

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

**INFERENCIA FILOGENÉTICA EN *Persea*
BASADA EN SECUENCIAS DE LA REGIÓN
TrnL-TrnF DE cpDNA**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
AGRÍCOLA**

P R E S E N T A

CECILIA CABRERA HERNÁNDEZ

Chapingo, Estado de México, Mayo de 2008

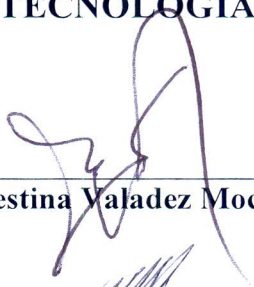


**“INFERENCIA FILOGENÉTICA EN *Persea* BASADA EN SECUENCIAS DE
cpDNA DE LA REGIÓN *TrnL-TrnF*”**

Tesis realizada por **CECILIA CABRERA HERNÁNDEZ**, bajo la dirección de la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, asesorada y aprobada por el comité indicado y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



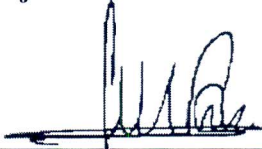
Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR:



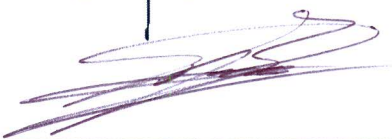
Dr. Alejandro F. Barrientos Priego

ASESOR:



Dr. Miguel Angel Serrato Cruz

ASESOR:



M. C. Juan Carlos Reyes Alemán

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapíngo y al Departamento de Fitotecnia., Por la formación profesional recibida.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por la dirección de este trabajo y sus valiosas aportaciones y enseñanzas.

A mis asesores, los Doctores: Alejandro F. Barrientos Priego, Miguel Angel Serrato Cruz y Juan Carlos Reyes Alemán por su valioso apoyo y colaboración para la culminación de este trabajo.

Al programa Red Aguacate SINAREFI (Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos) SNICS (Sistema Nacional de Investigación y Certificación de Semillas) y SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación) por su apoyo económico para la realización de esta investigación.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la ayuda económica para poder concluir la presente tesis.

Al Dr. J. Enrique Rodríguez Pérez Coordinador del Programa de Posgrado de Horticultura por su valioso apoyo para la culminación de esta investigación.

Al Dr. Alfonso Mendez Tenorio profesor-investigador de la Escuela Nacional de Biología del Instituto Politécnico Nacional por su valiosa ayuda en el manejo de los programas bioinformáticos para los análisis de la presente investigación.

A los compañeros de posgrado con quienes compartí gratos momentos, en especial a mis compañero de generación en la Maestría en Biotecnología Agrícola, Ismael López y Carmen Medina.

A las y los chicos que realizaron su servicio social o estancia profesional en el laboratorio y que participaron en este proyecto.

A José Ezequiel Guzmán, por tu ayuda constante, tu compañía en todo momento,
sobre todo cuando más se necesita contar sé que puedo contar contigo...

Hay hombres que luchan un día

y son buenos,

Hay hombres que luchan un año

y son mejores.

Hay quienes luchan muchos años

y son muy buenos,

Pero hay quienes luchan toda la vida

Esos son los imprescindibles

Bertolt Brecht

DATOS BIOGRÁFICOS

DATOS PERSONALES

Nombre: Cecilia Cabrera Hernández

Fecha de nacimiento: 24 de Octubre de 1978

Lugar de nacimiento: Cuernavaca, Morelos.

Profesión: Ingeniera Hortícola.

CURP: CAHC781024MMSBRC05

Cédula profesional: 5330400

FORMACIÓN ACADEMICA

1985-1991: Escuela Primaria Federal “Veinte de Noviembre” Cuernavaca,
Morelos.

1991-1994: Escuela Secundaria Federal “Ricardo Flores Magón”, Cuernavaca
Morelos

1994-1998: Preparatoria Diurna No. 2 “Antonio L. Mora del Castillo”.
Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca,
Morelos.

1999-2004: Ingeniera Hortícola, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
Cuernavaca, Morelos.

2006-2008: Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola Universidad
Autónoma Chapingo, Texcoco, México.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Antecedentes	3
2.1.1 Biodiversidad: el concepto y sus implicaciones en biotecnología.	3
2.1.2 Consideraciones básicas sobre Evolución.	6
2.1.3. El proceso de Especiación como promotor de diversidad y sus características.	8
2.2 Familia Lauraceae: el género <i>Persea</i> y especies afines.	12
2.2.1 Consideraciones generales y taxonómicas de la familia Lauraceae.	12
2.2.2 Morfología de la familia Lauracea.	14
2.2.3 Especies con importancia antropocéntrica que integran la familia Lauracea.	14
2.2.4 Género <i>Persea</i> : características taxonómicas del aguacate y sus relaciones filogenéticas.	15
2.2.5 Cariotipo del género <i>Persea</i>	19
2.2.6 Origen y distribución del subgénero <i>Persea</i>	19
2.3 Marcadores morfológicos y moleculares.	21
2.3.1. Región ITS (Espacios Transcritos Internos) del DNA ribosomal (rnDNA): generalidades.	23
2.3.2 Características del DNA ribosomal como marcador molecular.	25
2.3.3 Marcadores moleculares de DNA extranuclear: El caso de DNA de cloroplastos.	27

2.3.4 Utilización de marcadores morfológicos y moleculares con fines filogenéticos utilizados dentro del género <i>Persea</i> .	29
2.4 Consideraciones generales sobre la extracción de DNA con fines de caracterización molecular.	32
2.5 Secuenciación de DNA: electroforesis capilar.	33
2.6 La Bioinformática y su utilidad en filogenia.	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 Material vegetal.	38
3.2 Extracción de DNA: características de muestras vegetales para la extracción y procedimiento.	38
3.2.1 Soluciones químicas para extracción de DNA.	39
3.2.2 Determinación de la calidad y concentración de DNA.	41
3.3 Protocolo para obtención de la región ITS de DNA ribosomal con iniciadores ITS4 y ITS4 e ITS5 y Laur1, utilizando tres diferentes enzimas Taq. polimerasa.	42
3.3.1 Iniciadores utilizados para la región ITS.	42
3.3.2 Mezcla de reacción.	43
3.4 Protocolo para la obtención de DNA y amplificación de la región trnL-F en DNA de cloroplasto.	44
3.4.1 Mezcla de reacción.	45
3.4.2 Condiciones de amplificación de la región <i>TrnL-TrnF</i> de DNA de cloroplastos	45
3.4.3 Secuenciación de la región <i>TrnL-TrnF</i> de DNA de cloroplastos.	46
3.4.4 Alineamiento de secuencias en el GenBank	46
3.4.5 Alineamiento múltiple de secuencias, análisis de distancias genéticas y filogenéticos.	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1 Extracciones de DNA.	48

4.2 Amplificación con iniciadores ITS4 e ITS5.....	50
4. 3 Amplificaciones con los iniciadores ITSB y Laur1.....	51
4.4 Resultados del protocolo para la obtención del fragmento <i>TrnI-f</i> de DNA de cloroplastos con iniciadores TrnI y TrnIc.....	53
4.5 Secuenciación del fragmento <i>TrnL-TrnF</i> del DNA de cloroplastos.	54
4.5.1 Resultado del análisis de secuencias en fragmentos <i>TrnL-TrnF</i> de DNA de cloroplastos.....	54
V. CONCLUSIONES	59
VI. PERSPECTIVAS	60
VII. LITERATURA CITADA	61
VIII. ANEXO	75
8.1 Alineamiento de secuencias	76

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Nombre y origen de las accesiones consideradas para la investigación.....	41
Cuadro 2. Nombre y secuencias de iniciadores.	43
Cuadro 3. Reactivos y volumen para mezcla para reacción, utilizando iniciadores ITS4 e ITS5 y Laur1 e ITSB con diferentes enzimas <i>Taq</i> Polimerasas.....	43
Cuadro 4. Condiciones de PCR para los ensayos con los diferentes tipos de <i>Taq</i> Polimerasas.....	44
Cuadro 5. Nombre y secuencia de iniciadores utilizados para la amplificación de la región del DNA de cloroplasto.	44
Cuadro 6. Requerimientos para mezcla de reacción con iniciadores <i>trnI</i> y <i>trnLc</i> para DNA de cloroplastos.....	45

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. “Biodiversidad”.	5
Figura 2. . Distribución mundial de la flamilla Lauraceae. Familia que agrupa géneros y especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales.	13
Figura 3. Distribución geográfica de las tres razas de aguacate.	20
Figura 4. Organización de la región ITS del DNA ribosomal. Cada bloque o arreglo consiste en cientos o miles de copias de unidades individuales de rnDNA (Buckler <i>et al.</i> , 1997) compuestas por las secuencias contiguas 18S, ITS1, 5.8S, ITS 2, 26S.	24
Figura 5. Organización del genoma del cloroplasto del arroz (<i>Oryza sativa</i>).	28
Figura 6. Electroforesis capilar para secuenciación de DNA.	35
Figura 7. Diagrama del proceso de obtención de zonas conservadas del DNA en <i>Persea</i> para su secuenciación.	47
Figura 8. Gel de calidad de DNA de los diferentes materiales utilizados utilizando el protocolo de Kahanuja <i>et al.</i> (1999): 1 (Olanca), 2 (Tepetl), 3 (<i>P. lingue</i>), 4 (Palestre), 5 (Martín Grande), 6 (<i>P. floccosa</i>) 7 (Ixtapan del oro), 8 (<i>B. miersii</i>) 9 (<i>Marichal</i>), 10 (<i>P. cinerascens</i> La flecha señala el DNA esperado.	49
Figura 9. Gel de calidad de extracción con kit comercial. (1) Hass, (2) Antigua, (3) <i>P. shiedeana</i> , (4) Vargas, (5) Tepetl, (6) Cima de copey, (7) Olanca, (8) Tantima, (9) Nubes, (10) <i>P. nubigena</i> , (11) Fredy, (12) <i>P. steyermarkii</i> , (13) <i>B. miersii</i> , (14) Sn Cristobal Mercado, (15) <i>P. parvifolia</i> , (16) <i>P. gigantea</i> , (17) Martin Grande, (18) Lino ixtapan, (19) Marichal, (20) <i>P. rigens</i> , (21) <i>B. anay</i> , (22) Nubes, (23) Tetiz, (24) Yaruche, (25) <i>P. lingue</i> , (26) <i>P. chamisonis</i> , (27) <i>P. shiedeana</i> . La flecha señala el DNA esperado.	49

Figura 10. Productos de amplificación con diferentes temperaturas de alineamiento. De izquierda a derecha, panel A (55 °C): (1) Olanca, (2) Tepetl, (3) Vargas, (4) *P. lingue*, (5) Palestre, *P. cinerascens*; panel B (58 °C): 1) Olanca, 2) Tepetl, 3) Vargas, 4) *P. lingue*, 5) *P. cinerascens* y panel C (60 °C): (1) *B. miersii*, (2) Marichal, (3) *P. lingue*, (4) *P. cinerascens*, (5) *P. steyermarkii*, (6) *P. cinerascens*. El MPM es de 100 pb de Fermentas. La flecha señala el fragmento esperado..... 50

Figura 11. Productos de amplificación con los iniciadores ITSB y Laur1 utilizando MPM 1 kb. De izquierda a derecha: (1) Yaruche, (2) *P. cinerascens*, (3) Tepetl, (4) Martín Grande, (5) *P. lingue*, (6) Martín Grande, (7) Tepetl, (8) *P. steyermarkii*, (9) Vargas (10) *P. steyermarkii*, (11) Tantima, (12) *B. miersii*, (13) *P. lingue*, (14) *P. cinerascens*. Los fragmentos esperados se señalan con flechas. 51

Figura 12. Productos de amplificación de ITS utilizando el Kit Advantage® - GC 2 PCR. De izquierda a derecha: 1) Fredy, 2) Tetiz, 3) Cima Coppey, 4) Tochimilco, 5) *P. schiediana*, 6) San Cristóbal Mercado 7) *P. floccosa*, 8) *B. anay* 9) Tepetl 10) *B. miersii* 11) Antigua, 12) Olanca, 13) Tantima, 14) *P. cinerascens*, 15) Marichal, 16) Yaruche, 17) Palestre, 18) *P. sp*, 19) Vargas, 20) Nubes, 21) Lino Ixtapan. Nótese que en las muestras 4,5 9,10 y 11 solo se aprecia una sola banda; sin embargo en el resto se aprecian dos bandas de pesos moleculares de 500 y 700 pb. El MPM es de 1kb de Fermentas. 52

Figura 13. Productos de amplificación del fragmento *TmL-F* en DNA de cloroplastos de algunos de los materiales considerados. De izquierda a derecha: 1) Olanca, 2) *B. anay*, Fredy, 3 y 4) San Cristóbal Mercado, 5) *P. schiedeana*, 6) Olanca, 7) Cima de Coppey, 8) Fredy, 9) Tetiz, 10 y 11) Ixtapan de Oro, 12) Olanca, 13) Tochimilco, 14) Vargas, 15) *B. anay*, 16) Martín Grande, 17) *P. steyermarkii*, 18) Olanca, 19) *P. cinerascens*, 20) Tepetl, 21) Yaruche, 22) Lino Ixtapan, 23) Nubes, 24) Vargas, 25) *P. sp*. 26)

Marichal, 27) <i>P. chamisonis</i> . MPM de 1Kb de Fermentas. El fragmento esperado se señala con flechas.	54
Figura 14. Agrupamiento filogenético de 23 representantes del género <i>Persea</i> con base a la comparación de secuencias del fragmento <i>TmL-TmF</i> del cpDNA.	55

Inferencia filogenética en *Persea* basada en secuencias de la región *TrnL-TrnF* de cpDNA

Cecilia Cabrera Hernández¹ y Ernestina Valadez Moctezuma²

RESUMEN

El género *Persea* esta conformado por los subgéneros, *Persea* y *Eriodaphne*. El aguacate pertenece al subgénero *Persea* y presenta tres razas: Antillana, Guatemalteca y Mexicana. Actualmente existe controversia sobre la taxonomía de variedades cultivadas y especies estrechamente relacionadas. Debido a sus complejos patrones evolutivos, el subgénero *Persea* contiene genotipos con afinidades taxonómicas inciertas. En este estudio, se secuenció y comparó la región *TrnL-F* del cpDNA en 23 materiales de género con el objetivo de inferir sus posibles relaciones. El análisis filogenético fue congruente con la clasificación actual, porque se separaron sin dificultad los subgéneros, *Persea* y *Eriodaphne* a través de sus respectivos representantes. Algunos materiales del subgénero *Persea* se agruparon de manera intermedia, lo que supone un origen compartido entre las razas de aguacate. Se intentó amplificar la región ITS del DNA ribosomal nuclear, sin obtener el fragmento de interés en la mayoría de los materiales considerados en el estudio.

Palabras clave: Género *Persea*, DNA ribosomal, DNA de cloroplastos, análisis filogenéticos.

Palabras clave: aguacate, secuenciación, DNA de cloroplastos, análisis filogenéticos.

¹ Tesista, Maestría en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km. 38.5, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230. Tel. (595) 9521500. Ext. 5244. correo electrónico: zantedeshia_flor@yahoo.com.mx.

² Director de Tesis.

Phylogenetic inference in *Persea* using *TrnL-TrnF* region cpDNA

sequence data

Cecilia Cabrera Hernández¹ y Ernestina Valadez Moctezuma²

ABSTRACT

The *Persea* genus is composed with the subgenera *Persea* and *Eriodaphne*. The avocado belongs to the subgenus *Persea* and contains three races: West Indian, Guatemalan, and Mexican. The current taxonomy of cultivated varieties and other closely related species is controversial, because of the evolutionary complex patterns. The subgenus *Persea*, has genotypes with uncertain taxonomical affinities. This study was conducted in order to sequence and compare the *TrnL-TrnF* region from cpDNA from 23 materials belonging to the *Persea* genus and to infer their relationships. The phylogenetic analysis were consistent with the current classification because *Persea* and *Eriodaphne* subgenera were clearly separated through respective samples. Some materials from *Persea* subgenus were located into an intermediate group, supposing a common origin between the three races of avocado. In addition, we tried hard ITS amplification region from rDNA without the expected results in most part of the considered samples.

Key words: avocado, sequencing, chloroplast DNA, phylogenetic analysis.

¹ Student. Master in Agricultural Biotechnology, Chapingo Autonomous University, Chapingo, Texcoco, state of Mexico, Km. 38.5 Carretera Mexico-Texcoco. C.P. 56230. Tel: 01(595) 9521500 ext. 5244 zantedeshia_flor@yahoo.com.mx.

² Tutor.

I. INTRODUCCIÓN

La utilización de biotecnologías para la conservación, conocimiento y utilización racional de la biodiversidad se han convertido en la actualidad en acciones de importancia estratégica para la humanidad (Nuñez *et al.* 2003). El conocimiento de la biodiversidad de México mediante dichas herramientas debe ser una tarea prioritaria para los centros de enseñanza superior pública e investigación nacional. El presente trabajo pretende, comprender las relaciones filogenéticas de aguacate, mediante secuenciación de zonas conservadas de DNA que son de gran utilidad en estudios de filogenia y evolución. El aguacate tiene su centro de origen en Centro y Sudamérica debido a que ahí se localiza la mayor diversidad del taxón, al igual que otras muchas especies de importancia agrícola (Becerra *et al.* 2000). La importancia económica que el aguacate ha tomado en las últimas décadas, ha dado lugar a estudios sobre su diversidad genética y mejoramiento, pero la estimación de la diversidad genética del género y genealogía entre sus variedades botánicas, ha sido complicada, lo cual se ve relacionado con los orígenes de su domesticación y de la hibridación entre especies (Mijares *et al.* 1998), que en ocasiones provoca que dichas relaciones presenten patrones complejos. Se puede resumir que la historia del aguacate cultivado ilustra la complejidad de la evolución común en muchas plantas perenes (Clegg *et al.* 1993).

Desde el punto de vista agronómico, la caracterización de germoplasma se ha basado fundamentalmente en características de alta y baja heredabilidad medidas a través del fenotipo, sin embargo las principales limitantes de este

tipo de caracterización son la influencia ambiental, el tiempo requerido para la colecta de datos y el reducido número de genes involucrados en dichas características (Becerra *et al.* 2000), el rápido desarrollo de técnicas en biología molecular permite eliminar la influencia ambiental y evaluar con mayor certeza la diversidad genética y su evolución. Actualmente, técnicas moleculares más completas como la secuenciación y comparación de zonas conservadas de DNA, se están empleando para resolver problemas evolutivos, de diversidad genética y filogenia, algunas de las zonas y genes conservados que se localizan en el DNA nuclear; así como en zonas del DNA en el cloroplasto y mitocondrias.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

2.1.1 Biodiversidad: el concepto y sus implicaciones en biotecnología.

La biodiversidad se define como la variación existente dentro de la base hereditaria en todos los niveles de organización, desde genes en una población local o especie, hasta las especies que componen la parte viva de los múltiples ecosistemas del mundo (Figura 1) (Wilson, 1997). En los últimos años, la preocupación por la conservación de la biodiversidad se ha convertido en un “paradigma” de lo que se tiene y se está perdiendo de manera irreversible (Halffer y Ezcurra, 1992). Generalmente las expresiones ecologistas se refieren a la riqueza en especies (“diversidad alfa”), pero la diversidad también existe en lo que denominamos especies. La presencia de distintos alelos para cada gen (variación), es primordial para el proceso evolutivo. Así mismo, la biodiversidad se manifiesta en la heterogeneidad al interior de un ecosistema (“diversidad beta”), así como la heterogeneidad a nivel geográfico (“diversidad gamma”), (Bloch, 2006). Sin embargo, el panorama actual muestra una creciente degradación y agotamiento de los sistemas biológicos y de su diversidad (Nuñez *et al.*, 2003). Lo que es consecuencia, en gran medida, de las estrategias que los seres humanos han impulsado para convertir ecosistemas complejos en ecosistemas simples poniendo en peligro la estabilidad de los procesos biofísicos y desencadenando lo que se ha dado por llamar, “la crisis de la biodiversidad” (Toledo, 1994). Paralelamente al aumento de las presiones

humanas en constante crecimiento y al desarrollo de la agricultura, se ha ocasionado la rápida destrucción de la biodiversidad local y regional en los sistemas agrícolas, despreciando y desplazando a la flora y fauna silvestre como un recurso natural, todo esto además articulado a otros factores que amenazan la biodiversidad, como la alternación y sobreexplotación de especies y hábitats, la introducción de especies exóticas y la modificación de condiciones ambientales (Leemans, 1999), esto implica la extinción de un creciente número de especies de plantas y animales. Se considera que en el año 2050 una de cada cuatro de las plantas mas evolucionadas se habrá probablemente extinguido antes de haberse podido explorar y utilizar adecuadamente, entre otras, sus propiedades medicinales (Bloch, 2006). Sin embargo, la influencia que el hombre ha tenido sobre los ecosistemas no debe de verse como algo enteramente negativo, sino también, como el hecho de que la diversidad biológica ha aumentado debido a la domesticación de plantas y animales (McNeely *et al.* 1990). Así pues, la biodiversidad resulta de patrones ecológicos y evolutivos irrepetibles (Jefries, 1997).

En las ultimas décadas del siglo XX y lo que va del XXI, la biodiversidad parece haberse convertido en una nueva herramienta estratégica, en especial con la aplicación de la biotecnología, esta adquiere relevancia geopolítica al convertirse en una nueva fuente de riqueza en disputa con países desarrollados y sus capitales empresariales, por lo que las regiones que concentran la biodiversidad del planeta, conocidas como regiones de “megadiversidad”, son las más importantes para las industrias biotecnológicas. Enfocada así, la biodiversidad se puede considerar una ventaja para los países en vías de

desarrollo, pero sólo en medida en que estos sepan valorar, proteger y aprovecharla en forma sustentable. La instrumentación de la biodiversidad para su uso en biotecnología ha abierto la posibilidad, entre otros, de alterar el sistema alimenticio, la medicina, la industria, las armas, además del sistema jurídico internacional y del equilibrio ecológico. Es decir la biodiversidad se ha transformado ya en un poderoso recurso empresarial y político además del genético (Bloch, 2006).



Figura 1. “Biodiversidad”.

2.1.2 Consideraciones básicas sobre Evolución.

La evolución, para Dobzhansky (1982), es un hecho histórico completamente establecido, él menciona que la evolución es ante todo un proceso genético, y la genética de poblaciones es la disciplina biológica que suministra los principios teóricos de la evolución. Sin embargo, para Mayr (1997), la evolución no es solamente un cambio en la frecuencia genética sino una mejor respuesta de la capacidad de adaptación. La evolución es la transformación hereditaria de los organismos a través de las generaciones y las especies, por cambios en el material genético. Dado que los organismos interactúan con su ambiente, los cambios de éste influyen directa o indirectamente en el curso de la evolución (Myers y Knoll, 2001). Para Stebbins (1999), la evolución es un proceso de dos pasos que requiere de la variación genética inicial dentro de las poblaciones, así como de la modelación de esta variación vía la recombinación del gen y de la selección natural. Para Reznick (2001) y Sheldon (2000), la evolución es la teoría que explica la diversidad de los seres vivos, se ocupa de los mecanismos que producen cambios en ellos y del mismo cambio, así como la repercusión que para los organismos suponen estos cambios.

Por otro lado y al mismo tiempo, poblaciones y especies son las unidades básicas de la evolución según la teoría de evolución biológica. El cambio evolutivo se realiza mediante: mutaciones genéticas, cambios en la estructura y número de los cromosomas, mutaciones de los portadores extranucleares de la herencia, recombinación, selección, aislamiento, hibridación y alteraciones casuales de las frecuencias génicas en poblaciones pequeñas o por

fluctuaciones del tamaño de la población (Cupples, 2001; Johnston, 2001; Ennis, 2000). En realidad, la mutación es la fuente principal de toda nueva variación genética y sin ella no habría sido posible la evolución (Johnston, 2001). La causa principal de variabilidad que hace posible el proceso evolutivo de la vida son las mutaciones, que no son sino alteraciones espontáneas del material hereditario (Grant y Shoemaker, 2000; Harrison, 2001).

Otro aspecto importante es la variabilidad genética, que se puede definir como: "la habilidad genética para variar", y por lo tanto, es tener la capacidad para responder tanto a variaciones de índole ambiental como a cambios en los objetivos de selección, por lo que la variabilidad genética constituye la base del progreso genético (Rochambeau *et al.* 2000). En una especie determinada, la variabilidad puede representarse de tal modo que las diferencias entre individuos sean graduales y en este caso se habla de variabilidad continua y estas diferencias pueden ser debidas a factores ambientales que solo afectan al fenotipo y que por tanto no son heredables (Burd, 2000). La variabilidad discontinua, en cambio, es brusca y se debe a cambios (mutaciones) que no responden a las leyes de la herencia, es decir, que aparecen de forma espontánea en el seno de una población (Reeve y Sherman, 1999).

La variación es la materia prima sobre la cual la selección actúa (Ayala *et al.*, 2000). El resultado, a través del tiempo de la interacción de ambos procesos es la evolución y "la variación hereditaria" es el producto de la mutación, el paso de material genético entre poblaciones y la recombinación de factores genéticos, unidos con una selección que moldea el patrón de la variación (Barton y Keightley, 2002; Reznick, 2001). El azar puede provocar cambios en

frecuencias génicas de poblaciones pequeñas y cambiar drásticamente el pool génico, sin embargo, en una población muy grande, los eventos al azar no son importantes y cuando se presenta un aumento o disminución en la frecuencia de un gen en generaciones sucesivas de una población que resulta del azar, se llama deriva génica (Ayala *et al.*, 2000).

Otro proceso evolutivo es la migración, que se da en dos sentidos: emigración e inmigración, es decir, cuando los individuos salen o llegan a una población permitiendo el cambio evolutivo por el movimiento de genes hacia dentro o hacia fuera de la misma, llamando a este fenómeno, flujo génico (Mousseau y Olvido, 2001). La selección natural es un aspecto básico de la teoría de la evolución, la cual es consecuencia de la reproducción diferencial de unas variantes respecto a otras, es decir, de la selección natural que actúa sobre los dos principales recursos de la variación genética: la mutación y la recombinación; esta acción de la selección natural sobre la variabilidad hace posible que sobrevivan individuos en la población y que interaccionen de una manera más eficiente con el ambiente (Reznick, 2001).

2.1.3. El proceso de Especiación como promotor de diversidad y sus características.

De manera general, la especiación es definida como la formación de dos o más nuevas especies a partir de una especie ancestral (Wood y Rieseberg, 2001). Lo anterior, mediante el desarrollo de nuevas, diferentes combinaciones génicas y debido a la capacidad de responder a factores ambientales como se ha mencionado. Para que se inicie un proceso de especiación se requiere un

suministro de variaciones genéticas, estas tienen una ocurrencia de carácter universal en el mundo orgánico y se representa en tres niveles: el polimorfismo, la variación racial local y la variación geográfica. La recombinación génica es a su vez la fuente más importante de variaciones hereditarias en una especie con reproducción sexual; las variaciones hereditarias constituyen la materia prima necesaria para la respuesta de la especie a las condiciones ambientales heterogéneas o cambiantes. Para las especies biológicas compuestas de organismos de fecundación cruzada, la especiación incluye el aislamiento reproductivo.

La especie biológica es la unidad de organización fundamental en los organismos biparentales, es decir, es la suma total de individuos que se aparean entre sí. La característica fundamental de la especie biológica es la capacidad de los individuos de intercambiar genes con éxito, o sea, cruzarse libremente y producir progenie fértil y viable; por otro lado, se tiene que la incapacidad de intercambiar genes libremente y con buenos resultados, es la característica de especies biológicas separadas (Grant, 1989). El proceso de especiación es responsable de la basta cantidad de diversidad biológica que se encuentra actualmente, sin embargo se conoce poco acerca de ella debido al largo tiempo de los procesos y a las pocas excepciones que pueden ser observadas en la naturaleza o en un laboratorio (Wood y Rieseberg, 2001).

La reestructuración del cromosoma juega un papel importante en la evolución de especies debido a como sus genomas se expresan y a los mecanismos de aislamiento reproductor (Bush, 2001). Las especies pueden surgir por dos mecanismos: la anagénesis y la cladogénesis, (Otte, 2001), en ambas, para que

existan especiación debe haber divergencia genética y aislamiento reproductivo entre dos poblaciones antes relacionadas, estos procesos pueden ocurrir de dos maneras conduciendo a la especiación alopátrica o a la especiación simpátrica.

Para Rieseberg y Ungerer (2001) la cladogénesis es el modo fundamental de especiación y responsable directa de la biodiversidad, se produce por aislamiento reproductivo de las poblaciones de una especie y las barreras reproductoras suelen ser precigóticas y postcigóticas; las primeras se refieren mecanismos de aislamiento que tienen lugar antes o durante la fecundación y las más importantes son: a) La reproducción en diferentes épocas del año; b) Los mecanismos conductuales que utilizan las especies para reconocerse entre ellas por ejemplo, los diferentes tipos de cortejo en animales, o el canto de las aves; cuya finalidad es el reconocimiento entre los individuos de la misma especie; c) La incompatibilidad de las estructuras utilizadas en el acoplamiento; d) adaptación a diferentes microambientes aunque vivan en un mismo habitat y e) cuando los gametos no reconocen los de otro, por ejemplo, los granos de polen pueden llegar al estigma de diferentes especies pero sólo pueden fertilizar óvulos de la suya propia, o de especies muy semejantes. Las barreras postcigóticas, son los abortos espontáneos, esterilidad del híbrido, muerte prematura e híbridos débiles; el aislamiento reproductor se produce mediante mecanismos de aislamiento postcigóticos, es decir, posteriores al apareamiento y formación del cigoto y por medio de mecanismos de aislamiento precigóticos, esto es, mecanismos que impiden que se llegue a formar el cigoto (Howard, 2000).

Por otro lado, la especiación alopátrica, o geográfica, es aquella que se presenta cuando las poblaciones comienzan a divergir y el flujo de genes entre ellas se restringe o se ve totalmente interrumpido como una consecuencia de la dispersión y divergencia en diferentes ambientes (Mousseau y Olvido 2001).

El aislamiento geográfico es, a menudo la primera etapa de este proceso (Howard, 2000). La separación espacial durante un largo periodo de tiempo da lugar a la aparición de novedades evolutivas en una o en las dos poblaciones (Wood y Rieseberg, 2001). La especiación simpátrica se refiere a las nuevas especies que surgen sin el aislamiento geográfico es decir, en el mismo lugar geográfico y que es el origen de dos o más especies de una sola población local (Dieckmann y Doebeli, 1999; Kondrashov y Kondrashov, 1999). Puede ocurrir cuando se genera aislamiento en el mismo sitio por rangos de distribución, ocasionando que el flujo genético sea eliminado entre las poblaciones y se forman especies nuevas (Mousseau y Olvido, 2001) por variación de nichos o por el conjunto de mecanismos que produce una o más especies nuevas a partir de una especie ancestral sin segregación geográfica de las poblaciones, o si existe alguna barrera de tipo biológico (Wood y Rieseberg, 2001).

La especiación híbrida o "recombinacional" se refiere al origen de nuevas especies vía hibridación entre especies paternas divergentes cromosómica o genéticamente y de acuerdo con los estudios de simulación realizados por Ungerer *et al.*, (1998), sugieren que este tipo de especiación es puntuado, es decir con largos períodos de estasis, en los cuales la mayoría de las especies no exhiben algún cambio direccional durante sus estancia, seguido por abruptas

transiciones en las cuales las especies paternas individuales son desplazadas rápidamente por las neoespecies híbridas (McCarthy, 1995; Ungerer *et al.*, 1998). En relación con la formación de subespecies esta se presenta cuando una población debilita su entrecruzamiento reproductor con el resto de las poblaciones de la especie, por encontrarse en periodo de especiación o cladogénesis. Esta población puede seguir dos caminos diferentes (O'Hara, 1993): 1) la población debilita sus relaciones reproductoras y posteriormente se produce una ruptura permanente entre la población y el resto de la especie. En este caso estaríamos ante un verdadero fenómeno de diferenciación, una tendencia evolutiva propia que conlleva un destino histórico concreto: la separación y formación de una nueva especie. La tendencia evolutiva propia implica la adquisición de novedades evolutivas o autopomorfías. Es una subespecie que formará una especie. 2) La población debilita sus relaciones reproductoras pero posteriormente es absorbida por el resto de la especie, con lo que la separación es sólo temporal. Sin embargo, tiene un destino histórico diferente en el que no se forma una nueva especie, debido a la falta de tendencias evolutivas propias. Es una subespecie que no formará una especie.

2.2 Familia Lauraceae: el Género *Persea* y especies afines.

2.2.1 Consideraciones generales y taxonómicas de la familia Lauraceae.

Las Laurales es un orden que comprende siete familias, este orden es parte de la radiación de las primeras plantas con flores, a ella pertenece la familia Lauraceae considerada como una de las dicotiledóneas más primitivas. Los

registros fósiles de la familia datan de 120 millones de años atrás, y se conocen 500 especies de Lauraceae desde la primera Era Cretácica terminando en el Terciario tardío, que comenzó 65 millones de años atrás (Eklund y Kvacek, 1998, Eklund, 2000). Esta familia agrupa actualmente unas 2500 a 3000 especies en aproximadamente 50 géneros distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo (Figura 2) (Cronquist, 1981; Rohwer, 1993, Chanderbali *et al.*, 2001). En México no es una familia muy diversa, pero está representada por elementos arbóreos importantes de algunas comunidades vegetales tal es el caso de los bosques mesófilos. (Sarukhán, 1968; Rzedowski, 1978). De acuerdo con el estudio taxonómico más reciente que incluye un registro de todas las especies Mexicanas Lauraceae (Allen, 1945) el número de especies y géneros del país se ubicaría en 10 géneros y 73 especies.

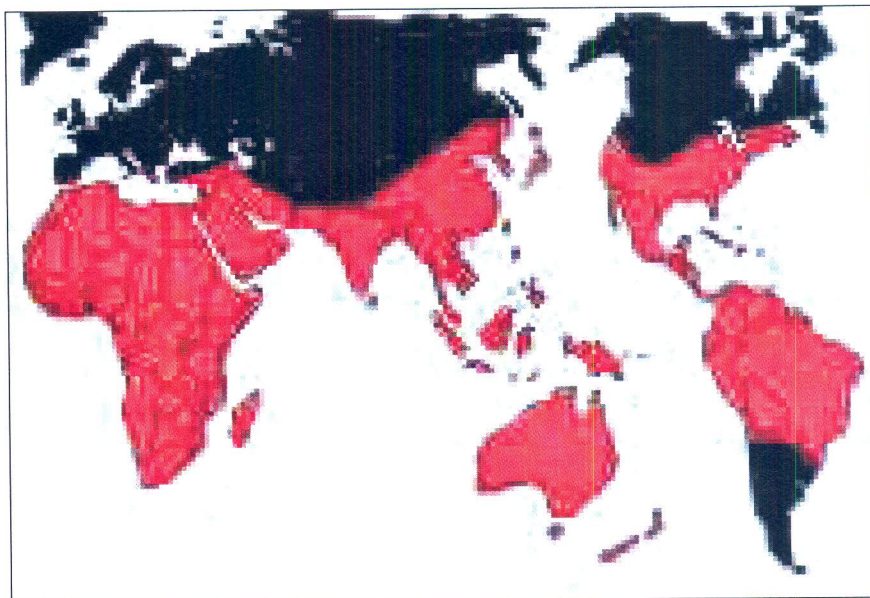


Figura 2. . Distribución mundial de la familia Lauraceae. Familia que agrupa géneros y especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales.

En comparación con otras familias, la taxonomía de esta familia es poco conocida debido en parte a su gran diversidad, dificultad de identificación y reducido trabajo taxonómico realizado en ella. Sin embargo, el reciente interés en la familia ha avanzado su conocimiento taxonómico y sistemático (Coy y Cuca, 2007).

2.2.2 Morfología de la familia Lauracea.

Árboles y arbustos integran esta familia, en su mayoría son perennifolios. Morfológicamente, tienen hojas que por lo regular son alternas, simples y coriáceas, algunas veces aparentan ser palmeadas y a menudo están provistas de glándulas, siendo su nerviación pinnada. Presentan inflorescencias axilares o casi terminales, generalmente son paniculadas y ocasionalmente racimosas. Sus flores pueden ser bisexuales o unisexuales, amarillentas o verdosas, con perianto de 4-6 piezas y 9-12 estambres los cuales están dispuestos en 3-4 verticilos de tres, a veces están reducidos a estaminodios. En cuanto a su fruto podemos decir que es drupáceo o baciforme, a veces recubierto en parte por el perianto persistiendo a modo de cúpula (Renner, 2001).

2.2.3 Especies con importancia antropocéntrica que integran la familia Lauracea.

Esta familia tiene gran importancia económica debido a que cuanta con tres recursos. Uno de ellos es el alto contenido de aceites esenciales en madera u hojas en la mayoría de sus miembros, los cuales son utilizados en perfumes, como especies y saborizantes, tales como el alcanfor y la canela. Otro es su

madera resistente la cual es una de las más valoradas en el trópico. El tercero es el Aguacate (*Persea americana*), fruta rica en aceite, domesticada en América Central hace varios cientos de años atrás, y ahora cultivada en zonas de climas tropical y subtropical alrededor del mundo. Algunos de estos integrantes que pueden verse en cultivo o de manera silvestre son especies de los géneros *Apollonias*, *Cinnamomum*, *Laurus*, *Lindera*, *Litsea*, *Neolitsea*, *Ocotea*, *Umbellularia*, *Sassafras* y *Persea* (Renner, 1997).

2.2.4 Género *Persea*: características taxonómicas del aguacate y sus relaciones filogenéticas.

El aguacate pertenece al género *Persea* (*Persea americana* Mill.), cultivo que tiene su centro de origen en México, es un frutal con importancia económica mundial, y nuestro país es uno de los principales productores del mismo. Por esto, el interés sobre su diversidad genética, que en México es de alrededor de 20 diferentes tipos relacionados con él (Barrientos *et al.* 2000). Este género contiene un número desconocido de especies (Bergh, 1992) algunos autores aseguran que son unas 80 especies reconocidas como válidas (Storey *et al.*, 1986; Zentmyer, 1991).

Se conocen tres razas de aguacate que son la raza Mexicana, Guatemalteca y la Antillana; las diferencias entre ellas, se deben principalmente a las preferencias ecológicas de los árboles (temperatura, humedad) y a características de fruto (textura y color de piel, contenido de aceite), los aguacates guatemaltecos se encuentran de manera intermedia entre los otros dos (Bergh y Ellstrand 1987; Knight 1999; Williams 1976). Así, los aguacates de

la raza Mexicana están caracterizados por una buena adaptación al clima templado, relativamente con buena tolerancia al frío, sus hojas con esencia a anís y frutos cubiertos por una delgada piel que va desde el color púrpura al negro. Por otro lado, los aguacates de raza guatemalteca son poco tolerantes al frío y son muy conspicuos principalmente porque su piel es gruesa y resistente, la cual continua verde después de la maduración. Los genotipos de la raza antillana, están adaptados a condiciones tropicales, por lo tanto, son muy sensibles al frío pero muestran tolerancia a suelos salinos y a otras condiciones edáficas adversas. El bajo contenido de aceite en la pulpa de la fruta confiere una ligera consistencia aguanosa, casi dulce, no encontrado en ninguno de las otras dos razas botánicas (Ashworth y Clegg, 2003). Este género se constituye a su vez de dos subgéneros (Kopp, 1966) uno de ellos *Persea*, es conocido también como el de los verdaderos aguacates, posee una característica particular: frutos de mayor tamaño (Barrientos *et al.* 2000).

El otro subgénero, *Eriodaphne*, es bastante numeroso, variable y se diferencia claramente por la cara interior de los sépalos, mismos que son sin pubescencia, con algunas excepciones, como *Persea pallida*, *Persea rigens* y *Persea cinerascens* (Barrientos *et al.* 2000), en cambio en *Persea* tiene ambas caras pubescentes. El subgénero *Eriodaphne* contiene algunas especies que tienen resistencia total al mayor problema fitosanitario del aguacate: la pudrición de la raíz causada por el hongo *Phytophthora cinnamomi*.

Cabe mencionar que ambos subgéneros son incompatibles, debido a que todo intento de hibridarlos, ó de injertar al subgénero *Persea* sobre especies de *Eriodaphne*, invariablemente ha fracasado (Bergh y Ellstrand, 1987; Bergh,

1992). Dentro del subgénero *Persea*, además del aguacate, se encuentran *Persea nubigena* (aguacate de monte), *Persea steyermarkii* (aguacate de montaña), *Persea schiedeana* (chinene, chinini, chenene, yas, hib), *P. floccosa* (aguacate cimarrón) (Barrientos y López, 2000). Además en este subgénero Williams (1977) incluyó a *P. parvifolia* (aguacatillo de Veracruz, México). *P. primatogena* (guaslipe de Nicaragua) ha sido reclasificado dentro del género *Beilschmiedia* (Zentmeyer). Schieber y Zentmeyer (1978) propusieron la incorporación de *P. tolimanensis* (aguacate de mico) y *P. zentmeyerii* (de Guatemala) a este subgénero.

Para Koop (1996) el aguacate mexicano se clasifica como *Persea americana* var. *drymifolia*, y a los tipos guatemaltecos y antillano como *Persea americana* var. *americana* y un aguacate silvestre como *P. americana* var. *nubigena*. Williams (1977) clasificó a la raza guatemalteca como *Persea nubigena* var. *Guatemalensis*, forma que ha sido derivada de *P. nubigena* var. *nubigena*, sin embargo, actualmente se consideran tres razas dentro de la especie *Persea americana* Mill. Bergh y Ellstrand (1987) hicieron la clasificación mas acertada de estas, agrupando a la raza Mexicana como la variedad botánica *drymifolia* (*P. americana* var. *drymifolia*), la raza Guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*) y raza Antillana (*P. americana* var. *americana*).

Los estudios de taxonomía numérica en cultivares de aguacate, indican una mayor relación filogenética entre los aguacates antillanos y guatemaltecos, que entre antillano y mexicano (Rhodes *et al.* 1971). García e Ichikawa (1979) estudiando diagramas de dispersión para combinaciones de dos en dos de 15 características morfológicas, observan esta misma tendencia, es decir,

encuentran más similitud entre antillanos con guatemaltecos que entre antillanos con mexicanos. Estos resultados difieren de lo sugerido por Williams (1977), en el sentido de que si el aguacate guatemalteco es una especie diferente, serian mayor las diferencias entre guatemaltecos con antillanos pero, siendo el antillano y el mexicano de una misma especie, seria de esperarse que estas dos variedades fueran mas afines, lo cual no se indica en los trabajos de Rhodes *et al.* (1971) y García e Ichikawa (1979). Lo anterior plantea la necesidad de realizar mas estudios que tiendan a esclarecer las relaciones filogenéticas entre los aguacates. Considerando la hibridación del aguacate silvestre y el recientemente mejorado en donde sus relaciones genéticas presentan patrones complejos de la evolución común en muchas plantas perennes, existe polémica sobre el estado de su taxonomía entre las mismas variedades de aguacate cultivado y otras especies estrechamente relacionadas con *Persea*. Algunos investigadores han sugerido que la especie *P. nubigena* es actualmente una cuarta variedad de *P. americana* (Kopp, 1996), otros han sugerido que var. *guatemalensis* es una subespecie de *P. nubigena* (Bergh *et al.* 1973). En años mas o menos recientes van der Werf (2002) publicó que el subgénero *Persea* solo se conforma por dos especies: *P. americana* y *P. schiedeana*, dejando a un lado las especies *P. nubigena*, *P. steyermarkii*, *P. parvifolia*, *P. tolimanensis*, *P. floccosa* y *P. zentmyerii*, basándose para este estudio, en características morfológicas de ejemplares que en su mayoría fueron de herbario y justificando este discernimiento, con el hecho de que la variabilidad genética en aguacate se debe básicamente a procesos de selección que el hombre a hecho a este cultivo a través del tiempo.

2.2.5 Cariotipo del género *Persea*.

El número cromosómico del género *Persea* solo se ha estudiado en algunas especies, entre las que se encuentra el aguacate (*Persea americana*) (Schroeder, 1952). *P. nubigena*, *P. barbonia*, *P. longipes*, *P. floccosa* (Bringhurst, 1954), *P. palustris* (Bowden, 1954; citado por Darlington y Wylie, 1956), *P. cinerascens* (Garcia, 1970), *P. shiedeana* (Garcia, 1972), *Persea indica*, *P. donnell-smithii* y *P. pachuypoda* (Garcia, 1975) poseen un número cromosómico de $2n=24$. Sólo se ha identificado una especie tetraploide (doble número cromosómico) que se denomina *P. hintonii* (García, 1975) y es nativa de Temascaltepec y Tejupilco, Estado de México. García (1975), identificó también algunos tipos de aguacate (*Persea americana*) tetraploides y triploides provenientes de San Juan de la Vega, Guanajuato, México. La presencia de formas intermedias fértiles que ocurren naturalmente en lugares donde crecen simpátricamente algunas especies, sugiere gran homología en estructura cromosómica. Por ejemplo en Veracruz, donde crecen juntos *P. americana* y *P. schiedeana* se registran formas intermedias; en Michoacán donde *P. americana* crece junto con *P. cinerascens*, se observan formas intermedias que se conocen como aguacate blanco (García, 1978).

2.2.6 Origen y distribución del subgénero *Persea*

Los orígenes de la domesticación y las relaciones genealógicas entre las variedades de aguacate no son del todo conocidos, así mismo, la evidencia antropológica sugiere que fue cultivado miles de años atrás (Smith, 1966; Smith, 1969). La distribución de la planta del aguacate (*P. americana* Mill) y la

evidencia taxonómica han sido compatibles con el hecho de que es originario de México central (Zentmeyer *et al.* 1986). Como prueba de su origen, existen restos fósiles de entre 8000 y 10000 años de antigüedad encontrados en Tehuacan Puebla (Téliz *et al.* 2000). Es a partir de este descubrimiento, que se conoce, ha sido utilizado como alimento y planta medicinal desde hace milenios (Villanueva y Vertí, 2007).



Figura 3. Distribución geográfica de las tres razas de aguacate.

El aguacate, de la misma manera que el maíz, el dátil, el higo, el tabaco y la caña de azúcar, ha sido cultivado desde la antigüedad transformándose a través de la selección del hombre desde la prehistoria (Zentmeyer *et al.* 1986). La mayoría de los miembros reconocidos del subgénero *Persea* crecen desde México central y Guatemala a través de toda América Central (Figura 3), lo cual soporta la teoría del origen del género *Persea* y probablemente de todo el subgénero *Persea* (Bergh y Ellstrand, 1987; Schroeder, 1990; Ben Ya'acov, *et al.*, 1992). Las culturas prehispánicas contaban con un buen conocimiento acerca del aguacate y sus variantes. En el Códice Florentino, por ejemplo, se

mencionan tres tipos de aguacate cuya descripción supone que: aoacatl, podría tratarse de *P. americana* var. *drymifolia* (raza Mexicana), “tlacacolaocatl” *P. americana* var. *americana* (Raza antillana) y quilaoacatl *P. americana* var. *guatemalensis* (raza Guatemalteca) (Barrientos y López 2000). Las diferentes hibridaciones ocurridas en los variados ambientes ecológicos de México y Centroamérica dieron origen al aguacate comestible, de este modo en las regiones americanas en donde el aguacate se cultiva desde tiempos precolombinos, la producción proviene de fuentes distintas de árboles nativos o criollos y cultivares selectos reproducidos asexualmente (Mijares y López 1998).

2.3 Marcadores morfológicos y moleculares.

Los métodos taxonómicos tradicionales de clasificación e identificación se basan en la asociación común de caracteres morfológicos externos antes mencionada y rasgos fisiogenéticos. Pero no siempre se puede cumplir la correlación; existen casos de verdaderas especies biológicas que son indistinguibles morfológicamente, tales especies desconcertantes se llaman especies hermanas (Grant, 1989). El uso de marcadores morfológicos en las plantas, tienen muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales y fenológicos, regularmente solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando esta llega a su estado adulto (Tanksley, 1983). Debido a los avances de la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares de DNA que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales. Estos marcadores moleculares de DNA son

fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismos que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de efectos epistáticos (Tanksley, 1983; Powell, 1992; Phillips *et al.* 1995; Rallo *et al.*, 2002). Es decir, los marcadores idóneos son los de DNA y se trata de cualquier fragmento que se encuentre en alguna región del genoma, en el gen o dentro de él y que lógicamente no afecte al carácter en estudio (SIDTA 1999). Estos marcadores de DNA se basan fundamentalmente en el análisis de la longitud y/o secuencias de este entre individuos. Las técnicas empleadas para ellos son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards 1998). El rápido desarrollo de los métodos moleculares durante la década de los 80's ha tenido un profundo efecto sobre el estudio de evolución de plantas (Clegg *et al.* 1993). Estos "recientes" avances en biología molecular, principalmente en el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación de DNA, la secuenciación de DNA y los análisis de datos, han resultado ser poderosas técnicas que puede usarse para la investigación, caracterización y evaluación de la diversidad genética. El extenso número de artículos de investigación que actualmente aparecen en la literatura, describen el uso de esas técnicas en una amplia diversidad de especies de plantas y para una variedad de problemas, lo anterior es testimonio del incremento del impacto en este campo (Karp y Edwards 2000). Los avances

basados en marcadores de DNA, para la reconstrucción filogenética proveen a los investigadores un amplio rango de herramientas para el estudio de diversidad biológica y evolución desde nivel de población, hasta la comparación de familias y aún de reinos (Moritz *et al.* 1996). Paz y Álvaro (2001) en su estudio sobre variación intraespecífica en musgos, por ejemplo, cuestiona las limitaciones de los marcadores morfológicos: ¿Cuándo la variabilidad morfológica es una respuesta a condiciones ambientales y cuándo se trata de caracteres discriminatorios fijados genéticamente, es así que con la utilización de las técnicas moleculares se intenta superar las barreras medioambientales para llegar de manera más certera a los niveles taxonómicos y filogenéticos inferiores.

2.3.1. Región ITS (Espacios Transcritos Internos) del DNA ribosomal (rnDNA): generalidades.

El DNA ribosomal nuclear (nrDNA) está organizado en bloques en una o más regiones cromosómicas. Cada bloque o arreglo consiste en cientos o miles de copias (Buckler *et al.* 1997) de unidades individuales de rnDNA compuestas por las secuencias contiguas 18S, ITS1, 5.8S, ITS 2, 26S e IGS (Figura 4). Los arreglos más grandes y activos son llamados regiones nucleolares organizadoras (NORs). Estos espacios son parte de la unidad transcripcional, pero no son incluidas al final en el RNA ribosomal (Musters *et al.* 1990). Las mutaciones dentro de esas repeticiones en tandem, en individuos, están generalmente homogenizados por medio de evolución concertada (Arnheim, 1983) pero el modo y la coordinación de esta evolución concertada varía

marcadamente entre los diferentes grupos de plantas (Baldwin *et al.*, 1995; Mayer y Soltis, 1999). Generalmente la diversidad del DNA ribosomal intragenómico es baja, pero algunas especies muestran alta heterogeneidad en esta región (Buckler *et al.*, 1997; Denduangboripan y Cronk, 2000) esto ocurre si el proceso no es suficientemente rápido para alcanzar homogenización para las diferentes copias (Campbell *et al.*, 1997; Zhang y Sang, 1999). Con híbridos generados recientemente, al ser secuenciados de manera directa, se puede revelar una aditividad paterna (señal de dos diferentes nucleótidos) en el material estudiado (Fuentes y Nieto, 2003).

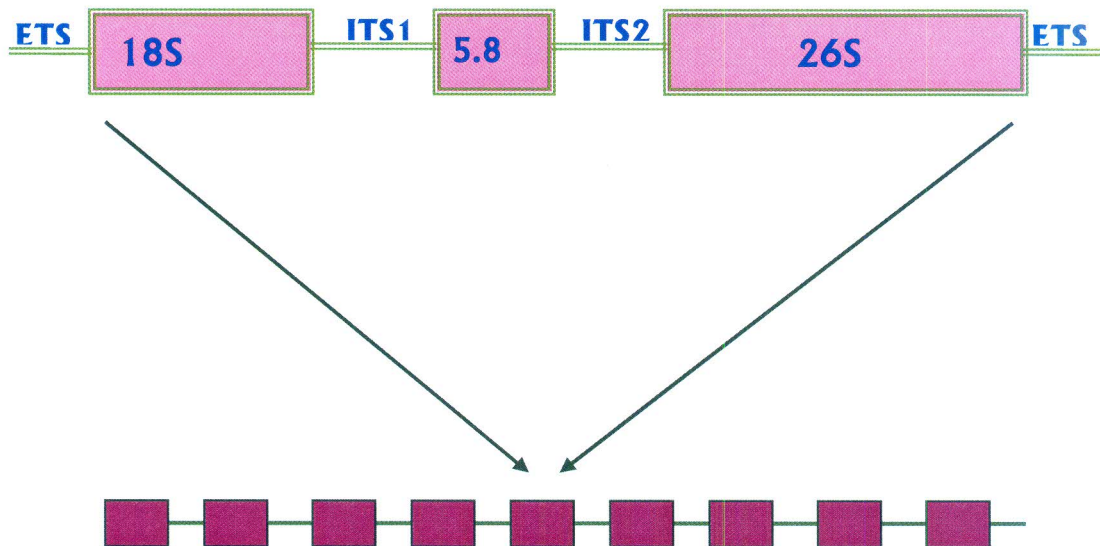


Figura 4. Organización de la región ITS del DNA ribosomal. Cada bloque o arreglo consiste en cientos o miles de copias de unidades individuales de rnDNA (Buckler *et al.*, 1997) compuestas por las secuencias contiguas 18S, ITS1, 5.8S, ITS 2, 26S.

2.3.2 Características del DNA ribosomal como marcador molecular.

Las secuencias contiguas de la región de los espacios internos transcritos del DNA ribosomal nuclear han surgido del nivel de marcador filogenético “alternativo” (Soltis y Soltis, 1992) y se han convertido en fuentes básicas de datos para el estudio de niveles bajos en relaciones filogenéticas entre *taxas* de plantas por más de diez años (Baldwin, 1992; Baldwin *et al.*, 1995). Siendo esta región una de las más utilizadas en la actualidad como marcadores moleculares para sistemática de angiospermas (Hershkovitz *et al.*, 1999; Alvarez y Wendel, 2003). Algunos reportes de variación en ITS proveen resultados que son consistentes con la existencia de arreglos homogéneos del DNA ribosomal nuclear dentro de individuos (Ainouche y Bayer, 1997; Baldwin *et al.*, 1995) presumiblemente resultado de una evolución concertada (conversión genética y un desigual entrecruzamiento; Arnheim, 1983). Las implicaciones y la importancia de los polimorfismos y pseudogenes en rDNA para análisis filogenéticos con estas secuencias en plantas fueron discutidas en el innovador trabajo de Buckler *et al.* (1997) y por Mayol y Rosselló (2001). Sin embargo, muchos temas relacionados con la caracterización de polimorfismos y pseudogenes del DNA ribosomal nuclear y sus implicaciones para especies además de la reconstrucción de niveles filogenéticos, siguen siendo ambiguos (Bailey *et al.* 2003). Así mismo, el uso de los ITS para niveles filogenéticos inferiores, se ha incrementado en organismos como por ejemplo, hongos, algas e insectos. Se ha considerado que las secuencias de esos espacios contienen signos inadecuados para análisis filogenéticos a nivel interfamiliar y para niveles

más bajos (Soltis y Soltis, 1992). Se ha demostrado que ITS2 ha retenido suficientes signos filogenéticos para poder discriminar, por ejemplo, entre secuencias desde algas verdes, hongos y semillas de plantas. La reconstrucción de relaciones filogenéticas entre especies y taxas superiores (especies arbóreas) usando datos de secuencias multicopia de nrDNA, depende sobre todo, de un claro entendimiento de las relaciones de las secuencias, (por ejemplo, árboles de genes) (Goodman *et al.*, 1979; Pamilo y Nei, 1988; Avise, 1989; Doyle, 1992; Sanderson y Doyle, 1992; Baliley *et al.*, 2003). Si las secuencias son confundidas como ortólogas (derivadas de eventos de especiación), cuando ellas son más bien parálogas (derivadas de eventos de duplicación de genes) las relaciones entre especies pueden ser inferidas incorrectamente. Mientras la ortología es, por definición, una relación interespecífica entre secuencias, la paralogía puede ocurrir a diferentes niveles entre secuencias, dentro de un individuo, entre individuos dentro de especies y entre especies (Bailey *et al.* 2003). Estos autores mencionan, que la compleja organización del DNA ribosomal nuclear en combinación con esos niveles variantes de paralogía, han generado confusión sobre el nivel de esta, que puede interferir con el árbol de reconstrucción de especies y los métodos apropiados para identificar ortólogos y parálogos. Así mismo, la organización del rnDNA complica la caracterización de polimorfismos intraindividuales.

2.3.3 Marcadores moleculares de DNA extranuclear: El caso de DNA de cloroplastos.

Como se ha mencionado, en los últimos tiempos los marcadores moleculares de DNA han tomado gran relevancia, sobre todo por que ofrecen la posibilidad de estudiar directamente secuencias de nucleótidos de DNA, analizando no solo genes estructurales sino analizando secuencias no codificantes, las cuales acumulan mutaciones de manera neutral, sin una presión de selección tan fuerte como los genes estructurales. En este sentido, se puede analizar también el DNA de plastos u organelos también llamados DNA extranuclear, como lo es el DNAm (mitocondrial) y DNAc (cloroplastos) permitiendo diferentes tipos de estudios.

El DNA de cloroplasto, permite el estudio en sistemática y en análisis filogenéticos entre especies de un género, debido a que su tipo de herencia impide la recombinación génica, por lo que las secuencias de este DNA se mantienen en un linaje uniparental. Esta característica las hace especialmente útiles en procesos evolutivos dentro de una especie (Gallo *et al.* 2004). La estructura del DNA de cloroplasto, es circular con un tamaño que varia entre 120 Kilobases (Kb) y 170 Kb (Figura 5) posee un relativo alto grado de conservación en tamaño, estructura y contenido de genes en plantas terrestres (Downie y Palmer 1992).

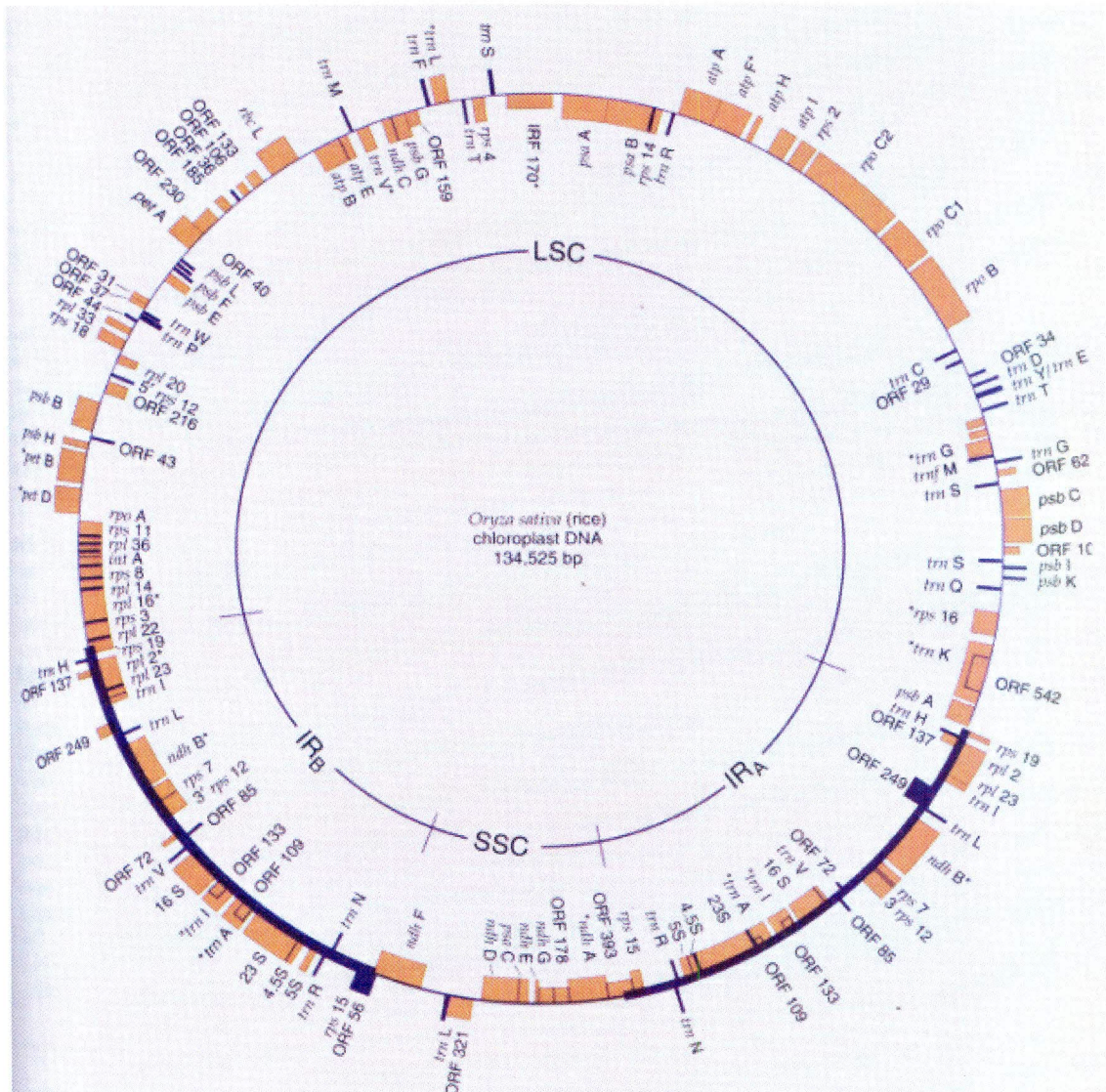


Figura 5. Organización del genoma del cloroplasto del arroz (*Oryza sativa*).

Su herencia es de tipo clonal, uniparental, predominantemente materna en angiospermas y paterna en gimnospermas. Y como se ha mencionado, la evolución en cloroplastos es relativamente lenta, con sustitución de nucleótidos en una tasa baja (Clegg *et al.*, 1991; Clegg *et al.*, 1994). Esto puede ser también una desventaja cuando se intenta estudiar relaciones intraespecíficas, sin embargo, utilizando regiones no-codificantes, las cuales presentan alto

grado de frecuencia de mutaciones, la resolución para estudios evolutivos se incrementa utilizando ambas (las altamente conservadas y las mas variables) (Taberlet *et al.* 1991). Con pocas excepciones, el genoma de cloroplasto contiene dos regiones repetidas que son invertidas (aproximadamente 25 kb cada una), que son como dos imágenes en un espejo, en términos de complementación de genes (Figura 5). Estas regiones están separadas una de otra por una región larga y una pequeña de una sola copia (LSC y SSC, respectivamente). Estudios previos sugieren que esta región acumula mutaciones puntuales más lentas que las regiones de una sola copia (Curtis y Clegg, 1984; Wolfe *et al.*, 1987; Wolfe, 1991; Gaut, 1998). Estas son las características que hacen al DNA de cloroplastos interesante en el tipo de estudios mencionados; y si bien la tasa de mutación es lenta, se ha detectado variación intraespecífica en la mayoría de los casos entre poblaciones y ocasionalmente dentro de ellas (Soltis *et al.* 1992). El genoma del cloroplasto esta siendo mayor objetivo en estudios de evolución molecular en plantas. El tamaño pequeño del genoma del cloroplasto, junto con el rápido progreso en la caracterización molecular de la codificación de genes, se han combinado para facilitar las investigaciones sobre evolución.

2.3.4 Utilización de marcadores morfológicos y moleculares con fines filogenéticos utilizados dentro del género *Persea*.

Los trabajos relacionados con el esclarecimiento de la filogenia y diversidad genética de especies silvestres y/o cultivadas del Aguacate (*Persea americana* Mill.) son variados, la finalidad: la protección y conservación de estas especies

silvestres o de cultivares regionales y por supuesto, contar con parámetros más amplios a considerar para su fitomejoramiento, el cual busca, como en todo cultivo de importancia económica, mantenerse a la vanguardia, atendiendo necesidades que el mercado demanda, así como características agronómicas relacionadas con rendimiento, adaptaciones a condiciones climáticas y edáficas, entre otros.

En cuanto a los estudios realizados mediante características morfológicas, Campos *et al.* 2007, han encontrado que la filogenia del género *Persea* se reconoce como un género parafiletico, con dos clados bien definidos, mismos que han sido determinados por Kopp, (1966); Williams, (1977); Bergh y Ellstrand, (1987); Scora y Bergh, (1990); como los subgéneros *Eriodaphne* y *Persea*. Se ha sugerido también que ambos subgéneros más bien son géneros independientes, debido sobre todo, a la incompatibilidad sexual entre ambos. (Bergh y Ellstrand, 1987; Litz, 2001). Cabe mencionar que este trabajo reconoce las limitaciones que poseen este tipo de marcadores (morfológicos), los cuales son influenciados por el ambiente, como anteriormente se mencionó, y se sugiere complementar, por ejemplo, con análisis de marcadores de DNA ribosomal, con el fin de precisar la información.

Diferentes investigadores (Rhodes *et al.*, 1971; Bergh *et al.*, 1973; Torres *et al.* 1978; Furnier *et al.* 1990; Mhameed *et al.* 1997; Davies *et al.*, 1998) han utilizado herramientas morfológicas y moleculares para discernir las relaciones entre muchos cultivares, las tres razas de aguacate y especies relacionadas. Sin embargo sus resultados, no han sido evaluados estadísticamente (Ashworth y Clegg, 2003).

Los marcadores genéticos proveen importantes herramientas en la búsqueda de una amplia variedad de problemas prácticos en el mejoramiento del aguacate (Clegg *et al.* 1993). Furnier *et al.* (1990) emplearon una serie de marcadores moleculares para una mejor caracterización de las relaciones genéticas entre variedades de aguacate cultivado y especies relacionadas. Cinco especies de *Persea* y 19 cultivares de *Persea* americana incluyendo las tres variedades o razas, fueron estudiadas usando DNA de cloroplastos (cpDNA) y pruebas con DNA nuclear. Las pruebas incluyeron clones de la familia de genes que codifican para la celulasa de DNA nuclear, genes de RNA nuclear ribosomal y un juego de clones que abarca el genoma completo de DNA de cloroplastos. Esas pruebas de clones fueron hibridadas por transferencia tipo Southern digiriendo completamente el DNA total de aguacate con ocho enzimas de restricción. Debido al tipo de herencia del DNA de cloroplastos, estos marcadores revelaron que la raza guatemalteca probablemente recibió material genético de *Persea steyermarkii*, debido a que dos únicos marcadores de DNA cloroplastos ligaron a la raza guatemalteca con *P. steyermarkii*. Lavi *et al.* (1991) utilizó huellas de DNA para la identificación y análisis genético de aguacate con las que identificaron varios cultivares, además de que caracterizaron las tres razas de aguacate y se realizó un análisis genético de la estructura de la familia. Así mismo Rodríguez-Medina *et al.* (2003) realizaron una caracterización morfoagronómica, isoenzimática y molecular en el mismo cultivo con el objetivo de identificar presencia de híbridos naturales entre razas hortícolas diferentes debido a que su ubicación es difícil.

Ashworth y Clegg (2003) realizaron estudios de relaciones genealógicas en genotipos de aguacate cultivados y representantes de sus tres razas botánicas mediante microsatélites y RFLPs, los materiales estudiados se agruparon de acuerdo con las tres razas de aguacate y los aguacates cultivados formaron grupos de manera intermedia entre algunas de ellas, lo que indicó posible origen de hibridación entre razas. Fiedleer *et al.* (1998) utilizaron marcadores moleculares tipo RAPDs para encontrar relaciones genéticas de aguacate, encontrando los marcadores potencialmente “específicos” para cada una de las razas. Y por medio de un dendrograma, se identificaron tres grupos representantes de las tres razas de aguacate, estos resultados concuerdan con la actual clasificación en tres razas botánicas.

Por otra parte, Chanderbali *et al.* (2001) han realizado trabajos sobre filogenia en la familia Lauracea, a la cual pertenece el aguacate utilizando zonas del DNA ribosomal e iniciadores diseñados específicamente para esta familia, considerando también diversas zonas en cloroplastos útiles para filogenia.

2.4 Consideraciones generales sobre la extracción de DNA con fines de caracterización molecular.

Existe una gran variedad de problemas que pueden ser encontrados durante el aislamiento y purificación de DNA de alto peso molecular en las diferentes especies. Estos problemas incluyen la degradación completa o parcial del DNA por nucleasas endógenas, aislamiento conjunto con polisacáridos altamente viscosos, lo que vuelve a las muestras difíciles de manejar y puede inhibir también la reacción enzimática; también se puede presentar durante el

aislamiento con ácidos orgánicos solubles, polifenoles, látex, y otros compuestos secundarios, los cuales causan daño al DNA o inhiben, como se ha mencionado, la reacción enzimática.

Debido a que la composición bioquímica del tejido de especies de plantas varía considerablemente, es virtualmente imposible contar con un único protocolo óptimo que sea el adecuado para todas las especies de plantas. Por lo tanto, los diferentes métodos de aislamiento de DNA difieren en muchos aspectos, los cuales incluyen la destrucción de tejidos y células, la composición de los buffers de lisis y extracción y la forma por la cual el DNA es purificado de otros componentes celulares (proteínas, RNA, membranas, polisacáridos y fenoles). La utilización de tejido seco o liofilizado evita el problema de des-congelamiento y mediante la pulverización el tejido, la extracción resulta más sencilla (Weising *et al.* 2005).

2.5 Secuenciación de DNA: electroforesis capilar.

Ciertamente, en la actualidad, la estrategia más directa para estudiar los niveles de polimorfismos en el DNA es la determinación de la secuencia de nucleótidos de una región definida (Maxam y Gibler, 1977; Sanger y Coulson, 1977) y el posterior alineamiento de esas secuencias de la región ortóloga en el genoma de otro organismo más o menos relacionado (Hillis *et al.*, 1996, Alpey, 1997). La relación entre homólogos puede deducirse a partir de un alineamiento, y la construcción de la filogenia puede reconstruirse por medio de una variedad de enfoques y algoritmos. La secuenciación de DNA es altamente robusta, reproducible e informativa en su conjunto (Weising *et al.* 2005).

Al menos desde hace una década, el método conocido como "secuenciación por terminador fluorescente" (Figura 6), es el más utilizado y presenta mejores características que el desarrollado por Allan Maxam y Walter Gilbert en 1977, el cual se basa en la modificación química del DNA y la posterior escisión en bases específicas, o el método desarrollado posteriormente por Sanger y Coulson cuyo principio es el uso de didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs), como terminadores de la cadena de DNA (Figura 6).

La mayor ventaja del método "secuenciación por terminador fluorescente" es que la secuenciación se lleva a cabo en una sola reacción, en lugar de cuatro. En el procedimiento se marcan cada uno de los cuatro didesoxinucleótidos que terminan la cadena con un colorante fluorescente diferente, con fluorescencias a diferentes longitudes de onda.

Otra ventaja, es la rapidez debida a la secuenciación automatizada, controlado por computadora. Algunas limitaciones son los efectos de los terminadores fluorescentes en el fragmento de DNA, que produce alturas y formas de picos desiguales en los registros de secuencia de DNA del cromatograma de DNA tras la electroforesis capilar al principio y al final de cada secuencia. Este problema se ha resuelto con la introducción de nuevos sistemas enzimáticos de polimerasas de DNA y colorantes que minimizan la variabilidad de la incorporación. Este método se utiliza ahora para mayoría de los proyectos de secuenciación, debido a su sencillez y costos relativamente más bajos.

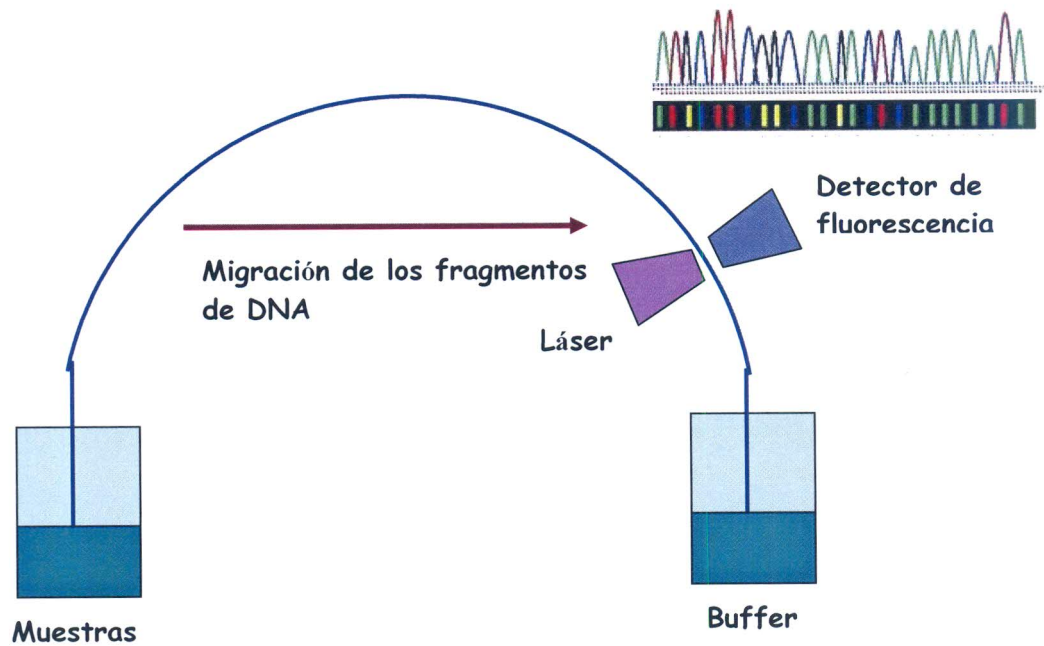


Figura 6. Electroforesis capilar para secuenciación de DNA.

2.6 La Bioinformática y su utilidad en filogenia.

El desarrollo de la ingeniería genética y las nuevas tecnologías de la información durante la última década del siglo XX, condicionaron el surgimiento de una disciplina que generó vínculos indisolubles entre la Informática y las Ciencias Biológicas: la Bioinformática. Este término es relativamente reciente, y apareció en la literatura a principios de 1990, cuando comenzaba a estructurarse el llamado "Proyecto Genoma Humano" y el National Center for Biotechnology Information (NCBI) de los Estados Unidos, daba sus primeros pasos (Perezleo *et al.* 2003).

La bioinformática es definida como la aplicación de técnicas computacionales para comprender y organizar el flujo de la información asociada con sistemas y

procesos biológicos (Luscombe *et al.* 2001). Esta disciplina se contextualiza en la intersección de la biología molecular, que origina los datos a analizar, la computación, que proporciona el hardware y las vías de comunicación de los resultados entre investigadores; y el análisis de datos mediante algoritmos, que entrega los programas y resultados a analizar (Brown 2000). La bioinformática se desenvuelve buscando y utilizando patrones y estructuras inherentes en datos biológicos, como secuencias génicas, al mismo tiempo que desarrolla nuevas metodologías para acceso y búsquedas en bases de datos (NCBI 2008).

La fuente de la que se nutre la Bioinformática la constituyen una serie de bases de datos de acceso público donde se acumula, continuamente, toda la información disponible. Éstas se han especializado según la naturaleza de los datos almacenados, siendo las principales las que recogen secuencias de genes, genomas y proteínas (Gen-Bank: www.ncbi.nlm.nih.gov; EMBL: www.ebi.ac.uk; DDBJ: www.ddbj.nig.ac.jp; Uniprot: www.ebi.uniprot.org). Estructuras tridimensionales de macromoléculas (ProteinData Bank: www.rcsb.org/pdb), datos de expresión génica (Array Express: www.ebi.ac.uk/arrayexpress; Stanford Microarray Database: genome-www5.stanford.edu), ontologías (GeneOntology: www.geneontology.org) y literatura científica (PubMed: www.ncbi.nlm.nih.gov/Literature) (López y Gómez-Puertas, 2005).

Con la utilización de nuevas técnicas para la secuenciación de DNA y las proteínas y la producción paralela, cada vez mayor, de secuencias que se almacenan en las bases de datos, se hizo necesario la creación de algoritmos

que permitieran comparar y catalogar secuencias por métodos computacionales que comparan y alinean dichas secuencias, lo que hace posible entre otros tipos de estudios, investigar las relaciones evolutivas entre los diferentes, reinos, phyla y taxa biológicos (Franco *et al.* 2008). Es decir la bioinformática ofrece la posibilidad de comparar y relacionar la información genética con fines deductivos, así surgen respuestas que no parecen obvias a la vista de los resultados de los experimentos (Perezleo *et al.* 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras del género *Persea* recolectadas del Depositario Nacional de Germoplasma de Aguacate (DNGA) perteneciente a la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, A.C., ubicado en Coatepec Harinas, Estado de México, México. Estas muestras fueron procesadas, secuenciadas y analizadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.1 Material vegetal.

Se trabajó con 23 materiales, representantes de las tres razas del género *Persea*, fueron consideradas también especies afines como *P. steyermarkii*, *P. floccosa*, *P. nubigena*, *P. shiedeana* y *P. cinerascens* (Cuadro 1).

3.2 Extracción de DNA: características de muestras vegetales para la extracción y procedimiento.

Las muestras vegetales fueron colectadas y trasladadas al laboratorio para secarlas en silica gel. La extracción de DNA se realizó empleando dos protocolos; el de Khanuja *et al.* (1999) y el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit de Queagen, siguiendo las indicaciones del instructivo en este último caso. El primer protocolo fue adaptado a las características del tejido vegetal y condiciones del laboratorio.

3.2.1 Soluciones químicas para extracción de DNA.

- a) Buffer de extracción: 100 mM Tris HCL (pH 8.0), 25 mM EDTA, 1.5M NaCl, 2.5 % de CTAB, 0.2 % β -mercaptoetanol (v/v), 1 % PVP (w/v).
- b) Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
- c) NaCl 5 M
- d) Isopropanol
- e) Etanol al 80 %
- f) RNAasa.

Procedimiento del “Protocolo para aislamiento rápido de DNA con muestras frescas y secas de plantas que producen grandes cantidades de metabolitos secundarios y aceites esenciales” (Khanuja *et al.* 1999).

- 1) Se maceró la muestra en nitrógeno líquido (0.5 gr. de tejido seco).
- 2) Se transfirió a un tubo de polipropileno de 2 mL y agregó 1 mL de buffer de extracción preparado recientemente, se mezcló por inversión.
- 3) Después se incubó a 60 °C en agitación durante 1-2 horas (muestras deshidratadas pudieran requerir incubación durante toda la noche a 37 °C)
- 4) Se agregaron 500 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló la muestra por inversión durante 15 minutos.
- 5) Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Se transfirió la fase acuosa superior a otro tubo de polipropileno.

- 7) Posteriormente se agregó un volumen igual al obtenido, 500 μL aproximadamente, de NaCl 5 M y se mezcló suavemente (no dar vortex).
- 8) Se agregó un volumen de 600 μL de isopropano. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente por una hora.
- 9) Se mezcló cuidadosamente, si se apreciaron las fibras de ácidos nucleicos, se rescataron con una varilla de vidrio y se transferieron a un microtubo.
- 10) Alternativamente, si no se observaron las fibras de DNA, después de mezclar con isopropanol, las muestras se centrifugaron 13 000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente.
- 11) Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80% (hasta tres veces dependiendo de la pureza deseada).
- 12) Se procedió a secar la pastilla invirtiendo el tubo durante 15 minutos y finalmente se disolvió en 500 μL de buffer TE alto en sales.
- 13) Se adicionaron 5 μL de RNAasa y se incubó la muestra a 37° C por 30 min.
- 14) Se eliminó la RNAasa con un igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
- 15) Nuevamente se transfirió el nivel acuoso a un microtubo de 1.5 mL y se agregaron 2 volúmenes etanol frío.
- 16) Se centrifugaron los tubos a 10 000 rpm durante 10 minutos a 25-30° C.
- 17) Se lavó la pastilla con etanol 80%.
- 18) Finalmente se dejó secar la pastilla y se disolvió en 70-100 μL de agua libre de nucleasas.

3.2.2 Determinación de la calidad y concentración de DNA.

Para estimar la calidad del DNA extraído, se analizaron las muestras en geles de agarosa 0.8 %, utilizando una cámara de electrofóresis horizontal y con un campo eléctrico de 90 volts durante una hora aproximadamente. Se determinó la concentración de DNA a 260 nm con un espectrofotómetro Perkin Elmer.

Cuadro 1. Nombre y origen de las accesiones consideradas para la investigación.

MATERIALES	CLAVE	ORIGEN DE MUESTRA
RAZA MEXICANA		
1. Tochimilco	Tch	MÉXICO
2. Tepetl	T	MÉXICO
3. Vargas	Vg	MÉXICO
4. Ixtapan del oro	XO	MÉXICO
RAZA GUATEMALTECA		
5. Palestre	P	GUATEMALA
6. San Cristobal Mercado	SCM	MÉXICO
RAZA ANTILANA		
7. Antigua	A	ISRAEL
8. Marichal	Mar	COSTA RICA
9. Tetiz	Tt	**
RAZA COSTARICENSIS		
10. Las nubes 6-105	Nbs	COSTA RICA
11. Fredy 4	Fr	COSTA RICA
OTRAS ESPECIES		
12. <i>Persea cinerascens</i>	Pc	MÉXICO
13. <i>Persea floccosa</i>	PF	ISRAEL
14. <i>Persea steyermarkii</i>	Ps	MÉXICO
15. <i>Persea nubigena</i> 1/7	Nub 1/7	ISRAEL
16. <i>Persea shiedeana</i>	Sh	HONDURAS
17. <i>Persea chamisonis</i>	Ch	**
18. <i>Persea longipes</i> (TANTIMA)	Tn	**
19. <i>Persea sp</i>	PR	**
20. <i>P. shiedeana</i> (Lino Ixtapan)	Lix	**
21. <i>P. shiedeana</i> (Yaruche)	Yr	COSTA RICA
HIBRIDOS		
22. Martín Grande	MG	MÉXICO
23. Cima De Coppey	CC	ESTADOS UNIDOS
		**

3.3 Protocolo para obtención de la región ITS de DNA ribosomal con iniciadores ITS4-ITS4 e ITSB - Laur1, utilizando tres diferentes enzimas *Taq* polimerasas.

3.3.1 Iniciadores utilizados para la región ITS.

Inicialmente se había considerado el análisis de la región ITS que comprende el ITS 1, el gen 5.8 S y el ITS 2 del DNA ribosomal nuclear. Se utilizaron dos pares de iniciadores (Cuadro 2); el primer par fue ITS4 e ITS5 (“forward” y “reverse” respectivamente), sintetizados por la compañía SIGMA®, y el segundo, para la misma zona pero específicos para la familia Lauraceae que fueron ITSB y Laur1, sintetizados por la compañía Integrated DNA Technologies. Debido a la dificultad de amplificación de la región esperada para la mayoría de las muestras, se utilizaron las diferentes enzimas DNA polimerasas (Cuadro 3) correspondientes a los kits comerciales para PCR tales como, Fermentas, GoTaq® Flexi Promega y Advantage- GC-2 PCR de Clontech, este ultimo posee la característica de facilitar la amplificación de secuencias ricas en guaninas y citocinas. Así mismo, para la mezcla de reacción con la enzima de Promega se utilizó el reactivo dimetil-sulfoxido (DMSO), el cual ha demostrado mejorar la amplificación se zonas con secuencias ricas en guaninas y citocinas, rompiendo el apareamiento de bases (Pomp *et al.*, 1991). Las condiciones de amplificación con ambos pares de iniciadores y con las diferentes enzimas *Taq* Polimerasas se indican en los Cuadros 3 y 4.

Cuadro 2. Nombre y secuencias de iniciadores.

Iniciador	Tipo de DNA amplificado	Secuencia 5' - 3'
ITS 4	DNA ribosomal	CCT-TGG-CCG-GGT-TAA-ATT-TGG-G
ITS 5	DNA ribosomal	GGC-TTG-CCG-GTC-CCG-TTA-CGA
ITS B	DNA ribosomal	ACC-ACC-ACC-GGC-AAC-CA
LAUR 1	DNA ribosomal	CTT-TTC-CTC-CGC-TTA-TTG-ATA-TG

3.3.2 Mezcla de reacción

Para amplificar la región ITS1-5.8S-ITS2 del DNA ribosomal nuclear, se preparó una mezcla de reacción para PCR 1x con 25 µL de volumen final. El Cuadro 2 muestra los volúmenes de cada reactivo de acuerdo con el kit empleado.

Cuadro 3. Reactivos y volumen para mezcla para reacción, utilizando iniciadores ITS4 e ITS5 y Laur1 e ITSB con diferentes enzimas Taq. Polimerasas.

Reactivos	1 X Kit Fermentas con ITS4 e ITS5	1 X Kit Promega con Laur1 e ITSB	1 X Kit Advantage Laur1 e ITSB
DNA	5.0 µL (20 ng/µL)	5.0 µL (20 ng/µL)	5 µL (20 ng/µL)
Taq. Polimerasa	0.4 µL (5 u/ µL)	0.4 µL (5 u/ µL)	*
Advantage - GC	*	*	0.5 µL (50 X)
2 pol. Mix			
MgCl ₂	2.0 µL (25 mM)	2.0 µL (25 mM)	*
Buffer	2.5 µL (10 X)	5 µL (5 X)	5 µL (5 X)
GC Melt	*	*	2.5 µL (5 M)
ITS4	2.0 µL (10 pmol/ µL)	*	*
ITS5	2.0 µL (10 pmol/ µL)	*	*
ITS B	*	.5 µL (10 pmol/ µL)	1 µL(10 pmol/ µL)
Laur1	*	.5 µL (10 pmol/ µL)	1 µL (10 pmol/ µL)
dNTP`s	5.0 µL (10 pmol/ µL)	5.0 µL (10 pmol/ µL)	5 µL (10 pmol/ µL)
Agua HPLC	5.9 µL	5.35 µL	5 µL
DMSO	*	1.25 µL	*

Cuadro 4. Condiciones de PCR para los ensayos con los diferentes tipos de *Taq* Polimerasas.

Condiciones para PCR en los diferentes ensayos						
	PCR ITS4 e ITS5 Kit Fermentas		PCR ITSB y Laur1 kit Promega		PCR ITSB Y Laur1Kit Advantage® -GC 2 PCR.	
Etapas	Tm	Tiempo	Tm	Tiempo	Tm	Tiempo
Pre -desnaturalización						
(1 ciclo)	94° C	4 min	96 °C	4 min	96 °C	4 min
Num. de ciclos		35		35		35
Desnaturalización	94 °C	1 min	94 °C	1 min	94 °C	1 min
Amplificación	60 °C	1 min	63 °C	1 min	63 °C	1 min
Extensión	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	10 min
Extensión final	72 °C	10 min	72 °C	10 min	*	*

3.4 Protocolo para la obtención de DNA y amplificación de la región trnL-F en DNA de cloroplasto.

Para la obtención de DNA de cloroplastos, se utilizó el mismo protocolo de extracción de DNA que se ha mencionado, y los iniciadores para la amplificación de esta región se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Nombre y secuencia de iniciadores utilizados para la amplificación de la región del DNA de cloroplasto.

Iniciador	Tipo de DNA amplificado	Secuencia 5'-3'
trnLf	DNA de cloroplasto	AAT TGA ACT GGT GAC ACG AG
trnLc	DNA de cloroplasto	CGA ATT CGG TAG ACG CTA CG

3.4.1 Mezcla de reacción.

En el cuadro 6 se señala la mezcla de reacción para la amplificación de DNA de cloroplastos

Cuadro 6. Requerimientos para mezcla de reacción con iniciadores trnLf y trnLc para DNA de cloroplastos.

Reactivo	Volumen 1x	Concentración final
DNA	5.0 µL (20 ng/µL)	100 ng
Taq. Pol.	0.4 µL (5 U/µL)	2 U
MgCl ₂	2.0 µL (25 mM)	2 mM
Buffer Taq.	5.0 µL (5X)	1X
trnLc	1.0 µL (10pmol/ µL)	10 pmol
trnLf	1.0 µL (10pmol/ µL)	10 pmol
dNTP`s	5.0 µL 10pmol/ µL	50 pmol
Agua	5.6 µL	*
DMSO	10 % v/v	10 % v/v

3.4.2 Condiciones de amplificación de la región *TrnL-TrnF* de DNA de cloroplastos

Las condiciones de amplificación con los iniciadores trnLc y trnLf, fueron: 94 °C de pre-desnaturalización por 4 min, 30 ciclos con una desnaturalización de 94 °C durante 1min, amplificación a 60 °C también 1min, con extensión de 72 °C de 1 min y extensión final de 72 °C durante 10 min.

3.4.3 Secuenciación de la región *TrnL-TrnF* de DNA de cloroplastos.

La región *trnL-F* que comprende una secuencia parcial del gen tRNA-Leu (*trnL*), la secuencia completa del espacio intergénico *trnL-trnF* y una secuencia parcial del gen tRNA-Phe (*trnF*), fue secuenciada por ambos lados de la cadena de DNA por para cada uno de los materiales incluidos en el presente trabajo.

3.4.4 Alineamiento de secuencias en el GenBank

Se realizó un alineamiento de cada secuencia obtenida con la base de datos del NCBI (GenBank) mediante el programa BLAST, este alineamiento se realiza por búsquedas de similitud; es decir, se compara una secuencia problema contra todas las secuencias existentes en la base de datos, de esta manera se pudo corroborar que el fragmento efectivamente se tratara de la zona esperada en cloroplastos.

3.4.5 Alineamiento múltiple de secuencias, análisis de distancias genéticas y filogenéticos.

Los análisis filogenéticos se realizaron con el software MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). El análisis de inició con la realización de un alineamiento múltiple por medio del programa ClustalW, con las secuencias obtenidas. La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de Mínima Evolución. Se obtuvo el árbol filogenético usando el método Jukes-Cantor que calcula las distancias evolutivas con base en unidades referidas al número de bases sustituidas por sitio. Para generar el árbol inicial, se utilizó el algoritmo Neighbor-Joining y

finalmente se construyó el árbol de Mínima Evolución usando el algoritmo Close-Neighbor-Interchange (CNI). Todas las posiciones que contenían *gaps* y datos perdidos el programa MEGA 4 los eliminó automáticamente del conjunto de datos; por lo que del total de 850 pares de bases que se estimaron inicialmente, solo fueron de utilidad 652 posiciones en el conjunto final de datos.

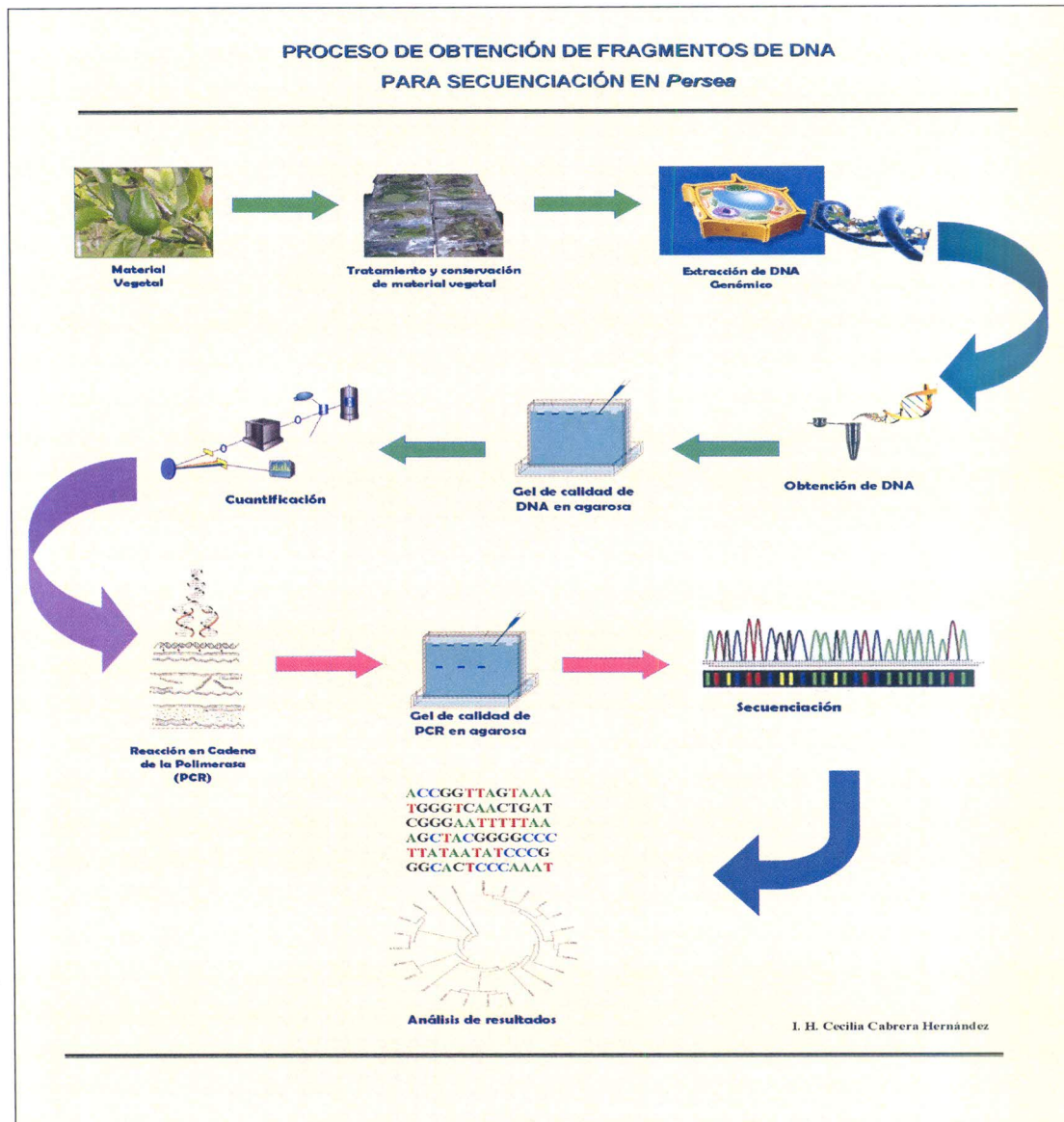


Figura 7. Diagrama del proceso de obtención de zonas conservadas del DNA en *Persea* para su secuenciación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracciones de DNA

El DNA obtenido con el protocolo de Khanuja *et al.* (1999) fue de calidad y cantidad apropiada para los análisis moleculares considerados en el presente estudio. Cabe mencionar que no todas las muestras consideradas inicialmente (30 muestras) presentaron facilidad para la extracción; sin embargo, en la mayoría de las muestras finalmente trabajadas fue necesario variar los tiempos de centrifugación, volúmenes de isopropanol y lavados con etanol. Se optó por eliminar a *P. parvifolia* porque aún con las modificaciones hechas al protocolo de Khanuja *et al.* (1999) no fue posible purificar esta molécula. Con la finalidad de obtener una mejor calidad del DNA, se utilizó el kit comercial DNeasy Plant mini kit de Quiagen. Sin embargo, como se observa en la Figura 9, solo en algunas muestras fue posible obtener la molécula deseada; y al utilizar este DNA para amplificación con PCR, no hubo éxito alguno. Los problemas en la obtención DNA se han observado en trabajos realizados anteriormente con la misma especie (Reyes-Alemán, 2008, comunicación personal) y se han adjudicado a varios factores; el mas consistente como es sabido, es que esta familia se distingue por la presencia de metabolitos (principalmente resinas, polisacáridos y polifenoles) que complican la obtención de DNA de calidad óptimo para PCR. Estos metabolitos secundarios causan un efecto de inhibición del reconocimiento de iniciadores y de la reacción enzimática (Weising *et al* 2005). En la Figura 8 se muestra el gel de calidad obtenido para las muestras finalmente utilizadas.

Estos metabolitos secundarios causan un efecto de inhibición del reconocimiento de iniciadores y de la reacción enzimática (Weising *et al* 2005). En la Figura 8 se muestra el gel de calidad obtenido para las muestras finalmente utilizadas.

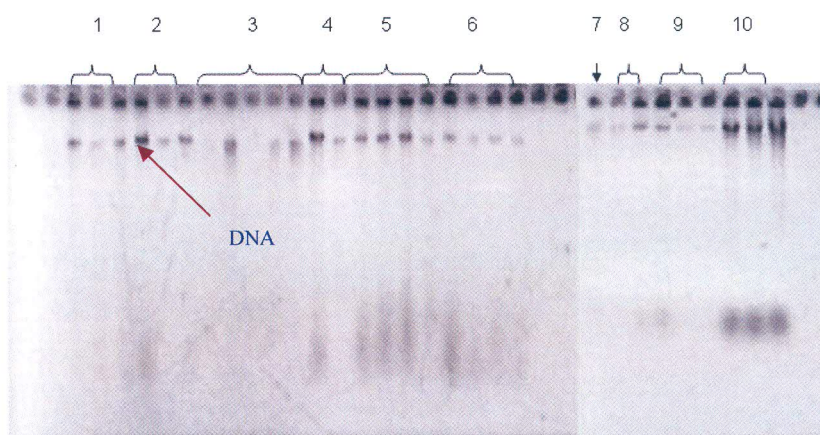


Figura 8. Gel de calidad de DNA de los diferentes materiales utilizados utilizando el protocolo de Kahanuja et al, (1999): 1 (Olanca), 2 (Tepetl), 3 (*P. lingue*), 4 (Palestre), 5 (Martín Grande), 6 (*P. floccosa*) 7 (Ixtapan del oro), 8 (*B. miersii*) 9 (Marichal), 10 (*P. cinerascens* La flecha señala el DNA esperado.

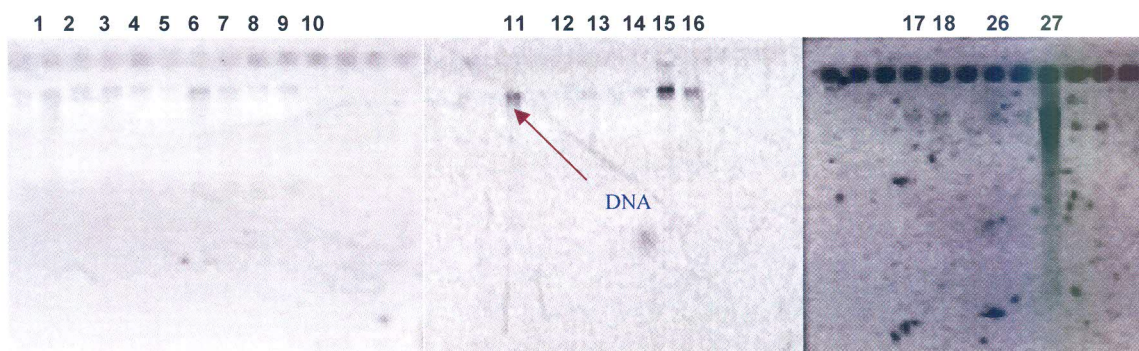


Figura 9. Gel de calidad de extracción con kit comercial. (1) Hass, (2) Antigua, (3) *P. shiedeana*, (4) Vargas, (5) Tepetl, (6) Cima de copey, (7) Olanca, (8) Tantima, (9) Nubes, (10) *P. nubigena*, (11) Fredy, (12) *P. steyermarkii*, (13) *B. mierssi*, (14) Sn Cristobal Mercado, (15) *P. parvifolia*, (16) *P. gigantea*, (17) Martin Grande, (18) Lino ixtapan, (19) Marichal, (20) *P. rigens*, (21) *B. anay*, (22) Nubes, (23) Tetiz, (24) Yaruche, (25) *P. lingue*, (26) *P. chamisonis*, (27) *P. shiedeana*.

4.2 Amplificación con iniciadores ITS4 e ITS5.

Los primeros ensayos de amplificación se realizaron con la finalidad de determinar la mejor temperatura de alineamiento utilizando estos iniciadores: ITS4 e ITS5 (Figura 10).

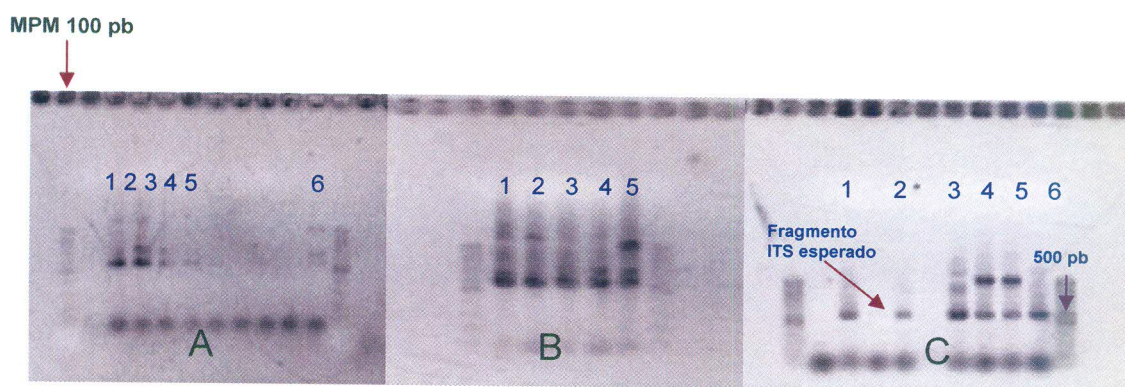


Figura 10. Productos de amplificación con diferentes temperaturas de alineamiento. De izquierda a derecha, panel A (55 °C): (1) Olanca, (2) Tepetl, (3) Vargas, (4) *P. lingue*, (5) Palestre, *P. cinerascens*; panel B (58 °C): 1) Olanca, 2) Tepetl, 3) Vargas, 4) *P. lingue*, 5) *P. cinerascens* y panel C (60 °C): (1) *B. miersii*, (2) Marichal, (3) *P. lingue*, (4) *P. cinerascens*, (5) *P. steyrmarkii*, (6) *P. cinerascens*. El MPM es de 100 pb de Fermentas. La flecha señala el fragmento esperado.

En este experimento, la mejor definición de banda, se obtuvo con 60° C de alineamiento, sin embargo, en la mayoría de los materiales amplificados se produjeron dos o más regiones reconocidas por los iniciadores, las cuales pueden observarse en la Figura 10 panel C). Una vez optimizada la temperatura de alineamiento, se intentó nuevamente la amplificación de todos los materiales, repitiendo las condiciones donde se observó mejor amplificación; sin embargo, no se obtuvo nuevamente el fragmento esperado (alrededor de 500 a 700 pb).

4. 3 Amplificaciones con los iniciadores ITSB y Laur1.

Con la finalidad de intentar nuevamente la amplificación de la región ITS, se utilizaron los iniciadores ITSB y Laur1, que son específicos para la familia de las Lauraceas (Chanderbali *et al.* 2001); a la mezcla de reacción se adicionó Dimetil-sulfóxido (DMSO) como lo describe el protocolo de Kuzoff *et al.* (1998). La Figura 11 muestra los productos obtenidos con las condiciones antes mencionadas. Se puede observar que en la mayoría de los materiales amplificados se presentaron bandas inespecíficas, pero también fragmentos que corresponden al peso molecular esperado en relación a los fragmentos reportados en el genbank para especies pertenecientes a la familia Lauraceae.

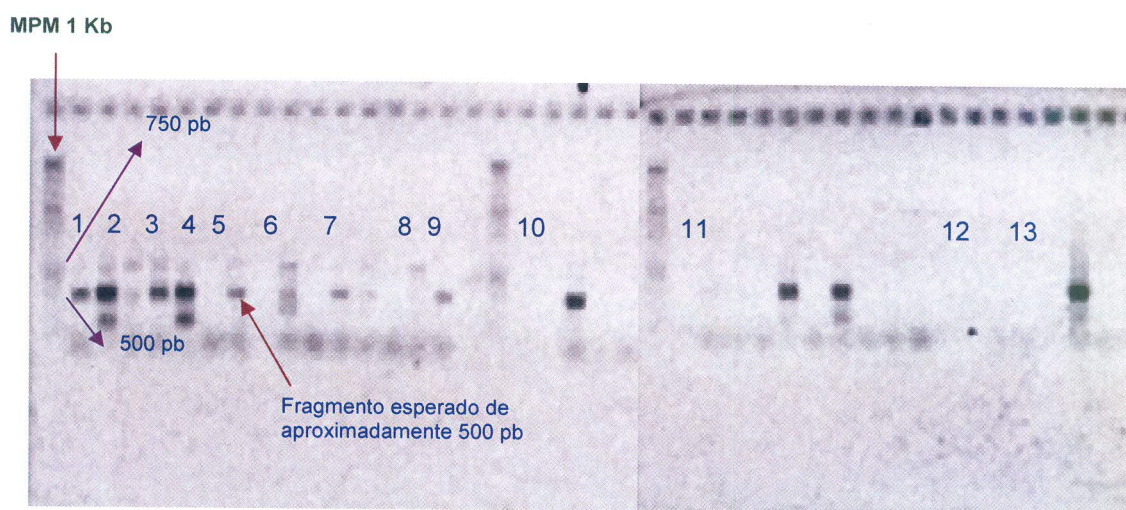


Figura 11. Productos de amplificación con los iniciadores ITSB y Laur1, utilizando MPM 1000 pb. De izquierda a derecha: (1) Yaruche, (2) *P. cinerascens*, (3) Tepetl, (4) Martín Grande, (5) *P. lingue*, (6) Martín Grande, (7) Tepetl, (8) *P. steyermarkii*, (9) Vargas, (10) *P. steyermarkii*, (11) Tantima, (12) *B. miersii*, (13) *P. lingue*, (14) *P. cinerascens*. Los fragmentos esperados se señalan con flechas.

Con el Kit Advantage® -GC 2 PCR de los laboratorios Clontech, se obtuvieron productos de amplificación nítidos gracias a las características que este kit

presenta y descritas en páginas anteriores; sin embargo, nuevamente se obtuvieron dos fragmentos con pesos moleculares diferentes en la mayoría de las muestras (Figura 12). Aún cuando no fue posible obtener la banda única esperada, el uso del kit indicado, podría permitir la clonación de dichos productos de manera más específica para una posterior clonación e identificación del fragmento esperado.

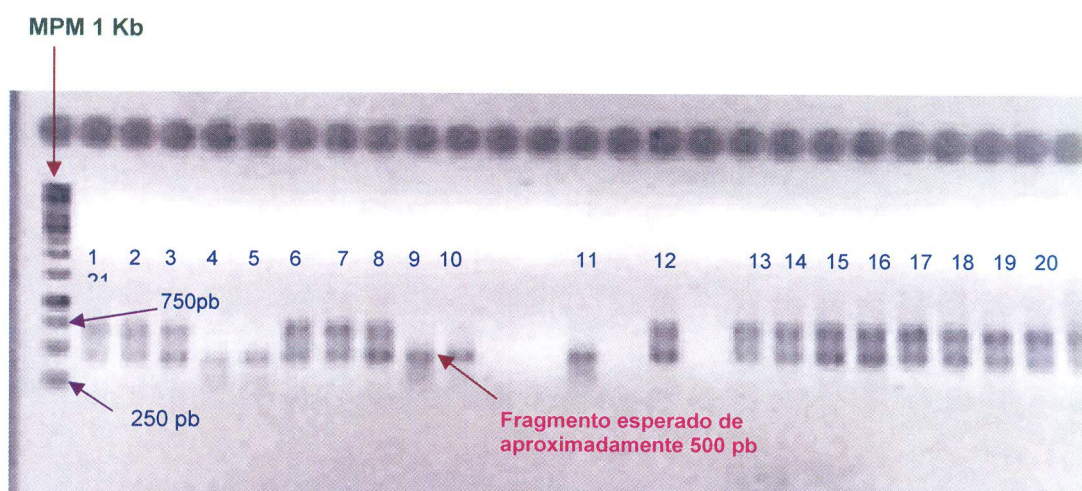


Figura 12. Productos de amplificación de ITS utilizando el Kit Advantage® -GC 2 PCR. De izquierda a derecha: 1) Fredy, 2) Tetiz, 3) Cima Coppey, 4) Tochimilco, 5) *P. schiediana*, 6) San Cristóbal Mercado 7) *P. floccosa*, 8) *B. anay* 9) Tepetl 10) *B. miersii* 11) Antigua, 12) Olanca, 13) Tantima, 14) *P. cinerascens*, 15) Marichal, 16) Yaruche, 17) Palestre, 18) *P. sp*, 19) Vargas, 20) Nubes, 21) Lino Ixtapan. Nótese que en las muestras 4,5 9,10 y 11 solo se aprecia una sola banda; sin embargo en el resto se aprecian dos bandas de pesos moleculares de 500 y 700 pb. El MPM es de 1kb de Fermentas.

La obtención de fragmentos ITS del DNA ribosomal, no pudo concretarse de manera exitosa porque no se obtuvo una banda única del peso molecular esperado (alrededor de 500 a 700 pb) en todas las muestras, aún utilizando las

diferentes marcas comerciales de enzimas *Taq* Polimerasa o utilizando DMSO (Dimetil-sulfoxido) como lo refiere el protocolo de Kuzoff *et al.* (1998). Las dificultades descritas para la obtención de este fragmento se han relacionado por una parte como ya se mencionó, a la dificultad de obtener DNA de calidad y por otra, a la estructura genética natural de este fragmento, ya que en angiospermas se ha reportado que las secuencias cercanas al extremo 5' y al final del extremo 3' del ITS1, son altamente variables y tienden a formar estructuras similares a loops. Estas regiones en forma de loops contienen una alta proporción de guaninas, citocinas y timinas (Liu y Scharal, 1994), por lo que se complica el alineamiento del template y el pareamiento o reconocimiento con los iniciadores utilizados.

4.4 Resultados del protocolo para la obtención del fragmento *TrnI-f* de DNA de cloroplastos con iniciadores TrnLf y TrnLc.

En la amplificación de la región *TrnL-TrnF* DNA de cloroplastos no se encontró dificultad. En el primer ensayo se obtuvieron dobles bandas, sin embargo, esto se resolvió adicionando DMSO en la mezcla de reacción, como se hizo para la región ITS. En la Figura 13 se observa la fotografía del gel con el fragmento obtenido con PCR.

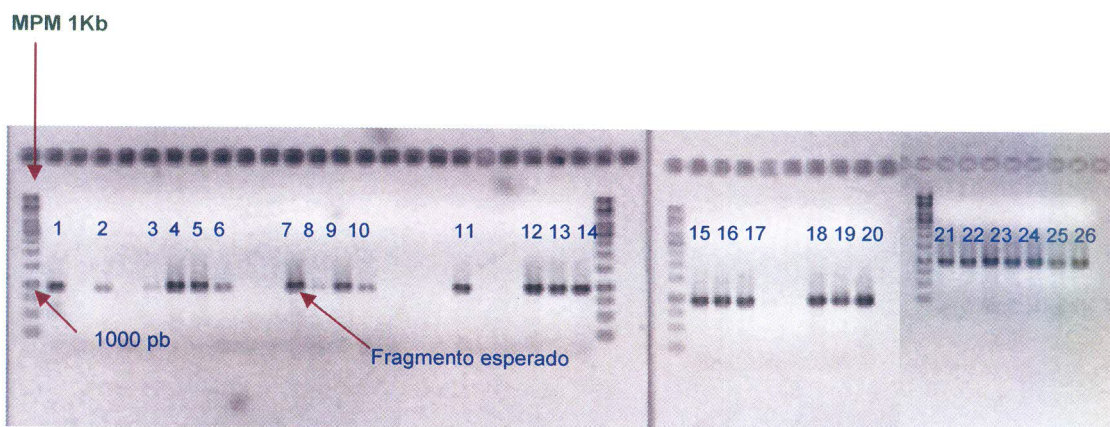


Figura 13. Productos de amplificación del fragmento *TrnL-F* en DNA de cloroplastos de algunos de los materiales considerados. De izquierda a derecha: 1) Olanca, 2) *B. anay*, Fredy, 3 y 4) San Cristóbal Mercado, 5) *P. schiedeana*, 6) Olanca, 7) Cima de Coppey, 8) Fredy, 9) Tetiz, 10 y 11) Ixtapan de Oro, 12) Olanca, 13) Tochimilco, 14) Vargas, 15) *B. anay*, 16) Martín Grande, 17) *P. steyermarkii*, 18) Olanca, 19) *P. cinerascens*, 20) Tepetl, 21) Yaruche, 22) Lino Ixtapan, 23) Nubes, 24) Vargas, 25) *P. sp.* 26) Marichal, 27) *P. chamisonis*. MPM de 1Kb de Fermentas. El fragmento esperado se señala con flechas.

4.5 Secuenciación del fragmento *TrnL-TrnF* del DNA de cloroplastos.

Se obtuvieron las secuencias del fragmento *TrnL-TrnF* de cpDNA en ambas cadenas para los 23 materiales considerados en el trabajo, estos fragmentos presentaron una longitud aproximada de 850 pb.

4.5.1 Resultado del análisis de secuencias en fragmentos *TrnL-TrnF* de DNA de cloroplastos.

Con el análisis de las secuencias descrito líneas atrás, se obtuvieron dos grupos bien diferenciados (Figura 14), los cuales representan al subgénero *Persea* y subgénero *Eriodaphne* con base en los materiales utilizados. El primer agrupamiento corresponde al subgénero *Persea* y contiene la mayoría de los genotipos, este a su vez se subdivide en varios subgrupos. En el primer

subgrupo de *Persea*, se encuentran representantes de las tres razas de aguacate y especies afines tales como *P. nubigena*, *P. shiedeana*, *P. floccosa* y el híbrido Martín Grande, este híbrido (híbrido de *P. schiedeana* x *P. americana*) comparte este sub-agrupamiento con Palestre (RG), lo cual tiene correspondencia con lo encontrado por Ashworth y Clegg (2003); es decir, existe relación entre híbridos de la raza Guatemalteca y raza Mexicana con *P. schiedeana*.

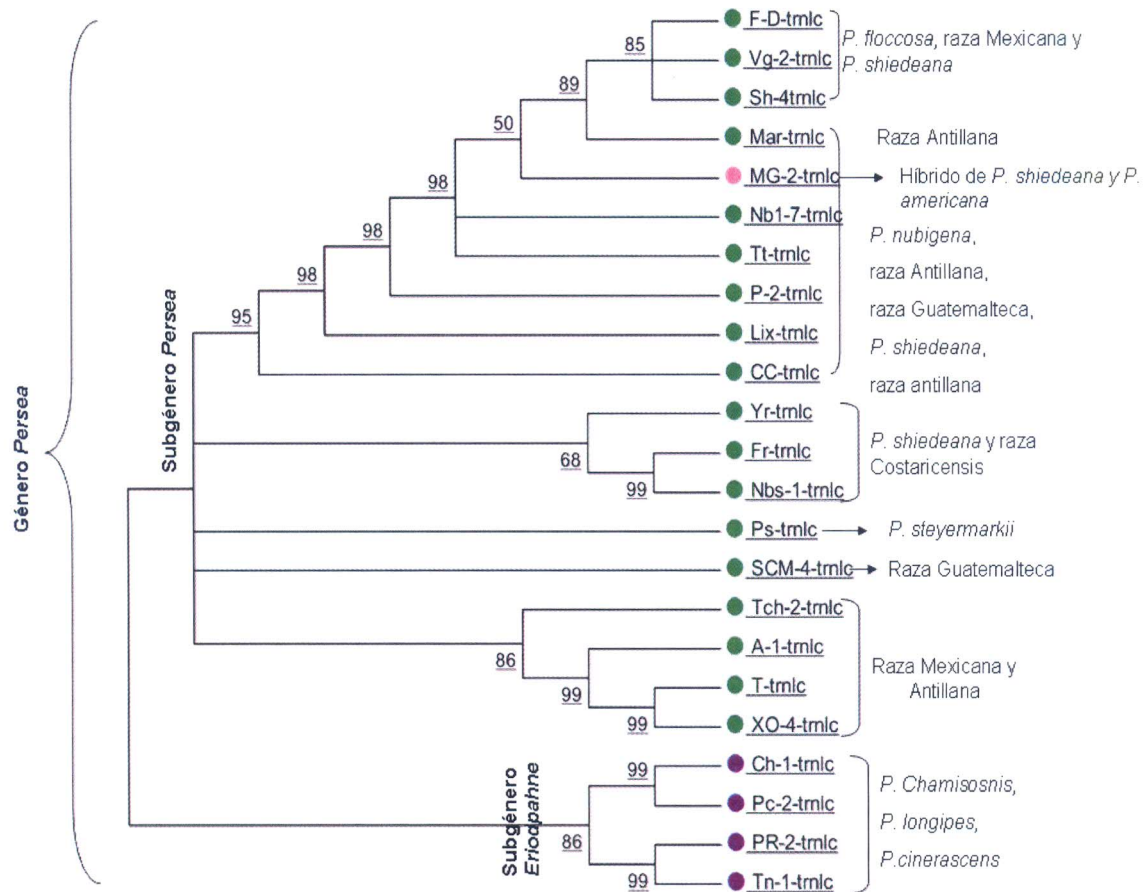


Figura 14. Agrupamiento filogenético de 23 representantes del género *Persea* con base en la comparación de secuencias del fragmento *TrnL-TrnF* del cpDNA.

Se observa también en este sub-agrupamiento, que representantes de la raza Antillana y la raza Mexicana muestran correspondencia con lo propuesto por García e Ichikawa (1979) en el sentido de que *P. americana* var. *americana* (raza Antillana) pudo haber emergido como un híbrido, de *P. americana* var. *drymifolia* (RM) y *P. schiedeana*. En otras palabras, este sub-grupo se mantiene como tal en nuestros análisis debido en parte a la información genética compartida en la secuencia de DNA analizada. El subgrupo dos se conformó por los dos representantes de la raza Constaricensis (Fredy y Las nubes) junto a un *P. schiedeana* (Yaruche), este sub-agrupamiento no coincide con lo encontrado por Shieber (citado por Bergh *et al.*, 1987) porque consideran que *P. schiedeana* dio origen a la raza antillana; de ser así, se hubiera observado mayor relación con algún representante de dicha raza, por ejemplo: Marichal (Mar) Tetiz (Tt) y Antigua (A-1) en nuestros resultados. Por otro lado, Ashworth y Clegg (2003) analizando marcadores moleculares tipo microsatélites encontraron que *P. shiedeana* esta relacionada de manera mas cercana a cultivares híbridos de raza Mexicana mezclados con raza Guatemalteca. Observación que es más consistente con nuestros análisis. Como parte de este gran subgrupo se encuentran, como se ha indicado un *P. floccosa* (F-D), un representante de la raza Mexicana (Vg-2) y un *P. schiedeana* (Sh-4), agrupados de manera conjunta; esto sugiere mayor parecido en esta región del cloroplasto. La conformación de este subgrupo puede explicarse si se toma en consideración lo que algunos autores mencionan, que *P. floccosa* es ancestro de la raza Mexicana (Scora y Bergh 1990) y que la raza Antillana se originó por la raza Mexicana y *P. schiedeana*, (García e Ichikawa 1979). Por otro lado,

algunos autores han considerado que *P. nubigena* y *P. steyermarkii* dieron origen a la raza Guatemalteca (Schieber y Zentmyer 1978; Furnier *et al.*, 1990), por esta razón ambas pudieron haberse incluido dentro de este subgrupo, compartiéndolo como se ha indicado, con un representante de la raza Guatemalteca. Por otra parte, *P. steyermarkii* (Ps) y San Cristóbal Mercado (SCM) (RG) que se encuentran dentro del subgrupo de *Persea* no están incluidos dentro de los otros sub-agrupamientos que se han descrito. Al respecto, Schieber y Zentmyer (1978) y Furnier *et al.* (1990), consideran que *P. steyermarkii* también dio origen a la raza Guatemalteca, así que, aunque no formaron parte de un subgrupo dentro del subgénero *Persea*, ambos materiales han sido relacionados con anterioridad. Finalmente dentro del subgrupo de *Persea* se encuentra el grupo conformado por representantes de la raza Mexicana (Tch, T, XO) y un antillano (A-1), lo que es consistente con lo propuesto por García e Ichikawa (1979) en el sentido de que *P. americana* var. *americana* (raza Antillana) pudo haber surgido como un híbrido de *P. americana* var. *drymifolia* (RM) y *P. schiedeana*; es decir, en este subgrupo muestra con mayor claridad las relaciones cercanas entre antillanos y mexicanos, si damos por hecho, que la raza Mexicana dio origen a la Antillana. Sin embargo la ubicación de *P. schiedeana* dentro de este grupo se puede explicar debido a la hibridación que se ha dado desde hace cientos o miles de años atrás, o quizás también a hibridaciones recientes. Por lo tanto, el que algunos materiales se hayan agrupado de manera intermedia o incluso de forma inesperada, se pudo deber a las hibridaciones ocurridas de manera natural y por la intervención del hombre, a lo largo del tiempo. Por otra parte, dentro del otro grupo principal,

quedaron claramente definidos los representantes del subgénero *Eriodaphne*, coincidiendo esto con la actual clasificación del género (Kopp 1966; van der Werff 2002). Por lo tanto, el análisis de los fragmentos *Tml-f* pudieron diferenciar a los dos subgéneros de *Persea* sin dificultad (*Persea* y *Eriodaphne*) mediante sus respectivos representantes.

Por otra parte, es necesario resaltar que a partir del alineamiento con secuencias de la base de datos del NCBI, se bajaron secuencias que mostraban tener gran similitud con las nuestras, estas son pertenecientes al género *Sassafras* así como también se bajo la secuencia reportada para *P. americana*. En un inicio se integraron a nuestro alineamiento, pero no fue posible separar este género dentro de nuestro árbol filogenético debido a su gran similitud y la secuencia reportada como perteneciente a *P. americana* parecía lo suficientemente diferente como para no agruparse dentro del conjunto del subgénero *Persea*. Finalmente se decidió no incluirlas para nuestros análisis, sin embargo estas secuencias fueron útiles para identificar que el fragmento amplificado fuera el esperado.

V. CONCLUSIONES

El análisis de secuencias de la región *TmL-TmF* permitió diferenciar a los representantes de los dos subgéneros de *Persea*: *Eriodaphne* y *Persea*.

Con el análisis de las secuencias de la región *TmL-TmF* no fue posible separar de forma definida las tres razas de aguacate.

La ubicación conjunta de los representantes de *P. schiedeana* y de las razas Antillana, Mexicana y Costarricenses en el árbol filogenético, sugiere que esta especie pudo ser producto de la hibridación natural o fitomejoramiento, tal y como se ha sugerido en estudios anteriores.

Los grupos conformados por los representantes del subgénero *Eriodaphne* (*P. chamisinis*, *P. longipes* y *P. cinerascens*) y los materiales pertenecientes a la raza Antillana y Mexicana (Tch-2, A-1, T-t y XO-4), así como los conformados por *P. floccosa*, raza Mexicana, *P. floccosa* y *P. schiedeana* (F-D, Vg-2 y Sh-4) y *P. schiedeana*, y la Raza constarricensis (Yr, Fr, y Nbs) dentro del subgrupo de *Persea*, se mantuvieron agrupados consistentemente en los diferentes árboles filogenéticos ensayados.

El híbrido Martín Grande tal como se esperaba, se agrupó con representantes de *Persea schiedeana* y *Persea americana*.

Para poder inferir el proceso evolutivo ocurrido en los representantes de *Persea* considerados para este trabajo, es necesario comparar otras regiones conservadas o genes del DNA.

VI. PERSPECTIVAS

Para México como centro de origen y dispersión del aguacate (y de otros cultivos de importancia agrícola), es indispensable utilizar las herramientas tecnológicas de vanguardia tales como la biotecnología para el reconocimiento de su diversidad, conservación y protección. En la actualidad, los estudios sobre filogenia están acompañados de la utilización conjunta de una amplia diversidad de técnicas, que van desde las morfológicas hasta la secuenciación de genes o zonas conservadas de DNA nuclear, de cloroplastos o mitocondrias, y que se utilizan según el objetivo o los alcances de estudio. Este trabajo, es continuación de otros relacionados con este cultivo, que han partido de utilizar características morfológicas, marcadores moleculares tales como RAPDs e ISSRs, hasta la secuenciación de zonas conservadas en el genoma de cloroplastos, y se considera seguir complementando y corroborando esta información mediante la aplicación de diferentes técnicas moleculares. Quizás una próxima herramienta, sea la secuenciación de zonas codificantes útiles para filogenia en donde se consideren los tres genomas que posee una planta. La traducción de zonas codificadoras de proteínas puede ser de mayor utilidad para estudios de filogenia, porque es más fácil de manejarlas para su análisis, y más confiable debido a que son regularmente de menor tamaño que una secuencia anónima de DNA.

VII. LITERATURA CITADA

- Ainouche, M. L., and R. J. Bayer. 1997. On the origins of the tetraploid *Bromus* species. Insights from ITS sequences of nr DNA. *Genome* 40: 730-743.
- Alberts, B., Johnson A., Walter P., Lewis J., Raff M., and Roberts K. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Pub. pp. 723-895
- Allen, C. K. 1945. Studies in the Lauraceae VI. Preliminary survey of the Mexican and Central American species. *J. Arnold Arbor.* 26: 280-434.
- Alphey, L. 1997. PCR-based method for isolation of full-length clones and splice variants from cDNA libraries. *Biotechniques* 22:481-486.
- Arnheim, N. 1983. Concerted evolution of multigene families, In: *Evolution of Genes and Proteins*. Nie, M., and R. K. Kehn (eds.). Sundeland: Sinauer, MA. U.S.A. pp. 38-61.
- Ashworth, V. E. T., and M. T. Clegg. 2003. Microsatellite markers in *Avocado* (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated *Avocado* genotypes. *J. Heredity* 94: 407-415.
- Awise, J. C. 1989. Gene-trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. *Evolution* 43: 1192-1208.
- Ayala, F. J., W. M. Fitch, and M. T. Clegg. 2000. *Variation and evolution in plants and microorganisms: Toward a new synthesis 50 years after Stebbins*. National Academy Press, Washington, D.C., U.S.A. 300 p.
- Bailey, C. D., T. G. Carr, S. A. Harris, and C. E., Hughes. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy and pseudogenes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 435-455.
- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants an example from the compositae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 3-16.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell, and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear

- ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Barrientos P., A. F., y López L., L. 2000. Historia y genética del aguacate. En: *El Aguacate y su Manejo Integrado*. Téliz D. (Ed.). Editorial Mundi-Prensa, México. pp. 3-15.
- Barrientos P., F. A., A. D. Ben -Ya'cov, T. E. Cruz, L. L. López , G. Bufler y M. W. Borys . 1991. Descriptores para aguacate. Fundación Salvador Sánchez Colín. CICTAMEX S. C. México. 69 p.
- Barton, N. H., and P. D. Keightley. 2002. Understanding quantitative genetic variation. *Nat. Rev. Genet.* 3(1) : 11-21.
- Becerra V.; Paredes P. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica.* 60: 270-281.
- Ben-Ya'acov, A., G. Bufler, A. F. Barrientos-Priego, E. de la Cruz-Torres, and L. López-L. 1992. A study of avocado germplasm resources, 1988-1990. I. General description of the international project and its findings. *Proc. of Second World Avocado Congress II*: 535-541.
- Bergh, B. 1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 76: 61-75.
- Bergh, B. O., R. W. Scora, and W. B. Storey. 1973. A comparison of leaf terpenes in *Persea* subgenus *Persea*. *Bot. Gazette* 134: 130-134.
- Bergh, B., and N. Ellstrand. 1987. Taxonomy of the Avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 70: 135-145.
- Bloch, R. 2006. La biodiversidad, un nuevo recurso estratégico. *Agenda Internacional.* 9:74-101. Disponible en: <http://www.agendainternacional.net/numerosAnteriores/n9/0907.pdf>. Fecha de consulta 21 de enero de 2007
- Bringhurst, R. 1954. Interspecific hybridization and chromosome numbers in *Persea*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 63: 239-242.
- Brown, S. M. 2000. Get your bioinformatics on the Web!. *Biotechniques.* 28:244-246.

- Buckler, E. S., I. V. Ippolito A., and T. P. Holtsford. 1997. The Evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetics implications genetics. *Genetics* 145: 821-832.
- Burd, M. 2000. Adaptation and constraint: Overview. *Encyclopaedia of Life sciences*. <http://www.els.net>. Fecha de consulta: 16 de marzo de 2007
- Bush, R. M. 2001. Predicting adaptive evolution. *Nat. Rev. Gen.* 2: 387-392.
- Campbell, C. S., M. F. Wojciechoeski, B. G. Balwin, A. A. Laurence, and M. J. Donoghue. 1997. Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Mol. Biol. Evol.* 14: 81-90.
- Campos R., T. Terrazas, y A. López-Mata. 2007. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: Hypothesis of species relationships. *Gen. Res. Crop Evol.* 54: 249-258.
- Chanderbali, A. S., H. Van der Werff, and S. S. Renner. 2001. The relationships and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 88: 104-131.
- Clegg, M. T., B. S. Gaunt, G. H. Learn Jr, and D. R. Morton. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 6795-6801.
- Clegg, M. T., B. S. Gaut, M. R. Duvall, and J. Davis. 1993. Inferring plant evolutionary history from molecular data. *New Zealand J. Bot.* 31: 307-316.
- Clegg, M. T., G. H. Learn, and E. M. Golemberg. 1991. In evolution at the molecular level. Selander, R. K., Clark A. G., and T. S. Whittam (eds.). Sinauer-Sunderland, MA, U.S.A. pp. 135-149.
- Coy B., D. E. y L. E. Cuca S. 2007. Metabolitos secundarios con actividad biológica aislados de especies pertenecientes a la familia Lauraceae. *Scentia et Technica.* 33: 363-364
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press. New York. U.S.A. 1262 p.

- Cupples, C. G. 2001. Mutagenesis mechanisms. Encyclopaedia of life sciences. <http://www.els.net>. Fecha de consulta: 5 de enero de 2007.
- Curtiss, S. E., and M. T. Clegg. 1984. Molecular evolution of chloroplast DNA sequence. *Mo. Evol.* 1: 291-301.
- Darlington, C. D., and A. P. Wylie. 1956. *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. 2ª Ed. London. George Allen & Unwin Ltd. New York, U.S.A. 520 p.
- García V., A. 1978. El análisis de los recursos genéticos disponibles en México: El Aguacate. SOMEFI. Chapingo, México. 13 pp.
- Davies, J., D. Henderson, M. Kobayashi., and M. T. Clegg. 1998. Genalogical relationships among cultivated avocados as revealed through RFLP analysis. *J. Heredity*. 89:319-323.
- Denduangboripant, J., and Q. C. B. Cronk. 2000. High intraindividual variation in internal transcribed spacer sequences in *Aeschynanthus* (Gesneriaceae): implications for phylogenetics. *Proc. Roy. Soc. London* 267: 1047-1415.
- Dieckmann, U., and M. Doebeli. 1999. On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* 400:353-357.
- Dobzhansky, T. 1982. *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press. New York, U. S. A. 364 p.
- Downie, S. R., and J. D. Palmer. 1992. Use of chloroplast DNA rearrangements in reconstructing plant phylogeny. In: *Molecular Systematics of Plants*. Soltis P. S., Soltis D. E. y Doyle J. J. (eds.). Chapman & Hall Inc., New York, U.S.A. pp. 14-35.
- Doyle, J. J. 1992. Gene trees and species trees: Molecular y systematic as one-character taxonomy. *Syst. Bot.* 17: 144-163.
- Eklund, H. 2000. Lauraceous flowers from the Late Cretaceous of North Carolina, U.S.A. *Bot. J. Linn. Soc.* 132: 397-428.
- Eklund, H., and Kvacek, J. 1998. Lauraceous inflorescences and flowers from the cenomanian of Bohemia (Czech Republic, Central Europe). *Int. J. Plant Sci.* 159: 668-686.
- Fiedler, J., G. Bufler, and F. Bangerth. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea Americana* mill.) using RAPD markers. *Euphytica*. 101: 249-255.

- Franco, M. L., J. F. Cediell, y C. Payán. 2008. Breve historia de la bioinformática. *Colombia Médica*. 39:117-120.
- Fuertes A., J, and G. Nieto F. 2003. Additive polymorphisms and reticulation in an ITS phylogeny of thrifts (*Armeria* Plumbaginaceae). *Mol. Phyl. Evol.* 28: 430-447.
- Furnier, G. R., M. P. Cummings, and M. T. Clegg. 1990. Evolution of the avocados as related by DNA restriction fragment variation. *J. Heredity*. 81: 183-188.
- Gallo, L., C. Donoso, y P. Donoso. 2004. Variación en *Nothofagus nerviosa* (Phil.). Dim. Et. Mil. (N. alpina, N. procera). En: Variación intraespecífica en especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Bosque nativo. Donoso, C., A. Premali, L. Gallo y R. Ipinza (Eds.). Editorial Universitaria. Santiago de Chile, Chile. pp. 115-139.
- García V, A. 1978. El análisis de los Recursos Genéticos Disponibles en México: El Aguacate. Chapingo México 13 p.
- García, A. 1970. Estudio botánico-citológico del "Canelillo" (*Persea* af. *cinerascens*, Blake) y su posible utilización. *Agrociencia* 5: 119-127.
- García, A. 1972. Estudio citológico del "chinini" (*Persea schiedeana*). *Agrociencia* 8: 67-72.
- García, A. 1975. Cytogenetical studies in the genus *Persea* (Lauraceae). I. Karyology of seven species. *Can. J. Genet. Cytol.* 17: 173-180.
- García, A., and S. Ichikawa. 1979. Cytogenetical studies in the genus *Persea* (Lauraceae). II. A comparative morphological study on 61 avocado strains. *Japan. J. Breedings* 29: 66-76.
- Gaut, B. S. 1998. Molecular clocks and nucleotide substitution rates in higher plants. *Evol. Biol.* 30:93-120.
- Goodman J., J. Czelusniak, G. W. Moore, A. E. Romero-Herrera, and G. Matsuda. 1979. Fitting the gen lineage into its spaces lineages: A parsimony strategy illustrated by cladograms constructed from globing sequences. *Syst. Zool.* 28: 132-168.

- Grant, D., and R. C. Shoemaker. 2000. Plant gene mapping techniques. Encyclopaedia of life sciences. <http://www.els.net>. Fecha de consulta: 25 de mayo de 2007
- Grant, V. 1989. Especiación Vegetal. México. Limusa, México, D.F. 578 p.
- Halffter, G. y E. Ezcurra. 1992. ¿Qué es la Biodiversidad?. En: La Diversidad Biológica de Iberoamérica. G. Halffter (Compilador). CYTED-D, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. I. Acta Zoológica Mexicana. Volumen Especial. pp 3-24.
- Harrison, R. M. 2001. Variation within species: Introduction. Encyclopaedia of life sciences. <http://www.els.net>. Fecha de consulta: 2 de abril de 2007
- Hershkovitz, M. A., E. A. Zimmer E. A., Hanh, W. J., 1999. Ribosomal DNA sequences and angiosperm systematics. In: Hollingsworth P.M., Bateman, R.M., Gornall, R.J. Eds. Molecular and Systematics and Plant Evolution. Taylor y Francis , London, pp.268-326.
- Hershkovitz, M. A., and E. A. Zimmer. 1996. Conservation patterns in angiosperm rDNA-ITS2 sequences. Nucleic Acid Research 24: 2857-2867.
- Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable. 1996. Molecular Systematics. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA., U.S.A. 655 pp.
- Howard, D. J. 2000. Speciation: Allopatric. Encyclopedia of Life Sciences/www.els.net. Fecha de consulta: 10 de marzo de 2007.
- Jeffries, M. 1997. Biodiversity and conservation. Ed. Routledge. London, England. 208 pp.
- Johnston, M. O. 2001. Mutations and new variation: Overview. Encyclopaedia of life sciences. <http://www.els.net>. Fecha de consulta: 25 de abril de 2007
- Karp A., and K. J. Edwards. 2000. Molecular in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. In: Techniques for analysis, characterization and conservation of plant genetic resources. IPGRI. pp. 1-47.

- Karp, A., and K. J. Edwards. 1998. DNA markers: a global overview. En: DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews. Caetano-Anollés G. y P. M. Gresshoff. (eds.). Editorial Wiley, Nueva York, U.S.A. pp. 1-13.
- Khanuja P.S.S. , Shasany K.A. Darokar M.P. and Kumar S. 1999. Rapid Isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporter. 17: 1-7.
- Knight, R. J. Jr, 1999. Genes diversity in Avocado. In: Proceedings of avocado Brainstorming '99. Riverside, CA., U.S.A. California Avocado Commission and University of California. pp.16-18.
- Kondrashov, A. S., and F. A. Kondrashov. 1999. Interactions among quantitative traits in the course of sympatric speciation. Nature 400: 351-354.
- Kopp, L. E. 1966. A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western Hemisphere (*Persea*-Lauraceae). Memoirs of the New York Botanical Garden 14: 1-120.
- Korol A, Rashkovetsky E, Iliadi K, Michalak P, Ronin Y, Nevo E (2000). Nonrandom mating in *Drosophila melanogaster* laboratory populations derived from closely adjacent ecologically contrasting slopes at 'Evolution Canyon'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 12637–12642.
- Kuzoff, R., J. Sweere, D. Soltis , P. Soltis y E. Zimmer. 1998. The Phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants. Molecular Biology Evolution. 15: 251:263.
- Kuzoff, R.K., Soltis, D.E., Hufford, L., Soltis, P.S., 1999. Phylogenetic relationships within *Lithophragma* (Saxifragaceae) hybridization, allopolyploid and ovary diversification. Syst. Bot. 24, 598–615.
- Lavi, U., J. Hillel, A. Vainstein, E. Lahav, and D. Sharon. 1991. Application of DNA fingerprints for identification and genetic analysis of avocado. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116: 1078-1081.

- Leemans, R. 1999. Modelling for species and habitats: new opportunities for problem solving. *Sci. Total Environ.* 240: 51–73.
- Litz, R. 2001. Fusión de protoplastos en aguacate. In: *Memorias Primer Congreso Mexicano-Latinoamericano de aguacate*. Uruapan, México. pp. 145-150.
- Liu, J. S. and C. L. Scharal. 1994. A conserved sequence in the internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. *Plant Molecular Biology* 26: 775-778.
- López, V. E., y P. Gómez-Puertas. 2005. Bioinformática, la información al servicio de la ciencia. *Física y Sociedad*. 16:46-50.
- Luscombe, N. M., D. Greenbaum, and M. Gerstein. 2001. What is Bioinformatics? A Proposed Definition and Overview of the Field. *Method. Inform. Med.* 40:346-58.
- Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 74: 560-564.
- Mayer, M. S., and P. S. Soltis. 1999. Intraespecific phylogeny análisis using ITS sequences: insights from studies of the *Streptanthus glandulosas* complex (Cruciferae). *System. Bot.* 24: 47-61.
- Mayol, M., and J. A. Rosselló. 2001. Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 19:167-176.
- Mayr, E. 1997. The objects of selection. *Proceedings of the National Academy Science. U.S.A.* 94: 2091-2094.
- McCarthy, E. M., M. A. Asmussen, and W. W. Anderson. 1995. A theoretical assessment of recombinational speciation. *Heredity* 74: 502-509.
- McNeely, J. A., K. R. Miller, W. V. Reid, R.A. Mittermeier, and T. B. Werner. 1990. *Conserving the world's biological diversity*. IUCN, WRI, CI, WWF-US, and WB. Gland, Switzerland and Washington, D. C., U.S.A. 193 p.
- Mhameed, S., D. Sharon, D. Kaufmann, E. Lahav, J. Hillel, C Degani, and U. Lavi. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea Americana* Mill.) and between species. *Theor. Appl. Genet.* 94: 279-286.

- Mijares, O. P., y L. López L. 1998. Variedades de Aguacate y su producción en México. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S. C. Coatepec Harinas, Edo. de México, México. pp 23-32.
- Moritz, C., y D.D. Hillis.1996. Molecular systematics: context and controversies. *In: Molecular Systematics*. Hillis, D. M., C. Moritz, and B. K. Mable (eds.) Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA. U.S.A. pp. 1-12.
- Mosseau, T. A., and A. E. Olvido. 2001. Geographical variation. *Encyclopaedia of life sciences*. <http://www.els.net>.
- Musters, W., K. Boon, C. A. F. M. Van der Sande, H. Van Heerikhuizen, and R. J. Planta. 1990. Functional analysis of transcribed spacer of yeast ribosomal DNA. *EMBO J.* 9: 3989-3996.
- Myers, N., and A. H. Knoll. 2001. The biotic crisis and the future of evolution. *Proceedings of the Nacional Academy Science*. U.S.A. 98: 5389-5392.
- NCBI. Bioinformatics. (Fecha de acceso junio 12 de 2008). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/bioinformatics.html>
- NCBI. Bioinformatics. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/bioinformatics.html>. Fecha de consulta: 10 de junio de 2008.
- Núñez, I., E. Gonzáles G. y A. Barahona. 2003. La biodiversidad: Historia y contexto de un Concepto. *Interciencia* 28(7): 387-393.
- O'Hara, R. J. 1993. Systematic generalization, historical fate, and the species problem. *Syst. Biol.* 43: 231-246.
- Otte, D. 2001. Species and speciation. *Encyclopedia of life sciences*. [www://www.els.net](http://www.els.net). Fecha de consulta: 2 de diciembre de 2007
- Pamilo, P., and M. Nei. 1998. Relationships between gene-trees and species-trees. *Mol. Biol. Evol.* 5: 568-583.
- Paz M. M. y Alvaro I. 2001. Notas preliminares sobre las tecnicas de amplificación y variación de la región ITS (Internal Trascripted Spacer) en el género *Encalypta* (Encaliptaceae, Bryophyta). *Botanica Complutenses*. 25: 233-239.

- Perezleo, S. L., R. A. Jorge, C. C. González, G. A. Veloz, y J. A. Ruiz. 2003. Impacto de la Bioinformática en las ciencias biomédicas. ACIMED (*on line*). 11 (4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352003000400007&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1024-9435. Fecha de consulta: 10 de junio de 2008.
- Phillips, W., H. Rodríguez, and P. Fritz. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie Técnica. Informe Técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.
- Pomp D. y Medrano, J.F. 1991. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. Bio. Techniques 10: 58-59.
- Powell, W. 1992. Plant genomes, gene markers, and linkage maps. In Biotechnology and Crop Improvement in Asia. Moss, J. P. (ed.). International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Patancheru, India. pp. 297-322.
- Rallo, P.; A. Belaj, R. De La Rosa, e I. Trujillo. 2000. La biotecnología prepara el olivo del siglo XX. Córdoba, España. Consultado 23 mayo 2008. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm Fecha de consulta: 9 de agosto de 2007
- Reeve, H. K., and P. W. Sherman. Adaptations: Meanings. Encyclopaedia of Life sciences. <http://www.els.net>. Fecha de consulta: 27 de junio de 2007
- Renner, S. S. 1997. Laurales, Angiosperms, Plant Classification. Encyclopedia of Life Sciences. Available at: <http://www.umsl.edu/~renners/Laurales.ELS.pdf>. Fecha de consulta: 28 de septiembre de 2007
- Renner, S. S. 2001. Laurales. Encyclopaedia of life sciences. <http://www.els.net>.
- Reznick, D. 2001. Natural selection: Introduction. Encyclopaedia of life sciences. <http://www.els.net>. Fecha de consulta: 19 de mayo de 2007

- Rhodes, A. M., S. E. Malo, C. W. Campbell, and S. G. Carmer. 1971. A numerical taxonomic study of the avocado (*Persea americana* Mill.). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 96: 391-395.
- Rieseberg, L. H., and M. C. Ungerer. 2001. Speciation: genetics. Encyclopedia of Life Sciences/www.els.net. Fecha de consulta: 18 de septiembre de 2007
- Rochambeau, H., F. Fournet-Hanocq, and V. T. Khang. 2000. Measuring and managing genetics variability in small populations. Ann. Zootech. 49:77-93.
- Rodríguez-Medina N. N., W. Rhode, C. González-Arencibia, I. M. Ramírez-Pérez, J. L. Fuentes-Lorenzo, M. A. Román- Gutiérrez, X. Xiqués-Martín, D. Becker y J. B. Velázquez-Palenzuela. 2003. Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill) en Cuba. In: Proceedings of the 5th World Avocado Congress, Malaga, Spain, 1:47-53.
- Rohwer, J. 1993. Lauraceae. In: The Families and Genera of Vascular Plants. Kubitzki, K., J. G. Rohwer, and V. Bittrich, (eds.) Springer-Verlag. Berlin, Germany. 2: 366-391.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de Mexico. Editorial Limusa. México, D. F. 432 p.
- Sanderson, M. T., and J. J. Doyle. 1992. Resonstruction or organismal and gen phylogenies from data of multioigen families: Concerted evolution, homoplasy and confidence. Syst. Biol. 41: 14-17.
- Sanger, F., and A. R. Coulson. 1977 A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 560–564
- Sarukhán, J. 1998. Los tipos de vegetación arbórea de la zona calida-húmeda de México. En: Manual para la Identificación de los Principales Árboles tropicales de México. Pennington, T. D. y J. Sarukhán (eds.). Instituto nacional de Investigaciones forestales-FAO, México, D. F. pp. 3-46.

- Schieber, E., and G. A. Zentmyer. 1978. Hunting for *Persea steyermarkii* in the mountains of Guatemala. Calif. Avocado Soc. Yearbook. 62: 67-71.
- Schroeder, C. A. 1952. Floral development, sporogenesis and embryology in avocado, *Persea americana*. Botanical Gazette 113(3): 270-278.
- Schroeder, C. A. 1990. Useful fruits of avocado relatives. Calif. Avocado Soc. Yearbook 74: 243-245.
- Scora, R. W., and B. O Bergh. 1990. The origin and taxonomy of avocado (*Persea americana* Mill.). Lauraceae. Acta Horticulturae 275: 387-394.
- Sheldon, P. R. 2000. (Fecha de consulta: 15 de enero de 2008) Punctuated equilibrium and phyletic gradualism. Encyclopaedia of life sciences. <http://www.els.net>.
- SIDTA, 1999. Los marcadores moleculares en ingeniería genética y en mejora vegetal. España. (Cosultado 25 de Abril 2007). Disponible en: <http://www.jcyl.es/jcyl/cag/dgiadr/svidta/boletin/dic99/bold.html#los%20marcadores%20moleculares%20en%20ingenieria%genetica>.
- Smith, C. E. Jr. 1966. Archeological evidence for selection in avocado. Econ. Bot. 20: 169-175.
- Smith, C. E. Jr. 1969. Additional notes on preconquest avocados in Mexico. Econ. Bot. 23: 135-140.
- Soltis, D. E., P. S. Soltis, and B. G. Milligan. 1992. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. In: Molecular Systematics of Plants. Soltis, P. S., D. E. Soltis, and J. J. Doyle (eds.). Chapman & Hall Inc. New York, U.S.A. pp. 117–150.
- Soltis, P. S., and D. E. Soltis. 1995. Conservation patterns in angiosperm rDNA ITS2 sequences. An. Missouri Bot. Gard. 82: 147.
- Stebbins, G. L. 1999. A brief summary of my ideas on evolution. Am. J. Bot. 86 (8): 1207-1208.
- Storey, W. B.; B. Bergh, and G. A. Zentmyer. 1986. The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. Calif. Avocado Soc. Yearbook. 70 : 127-143.

- Taberlet, T., L. Gielly, G. Pauton, and J. Bowvent. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Biol. Mol.* 17:1105-1109.
- Tamura K, Dudley J, Nei M y Kumar S. 2007 *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tanksley, S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Rep.* 1: 3-8.
- Téliz O., D., G. Mora A. y L. Morales G. 2000. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. En: *El aguacate y su manejo integrado*. Téliz, D. (Ed.). Ediciones Mundi-Prensa, México; pp 3-15.
- Toledo, A. 1998. Economía de la biodiversidad. PNUMA. Oficina Regional Para América Latina y el Caribe. Red de Formación Ambiental. Serie de textos para la formación ambiental No. 2, México. 48 p.
- Torres, A. M., U. Diedenhofen, B. O. Bergh, and R. J. Knight. 1978. Enzyme polymorphisms as genetic markers in the avocado. *Amer. Bot.* 65:131-139.
- Ungerer, M. C., J. E. Stuart, J. P. Baird y L. H. Rieseberg. 1998. Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:11757-11762.
- Van der Werff, H. 2002. A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central America. *Novon* 12: 575-586.
- Villanueva, M. y S. Verti. 2007. aguacate: oro verde de México, orgullo de Michoacán. En: *Actas del VI Congreso Mundial del Aguacate*. Viña Del Mar, Chile. 12-16 Noviembre. (Fecha de consulta: 29 de abril de 2008) El Disponible en: www.avocadosource.com/WAC6/es/Extenso/5c-234.pdf.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods and applications. Second edition. CR Press. Boca Raton, Florida, U.S.A. pp 24-65.

- Whitlock, M. C., and P. C. Phillips. 1999. (Fecha de consulta: 2 de febrero de 2007) Drift: Introduction. Encyclopaedia of Life sciences. <http://www.els.net>.
- Williams, L. O. 1977. The botany of the Avocado and its relatives. Proceedings of the First International Tropical Fruit Short Course, The Avocado. November 5-10, Sauls JW, Philips RL, Jackson LK, (eds). University of Florida, Gainesville, Florida. USA. pp.9-15.
- Wilson, E. 1997. Introducción. In: Biodiversity II. Understanding and protecting our biological resources. Reaka-Kudla, M. L., D. O. Wilson, and E. O. Wilson (Eds). Joseph Henry Press. Washington D. C., E.E.U.U. pp 1-3.
- Wolfe, K. H. 1991. Mammalian DNA replication: mutation bases and the mutation rate. J. Theor. Biol. 149: 441-451.
- Wolfe, K.H., W-H. Li, and P. M. Sharp. 1987. Rates of nucleotide substitutions vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 84: 9054-9058.
- Wood, T. E., and L. H. Rieseberg. 2001. Speciation: Introduction. Encyclopaedia of Life sciences. <http://www.els.net>. Fecha de consulta: 1 de mayo de 2007
- Zentmeyer, G. A., B. Bergh, and W. B. Storey. 1986. The origin, indigenous range and dissemination of the avocado. Calif. Avocado Soc. Yearbook. 70: 127-133.
- Zentmyer, G. A. 1991. The genus Persea. Calif. Avocado Soc. Yearbook. 75: 119-123.
- Zhang, D., and T. Sang. 1999. Physical mapping of ribosomal RNA genes in Paeonies (*Paeonia*, Paeniaceae) by Fluorescent in situ Hybridization: Implications for Phylogeny and Concerted Evolution. Am. J. Bot. 86: 735-740.

VIII. ANEXO

8.1 Alineamiento de secuencias

```
#NEXUS
BEGIN DATA;
dimensions ntax=26 nchar=971;
format missing=?
symbols="ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ"
interleave datatype=DNA gap= -;

matrix
CC-trn1c      -----GTGGAGGCTGGT-GGAACCTCT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
Fr-trn1c      -----GCTT-G--GAACCTCT--AGTGATAACTTCCAA-TTC
MG-2-trn1c    -----GCTGT--GGAACCTCT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
Ch-1-trn1c    -----CGGTGGTGGCTGT--GGAACCTCT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
PR-2-trn1c    -----GCTGGT--G--GAACCTCT--AGTGATAACTTCCAA-TTC
Nbs-1-trn1c   -----TGGGCTGTT-AGGACCTCT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
XO-4-trn1c    -----GGGGGGCTGATGGAACCTCT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
Nb1-7-trn1c   -----GCTGT--GGAACCTCT--AGTGATAACTTCCAA-TTC
T-trn1c       -----GCTGT--GGAACCTCT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
Tn-1-trn1c    -----TGGTGGCTTT--GGAACCTCT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
P-2-trn1c     -----CGTGGTGGCTGT--GGAACCTCT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
Lix-trn1c     -----GCTGT--GGAACCTCT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
Ps-trn1c      -----TGG-GGCTATA-GGAACCTCT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
SCM-4-trn1c   -----GCTGT--GGAACCTCT--AGTGATAACTTCCAA-TTC
Mar-trn1c     -----GGGGGTT-AAG-CCTCT--CGTGGTA-GTTCCAA-TTC
Pc-2-trn1c    -----TGGTGGCTGGT-GGA-CCTCT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
A-1-trn1c     -----GCTGGT--G--GAACCTCT--AGTGATAACTTCCAA-TTC
Yr-trn1c      -----GCTGGTT-G--GAACCTCT--AGTGATAACTTCCAA-TTC
Vg-2-trn1c    ----GAGGGGCTGTATA-G-GAA-CCTCT--AGTGATAACTTCCAA-TTC
Tch-2-trn1c   -----TGGTGGCTTGTGGAACCTCT--AGTGATAACTTCCAA-TTC
Tt-trn1c      -----GTGGTGGCTGGTTGGAACCTCT--AGTGATAACTTCCAA-TTC
Sh-4trn1c     -----CTACT--AGTGATA-CTTCCAA-TTC
F-D-trn1c     -----CCTTGGGTGTT-GA--CCTCT--AGTGATA-GTTCCAA-TTC

CC-trn1c      AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Fr-trn1c      AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
MG-2-trn1c    AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Ch-1-trn1c    AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
PR-2-trn1c    AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Nbs-1-trn1c   AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
XO-4-trn1c    AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Nb1-7-trn1c   AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
T-trn1c       AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Tn-1-trn1c    AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
P-2-trn1c     AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Lix-trn1c     AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Ps-trn1c      AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
SCM-4-trn1c   AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Mar-trn1c     -GAGAAACCCTGGAATTTAAATGGG-AATCCTGAGCCCAATCCTGTTT-
Pc-2-trn1c    AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
A-1-trn1c     AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Yr-trn1c      AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Vg-2-trn1c    AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Tch-2-trn1c   AGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
```

Tt-trnIc	AGAGAAACCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
Sh-4trnIc	AGAGAAACCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
F-D-trnIc	AGAGAAACCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTT
CC-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGGATAGGT
Fr-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
MG-2-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGGATAGGT
Ch-1-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
PR-2-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
Nbs-1-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
XO-4-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
Nb1-7-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
T-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
Tn-1-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
P-2-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGGATAGGT
Lix-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGGATAGGT
Ps-trnIc	CAGAAAACA-GGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
SCM-4-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGGATAGGT
Mar-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTC-GAAAGCGAGAACCAAAAAA-GGATAGGATAGGT
Pc-2-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
A-1-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
Yr-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
Vg-2-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGGATAGGT
Tch-2-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
Tt-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGGATAGGT
Sh-4trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGGATAGGT
F-D-trnIc	CAGAAAACAAGGGTTCAGAAAGCGAGAACCAAAAAAAGGATAGG-----T
CC-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Fr-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
MG-2-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Ch-1-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
PR-2-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Nbs-1-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
XO-4-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Nb1-7-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
T-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Tn-1-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
P-2-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Lix-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Ps-trnIc	GCAGAGACTCAA-GGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
SCM-4-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Mar-trnIc	GC-GAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Pc-2-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
A-1-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Yr-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Vg-2-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Tch-2-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Tt-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
Sh-4trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
F-D-trnIc	GCAGAGACTCAAAGGAAGCTGTTCTAACGAAT-----GGAGTTGATTA
CC-trnIc	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Fr-trnIc	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
MG-2-trnIc	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Ch-1-trnIc	ACATTGGGATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
PR-2-trnIc	ACATTGGGATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT

Nbs-1-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
XO-4-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Nb1-7-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
T-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Tn-1-trn1c	ACATTGGGATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
P-2-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Lix-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Ps-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
SCM-4-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Mar-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Pc-2-trn1c	ACATTGGGATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
A-1-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Yr-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Vg-2-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Tch-2-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Tt-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
Sh-4trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAAGATGACCCTAT
F-D-trn1c	ACATTGGTATAGGAATCCTTCTATCGAAATTCAGAAAGGATGACCCTAT
CC-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Fr-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
MG-2-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Ch-1-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
PR-2-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Nbs-1-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
XO-4-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Nb1-7-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
T-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Tn-1-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
P-2-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Lix-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Ps-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
SCM-4-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Mar-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCG-TTCCGTA
Pc-2-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
A-1-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Yr-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Vg-2-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Tch-2-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Tt-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
Sh-4trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
F-D-trn1c	CCTATATACGTACTGAAATATCAAACAATTAATCACGATCCGATTCCGTA
CC-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
Fr-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
MG-2-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
Ch-1-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTGTTGTGAATCGATTCCA
PR-2-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTGTTGTGAATCGATTCCA
Nbs-1-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
XO-4-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
Nb1-7-trn1c	TTTTTTTTTATATATATG--AGAATGGA-----TCTTGGATCA-TTCCG
T-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
Tn-1-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTGTTGTGAATCGATTCCA
P-2-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
Lix-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
Ps-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATAGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
SCM-4-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA

Mar-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCG-TTCCA
Pc-2-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTGTTGTGAATCGATTCCA
A-1-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
Yr-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
Vg-2-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
Tch-2-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
Tt-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
Sh-4trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA
F-D-trn1c	TTTTTTTTTATATGA-----AAAATGGAAGAATTCTTGTGAATCGATTCCA

CC-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Fr-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
MG-2-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Ch-1-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
PR-2-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Nbs-1-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
XO-4-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Nb1-7-trn1c	AAT--GAGGACGAATCAT-----ATCTGATCACTC-CTCCTCGGA
T-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Tn-1-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
P-2-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Lix-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Ps-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
SCM-4-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Mar-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATCC---CCTCGGA
Pc-2-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
A-1-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Yr-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Vg-2-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Tch-2-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Tt-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
Sh-4trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA
F-D-trn1c	AATTGAAGGAAGAATCGAATATTCAGTGATCAAATCATTCACTCCTCGGA

CC-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Fr-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
MG-2-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Ch-1-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
PR-2-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Nbs-1-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
XO-4-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Nb1-7-trn1c	-AGATCTTTTGA--GACTGAT--AACGGACGAGAATAAGATCAG--TCCA
T-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Tn-1-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
P-2-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Lix-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Ps-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
SCM-4-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Mar-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Pc-2-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
A-1-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Yr-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Vg-2-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Tch-2-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Tt-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
Sh-4trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA
F-D-trn1c	TAGATCTTTTGAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCA

CC-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Fr-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
MG-2-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Ch-1-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
PR-2-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Nbs-1-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
XO-4-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Nb1-7-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
T-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Tn-1-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
P-2-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Lix-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Ps-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
SCM-4-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Mar-trnlc	TTCTACATGTCT-----
Pc-2-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
A-1-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Yr-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Vg-2-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Tch-2-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Tt-trnlc	TTCTACATGTCAA-----
Sh-4trnlc	TTCTACATGTCAA-----
F-D-trnlc	TTCTACATGTCAATACCGACAACACATGTCAATACCGACAACACATGTCA
CC-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Fr-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
MG-2-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Ch-1-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
PR-2-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Nbs-1-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
XO-4-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Nb1-7-trnlc	---TCCACT-CAATGAATTT---ATGAGGGGAAACCTC---ACTTTAC
T-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Tn-1-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
P-2-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Lix-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Ps-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
SCM-4-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Mar-trnlc	-TCCCGACCACA-TGAATTTTAT-GTAAGGGGAAAA-CCGTCCACTTT-G
Pc-2-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
A-1-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Yr-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Vg-2-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Tch-2-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Tt-trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
Sh-4trnlc	-TACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
F-D-trnlc	ATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAGGGGAAAAATCCGTCGACTTTAG
CC-trnlc	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAAGAGCCC
Fr-trnlc	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAAGAGCCC
MG-2-trnlc	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAAGAGCCC
Ch-1-trnlc	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAAGAGCCC
PR-2-trnlc	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAAGAGCCC
Nbs-1-trnlc	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAAGAGCCC
XO-4-trnlc	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAAGAGCCC
Nb1-7-trnlc	AAGTCG-GAGGGTTCC-GCCCTC--TCCCCAATAAAAAAGAAA---GCC

T-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
Tn-1-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
P-2-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
Lix-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
Ps-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
SCM-4-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
Mar-trn1c	AAATCGTGAGGGTTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
Pc-2-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
A-1-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
Yr-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
Vg-2-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
Tch-2-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
Tt-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
Sh-4trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
F-D-trn1c	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAAAGAAAAGAGCCC
CC-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Fr-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
MG-2-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Ch-1-trn1c	ATTTGACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
PR-2-trn1c	ATTTGACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Nbs-1-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
XO-4-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Nb1-7-trn1c	ATTT--CTACC--TACCTCTTTATTTTCCCC-TCGGTTCCAAATTAGTTA-
T-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Tn-1-trn1c	ATTTGACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
P-2-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Lix-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Ps-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
SCM-4-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Mar-trn1c	ATTT-CTACCACAACCTCTTTATTTTCGTC-TCGGTCC--AAATAGT-AT
Pc-2-trn1c	ATTTGACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
A-1-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Yr-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Vg-2-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Tch-2-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Tt-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
Sh-4trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
F-D-trn1c	ATTTTACTACC-TAACCTCTTTATTTTCGTCATCGGTTCCAAATTAGTTAT
CC-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Fr-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
MG-2-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Ch-1-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
PR-2-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Nbs-1-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
XO-4-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Nb1-7-trn1c	GTTTCT--ATCACTCTACTCTTTTACGA-CGGATCCGGACC--AACCTTT
T-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Tn-1-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
P-2-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Lix-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Ps-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
SCM-4-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Mar-trn1c	GTTTCT-ATTCACTC---TCCTTCAAAACGGATCCGGACAGAA---CT
Pc-2-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
A-1-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCAAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT

Yr-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCACAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Vg-2-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCACAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Tch-2-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCACAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Tt-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCACAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
Sh-4trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCACAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
F-D-trn1c	GTTTCTTATTCACTCTACTCTTTTCACAAACGGATCCGGACAGAAACCTTT
CC-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACAA-TGAACATATA
Fr-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACCAATGAACATATA
MG-2-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTAC--AATGAACATATA
Ch-1-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACAAATGAACATATA
PR-2-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACCAATGAAC-TATA
Nbs-1-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACAAATGAACATATA
XO-4-trn1c	CTCTCTTATCGCAAGTCTATAGATACGATATACTTACAAATGAACATATA
Nb1-7-trn1c	CTCTCTTATCACA-GTCTATCGATACGTT--TCTTACAACTGA-CTTGC-
T-trn1c	CTCTCTTATCGCAAGTCTATAGATACGATATACTTACCAATGAACATATA
Tn-1-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACCAATGAACATATA
P-2-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACAAATGAACATATA
Lix-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACAAATATACTTACCAATGAACATATA
Ps-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATAC-ATATACTTAC-AATGAACATATA
SCM-4-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTAC-AATGAACATATA
Mar-trn1c	TTCTCCTTTTCACAAGTCTATAGACACGATATACTTACAAATGAACATAT-
Pc-2-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACAAATGAACATATA
A-1-trn1c	CTCTCTTATCGCAAGTCTATAGATACGATATACTTACCAATGAACATATA
Yr-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACAAATGAACATATA
Vg-2-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACAAATGAACATATA
Tch-2-trn1c	CTCTCTTATCGCAAGTCTATAGATACGATATACTTCCAA-TGAAC---TA
Tt-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACAAATGAACATATA
Sh-4trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACAAATGAACATATA
F-D-trn1c	CTCTCTTATCACAAGTCTATAGATACGATATACTTACAAATGAACATATA
CC-trn1c	TAGGCAGGAA--TTTCCATTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
Fr-trn1c	T-GGCAGGAA---TTTCCTTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
MG-2-trn1c	T-GGCAGGGA---TTCCCTTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
Ch-1-trn1c	TAGGC-AGGAATTTCC-GTTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
PR-2-trn1c	T-GGCCAGGA---TTCCGTTATTAAATAATTC-CAGTCCATATCATTACT
Nbs-1-trn1c	TAGGCAAGGAA-TTTCCATTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
XO-4-trn1c	TAGGCAAGGAA-TTTCCATTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
Nb1-7-trn1c	TAGGCAAGGC--TTTCCATTATTAA--AATTCCCAG-CCATATCACTACC
T-trn1c	TAGGCAAGGAA-TTTCCATTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
Tn-1-trn1c	T-GGC-AGGAATTTCC-GTTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
P-2-trn1c	TAGGCAAGGAA-TTTCCATTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
Lix-trn1c	TAGGCAAGGAA-TTTCCATTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
Ps-trn1c	TAGGCCAGGAA-TTTC--TTATTAAATAATTCACAGTCC-TATCATTACT
SCM-4-trn1c	TAGGCAGGAA---TTTCCTTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
Mar-trn1c	TAGGCAAGGGA-ATTCCATTATTAAATAATTCACAGTCC-TTATCTTACT
Pc-2-trn1c	TAGGC-AGGAATTGCC-GTTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
A-1-trn1c	T-GGCAGGGA---TTTCCTTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
Yr-trn1c	TAGGCAAGGAA-TTTCCATTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
Vg-2-trn1c	TAGGCAAGGAA-TTTCCATTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
Tch-2-trn1c	TTGGCCAGGAA-TTTCC-TTATTAA-TAATTCACAGTCC-TATCATTACT
Tt-trn1c	TAGGCAAGGAA-TTTCCATTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
Sh-4trn1c	TAGGCAAGGAA-TTTCCATTATTAAATAATTCACAGTCCATATCATTACT
F-D-trn1c	TAGGCAAGGAA--TTTCCTTATTAAATAATTCACAGTCC-TATCATTACT
CC-trn1c	CTTACACTGACAA-GTC-TTCTTTTTGAAGATCCAAGAAA-CTCCCAGGC
Fr-trn1c	CTTACACTGACAAAGTC--TCTTTTTGAAGATCCAAGAAC-CTCC-AGGC

MG-2-trn1c	CTTACACTGACAA-GTC-TTCTTTTTGAAGATCCAGAAA--CTCCCAGGC
Ch-1-trn1c	CTTACACTGACAAAGTC--TTCTTTTTGAAGATCCAAGAAA-CTCC-AGGC
PR-2-trn1c	CTTACACTGACAA-GTC--TCTTTTTGAAGATCCCAGAAA-CTCCCAGGC
Nbs-1-trn1c	CTTACACTGACAAAGTCCTTCTTTTTGAAGATCCAAGAAC-CTCCAGG-C
XO-4-trn1c	CTTACACTGACAAAGTC-TTCTTTTTGAAGATCCAAGAAA-CTCCCAGGC
Nb1-7-trn1c	TTC---CTGACCA--TC--TTCTTTTTGAAGATCACAAA--CTCCCAGG--
T-trn1c	CTTACACTGACAAAGTC-TTCTTTTTGAAGATCCAAGAAA-CTCCCAGGC
Tn-1-trn1c	CTTACACTGACAAAGTC--TCTTTTTGAAGATCCAAGAAA-CTCCAGG--
P-2-trn1c	CTTACACTGACAA-GTC-TTCTTTTTGAAGATCCAAGAAA-CTCCAAGGC
Lix-trn1c	CTTACACTGACAA-GTC-TTCTTTTTGAAGATCCAAGAAA-CTCCCAGGC
Ps-trn1c	CTTAC-CTGACAAAGTC-TTCTTTTTGAAGATCCCAGAAA-CTCC-AGGC
SCM-4-trn1c	CTTACACTGACAA-GTC-TTCTTTTTGAAAATCCAAGAAA-CTCCCAGGC
Mar-trn1c	CTTAC-CCGGCCAAGCCTCTTTTT--AAGATC--AGAAACTCCCAGGGC
Pc-2-trn1c	CTTACACTGACAAAGTC--TTCTTTTTGAAGATCCAAGAAA-CTCCCAGGC
A-1-trn1c	CTTACACTGACAA-GTC-TTCTTTTTGAAGATCCCAGAAA-CTCCAGG--
Yr-trn1c	CTTACACTGACAAAGTC-TTCTTTTTGAAGATCCA-GAAC-CTCC-AGGC
Vg-2-trn1c	CTTACACTGACAAAGTCCTTCTTTTT-GAAGATCCCAGAAACTCCCAGG--
Tch-2-trn1c	CTTAC-CTGACCAAGTC-TTCTTTTTGAAGATCCAAGAAA-CTCCCAGGC
Tt-trn1c	CTTACACTGACAAAGTC-TTCTTTTTGAAGATCCAAGAAA-CTCCAAGGC
Sh-4trn1c	CTTACACTGACAAAGTCCTTCTTTTT-GAAGATCCAAGAAACTCCCAGG-C
F-D-trn1c	CTTAC-CTGACAAAGTCCTTCTTTTTGAAGATCCCAGAAACTCCCAGGGC
CC-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTTTCTTTAAT-GACATAGAC
Fr-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTTTCTTTAATTGACATAGAC
MG-2-trn1c	-TAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTTTCTTTAATTGACATAGAC
Ch-1-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTTTCTTTAATTGACATAGAC
PR-2-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTT-CTTTAATTGACATAGAC
Nbs-1-trn1c	CTAGGTAAGATTTTGTAAGACTTTTTGGGTTCTTTATT--GACATAAC
XO-4-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTTTCTTTAATTGACATAGAC
Nb1-7-trn1c	CTAGGTAGATTTTG--CAAGACGTTTTGGG-TTTCTTGATTGACCTCACC
T-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTTTCTTTAATTGACATAGAC
Tn-1-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGGTTCTTTAATTGACATAGAC
P-2-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTTTCTTTAATTGACATAGAC
Lix-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTT-CTTTAATTGACATAGAC
Ps-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGG-TTCTTTA-TTGACATAGAC
SCM-4-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTTTCTTTAATTGACATAGAC
Mar-trn1c	CCGAAGA---TTTG--TAAACTTTTTGGGGATTTTAGG---ACCTAGAC
Pc-2-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGG-TTCTTTAATTGACATAGAC
A-1-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTT-CTTTAATTGACATAGAC
Yr-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTTTCTTTAATTGACATAGAC
Vg-2-trn1c	CTAGGTAAGATTTG--TAAGACTTTTTGGGGTTTCTTTA--ATTGACAT
Tch-2-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTT-CTTTAATTGACATAGAC
Tt-trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGGTTTCTTTAATTGACATAGAC
Sh-4trn1c	CTAGGTAAGATTTTG-TAAGACTTTTTGGG-TTTCTTTA--ATTGACAT
F-D-trn1c	CTAGGTA-ATTTTG--TAAGACTTTTG-----
CC-trn1c	CC-CAGTCCTCTAATA-----
Fr-trn1c	CC-CCGTCCTCTAATAGGGCGATGCATC-----
MG-2-trn1c	CC-C-GTCCTCTAATAGGGCGATG-----
Ch-1-trn1c	CC-TAGTCCTCTAATAGGGCGA-----
PR-2-trn1c	CC-TAGTCCTCTAATAGGGCGATGCAT-----
Nbs-1-trn1c	CCCCG-CCCTAATAGGG-----
XO-4-trn1c	CCCAG-TCCTCTAATAGGG-----
Nb1-7-trn1c	C--CACTCCTCTGATAAGGCGA-----
T-trn1c	CC-CAGTCCTCTAATAGGGCGATGCATC-----
Tn-1-trn1c	CC-TAGTCCTCTAATAGGGCGATG-----
P-2-trn1c	CC-CAGTCCTCTAATA-----

Lix-trn1c	CC-CAGTCCTCTAATAGGGCGATG-----
Ps-trn1c	CC-CCGTCCTCTAATAGGGCG-----
SCM-4-trn1c	CC-CAGTCCTCTAATAGGGCGAT-----
Mar-trn1c	CCCCCCCCC-----
Pc-2-trn1c	CCCTAGTCCTCTAATAGGGCGATG-----
A-1-trn1c	CC--CGTCCTCTAATAGGGCGATGCAT-----
Yr-trn1c	CC-CCGTCCTCTAATAGGGCGATGCAT-----
Vg-2-trn1c	AGACCCCGTCCTC-----
Tch-2-trn1c	CCCG--TCCTCTAATAGGGCG-----
Tt-trn1c	CC-CAGTCCTCTAA-----
Sh-4trn1c	AG-----
F-D-trn1c	-----

CC-trn1c	-----
Fr-trn1c	-----
MG-2-trn1c	-----
Ch-1-trn1c	-----
PR-2-trn1c	-----
Nbs-1-trn1c	-----
XO-4-trn1c	-----
Nb1-7-trn1c	-----
T-trn1c	-----
Tn-1-trn1c	-----
P-2-trn1c	-----
Lix-trn1c	-----
Ps-trn1c	-----
SCM-4-trn1c	-----
Mar-trn1c	-----
Pc-2-trn1c	-----
A-1-trn1c	-----
Yr-trn1c	-----
Vg-2-trn1c	-----
Tch-2-trn1c	-----
Tt-trn1c	-----
Sh-4trn1c	-----
F-D-trn1c	-----

;
end;