UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS SUBGÉNEROS *Persea* Y *Eriodaphne* (*Persea*; Lauraceae) MEDIANTE SECUENCIAS DE ADN NUCLEAR, MITOCONDRIAL Y DE CLOROPLASTO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
MÉXICO
DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA:

MARÍA EDITH CRUZ MAYA

Chapingo, México. Junio de 2011.

Investigación y Posgrado
Instituto de Horticultura

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS SUBGÉNEROS *Persea* Y *Eriodaphne* (*Persea;* Lauraceae) MEDIANTE SECUENCIAS DE ADN NUCLEAR, MITOCONDRIAL Y DE CLOROPLASTO

Esta tesis fue realizada por María Edith Cruz Maya bajo la dirección del consejo particular que se indica, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR: _____

DR. ALEJANDRO F. BARRIENTOS PRIEGO

ASESOR: _____

DR. JOSE LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ASESOR: _____

DR. JUAN CARLOS REYES ALEMAN

Chapingo, Estado de México, Junio 2011

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para lograr este grado académico.

A la **Universidad Autónoma Chapingo,** en especial al Departamento de Fitotecnia con mucho afecto por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación académica y así cumplir una meta más en mi vida profesional.

A los Doctores **Alejandro F. Barrientos Priego, José Luis Rodríguez de la O, Juan Carlos Reyes Alemán,** a la M**.** en C**. Lily Zelaya Molina** y al **Dr. Rodolfo Salas** por todo su apoyo, disposición y aportaciones en la realización del presente trabajo.

"A cada uno de ustedes muchas gracias por todo. Por la confianza depositada en mí."

DEDICATORIA

A DIOS JEHOVÁ, por haberme dado el don de la vida, por la salud y por permitirme disfrutar día a día de sus maravillas. Por darme la oportunidad de concluir este grado académico.

"Porque Jehová da *sabiduría* y de su boca procede el conocimiento y la inteligencia" Prov. 2:6.

Con todo mi amor y cariño a mi hija **Daniela Yashim,** la luz de mi vida. Por todo su cariño, comprensión y por su apoyo incondicional.

A mis padres: **Carmen y J. Rosario** por la vida que me dieron, por su amor, cariño, comprensión y por todo su apoyo en todos los aspectos de mi vida.

A mis hermanos **Ericka, Eduardo e Itzel**, por ser tan maravillosos y por todos los momentos compartidos.

A mi amiga **Lily X. Zelaya Molina**, una gran persona y compañera, gracias por todo su amistad y apoyo para la realización de este trabajo.

A la **Dra. Antonieta Goytia Jiménez** por su apoyo incondicional y por su amistad sincera.

A mis hermanos en la fe: **Carmen López Márquez y su esposo José Luís Ramírez Landón y sus hijos, Marianita y José Luis.** Gracias por toda su comprensión y apoyo incondicional.

A todos mil gracias de todo corazón. Por ser de gran bendición en mi vida.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor nació el 16 de Junio de 1981 en Texcoco, Estado de México. Realizó sus estudios profesionales en la Universidad Autónoma Chapingo durante los años 2001-2006, en el Departamento de Zootecnia obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo Zootecnista en el año 2008.

En lo referente a su vida profesional ha impartido clases a nivel de preparatoria desde 2006 en el área de Ciencias Naturales. Trabajo dos años en el Centro de Mejoramiento de Maíz y Trigo como Asistente de Biotecnología.

CONTENIDO

	Pág
Índice de cuadros	ii
Índice de figuras	iii
Resumen general	v
General abstract	v
Introducción general	1
Objetivos e hipótesis	5
Capítulo I. Análisis filogenético de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* (*Persea*; lauraceae) mediante secuencias de ADN nuclear, mitocondrial y de cloroplasto	9
Resumen	10
Abstract	10
Introducción	11
Materiales y métodos	15
Resultados	21
Discusión y conclusiones	30
Literatura citada	35
Capítulo II. Inversiones del espacio intergénico *trnH-psbA* para la reconstrucción filogenética del género *Persea* (Lauraceae)	40
Resumen	41
Abstract	41
Introducción	42
Materiales y métodos	44
Resultados	49
Discusión	59
Conclusiones	63
Literatura citada	64
Conclusiones generales	67

ÍNDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1.1.	Ejemplares utilizados en el análisis, registro en el Banco de Germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C., subgénero al que pertenecen y lugar de procedencia.	16
Cuadro 1.2.	Iniciadores utilizados en la amplificación y secuenciación de fragmentos de ADN mitocondrial, nuclear y de cloroplasto.	19
Cuadro 1.3.	Descripción de los alineamientos de las secuencias de los 32 materiales del género *Persea*, y uno de *Beilschmiedia anay*.	22
Cuadro 1.4.	Intervalo de variación de nucleótidos entre las secuencias de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*, y de *Beilschmiedia anay*, en los ocho fragmentos de ADN analizados.	23
Cuadro 2.1	Especies utilizadas en el análisis, registro en el Banco de Germoplasma del CICTAMEX S.C., subgénero al que pertenecen y lugar de procedencia.	45
Cuadro 2.2	Descripción de las secuencias y datos de los alineamientos del fragmento *trnH-psbA* en la *familia* Lauraceae y los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*.	53
Cuadro 2.3.	Descripción de los análisis filogenéticos del fragmento *trnH-psbA* en las familia Lauraceae, el género *Persea* y los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.1.	Árbol filogenético número 13 del gen *matK* generado con el método de máxima parsimonia y 1000 búsquedas heurísticas; el árbol incluye 38 secuencias del Genebank y 12 secuencias de este trabajo, 16 pertenecen al género *Persea* y el resto a diferentes géneros de la familia Lauraceae.	25
Figura 1.2.	Árbol filogenético número 18 de los cinco fragmentos concatenados de cloroplasto generado con el método de Máxima parsimonia y 1000 búsquedas heurísticas.	27
Figura 1.3.	Árbol filogenético número 157 de los ocho fragmentos concatenados.	29
Figura 1.4.	Rama y fruto de *Persea parvifolia* L. Wms.	35
Figura 2.1.	Ubicación de la región *psbA* 3´-UTR del espacio intergénico *trnH-psbA* del genoma del cloroplasto en 39 secuencias representantes de la familia Lauraceae, se marca en un cuadro la región de la inversión de 18-27 pb, que están flanqueadas por una repetición invertida de 13 pb, que presenta algunas mutaciones puntuales.	51
Figura 2.2.	Árboles filogenéticos del espacio intergénico *trnH-psbA* de 131 secuencias de Lauraceae, generados con el método de máxima parsimonia y 1000 búsquedas heurísticas, los valores de “bootstrap” >50 se encuentran por arriba de las ramas.	55
Figura 2.3.	Árbol filogenético del espacio intergénico *trnH-psbA* de 45 secuencias del género *Persea* sin modificación en la región de inversión.	57
Figura 2.4.	Árbol filogenético del espacio intergénico *trnH-psbA* de 45 secuencias del género *Persea* con la región de la inversión en la forma B.	58

Figura 2.5. Árboles filogenéticos la región del *psbA* 3´-UTR de 126 secuencias de Lauraceae, generados con el método de máxima parsimonia y 1000 búsquedas heurísticas, los valores de “bootstrap” >50 se encuentran por arriba de las ramas. 62

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS SUBGÉNEROS *Persea* Y *Eriodaphne* (*Persea*; Lauraceae) MEDIANTE SECUENCIAS DE ADN NUCLEAR, MITOCONDRIAL Y DE CLOROPLASTO

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE SUBGENUS *Persea* And *Eriodaphne* (*Persea*, Lauraceae) USING NUCLEAR, MITOCHONDRIAL AND CHLOROPLAST DNA SEQUENCES

Cruz-Maya, M. E[1]. y Barrientos-Priego, A. F[2]

RESUMEN GENERAL

Persea es uno de los géneros más controversiales dentro de la familia Lauraceae, por las relaciones complejas entre sus dos subgéneros; sugiriendo el origen no monofilético de *Persea*. Se realizó el análisis filogenético de 33 materiales (cinco del subgénero *Eriodaphne*, 28 del subgénero *Persea*), utilizando los genes de cloroplasto *ndhF*, *rbcL*, *matK* y *rpoC* y el espaciador intergénico *trnH-psbA*; el gen nuclear *18s* y los genes mitocondriales *atp4* y *Cox3*. Los análisis del gen *matK* y el de los ocho genes concatenados mostraron la separación de ambos subgéneros de *Persea* en clados independientes, confirmando el origen no monofilético de *Persea* y apoyando la separación de ambos subgéneros en géneros independientes.

Dentro de los genes de cloroplasto, el espacio intergénico *trnH-psbA* fue el más variable. Sin embargo, presenta una zona sujeta a frecuente inversión dentro de la región *psbA*- 3' UTR en múltiples linajes de angiospermas. Se analizaron 131 secuencias de 33 géneros de la familia Lauraceae para evaluar el efecto de la zona de inversión de la región *trnH-psbA* en las relaciones filogenéticas de la familia Lauraceae y en el género *Persea*. Se observó que las relaciones filogenéticas estuvieron determinadas en gran medida por la configuración que presenta la zona de inversión, ya que al modificarla se obtuvo mejor resolución filogenética en ambos casos.

Palabras clave: Aguacate, Angiospermas basales, filogenia.

GENERAL ABSTRACT

Persea is one of the most controversial genera within the family Lauraceae, because the relationships between the two subgenera are very complex; suggesting the origin not monophyletic of *Persea*. It was carried out a phylogenetic analysis with 33 materials (five of the subgenus *Eriodaphne* and 28 of the subgenus *Persea*) was carried out, using the chloroplast genes *ndhF*, *rbcL*, *matK*, *rpoC1*, and the intergenic spacer *trnH-psbA*, the nuclear gene *18s*, and the mitochondrial genes *atp4* and *Cox3*. The *matK* gene analysis and the eight concatenated genes show the separation of both subgenera of *Persea* in separate clades, suggesting that the origin of *Persea* is not monophyletic and therefore *Persea* and *Eriodaphne* subgenera should be recognized as independent genera.

Inside the genes of chloroplast, the intergenic space *trnH-psbA* was the more variable. Nevertheless, it presents a zone holds to frequent investment inside the region *psbA*-3' UTR in multiple lineages of angiospermas. 131 sequences of 33 genera of the family Lauraceae were analyzed to evaluate the effect of the zone of investment of the region *trnH-psbA* in the phylogenetic relations of the family Lauraceae and in the *Persea* genera. It was observed that the phylogenetic relations were determined in great measured by the configuration that presents the zone of investment, since upon modifying it better phylogenetic resolution was obtained in both cases.

Key words: Avocado, basal angiosperms, phylogeny.

[1] Estudiante de la maestría en ciencias en Biotecnología Agrícola. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.
[2] Profesor-Investigador. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.

INTRODUCCIÓN

El género *Persea* pertenece a la familia Lauraceae, actualmente dividida en dos subgéneros, *Persea* y *Eriodaphne* (Koop, 1996; van der Werff, 2002). Las principales características de distinción entre en estos subgéneros son la pubescencia de los tépalos y el tamaño de fruto; el subgénero *Persea* presenta ambas caras de los sépalos pubescentes, mientras que en *Eriodaphne* generalmente solo la cara abaxial de los tépalos es pubescente (Kopp, 1966). Por el tamaño del fruto, el subgénero *Persea* tiene frutos grandes (~7-20 cm) mientras que en *Eriodaphne* los frutos son pequeños (menores a 2 cm).

El género *Persea* tiene alrededor de 85 especies, la mayoría se encuentran desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica (*Persea borbonia*) hasta Chile (*Persea lingue*); las excepciones son *Persea indica* que se encuentra en las Islas Canarias (España) y probablemente otras del sur de Asia. En México se encuentran alrededor de 20 especies, de las cuales cinco pertenecen al subgénero *Persea* y el resto al subgénero *Eriodaphne*.

Dentro del género *Persea*, la especie más importante por su valor socioeconómico es *Persea americana* Mill. (aguacate), la cual se considera tuvo su origen en las partes altas del centro y sur de México y en las partes altas de Guatemala, por lo que México se considera uno de los países con amplia diversidad genética de este cultivo, se considera que este cuenta con mecanismos de adaptación como resistencia al frío, tolerancia a salinidad, así como características de importancia agroindustrial como alto contenido de aceites, resistencia del fruto al transporte (Barrientos-Priego y López-López, 1998) por lo

que se considera una fuente muy valiosa y potencial como recurso filogenético, para su uso en el mejoramiento genético de cultivares, portainjertos e interinjertos que deben conservarse.

Dentro de *Persea americana*, se reconocen además cuatro razas de aguacate: raza Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*), raza Guatemalteca (*Persea americana* var. *guatemalensis*), raza Antillana (*Persea americana* var. *americana*) (Bergh y Ellstrand, 1987) y raza Costaricencis (*Persea americana* var. *costaricensis*) (Ben-Ya'acov *et al*., 1995). Se considera que estas razas son genéticamente equidistantes (Bufler y Fiedler, 1996).

En el caso del subgénero *Eriodaphne* su importancia radica en que algunas especies contienen genes que le confieren resistencia a *Phytophthora cinnamomi*, los cuales podrían ser utilizados en el mejoramiento genético en especies del subgénero *Eriodaphne*.

Por el enorme potencial genético del género *Persea*, se han intentado incorporar características agronómicas de algunas especies del subgénero *Eriodaphne* (con excepción de *P. longipes*) en especies del subgénero *Persea*, especialmente en *Persea americana*, por medio cruzas y de injertos, lo cual puso en evidencia la incompatibilidad gamética y vegetativa que existe entre los dos subgéneros; sin embargo, entre especies del subgénero *Persea* si existe compatibilidad gamética y vegetativa, haciendo posible el cruzamiento y la injertación entre las especies de este.

Para tratar de explicar la incompatibilidad entre ambos subgéneros de *Persea* se han realizado varios estudios en base a caracteres morfológicos y moleculares de ADN. Entre los cuales se encuentran el análisis cladístico realizado por Campos- Rojas *et al.* (2007) y

los análisis filogenéticos de secuencias de la región ITS por Rohwer *et al.* (2009) y el de Cabrera-Hernández *et al*. (comunicación personal) de la región *trnL-F* de cloroplasto, quienes trataron de resolver las relaciones ancestro-descendencia dentro del género *Persea*. Los tres estudios pudieron separar en clados diferentes a las especies del subgénero *Persea* de las del subgénero *Eriodaphne*, apoyando la hipótesis del origen no monofilético del género *Persea* y también proporcionando una explicación a la incompatibilidad entre ambos subgéneros. Sin embargo, aún existe controversia en el tema, debido a que las relaciones filogenéticas entre los dos subgéneros resultan extremadamente complejas (Galindo *et al.,* 2008; Smith *et al.*, 1992; Kopp 1966); por el tipo y número de marcadores moleculares y morfológicos, utilizados hasta ahora, se considera que aún no se cuenta con suficiente evidencia para afirmar la separación taxonómica de los dos subgéneros de *Persea*, razón por la que estos aún no han sido reconocidos como géneros independientes. Por lo tanto resulta conveniente realizar el análisis de un mayor número de fragmentos de ADN, así como un mayor número de especies que representen mejor a ambos subgéneros, de manera que se puedan obtener nuevas evidencias que permitan realizar una mejor reconstrucción filogenética de género *Persea* y de esta forma poder aclarar con mayor certeza el origen del género *Persea*.

A nivel molecular es posible utilizar fragmentos de ADN como son regiones codificantes, espaciadores intergénicos y espacios internos transcritos del genoma de cloroplasto (cpADN), genoma mitocondrial (mtADN) y del genoma nuclear (nADN) para realizar estudios filogenéticos, biogeográficos, de diversidad genética, identificación de especies biológicas y evolución molecular (Soltis *et al*., 1995). En la selección de estos marcadores se requiere que sean genes de copia única, con suficiente variación

genética interespecífica, sin problemas de copias múltiples parálogas y con un número considerable de polimorfismos (Ratnasingham y Hebert, 2007). Entre los locus más utilizados del genoma de cloroplasto se encuentran los genes *rbcL*, (Chase *et al.*, 1993), *ndhF* (Godde y Trebst, 1980), *matK* (Vogel *et al*., 1999) y *rpoC1*y el espaciador intergénico *trnH-psbA.* En el genoma mitocondrial algunos genes más utilizados son *atp4* (Duminil *et al*., 2002) y *Cox3*. En el genoma nuclear el gen *18s* (White *et al*., 1990). De estos fragmentos, el espacio intergénico *trnH-psbA* del genoma del cloroplasto es considerado como uno de los mejores marcadores para identificación de especies en varios grupos de plantas, debido a su alto porcentaje de sitios polimórficos (Lahaye *et al*., 2008; Storchová y Olson; 2007), por lo que ha sido propuesto como unos de los códigos de barras universales para plantas (Nicolalde-Morejo *et al*., 2010; Chen *et al.*, 2010). Algunos otros también considerados corresponden a los genes *matK* y *rbcL.*

El presente estudio tuvo como objetivo reconstruir las relaciones filogenéticas dentro del género *Persea*, mediante el análisis de las secuencias de ocho fragmentos de ADN, para obtener evidencias sólidas y robustas que permitan el reconocimiento de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* como géneros filogenéticamente independientes. Así como también reconocer marcadores útiles en la identificación de materiales pertenecientes a ambos subgéneros.

OBJETIVOS GENERALES

- Reconstruir las relaciones filogenéticas existentes entre los subgéneros *Persea y Eriodaphne* mediante el análisis de secuencias de ADN.
- Seleccionar marcadores moleculares útiles en la identificación de especies dentro del subgénero *Persea*.

HIPOTÉSIS GENERAL

- El análisis filogenético generado permitirá inferir las relaciones existentes entre los 33 miembros de los subgéneros *Persea y Eriodaphne* aportando evidencias contundentes acerca del origen no mofilético del género *Persea*, apoyando la separación de estos como géneros independientes.

LITERATURA CITADA

Barrientos-Priego, A. F. y L. López-López. 1998. Historia y genética del aguacate. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas, México.

Ben-Ya'acov, A., A. Solis M. y E. Peri. 1995. Progress of the study of avocado genetic resources. II. The avocado genetic resources in Costa Rica. Program and Book of Abstracts of the World Avocado Congress III. Octubre 22-27, Tel Aviv, Israel. p.109.

Bufler, G., y J. Fiedler. 1996. Avocado Genetic Resources: Final Repot. GIARA B-14. Julio, 1996. 50 p.

Campos- Rojas, E., Terrazas, T. and L. López-Mata. 2007. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. Genetic Resources and Crop Evolution 54: 249–258.

Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Duvall, M. R., Price, R. A., Hills, H. G., Qiu, Y, L., Kron, K. A., Rettig, J. H., Conti, E., Palmer, J. D., Manhart, J. R., Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W. J., Karol, K. G., Clark, W. D., Hedrén, M., Gaut, B. S., Jansen, R. K., Kim, K.-J., Wimpee, C. F., Smith, J. F., Furnier, G. R., Strauss, S. H., Xiang, Q.-Y., Plunkett, G. M., Soltis, P. S., Swensen, S. M., Williams, S. E., Gadek, P. A., Quinn, C. J., Eguiarte, L. E., Golenberg, E., Learn, G. H., Jr., Graham, S. W., Barrett, S. C. H., Dayanandan, S. y V. A. Albert, 1993. Phylogenetics of seed plants: An analysis of

nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL.* Annals of the Missouri Botanical Garden 80: 528-580.

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Linchun, S., Zhu, Y., Ma1, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia1, X., Lin, Y., Leon, C. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. Plos ONE 5:e8613.

Duminil, J., Pemonge, M.H. and R.J. Petit. 2002. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. Molecular Ecology Notes 2: 428–430.

Galindo T., M. E., Arzate F., A. M., Ogata, A. N., Murguía G., J., Lee E.H.E. y I. Landero T. 2008. El origen y domesticación del aguacate (*Persea americana* Mill.) en Mesoamérica. XXI Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz y I del Trópico Mexicano. Estado de Veracruz, México. pp. 516-523.

Godde, D. and A. Trebst. 1980. NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of *Clamydomonas reinherdii*. Archives of Microbiology 127: 245-252.

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.

Lahaye, R., Van der, B. M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G., Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. PNAS 105: 2923-2928.

Nicolalde-Morejo, F., Vergara-Silvac, F., Gonzalez-Astorgaa, J., Stevensond, D. W., Vovidese, A. P. and Sosa, V. 2010. A character-based approach in the Mexican cycads supports diverse multigene combinations for DNA barcoding. Cladistics 26:1-15.

Ratnasingham, S. and P. D. N. Hebert. 2007. BOLD: The barcode of life data system. Molecular Ecology Notes 7: 355-364.

Rohwer, J. G., Li, J., Rudolph, B., Schmidt, S. A., van der Werff, H., and H.-W. Li. 2009. Is *Persea* (Lauraceae) monophyletic? Evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. Taxon 58: 1153–1167

Smith, N., Williams, J. T., Plucknett, D. L. and J. Talbot. 1992. Tropical Forests and Their Crops. Comstock Publishing. Ithaca, USA.

Soltis, P. S., Soltis, D. E., Novak, S. J., Schultz, J. L. and R. K. Kuzoff. 1995. Fossil DNA: ITS potential for biosystematics, pp. 1-13. *In*: Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics. P. C. Hoch and A. G. Stephenson (eds.). Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri, USA.

Storchová H. and M.S. Olson. 2007. The architecture of the chloroplast psbA-trnH non-coding region in angiosperms. Plant System and Evolution 268: 235-256.

Van der Werff, H. 2002. A synopsis of Persea (Lauraceae) in Central America. Novon 12: 575-586.

Vogel, J., Börner, T. and W.R. Hess. 1999. Comparative analysis of splicing of the complete set of chloroplast group II introns in three higher plants mutants. Nucl. Acid. Res. 27: 3866-3874.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. *In*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds.). Academic Press, Inc., New York, USA.

CAPITULO I

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS SUBGÉNEROS *Persea* Y *Eriodaphne* (*Persea*; Lauraceae) MEDIANTE SECUENCIAS DE ADN NUCLEAR, MITOCONDRIAL Y DE CLOROPLASTO

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS SUBGÉNEROS *Persea* Y *Eriodaphne* (*Persea*; Lauraceae) MEDIANTE SECUENCIAS DE ADN NUCLEAR, MITOCONDRIAL Y DE CLOROPLASTO

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE SUBGENUS *Persea* And *Eriodaphne* (*Persea,* Lauraceae) USING NUCLEAR, MITOCHONDRIAL AND CHLOROPLAST DNA SEQUENCES

Cruz-Maya, M. E[1]. y Barrientos-Priego, A. F[2].

RESUMEN

Desde el punto de vista filogenético el género *Persea* es uno de los géneros más controversiales dentro de la familia Lauraceae, principalmente por las relaciones complejas entre sus dos subgéneros, y no contar con las evidencias suficientes para establecer si el subgénero *Eriodaphne* es o no un género independiente. Para poder determinar las relaciones filogenéticas del género *Persea*, se realizó el análisis filogenético de 33 materiales (cinco del subgénero *Eriodaphne*, 28 del subgénero *Persea*) utilizando los genes de cloroplasto *ndhF*, *rbcL*, *matK* y *rpoC* y el espaciador intergénico *trnH-psbA*; el gen nuclear *18s* y los genes mitocondriales *atp4* y *Cox3*. El análisis del gen *matK* y el de los ocho genes concatenados mostraron la separación de ambos subgéneros en clados independientes, lo que sugiere que el origen de *Persea* es no monofilético y por lo tanto ambos subgéneros, *Persea* y *Eriodaphne*, deben ser reconocidos como géneros filogenéticamente independientes.

Palabras clave: aguacate, aguacatillo, filogenia, secuencias de genes, separación de géneros.

ABSTRACT

From the phylogenetic point of view, *Persea* is one of the most controversial genera within the family Lauraceae, mainly because the relationships between the two subgenera are very complex, and there is insufficient evidence to establish whether *Eriodaphne* subgenus is an independent genus or not. To determine the phylogenetic relationships of the genus *Persea*, a phylogenetic analysis of 33 materials (five of the subgenus *Eriodaphne* and 28 of the subgenus *Persea*) was carried out, using the chloroplast genes *ndhF*, *rbcL*, *matK*, *rpoC1*, and the intergenic spacer *trnH-psbA*, the nuclear gene*18s*, and the mitochondrial genes *atp4* and *Cox3*. Analysis of the *matK* gene and the eight concatenated genes showed that the species of both subgenera are in separate clades, suggesting that the origin of *Persea* is not monophyletic and therefore *Persea* and *Eriodaphne* subgenera should be recognized as phylogenetically independent genera.

Keywords: avocado, “aguacatillo”, phylogeny, gene sequences, genus separation.

[1] Estudiante de la maestría en ciencias en Biotecnología Agrícola. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.

[2] Profesor-Investigador. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo

INTRODUCCIÓN

El género *Persea* (Lauraceae) tiene aproximadamente 85 especies distribuidas en América, desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica [*Persea borbonia* (L.) Spreng] hasta Chile (*Persea lingue* Ruiz & Pavon); con una especie en las Islas Canarias [*P. indica* (L.) Spreng.] y probablemente algunos representantes en el sur de Asia (Barrientos-Priego y López-López, 1998). El género se dividió en los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* (Kopp, 1966) con base a ciertos caracteres morfológicos ubicados en la flor y fruto, como son la longitud y persistencia de los tépalos, el número de anteras, la forma del pedicelo del fruto (Rohwer *et al*., 2009), la pubescencia de los sépalos, el tamaño de fruto y la presencia de un capuchón en la parte alta del fruto, los tres últimos son los principales caracteres que diferencian ambos subgéneros. El subgénero *Persea* presenta sépalos con las caras abaxial y adaxial pubescente, mientras que en *Eriodaphne* generalmente la cara adaxial de los sépalos es glabra (Kopp, 1966). Por el tamaño del fruto, el subgénero *Persea* tiene frutos grandes (~7-20 cm) conocidos como aguacates verdaderos, y en *Eriodaphne* los frutos son pequeños (menores a 2 cm) y se conocen como aguacatillos. En el caso del capuchón del fruto, este se encuentra presente en los frutos del subgénero *Eriodaphne*, mientras que en los frutos del subgénero *Persea* está ausente.

A pesar de los estudios realizados para esclarecer las relaciones filogenéticas de los subgéneros de *Persea*, así como de sus géneros afines, los caracteres morfológicos considerados no son contundentes (Rohwer *et al*., 2009), principalmente por la dificultad de encontrar las estructuras florales y los frutos simultáneamente, lo que dificulta en gran medida la identificación de los ejemplares muestreados.

Dentro del subgénero *Persea*, *P. americana* Mill. es la especie más estudiada debido a su importancia en la alimentación humana, principalmente por su alto contenido en aceite; razón por la que se han intentado incorporar en las subespecies de *P. americana* Mill. características agronómicas (como es la resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands) de especies del subgénero *Eriodaphne* [con excepción de *P. longipes* (Schlecht.) Meissn], por medio de cruzas e injertos, lo cual puso en evidencia la incompatibilidad vegetativa que existe entre los dos subgéneros (Frolich *et al*., 1958). Sin embargo, entre especies del subgénero *Persea* si se ha encontrado compatibilidad para injertar entre *P. americana* y las especies *P. nubigena* L. Wms., *P. steyemarkii* Allen, *P. schiedeana* Ness, y *P. flocossa* Mez (Frolich *et al*., 1958). También se ha encontrado compatibilidad gamética entre *P. americana* Mill. con *P. schiedeana* Ness (Ellstrand *et al*., 1986), *P. flocossa* Mez (Berg, 1967), *P. nubigena* L. Wms. (Bringhurst, 1954) y un hibrido natural entre *P. steyemarkii* Allen y *P. americana* Mill. (Barrientos *et al*., comunicación personal). Estos hallazgos han generado controversias respecto al origen monofilético del género *Persea*, sugiriendo que los subgéneros de *Persea* (*Persea* y *Eriodaphne*) pueden ser reconocidos como géneros independientes.

El análisis cladístico de Campos- Rojas *et al.* (2007) y los análisis filogenéticos de secuencias de la región ITS de Rohwer *et al.* (2009), y el de Cabrera-Hernández *et al*. (comunicación personal) sobre la región *trnL-F* de cloroplasto, trataron de resolver las relaciones ancestro-descendencia dentro del género *Persea*. Los tres estudios pudieron separar en clados diferentes a las especies del subgénero *Persea* de las del subgénero *Eriodaphne*, apoyando la hipótesis del origen no monofilético del género *Persea* y también proporcionando una explicación a la incompatibilidad entre ambos subgéneros.

Sin embargo, aún existe controversia en el tema debido a que las relaciones filogenéticas entre los dos subgéneros son complejas (Galindo *et al.,* 2008; Smith *et al.*, 1992; Kopp 1966) y hasta ahora no se cuenta con suficiente evidencia de este tipo de estudios para la separación de los dos subgéneros de *Persea*.

Los estudios de Rohwer *et al.* (2009) y Cabrera-Hernández *et al.* (comunicación personal) se realizaron únicamente con la información de un solo gen, por lo que resulta conveniente llevar a cabo un análisis con un mayor número de fragmentos de ADN, así como un mayor número de especies que representen más claramente a ambos subgéneros, de manera que con esto se pueda contar con nuevas evidencias que permitan aclarar con mayor certeza el origen del género *Persea*.

En los análisis filogenéticos de varias familias de angiospermas se han utilizado secuencias de ADN de regiones codificantes, espaciadores intergénicos y espacios internos transcritos del genoma de cloroplasto (cpADN), del genoma mitocondrial (mtADN) y del genoma nuclear (nADN). Actualmente estas secuencias son consideradas un recurso potencial en estudios filogenéticos, biogeográficos, de diversidad genética, identificación de especies biológicas y evolución molecular (Soltis *et al*., 1995). Generalmente son genes de copia única, con suficiente variación genética interespecífica, sin problemas de copias múltiples parálogas y con un número considerable de polimorfismos (Ratnasingham y Hebert, 2007). Entre los locus más utilizados del genoma de cloroplasto se encuentran el gen *rbcL*, el cual codifica para la subunidad grande de la ribulosa 1-5 bifosfato/carboxilasa, cuyas funciones son la fijación de CO_2 en forma orgánica y también es una oxigenasa en la fotorespiración (Chase *et al.,* 1993; Judd *et al*., 2007). Otro gen es el *ndhF*, que codifica para la subunidad pequeña de la

enzima NADH deshidrogenasa que participa en la oxidación del NAD a NADH durante la fase oscura de la fotosíntesis que se lleva a cabo en el estroma de los tilacoides para reducir los efectos del estrés fotooxidativo y la senescencia (Lewin, 1994; Godde y Trebst, 1980). El gen *matK*, que codifica una madurasa involucrada en el proceso de eliminación de intrones durante la maduración de transcritos multicistrónicos del cloroplasto (Vogel *et al*., 1999; Schmitz-Linneweber *et al*., 2001). El gen *rpoC1* codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa, la cual participa en el proceso de transcripción de los genes del cloroplasto. Entre las secuencias utilizadas se encuentra también el espaciador intergénico *trnH-psbA*, ubicado entre el gen *psbA* que codifica para la proteína de 32 kDa del fotosistema II y el gen *trnH* que codifica para el tRNA-His (Olmstead y Sweere, 1994). También han sido considerados fragmentos del genoma mitocondrial, como son el gen *atp4*, que codifica para la subunidad 4 de la ATPasa, y la del gen *Cox3*, que codifica para subunidad 3 del citocromo c oxidasa (Duminil *et al*., 2002). Se han considerado también algunos genes nucleares como el gen *18s* (White *et al*., 1990) que codifica para la subunidad pequeña (40S) del ribosoma, en donde se lleva a cabo la traducción del RNAm en eucariontes. De entre ellos, los genes *ndhF*, *matK*, *rpoC1*, y el espaciador *trnH-psbA*, son los que presentan las tasas de evolución más altas.

El presente estudio tuvo como objetivo reconstruir las relaciones filogenéticas dentro del género *Persea*, mediante el análisis de secuencia de ocho fragmentos de ADN, para obtener evidencias solidas y robustas que permitan el reconocimiento de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* como géneros filogenéticamente independientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó material vegetal de 33 especímenes del género *Persea* (cinco del subgénero *Eriodaphne* y 28 del subgénero *Persea*), además de una especie del género *Beilschmiedia*, que se obtuvo de la colección del banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C (ubicado en Coatepec de Harinas, México), y de ejemplares depositados en el Herbario del Departamento de Bosques de la Universidad Autónoma Chapingo (CHAP). Los ejemplares provienen de varias localidades de México y de otros países donde se distribuye este género (Cuadro 1.1.).

Cuadro 1.1. Ejemplares utilizados en el análisis, registro en el Banco de Germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C., subgénero al que pertenecen y lugar de procedencia.

Taxón	Clave de registro	Subgénero	Localidad
Persea floccosa	CH-I-3	*Persea*	Aquila, Veracruz, México
Persea sp. 'Freddy 4'	CH-CR-29	*Persea*	Costa Rica
Persea americana var. costaricensis	CH-CR-44	*Persea*	Costa Rica
Persea americana var. costaricensis	CH-CR-25	*Persea*	Costa Rica
Persea steyermarkii	CH-G-Ch1	*Persea*	Chiapas, México
Persea schiedeana	CH-Gu-1	*Persea*	Guatemala
Persea americana var. americana	CH-G-48	*Persea*	Yucatán, México
Persea americana var. drymifolia	CH-C-57	*Persea*	Edo. de México, México
Persea gigantea	CH-I-2	*Persea*	Guatemala
Persea lingue	CH-Pl-1	*Eriodaphne*	Chile
Persea parvifolia	CH-Ve-2	*Persea*	Chocamán, Veracruz, México
Persea americana var. americana x var. Guatemalensis ('Hass')	Punta A+T46	*Persea*	California, U.S.A.
Beilschmiedia anay	CG-Hu-56	*Beilschmiedia*	Cuetzalan, Puebla, México.
Persea americana var. Guatemalensis	CH-GU-6	*Persea*	Guatemala
Persea americana var. americana	CH-G-45	*Persea*	Hunucmá, Yucatán, México
Persea americana var. drymifolia	CH-Der-2	*Persea*	Coatepec de Harinas, Edo. de México, México
Persea cinerascens	CH-C-30	*Eriodaphne*	Tacámbaro, Michoacán, México
Persea americana var. drymifolia	CH-C-63	*Persea*	Coatepec de Harinas, Edo. de México, México
Persea americana var. americana	CH -CR- 28	*Persea*	Costa Rica
Persea americana var. guatemalensis	CH-GU-5	*Persea*	Guatemala
Persea longipes	CH-G-36	*Eriodaphne*	Sierra de Tantima, Veracruz, México

Persea sp. 'PR'	CH-PR-1	*Eriodaphne*	Huatusco, Veraruz, México
Persea americana var. americana	CH-I-6	*Persea*	La Antigua, Veracruz, México
Persea nubigena	CH-I-4	*Persea*	Israel
Persea schiedeana	CH-H-5	*Persea*	Honduras
Persea schiedeana x *Persea americana* var. guatemalensis	CH-C-62	*Persea*	Guatemala
Persea americana var. drymifolia	CH-C-47	*Persea*	Michoacán, México
Persea americana var. guatemalensis	CH-G-11 S1	*Persea*	Olanca, Chiapas, México
Persea americana var. guatemalensis	CH-G-7 S2	*Persea*	San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México
Persea schiedeana	CH-H-7	*Persea*	Honduras
Persea chamissonis	CHAP 37473	*Eriodaphne*	La Mojonera, Hidalgo, México
Persea tolimanensis	Mv1*	*Persea*	Motozintla, Chiapas, México

* Material tomado de ejemplares depositados en el Herbario CHAP.

Extracción, amplificación y secuenciación de ADN.

El ADN se extrajo de ~50-100 mg de hojas previamente deshidratadas en sílica gel, en algunos casos se utilizaron hojas de especímenes de herbario. Se extrajo ADN genómico por el método de CTAB (Weising *et al*., 1995) con algunas modificaciones que permitieron eliminar de las muestras una mayor cantidad posible de compuestos fenólicos. Al final del procedimiento el ADN se purificó con el Qiaquick columns (Qiagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación de cada uno de los ocho fragmentos se realizó en un volumen total de 25 µL, conteniendo 50-100 ng de DNA, 200 µM de la mezcla de dNTP's, 1X Colorless GoTaq Flexi Reaction Buffer (Promega, USA), 20 pM de cada uno los iniciadores específicos para cada fragmento (Cuadro 1.2), 2.5 mM de $MgCl_2$ y 2 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA). Los programas de amplificación de cada fragmento consistió de un ciclo de desnaturalización inicial de 4 min a 94 ºC, seguido de 35 ciclos de 45 s a 94 ºC, 1 min a la temperatura específica de cada fragmento (Cuadro 1.2) y 1 min a 72 ºC, con un último ciclo de extensión final de 5 min a 72 ºC. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). Los fragmentos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa a 1.2 %. Los productos de PCR se limpiaron utilizando las columnas del Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Cuadro 1.2. Iniciadores utilizados en la amplificación y secuenciación de fragmentos de ADN mitocondrial, nuclear y de cloroplasto.

Locus/ Segmento	Nombre y dirección	Secuencia 5´– 3´	Tm (°C)	Referencia
n*18s*	*NS1*	GTAGTCATATGCTTGTCTC	56	White *et al*. (1990)
	NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	56	White *et al*. (1990)
	NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	56	White *et al*. (1990)
	NS8	TCCGCAGGTTCACCTACGGA	56	White *et al.* (1990)
cp *rpoC1*	1f	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	56	Ford *et al.* (2009)
	4r	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	56	Ford *et al.* (2009)
cp *trnH-psbA*	trnH2	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	51	Tate *et al.* (2003)
	psbAF	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	51	Tate *et al.* (2003)
cp *rbcL*	1f	ATGTCACCACAAACAGAAAC	56	Olmstead *et al*. (1992)
	724r	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	56	Fay *et al.* (1997)
cp *ndhF*	389f	CTGCBACCATAGTMGCAGCA	59	Este estudio
	461r	GATTRGGACTTCTRSTTGTTCCGA	59	Este estudio
cp *matK*	1326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	48	Schmitz-Linneweber *et al*. (2001)
	390F	CGATCTATTCATTCAATATTTC	48	Schmitz-Linneweber *et al*. (2001)
mt *Orf25* (*atp4*)	Orf1	AAGACCRCCAAGCYYTCTCG	50	Duminil *et al*. (2002)
	Orf2	TTGCTGCTATTCTATCTATT	50	Duminil *et al*. (2002)
mt *Cox3*	*Cox3*r	CTCCCCACCAATAGATAGAG	51	Duminil *et al*. (2002)
	*Cox3*f	CCGTAGGAGGTGTGATGT	51	Duminil *et al*. (2002)

n = ADN del genoma nuclear
cp = ADN del genoma de cloroplasto
mt = ADN del genoma mitocondrial

Los productos de PCR se secuenciaron directamente, utilizando los primers mencionados anteriormente, en el sistema de secuenciación automatizado de Macrogen (Corea del Sur; http://dna.macrogen.com). Las secuencias se editaron y ensamblaron con el programa BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall, 1999).

Alineamiento de secuencias.

Las 33 secuencias obtenidas de cada uno de los fragmentos *ndhF*, *rbcL*, *matK*, *rpoC*, *trnH-psbA*, *18s*, *atp4* y *Cox3*, se alinearon con el programa MUSCLE versión 3.8 (Edgar, 2004). Adicionalmente, 15 de las secuencias obtenidas del gen *matK* se alinearon junto con 35 secuencias del Genebank, dos perteneciente a *Persea* y las demás a 18 géneros cercanos de la familia Lauraceae (*Sassafras*, *Litsea*, *Lindera*, *Ocotea*, *Cinnamomun*, *Nectandra*, *Actinodaphne*, *Parasassafras*, *Sinosassafras*, *Neolitsea*, *Iteadaphne*, *Endlicheria*, *Aniba*, *Laurus*, *Umbellularia*, *Alseodaphne*, *Phoebe* y *Machilus*). Posteriomente, se construyó manualmente la supermatriz de las cinco secuencias de cloroplasto: *ndhF+rbcL+matK+rpoC+trnH-psbA*, así como la supermatriz de los dos genes mitocondriales *atp4+Cox3*, y la supermatriz de los ocho fragmentos analizados *ndhF+rbcL+matK+rpoC+trnH-psbA+18s+atp4+Cox3*.

Análisis filogenético.

Se llevaron a cabo cuatro análisis, en el primero se analizaron las 69 secuencias alineadas del gen *matK*; y en los otros tres cada una de las supermatrices mencionadas anteriormente. Los cuatro análisis se realizaron con el método de máxima parsimonia utilizando el programa PAUP versión 4.0b10 (Swofford, 2001). En cada uno de los análisis, todos los caracteres tuvieron el mismo valor y los espacios vacíos presentes entre las secuencias alineadas fueron considerados como datos perdidos. Para encontrar

los árboles más parsimoniosos se utilizó una búsqueda heurística con 1000 repeticiones de adición de taxones al azar y un intercambio de bifurcaciones de bisección-reconexión de árboles, con la opción Multress sólo se guardaron los mejores árboles de cada paso. El análisis de remuestreo ("bootstrap") se realizó con 1000 repeticiones y una búsqueda heurística con las especificaciones mencionadas anteriormente.

RESULTADOS

Características de las secuencias.

Se obtuvieron 33 secuencias de cada uno de los genes amplificados: *ndh*F, *rbcL*, *matK*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *18*s, *atp4* y *Cox3*. La mayor variación se presentó en *trnH-psbA*, el alineamiento de 497 pb presentó 67 sitios variables (13.48 %) y 32 sitios parsimonio-informativos (6.44 %); las menor variación se presentó en los dos genes mitocondriales, *atp4* y *Cox3* (1.18 y 0.43 % de sitios variables en la secuencia, respectivamente) (Cuadro 3 y 4). La secuencia más variable en los ocho genes fue *Beilschmieda anay* (0-4 %) (Cuadro 4), que se utilizó como grupo externo en los cuatro análisis filogenéticos.

Cuadro 1.3. Descripción de los alineamientos de las secuencias de los 33 materiales del género *Persea*, y uno de *Beilschmiedia anay*.

Locus/segmento	Longitud de alineamientos (bp)	RC	RNC	Pi	Pi (%)	SC	SC (%)	Sv	Sv (%)	S	MFSE
n*18*s	1748	0	1748	6	0.34	1719	98.34	29	1.69	23	2
cp *rpoC1*	599	599	0	2	0.33	577	96.33	22	3.67	20	2*
cp *trnH-psbA*	497	98	399	32	6.44	428	86.12	67	13.48	41	5*
cp *rbcL*	1481	1428	53	10	0.67	1390	93.86	91	6.14	81	4
cp *ndh*F	739	739	0	4	0.54	707	95.67	32	4.33	28	0
cp *matK*	909	909	0	7	0.77	866	95.27	43	4.73	36	1
mt *atp4*	507	507	0	1	0.20	501	99.82	6	1.18	5	0
mt *Cox3*	695	695	0	0	0	692	99.57	3	0.43	3	0
matK-rbcL-ndhF-rpoC1-trnH-psbA	4236	3773	463	55	1.30	3965	93.60	261	6.16	206	12**
Cox3-atp4	1199	1199	0	1	0.08	1190	99.23	9	0.75	8	0
18s-Cox3-atp4-matK-rbcL-ndhF-rpoC1-trnH-psbA	7183	4983	2200	62	0.86	6874	95.69	299	4.16	237	14**

Pi= Sitios parsimonio informativos, RC= Región codificante, RNC= Región no codificante, SC= Sitios conservados, S= Sitios "singlenton"
MFE= Mutaciones fijas exclusivas para Eriodaphne, * Una de las mutaciones está presente también en *Beilschmiedia.*
** Dos de las mutaciones están presente también en *Beilschmiedia.*

Cuadro 1.4. Intervalo de variación de nucleótidos entre las secuencias de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*, y de *Beilschmiedia anay*, en los ocho fragmentos de ADN analizados.

Locus/segmento	Longitud de alineamientos (bp)	Variación (%) Persea/ Persea	Variación (%) Eriodaphne / Eriodaphne	Variación (%) Persea/ Eriodaphne	Variación (%) Persea/ *B. anay*	Variación (%) Eriodaphne/*B. anay*
n*18s*	1748	0-0.4	0-0.1	0.2-0.4	1.3-1.4	1.3-1.4
cp *rpoC1*	599	0-0.2	0.0	0-0.4	3.4-3.6	0.4
cp *trnH-psbA*	497	0.0-5.5	0.3-2.7	2.1-6.9	15.1-17.6	14.5-15.5
cp *rbcL*	1481	0.0- 3.9	0.0-0.2	0.3-4.1	2-5.1	2.2-2.3
cp *ndhF*	739	0.0-0.7	0.0-0.2	0.0-0.6	3.2-3.7	3.2-3.3
cp *matK*	909	0.0-0.6	0.0-0.2	0.3-0.7	3.7-4.0	3.9-4.0
mt *atp4*	507	0.0-0.2	0.0	0.0-0.2	0.8-1.0	0.8
mt *Cox3*	695	0-0.2	0.0	0-0.5	0-0.2	0.0
matK-rbcL-ndhF-rpoC1-trnH-psbA	4236	0.0-1.9	0.1-0.4	1.0-2.3	4.4-5.7	4.4-4.5
Cox3-atp4	1199	0.0-0.2	0.0-0.2	0.0-0.5	0.4-0.6	0.4-0.5
18s-Cox3-atp4-matK-rbcL-ndhF-rpoC1-trnH-psbA	7183	0.1-1.3	1.0-3.0	3-3.7	3.0-3.7	3-3.1

Análisis filogenético del gen *matK*.

Se obtuvieron 135 árboles igualmente parsimoniosos, con una longitud de pasos (LP) de 121, índice de consistencia (CI) de 0.88, índice de consistencia excluyendo los caracteres variables no informativos de 0.73, índice de homoplasia (HI) de 0.12 y un índice de retención (RI) de 0.88. En los árboles obtenidos se observó la formación de tres clados, el primero constituido por los géneros de los complejos *Litsea* y *Ocotea*, aunque con un bajo soporte del "bootstrap"; el segundo formado por las especies del subgénero *Persea*, con 100 % de "bootstrap"; y el tercero por las especies del subgénero *Eriodaphne*, este último con 62 % de "bootstrap" (Figura 1.1).

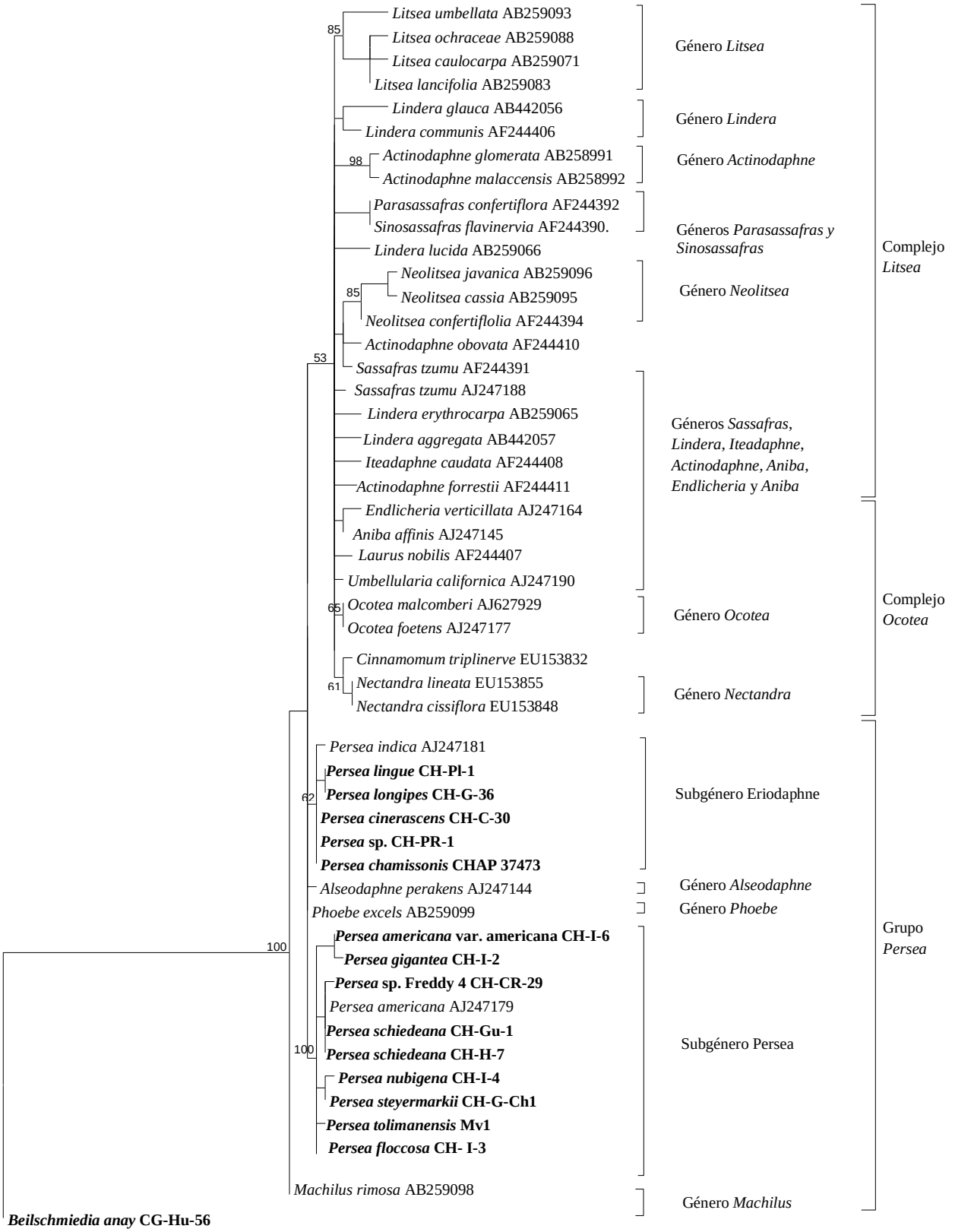

Litsea umbellata AB259093
Litsea ochraceae AB259088
Litsea caulocarpa AB259071
Litsea lancifolia AB259083
Género Litsea
Lindera glauca AB442056
Lindera communis AF244406
Género Lindera
Actinodaphne glomerata AB258991
Actinodaphne malaccensis AB258992
Género Actinodaphne
Parasassafras confertiflora AF244392
Sinosassafras flavinervia AF244390.
Géneros Parasassafras y Sinosassafras
Lindera lucida AB259066
Neolitsea javanica AB259096
Neolitsea cassia AB259095
Género Neolitsea
Neolitsea confertiflolia AF244394
Actinodaphne obovata AF244410
Sassafras tzumu AF244391
Sassafras tzumu AJ247188
Lindera erythrocarpa AB259065
Lindera aggregata AB442057
Iteadaphne caudata AF244408
Actinodaphne forrestii AF244411
Endlicheria verticillata AJ247164
Aniba affinis AJ247145
Laurus nobilis AF244407
Umbellularia californica AJ247190
Géneros Sassafras, Lindera, Iteadaphne, Actinodaphne, Aniba, Endlicheria y Aniba
Ocotea malcomberi AJ627929
Ocotea foetens AJ247177
Género Ocotea
Cinnamomum triplinerve EU153832
Nectandra lineata EU153855
Nectandra cissiflora EU153848
Género Nectandra
Complejo Litsea
Complejo Ocotea
Persea indica AJ247181
Persea lingue CH-Pl-1
Persea longipes CH-G-36
Persea cinerascens CH-C-30
Persea sp. CH-PR-1
Persea chamissonis CHAP 37473
Subgénero Eriodaphne
Alseodaphne perakens AJ247144
Género Alseodaphne
Phoebe excels AB259099
Género Phoebe
Persea americana var. americana CH-I-6
Persea gigantea CH-I-2
Persea sp. Freddy 4 CH-CR-29
Persea americana AJ247179
Persea schiedeana CH-Gu-1
Persea schiedeana CH-H-7
Persea nubigena CH-I-4
Persea steyermarkii CH-G-Ch1
Persea tolimanensis Mv1
Persea floccosa CH- I-3
Subgénero Persea
Grupo Persea
Machilus rimosa AB259098
Género Machilus
Beilschmiedia anay CG-Hu-56
85
85
98
53
62
100
100
65
61
5

Figura 1.1. Árbol filogenético número 13 del gen *matK* generado con el método de máxima parsimonia y 1000 búsquedas heurísticas; el árbol incluye 38 secuencias del Genebank y 12 secuencias de este trabajo, 16 pertenecen al género *Persea* y el resto a diferentes géneros de la familia Lauraceae. Los valores de "bootstrap" >50 se encuentran por debajo de las ramas.

Análisis de los dos genes mitocondriales concatenados.

Se obtuvo un solo árbol parsimonioso (LP= 9, CI= 1.0, HI= 0.0, RI= 1.0); con la formación de un solo clado, ya que la mayoría de las secuencias fueron prácticamente iguales, con la excepción de *P. shiedeana* (CH-H-5 y CH-C-62), *P. chamissonis*, *P. steyemarkii*, *P. parvifolia*, *P. nubigena* y *P. tolimanensis*. La variación de las secuencias de estos genes fue muy baja entre las especies del subgénero *Persea* (0-0.2 %) y en las especies de *Eriodaphne* (0-0.5 %) (Cuadro1.4).

Análisis de los cinco genes concatenados de cloroplasto.

Se obtuvieron 160 árboles igualmente parsimoniosos (LP= 311, CI= 0.87, HI= 0.13, RI= 0.82). En los filogramas obtenidos se observó la separación de las especies del subgéneros de *Persea* en un solo clado y las especies de *Eriodaphne* en otro (Figura 2), el clado constituido por los representantes del subgénero *Eriodaphne* presentó un buen soporte de "bootstrap" (88 %), no así el clado del subgénero *Persea*, en donde se forman dos grupos con un alto soporte de "bootstrap" (82 %), uno constituido por *P. parvifolia* y el otro por las 27 secuencias restantes de este subgénero. Los genes considerados en este análisis fueron más variables que los genes mitocondriales (Cuadro 4.1), tuvieron un mayor número de sitios parsimonio-informativos (Pi), que variaron desde dos en el marcador *rpoC*, hasta 32 en el marcador *trnH-psbA*, con un total de 55 Pi para el análisis (Cuadro 3.1); también cabe señalar la presencia de 12 mutaciones fijas en las especies del subgénero *Eriodaphne* que influyeron de forma definitiva en la conformación de este clado.

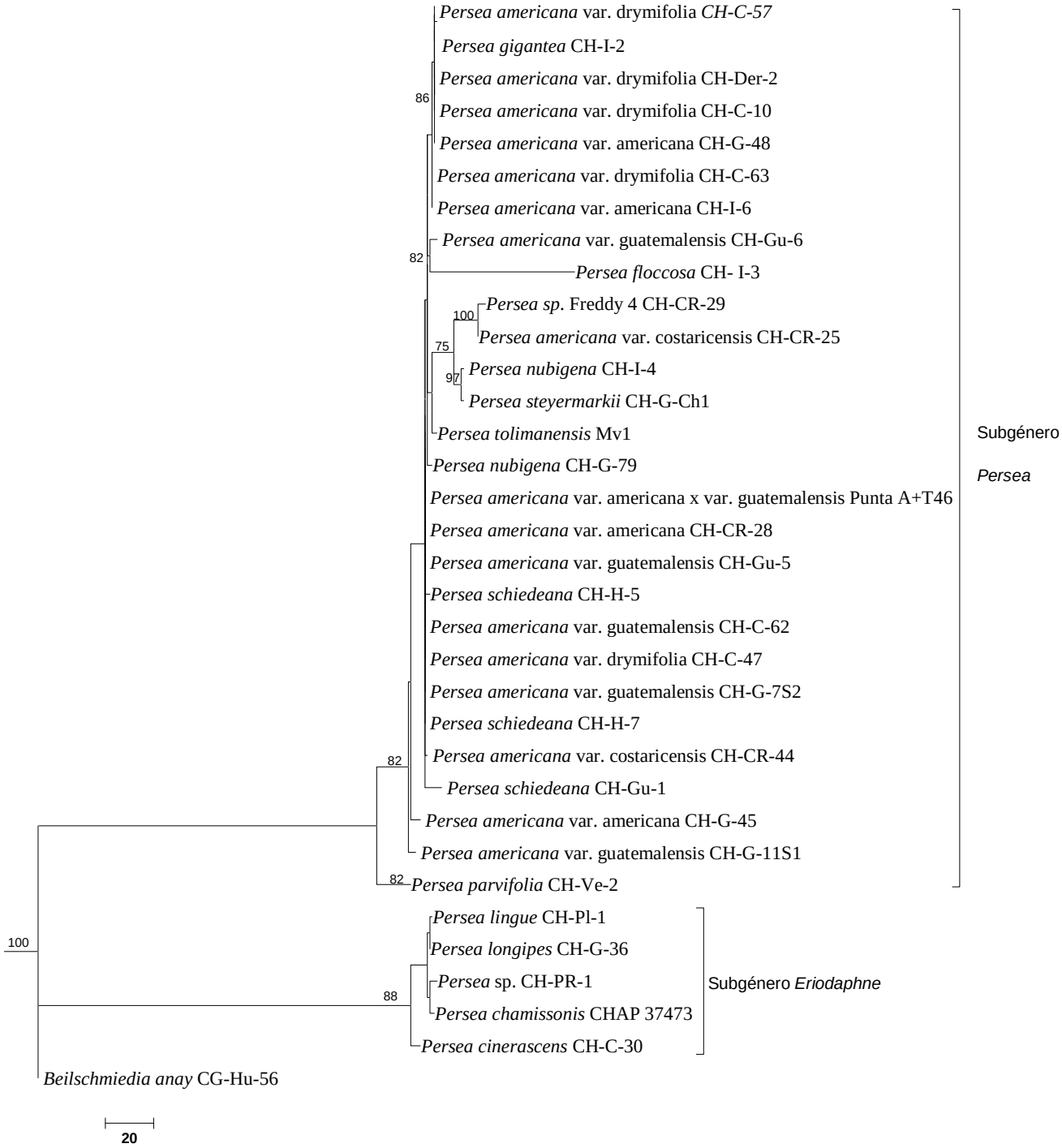


Fig. 1.2. Árbol filogenético número 18 de los cinco fragmentos concatenados de cloroplasto generado con el método de Máxima parsimonia y 1000 búsquedas heurísticas. Los valores de "bootstrap" >50 se encuentran por arriba de las ramas.

Análisis de los ocho genes concatenados

En el análisis se obtuvieron 264 árboles igualmente parsimoniosos (LP= 355, CI= 0.87, HI= 0.13, RI= 0.81). En los filogramas se observó, al igual que en análisis anterior, la conformación del clado del subgénero *Eriodaphne* independiente del clado del subgénero *Persea*, aunque en este caso los valores de "bootstrap" fueron más altos, 94 y 100 %, respectivamente (Figura 1.3), además de una agrupación de especies afines e individuos dentro de la misma especie, como es el caso de los tres ejemplares de *P. schiedeana*, sin embargo, no tuvieron soporte de valor "bootstrap".

Las secuencias de *P. americana* no se agrupan en un solo clado; las cuatro razas de esta especie (mexicana, antillana, guatemalteca y costaricensis; que corresponden a las variedades de *P. americana*: drymifolia, americana, guatemalensis y costariscencis, respectivamente) no se agrupan en un solo clado, sino en varios que se mezclan con las otras siete especies, dificultando la reconstrucción filogenética a nivel de especies dentro de este subgénero. Por ejemplo, se observan cuatro agrupamientos con un alto valor de "bootstrap", en el primero se agrupan cuatro individuos de *Persea americana* var, drymifolia, dos de *P. americana* var. americana y uno de *P. gigantea*. En el segundo grupo se encuentran cinco individuos de diferentes especies: *Persea* sp. 'Freddy 4' CH-CR-29, *P. americana* var. costaricensis CH-CR-25, *P. nubigena* CH-I-4, *P. steyemarkii* CH-G-Ch1, y *P. tolimanensis* MV1. El tercer grupo está formado por *P. americana* var. guatemalensis CH-Gu-6, *P. nubigena* CH-G-79 y *P. flocossa* CH-I-3. Finalmente, el cuarto grupo está formado por tres representantes de *P. schiedeana* (CH-H-5, CH-Gu-1 y CH-H-7) (Figura 1.3). También en el filograma se puede observar que *P. parvifolia* aparece como la especie menos evolucionada y *P. flocossa* la especie más reciente.

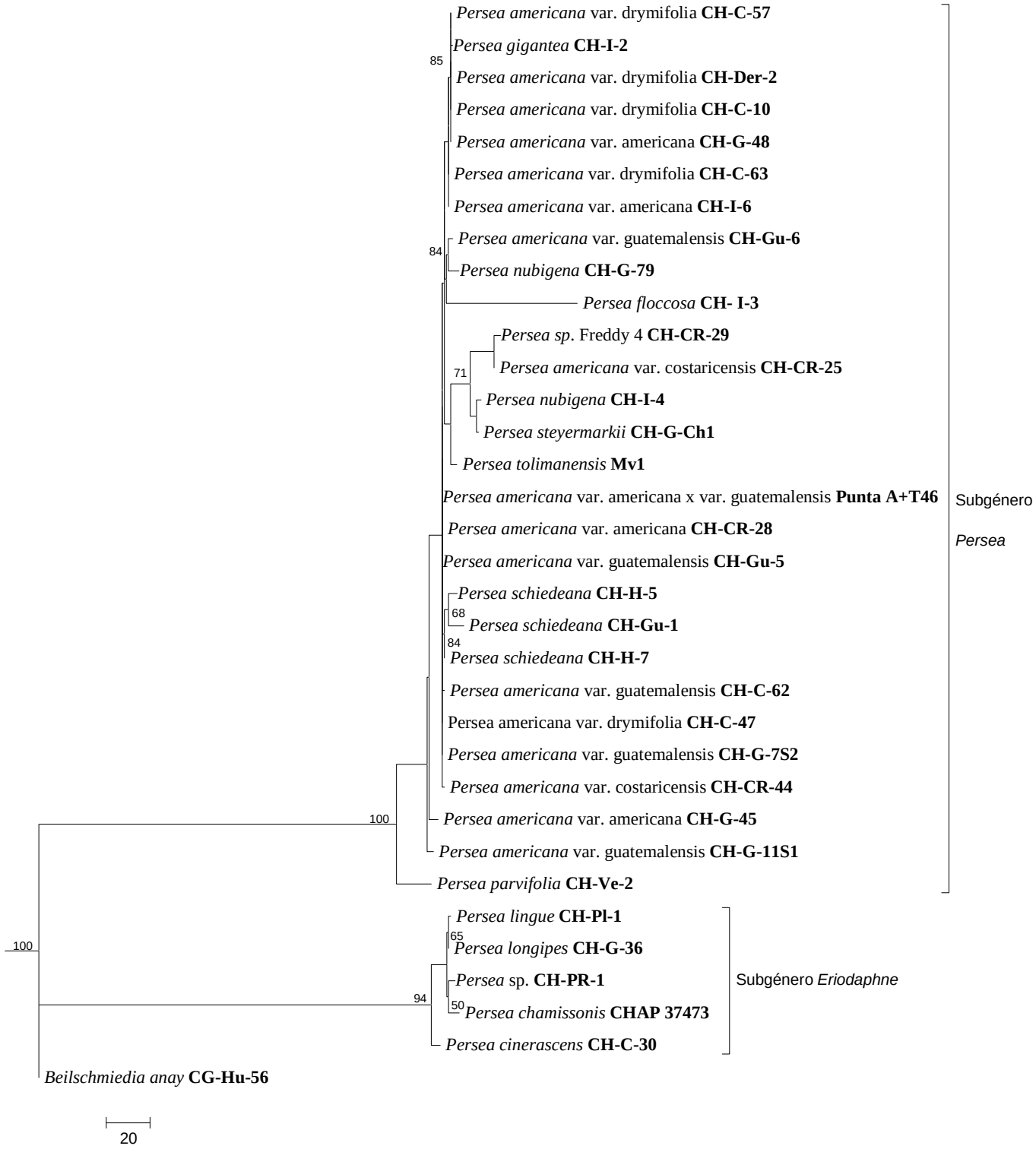


Figura 1.3. Árbol filogenético número 157 de los ocho fragmentos concatenados. El árbol se generó con el método de Máxima parsimonia y 1000 búsquedas heurísticas. Los valores de "bootstrap" >50 se encuentran por arriba de las ramas

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A pesar de que el gen *matK* presentó un bajo grado de divergencia en las 34 secuencias obtenidas, 43 sitios variables (4.73 %) y siete sitios parsimonio informativos (0.77 %), el análisis en conjunto con las 35 secuencias del Genbank pudo ubicar a los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* dentro de la familia Lauraceae y relacionados con los géneros de los complejos *Litsea* (Li *et al*., 2004) y *Ocotea* (Chanderbali *et al*., 2001). Rohwer (2000) también encontró niveles bajos de divergencia dentro de las secuencias de *matK* en las lauráceas (9.7 %) y menor a 1 % dentro de las secuencias del género *Persea* al igual que en nuestras secuencias; sin embargo, estos valores fueron suficientes para separar a los dos subgéneros de *Persea*, señalando el origen no monofilético del género. Estos resultados difieren de lo encontrado por Chanderbali *et al*. (2001), quienes en el árbol filogenético de la matriz I de los genes *trnL-trnH*/*psbA-trnH*, no logran esclarecer las relaciones dentro del grupo *Persea*, las especies de los dos subgéneros están mezcladas entre ellas y con una secuencia de *Alseodaphne*. Sin embargo, Rohwer *et al*. (2009) al analizar secuencias de ITS de varios géneros de la familia Lauraceae encontraron que las especies de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* si se agrupan en forma independiente; aunque algunas especies identificadas como *Persea* (*Persea sphaerocarpa*, *Persea* sp. y *Persea areolatocostae*) se encuentran en el filograma fuera de los grupos que conforman a los dos subgéneros de *Persea*; es decir que existe la posibilidad de que haya problema con la identificación de estos materiales o de que se trate de individuos pertenecientes a otro grupos filogenéticos. Es importante señalar que la secuencia de *Machilus rimosa* empleada en este análisis forma un clado aparte, independiente del grupo *Persea*; lo cual corrobora que *Machilus* representa un género aparte como lo sugieren Rohwer *et al.*

(2009), y no un subgénero más dentro de *Persea* como lo consideran Chanderbali *et al*. (2001) y van der Werff (2001).

Los árboles obtenidos del análisis de los cinco marcadores concatenados de cloroplasto fueron muy similares a los obtenidos en el análisis de los ocho marcadores concatenados; así, los marcadores de cloroplasto fueron los más útiles para la reconstrucción filogenética de *Persea* a nivel de subgéneros. En comparación con los genes mitocondriales y nucleares, los genes y espacios intergénicos de cloroplasto son muy útiles para estudios filogenéticos, principalmente a nivel de géneros y especies, ya que a pesar de tener una baja tasa de evolución, presentan variación debida a la extensión de mutaciones libres por selección, y al utilizarlos de forma concatenada se incrementa su capacidad de resolución logrando una adecuada reconstrucción filogenética dentro de géneros complejos (Storchová y Olson; 2007; Olmstead y Palmer, 1994). Además, los genes mitocondriales seleccionados presentaron baja tasa de sustitución y probablemente baja frecuencia de rearreglos (Storchová y Olson; 2007); y el gen nuclear a pesar de presentar cierta variación, fue menor a la reportada para otros genes nucleares de la familia lauraceae como ITS (Rohwer, et al., 2009).

Además de separar concluyentemente a ambos subgéneros en dos clados con un alto soporte de “bootstrap” (>70 %), el análisis de los ocho marcadores concatenados proporcionó información útil acerca de las especies consideradas; en el subgénero *Eriodaphne* todas las especies se resuelven completamente, aunque con valores de “bootstrap” menores a 50 %. En el subgénero *Persea* no fue posible lograr la separación de las ocho especies incluidas, lo cual también se ha encontrado en estudios de marcadores SSRs en diferentes especies del sugénero *Persea* (Mhameed *et al*., 1997); además, se considera que el aguacate a pesar de ser una especie subtropical y con sistema

de polinización cruzada, no presenta un nivel de variabilidad genética excepcionalmente alta, en comparación con estimación que se han hecho con especies de clima templado (Chen *et al*., 2008).

En el filograma se observó que *P. parvifolia* L. Wms. aparece como la especie menos evolucionada y claramente separada del resto. Es de destacar que dicha especie, descrita por Williams (1977), no es considera por van der Werff (2002) aunque es una de las especies más primitivas de acuerdo al presente estudio, también tiene particularidades morfológicas como son brotes delgados, hojas pequeñas alargadas y fruto pequeño (Figura 1.4), además que es más arbustiva que arbórea. En contraste, *P. floccosa* es la especie más reciente, sin embargo, a pesar de que se pudo separar *P. floccosa*, *P. nubigena* y *P. steyermarkii* de *P. americana* mediante RFLP, se considera que pueden ser solo variantes de *P. americana* (Furnier *et al*., 1990).



Figura 1.4. Rama y fruto de *Persea parvifolia* L. Wms.

Aunque el análisis de los ochos genes concatenados pudo esclarecer las relaciones filogenéticas dentro del género *Persea*, y específicamente la separación de los dos subgéneros, es evidente que en conjunto la variación de los ocho genes fue baja, 4.16 % de sitios variables y 0.86 % de sitios parsimonio-informativos. Esto ya se había reportado para *psb*A-*trn*H (Chanderbali *et al*., 2001) y *matK* (Rohwer, 2000), pero no para los otros genes en la familia Lauraceae. Resultando importante identificar nuevos genes y/o combinaciones de genes que presenten una mayor variación que permita resolver mejor

las relaciones filogenéticas tanto a nivel de especie como del género *Persea, y* en general de la familia Lauraceae, para con ello elaborar árboles filogenéticos que descarten las relaciones ambiguas entre géneros; es decir, que la presencia de especies de un solo género en dos o más clados sea debido a errores de identificación de ejemplares, o a un origen parafilético de los géneros, más que a una baja variación en las secuencias de ADN, como se observó en el árbol de *matK* de este estudio y en los filogramas de Rohwer *et al.* (2009), Kress *et al.* (2009), Kress *et al.* (2010), entre otros. Un buen candidato puede ser la región ITS nuclear, que presenta un 33 % de sitios parsimonio-informativos (Rohwer *et al*., 2009), pero tiene el inconveniente de ser difícil de amplificar y secuenciar en las lauráceas.

Con base en la hipótesis acerca del origen no monofilético del género *Persea*, nuestros resultados sugieren que efectivamente el género *Persea* no corresponde a un grupo monofilético; por lo tanto, los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* deben ser reconocidos como géneros independientes, confirmando los análisis de Rohwer *et al.* (2009) y Cabrera-Hernández *et al.* (comunicación personal). Con respecto al nombre del nuevo género, sería *Eriodaphne*, por ser el que Kopp (1966) le dio al subgénero o *Mutisiopersea*, el género que Kostermans (1993) creó para agrupar a las especies de *Persea* que tienen tépalos persistentes y endurecidos en los frutos, y que Rohwer *et al.* (2009) están retomando para ubicar a nivel de género al subgénero *Eriodaphne.*

LITERATURA CITADA

Barrientos-Priego, A. F. y L. López-López. 1998. Historia y genética del aguacate. Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S.C. Coatepec Harinas, México. Pp. 100-121.

Bergh, B. O. and N. C. Ellstrand. 1967. Taxonomy of the avocado. California Avocado Society Yearbook 70: 135-145.

Bringhurst, R. 1954. Interspecific hybridization and chromosome numbers in *Persea*. Proceedings of the American Society for Horticultural Science 63: 239-242.

Campos- Rojas, E., Terrazas, T. and L. López-Mata. 2007. *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. Genetic Resources and Crop Evolution 54: 249–258.

Chanderbali, A. S., van der Werff, H. and S. S. Renner. 2001. Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: Evidence from the chloroplast and nuclear. Annals of the Missouri Botanical Garden 88: 104-134

Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Duvall, M. R., Price, R. A., Hills, H. G., Qiu, Y, L., Kron, K. A., Rettig, J. H., Conti, E., Palmer, J. D., Manhart, J. R., Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W. J., Karol, K. G., Clark, W. D., Hedrén, M., Gaut, B. S., Jansen, R. K., Kim, K.-J., Wimpee, C. F., Smith, J. F., Furnier, G. R., Strauss, S. H., Xiang, Q.-Y., Plunkett, G. M., Soltis, P. S., Swensen, S. M., Williams, S. E., Gadek, P. A., Quinn, C. J., Eguiarte, L. E., Golenberg, E., Learn, G. H., Jr., Graham, S. W., Barrett, S. C. H., Dayanandan, S. y V. A. Albert, 1993. Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL.* Annals of the Missouri Botanical Garden 80: 528-580.

Chen, H., Morrel, P. L., De la Cruz, M. y M. T. Clegg. 2008. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado (*Persea americana* Mill.). Journal of Heredity 99: 382–389.

Duminil, J., Pemonge, M.H. and R.J. Petit. 2002. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. Molecular Ecology Notes 2: 428–430.

Ellstrand, C., Lee, J. M. E., Bergh, B. O., Coffey, M. D., and G. A. Zentmyer. 1986 Isozymes confirm hybrid parentage for G 755' selections. California Avocado society Yearbook 70: 199-203.

Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acid Research 32:1792-1797.

Fay, M. F., Swensen, S. M. and M. W. Chase. 1997. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). Kew Bulletin 52: 111–120.

Ford, C.S., Ayres, K.L., Toomey, N., Haider, N., Van Alphen S. J., Kelly L.J., Wikström, N., Hollingsworth, P.M., Duff, R.J., Hoot, S.B., Cowan, R S., Chase, M.W. and M.J. Wilkinson. 2009. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. Bot. Linn. Soc. 159: 1–11.

Frolich, E. F., Schroeder, C. A. and G. A. Zentmyer. 1958. Graft compatibility in the genus *Persea*. California Avocado Society Yearbook 42: 102-105.

Furnier, G. R, Cummings, M. P. and Clegg, M.T. 1990. Evolution of the avocados as related by DNA restriction fragment variation. Journal of Heredity 81: 183-188.

Galindo T., M. E., Arzate F., A. M., Ogata, A. N., Murguía G., J., Lee E.H.E. y I. Landero T. 2008. El origen y domesticación del aguacate (*Persea americana* Mill.)

en Mesoamérica. XXI Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz y I del Trópico Mexicano. Estado de Veracruz, México. pp. 516-523.

Godde, D. and A. Trebst. 1980. NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of *Clamydomonas reinherdii*. Archives of Microbiology 127: 245-252.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. and M.J. Donoghue. 2007. Plant systematics: a phylogenetic approach, Third Edition. Sinauer Axxoc. Sunderland, USA.

Lewin, B. 1994. Genes IV. 2 ed. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, España.

Li, J., Christophel, D. C., Conran, J. G., and H. W. Li. 2004. Phylogenetic relationships within the 'core' Laureae (*Litsea* complex, Lauraceae) inferred from sequences of the chloroplast gene *matK* and nuclear ribosomal DNA ITS regions. Plant Syst. Evol. 246: 19-34.

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.

Kress, W. J., Erickson, D. L., Swenson, N. G., Thompson, J., Uriarte, M. and J. K. Zimmerman. 2010. Advances in the use of DNA barcodes to build a community phylogeny for tropical trees in a Puerto Rican forest dynamics plot. PLoS ONE 5: e15409. doi:10.1371/journal.pone.0015409

Kress, W. J., Erickson, D. L., Jones, F. A., Swenson, N. G., Perez, R., Sanjur, O. and E. Bermingham. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. PNAS. 106: 8621–18626.

Kostermans, A. J. G. H. 1993. *Mutisiopersea* Kostermans, a new genus in Lauraceae. Rhredia 3: 132-135.

Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D., Lahav, E., Hillel, J., Degani, C. and U. Lavi. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between species. Theoretical and Applied Genetics 94: 279-286.

Olmstead, R.G. and J.A. Sweere. 1994. Combining data in phylogenetic systematics: an empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. Systematic Biology 43: 467-481.

Olmstead R.G. and J.D. Palmer. 1994. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. American Journal Botany 81:1205-1204.

Ratnasingham, S. and P. D. N. Hebert. 2007. BOLD: The barcode of life data system. Molecular Ecology Notes 7: 355-364.

Rohwer, J. G. 2000. Toward a phylogenetic classification of the Lauraceae: evidence from *matK* sequences. Syst. Bot. 25: 60–71

Rohwer, J. G., Li, J., Rudolph, B., Schmidt, S. A., van der Werff, H., and H.-W. Li. 2009. Is *Persea* (Lauraceae) monophyletic? Evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. Taxon 58: 1153–1167

Schimitz-Linneweber, C., Maier, R. M., Alcaraz, J. P., Cottet, A., Herrmann, R. G. and D. R. Mache. 2001. The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. Plant Molecular Biology 45: 307–315.

Smith, N., Williams, J. T., Plucknett, D. L. and J. Talbot. 1992. Tropical Forests and Their Crops. Comstock Publishing. Ithaca, USA.

Soltis, P. S., Soltis, D. E., Novak, S. J., Schultz, J. L. and R. K. Kuzoff. 1995. Fossil DNA: its potential for biosystematics, pp. 1-13. *In*: Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics. P. C. Hoch and A. G. Stephenson (eds.). Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri, USA.

Storchová H. and M.S. Olson. 2007. The architecture of the chloroplast psbA-trnH non-coding region in angiosperms. Plant System and Evolution 268: 235-256.

Swofford, D. L. 2001. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates. Sunderland, USA.

Tate, J. A. and B. B. Simpson. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. Syst. Bot. 28: 723–737.

van der Werff, H. 2002. A synopsis of Persea (Lauraceae) in Central America. Novon 12: 575-586.

Vogel, J., Börner, T. and W.R. Hess. 1999. Comparative analysis of splicing of the complete set of chloroplast group II introns in three higher plants mutants. Nucl. Acid. Res. 27: 3866-3874.

Weising, K., Atkinson, R. G. and R. C. Gardner. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. PCR Meth. Applications 4: 249-255.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. *In*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds.). Academic Press, Inc., New York, USA.

Williams, L. O. 1977. The avocado, a synopsis of the genus *Persea*, subg. Persea. Economic Botany 31: 315–320.

CAPITULO II

INVERSIONES DEL ESPACIO INTERGÉNICO *trnH-psbA* PARA LA RECONSTRUCCIÓN FILOGENETICA DEL GÉNERO *Persea* (Lauraceae)

INVERSIONES DEL ESPACIO INTERGÉNICO *trnH-psbA* PARA LA RECONSTRUCCIÓN FILOGENETICA DEL GÉNERO *Persea* (Lauraceae)

INVESTMENTS OF THE *trnH-psbA* INTERGENIC SPACER FOR THE PHYLOGENETIC RECONSTRUCTION EN THE GENUS *Persea* (Lauraceae)

Cruz-Maya, M. E[1]. y Barrientos-Priego, A. F[2].

RESUMEN

El espacio intergénico *trnH-psbA* es un fragmento ampliamente utilizado en estudios filogenéticos de varias familias de las angiospermas y es uno de los principales códigos de barras de ADN para la identificación de especies. Sin embargo, la presencia de una zona sujeta a frecuente inversión dentro de la región *psb*A- 3' UTR en múltiples linajes de angiospermas puede complicar su uso al sobrestimar el número de eventos de sustitución. En este estudio se evaluaron las implicaciones de la inversión de la región *trnH-psbA* en las relaciones filogenéticas de la famila Lauraceae y en el género *Persea*. Al analizar 131 secuencias de 33 géneros de la familia Lauraceae se observó que las relaciones filogenéticas estuvieron determinadas en gran parte por la configuración que presenta la zona de inversión, ya que 11 de los géneros presentan ambas configuraciones, estableciéndose relaciones que no reflejaron ancestría, y que separan linajes relacionados. Al modificar la zona de inversión de las secuencias en una sola conformación, el índice de homoplasia disminuyó, así como el número de sitios informativos y se llegó a obtener una mejor resolución en las relaciones filogenéticas de la familia Lauraceae y del género *Persea*.

Palabras clave: Aguacate, Angiospermas basales, secuencia no codificante, filogenia.

ABSTRACT

The *trnH-psbA* intergenic spacer has been broadly used in phylogenetic studies of several families of angiosperms, and is one of the major DNA barcodes. However, the presence of a region subjected to frequent inversions within the *psb*A-3' UTR region in multiple lineages of the angiosperms may complicate its use by overestimating the number of substitution events. The implications of the inversions of the *trnH-psbA* region in the phylogenetic relationships of Lauraceae and *Persea* genus were evaluated. 131 sequences of 33 genera of the family Lauraceae were evaluated. The analyzes illustrate that the phylogenetic relationships of the taxa are determined largely by the configuration of each sequence in the inversion region; the sequences of 11 genera have both configurations, establishing relationships that do not reflect the ancestry of the taxa, instead related lineages are separated. Modifying the inversion area of the sequences in a single conformation decreased both homoplasy index and the number of informative sites and shows a better resolution in the phylogenetic relationships of Lauraceae and *Persea*.

Key words: Avocado, basal angiosperms, non-coding sequence, phylogeny

[1] Estudiante de la maestría en ciencias en Biotecnología Agrícola. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.
[2] Profesor-Investigador. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.

INTRODUCCIÓN

El espacio intergénico *trnH-psbA* es una región del genoma del cloroplasto de las plantas, se encuentra ubicado entre el gen *psb*A que codifica para la proteína de 32 kDa del fotosistema II y el gen *trn*H que codifica para el tRNA-His (Olmstead y Sweere, 1994). Este marcador es una de las regiones más variables del genoma del cloroplasto (Storchová y Olson; 2007), por lo que se ha propuesto como uno de los códigos de barras universales para plantas (Nicolalde-Morejo *et al*., 2010; Chen *et al.*, 2010*;* Lahaye *et al*., 2008). Además, en combinación con los genes *matK* y *rbcL* puede llegar a delimitar hasta más del 85 % de especies de un taxa (Kress y Erickson, 2007). Así, resulta de gran utilidad en la identificación de especies de plantas conocidas y en el descubrimiento de nuevas especies (Nicolalde-Morejo *et al*., 2010; Chen *et al.*, 2010*;* Lahaye, *et al*., 2008; Hebert y Gregory, 2005; Ratnasingham y Hebert, 2007). Esta región de ADN también se ha utilizado ampliamente en estudios filogenéticos de varios grupos de angiospermas, en donde ha permitido discernir las relaciones de ancestro-descendencia de familias como Asteraceae (Bain y Jansen 2006), Fabaceae y Poaceae (Kress *et al.*, 2005), entre muchas otras.

No obstante, estudios recientes han indicado que la región intergénica *trnH-psbA* está constituida por dos zonas: la región *psb*A 3´-UTR (región no traducida), que está involucrada en la regulación post-trascripcional de la expresión del gen *psb*A, y el espacio intergénico no transcrito *trnH-psbA* (Storchová y Olson, 2007). Ambas zonas co-evolucionan en forma independiente; específicamente, la porción terminal de la región *psb*A 3´-UTR muestra una frecuente evolución convergente; esto es, una zona de aproximadamente 30 pb que presenta inversiones repetidas, y a su vez está flanqueada

por secuencias invertidas o palindrómicas (Sang *et al*., 1997; Kelchner y Wendel, 1996). Este hecho puede confundir el análisis filogenético a cualquier nivel taxonómico, porque las inversiones cuando no se reconocen y no se alinean apropiadamente pueden llevar a sobrestimar el número de eventos de sustitución, separando linajes cercanos y uniendo taxa poco relacionados pero que comparten la misma forma de la inversión (Storchová y Olson, 2007; Whitlock *et al.*, 2010).

Recientemente Cruz-Maya *et al*. (comunicación personal) para establecer la delimitación genérica de *Persea*, utilizando el espacio intergénico *trnH-psbA* junto con otros siete marcadores de DNA, encontraron que a pesar de que el espacio intergénico *trnH-psbA* es el marcador con mayor variabilidad, refleja una filogenia diferente a la que presentan los otros siete marcadores, generando confusión en el análisis. Anteriormente Chanderbali *et al.* (2001) utilizaron el espacio intergénico *trnH-psbA* para establecer las relaciones filogenéticas de las lauráceas, donde también se presentaron algunas confusiones pero no mencionan la presencia de la zona de inversión en este marcador.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue analizar el espacio intergénico *trnH-psbA* para ubicar la zona de inversión de la región del *psb*A 3´-UTR en el género *Persea* y en la familia Lauraceae, establecer las dos formas de la inversión de la UTR en el género *Persea* y en la familia Lauraceae, y determinar cómo influye la zona de inversión y las misma región del *psb*A 3´-UTR en las relaciones filogenéticas del género *Persea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal.

Se utilizó tejido vegetal de 38 materiales del género *Persea* (31 de *Persea*, 7 de *Eriodaphne*), 1 de *Nectandra* sp. y 1de *Beilschmiedia anay*, los cuales fueron obtenidos de la colección del banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX. S.C. (Coatepec de Harinas, México), y de ejemplares depositados en el Herbario del Departamento de Bosques de la Universidad Autónoma Chapingo (CHAP). Los ejemplares provienen de varias localidades de México y de otros países donde se distribuye este género (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Especies utilizadas en el análisis, registro en el Banco de Germoplasma del CICTAMEX S.C., subgénero al que pertenecen y lugar de procedencia.

Taxón	Clave de registro	Subgénero	Localidad y/o país
Persea floccosa	CH-I-3	*Persea*	Aquila, Veracruz, México
Persea sp. 'Freddy 4'	CH-CR-29	*Persea*	Costa Rica
Persea americana var. costaricensis	CH-CR-44	*Persea*	Costa Rica
Persea americana var. costaricensis	CH-CR-25	*Persea*	Costa Rica
Persea steyermarkii	CH-G-Ch1	*Persea*	Chiapas, México
Persea schiedeana	CH-Gu-1	*Persea*	Guatemala
Persea americana var. americana	CH-G-48	*Persea*	Yucatán, México
Persea americana var. drymifolia	CH-C-57	*Persea*	Edo. de México, México
Persea gigantea	CH-I-2	*Persea*	Guatemala
Persea lingue	CH-Pl-1	*Eriodaphne*	Chile
Persea parvifolia	CH-Ve-2	*Persea*	Chocamán, Veracruz, México
Persea americana var. americana x var. guatemalensis	"Hass"	*Persea*	California, U.S.A.
Beilschmiedia anay	CG-Hu-56		Cuetzalan, Puebla, México.
Persea americana var. guatemalensis	CH-GU-6	*Persea*	Guatemala
Persea americana var. americana	CH-G-45	*Persea*	Hunucmá, Yucatán, México
Persea americana var. drymifolia	CH-Der-2	*Persea*	Coatepec de Harinas, Edo. de México, México
Persea cinerascens	CH-C-30	*Eriodaphne*	Tacámbaro, Michoacán, México
Persea americana var. drymifolia	CH-C-63	*Persea*	Coatepec de Harinas, Edo. de México, México
Persea americana var. americana	CH -CR- 28	*Persea*	Costa Rica
Persea americana var. guatemalensis	CH-GU-5	*Persea*	Guatemala
Persea longipes	CH-G-36	*Eriodaphne*	Sierra de Tantima, Veracruz, México
Persea sp. 'PR'	CH-PR-1	*Eriodaphne*	Huatusco, Veraruz, México
Persea americana var. americana	CH-I-6	*Persea*	La Antigua, Veracruz, México
Persea nubigena	CH-I-4	*Persea*	Israel
Persea schiedeana	CH-H-5	*Persea*	Honduras
Persea schiedeana x *Persea americana* var. guatemalensis	CH-C-62	*Persea*	Guatemala
Persea americana var. drymifolia	CH-C-47	*Persea*	Michoacán, México
Persea americana var. guatemalensis	CH-G-11 S1	*Persea*	Olanca, Chiapas, México

Persea americana var. guatemalensis	CH-G-7 S2	*Persea*	San Cristobal de las Casas, Chiapas, México
Persea schiedeana	CH-H-7	*Persea*	Honduras
Persea chamissonis	CHAP 37473	*Eriodaphne*	La Mojonera, Hidalgo, México
Persea chamissonis	CH-Ve-1	*Eriodaphne*	Huatusco, Veracruz, México
Persea tolimanensis	Mv1*	*Persea*	Motozintla, Chiapas, México
Persea vesticula	CAV3	*Eriodaphne*	Tenejapa, Chiapas, México
Nectandra sp.	CAS2		Tenejapa, Chiapas, México

* Material tomado de ejemplares depositados en el Herbario CHAP.

Extracción, amplificación y secuenciación de ADN.

El ADN se extrajo de ~50 - 100 mg de hojas previamente deshidratadas en silica gel, en algunos casos se utilizaron hojas de especímenes de herbario. Para extraer el ADN se utilizó el método de CTAB (Weising *et al.*, 1995) con algunas modificaciones que permitieron eliminar de las muestras una mayor cantidad de compuestos fenólicos. Al final del procedimiento el ADN se purificó con el QIAquick columns (Qiagen, USA). La amplificación del fragmento *trnH-psbA* se realizó en un volumen total de 25 µL, conteniendo 50-100 ng de DNA, 200 µM de la mezcla de dNTP's, 1X Colorless GoTaq Flexi Reaction Buffer (Promega, USA), 20 pM del iniciador trnH2 (5´- GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C -3´) y 20 pM del iniciador psbAF (5´- GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C- 3´) (Tate *et al.* 2003), 2.5 mM de $MgCl_2$ y 2U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, USA). El programa de amplificación del fragmento consistió en un ciclo de desnaturalización inicial de 4 min a 94 ºC, seguido de 35 ciclos de 45 s a 94 ºC, 1 min a 51°C y 1 min a 72 ºC, con un último ciclo de extensión final de 5 min a 72 ºC. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). Los fragmentos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa a 1.2 %. Los productos de PCR se limpiaron utilizando las columnas del QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA). Los productos de PCR se secuenciaron directamente, utilizando los primers mencionados anteriormente, en el sistema de secuenciación automatizado de Macrogen (Corea del sur; http://dna.macrogen.com). Las secuencias se editaron y ensamblaron con el programa BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall, 1999).

Alineamiento de secuencias.

Para ubicar en las lauráceas la región *psb*A 3´-UTR y la zona de inversión dentro de ella, se alinearon las secuencias reportadas de estas zonas por Storchová y Olson (2007), y Whitlock *et al.* (2010) junto con 131 secuencias del espaciador intergénico *trnH-psbA*: 23 de las secuencias obtenidas en este estudio (17 de *Persea,* 4 de *Eriodaphne,* 1 de *Beilschmiedia anay* y 1 de *Nectandra* sp.) y 108 secuencias del Genbank correspondientes a 33 géneros de la familia Lauraceae: *Actinodaphne*, *Aiouea*, *Alseodaphne*, *Anaueria*, *Aniba*, *Aspidostemon*, *Chlorocardium*, *Cinnamomum*, *Cryptocarya*, *Endiandra*, *Endlicheria*, *Eusideroxilon*, *Iteadaphne*, *Kubitzkia*, *Laurus*, *Licaria*, *Lindera*, *Litsea*, *Mezilaurus*, *Nectandra*, *Neocinnamomun*, *Neolitsea*, *Ocotea*, *Parasassafras*, *Persea*, *Pleurothyrium*, *Potameia*, *Potoxylon*, *Rhodostemonodaphne*, *Sassafras*, *Sextonia,* y *Umbellularia*.

Se realizó un segundo alineamiento con las mismas 131 secuencias mencionadas en el párrafo anterior, pero siguiendo lo indicado por Whitlock *et al.* (2010), previamente se reemplazó arbitrariamente una de las dos formas de la inversión con su complemento reverso, de tal forma que la homología se maximizó a través de la región.

En el tercer alineamiento se utilizaron 39 de las secuencias obtenidas en este estudio (31 de *Persea*, 7 de *Eriodaphne* y 1 de *Beilschmiedia anay*) junto con 6 secuencias obtenidas del Genbank (4 de *Persea* y 2 de *Eriodaphne*). En el cuarto alineamiento se utilizaron las mismas secuencias pero previamente se reemplazó arbitrariamente una de las dos formas de la inversión con su complemento reverso.

En el quinto alineamiento se consideró solamente la región del *psb*A 3´-UTR, se incluyeron 126 secuencias: 23 de las secuencias obtenidas en este estudio y 103

secuencias del Genbank correspondientes a 33 géneros de la familia Lauraceae mencionados anteriormente. En el sexto alineamiento se utilizaron las mismas secuencias pero con el reemplazó arbitrario de una de las dos formas de la inversión con su complemento reverso.

Todos los alineamientos se realizaron con el programa MUSCLE versión 3.8 (Edgar, 2004).

Análisis filogenético.

Cada uno de los seis alineamientos descritos en la sección anterior se analizaron con el método de máxima parsimonia, utilizando el programa PAUP versión 4.0b10 (Swofford, 2001). En cada uno de ellos los caracteres tuvieron el mismo valor y los espacios vacíos presentes entre las secuencias alineadas fueron considerados como datos perdidos. Para encontrar los árboles más parsimoniosos se utilizó una búsqueda heurística con 1000 repeticiones de adición de taxones al azar y un intercambio de bifurcaciones de bisección-reconexión de árboles, con la opción Multress sólo se guardaron los mejores árboles de cada paso. El análisis de "bootstrap" se realizó con 1000 repeticiones y una búsqueda heurística con las especificaciones mencionadas anteriormente.

RESULTADOS

Ubicación de la región *psb*A 3´-UTR del espacio intergénico *trnH-psbA*.

La región *psb*A 3´-UTR tuvo una variación de 77 a 86 pb. Las 131 secuencias de los 33 géneros de la familia Lauraceae se agruparon en 39 diferentes secuencias (Fig. 2.1) Algunas secuencias fueron iguales en varias especies del mismo género, como en *Cryptocarya*, *Beilschmiedia* y *Persea*. Otras en cambio, fueron comunes en varios

géneros, como es el caso de la secuencia de *Cinnamomum quadrangulum* AF268781, que fue igual a 3 secuencias de *Cinnamomum*, 2 de *Endlicheria*, 1 de *Kubitzkia*, 1 de *Laurus*, 2 de *Licaria*, 1 de *Lindera*, 1 de *Litsea*, 2 de *Neolitsea*, 7 de *Ocotea*, 1 de *Pleurothyrium* y 3 de *Rhodostemonodaphne*. También la secuencia de *Cinnamomum japonicum* AF268782, fue igual a 12 secuencias de 8 géneros. La zona de inversión ubicada dentro de la región *psb*A 3´-UTR tuvo una variación de 18 a 22 pb y esta bordeada en ambos sentidos por una repetición invertida o secuencia palindromica de 13 pb, que presenta algunas mutaciones puntuales en algunas de las secuencias. En el recuadro de la Fig. 2.1 se indica la ubicación de la zona de inversión, se observa la presencia de las dos formas de la inversión (A y B), ambas formas se presentan en secuencias del mismo género y también se observaron en secuencias de la misma especie, siendo más común la forma B. En *Persea*, la forma B es predominante, la forma A se presenta sólo en siete secuencias: *Persea cinerascens* CH-C-30, *Persea* sp. 'Freddy' CH-CR-29, *Persea chamissonis* CH-Ve-1, *Persea vesticula* CAV3, *Persea steyermarkii* CH-G-Ch1, *Persea nubigena* CH-I-4 y *Persea americana* var. costaricensis CH-CR-25; por lo que ambas formas de la inversión se presentan en *Persea chamissonis*, *Persea steyermarkii*, *Persea nubigena* y *Persea americana*.

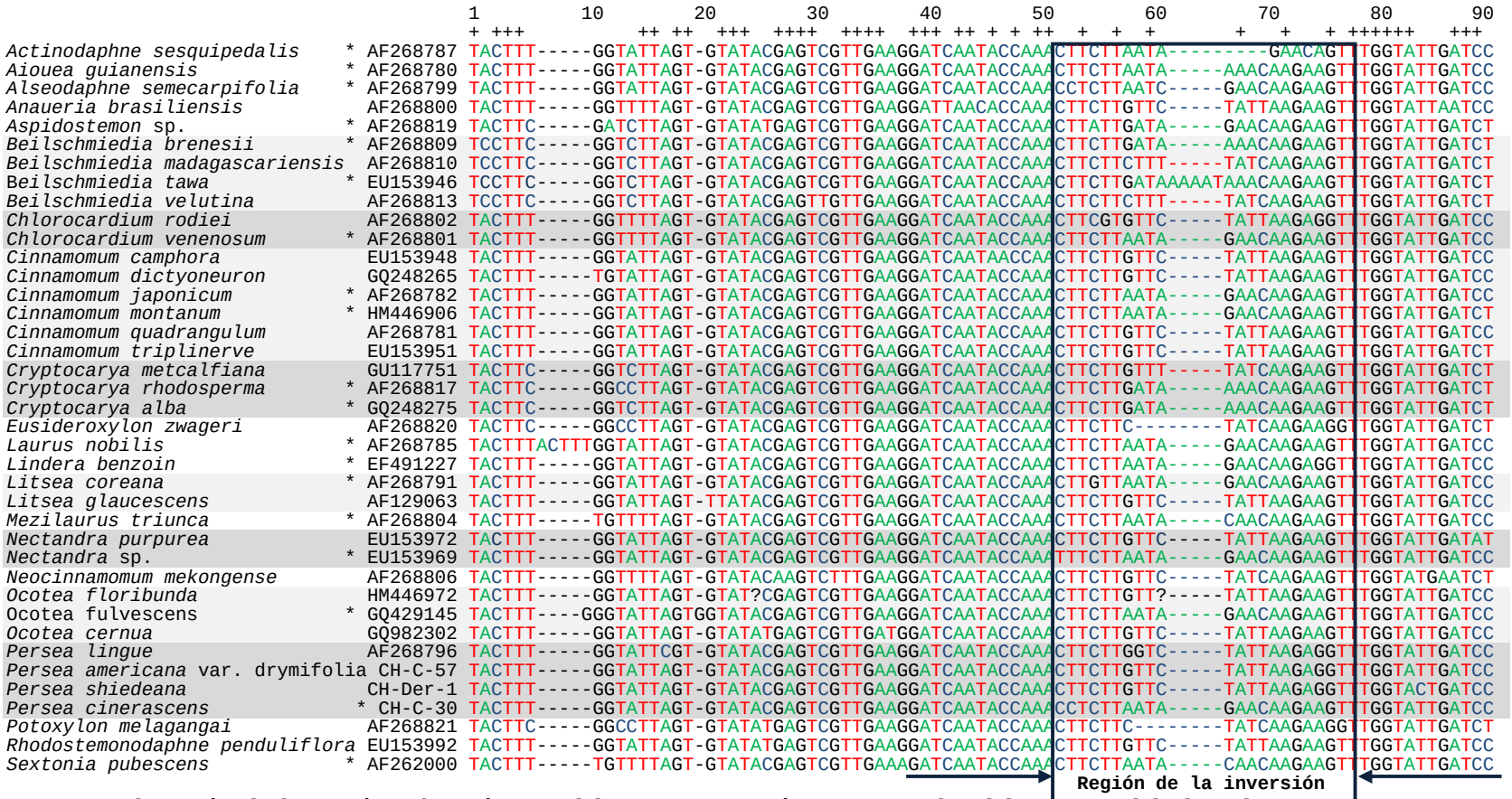


Fig. 2.1. Ubicación de la región psbA 3´-UTR del espacio intergénico *trnH-psbA* del genoma del cloroplasto en 39 secuencias representantes de la familia Lauraceae, se marca en un cuadro la región de la inversión de 18-27 pb, que están flanqueadas por una repetición invertida de 13 pb, que presenta algunas mutaciones puntuales. Los números en la parte superior indican la posición en el espacio intergénico. Los asteriscos marcan las secuencias con la configuración A de la inversión. Los signos de suma señalan los sitios invariables del alineamiento.

En total 69 secuencias de 19 géneros presentaron la configuración A de la zona de inversión. El resto de las 131 secuencias de 23 géneros presentan la configuración B. los géneros *Beilschmiedia*, *Chlorocardium*, *Cinnamomum*, *Cryptocarya*, *Endlicheria*, *Laurus*, *Licaria*, *Lindera*, *Litsea*, *Ocotea* y *Persea* presentan ambas configuraciones de la inversión.

Características de los alineamientos y secuencias.

En el primer y segundo alineamiento se consideró completamente el espacio intergénico *trnH-psbA* de las 131 secuencias, sin embargo, la longitud del fragmento alineado fue ligeramente menor en el segundo análisis como resultado del cambio arbitrario de la forma A de la inversión por la B y de la variación de la longitud del espacio intergénico en las secuencias (Cuadro 2.2). Los datos de sitios variables (Sv), sitios parsimonio-informativos (Pi) y sitios conservados (Sc) fueron prácticamente iguales en ambos alineamientos, pero al revisar los datos relacionados a los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* se observa un decremento en el segundo análisis, principalmente para *Eriodaphne* (Cuadro 2.2).

En el segundo y tercer alineamiento se consideró también el espacio intergénico *trnH-psbA* completo, pero sólo de las secuencias del género *Persea*. Igualmente, hubo variación en la longitud de los fragmentos alineados, el cuarto alineamiento fue ligeramente menor; y los datos Sv, Pi y Sc también fueron menores (Cuadro 2.2).

En los alineamientos quinto y sexto se consideró únicamente la región *psb*A 3´-UTR de 126 secuencias de Lauraceae. La longitud de la región varió por efecto de las inserciones y deleciones de la región de la inversión, aunque en los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* no se presentaron y la longitud fue constante. Ambos alineamientos fueron de la misma

longitud. Al comparar los alineamientos se observó que al tener todas las inversiones en la forma B, en Lauraceae, *Persea* y *Eriodaphne* los Sc aumentan y por lo tanto los Sv disminuyen, los Pi disminuyen en Lauraceae y no existe ninguno que separe a *Persea* y *Eriodaphne* (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Descripción de las secuencias y datos de los alineamientos del fragmento *trnH-psbA* en la familia Lauraceae y los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*.

Género/ subgénero	TFA	VSFA	Pi	Pi (%)	Sc	Sc (%)	Sv	Sv (%)	SVNI
1° Alineamiento									
Lauraceae	504	315-411	138	27.38	227	45.04	223	44.25	84
Persea	504	388-400	21	4.17	364	72.81	41	8.14	20
Eriodaphne	504	394-398	17	3.37	377	74.80	21	4.17	4
2° Alineamiento									
Lauraceae	496	315-411	137	27.62	224	45.16	224	45.16	87
Persea	496	388-400	16	3.23	372	75.00	33	6.65	15
Eriodaphne	496	394-398	9	1.82	382	77.02	14	2.82	5
3° Alineamiento									
Persea	411	388-400	167	40.63	228	55.47	172	41.85	5
Eriodaphne	411	394-398	101	24.57	254	61.80	142	34.55	41
4° Alineamiento									
Persea	410	388-400	27	6.58	366	89.27	35	8.54	8
Eriodaphne	410	394-398	9	2.19	382	93.17	15	3.66	6
5° Alineamiento									
Lauraceae	91	77-85	19	20.87	42	46.15	39	42.86	19
Persea	91	80	8	8.79	71	78.02	9	9.89	1
Eriodaphne	91	80	8	8.79	71	78.02	9	9.89	1
6° Alineamiento									
Lauraceae	91	77-85	15	16.48	46	50.55	35	38.46	19
Persea	91	80	0	0	79	86.81	1	1.10	1
Eriodaphne	91	80	0	0	78	85.71	2	2.20	2

TFA= Longitud del fragmento alineado VSFA= Variación de las secuencias del fragmento alineado Pi= Sitios parsimonio informativos, Sc= Sitios conservados, Sv= sitios variables, SVNI= Sitios variables no informativos

Análisis filogenéticos del fragmento *trnH-psbA*.

En el primer análisis se observó el agrupamiento de las especies de géneros como *Crytpcaria*, *Sassafras* y *Sextonia* en clados independientes, sin embargo, especies de géneros como *Ocotea*, *Cinnamomum*, *Rhodostemonodaphne* y *Nectandra* se presentan en varios clados a lo largo del árbol (Fig. 2.2). Para el caso de los subgéneros *Persea*, este se divide en tres clados, en donde dos clados está formado por especies que comparten la misma forma de la inversión en la región *psbA* 3´-UTR, y las del tercero presentan la otra forma de la inversión. Las especies del subgénero *Eriodaphne* se dividen en dos clados, en cada uno de ellos están especies que comparten la misma forma de la inversión de la región *psb*A 3´-UTR. En el segundo análisis se observó que las especies de géneros como *Ocotea* se agruparon en un menor número de clados; pero no llegan a formar uno solo. Para el caso del subgénero *Eriodaphne* si se llega a formar un solo clado, pero en el subgénero *Persea* se forman dos, el clado conformado por *P. americana* var. americana CH-G-45 y *P. americana* var. guatemalensis CG-G-11S1 se mantiene en el árbol a pesar del cambio de la región de inversión de la forma A a la B.

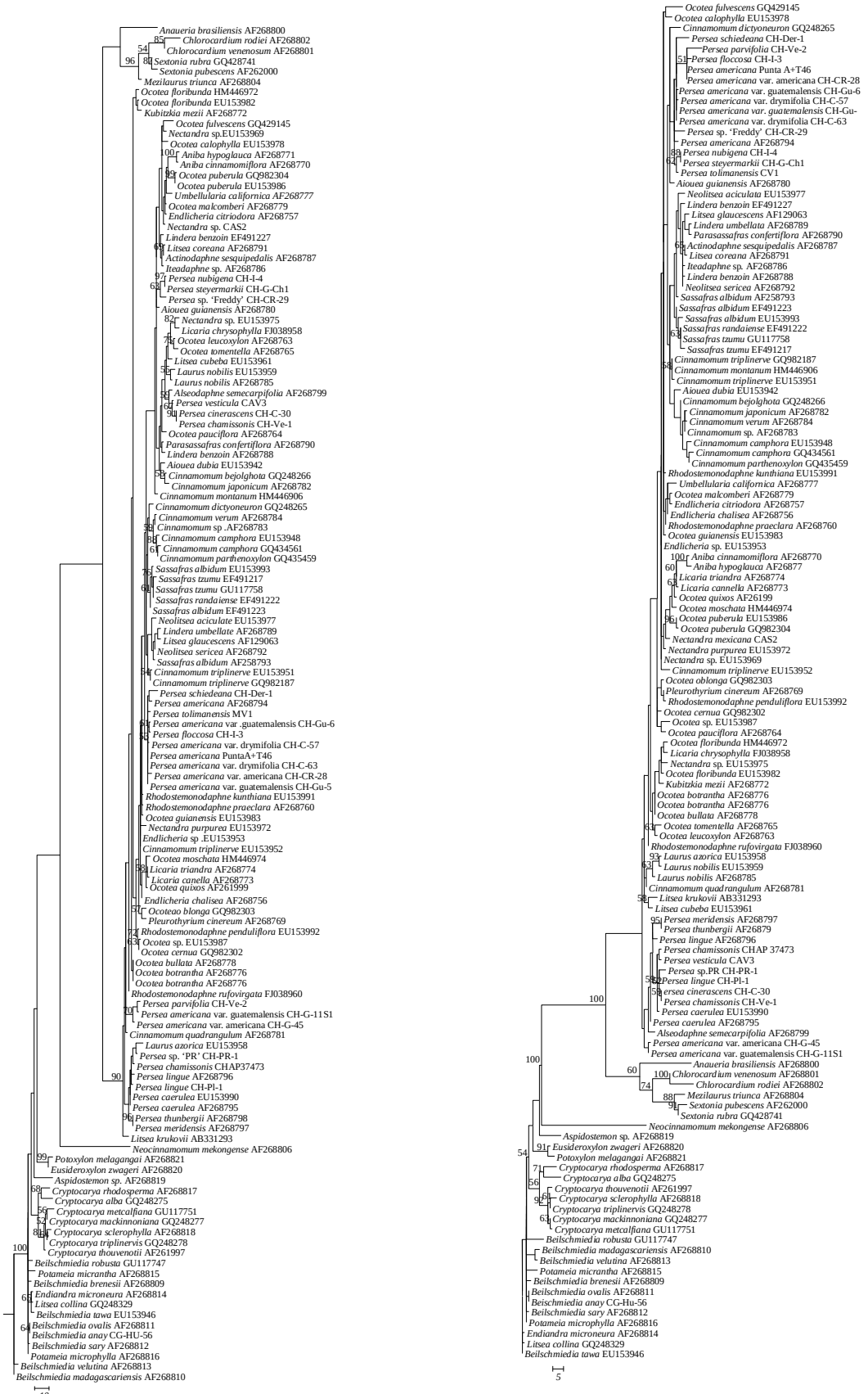

Anaueria brasiliensis AF268800
Chlorocardium rodiei AF268802
Chlorocardium venenosum AF268801
Sextonia rubra GQ428741
Sextonia pubescens AF262000
Mezilaurus triunca AF268804
Ocotea floribunda HM446972
Ocotea floribunda EU153982
Kubitzkia mezii AF268772
Ocotea fulvescens GQ429145
Nectandra sp.EU153969
Ocotea calophylla EU153978
Aniba hypoglauca AF268771
Aniba cinnamomiflora AF268770
Ocotea puberula GQ982304
Ocotea puberula EU153986
Umbellularia californica AF268777
Ocotea malcomberi AF268779
Endlicheria citriodora AF268757
Nectandra sp. CAS2
Lindera benzoin EF491227
Litsea coreana AF268791
Actinodaphne sesquipedalis AF268787
Iteadaphne sp. AF268786
Persea nubigena CH-I-4
Persea steyermarkii CH-G-Ch1
Persea sp. 'Freddy' CH-CR-29
Aiouea guianensis AF268780
Nectandra sp. EU153975
Licaria chrysophylla FJ038958
Ocotea leucoxylon AF268763
Ocotea tomentella AF268765
Litsea cubeba EU153961
Laurus nobilis EU153959
Laurus nobilis AF268785
Alseodaphne semecarpifolia AF268799
Persea vesticula CAV3
Persea cinerascens CH-C-30
Persea chamissonis CH-Ve-1
Ocotea pauciflora AF268764
Parasassafras confertiflora AF268790
Lindera benzoin AF268788
Aiouea dubia EU153942
Cinnamomum bejolghota GQ248266
Cinnamomum japonicum AF268782
Cinnamomum montanum HM446906
Cinnamomum dictyoneuron GQ248265
Cinnamomum verum AF268784
Cinnamomum sp .AF268783
Cinnamomum camphora EU153948
Cinnamomum camphora GQ434561
Cinnamomum parthenoxylon GQ435459
Sassafras albidum EU153993
Sassafras tzumu EF491217
Sassafras tzumu GU117758
Sassafras randaiense EF491222
Sassafras albidum EF491223
Neolitsea aciculate EU153977
Lindera umbellate AF268789
Litsea glaucescens AF129063
Neolitsea sericea AF268792
Sassafras albidum AF258793
Cinnamomum triplinerve EU153951
Cinnamomum triplinerve GQ982187
Persea schiedeana CH-Der-1
Persea americana AF268794
Persea tolimanensis MV1
Persea americana var .guatemalensis CH-Gu-6
Persea floccosa CH-I-3
Persea americana var. drymifolia CH-C-57
Persea americana PuntaA+T46
Persea americana var. drymifolia CH-C-63
Persea americana var. americana CH-CR-28
Persea americana var. guatemalensis CH-Gu-5
Rhodostemonodaphne kunthiana EU153991
Rhodostemonodaphne praeclara AF268760
Ocotea guianensis EU153983
Nectandra purpurea EU153972
Endlicheria sp .EU153953
Cinnamomum triplinerve EU153952
Ocotea moschata HM446974
Licaria triandra AF268774
Licaria canella AF268773
Ocotea quixos AF261999
Endlicheria chalisea AF268756
Ocoteao blonga GQ982303
Pleurothyrium cinereum AF268769
Rhodostemonodaphne penduliflora EU153992
Ocotea sp. EU153987
Ocotea cernua GQ982302
Ocotea bullata AF268778
Ocotea botrantha AF268776
Ocotea botrantha AF268776
Rhodostemonodaphne rufovirgata FJ038960
Persea parvifolia CH-Ve-2
Persea americana var. guatemalensis CH-G-11S1
Persea americana var. americana CH-G-45
Cinnamomum quadrangulum AF268781
Laurus azorica EU153958
Persea sp. 'PR' CH-PR-1
Persea chamissonis CHAP37473
Persea lingue AF268796
Persea lingue CH-Pl-1
Persea caerulea EU153990
Persea caerulea AF268795
Persea thunbergii AF268798
Persea meridensis AF268797
Litsea krukovii AB331293
Neocinnamomum mekongense AF268806
Potoxylon melagangai AF268821
Eusideroxylon zwageri AF268820
Aspidostemon sp. AF268819
Cryptocarya rhodosperma AF268817
Cryptocarya alba GQ248275
Cryptocarya metcalfiana GU117751
Cryptocarya mackinnoniana GQ248277
Cryptocarya sclerophylla AF268818
Cryptocarya triplinervis GQ248278
Cryptocarya thouvenotii AF261997
Beilschmiedia robusta GU117747
Potameia micrantha AF268815
Beilschmiedia brenesii AF268809
Endiandra microneura AF268814
Litsea collina GQ248329
Beilschmiedia tawa EU153946
Beilschmiedia ovalis AF268811
Beilschmiedia anay CG-HU-56
Beilschmiedia sary AF268812
Potameia microphylla AF268816
Beilschmiedia velutina AF268813
Beilschmiedia madagascariensis AF268810
10
Ocotea fulvescens GQ429145
Ocotea calophylla EU153978
Cinnamomum dictyoneuron GQ248265
Persea schiedeana CH-Der-1
Persea parvifolia CH-Ve-2
Persea floccosa CH-I-3
Persea americana Punta A+T46
Persea americana var. americana CH-CR-28
Persea americana var. guatemalensis CH-Gu-6
Persea americana var. drymifolia CH-C-57
Persea americana var. guatemalensis CH-Gu-
Persea americana var. drymifolia CH-C-63
Persea sp. 'Freddy' CH-CR-29
Persea americana AF268794
Persea nubigena CH-I-4
Persea steyermarkii CH-G-Ch1
Persea tolimanensis CV1
Aiouea guianensis AF268780
Neolitsea aciculatu EU153977
Lindera benzoin EF491227
Litsea glaucescens AF129063
Lindera umbellata AF268789
Parasassafras confertiflora AF268790
Actinodaphne sesquipedalis AF268787
Litsea coreana AF268791
Iteadaphne sp. AF268786
Lindera benzoin AF268788
Neolitsea sericea AF268792
Sassafras albidum AF258793
Sassafras albidum EF491223
Sassafras albidum EU153993
Sassafras randaiense EF491222
Sassafras tzumu GU117758
Sassafras tzumu EF491217
Cinnamomum triplinerve GQ982187
Cinnamomum montanum HM446906
Cinnamomum triplinerve EU153951
Aiouea dubia EU153942
Cinnamomum bejolghota GQ248266
Cinnamomum japonicum AF268782
Cinnamomum verum AF268784
Cinnamomum sp. AF268783
Cinnamomum camphora EU153948
Cinnamomum camphora GQ434561
Cinnamomum parthenoxylon GQ435459
Rhodostemonodaphne kunthiana EU153991
Umbellularia californica AF268777
Ocotea malcomberi AF268779
Endlicheria citriodora AF268757
Endlicheria chalisea AF268756
Rhodostemonodaphne praeclara AF268760
Ocotea guianensis EU153983
Endlicheria sp. EU153953
Aniba cinnamomiflora AF268770
Aniba hypoglauca AF26877
Licaria triandra AF268774
Licaria cannella AF268773
Ocotea quixos AF26199
Ocotea moschata HM446974
Ocotea puberula EU153986
Ocotea puberula GQ982304
Nectandra mexicana CAS2
Nectandra purpurea EU153972
Nectandra sp. EU153969
Cinnamomum triplinerve EU153952
Ocotea oblonga GQ982303
Pleurothyrium cinereum AF268769
Rhodostemonodaphne penduliflora EU153992
Ocotea cernua GQ982302
Ocotea sp. EU153987
Ocotea pauciflora AF268764
Ocotea floribunda HM446972
Licaria chrysophylla FJ038958
Nectandra sp. EU153975
Ocotea floribunda EU153982
Kubitzkia mezii AF268772
Ocotea botrantha AF268776
Ocotea botrantha AF268776
Ocotea bullata AF268778
Ocotea tomentella AF268765
Ocotea leucoxylon AF268763
Rhodostemonodaphne rufovirgata FJ038960
Laurus azorica EU153958
Laurus nobilis EU153959
Laurus nobilis AF268785
Cinnamomum quadrangulum AF268781
Litsea krukovii AB331293
Litsea cubeba EU153961
Persea meridensis AF268797
Persea thunbergii AF26879
Persea lingue AF268796
Persea chamissonis CHAP 37473
Persea vesticula CAV3
Persea sp.PR CH-PR-1
Persea lingue CH-Pl-1
ersea cinerascens CH-C-30
Persea chamissonis CH-Ve-1
Persea caerulea EU153990
Persea caerulea AF268795
Alseodaphne semecarpifolia AF268799
Persea americana var. americana CH-G-45
Persea americana var. guatemalensis CH-G-11S1
Anaueria brasiliensis AF268800
Chlorocardium venenosum AF268801
Chlorocardium rodiei AF268802
Mezilaurus triunca AF268804
Sextonia pubescens AF262000
Sextonia rubra GQ428741
Neocinnamomum mekongense AF268806
Aspidostemon sp. AF268819
Eusideroxylon zwageri AF268820
Potoxylon melagangai AF268821
Cryptocarya rhodosperma AF268817
Cryptocarya alba GQ248275
Cryptocarya thouvenotii AF261997
Cryptocarya sclerophylla AF268818
Cryptocarya triplinervis GQ248278
Cryptocarya mackinnoniana GQ248277
Cryptocarya metcalfiana GU117751
Beilschmiedia robusta GU117747
Beilschmiedia madagascariensis AF268810
Beilschmiedia velutina AF268813
Potameia micrantha AF268815
Beilschmiedia brenesii AF268809
Beilschmiedia ovalis AF268811
Beischmiedia anay CG-Hu-56
Beilschmiedia sary AF268812
Potameia microphylla AF268816
Endiandra microneura AF268814
Litsea collina GQ248329
Beilschmiedia tawa EU153946
5

Figura 2.2. Árboles filogenéticos del espacio intergénico *trnH-psbA* de 131 secuencias de Lauraceae, generados con el método de máxima parsimonia y 1000 búsquedas heurísticas, los valores de "bootstrap" >50 se encuentran por arriba de las ramas. A) Árbol número 204 del primer análisis que considera las 131 secuencias sin modificación en la región de inversión. B) Árbol número 502 del segundo análisis que considera las 131 secuencias con la región de la inversión en la forma B.

En el tercer y cuarto análisis, donde solo se consideraron las secuencias de *Persea*, se apreció el cambio en la conformación de dos clados, uno de cada subgénero, cuando se consideran todas las secuencias de la región de inversión en la forma B. Reflejando la influencia de esta zona en la filogenia de ambos taxa (Fig. 2.3 y fig. 2.4).

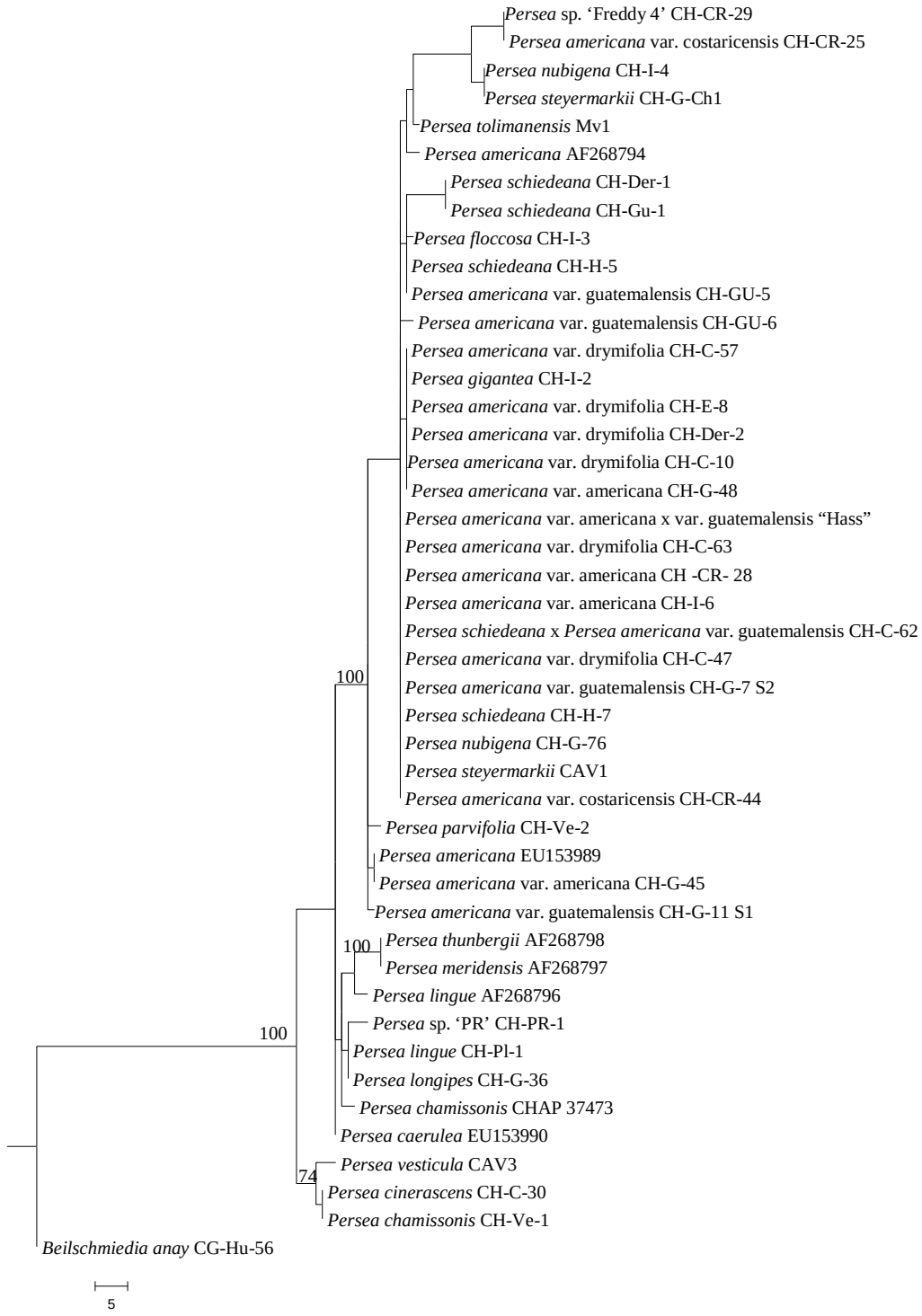


Figura 2.3. Árbol filogenético del espacio intergénico *trnH-psbA* de 45 secuencias del género *Persea* sin modificación en la región de inversión. Árbol número 203 generado con el método de máxima parsimonia y 1000 búsquedas heurísticas. Los valores de "bootstrap" >70 se encuentran por arriba de las ramas.

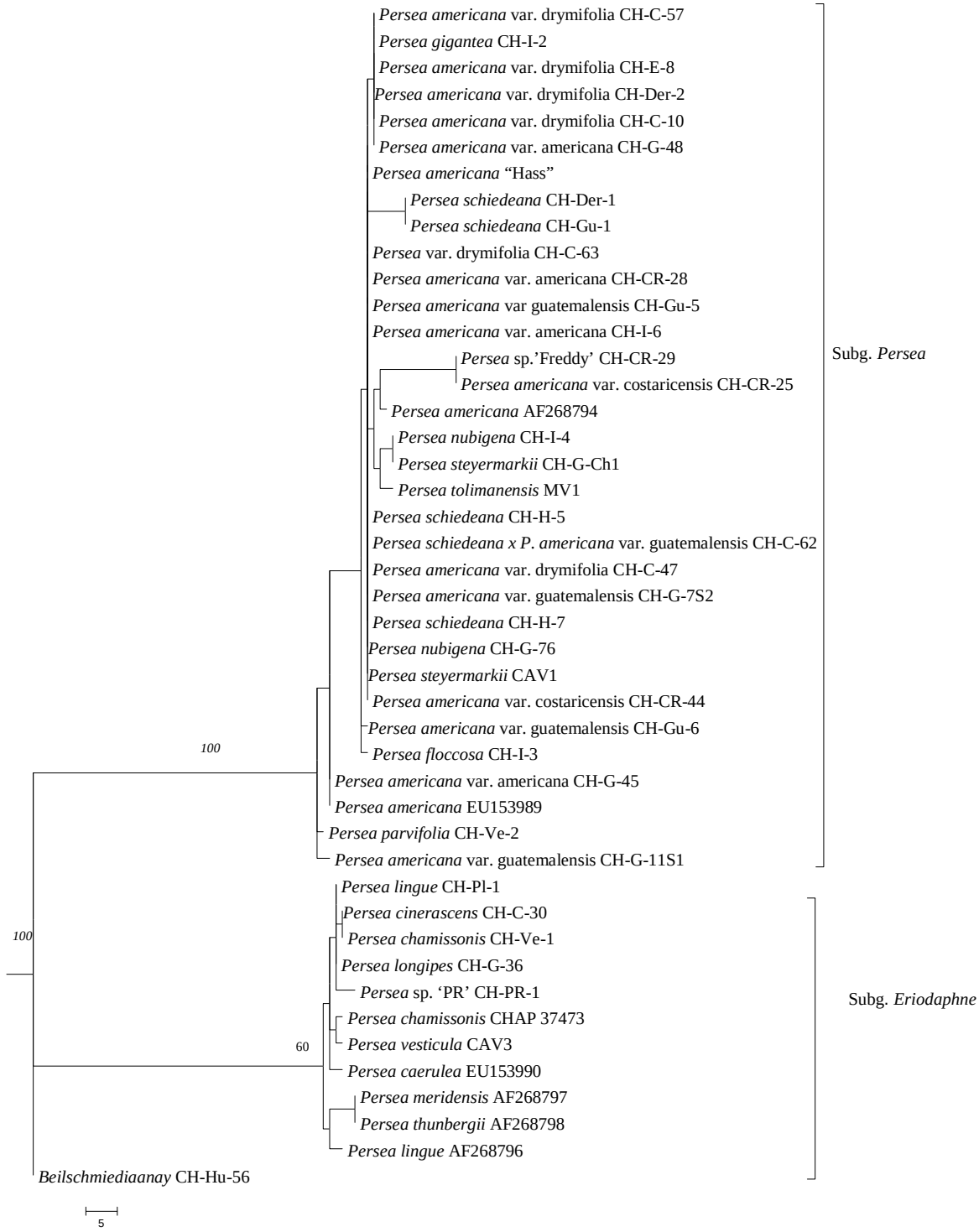


Figura 2.4. Árbol filogenético del espacio intergénico *trnH-psbA* de 45 secuencias del género *Persea* con la región de la inversión en la forma B. Árbol número 33 generado con el método de máxima parsimonia y 1000 búsquedas heurísticas. Los valores de "bootstrap" >70 se encuentran por arriba de las ramas.

En los últimos dos análisis a pesar de haberse considerado un fragmento de apenas 77-85 pb, se apreció que la zona de inversión tuvo un gran peso en los árboles filogenéticos, al considerarse tal y como aparece en las secuencias se obtiene un mayor número de sitios informativos, y en el caso de *Persea* se obtiene dos clados independientes que están formados por especies que comparten la misma forma de la inversión. Cuando se consideran todas las secuencias en la misma forma de la inversión se tiene un menor número de sitios informativos, formándose menos clados con varios géneros, las especies de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* se agrupan en uno solo.

DISCUSIÓN

A pesar de que el espacio intergénico *trnH-psbA* por su alta tasa de evolución nucleotídica es uno de los fragmentos del genoma del cloroplasto de las angiospermas más empleado en los análisis filogenéticos y de código de barras, algunos investigadores han puesto de manifiesto que no es un marcador adecuado para estos análisis, ya que en ciertas zonas de la secuencia la variación se debe a la presencia de caracteres homoplásicos (Olmstead y Palmer, 1994), que no reflejan ancestría común (Page y Holmes, 1998; Morrone, 2000). Una de las zonas problemáticas es un pequeño fragmento de ADN en la región *psb*A 3´-UTR, que presenta frecuentes inversiones, lo que ocasiona que secuencias de la misma especie con diferente configuración de la inversión aparezcan distantemente relacionadas (Whitlock *et al*., 2010). En las secuencias analizadas de la familia Lauraceae y específicamente entre las especies de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*, se encontró que los datos de divergencia entre las secuencias de los géneros analizados se sobrestiman cuando no se reconoce la inversión

y no se alinean las secuencias en una sola configuración de la inversión, como consecuencia los árboles filogenéticos generados fallan en establecer correctamente las relaciones de ancestro-descendencia; así, un estudio de código de barras fallaría en distinguir las especies y géneros.

Cuando la región de inversión se alinea en una sola configuración, las relaciones filogenéticas son más claras; no obstante, para el caso de los taxa analizados no se obtienen árboles resueltos, sigue habiendo mezcla de algunos géneros en varios clados. Una posible respuesta es que a pesar del alineamiento de la región de inversión, los índices de homoplasia de las reconstrucciones filogenéticas siguen siendo altos (Cuadro 2.3) en comparación con los datos obtenidos en *trn*L-*trn*F (Lauraceae HI=0.19, *Persea* HI=0.036), *matK* (Lauraceae HI=0.09, *Persea* HI=0.048), y *rbcL* (Lauraceae HI=0.017, *Persea* HI=0.01) (Cruz-Maya *et al*., comunicación personal), por lo del espacio no transcrito del espacio intergénico *trnH-psbA* presenta elementos que están influyendo en el aumento del índice de homoplasia y en la estructura de los árboles filogenéticos. También es probable que la homoplasia no sea el único factor que cause tal efecto, y puede que existan por ejemplo, problemas en la identificación de materiales que hace que especies de géneros como *Ocotea*, *Litsea* y *Lindera* se distribuyan en varios clados de los árboles. Otra posibilidad es que varias de las especies consideradas hasta ahora deban constituirse en nuevos géneros o subgéneros, hipótesis que necesita mucha más información para poder ser sustentada.

Cuadro 2.3. Descripción de los análisis filogenéticos del fragmento *trnH-psbA* en las familia Lauraceae, el género *Persea* y los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*.

Análisis	LP	CI	HI	RI
Primero	552	0.53	0.47	0.87
Segundo	496	0.60	0.40	0.90
Tercero	114	0.75	0.24	0.87
Cuarto	106	0.81	0.19	0.89
Quinto	61	0.76	0.25	0.96
Sexto	46	0.82	0.17	0.79

LP= Longitud de pasos, CI= Índice de consistencia
HI= Índice de homoplasia, RI= Índice de retención

El análisis de la región *psbA* 3´-UTR presentó una disminución importante en el índice de homoplasia cuando la zona de inversión se alineó en una sola configuración, y a pesar de que la región *psbA* 3´-UTR es muy corta (77-85 pb en Lauraceae) para proporcionar suficiente señal filogenética, se pudo observar cual fue el efecto de la región de inversión en los árboles filogenéticos (Fig. 2.5); además, al compararlos con los árboles de la región intergénica *trnH-psbA* completa, se observó su influencia en la conformación de los clados, como es el caso de la formación del clado independiente de *P. americana* var. americana CH-G-45 y *P. americana* var. guatemalensis CG-G-11S1 (Fig, 2.2), que no se presenta en los filogramas de la región *psbA* 3´-UTR (Fig. 2.5). En un futuro varias regiones intergénicas 3´-UTRs de genes que codifiquen proteínas podrían combinarse para obtener información adicional que pueda resolver mejor las relaciones filogenéticas de los taxa. Este tipo de inversiones no solo se presentan en la región *trnH-psbA*, también se han encontrado en los marcadores: *rpl16* (Kelcher y Wendel, 1996), *psbC-trnS* (Catalano *et al.*, 2009), *trnL-trnF* (Kim y Lee, 2005), y *atpb-rbcL* (Golenberg *et al*., 1993) entre otros.

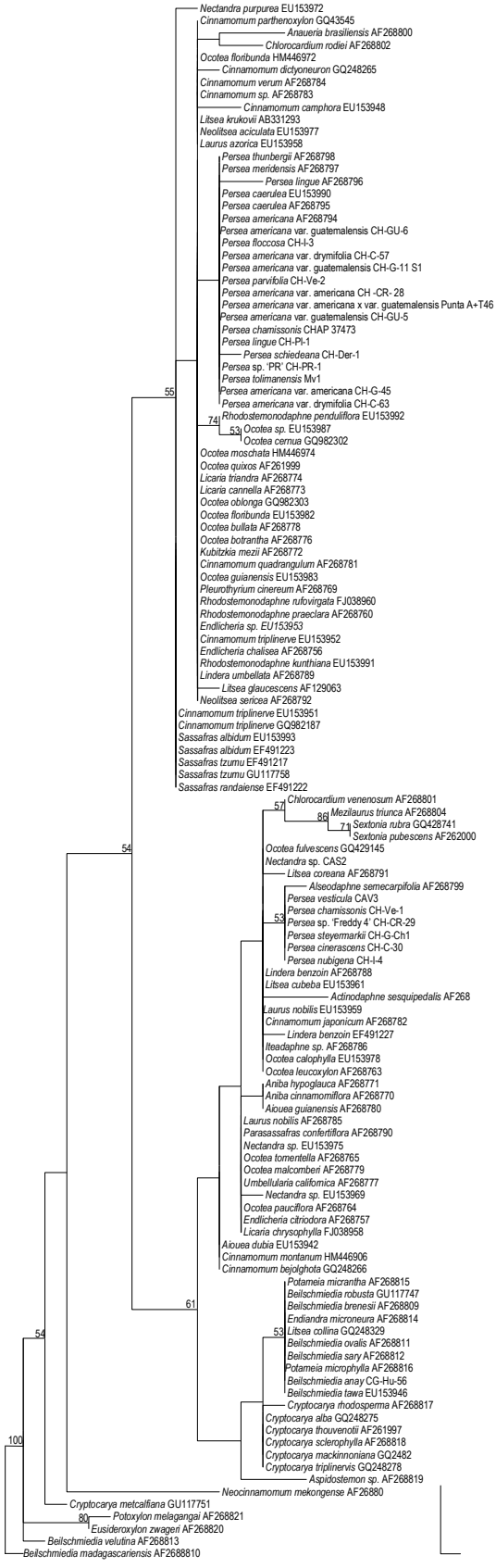

Nectandra purpurea EU153972
Cinnamomum parthenoxylon GQ43545
Anaueria brasiliensis AF268800
Chlorocardium rodiei AF268802
Ocotea floribunda HM446972
Cinnamomum dictyoneuron GQ248265
Cinnamomum verum AF268784
Cinnamomum sp. AF268783
Cinnamomum camphora EU153948
Litsea krukovii AB331293
Neolitsea aciculata EU153977
Laurus azorica EU153958
Persea thunbergii AF268798
Persea meridensis AF268797
Persea lingue AF268796
Persea caerulea EU153990
Persea caerulea AF268795
Persea americana AF268794
Persea americana var. guatemalensis CH-GU-6
Persea floccosa CH-I-3
Persea americana var. drymifolia CH-C-57
Persea americana var. guatemalensis CH-G-11 S1
Persea parvifolia CH-Ve-2
Persea americana var. americana CH -CR- 28
Persea americana var. americana x var. guatemalensis Punta A+T46
Persea americana var. guatemalensis CH-GU-5
Persea chamissonis CHAP 37473
Persea lingue CH-PI-1
Persea schiedeana CH-Der-1
Persea sp. 'PR' CH-PR-1
Persea tolimanensis Mv1
Persea americana var. americana CH-G-45
Persea americana var. drymifolia CH-C-63
Rhodostemonodaphne pendulliflora EU153992
Ocotea sp. EU153987
Ocotea cernua GQ982302
Ocotea moschata HM446974
Ocotea quixos AF261999
Licaria triandra AF268774
Licaria cannella AF268773
Ocotea oblonga GQ982303
Ocotea floribunda EU153982
Ocotea bullata AF268778
Ocotea botrantha AF268776
Kubitzkia mezii AF268772
Cinnamomum quadrangulum AF268781
Ocotea guianensis EU153983
Pleurothyrium cinereum AF268769
Rhodostemonodaphne rufovirgata FJ038960
Rhodostemonodaphne praeclara AF268760
Endlicheria sp. EU153953
Cinnamomum triplinerve EU153952
Endlicheria chalisea AF268756
Rhodostemonodaphne kunthiana EU153991
Lindera umbellata AF268789
Litsea glaucescens AF129063
Neolitsea sericea AF268792
Cinnamomum triplinerve EU153951
Cinnamomum triplinerve GQ982187
Sassafras albidum EU153993
Sassafras albidum EF491223
Sassafras tzumu EF491217
Sassafras tzumu GU117758
Sassafras randaiense EF491222
Chlorocardium venenosum AF268801
Mezilaurus triunca AF268804
Sextonia rubra GQ428741
Sextonia pubescens AF262000
Ocotea fulvescens GQ429145
Nectandra sp. CAS2
Litsea coreana AF268791
Aiseodaphne semecarpifolia AF268799
Persea vesticula CAV3
Persea chamissonis CH-Ve-1
Persea sp. 'Freddy 4' CH-CR-29
Persea steyermarkii CH-G-Ch1
Persea cinerascens CH-C-30
Persea nubigena CH-I-4
Lindera benzoin AF268788
Litsea cubeba EU153961
Actinodaphne sesquipedalis AF268
Laurus nobilis EU153959
Cinnamomum japonicum AF268782
Lindera benzoin EF491227
Iteadaphne sp. AF268786
Ocotea calophylla EU153978
Ocotea leucoxylon AF268763
Aniba hypoglauca AF268771
Aniba cinnamomiflora AF268770
Aiouea guianensis AF268780
Laurus nobilis AF268785
Parasassafras confertiflora AF268790
Nectandra sp. EU153975
Ocotea tomentella AF268765
Ocotea malcomberi AF268779
Umbellularia californica AF268777
Nectandra sp. EU153969
Ocotea pauciflora AF268764
Endlicheria citriodora AF268757
Licaria chrysophylla FJ038958
Aiouea dubia EU153942
Cinnamomum montanum HM446906
Cinnamomum bejolghota GQ248266
Potameia micrantha AF268815
Beilschmiedia robusta GU117747
Beilschmiedia brenesii AF268809
Endiandra microneura AF268814
Litsea collina GQ248329
Beilschmiedia ovalis AF268811
Beilschmiedia sary AF268812
Potameia microphylla AF268816
Beilschmiedia anay CG-Hu-56
Beilschmiedia tawa EU153946
Cryptocarya rhodosperma AF268817
Cryptocarya alba GQ248275
Cryptocarya thouvenotii AF261997
Cryptocarya sclerophylla AF268818
Cryptocarya mackinnoniana GQ2482
Cryptocarya triplinervis GQ248278
Aspidostemon sp. AF268819
Neocinnamomum mekongense AF26880
Cryptocarya metcalfiana GU117751
Potoxylon melagangai AF268821
Eusideroxylon zwageri AF268820
Beilschmiedia velutina AF268813
Beilschmiedia madagascariensis AF2688810
55
74
53
54
57
86
71
53
54
61
53
100
80
Actinodaphne sesquipedalis AF268787
Aiouea guianensis AF268780
Aniba cinnamomiflora AF268770
Aniba hypoglauca AF268771
Ocotea floribunda HM446972
Aiseodaphne semecarpifolia AF268799
Chlorocardium rodiei AF268802
Persea americana var. drymifolia CH-C-57
Persea lingue CH-PI-1
Persea parvifolia CH-Ve-2
Persea americana var. americana x var. guatemalensis Punta A+T46
Persea americana var. guatemalensis CH-GU-6
Persea americana var. americana CH-G-45
Persea floccosa CH-I-3
Persea schiedeana CH-Der-1
Persea cinerascens CH-C-30
Persea americana var. americana CH -CR- 28
Persea americana var. guatemalensis CH-GU-5
Persea sp. 'PR' CH-PR-1
Persea sp. 'Freddy 4' CH-CR-29
Persea nubigena CH-I-4
Persea americana var. guatemalensis CH-G-11 S1
Persea chamissonis CHAP 37473
Persea chamissonis CH-Ve-1
Persea tolimanensis Mv1
Persea vesticula CAV3
Persea steyermarkii CH-G-Ch1
Persea americana AF268794
Persea caerulea AF268795
Persea caerulea EU153990
Persea lingue AF268796
Persea meridensis AF268797
Persea thunbergii AF268798
Persea americana var. drymifolia CH-C-63
Cinnamomum camphora EU153948
Cinnamomum dictyoneuron GQ248265
Cinnamomum japonicum AF268782
Cinnamomum quadrangulum AF268781
Cinnamomum sp. AF268783
Cinnamomum triplinerve EU153952
Cinnamomum verum AF268784
Endlicheria chalisea AF268756
Endlicheria citriodora AF268757
Endlicheria sp. EU153953
Iteadaphne sp. AF268786
Kubitzkia mezii AF268772
Laurus azorica EU153958
Laurus nobilis AF268785
Laurus nobilis EU153959
Licaria cannella AF268773
Licaria chrysophylla FJ038958
Licaria triandra AF268774
Lindera benzoin AF268788
Lindera benzoin EF491227
Lindera umbellata AF268789
Litsea coreana AF268791
Litsea cubeba EU153961
Litsea glaucescens AF129063
Litsea krukovii AB331293
Nectandra sp. CAS2
Nectandra sp. EU153969
Neolitsea aciculata EU153977
Neolitsea sericea AF268792
Ocotea botrantha AF268776
Ocotea bullata AF268778
Ocotea cernua GQ982302
Ocotea sp. EU153987
Ocotea floribunda EU153982
Ocotea fulvescens GQ429145
Ocotea guianensis EU153983
Ocotea leucoxylon AF268763
Ocotea malcomberi AF268779
Ocotea moschata HM446974
Ocotea oblonga GQ982303
Ocotea pauciflora AF268764
Ocotea quixos AF261999
Ocotea tomentella AF268765
Parasassafras confertiflora AF268790
Pleurothyrium cinereum AF268769
Rhodostemonodaphne kunthiana EU153991
Rhodostemonodaphne pendulliflora EU153992
Rhodostemonodaphne praeclara AF268760
Rhodostemonodaphne rufovirgata FJ038960
Umbellularia californica AF268777
Cinnamomum parthenoxylon GQ43545
Nectandra sp. EU153975
Ocotea calophylla EU153978
Anaueria brasiliensis AF268800
Chlorocardium venenosum AF268801
Mezilaurus triunca AF268804
Sextonia pubescens AF262000
Sextonia rubra GQ428741
Aiouea dubia EU153942
Cinnamomum montanum HM446906
Cinnamomum triplinerve EU153951
Cinnamomum triplinerve GQ982187
Sassafras albidum EF491223
Sassafras albidum EU153993
Sassafras randaiense EF491222
Sassafras tzumu EF491217
Sassafras tzumu GU117758
Nectandra purpurea EU153972
Cinnamomum bejolghota GQ248266
Neocinnamomum mekongense AF26880
Aspidostemon sp. AF268819
Cryptocarya alba GQ248275
Cryptocarya mackinnoniana GQ2482
Cryptocarya metcalfiana GU117751
Cryptocarya rhodosperma AF268817
Eusideroxylon zwageri AF268820
Potoxylon melagangai AF268821
Cryptocarya sclerophylla AF268818
Cryptocarya thouvenotii AF261997
Cryptocarya triplinervis GQ248278
Beilschmiedia brenesii AF268809
Beilschmiedia ovalis AF268811
Beilschmiedia robusta GU117747
Beilschmiedia sary AF268812
Endiandra microneura AF268814
Litsea collina GQ248329
Beilschmiedia anay CG-Hu-56
Potameia micrantha AF268815
Potameia microphylla AF268816
Beilschmiedia tawa EU153946
Beilschmiedia velutina AF268813
Beilschmiedia madagascariensis AF268810
76
58
58
62
100

Figura 2.5. Árboles filogenéticos la región del *psbA* 3´-UTR de 126 secuencias de Lauraceae, generados con el método de máxima parsimonia y 1000 búsquedas heurísticas, los valores de "bootstrap" >50 se encuentran por arriba de las ramas. A) Árbol número 45 del quinto análisis que considera las 126 secuencias sin modificación en la región de inversión. B) Árbol número 8 del sexto análisis que considera las 126 secuencias con la región de la inversión en la forma B.

CONCLUSIONES

La zona de inversión de 18-27 pb de la región *psbA* 3´-UTR del espacio intergénico *trnH-psbA* influyó la filogenia de las lauráceas y en los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*, es evidente que al no tomarse en cuenta la configuración de este pequeño fragmento se generan grupos artificiales que no reflejan las verdaderas relaciones de ambos taxa, lo que incrementa aun más la controversia que rodea su asignación a la categoría de género.

Además de que existe la necesidad de continuar con la búsqueda de marcadores que presenten alta variabilidad, preferentemente genes, o fragmentos con bajo índice de homoplasia que ayuden a mejorar la inferencia filogenética dentro de la familia Lauraceae y específicamente dentro del género *Persea*. Con los resultados obtenidos hasta el momento sobre el espacio intergénico *trnH-psbA*, se podría considerar hacer estudios filogenéticos sólo de la región *psbA* 3´-UTR, junto con las regiones 3'-UTR de otros espacios intergénicos, o analizar el espacio no transcrito del espacio intergénico *trnH-psbA* para encontrar otros elementos que estén influyendo en el índice de homoplasia y que permitan un mejor manejo de la información, por lo que es evidente la necesidad de que se implementen algoritmos que busquen mutaciones estructurales, inversiones, inserciones y deleciones, y que se incorporen en las herramientas bioinformáticas para obtener mejores estudios filogenéticos.

LITERATURA CITADA

Bain, J.F., Jansen, R.K. 2006. A chloroplast DNA hairpin structure provides useful phylogenetic data within tribe Senecioneae (Asteraceae). Canadian Journal Botany 84: 862–868.

Catalano, S.A., Saidman, B.O., and Vilardi, J.C. 2009. Evolution of small inversions in chloroplast genome: a case study from a recurrent inversion in angiosperms. Cladistics 25: 93–104.

Chanderbali, A.S., Van der Werff, H., and S.S. Renner. 2001. Phylogeny and historical biogeography of lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear. Annals of the Missouri Botanical Garden, 88: 104-134.

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Linchun, S., Zhu, Y., Ma1, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia1, X., Lin, Y., Leon, C. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. Plos ONE 5:e8613.

Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleid Acid Res. 32:1792-1797.

Golenberg, E.M., Clegg, M.T., Durbin, M.L., Doebley, J., and Ma, D.P. 1993. Evolution of a non-coding region of the chloroplast genome. Mol Phylogenet Evol 2: 52–64

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.

Hebert, P.D.N., and Gregory, T.R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Biol.* 54.

Kelchner, S.A, and Wendel, J.F. 1996. Hairpins create minute inversions in non-coding regions of chloroplast DNA. Curr. Genet. 30: 259–262.

Kim, K.J., and Lee, H.L. 2005. Widespread occurrence of small inversions in the chloroplast genomes of land plants. Mol. Cells 19: 104–113.

Kress, W.J. and Erickson, D.L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. PLoS ONE 2(6): e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508.

Kress, W.J., Wurdack, J.K., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. and Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. PNAS 23:8369-8374.

Lahaye, R., Van der, B. M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G., Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. PNAS 105: 2923-2928.

Morrone, J.J. 2000. Sistemática, Biogeografía y Evolución. Patrones de la Biodiversidad en Tiempo-Espacio. Las Prensas de Ciencias. UNAM. D.F. México 124 p.

Nicolalde-Morejo, F., Vergara-Silvac, F., Gonzalez-Astorgaa, J., Stevensond, D. W., Vovidese, A. P. and Sosa, V. 2010. A character-based approach in the Mexican cycads supports diverse multigene combinations for DNA barcoding. Cladistics 26:1-15.

Olmstead, R.G. and J.A. Sweere. 1994. Combining data in phylogenetic systematics: an empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. Systematic Biology 43: 467-481.

Olmstead, R.G, and Palmer, J. D. 1994. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. Amer. J. Bot. 81: 1205‑1204

Page, R.D. M., and Holmes, E.C. 1998. Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach. Blackwell Science, Oxford, U.K.

Ratnasingham, S., and Hebert, P.D.N. 2007. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). Mol. Ecol. Notes. 7: 355–364.

Rohwer, J. G., Li, J., Rudolph, B., Schmidt, S. A., van der Werff, H., and H.-W. Li. 2009. Is *Persea* (Lauraceae) monophyletic? Evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. Taxon 58: 1153–1167.

Rohwer, J. G. 2000. Toward a Phylogenetic Classification of the Lauraceae: Evidence from *matK* Sequences. Systematic Botany 25:60-71.

Sang, T., Crawford, D. J., and T. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). Amer. J. Bot. 84: 1120–1136.

Storchová, H., and Olson, M. S. 2007. The architecture of the chloroplast *trnH-psbA* non-coding region in angiosperms. Plant Systematics and Evolution 286: 235-256.

Swofford, D. L. 2001. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Weising, K., Atkinson, R.G., and R.C. Gardner. 1995. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. PCR Meth Applications 4: 249-255.

Whitlock, B.A., Hale, A.M., and Groff, P.A. 2010. Intraspecific Inversions Pose a Challenge for the *trnH-psbA* Plant DNA Barcode. PLoS ONE 5: e11533. doi:10.1371/journal.pone.0011533.

CONCLUSIONES GENERALES

De los genes analizados, los genes del genoma de cloroplasto fueron los más polimórficos, resultando los más útiles en la reconstrucción filogenética del género *Persea*. Sin embargo, no resultaron ser muy útiles en la separación de las especies dentro de este género.

Con base a los resultados de este estudio se propone la separación de los subgéneros de *Persea* como géneros independientes ya que el género *Persea* no corresponde a un grupo monofilético.

En el fragmento *psbA-trnH* se recomienda utilizar la zona de inversión de 18-27 pb de la región *psbA* 3´-UTR en estudios filogenéticos, ya que influye en forma positiva en la reconstrucción filogenética de las lauráceas y dentro de *Persea* (*Persea* y *Eriodaphne*).

Existe aún la necesidad de continuar con la búsqueda de marcadores moleculares que presenten alto polimorfismo, preferentemente genes, o fragmentos con bajo índice de homoplasia que ayuden a mejorar la inferencia filogenética dentro de la familia Lauraceae y específicamente dentro del género *Persea*. Así como que ayuden en la identificación de especies de *Persea*.