	AY514010
Mh 17	F: CACGATGACCTCTCAGTGGA R: CCTGTGTATGCGTTCGATTG	AY514011
Mh 22	F: CCCATTATAGCCCTCCACCT R: AGAGAGCACATGCAAGCTCA	AY514014

1.0 μ M, dNTPs 250 μ M, 25 ng de ADN y 2 U de polimerasa *Taq* (Apex Gene choice). La PCR se realizó en un termociclador (Labnet International) con desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 15 seg a 94 °C, 1 min a la temperatura de anillado específico del par de oligonucleótidos y extensión de 30 seg a 72 °C y una extensión final de 7 min a 72 °C. La amplificación de los productos de la PCR (5 μ L) se corroboró en geles de agarosa al 0.8 %, antes de realizar la electroforesis en el gel de acrilamida. Cuando no hubo amplificación, se realizaron tres ensayos más. La concentración de ADN se aumentó a 50 y 80 ng y 15 s al tiempo para cada segmento del ciclo de la PCR.

Electroforesis en gel de acrilamida, visualización y registro de alelos

Los productos de PCR se separaron en geles de acrilamida al 6 %, según el procedimiento de Benbouza *et al.* (2006). La electroforesis se realizó por 3 h a 1680V, 60 mA y 80 W en una cámara vertical (Thermo Scientific Owl P10DS Dual Gel System) con amortiguador de pH TBE IX (Trizma 10 mM, ácido bórico 8.9 mM y Na₂EDTA 2 mM). Antes de la electroforesis, el ADN se desnaturalizó 2 min a 92 °C. Entre las muestras se colocó un marcador con múltiplos de 100 pb (Promega). Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con nitrato de plata y la imagen del gel se capturó con una cámara Kodak Digital Science®. Para

Acrylamide gel electrophoresis, alleles display and recording

The PCR products were separated on acrylamide gels at 6 % according to the procedure described by Benbouza *et al.* (2006). Electrophoresis was carried out for 3 h at 1680V, 60 mA and 80 W in a vertical chamber (Thermo Scientific Owl P10DS Dual Gel System) with pH TBE IX buffer (Trizma 10 mM, 8.9 mM boric acid and 2 mM Na₂EDTA). Prior to electrophoresis, we denatured DNA for 2 min at 92 °C. Among the samples a marker was placed with multiples of 100 bp (Promega). After electrophoresis, the gels were stained with silver nitrate and the gel image captured using a Kodak Digital Science® camera. For the allele size (bp), we used a 1D Image Analysis (version 3.0) and the size of the marker fragments as reference.

Analysis of the genetic variation

The Popgen program (Yeh *et al.*, 1999) was used to calculate genetic polymorphism in the number of alleles per locus (na) and effective alleles (ne), the observed and expected levels of homo and heterozygosity assuming Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), the HWE deviations for each locus and linkage disequilibrium (LD) without assuming HWE ($P < 0.05$). The polymorphism information content (PIC) for each locus was calculated with the "excel microsatellite

conocer el tamaño de los alelos (pb) se usó 1D Image Analysis (versión 3.0) y el tamaño de los fragmentos del marcador como referencia.

Análisis de la variación genética

El polimorfismo genético, en número de alelos por locus (na) y efectivo de alelos (ne), los niveles observados y esperados de homo y heterocigosidad, asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), las desviaciones al HWE para cada locus y el desequilibrio por ligamiento (LD) sin asumir HWE ($P < 0.05$), se calcularon con el programa Popgen (Yeh *et al.*, 1999). La información del contenido de polimorfismo (PIC) para cada locus se calculó en el "excel microsatellite toolkit". La presencia de alelos nulos se calculó con la estimación de máxima verosimilitud (ML) del algoritmo EM (Expectation-Maximization) de Dempster *et al.* (1977) con el programa GenePop 4.0 (Rousset, 2008). El coeficiente F_{IS} se calculó como una medida de exceso o deficiencia de heterocigosidad dentro de la especie con el programa FSTAT versión 2.9.3.2 (Goudet, 2002). La significancia de F_{IS} se probó con métodos de re-muestreo aleatorio y los valores de P para $F_{IS}=0$ se calcularon con 1000 permutaciones al azar.

La similitud entre los genotipos se obtuvo con una matriz binaria de presencia (1) o ausencia (0) de alelos, y se calculó con el programa PAUP 4.0b8 (Swofford, 2001) de acuerdo con Nei y Li (1979): $S = 2c / (a + b + 2c)$, donde c = número de alelos compartidos por la muestra (A) y la muestra (B), a = número de alelos presentes en A y no en B, y b = el número de alelos no presentes en A, pero sí en B. Con los valores de similitud se construyó un filograma sin enraizar para conocer el grado de divergencia entre ejemplares con el método NJ (Neighbor-Joining).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siete loci de microsatélite (Mh 04, Mh 06, Mh 07, Mh 08, Mh 12, Mh 17 y Mh 22) identificados originalmente en *M. huberi* fueron polimórficos en *M. zapota* (Figura 1). El resto no amplificó (Mh 03, Mh 19 y Mh 24) o fueron monomórficos (Mh 20 y Mh 26). Esto confirmó que las amplificaciones cruzadas con los marcadores usados en especies del mismo género son posibles. Además, es posible usarlas en estudios ecológicos y de diversidad genética en escala mayor para diseñar programas para la conservación de *M. zapota*.

Se observaron 70 alelos en los siete loci usados. Los microsatélites en *M. zapota* mostraron variabilidad mayor en el número de alelos que en *M. huberi* con los mismos marcadores. Los alelos fueron entre

toolkit". The presence of null alleles was calculated with the maximum likelihood estimation (ML) of the EM algorithm (Expectation-Maximization) by Dempster *et al.* (1977) with the program GenePop 4.0 (Rousset, 2008). The coefficient F_{IS} was calculated as a measure of excess or deficiency of heterozygosity within the species with the program FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 2002). The significance of F_{IS} was tested with random resampling methods and P values for $F_{IS}=0$ were calculated with 1000 random permutations.

The similarity between genotypes was obtained with a binary matrix of presence (1) or absence (0) of alleles, calculated with the 4.0b8 PAUP program (Swofford, 2001), according to Nei and Li (1979): $S = 2c / (a + b + 2c)$, where c = number of alleles shared by sample (A) and sample (B); a = number of alleles present in A and not in B; and b = the number of alleles not present in A, but present in B. With the similarity values, we built an unrooted phylogram to determine the degree of divergence between specimens with the NJ method (Neighbor-Joining).

RESULTS AND DISCUSSION

Seven microsatellite loci (Mh 04, Mh 06, Mh 07, Mh 08, Mh 12, Mh 17 and Mh 22) originally identified in *M. huberi* were polymorphic in *M. zapota* (Figure 1). The rest did not amplify (Mh 03, Mh 19, and Mh 24) or were monomorphic (Mh 20 and Mh 26). This confirmed that cross amplifications with the markers used in species of the same genus are possible. Furthermore, it is possible to use them in ecological studies of genetic diversity at greater scale to design programs for the conservation of *M. zapota*.

We observed 70 alleles in the seven loci used. Microsatellites in *M. zapota* showed higher variability in the number of alleles than in *M. huberi* with the same markers. Alleles were between 6 and 17, with a mean of 11.85 per locus, whereas *M. huberi* averaged 6.14. Only locus Mh 22 in *M. zapota* presented fewer alleles (Table 3).

The PIC values were 81 % in the locus Mh 22- to 93 % in Mh 12 (Table 4). Microsatellites, as other co-dominant markers, are used in diploid species assuming that there is no linkage between loci. This was corroborated with LD values of 0.00 in the seven loci examined, and showed that loci are independent. Therefore, the greater number of alleles in *M. zapota* is not the result of artifact by linkage, which could be due to hybridization or polyploidy processes (natural

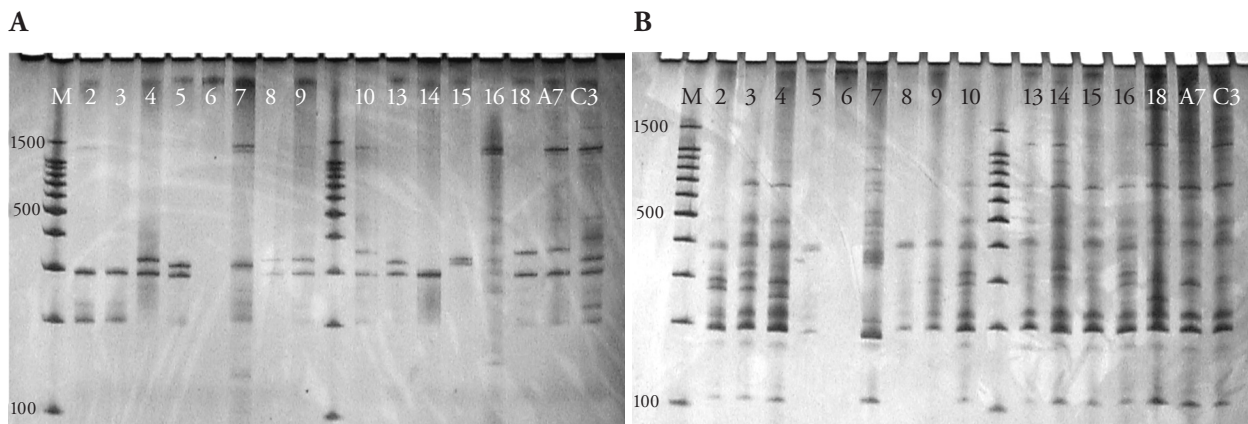


Figura 1. Ejemplo de dos loci polimórficos, Mh 06 (A) y Mh 12 (B), en *Manilkara zapota*. Los números corresponden a los ejemplares y M al marcador en pares de bases.

Figure 1. Example of two polymorphic loci, Mh 06 (A) and Mh 12 (B), in *Manilkara zapota*. Numbers correspond to specimens and M to marker in base pairs.

6 y 17, con media de 11.85 por locus, mientras que *M. huberi* promedió 6.14. Sólo el locus Mh 22 en *M. zapota* presentó menor número de alelos (Cuadro 3).

Los valores PIC fueron 81 % en el locus Mh 22 a 93 % en el Mh 12 (Cuadro 4). Los microsatélites, como otros marcadores co-dominantes, se usan en especies diploides suponiendo que no hay ligamiento entre loci. Esto se corroboró con los valores de LD de 0.00 en los siete loci examinados y mostró que los loci son independientes. Por tanto, el número mayor de alelos en *M. zapota* no resulta de artificios por ligamiento, lo cual podría deberse a procesos de hibridación o poliploidía (natural o inducida) sucedidos

or induced) occurred over time and documented by Kosman and Leonard (2005).

In contrast to the high number of alleles, only five of the seven loci tested were heterozygous. The H_O was low compared to H_E under HW. The mean value of H_O was 0.154, which contrasts with the value expected of 0.951. Heterozygosity values provide information on the structure and evolution of populations. Therefore, the low values of heterozygosity in *M. zapota* may indicate that the species has undergone erosion in its genetic variability by inbreeding. These results agree with those of F_{IS} , indicating an excess of homozygotes. We

Cuadro 3. Comparación de la diversidad alélica entre *Manilkara huberi* y *Manilkara zapota* para los siete loci de microsatélites usados en este estudio.

Table 3. Comparison of the allelic diversity between *Manilkara huberi* and *Manilkara zapota* for seven microsatellite loci used in this study.

Locus	Unidad repetida	Publicación original (<i>M. huberi</i>)				Este estudio (<i>M. zapota</i>)			
		Número de alelos	Intervalo de tamaño (pb)	H_E	H_O	Número de alelos	Intervalo de tamaño (pb)	H_E	H_O
Mh 04	(CT) ₁₂	5	189-209	0.768	0.583	15	156-477	0.333	0.967
Mh 06	(GA) ₁₄	7	162-188	0.754	0.417	9	209-417	0.000	0.941
Mh 07	(CT) ₂₃	4	153-187	0.746	0.750	9	182-448	0.125	0.942
Mh 08	(CT) ₁₁	7	172-202	0.862	0.917	12	184-423	0.333	0.961
Mh 12	(CT) ₉ (AC) ₆	7	187-211	0.859	0.667	17	111-473	0.133	0.970
Mh 17	(CT) ₁₃	6	240-274	0.721	0.750	15	222-589	0.154	0.966
Mh 22	(CT) ₁₅	7	180-206	0.841	0.833	6	167-388	0.000	0.909

Cuadro 4. Niveles de polimorfismo obtenidos con 7 loci de microsatélites en 20 individuos de *Manilkara Zapota*.
Table 4. Polymorphism levels obtained with 7 microsatellite loci in 20 individuals of *Manilkara Zapota*.

Locus	N	na	ne	H _O	H _E	PIC	F _{IS} *	Frecuencia alelos nulos
Mh 04	24	15	13.714	0.333	0.967	0.922	0.665	0.3581
Mh 06	18	9	9.000	0.000	0.941	0.878	1.000	0.5324
Mh 07	16	9	8.533	0.125	0.942	0.871	0.875	0.3680
Mh 08	18	12	10.800	0.333	0.961	0.900	0.667	0.4755
Mh 12	30	17	16.071	0.133	0.970	0.934	0.867	0.4449
Mh 17	26	15	14.083	0.154	0.966	0.924	0.846	0.5521
Mh 22	12	6	6.000	0.000	0.909	0.810	1.000	0.4519
Media	21	11.857	11.172	0.154	0.951		0.846	
Desv. Est.		4.018	3.594	0.137	0.022			

na = número de alelos observados, ne = número efectivo de alelos, H_O = heterocigosidad observada, H_E = heterocigosidad esperada, PIC = información del contenido de polimorfismo. * Todos los valores de P (0.05) para la prueba exacta de HWE indicaron una desviación significativa al equilibrio de Hardy-Weinberg. † na = number of alleles observed; ne = effective number of alleles; H_O = observed heterozygosity; H_E = expected heterozygosity, PIC = polymorphism information content. * All P values (0.05) for the HWE exact test indicated a significant deviation to the Hardy-Weinberg equilibrium.

en el tiempo y documentados por Kosman y Leonard (2005).

En contraste con el número elevado de alelos, sólo cinco de los siete loci probados fueron heterocigotos. La H_O fue baja con respecto a H_E bajo HWE. El valor medio de H_O fue 0.154, que contrasta con el esperado de 0.951. Los valores de heterocigosidad proporcionan información de la estructura y de la evolución de las poblaciones. Por tanto, los valores bajos de heterocigosidad en *M. zapota* podrían indicar que la especie ha sufrido una erosión en su variabilidad genética por endogamia. Estos resultados concuerdan con los de F_{IS}, que indican un exceso de homocigotos. Para los loci Mh 06 y Mh 22 los valores de 1.00 indican ausencia de heterocigotos. En todos los loci, los valores de P (0.05) para este coeficiente indicaron una desviación significativa al HWE.

La combinación de un número alto de alelos y heterocigosidad baja es un fenómeno explicado con modelos teóricos (Nei y Li, 1976; Maruyama y Fuerst, 1984), que comparan los valores relativos esperados de número de alelos y la heterocigosidad de poblaciones en expansión, después que el número de miembros ha descendido drásticamente (cuello de botella), contra los valores de poblaciones que están en equilibrio. Estos modelos predicen que en poblaciones en expansión el número de alelos crecerá más rápidamente que la heterocigosidad. Si este es el caso para *M. zapota*, se podría suponer que esta especie

found values of 1.00 for the loci Mh 06 and Mh 22, which indicate absence of heterozygotes. In all loci, the values of P (0.05) for this coefficient indicated a significant deviation to HWE.

The combination of a large number of alleles and low heterozygosity was explained with theoretical models (Nei and Li, 1976; Maruyama and Fuerst, 1984). These models compare the expected relative values of the number of alleles and heterozygosity of populations that are expanding, after the number of members has dropped dramatically (bottleneck), against the values of populations that are in equilibrium. These models predict that in expanding populations the number of alleles will grow faster than heterozygosity. If this is the case for *M. zapota*, we could assume that this species at some point in its evolution experienced a bottleneck, perhaps by habitat fragmentation, and is now expanding. This hypothesis could be tested with a larger sample of specimens and different areas of distribution.

Another possible explanation for heterozygous deficiency is the presence of null alleles. The results obtained with the EM algorithm for these alleles ranged between 0.3581 and 0.5521 for the locus Mh 04 and Mh 17 (Table 4), which showed the likely presence of null alleles in *M. zapota*. Since its presence varies considerably among studies (Dakin and Avise, 2004), it has been suggested that the flanking regions are more unstable than what is believed (Grimaldi

en algún momento en su evolución experimentó un cuello de botella, quizá por fragmentación de su hábitat, y ahora se encuentra en expansión. Esta hipótesis podría probarse con una muestra mayor de ejemplares y de diferentes áreas de distribución.

Otra posible explicación para la deficiencia de heterocigotos es la presencia de alelos nulos. Los resultados obtenidos con el algoritmo EM para estos alelos oscilan entre 0.3581 y 0.5521 para los locus Mh 04 y Mh 17 (Cuadro 4) lo cual mostró la presencia probable de alelos nulos en *M. zapota*. Dado que su presencia varía considerablemente entre estudios (Dakin y Avise, 2004), se ha sugerido que las regiones flanqueadoras son más inestables que lo propuesto (Grimaldi y Crouau-Roy, 1997). Los alelos nulos se han postulado para explicar las desviaciones significativas del HWE y coeficientes positivos de endogamia (exceso de homocigotos, Jones y Ardren, 2003). Estos alelos no se amplifican debido a la concentración o calidad baja de ADN, o por la presencia de mutaciones en las regiones flanqueadoras de los oligonucleótidos, debida a la divergencia de las secuencias (Dakin y Avise, 2004). Los mismos microsatélites en ampliificaciones cruzadas aumentan la presencia de alelos nulos, cuando la frecuencia de sustituciones o inserciones/delecciones entre especies es mayor que dentro de la especie para la cual fueron diseñados (Oddou-Muratorio, 2009). Esto puede explicar la presencia de alelos nulos en *M. zapota*. Al respecto, Azevedo *et al.* (2005) atribuyen la deficiencia de heterocigotos en los loci Mh 06 y Mh 24 de *M. huberi* a la presencia posible de estos alelos. En *M. zapota* el locus Mh 06 no presentó heterocigotos, lo que parece indicar presencia de alelos nulos en este locus en ambas especies.

Hay métodos diversos para estimar la frecuencia de los alelos nulos desde datos genéticos experimentales. Todos suponen panmixia y atribuyen las proporciones bajas de heterocigotos a la presencia de estos alelos. Sin embargo, difieren en la interpretación de la ausencia de bandas visibles, que puede deberse a individuos homocigotos para un alelo nulo (homocigotos nulos) o a artificios de la PCR (Dakin y Avise, 2004; Chapuis y Estoup, 2007; Oddou-Muratorio, 2009). En simulaciones hechas con algoritmos diversos el método EM estimó mejor la frecuencia de alelos nulos. Este método iterativo estima la verosimilitud máxima de la frecuencia

and Crouau-Roy, 1997). Significant deviations from HWE and positive coefficients of inbreeding (excess of homozygotes, Jones and Ardren, 2003) are an explanation for the presence of null alleles. These alleles do not amplify because of the concentration or low quality of DNA, or the presence of mutations in the flanking regions of the oligonucleotides due to the divergence of sequences (Dakin and Avise, 2004). Microsatellites themselves in cross amplifications increase the presence of null alleles, when the frequency of substitutions or insertions/deletions between species is greater than within the species for which they were designed (Oddou-Muratorio, 2009). This may explain the presence of null alleles in *M. zapota*. In this regard, Azevedo *et al.* (2005) attribute the deficiency of heterozygous in loci Mh 06 and Mh 24 of *M. huberi* to the possible presence of these alleles. In *M. zapota*, Mh 06 locus showed no heterozygous, suggesting the presence of null alleles in this locus in both species.

There are various methods to estimate null allele frequency from experimental genetic data. All involve panmixia and the low proportions of heterozygous are due to the presence of these alleles. However, they differ in the interpretation of the absence of visible bands, which may be due to homozygous individuals for null allele (null homozygous) or PCR artifices (Dakin and Avise, 2004; Chapuis and Estoup, 2007; Oddou-Muratorio, 2009). In simulations with various algorithms, the EM method was the best to estimate null allele frequency. This iterative method estimates the maximum likelihood of frequency of these alleles in genetic data. However, to ensure the existence of null alleles in *M. zapota* it is necessary to cross and see the pattern of alleles of the progeny, redesign oligonucleotides to try to recover the heterozygous allele or sequence alleles to learn about their molecular basis in detail.

The genetic similarity values obtained according to Nei and Li (1979) in *M. zapota* varied from 0.2326, between ch8 and ch7 specimens to 0.0290 between A7 and ch8 specimens. Cluster NJ analysis distributed the collections into two main groups. The first consisted of specimens from upstate. These samples (ch2, ch3 and ch4) corresponded to isolated and distant individuals from any area producing chicozapote. The remaining specimens from the center and south of the state were included in a large

de estos alelos en los datos genéticos. No obstante, para asegurar la existencia de alelos nulos en *M. zapota* es necesario hacer cruces y observar el patrón de alelos de la progenie, rediseñar oligonucleótidos para intentar recuperar el alelo heterocigoto o secuenciar los alelos para conocer sus bases moleculares detalladas.

Los valores de similitud genética obtenidos de acuerdo a Nei y Li (1979) en *M. zapota* variaron de 0.2326, entre los ejemplares ch8 y ch7, a 0.0290, entre los ejemplares A7 y ch8. El análisis de agrupamiento NJ, distribuyó las recolectas en dos grupos principales. El primero consistió de especímenes del norte del estado. Esas muestras (ch2, ch3 y ch4) correspondieron a individuos aislados y distantes de cualquier zona productora de chicozapote. El resto de los ejemplares, provenientes del centro y sur del estado, se incluyeron en un gran grupo formado por tres subgrupos relacionados principales por su similitud genética (Figura 2).

El subgrupo formado por ch5, ch7, NB-1, EZ-10, G2, C3 y EZ-2 concentró ejemplares recolectados en el centro del estado, con excepción de los ejemplares ch5 y ch7, de los municipios de Catemaco y Huayepan de Ocampo. El subgrupo formado por ch6, ch16, ch18, ch10, A7, ch9, ch5, y ch14 agrupó ejemplares recolectados desde Apazapan (A7) en el centro del estado, hasta Moloacán (ch9) una de las localidades más sureñas. El otro subgrupo incluyó los ejemplares ch8 de Las Choapas y ch13 de Playa Vicente (Figura 2).

El análisis de agrupamiento también reveló que los ejemplares en el mismo subgrupo no comparten rasgos morfológicos, como la forma del fruto o tamaño de las semillas. Es el caso de los frutos de la muestra C3 con semillas notablemente pequeñas o ausentes y el ejemplar genéticamente más parecido (EZ-2) con semillas normales; o el ejemplar ch8 con frutos redondos en contraste con los de ch13 que son ovalados. Estos resultados indicaron que la similitud genética de la mayoría de los ejemplares no parece estar relacionada con su cercanía geográfica. Así, los ejemplares ch5 y ch6 de Catemaco y San Andrés Tuxtla estuvieron en subgrupos diferentes, y los ejemplares ch10 y A7, de Cosoleacaque y Apazapan, estuvieron íntimamente relacionados genéticamente. El hecho de que el análisis de similitud genética haya agrupado ejemplares recolectados desde el municipio de Emiliano Zapata hasta Las Choapas podría

group made up of three main subgroups related by their genetic similarity (Figure 2).

The subgroup made up of ch5, ch7, NB-1, EZ-10, G2, C3 and EZ-2 concentrated specimens collected in the center of the state, except ch5 and ch7 from the municipalities of Catemaco and Huayepan de Ocampo. The subgroup made up of ch6, ch16, ch18, ch10, A7, ch9, ch5, and ch14 grouped specimens collected from Apazapan (A7) in the center of the state, up to Moloacán (ch9), one of the most southerly locations. The other subgroup included specimens ch8 from Las Choapas, and ch13 from Playa Vicente (Figure 2).

Cluster analysis also revealed that the specimens in the same subgroup share no morphological features, such as the shape of the fruit or seed size. This is the case of the fruits of the sample C3 with seeds extremely small or absent and the genetically more similar specimen (EZ-2) with normal seeds, or the specimen ch8 with round fruits in contrast to those of ch13 that are oval. These results indicated that the genetic similarity of most individuals appears to be unrelated to their geographical proximity. Therefore, specimens ch5 and ch6 from Catemaco and San Andrés Tuxtla were in different subgroups, and ch10 and A7 from Cosoleacaque and Apazapan were closely related genetically. The fact that the genetic similarity analysis has grouped specimens collected from the municipality of Emiliano Zapata up to Las Choapas could be due to a gene flow in the species, given by nearby commercial plantations. However, to test this hypothesis research is required on plantations in these areas. Similarity between geographically distant units may be also due to the management of the species along the years. The interest in exploiting this crop for commercial use in the central and southern state of Veracruz may have caused the transfer of the species by farmers looking for new areas of production or residents that have done the same for consumption reasons.

The length of the branches of the phylogram is proportional to the variation between specimens and showed that the greatest variation is in conserved areas, such as specimen ch7 collected in a tropical forest relict. Besides, other suitable candidates for plant genetic management are G2, ch2, ch6, ch8 and ch13. These trees were also among the older or those collected in areas that are visibly better preserved.

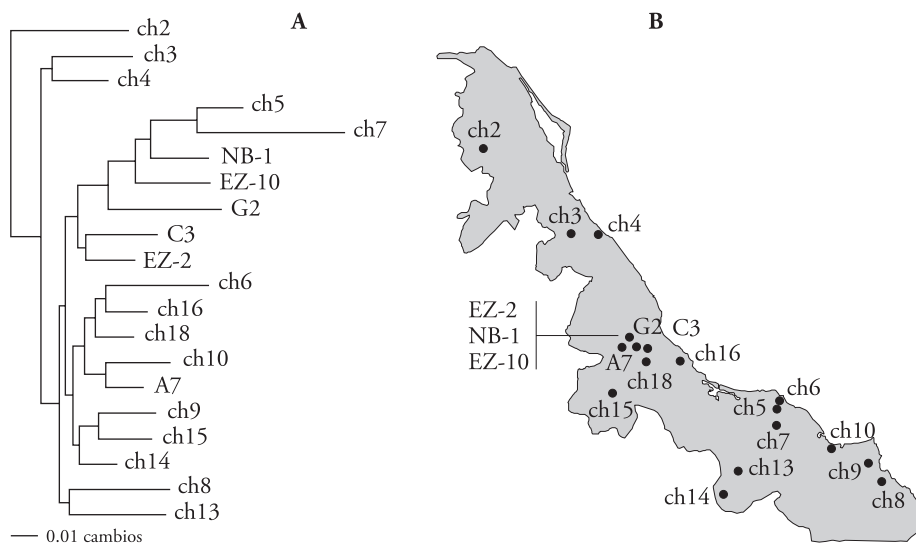


Figura 2. A) Filograma con el agrupamiento y el grado de divergencia entre ejemplares de *Manilkara zapota*. La escala es proporcional a la cantidad de cambios encontrados entre ejemplares. B) Sitios de recolecta de los ejemplares.

Figure 2. A) Phylogram with clustering and the degree of divergence between specimens of *Manilkara zapota*. The scale is proportional to the amount of changes found among specimens. B) Collection sites of the specimens.

explicarse por un flujo génico en la especie, dado por plantaciones comerciales cercanas. Sin embargo, es necesario estudiar las plantaciones de esas zonas para probar esta hipótesis. La similitud entre ejemplares geográficamente distantes, también puede explicarse por el manejo de la especie a lo largo de los años. El interés en explotar este cultivo para uso comercial en las zonas centro y sur del estado de Veracruz, pudo provocar el movimiento de la especie por agricultores en busca de nuevas áreas de producción o por los pobladores que la han trasladado para su consumo.

La longitud de las ramas del filograma es proporcional a la variación entre los ejemplares y mostró que la mayor variación se encuentra en áreas conservadas, es caso del ejemplar ch7 recolectado en un relicto de bosque tropical. Además, G2, ch2, ch6, ch8 y ch13 son candidatos adecuados para manejo fitogenético. Estos árboles también estaban entre los de más edad o se recolectaron en zonas visiblemente mejor conservadas.

CONCLUSIONES

El análisis genético de 20 ejemplares de *M. zapota*, basado en siete loci de microsatélites, reveló las afinidades genéticas de ejemplares silvestres o alejados de plantaciones comerciales en el estado de

CONCLUSIONS

The genetic analysis of 20 specimens of *M. zapota*, based on seven microsatellite loci revealed genetic affinities of wild specimens or that are away from commercial plantations in the state of Veracruz. The microsatellites used have potential for their application in other species of the genus. The use of various indices to assess the level of polymorphism, and the discrimination capacity of similarity analysis showed the potential of microsatellites to identify individuals with greater genetic variation. In order to preserve the germplasm of this species the research should continue, and for expanded genetic configuration of *M. zapota*, further information is required increasing the number of specimens and loci.

—End of the English version—



Veracruz. Los microsatélites usados tienen potencial para aplicarse en otras especies del género. La utilización de diversos índices para evaluar el nivel de polimorfismo y la capacidad de discriminación de

los análisis de similitud, mostró el potencial de los microsatélites para identificar ejemplares con mayor variación genética. Para preservar el germoplasma de esta especie debe continuar la investigación, y para la configuración genética mayor de *M. zapota* se requiere ampliar la información genética aumentando el número de ejemplares y loci.

AGRADECIMIENTOS

A la Línea Prioritaria de Investigación No. 2 Agroecosistemas Tropicales del Colegio de Postgraduados, por el apoyo otorgado para la realización de las recolectas y al Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Ecología, A. C., por la infraestructura para la realización de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Awise, J. C. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Sinauer Associates, Massachusetts. 684 p.
- Azevedo, V. C. R., C. C. Vinson, and A. Y. Ciampi. 2005. Twelve microsatellite loci in *Manilkara huberi* (Ducke) Standl (Sapotaceae), an Amazonian timber species. *Mol. Ecol.* 5: 13-15.
- Bayuelo-Jiménez, J. S., e I. Ochoa. 2006. Caracterización morfológica del sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacquin) H. E. Moore & Stearn] del centro occidente de Michoacán. *Rev. Fitotec. Mex.* 29: 9-17.
- Benbouza, H., J. Jean-Marie, B. Jean-Pierre, and M. Guy. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10: 77-81.
- Chapuis, M., and A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24: 621-631.
- Dakin, E. E., and J. C. Awise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93: 504-509.
- Dempster, A. P., N. M. Laird, and D. B. Rubin. 1977. Maximum Likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J. Royal Statistical Soc. Ser. B (Methodological)* 39: 1-38.
- González H, D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Rev. Mex. Micol.* 14: 1-21.
- González, D., and A. P. Vovides. 2002. Low intralinesage divergence in *Ceratozamia* (Zamiaceae) detected with nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA *trnL-F* non-coding region. *Syst. Bot.* 27: 654-661.
- Goudet, J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3.2. Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Govaerts, R., D. G. Frodin, and T. D. Pennington. 2001. World Checklist and Bibliography of Sapotaceae. Royal Botanic Gardens, Kew. 372 p.
- Grimaldi, M. C., and B. Crouau-Roy. 1997. Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequences. *J. Mol. Evol.* 44: 336-340.
- Heaton, H. J., R. Whitkus, and 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. *Mol. Ecol.* 8: 627-632. IPGRI (The International Plant Genetic Resources Institute). 2001. Regional Report Americas 1999-2000, Rome. 32 p.
- Jones, A. G., and W. R. Ardren. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol. Ecol.* 12: 2511-2523.
- Kosman, E., and K. J. Leonard. 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Mol. Ecol.* 14: 415-424.
- Maruyama, T., and P. A. Fuerst. 1984. Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. I. Allele numbers when populations evolve from zero variability. *Genetics* 108: 745-763.
- Meghala, R., K. V. Ravishankar, A. Lalitha, and A. Rekha. 2005. Genetic diversity of Indian sapota (*Manilkara zapota*) cultivars characterized by RAPD markers. *Plant Genet. Res. Newsletter* 142: 43-46.
- Morrone, J. J. 2001. Biogeografía de America Latina y el Caribe. Vol. 3. Manuales & Tesis Sociedad Entomológica Aragonesa. Zaragoza. 148 p.
- Nei, M., and W.-H. Li. 1976. The transient distribution of allele frequencies under mutation pressure. *Genet. Res.* 28: 205-214.
- Nei, M., and W.-H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Academy Sci. USA* 76: 5269-5273.
- Oddou-Muratorio, S., G. G. Vendramin, J. Buiteveld, and B. Fady. 2009. Population estimators or progeny tests: what is the best method to assess null allele frequencies at SSR loci? *Conserv. Genet.* 10: 1343-1347.
- Perrier, C., F. Grandjean, J. L. Gentil, and C. Cherbonnel. 2011. A species-specific microsatellite marker to discriminate European Atlantic salmon, brown trout, and their hybrids. *Conserv. Genet. Res.* 3: 131-133.
- Phillips, W., H. Rodríguez, y P. Fritz. 1995. Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo. CATIE, Turrialba. 183 p.
- Pinhero, F., C. Palma-Silva, F. Barros, and S. Cozzolino. 2009. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*. *Genet. Mol. Biol.* 32: 337-339.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* 8: 103-106.
- Serna-Lagunes, R., D. González, y P. Díaz-Rivera. 2012. Variabilidad genética de poblaciones en cautiverio de *Crocodylus moreletii* (Crocodylia: Crocodylidae) usando marcadores de microsatélites. *Rev. Biol. Trop.* 60: 425-436
- Sun, H. S., and B. W. Kirkpatrick. 1996. Exploiting dinucleotide microsatellites conserved among mammalian species. *Mamma. Genome* 7: 128-132.
- Swenson, U., and A. A. Anderberg. 2005. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). *Cladistics* 21: 101-130.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods, v. 4 beta 10). Sinauer Associates, Massachusetts.

- Tautz, D., M. Trick, and D. A. Dover. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652-656.
- Xin-hua, H., G. Yong-ze, L. Yang-mi, and O. Sh-jin. 2007. Assessment of the genetic relationship and diversity of mango and its relatives by cpISSR marker. *Agric. Sci. China* 6: 137-142.
- Yeh, F. C., R. C. Yang, and T. Boyle. 1999. POPGENE version 1.32: Microsoft Windows -based freeware for population genetic analysis, quick user guide. Center for International Forestry Research. University of Alberta, Canada.