

Phylogenetic analysis of some members of the subgenus *Persea* (*Persea*, Lauraceae)

Análisis filogenético de algunos miembros del subgénero *Persea* (*Persea*, Lauraceae)

María Edith Cruz-Maya¹; Alejandro Facundo Barrientos-Priego^{1*}; Lily Xochitl Zelaya-Molina²; José Luis Rodríguez-de la O¹; Juan Carlos Reyes-Alemán³

¹Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Recursos Genéticos. Av. Biodiversidad núm. 2498, col. Centro, Tepatitlán de Morelos, Jalisco, C. P. 47600, MÉXICO.

³Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Tenancingo-Villa Guerrero km 1.5, Tenancingo, Estado de México, C. P. 52400, MÉXICO.

*Corresponding author: abarrien@correo.chapingo.mx.

Abstract

The avocado belongs to the genus *Persea*, which is one of the most controversial genera of the Lauraceae family, since the relationships within the subgenus *Persea* are not clear and only recognized two species, *Persea americana* and *Persea schiedeana*. Its relationship with the subgenus *Eriodaphne* is also complex and there is a debate as to whether it is an independent genus. For this reason, the study aims to analyze the phylogenetic relationships within the genus *Persea*, with an emphasis on the subgenus *Persea*, using maximum parsimony and bayesian inference with the sequence of eight different fragments from nuclear, chloroplast and mitochondrial DNA. Sequences of the chloroplast *ndhF*, *rbcl*, *matK*, *rpoC*, *trnH-psbA*; mitochondria *atp4* and *cox3* and nuclear 18S rRNA were used. Fourteen fixed mutations were found in species of the subgenus *Eriodaphne*. The maximum parsimony and bayesian phylogenetic analyses of the super-matrices of the five chloroplast sequences and the eight concatenated ones, separated the members of both subgenera into two different clades with high bootstrap and posterior probability support, suggesting that the origin of *Persea* is not monophyletic and therefore both subgenera, *Persea* and *Eriodaphne*, could be recognized as phylogenetically independent genera.

Keywords:

“aguacatillo”, avocado, phylogeny, chloroplast DNA, mitochondrial DNA.

Resumen

El aguacate pertenece al género *Persea*, el cual es uno de los más controversiales de la familia Lauraceae debido a que las relaciones entre el subgénero *Persea* no están claras, y solo se reconocen dos especies, *Persea americana* y *Persea schiedeana*. Su relación con el subgénero *Eriodaphne* también es compleja, y existe un debate sobre si este es un género independiente. Por ello, el objetivo de esta investigación fue analizar las relaciones filogenéticas dentro del género *Persea*, con énfasis en el subgénero *Persea*, utilizando la máxima parsimonia e inferencia bayesiana con la secuencia de ocho fragmentos diferentes de ADN nuclear, cloroplástico y mitocondrial. Se emplearon secuencias del cloroplasto *ndhF*, *rbcl*, *matK*, *rpoC*, *trnH-psbA*, mitocondrias *atp4* y *cox3*, y 18S rARN nuclear. Se encontraron 14 mutaciones fijas en especies del subgénero *Eriodaphne*. La máxima parsimonia, los análisis filogenéticos bayesianos de las supermatrices de las cinco secuencias de cloroplastos y las ocho concatenadas separaron a los miembros de ambos subgéneros en dos cladros diferentes con un alto *bootstrap* y soporte de probabilidad posterior. Lo anterior sugiere que el origen de *Persea* no es monofilético y, por lo tanto, ambos subgéneros, *Persea* y *Eriodaphne*, podrían ser reconocidos como géneros filogenéticamente independientes.

Palabras clave:

“aguacatillo”, aguacate, filogenia, ADN de cloroplastos, ADN mitocondrial.



Introduction

Avocado (*Persea americana* Mill.) is today among the most economically important subtropical/tropical fruit crops in the world (Bost, Smith, & Crane, 2013), with a production of avocado fruit that now exceeds 3.5 million tons, of which about 20 % is traded internationally (Schaffer, Wolstenholme, & Whiley, 2013). Chanderbali et al. (2008) consider avocado as the most important commodity from the Lauraceae.

The conservation of avocado genetic resources and their relatives is important to deal with the potential problems of the avocado industry in the future. Threats to the avocado industry have appeared recently, such as laurel wilt, caused by the fungus *Raffaelea lauricola* symbiont of the ambrosia beetle (*Xyleborus glabratus*) that has been responsible for the extensive death of native Lauraceae in the United States since 2000, when it was first detected (Fraedrich et al., 2008). In August 2011, a dooryard avocado tree immediately north of the focus was affected by laurel wilt (Ploetz et al., 2015), close to the center of avocado production in Florida, USA. Resistance to this disease is now of high priority; the pool to search for this resistance is in the genetic resources of the genus *Persea*.

Germplasm banks have tried to conserve the existing diversity of avocado and its relatives (Barrientos, 2010), one of them located in the Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C., which is considered the richest in respect to diversity and variability, and which started to concentrate more diversity in 1988 (Barrientos, 1999). The variability of this germplasm bank has been reported (López-López, Barrientos-Priego, & Ben-Ya'acov, 1999), as well its potential (Ben-Ya'acov & Barrientos, 2003), along with molecular characterization of some accessions with RAPD (Reyes-Alemán, Valadez-Moctezuma, Simuta-Velázco, Barrientos-Priego, & Gallegos-Vázquez, 2013), ISSR (Reyes-Alemán, Valadez-Moctezuma, & Barrientos-Priego, 2016), SSR (Gutiérrez-Díez, Barrientos-Priego, & Campos-Rojas, 2015) and with the sequence *trnL-trnF* of cpDNA (Cabrera-Hernández et al., 2017). In these studies, the great variability existing in that germplasm bank was evident, where the accessions represent above all the diversity that exists in the subgenus *Persea*.

The knowledge of the phylogenetic relationships of the subgenus *Persea* with the subgenus *Eriodaphne* is important to take decisions in relation to management and organization of germplasm banks and to guide future collections, in addition to defining actions with respect to genetic improvement.

The genus *Persea* L. (Lauraceae) consists of about 85 species distributed in America (Barrientos-Priego, Muñoz-Pérez, Borys, & Martínez-Damián, 2015), some new species have been described (Lorea-Hernández,

Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) se encuentra entre los cultivos de frutos subtropicales/tropicales más importantes del mundo (Bost, Smith, & Crane, 2013), con una producción que supera las 3.5 millones de toneladas, de las cuales aproximadamente 20 % se comercializan internacionalmente (Schaffer, Wolstenholme, & Whiley, 2013). Chanderbali et al. (2008) consideraron al aguacate como el producto más importante de las Lauráceas.

La conservación de los recursos genéticos del aguacate y sus parientes es importante para poder enfrentar los problemas potenciales de la industria del aguacate. Recientemente, han surgido amenazas en la industria del aguacate, como el marchitamiento del laurel, causado por el hongo *Raffaelea lauricola* simbiote del escarabajo ambrosial (*Xyleborus glabratus*). Este hongo es responsable de la muerte extensiva de Lauráceas nativas de Estados Unidos desde el 2000, cuando fue detectado por primera vez (Fraedrich et al., 2008). En agosto de 2011, cerca del centro de producción de aguacate en Florida, Estados Unidos, un árbol de aguacate de un jardín familiar se vio afectado por la marchitez del laurel (Ploetz et al., 2015), por lo que la resistencia a esta enfermedad es de alta prioridad, y el acervo para buscar esta resistencia se encuentra en los recursos genéticos del género *Persea*.

Los bancos de germoplasma han tratado de conservar la diversidad existente de aguacate y sus parientes (Barrientos, 2010). Uno de estos bancos está ubicado en la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C., el cual comenzó a concentrar más diversidad en 1988 (Barrientos, 1999) y es considerado el más rico en cuanto a diversidad y variabilidad. Se ha reportado la variabilidad de este banco de germoplasma (López-López, Barrientos-Priego, & Ben-Ya'acov, 1999), así como su potencial (Ben-Ya'acov & Barrientos, 2003) y la caracterización molecular de algunas accesiones con amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) (Reyes-Alemán, Valadez-Moctezuma, Simuta-Velázco, Barrientos-Priego, & Gallegos-Vázquez, 2013), marcadores moleculares ISSR (Reyes-Alemán, Valadez-Moctezuma, & Barrientos-Priego, 2016) y SSR (Gutiérrez-Díez, Barrientos-Priego, & Campos-Rojas, 2015), y con la secuencia de *trnL-trnF* de cpADN (Cabrera-Hernández et al., 2017). En estos estudios, la gran variabilidad existente en ese banco fue evidente, donde las accesiones representan sobre todo la diversidad que existe en el subgénero *Persea*.

El conocimiento de las relaciones filogenéticas del subgénero *Persea* con el *Eriodaphne* es importante para tomar decisiones en relación al manejo y organización de bancos de germoplasma, guiar futuras colectas y para definir acciones con respecto al mejoramiento genético.

2002; van der Werff, 2002) and there are probably over a 100 species. The genus is distributed from the southern United States (*Persea borbonia* [L.] Spreng) to Chile (*Persea lingue* Ruiz & Pavon), with one species in the Canary Islands (*P. indica* [L.] Spreng.) and probably some representatives in South Asia (Barrientos-Priego et al., 2015); nevertheless, it is controversial as to whether *Persea* should be treated as including species from Asia since results suggest that *Persea* is strictly American (Li et al., 2011). The genus is divided into the subgenera *Persea* and *Eriodaphne* (Kopp, 1966); the first one has fruits known as real avocados (~ 5 to 20 cm) and the second tiny avocados known as “aguacatillos” (< 5 cm).

Within subgenus *Persea*, *P. americana* Mill. is the most studied species, mainly for its importance as a human food resource, and especially for its high oil content. For these reasons, and considering the graft compatibility among species, attempts to use species of subgenus *Eriodaphne* as a rootstock for *P. americana* to improve resistance to *Phytophthora cinnamomi* Rands. have been explored; however, the unsuccessful results revealed a vegetative incompatibility between species of both subgenera (Frolich, Schroeder, & Zentmyer, 1958).

There is a great controversy about the monophyletic origin of the genus *Persea*, indicating that phylogenetic studies based on morphological characters are not conclusive (Rohwer et al., 2009), and the subgenera *Persea* and *Eriodaphne* might perhaps be recognized as independent genera. However, a recent study by Li et al. (2011) shows *Persea* as monophyletic again, if *Apollonias* is included and a few aberrant species excluded. Several studies of the Lauraceae family based on molecular data give some information about *Persea* phylogeny (Chanderbali, van der Werff, & Renner, 2001); nevertheless, the inclusion of few species and specimens made the results uninformative for the *Persea-Eriodaphne* clade. The subgenus *Eriodaphne* has been studied by sequencing fragments of nuclear and chloroplast DNA more extensively by other authors (Chanderbali et al., 2001; Li et al., 2011; Rohwer et al., 2009), while the subgenus *Persea* has not. Cabrera-Hernández et al. (2017) in their study indicated that other sequences (chloroplast, mitochondrial and nuclei) must be studied in a concatenated way to have a better resolution of the subgenus *Persea*.

Specifically, within *Persea*, the cladistic analysis of Campos-Rojas, Terraza, and López-Mata (2007), the ITS phylogenetic study of Rohwer et al. (2009) and the *trnL-trnF* of cpDNA study of Cabrera-Hernández et al. (2017) could separate into different clades the species of the subgenus *Persea* from the species of *Eriodaphne*, supporting the hypothesis of a polyphyletic origin of the genus *Persea*, and providing an explanation of the vegetative (Frolich et al., 1958) and gametic (Lahav & Lavi, 2013) incompatibility between the two subgenera.

El género *Persea* L. (Lauraceae) está formado por cerca de 85 especies distribuidas en América (Barrientos-Priego, Muñoz-Pérez, Borys, & Martínez-Damián, 2015), aunque se han descrito algunas especies nuevas (Lorea-Hernández, 2002; van der Werff, 2002) y probablemente ya haya más de 100. El género está distribuido desde el sur de los Estados Unidos (*Persea borbonia* [L.] Spreng) hasta Chile (*Persea lingue* Ruiz & Pavon), una especie en las Islas Canarias (*P. indica* [L.] Spreng.) y probablemente algunos representantes en el sur de Asia (Barrientos-Priego et al., 2015). No obstante, es controvertido si se debe considerar que *Persea* incluye especies de Asia, ya que los resultados sugieren que *Persea* es estrictamente americano (Li et al., 2011). El género se divide en los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* (Kopp, 1966); el primero tiene frutos conocidos como aguacates reales (~ 5 a 20 cm) y el segundo aguacates muy pequeños conocidos como “aguacatillos” (< 5 cm).

Dentro del subgénero *Persea*, *P. americana* Mill. es la especie más estudiada, principalmente por su importancia como recurso alimenticio humano y su alto contenido de aceite. Por estas razones, y considerando la compatibilidad del injerto entre las especies, se ha explorado la posibilidad de utilizar especies del subgénero *Eriodaphne* como portainjerto de *P. americana* para mejorar la resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands.; sin embargo, resultados infructuosos revelaron incompatibilidad vegetativa entre las especies de ambos subgéneros (Frolich, Schroeder, & Zentmyer, 1958).

Existe gran controversia sobre el origen monofilético del género *Persea*, lo cual indica que los estudios filogenéticos basados en caracteres morfológicos no son concluyentes (Rohwer et al., 2009), y los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* podrían ser reconocidos como géneros independientes. No obstante, un estudio reciente de Li et al. (2011) muestra nuevamente a *Persea* como monofilético, si se incluye a *Apollonias* y se excluyen algunas especies aberrantes. Varios estudios de la familia Lauraceae, basados en datos moleculares, brindan información sobre la filogenia de *Persea* (Chanderbali, van der Werff, & Renner, 2001); sin embargo, la inclusión de pocas especies y especímenes hizo que los resultados no fueran informativos para el clado *Persea-Eriodaphne*. El subgénero *Eriodaphne* se ha estudiado secuenciando fragmentos de ADN nuclear y cloroplástico de manera más extensa por algunos autores (Chanderbali et al., 2001; Li et al., 2011; Rohwer et al., 2009), mientras que para el subgénero *Persea* no se ha hecho. Cabrera-Hernández et al. (2017) indicaron que otras secuencias (cloroplastos, mitocondrias y núcleos) deben estudiarse de forma concatenada para obtener una mejor resolución del subgénero *Persea*.

Específicamente, dentro de *Persea*, el análisis cladístico de Campos-Rojas, Terraza, y López-Mata (2007), el estudio filogenético ITS de Rohwer et al. (2009) y

However, controversy still exists on this issue, because the phylogenetic relationships between the two subgenera are very complex (Kopp, 1966), and so far, there is insufficient evidence from molecular DNA data for the separation of the two subgenera of *Persea*.

In several families of angiosperms, DNA sequences of coding regions, intergenic spacers and internal transcribed spacers of the chloroplast, mitochondria, and nucleus have been used in a concatenated form to obtain a better understanding of the phylogenetic relationships of the taxa analyzed. Among the most used genes are: *rbcL* (Kress & Erickson, 2007), *ndhF* (Beilstein Nagalingum, Clements, Manchester, & Mathews, 2010), *matK*, *rpoC1* (Chase et al., 2007), and the intergenic spacer region *trnH-psbA* (Dong, Liu, Yu, Wang, & Zhou, 2012) from chloroplast DNA. Also, fragments of mitochondrial DNA, such as *atp4* gene (Duminil, Pemonge, & Petit, 2002), and the nuclear *18S rRNA* gene have been considered. With these novel analyses, it is evident that information from different DNA genes of several *Persea* species is necessary to reconstruct the phylogenetic history of this genus. For this reason, the study aims to analyze the phylogenetic relationships within the genus *Persea*, with an emphasis on the subgenus *Persea*, using maximum parsimony and bayesian inference with the sequence of eight different fragments from nuclear, chloroplast and mitochondrial DNA.

Material and methods

Plant material

Plant material from 35 specimens of the genus *Persea*, 29 of *Persea* subgenus and five of *Eriodaphne* subgenus, and one from *Beilschmiedia anay* (Blake) Kosterm, were obtained from *Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX*, S.C. germplasm bank (Coatepec Harinas, Mexico), and from specimens deposited at the herbarium of the Forestry Department at *Universidad Autónoma Chapingo*, Mexico (CHAP). The specimens are from locations inhabited by the genus in Mexico and other countries (Table 1). The accessions included in the study represent practically all the diversity (seven species) of the subgenus *Persea*, according to the Kopp classification (1966), although the unrecognized species *Persea zentmayerii* is not included (Schieber & Bergh, 1987). In the case of *Persea americana*, all races or botanical varieties were included, as well as the proposed fourth race *Persea americana* var. *costaricensis*. In addition, some hybrids were considered (Table 1), as well as *Beilschmiedia anay* that was used as an outgroup.

DNA extraction, amplification, and sequencing

DNA was extracted from ~ 50 to 100 mg of leaves previously dried in silica gel. In some cases, leaves from herbarium specimens were used. Genomic DNA was

el estudio *trnL-trnF* de cpADN de Cabrera-Hernández et al. (2017) podrían separar en diferentes clados a las especies del subgénero *Persea* y *Eriodaphne*, apoyando la hipótesis de un origen polifilético del género *Persea*, y proporcionar una explicación de la incompatibilidad vegetativa (Frolich et al., 1958) y gamética (Lahav & Lavi, 2013) entre los dos subgéneros. Sin embargo, aún existe polémica sobre este tema, debido a que las relaciones filogenéticas entre los dos subgéneros son muy complejas (Kopp, 1966), y hasta ahora no hay suficiente evidencia de datos de ADN molecular para la separación de los dos subgéneros de *Persea*.

En varias familias de angiospermas, las secuencias de ADN de regiones codificantes, espaciadores intergénicos y espaciadores transcritos internos del cloroplasto, las mitocondrias y el núcleo se han utilizado en forma concatenada para obtener un mejor entendimiento de las relaciones filogenéticas de los taxa analizados. Entre los genes más utilizados, a partir de ADN de cloroplastos, se encuentran: *rbcL* (Kress & Erickson, 2007), *ndhF* (Beilstein Nagalingum, Clements, Manchester, & Mathews, 2010), *matK*, *rpoC1* (Chase et al., 2007) y la región espaciadora intergénica *trnH-psbA* (Dong, Liu, Yu, Wang, & Zhou, 2012). Además, se han considerado fragmentos de ADN mitocondrial como el gen *atp4* (Duminil, Pemonge, & Petit, 2002) y el gen nuclear *18S rARN*. Con estos análisis, es evidente que se requiere la información de diferentes genes de ADN de varias especies de *Persea* para reconstruir la historia filogenética de este género. Por esta razón, el presente estudio tiene como objetivo analizar las relaciones filogenéticas dentro del género *Persea*, con énfasis en el subgénero *Persea*, utilizando la máxima parsimonia e inferencia bayesiana con la secuencia de ocho fragmentos diferentes de ADN nuclear, cloroplástico y mitocondrial.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se obtuvo material vegetal de 35 especímenes del género *Persea*, 29 de subgénero *Persea*, cinco de subgénero *Eriodaphne* y uno de *Beilschmiedia anay* (Blake) Kosterm, del banco de germoplasma de la *Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX*, S.C. (Coatepec Harinas, México) y de especímenes depositados en el herbario de la División de Ciencias Forestales de la *Universidad Autónoma Chapingo*, México (CHAP). Los especímenes son de México y otros países (Cuadro 1). Las accesiones incluidas en este estudio representan prácticamente toda la diversidad (siete especies) del subgénero *Persea*, según la clasificación de Kopp (1966); aunque la especie *Persea zentmayerii*, no reconocida, no está incluida (Schieber & Bergh, 1987). En el caso de *Persea americana*, se incluyeron todas las razas o variedades botánicas, así como la propuesta de la cuarta raza *Persea americana* var.

Table 1. Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX collection accession number, place of origin and GenBank accession numbers of the species used in the analysis.**Cuadro 1. Número de accesión de la colección de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, lugar de origen y número de accesión de GenBank de las especies utilizadas en el análisis.**

Species name/ Nombre de la especie	Accession number/ Número de accesión	Location of origin/ Lugar de origen	GenBank accession number/Número de accesión del GenBank							
			<i>trnH-psbA</i>	<i>matK</i>	<i>rpoC1</i>	<i>cox3</i>	18S rRNA/ 18S rARN	<i>atp4</i>	<i>rbcL</i>	<i>ndh</i>
Genera <i>Beilschmiedia</i>/Género <i>Beilschmiedia</i>										
<i>Beilschmiedia anay</i>	CG-Hu-56	Puebla, México.	JF966434	JF966448	JF966482	JF966516	JF966550	JF966584	JF966618	JF966644
Género <i>Persea</i>										
Subgenera <i>Eriodaphne</i>/Subgénero <i>Eriodaphne</i>										
<i>P. chamissonis</i>	CHAP 37473 ²	Hidalgo, México	JF966426	JF966466	JF966500	JF966534	JF966568	JF966602	JF966636	JF966661
<i>P. cinerascens</i>	CH-C-30	Michoacán, México	JF966431	JF966452	JF966486	JF966520	JF966554	JF966588	JF966622	JF966670
<i>P. lingue</i>	CH-Pl-1	Chile	JF966423	JF966445	JF966479	JF966513	JF966547	JF966581	JF966615	JF966641
<i>P. longipes</i>	CH-G-36	Veracruz, México	JF966424	JF966456	JF966490	JF966524	JF966558	JF966592	JF966626	JF966652
<i>P. sp. 'PR'</i>	CH-PR-1	Veracruz, México	JF966432	JF966457	JF966491	JF966525	JF966559	JF966593	JF966627	JF966671
Subgenera <i>Persea</i>/Subgénero <i>Persea</i>										
<i>Persea americana</i> (P.a.)										
<i>P. a. var. americana</i>	CH-CR-28	Costa Rica	JF966410	JF966454	JF966488	JF966522	JF966556	JF966590	JF966624	JF966650
<i>P. a. var. americana</i>	CH-G-48	Yucatán, México	JF966396	JF966442	JF966476	JF966510	JF966544	JF966578	JF966612	JF966669
<i>P. a. var. americana</i>	CH-G-45	Yucatán, México	JF966416	JF966450	JF966484	JF966518	JF966552	JF966586	JF966620	JF966646
<i>P. a. var. americana</i>	CH-I-6	Veracruz, México	JF966403	JF966458	JF966492	JF966526	JF966560	JF966594	JF966628	JF966653
<i>P. a. var. drymifolia</i> x <i>P. a. var. guatemalensis</i>	'Hass'	California, Estados Unidos	JF966409	JF966447	JF966481	JF966515	JF966549	JF966583	JF966617	JF966643
<i>P. a. var. costaricensis</i>	CH-CR-25	Costa Rica	JF966430	JF966438	JF966472	JF966506	JF966540	JF966574	JF966608	JF966665
<i>P. a. var. costaricensis</i>	CH-CR-44	Costa Rica	JF966407	JF966437	JF966471	JF966505	JF966539	JF966573	JF966607	JF966664
<i>P. a. var. drymifolia</i>	CH-C-10	Puebla, México	JF966395	JF966441	JF966475	JF966509	JF966543	JF966577	JF966611	JF966668
<i>P. a. var. drymifolia</i>	CH-C-47	Michoacán, México	JF966411	JF966462	JF966496	JF966530	JF966564	JF966598	JF966632	JF966657
<i>P. a. var. drymifolia</i>	CH-C-57	México, México	JF966397	JF966443	JF966477	JF966511	JF966545	JF966579	JF966613	JF966639
<i>P. a. var. drymifolia</i>	CH-C-63	México, México	JF966402	JF966453	JF966487	JF966521	JF966555	JF966589	JF966623	JF966649
<i>P. a. var. drymifolia</i>	CH-Der-2	México, México	JF966401	JF966451	JF966485	JF966519	JF966553	JF966587	JF966621	JF966648
<i>P. a. var. guatemalensis</i>	CH-G-7 S2	Chiapas, México	JF966413	JF966464	JF966498	JF966532	JF966566	JF966600	JF966634	JF966659
<i>P. a. var. guatemalensis</i>	CH-G-11 S1	Chiapas, México	JF966412	JF966463	JF966497	JF966531	JF966565	JF966599	JF966633	JF966658
<i>P. a. var. guatemalensis</i>	CH-GU-5	Guatemala	JF966417	JF966455	JF966489	JF966523	JF966557	JF966591	JF966625	JF966651
<i>P. a. var. guatemalensis</i>	CH-GU-6	Guatemala	JF966399	JF966449	JF966483	JF966517	JF966551	JF966585	JF966619	JF966645
<i>P. floccosa</i>	CH-I-3	Veracruz, México	JF966406	JF966435	JF966469	JF966503	JF966537	JF966571	JF966605	JF966647
<i>P. a. var. drymifolia</i>	CH-I-2	México, México	JF966398	JF966444	JF966478	JF966512	JF966546	JF966580	JF966614	JF966640
<i>P. nubigena</i>	CH-G-76	Chiapas, México	JF966414	JF966467	JF966501	JF966535	JF966569	JF966603	JF966637	JF966662
<i>P. nubigena</i>	CH-I-4	Israel	JF966425	JF966459	JF966493	JF966527	JF966561	JF966595	JF966629	JF966654
<i>P. parvifolia</i>	CH-Ve-2	Veracruz, México	JF966408	JF966446	JF966480	JF966514	JF966548	JF966582	JF966616	JF966642
<i>P. schiedeana</i>	CH-Der-1	Veracruz, México	-	JQ352803	-	-	-	-	-	-
<i>P. schiedeana</i>	CH-Gu-1	Guatemala	JF966420	JF966440	JF966474	JF966508	JF966542	JF966576	JF966610	JF966667
<i>P. schiedeana</i>	CH-H-5	Honduras	JF966404	JF966460	JF966494	JF966528	JF966562	JF966596	JF966630	JF966655
<i>P. schiedeana</i>	CH-H-7	Honduras	JF966418	JF966465	JF966499	JF966533	JF966567	JF966601	JF966635	JF966660
<i>P. schiedeana</i> x <i>P. a. var. guatemalensis</i>	CH-C-62	Guatemala	JF966405	JF966461	JF966495	JF966529	JF966563	JF966597	JF966631	JF966656
<i>P. steyermarkii</i>	CH-G-Ch1	Chiapas, México	JF966429	JF966439	JF966473	JF966507	JF966541	JF966575	JF966609	JF966666
<i>P. tolimanensis</i>	Mv1	Chiapas, México	JF966433	JF966468	JF966502	JF966536	JF966570	JF966604	JF966638	JF966663
<i>P. sp. 'Freddy 4'</i>	CH-CR-29	Costa Rica	JF966428	JF966436	JF966470	JF966504	JF966538	JF966572	JF966606	JF966672

²Plant material was taken from specimens deposited at herbarium of the Forestry Department at Universidad Autónoma Chapingo, Mexico (CHAP).

²Material vegetal tomado de especímenes del herbario de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo (CHAP).

extracted by the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) based method (Gambino, Perrone, & Gribaudo, 2008). At the end of the procedure, the DNA was purified with Qiaquick columns (Qiagen®, USA) following manufacturer's instructions. The quality and quantity of the DNA were evaluated with a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer. The amplification of each of the eight fragments was performed in a total volume of 25 µL containing: 50 to 100 ng of DNA, 200 µM of dNTPs mix, 1X Colorless GoTaq® Flexi Reaction Buffer (Promega, USA), 20 pM of specific primers (Table 2), 2.5 mM of MgCl₂ and 2 U of GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, USA). Amplification programs consisted of one cycle of an initial denaturation of 4 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 45 s at 94 °C, 1 min at specific melting temperature (Table 2) and 1 min at 72 °C, finally an extension of 5 min at 72 °C. The amplification reactions were performed in a GeneAmp® PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, USA).

The amplified DNA fragments were visualized on a 1.2 % agarose gel stained with ethidium bromide. The polymerase chain reaction products were cleaned using Qiaquick® PCR Purification Kit columns (Qiagen, USA),

costaricensis. Además, se consideraron algunos híbridos (Cuadro 1), así como *Beilschmiedia anay* que se utilizó como grupo externo.

Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

El ADN se extrajo de ~ 50 a 100 mg de hojas previamente secadas en sílica gel. En algunos casos, se usaron hojas de especímenes del herbario. El ADN genómico se extrajo por el método basado en bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) (Gambino, Perrone, & Gribaudo, 2008). Al final del procedimiento, el ADN se purificó con columnas Qiaquick (Qiagen®, E.U.A), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y la cantidad del ADN se evaluaron con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. La amplificación de cada uno de los ocho fragmentos se realizó en un volumen total de 25 µL que contenía: 50 a 100 ng de ADN, 200 µM de mezcla dNTPs, 1X GoTaq® Flexi Reaction Buffer incoloro (Promega, E.U.A.), 20 pM de iniciadores específicos (Cuadro 2), 2.5 mM de MgCl₂ y 2 U de ADN GoTaq® Flexi Polimerasa (Promega, E.U.A.). Los programas de amplificación consistieron en un ciclo de desnaturalización inicial

Table 2. Primers used in the amplification and sequencing of mitochondrial, nuclear and chloroplast DNA.
Cuadro 2. Iniciadores utilizados en la amplificación y secuenciación de ADN mitocondrial, nuclear y cloroplástico.

Locus/ segment/ Locus/ segmento	Name/ Nombre	Sequence 5'-3' / Secuencia 5'-3'	Tm (°C) / Tf (°C)	Reference / Referencia
n ² 18S rRNA/ n ² 18S rARN	NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	56	White, Bruns, Lee, & Taylor (1990)
	NS4	CTTCCGTC AATTCCTTAAG	56	White et al. (1990)
	NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	56	White et al. (1990)
	NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	56	White et al. (1990)
cp <i>rpoC1</i>	1f	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	56	Ford et al. (2009)
	4r	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	56	Ford et al. (2009)
cp <i>trnH-psbA</i>	trnH2	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	51	Tate & Simpson (2003)
	psbAF	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	51	Tate et al. (2003)
cp <i>rbcL</i>	1f	ATGTACCACAAAACAGAAAC	56	Olmstead, Michaels, Scott, & Palmer (1992)
	724r	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	56	Fay, Swensen, & Chase (1997)
cp <i>ndhF</i>	389f	CTGCBACCATAGTMGCAGCA	59	This study / Presente estudio
	461r	GATTRGGACTTCTRSTTGTTCCGA	59	This study / Presente estudio
cp <i>matK</i>	1326R	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	48	Schmitz-Linneweber et al. (2001)
	390F	CGATCTATTCAATCAATATTC	48	Schmitz-Linneweber et al. (2001)
mt <i>atp4</i>	Orf1	AAGACCRCCAAGCYTCTCG	50	Duminil et al. (2002)
	Orf2	TTGCTGCTATTCTATCTATT	50	Duminil et al. (2002)
mt <i>cox3</i>	Cox3r	CTCCCCACCAATAGATAGAG	51	Duminil et al. (2002)
	Cox3f	CCGTAGGAGGTGTGATGT	51	Duminil et al. (2002)

n: nuclear genome DNA; cp: chloroplast genome DNA; mt: mitochondrial genome DNA; Tm: melting temperature.

n: ADN del genoma nuclear; cp: ADN del genoma del cloroplasto; mt: ADN del genoma mitocondrial; Tf: temperatura de fusión.

following the instructions provided by the manufacturer. The PCR products were sequenced directly using the same primers (Table 2) in an automated sequencing system in MacroGen Inc., South Korea. The sequences were edited and assembled with the BioEdit version 7.0.9.0 program (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

Sequence alignment

The 34 sequences obtained from the intergenic spacer *trnH-psbA*, *ndhF*, *rbcl*, *rpoC1*, 18S rRNA, *cox3*, and *atp4* genes, and 35 from the *matK* gene (Table 2) were aligned with MUSCLE version 3.8 (Edgar, 2004). Additionally, 16 sequences of *matK* were aligned with 36 sequences downloaded from GeneBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>): two of *Persea* and 18 from the closely related genera (*Sassafras*, *Litsea*, *Lindera*, *Ocotea*, *Cinnamomum*, *Nectandra*, *Actinodaphne*, *Parasassafras*, *Sinosassafras*, *Neolitsea*, *Iteadaphne*, *Endlicheria*, *Aniba*, *Laurus*, *Umbellularia*, *Alseodaphne*, *Phoebe* and *Machilus*). Afterward, two supermatrices, the first one with the chloroplast DNA sequences: *ndhF* + *rbcl* + *matK* + *rpoC1* + *trnH-psbA* and the second with all eight, were built manually.

Phylogenetic analysis

The 52 aligned sequences of *matK*, and the two supermatrices mentioned above were analyzed with maximum parsimony (MP) using PAUP ver. 4.0b10 software (Swofford, 2001) and bayesian inference (BI) using MrBayes ver. 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). The mitochondrial genes and the nuclear rDNA data were not analyzed separately since they did not show sufficient informative characters. In each analysis of MP, all the characters were weighted equally, and gaps treated as missing data. A set of the most parsimonious trees from the different datasets was obtained through heuristic searches of 1,000 replicates with random stepwise sequence addition, tree bisection-reconnection branch (TBR) swapping, "MulTrees" option in "effect", and saving 10 trees from each random sequence addition. Robustness of clades was estimated by a bootstrap analysis with 1,000 replicates with simple sequence addition, TBR swapping and holding only 10 trees per replicate to reduce time spent in swapping on large numbers of suboptimal trees. The BI was performed using the GTR + G model and two independent replicates of four chains with a maximum of 10 million generations, with trees sampled every 100 generations.

Results

Features of the sequence alignments

A total of 273 sequences were obtained from *ndhF*, *rbcl*, *matK*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, 18S rRNA, *atp4* and *cox3*; all of them were deposited at GenBank under

de 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 min a temperatura de fusión específica (Cuadro 2), 1 min a 72 °C y una extensión de 5 min a 72 °C. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, E.U.A.).

Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio. Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se limpiaron usando el kit de purificación de PCR en columnas Qiaquick® (Qiagen, E.U.A.), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Los productos de PCR se secuenciaron directamente usando los mismos iniciadores (Cuadro 2) en un sistema de secuenciación automatizada en MacroGen Inc., Corea del Sur. Las secuencias se editaron y ensamblaron con el programa BioEdit versión 7.0.9.0 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

Alineación de secuencias

Las 34 secuencias obtenidas de los espaciadores intergénicos *trnH-psbA*, *ndhF*, *rbcl*, *rpoC1*, 18S rARN, *cox3* y genes *atp4*, y 35 del gen *matK* (Cuadro 2), se alinearon con MUSCLE versión 3.8 (Edgar, 2004). Adicionalmente, se alinearon 16 secuencias de *matK* con 36 secuencias descargadas del GeneBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>): dos de *Persea* y 18 de los géneros estrechamente relacionados (*Sassafras*, *Litsea*, *Lindera*, *Ocotea*, *Cinnamomum*, *Nectandra*, *Actinodaphne*, *Parasassafras*, *Sinosassafras*, *Neolitsea*, *Iteadaphne*, *Endlicheria*, *Aniba*, *Laurus*, *Umbellularia*, *Alseodaphne*, *Phoebe* y *Machilus*). Posteriormente, se construyeron manualmente dos supermatrices, la primera con las secuencias de ADN del cloroplasto (*ndhF* + *rbcl* + *matK* + *rpoC1* + *trnH-psbA*) y la segunda con las ocho.

Análisis filogenético

Las 52 secuencias alineadas de *matK* y las dos supermatrices mencionadas anteriormente se analizaron con los métodos de máxima parsimonia (MP), utilizando el programa PAUP ver. 4.0b10 (Swofford, 2001), e inferencia bayesiana (IB), usando MrBayes ver. 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Los genes mitocondriales y los datos de rADN nuclear no se analizaron por separado, ya que no mostraron suficientes caracteres informativos. En cada análisis de MP, todos los caracteres se ponderaron por igual y los vacíos se consideraron como datos faltantes. Se obtuvo un conjunto de árboles más parsimoniosos de los diferentes conjuntos de datos mediante búsquedas heurísticas de 1,000 repeticiones con adición de secuencias escalonadas aleatorias, intercambio de ramas con bisección-reconexión de árbol (BRA), opción "MulTrees" activada en "effect" y guardando 10 árboles de cada adición de secuencia aleatoria. La

Accession numbers JF966395-JF966399, JF966401-JF966414, JF966416-JF966418, JF966420, JF966423-JF966426, JF966428-JF966672, and JQ352803 (Table 1). The *trnH-psbA* alignment held the highest variation, with 32 parsimony-informative sites (Pi, 6.44 %), and 67 variable sites (VS, 13.48 %) (Table 3). The mitochondrial genes *atp4* and *cox3* held the least variation, with 0 to 1 Pi sites, and 0.18 and 0.43 % VS, respectively (Table 3); despite the low informative sites obtained, it was decided to include them. *Beilschmiedia anay* CG-Hu-56 had the most divergent sequence in the eight sequences, by a variation of 0-4 % with *P. americana* sequences. *B. anay* CG-Hu-56 was used as an outgroup in the phylogenetic analysis.

Phylogenetic analysis of *matK*

A large phylogenetic analysis was performed with the *matK*. To place the subgenera *Persea* and *Eriodaphne* inside the Lauraceae family, representatives of 18 closely related genera were included in the analysis. Both the BI and the MP approaches resulted in relatively congruent topologies concerning subgenus *Eriodaphne* and the *Litsea-Ocotea* clade, and although *Persea* subgenera species were grouped with a weak Posterior Probability (PP) in BI, the bootstrap (BS) majority rule consensus tree from MP does not support this clade (Figure 1). The MP and BI recovered the subgenus *Eriodaphne* and the *Litsea-Ocotea* clade with weak BS and strong PP, BS values for these clades are 52 and 66 %, and BI support for the same branches is

robustez de los clados se estimó mediante un análisis de *bootstrap* (BS) con 1,000 repeticiones, adición de secuencia simple, intercambio de BRA y guardando solo 10 árboles por réplica para reducir el tiempo empleado en el intercambio de un gran número de árboles subóptimos. La IB se realizó con el modelo GTR+G y dos réplicas independientes de cuatro cadenas, con un máximo de 10 millones de generaciones y árboles muestreados cada 100 generaciones.

Resultados

Características de las alineaciones de secuencia

Se obtuvieron en total 273 secuencias de *ndhF*, *rbcl*, *matK*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *18S rARN*, *atp4* y *cox3*, y se depositaron en el GenBank con los números de accesión JF966395-JF966399, JF966401-JF966414, JF966416-JF966418, JF966420, JF966423-JF966426, JF966428-JF966672 y JQ352803 (Cuadro 1). La alineación *trnH-psbA* tuvo la variación más alta, con 32 sitios informativos de parsimonia (IP, 6.44 %) y 67 sitios variables (SV, 13.48 %) (Cuadro 3). Los genes mitocondriales *atp4* y *cox3* tuvieron la menor variación, con 0 a 1 sitios IP, y 0.18 y 0.43 % de SV, respectivamente (Cuadro 3); a pesar de los pocos sitios informativos obtenidos, se decidió incluirlos. *Beilschmiedia anay* CG-Hu-56 tuvo la secuencia más divergente de los ocho segmentos, con variación de 0 a 4 % en comparación con las secuencias de *P. americana*. *B. anay* CG-Hu-56 se utilizó como grupo externo en el análisis filogenético.

Table 3. Description of sequence alignments of 34 materials of *Persea* genus and one of *Beilschmiedia anay*.

Cuadro 3. Descripción de las alineaciones de secuencia de 34 materiales del género *Persea* y uno de *Beilschmiedia anay*.

Locus/segment/ Locus/segmento	Alignment length (bp)/ Longitud de alineación (bp)	CR ^z / RC ^z	NCR/ RNC	Pi (%)/ IP (%)	CS (%)/ SC (%)	VS (%)/ SV (%)	S	EFM/ MFE
n 18S rRNA/n 18S rARN	1748	0	1748	6 (0.34)	1719 (98.34)	29 (1.69)	23	2
cp <i>rpoC1</i>	599	599	0	2 (0.33)	577 (96.33)	22 (3.67)	20	2
cp <i>trnH-psbA</i>	497	98	399	32 (6.44)	428 (86.12)	67 (13.48)	41	5
cp <i>rbcl</i>	1481	1428	53	10 (0.67)	1390 (93.86)	91 (6.14)	81	4
cp <i>ndhF</i>	739	739	0	4 (0.54)	707 (95.67)	32 (4.33)	28	0
cp <i>matK</i>	909	909	0	7 (0.77)	866 (95.27)	43 (4.73)	36	1
mt <i>atp4</i>	507	507	0	1 (0.20)	501 (99.82)	6 (1.18)	5	0
mt <i>cox3</i>	695	695	0	0 (0.00)	692 (99.57)	3 (0.43)	3	0
<i>matK+rbcl+ndhF+rpoC1+ trnH-psbA</i>	4236	3773	463	55 (1.30)	3965 (93.60)	261 (6.16)	206	12
18S rRNA+ <i>cox3+atp4+matK+ rbcl+ndhF+rpoC1+trnH-psbA</i>	7183	4983	2200	62 (0.86)	6874 (95.69)	299 (4.16)	237	14

^zCR: coding region, NCR: non-coding region, Pi: parsimony informative sites, CS: conserved sites, VS: variable sites, S: singleton sites, EFM: *Eriodaphne* exclusive fixed mutations.

^zRC: región codificada, RNC: región no codificante, IP: sitios informativos de parsimonia, SC: sitios conservados, SV: sitios variables, S: sitios tipo singleton, MFE: mutaciones fijas exclusivas de *Eriodaphne*.

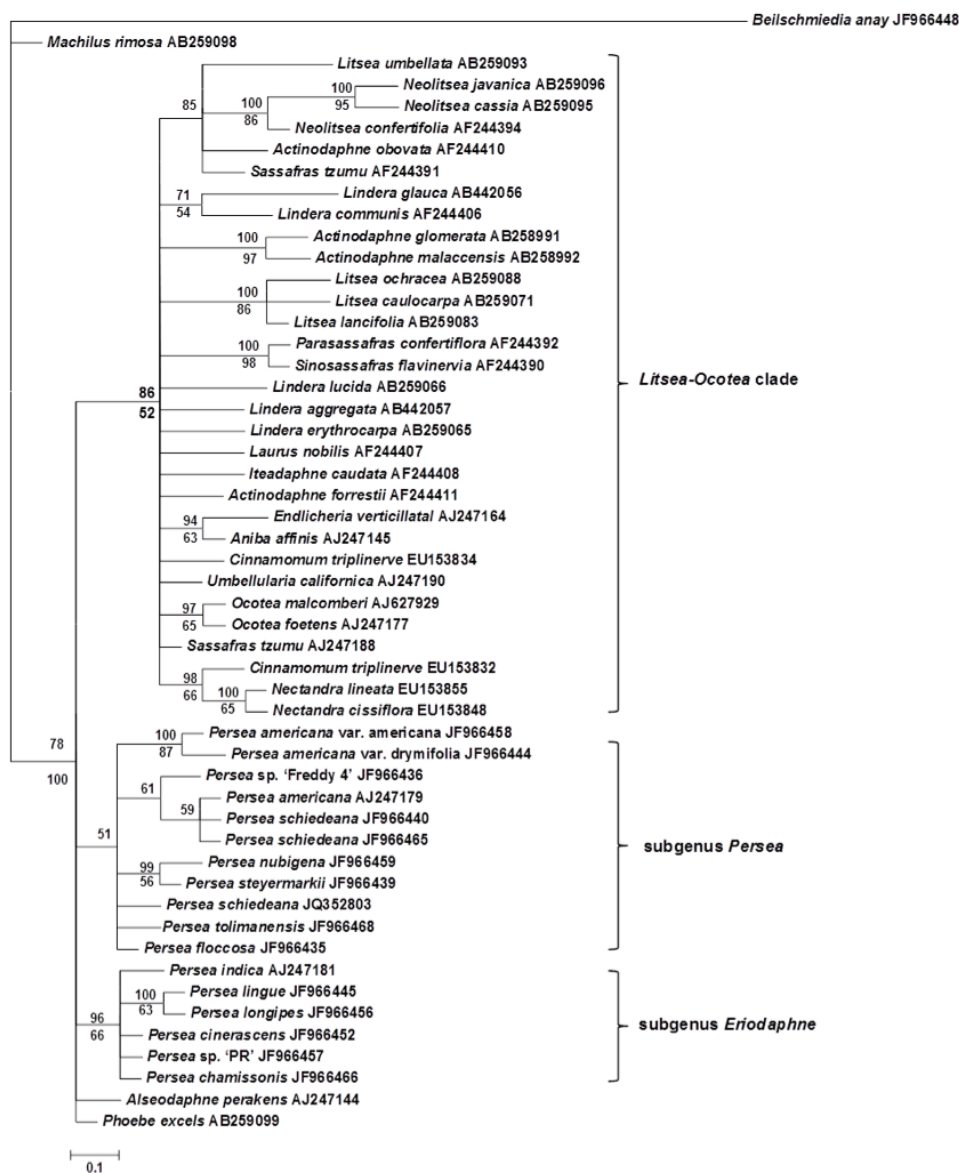


Figure 1. Bayesian 50 % majority rule consensus phylogram resulting from the analysis of partial sequences of the *matK* gene of *Persea* and other genera of Lauraceae. Posterior probabilities are indicated above the nodes, and maximum parsimony bootstrap support values (where 50 %) appear below the nodes. In the parsimonious analysis, 133 equally parsimonious trees with a length of 121 steps, and a consistency index of 0.88, homoplasy index of 0.12 and a retention index of 0.88 were obtained.

Figura 1. Filograma de consenso de la regla de mayoría bayesiana del 50 % resultante del análisis de secuencias parciales del gen *matK* de *Persea* y otros géneros de Lauraceae. Las probabilidades posteriores se indican arriba de los nodos, los valores de apoyo de *bootstrap* de máxima parsimonia (donde 50 %) aparecen debajo de los nodos. En el análisis de parsimonia se obtuvieron 133 árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 121 pasos, y un índice de consistencia de 0.88, índice de homoplasias de 0.12 e índice de retención de 0.88.

86 and 96 %, respectively. Within the *Eriodaphne* clade, both analyses support the subclade *P. lingue*-*P. longipes*, with 63 and 100 % of BS and PP, respectively. In the *Litsea-Ocotea* clade, both analyses support the formation of eight different subclades, mainly with species of the same genera, with 63 to 98 % of BS values and 71 to 100 % of PP (Figure 1). *Beilschmiedia anay* JF966448 and

Análisis filogenético de *matK*

Se realizó un gran análisis filogenético con *matK*. Para colocar los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* dentro de la familia Lauraceae, en el análisis se incluyeron representantes de 18 géneros estrechamente relacionados. Tanto los enfoques IB como los de MP

Machilus rimosa AB259098 are separated from the main core (100 % PP).

Analysis of the concatenated chloroplast sequences

The phylogenetic analysis of the five chloroplast sequences was performed with sequences of 34 different plant accessions evaluated in this study, with members of the subgenera *Persea* and *Eriodaphne*, plus *Beilschmiedia anay*. The BI and MP analyses resulted in relatively congruent topologies (Figure 2). The analyses recovered two major clades, subgenus *Eriodaphne* and subgenus *Persea*, with well-supported BS/PP (88/100 %) and moderate values (82/84 %), respectively. This indicates that the additional parsimony informative characters from the other chloroplast sequences may have improved the phylogenetic signal.

resultaron en topologías bastante congruentes con respecto al subgénero *Eriodaphne* y el clado *Litsea-Ocotea*. Aunque las especies del subgénero *Persea* se agruparon con una probabilidad posterior (PP) débil en IB, el árbol de consenso de la regla de mayoría del BS de MP no es compatible con este clado (Figura 1). La MP y IB recuperaron el subgénero *Eriodaphne* y el clado *Litsea-Ocotea* con BS débil y valores fuertes de PP; los BS para estos clados fueron 52 y 66 %, y los valores de IB fueron 86 y 96 %, respectivamente. Dentro del clado *Eriodaphne*, ambos análisis soportaron el subclado *P. lingue-P. longipes*, con 63 y 100 % de BS y PP, respectivamente. Al igual que el anterior, en *Litsea-Ocotea* ambos análisis respaldaron la formación de ocho subclados diferentes, principalmente con especies del mismo género, con valores de 63 a 98 % en BS y de 71 a 100 % en PP (Figura 1). Adicionalmente, se observa que *Beilschmiedia anay*

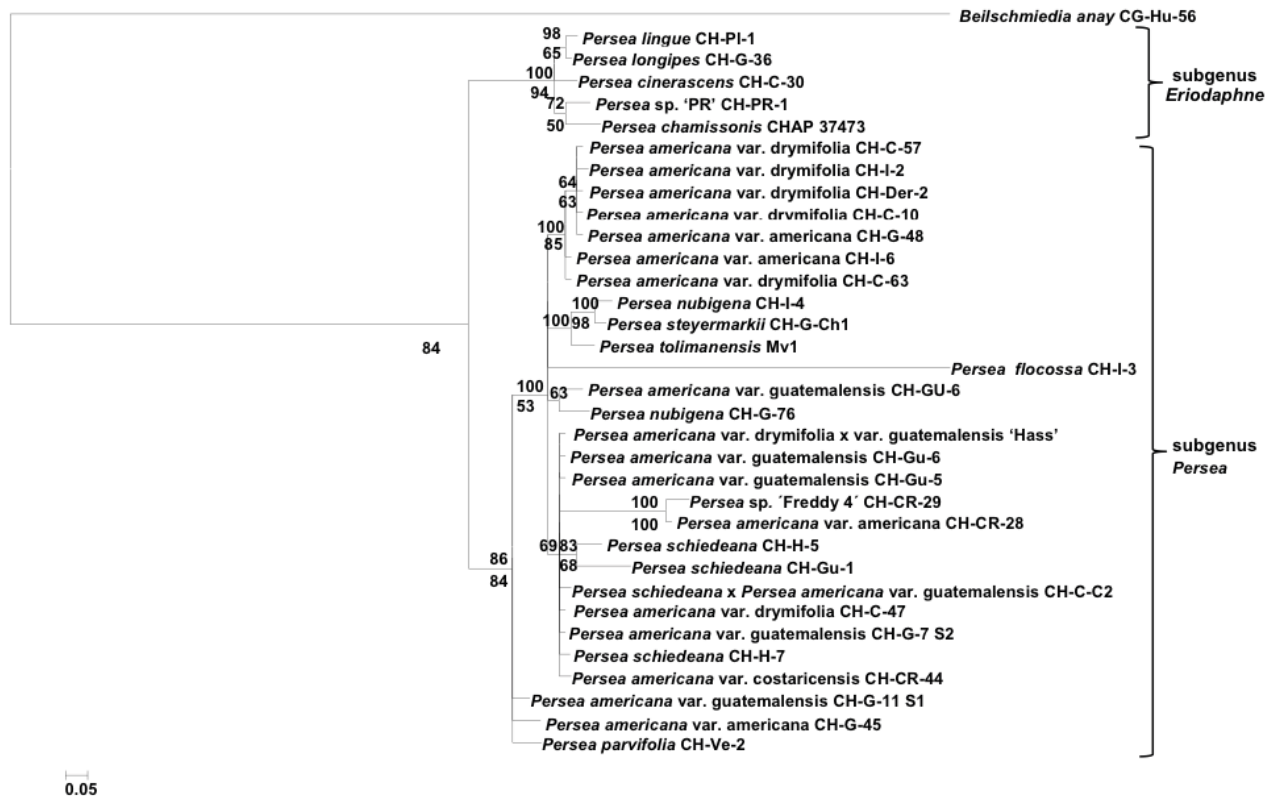


Figure 2. Bayesian 50 % majority rule consensus tree resulting from the analysis of the concatenation of the five chloroplast sequences *matK+rbcL+ndhF+rpoC1+trnH-psbA* of *Persea* and *Beilschmiedea anay* (Lauraceae). Posterior probabilities are indicated above the nodes, and maximum parsimony bootstrap support values (where 50 %) appear below the nodes. In the parsimonious analysis, 160 equally parsimonious trees with a length of 311 steps, and a consistency index of 0.87, homoplasy index of 0.13 and a retention index of 0.82 were obtained.

Figura 2. Árbol de consenso de la regla de mayoría bayesiana del 50 % resultante del análisis de la concatenación de las cinco secuencias de cloroplastos *matK+rbcL+ndhF+rpoC1+trnH-psbA* de *Persea* y *Beilschmiedea anay* (Lauraceae). Las probabilidades posteriores se indican arriba de los nodos, los valores de apoyo de *bootstrap* de máxima parsimonia (donde 50 %) aparecen debajo de los nodos. En el análisis de parsimonia se obtuvieron 160 árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 311 pasos, y un índice de consistencia de 0.87, índice de homoplasias de 0.13 e índice de retención de 0.82.

On the other hand, the five genes have a total of 261 VS, with 22 in *rpoC1* to 91 of *rbcL*; of these, 55 are Pi sites, with two in *rpoC* to 32 in *trnH-psbA* (Table 3). Also, it is important to note the presence of 12 fixed mutations in the five species of subgenus *Eriodaphne* so far investigated, which have led to the formation of a very solid clade (Table 3).

Within the five accessions of the subgenus *Eriodaphne* clade, the BI supports two groups, in the MP-BS majority rule consensus tree, although just the *Persea chamissonis-Persea* sp. 'PR' clade has a weak support of 61 %. This clade was also supported in the *matK* analysis. Within the *Persea* clade, there was a basal polytomy of two accessions of species of *Persea americana* (var. *americana*, CH-G-45 from Yucatán, Mexico and var. *guatemalensis* CH-G-11 S1 from Chiapas, Mexico), *Persea parvifolia* (CH-Ve-2 from Veracruz, Mexico) and a clade comprising the rest of the accessions (Figure 2). In this subclade, the BI tree shows five clades; two of them strongly supported one with all the *Persea americana* var. *drymifolia* accessions and another with *Persea nubigena* CH-I-4, *Persea steyermarkii* CH-G-Ch1 and *P. tolimanensis* Mv1; one with weak support; another with negligible; plus, one consisting of the single *Persea floccosa* CH-I-3 (Figure 2).

Analysis of the eight concatenated sequences

The phylogenetic analysis of the eight sequences was performed with plant accessions of 29 members of the subgenus *Persea*, five of the subgenus *Eriodaphne* and *Beilschmiedia anay*. The BI and MP analyses also resulted in relatively congruent topologies (Figure 3), and in general very similar to the BI and MP tree of the concatenated chloroplast sequences. The subgenera *Eriodaphne* and *Persea* clades were also obtained, but with slightly higher BS/PP support, 94/100 % for *Eriodaphne* and 84/86 % for *Persea* (Figure 3). The addition of 18S rRNA, *cox3*, and *atp4* genes provided 38 VS, seven of which are Pi (Table 3). This information was not able to significantly improve the phylogenetic signal. The *Eriodaphne* fixed mutations increased from 12 to 14, by the addition of two mutations of the 18S rRNA gene (Table 3).

Discussion

Persea is one of the most complex genera of the Lauraceae. Previous phylogenetic analyses of the *matK* gene (Chanderbali et al., 2001; Rohwer, 2000; Rohwer et al., 2009) have shown that the *Persea* group is a monophyletic group deeply nested within the Lauraceae, close to the *Litsea* and *Ocotea* complexes. In previous analyses, such as the *trnL-trnF/trnH-psbA* phylogenetic tree of Chanderbali et al. (2001), both subgenera of *Persea* are grouped in the same clade, related to *Machilus*

JF966448 y *Machilus rimosa* AB259098 están separadas del núcleo principal (100 % PP).

Análisis de las secuencias de cloroplastos concatenados

El análisis filogenético de las cinco secuencias de cloroplastos se realizó con secuencias de 34 accesiones de plantas diferentes, con miembros de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne*, más uno de *Beilschmiedia anay*. Los análisis de IB y MP resultaron en topologías bastante congruentes (Figura 2). Los análisis recuperaron dos clados principales, subgéneros *Eriodaphne* y *Persea*, con valores de BS/PP bien soportados (88/100 %) y valores moderados (82/84 %), respectivamente. Lo anterior indica que los caracteres informativos de parsimonia adicional, de las otras secuencias de cloroplastos, pueden haber mejorado la señal filogenética.

Por otro lado, los cinco segmentos de cloroplastos presentaron 261 SV, con 22 de *rpoC1* y 91 de *rbcL*; del total, 55 son sitios IP, de los cuales 32 corresponden a *trnH-psbA* (Cuadro 3). Es importante notar la presencia de 12 mutaciones fijas en los cinco segmentos del subgénero *Eriodaphne*, lo que ha llevado a la formación de un clado muy sólido (Cuadro 3).

Dentro de las cinco accesiones del clado del subgénero *Eriodaphne*, la IB soporta dos grupos en el árbol de consenso de la regla de mayoría MP-BS, aunque solo el clado de *Persea chamissonis-Persea* sp. 'PR' tiene un soporte débil de 61 %. Este clado también se apoyó en el análisis *matK*. Dentro del clado *Persea*, hubo politomía basal de dos accesiones de *Persea americana* (var. *americana*, CH-G-45 de Yucatán, México y var. *guatemalensis* CH-G-11 S1 de Chiapas, México), de *Persea parvifolia* (CH-Ve-2 de Veracruz, México) y un clado que comprende el resto de las accesiones (Figura 2). En este subclado, el árbol IB mostró cinco clados; dos de ellos apoyados fuertemente, uno con todas las accesiones de *Persea americana* var. *drymifolia* y otro con *Persea nubigena* CH-I-4, *Persea steyermarkii* CH-G-Ch1 y *P. tolimanensis* Mv1; uno con apoyo débil, otro insignificante y uno que contiene el único *Persea floccosa* CH-I-3 (Figura 2).

Análisis de las ocho secuencias concatenadas

El análisis filogenético de las ocho secuencias se realizó con accesiones de plantas de 29 miembros del subgénero *Persea*, cinco del subgénero *Eriodaphne* y una de *Beilschmiedia anay*. Los análisis IB y MP resultaron en topologías bastante congruentes (Figura 3); en general, muy similares al árbol IB y MP de las secuencias de cloroplastos concatenados. Los valores obtenidos de los subgéneros *Eriodaphne* y *Persea* en BS/PP fueron ligeramente superiores a los anteriores (94/100 % y 84/86 %, respectivamente; Figura 3). La adición de

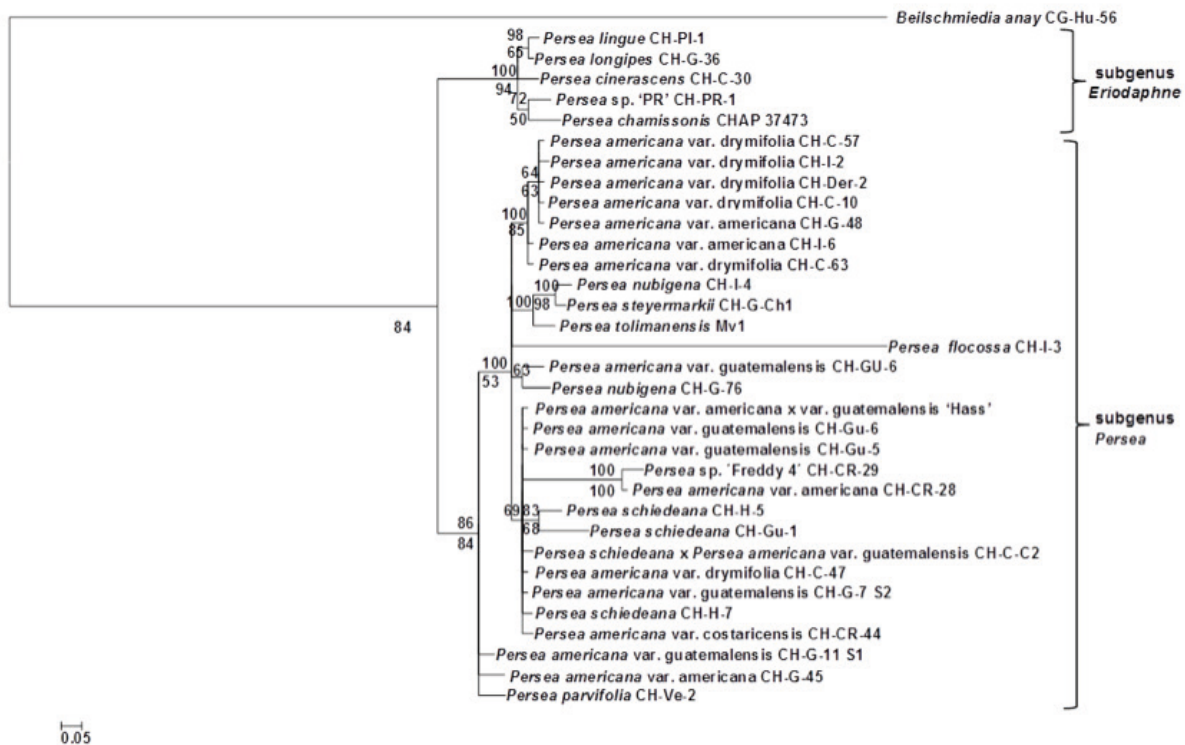


Figure 3. Bayesian 50 % majority rule consensus phylogram resulting from the analysis of the concatenation of 18S rRNA+cox3+atp4+matK+rbcL+ndhF+rpoC1+trnH-psbA sequences of *Persea* and *Beilschmiedea anay* (Lauraceae). Posterior probabilities are indicated above the nodes, and maximum parsimony bootstrap support values (where 50 %) appear below the nodes. In the parsimonious analysis, 264 equally parsimonious trees with a length of 355 steps, and a consistency index of 0.87, homoplasy index of 0.13 and a retention index of 0.81 were obtained.

Figura 3. Filograma de consenso de la regla de mayoría bayesiana del 50 % resultante del análisis de la concatenación de 18S rARN + cox3+atp4+matK+rbcL+ndhF+rpoC1+trnH-psbA de *Persea* y *Beilschmiedea anay* (Lauraceae). Las probabilidades posteriores se indican arriba de los nodos, los valores de apoyo de bootstrap de máxima parsimonia (donde 50 %) aparecen debajo de los nodos. En el análisis de parsimonia se obtuvieron 264 árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 355 pasos, y un índice de consistencia de 0.87, índice de homoplasias de 0.13 e índice de retención de 0.81.

thunbergii and *Aleodaphne semecarpifolia*. In the ITS phylogeny of Chanderbali et al. (2001), the three species of subgenus *Eriodaphne* formed a small clade (97 % BS), with *Persea americana* as its immediate sister group and several other, mainly Asian species of the *Persea* group as sister group to both. However, the small number of specimens analyzed of the two subgenera did not allow resolving the relationships within the *Persea* group.

Rohwer et al. (2009) used ITS sequences of several genera of the family. They found that the species of the subgenera *Persea* and *Eriodaphne* grouped separately from each other and from *Machilus* species. In our study, although *matK* gene showed a low degree of divergence in the sequences analyzed, BI and MP phylogenies could set the subgenus *Eriodaphne* in an independent clade, separated from species of the subgenus *Persea* and the other genera analyzed. Rohwer (2000) also

los genes 18S rARN, *cox3* y *atp4* proporcionó 38 SV más, de los cuales siete son sitios IP (Cuadro 3); sin embargo, esta información no fue capaz de mejorar significativamente la señal filogenética. Las mutaciones fijas de *Eriodaphne* aumentaron de 12 a 14 mediante la adición del gen 18S rARN (Cuadro 3).

Discusión

Persea es uno de los géneros más complejos de las Lauraceae. Análisis filogenéticos anteriores al gen *matK* (Chanderbali et al., 2001; Rohwer, 2000; Rohwer et al., 2009) han demostrado que *Persea* es un grupo monofilético profundamente anidado dentro de las Lauraceae, cerca de los complejos *Litsea* y *Ocotea*. En análisis previos, como el árbol filogenético *trnL-trnF* / *trnH-psbA* de Chanderbali et al. (2001), ambos subgéneros de *Persea* se agrupan en el mismo clado relacionado

found low levels of divergence within sequences of *matK* in Lauraceae (9.7 %) and less than 1 % within the genus *Persea*.

Although the *trnH-psbA* spacer region and the *rbcL* gene are more variable than *matK* (Table 3), these genes were not selected to investigate the position of *Persea* within the Lauraceae, because the *trnH-psbA* intergenic spacer has two areas subjected to frequent inversions that are not analyzed in this study and the phylogenetic trees of the *rbcL* (not shown) had the same topologies as the trees of *matK*.

The trees obtained from the analysis of chloroplast sequences and the eight concatenated ones are almost the same, due to the 55 PI sites of the chloroplast sequences, making them the most useful for the phylogenetic reconstruction of the clades, especially for the subgenus *Persea*. The mitochondrial and 18S *rRNA* genes only contributed to the separation of two accessions of *Persea schiedeana* (CH-H-5 and CH-Gu-1), although with moderate support.

In the subgenus *Eriodaphne* all species considered were resolved completely, but in the subgenus *Persea* the analysis failed to separate *Persea americana* from all the species, especially from *Persea schiedeana*, which has also been found in a study of avocado germplasm and additional species of subgenus *Persea* with ISSR markers (Reyes-Alemán et al., 2016). The genetic variability level of the avocado, despite its cross-pollination system, is not considered to be exceptionally high compared with estimates that have been made with temperate fruit species (Chen, Morrel, de la Cruz, & Clegg, 2008), which seems to be what was found in part in the present study.

Persea parvifolia L. O. Williams (*Persea pallescens* [Mez] Loera-Hernández), a shrub with thin shoots, small narrow obovate to elliptic leaves and small fruits (Figure 4), which was first described by L.O Williams (1977) and not considered by van der Werff (2002) as a subgenus *Persea* species, is one of the most ancestral species in the subgenus *Persea* clade, so it could be considered as a good candidate for the species that gave rise to the avocado; however, it was unresolved with the other two individuals of *P. americana* that also have a conserved sequence, so they could be primitive forms of those races. More individuals of this species are needed for a further analysis as well as other *P. americana* and other sources of *P. parvifolia* to support this.

It has been indicated that although *P. nubigena*, *P. steyermarkii* and *P. floccosa* could be separated from *P. americana* by restriction fragment length polymorphism (RFLP), they are considered to be only variants of *P. americana* (Furnier, Cummings, & Clegg, 1990); however, the results show that some of

con *Machilus thunbergii* y *Alseodaphne semecarpifolia*. En la filogenia ITS de Chanderbali et al. (2001), las tres especies del subgénero *Eriodaphne* formaron un pequeño clado (97 % BS), con *Persea americana* como su inmediato grupo hermano y varias otras especies, principalmente asiáticas del grupo *Persea*. Sin embargo, los pocos especímenes analizados de los dos subgéneros no permitieron resolver las relaciones dentro del grupo *Persea*.

Por su parte, Rohwer et al. (2009) utilizaron secuencias ITS de varios géneros de la familia y encontraron que las especies de *Machilus* y los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* se agrupan por separado entre sí. En el presente estudio, aunque el gen *matK* mostró un grado bajo de divergencia en las secuencias analizadas, las filogenias IB y MP podrían establecer al subgénero *Eriodaphne* en un clado independiente, separado de especies del subgénero *Persea* y de los otros géneros analizados. En este sentido, Rohwer (2000) también encontró niveles bajos de divergencia dentro de las secuencias de *matK* en Lauraceae (9.7 %) y menos de 1 % dentro del género *Persea*.

Aunque las regiones *trnH-psbA* y *rbcL* son más variables que *matK* (Cuadro 3), no se seleccionaron para investigar la posición de *Persea* dentro de las Lauraceae debido a que *trnH-psbA* tiene dos áreas sujetas a inversiones frecuentes que no se analizaron en este estudio. Además, los árboles filogenéticos de la *rbcL* (datos no mostrados) tuvieron las mismas topologías que los árboles de *matK*.

Los árboles obtenidos del análisis de secuencias de cloroplastos y las ocho concatenadas son muy similares debido a los 55 sitios de IP de las secuencias de cloroplastos, por lo que fueron los más útiles para la reconstrucción filogenética de los clados, especialmente para el subgénero *Persea*. Por otro lado, los genes mitocondriales y nuclear 18S *rARN* solo contribuyeron a la separación de dos accesiones de *Persea schiedeana* (CH-H-5 y CH-Gu-1), aunque con un apoyo moderado.

En *Eriodaphne* todas las especies consideradas se resolvieron completamente, pero en el subgénero *Persea* el análisis no logró separar *Persea americana* de todas las especies, especialmente de *Persea schiedeana*. Esta última ha sido encontrada en un estudio de germoplasma de aguacate y especies adicionales de subgénero *Persea* con marcadores ISSR (Reyes-Alemán et al., 2016). El nivel de variabilidad genética del aguacate, a pesar de tener un sistema de polinización cruzada, no es considerado excepcionalmente alto en comparación con las estimaciones que se han hecho con especies de frutos de clima templado (Chen, Morrel, de la Cruz, & Clegg, 2008); lo cual parece haber sido encontrado en parte en el presente estudio.



Figure 4. Branch and fruit of *Persea parvifolia* L. O. Williams (*Persea pallescens* [Mez] Loera-Hernández).
Figura 4. Rama y fruto de *Persea parvifolia* L. O. Williams (*Persea pallescens* [Mez] Loera-Hernández).

these species cluster together, which is the case of *P. nubigena*, *P. steyermarkii*, and *P. tolimanensis*, species considered to contribute to the ancestry of *P. americana* var. *guatemalensis* (Schieber & Bergh, 1987); nevertheless, this does not seem to correspond to our findings.

With respect to *P. americana*, a well-supported clade that includes five accessions of the Mexican race (*P. americana* var. *drymifolia*) were grouped together with two of the West Indian one (*P. americana* var. *americana*) indicates that they are closely related. It can be assumed that the last two accessions are not completely pure and that they may have genetic characteristics of the Mexican race. Conversely, an apparent conflict between phenotypic and genotypic data can help adjust pedigree information (Ashworth & Clegg, 2003), and be used to reclassify accessions in the germplasm bank as possible hybrids. This last point also applies to another clade that grouped accessions of the Guatemalan race, possibly hybrid, one *P. americana* var. *costaricensis*, and a *P. schiedeana* from Honduras, the last of which was also reported using DFP and SSR markers which did not find unique DNA patterns which could characterize the three races of *P. americana* and the three accessions of *P. schiedeana* (Mhameed et al., 1997). This is also in accordance for the subclade that grouped two *P. schiedeana*, one from Honduras and the other from Guatemala. In the other subclade, two accessions of Costa Rica were together an unclassified one ('Freddy 4') and a *P. americana* var. *americana* (CH-CR-28), which is probably the West Indian Race subclade.

Persea parvifolia L. O. Williams (*Persea pallescens* [Mez] Loera-Hernández) es un arbusto con brotes delgados, hojas pequeñas y estrechas de forma obovada a elíptica, y frutos pequeños (Figura 4) que fue descrito por primera vez por L. O. Williams (1977) y no fue considerado por van der Werff (2002) como un subgénero de la especie *Persea*. *P. parvifolia* es una de las especies más ancestrales del clado del subgénero *Persea*, por lo que podría considerarse un buen candidato para ser la especie que dio origen al aguacate; sin embargo, no se ha resuelto con otros dos individuos de *P. americana*, que también tienen una secuencia conservada, por lo que podrían ser formas primitivas de aquellas razas. Para poder sustentar esto, se necesitan más individuos de esta especie para un análisis posterior, así como otras fuentes de *P. americana* y de *P. parvifolia*.

Se ha indicado que *P. nubigena*, *P. steyermarkii* y *P. floccosa*, aunque podrían estar separadas de *P. americana* por polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) se consideran solo variantes de *P. americana* (Furnier, Cummings, & Clegg, 1990). No obstante, los resultados muestran que algunas de estas especies se agrupan, es el caso de *P. nubigena*, *P. steyermarkii* y *P. tolimanensis*, las cuales se considera que contribuyen en la ascendencia de *P. americana* var. *guatemalensis* (Schieber & Bergh, 1987), aunque esto parece no corresponder con los hallazgos de este trabajo.

Con respecto a *P. americana*, un clado bien apoyado que incluye cinco accessiones de la raza Mexicana

The complex legacy of ancient and recent avocado improvement has left a profusion of genotypes of uncertain affinities and with diffuse racial boundaries (Ashworth & Clegg, 2003), where other factors may have a role, including the possibility of remote hybridization events (Bufler & Ben-Ya'acov, 1992) or a more recent date for racial differentiation than previously thought (Ashworth & Clegg, 2003).

It must be considered that although the analyses of the eight concatenated sequences separate both subgenera of *Persea*, the variation of the eight sequences is low, 4.16 % of VS and 0.86 % of Pi sites (Table 3). This was reported for *trnH-psbA* (Chanderbali et al., 2001) and *matK* (Rohwer, 2000) in the family Lauraceae, but not for the other sequences. Therefore, it is necessary to find sequences showing a greater variation that allow a better resolution of the phylogenetic relationships within subgenus *Persea*. A suitable candidate may be the nuclear ITS region, which has 33 % parsimony-informative sites for many Lauraceae accessions (Rohwer et al., 2009), but in our experience it has the disadvantage of being difficult to amplify and sequence in some accessions of *Persea*, and to align because of too many indels. Liu, Chen, Song, Zhang, and Chen (2012) found that the ITS2 region produced a low success rate in direct PCR amplification and sequencing in Lauraceae species and it is also unsuitable to be the DNA barcode of the family.

Based on the hypothesis of a monophyletic origin of the genus *Persea*, our results partially suggest that this genus is not a monophyletic group; therefore, one could think that the subgenera *Persea* and *Eriodaphne* should be recognized as independent genera, confirming the analysis of Rohwer et al. (2009), where *Persea* does not appear to be monophyletic, because the subgenus *Persea* seems to be more closely related to *Phoebe* and *Alseodaphne* than to the subgenus *Eriodaphne*.

Conclusions

The eight concatenated sequences separated both subgenera (*Persea* and *Eriodaphne*) into two different clades, where 14 fixed mutations were found in the studied species of the subgenus *Eriodaphne*, supporting the hypothesis of independent genera. In the subgenus *Persea*, the concatenated sequences used failed to separate *Persea americana* from all the species, especially from *Persea schiedeana*, the most distinct species in the subgenus. The chloroplast intergenic spacer *trnH-psbA* sequence held the highest variation and informative sites, while the mitochondrial and nuclear rDNA sequences studied were not informative.

Acknowledgments

The first author was supported by a master scholarship from CONACYT-Mexico. This study was funded by

(*P. americana* var. *drymifolia*) junto con dos Antillanos (*P. americana* var. *americana*) indica que están relacionadas de manera muy cercana. Se puede suponer que las dos últimas accesiones no son completamente puras y que pueden tener características genéticas de la raza Mexicana. Por el contrario, un aparente conflicto entre los datos fenotípicos y genotípicos puede ayudar a ajustar la información de pedigrí (Ashworth & Clegg, 2003), y ser utilizado para reclasificar las accesiones en el banco de germoplasma como posibles híbridos. Lo anterior, también se aplica a otro clado que agrupó accesiones de la raza Guatemalteca, posiblemente híbrida (*P. americana* var. *costaricensis*) y una *P. schiedeana* de Honduras. Esta última también se ha analizado con marcadores DFP y SSR, y no se encontraron patrones únicos de ADN que pudieran ayudar a caracterizar las tres razas de *P. americana* y las tres accesiones de *P. schiedeana* (Mhameed et al., 1997); lo cual concuerda con el subclado que agrupa a dos *P. schiedeana*, una de Honduras y otra de Guatemala. Mientras que en el otro subclado se juntaron dos accesiones de Costa Rica, una no clasificada ('Freddy 4') y una *P. americana* var. *americana* (CH-CR-28), que probablemente sea el subclado de la raza Antillana.

El complejo legado de mejora del aguacate antiguo y reciente ha dejado una profusión de afinidades inciertas de genotipos con límites raciales difusos (Ashworth & Clegg, 2003). En este sentido, otros factores pueden tener un papel, incluyendo la posibilidad de eventos de hibridación remota (Buffer & Ben-Ya'acov, 1992) o una fecha más reciente para la diferenciación racial de lo que se pensaba anteriormente (Ashworth & Clegg, 2003).

Se debe considerar que, aunque los análisis de las ocho secuencias concatenadas separan a ambos subgéneros de *Persea*, la variación de las ocho secuencias es baja, 4.16 % de los SV y 0.86 % de los sitios IP (Cuadro 3). Esto se reportó para *trnH-psbA* (Chanderbali et al., 2001) y *matK* (Rohwer, 2000) de la familia Lauraceae, pero no para las otras secuencias. Por lo tanto, es necesario encontrar secuencias que muestren mayor variación, que permita mejorar la resolución de las relaciones filogenéticas dentro del subgénero *Persea*. Un candidato adecuado puede ser la región nuclear ITS, que tiene 33 % de sitios IP para muchas accesiones de Lauraceae (Rohwer et al., 2009); sin embargo, algunas accesiones de *Persea* tienen la desventaja de ser difícil de amplificar, secuenciar y alinear debido a que presentan demasiados indeles. Liu, Chen, Song, Zhang, y Chen (2012) encontraron que la región ITS2 produjo una tasa baja de éxito en la amplificación y secuenciación directas por PCR en especies de Lauraceae, además, tampoco es adecuada para ser el código de barras de ADN de la familia.

Con base en la hipótesis de un origen monofilético del género *Persea*, los resultados de este trabajo sugieren parcialmente que este género no es un grupo

project FRU-AGU-10-01 of the National System for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture in Mexico (SINAREFI-SNICS-SAGARPA) and by the Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C.

End of English version

References / Referencias

- Ashworth, V. E. T. M., & Clegg, M. T. (2003). Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *Journal of Heredity*, 94(5), 407-415. doi: 10.1093/jhered/esg076
- Barrientos-Priego, A. F. (1999). Conservation of avocado genetic resources in Mexico. *Subtropical Fruit News*, 7(1), 1-2.
- Barrientos Priego, A. F. (2010). El aguacate. *Biodiversitas*, 88(1), 1-7. Retrieved from <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv88art1.pdf>
- Barrientos-Priego, A. F., Muñoz-Pérez, R., Borys, M. W., & Martínez-Damián, M. T. (2015). Taxonomía, cultivares y portainjertos. In: Téliz, D. & Mora, A. (Eds.), *El aguacate y su manejo integrado* (pp. 31-62). Montecillos, México: Biblioteca Básica de Agricultura, Colegio de Postgraduados.
- Beilstein, M. A., Nagalingum, N. S., Clements, M. D., Manchester, S. R., & Mathews, S. (2010). Dated molecular phylogenies indicate a Miocene origin for *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18724-18728. doi: 10.1073/pnas.0909766107
- Ben-Ya'acov, A., & Barrientos-Priego, A. (2003). The *Persea* germplasm resources potential as discovered during an international collection project (pp. 21-26). *Proceedings of The V World Avocado Congress*. Malaga, Spain.
- Bost, J. B., Smith, N. J. H., & Crane, J. H. (2013). History, distribution and uses. In: Schaffer, B. A., Whitley, A. W., & Wolstenholme, B. N. (Eds.), *The avocado, botany and uses* (pp. 10-30). Oxfordshire, UK: CAB International Publishing. doi: 10.1079/9781845937010.0010
- Bufler, G., & Ben-Ya'acov, A. (1992). A study of the avocado germplasm resources, 1988-1990. 3 Ribosomal DNA repeat unit polymorphism in avocado (pp. 545-550). *Proceedings of the Second World Avocado Congress*, University of California, Riverside, California.
- Cabrera-Hernández, C., Valadez-Moctezuma E., Cruz-Maya, M. E., Zelaya-Molina, L. X., Barrientos-Priego, A. F., & Reyes-Alemán, J. C. (2017). EL *trnL-trnF* de cpADN contribuye a la separación de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* (Lauraceae; *Persea*) como géneros independientes. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 33(3), 231-240. doi: 10.4067/S0719-38902017005000701

monofilético; por lo que, se podría pensar que los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* deberían reconocerse como géneros independientes. Esto concuerda con el análisis de Rohwer et al. (2009), donde *Persea* no parece ser monofilético, pues parece estar relacionado más cercanamente con *Phoebe* y *Alseodaphne* que con el subgénero *Eriodaphne*.

Conclusiones

Las ocho secuencias concatenadas separaron a ambos subgéneros (*Persea* y *Eriodaphne*) en dos clados diferentes, donde se encontraron 14 mutaciones fijas en las especies estudiadas del subgénero *Eriodaphne*, lo cual respalda la hipótesis de géneros independientes. En el subgénero *Persea*, las secuencias concatenadas utilizadas no lograron separar a *Persea americana* de todas las especies, especialmente de *Persea schiedeana*, la más distinta de este subgénero. La secuencia de la región espaciadora intergénica *trnH-psbA* del cloroplasto mostró la mayor variación y contenido de sitios informativos, mientras que las secuencias de rADN mitocondrial y nuclear no fueron informativas.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) por la beca de maestría otorgada a la primera autora. Este estudio fue financiado por el proyecto FRU-AGU-10-01 del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI) y por la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C.

Fin de la versión en español

- Campos-Rojas, E., Terrazas, T., & López-Mata, L. (2007). *Persea* (avocados) phylogenetic analysis based on morphological characters: hypothesis of species relationships. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(2), 249-258. doi: 10.1007/s10722-005-3808-x
- Chanderbali, A. S., van der Werff, H., & Renner, S. S. (2001). Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: Evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88(1), 104-134. doi: 10.2307/2666133
- Chanderbali, A. S., Albert, V. A., Ashworth, V. E., Clegg, M. T., Litz, R. E., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2008). *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays*, 30(4), 386-396. doi: 10.1002/bies.20721
- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgensen, T., Cameron, K. M., Carine, M., & Pedersen, N. (2007).

- A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 56(2), 295-299. Retrieved from <https://botanica.uniandes.edu.co/investigacion/pdfs/Chase-Plant%20Barcodes.pdf>
- Chen, H., Morrel, P. L., de la Cruz, M., & Clegg, M. T. (2008). Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of Heredity*, 99(4), 382-389. doi: 10.1093/jhered/esn016
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., & Zhou, S. (2012). Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PLoS One*, 7(4), 35071. doi: 10.1371/journal.pone.0035071
- Duminil, J., Pemonge, M. H., & Petit, R. J. (2002). A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes*, 2(4), 428-430. doi: 10.1046/j.1471-8286.2002.00263.x
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Fay, M. F., Swensen, S. M., & Chase, M.W. (1997). Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). *Kew Bulletin*, 52(1), 111-120. doi: 10.2307/4117844
- 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., & Wilkinson, M. J. (2009). Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159(1), 1-11. doi: 10.1111/j.1095-8339.2008.00938.x
- Fraedrich, S. W., Harrington, T. C., Rabaglia, R. J., Ulyshen, M. D., Mayfield, A. E., Hanula, J. L., Eickwort, J. M., & Miller, D. R. (2008). A fungal symbiont of the redbay ambrosia beetle causes a lethal wilt in redbay and other Lauraceae in the southeastern United States. *Plant Disease*, 92(2), 215-224. doi: 10.1094/PDIS-92-2-0215
- Frolich, E. F., Schroeder, C. A., & Zentmyer, G. A. (1958). Graft compatibility in the genus *Persea*. *California Avocado Society*, 42, 102-105. Retrieved from http://www.avocadosource.com/CAS_Yearbooks/CAS_42_1958/CAS_1958_PG_102-105.pdf
- Furnier, G. R., Cummings, M. P., & Clegg, M. T. (1990). Evolution of the avocados as related by DNA restriction fragment variation. *Journal of Heredity*, 81(3), 183-188. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a110963
- Gambino, G., Perrone, I., & Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520-525. doi: 10.1002/pca.1078
- Gutiérrez-Díez, A., Barrientos-Priego, A. F., & Campos-Rojas, E. (2015). Caracterización molecular y análisis filogenético de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* (Lauraceae) (pp. 88-94). *Recursos genéticos y manejo de viveros*. Lima, Perú.
- 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), 1-120.
- Kress, W. J., & 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), 508. doi: 10.1371/journal.pone.0000508
- Lahav, E., & Lavi, U. (2013). 4 Genetics and breeding. In: Schaffer, B. A., Whitley, A. W., & Wolstenholme, B. N. (Eds.), *The avocado botany, and uses* (pp. 51-85). Oxfordshire, UK.: CAB International Publishing.
- Li, L., Li, J., Rohwer, J. G., van der Werff, H., Wang, Z. H., & Li, H. W. (2011). Molecular phylogenetic analysis of the *Persea* group (Lauraceae) and its biogeographic implications on the evolution of tropical and subtropical amphipacific disjunctions. *American Journal of Botany*, 98(9), 1520-1536. doi: 10.3732/ajb.1100006
- Liu, Z., Chen, S. L., Song, J. Y., Zhang, S. J., & Chen, K. L. (2012). Application of deoxyribonucleic acid barcoding in Lauraceae plants. *Pharmacognosy Magazine*, 8(29), 4-11. doi: 10.4103/0973-1296.93301
- López-López, L., Barrientos-Priego, A. F., & Ben-Ya'acov, A. D. (1999). Variabilidad genética de los bancos de germoplasma de aguacate preservados en el Estado de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 19-23. doi: 10.5154/r.rchsh.1999.02.012
- Lorea-Hernández, F. G. (2002). La familia Lauraceae en el sur de México: diversidad, distribución y estado de conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 71, 59-70. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57707104>
- Mhameed, S., Sharon, D., Kaufman, D., Lahav, E., Hillel, J., Degani, C., & Lavi, U. (1997). Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 94(2), 279-286. doi: 10.1007/s001220050411
- Olmstead, R., Michaels, H., Scott, K., & Palmer, J. (1992). Monophyly of the Asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcl*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79(2), 249-265. doi: 10.2307/2399768
- Ploetz, R. C., Peña, J. E., Smith, J. A., Dreaden, T. J., Crane, J. H., Schubert, T., & Dixon, W. (2015). Laurel Wilt, caused by *Raffaelea lauricola*, is confirmed in Miami-Dade County, center of Florida's commercial avocado production. *Plant Disease*, 95(12), 33-44. doi: 10.1094/PDIS-08-11-0633
- Reyes-Alemán, J. C., Valadez-Moctezuma, E., Simuta-Velázco, L., Barrientos-Priego, A. F., & Gallegos-Vázquez, C. (2013). Distinción de especies del género *Persea* mediante RAPD e ISSR de ADN. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(4), 517-529. Retrieved from <http://scielo.unam.mx/pdf/remexca/v4n4/v4n4a3.pdf>
- Reyes-Alemán, J. C., Valadez-Moctezuma, E., & Barrientos-Priego, A. F. (2016). Assessment of genetic relationship in *Persea* spp. by traditional molecular markers. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 1-11. doi: 10.4238/gmr.15027359
- Rohwer, J. G. (2000). Toward a phylogenetic classification of the Lauraceae: evidence from *matK* sequences. *Systematic Botany*, 25(1), 60-71. doi: 10.2307/2666673

- Rohwer, J. G., Li, J., Rudolph, B., Schmidt, S. A., van der Werff, H., & Li, H. W. (2009). Is *Persea* (Lauraceae) monophyletic? Evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. *Taxon*, 58(4), 1153-1167. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/27757009>
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180
- Schaffer, B., Wolstenholme, B. N., & Whiley, A. W. (2013). Introduction. In: Schaffer, B. A., Whiley, A. W., & Wolstenholme, B. N. (Eds.), *The avocado, botany and uses* (pp. 1-9). Oxfordshire, UK: CAB International Publishing. doi: 10.1079/9781845937010.0001
- Schieber, E., & Bergh, B. O. (1987). *Persea zentmyerii*: a new species from Guatemala. *California Avocado Society*, 71, 199-203. Retrieved from http://avocadosource.com/CAS_Yearbooks/CAS_71_1987/CAS_1987_PG_199-203.pdf
- Schmitz-Linneweber, C., Maier, R. M., Alcaraz, J. P., Cottet, A., Herrmann, R. G., & Mache, D. R. (2001). The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *Plant Molecular Biology*, 45(3), 307-315. doi: 10.1023/A:1006478403810
- Swofford, D. L. (2001). *PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*, 4.0 B5. Sunderland, USA: Sinauer Associates. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.458.6867>
- Tate, J. A., & Simpson, B. B. (2003). Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*, 28(4), 723-737. doi: 10.1043/02-64.1
- Van der Werff, H. (2002). A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central America. *Novon*, 12(4), 575-586. doi: 10.2307/3393142
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White T. J. (Eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315-322). New York, USA: Academic Press, Inc.
- Williams, L. O. (1977). The avocado, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany*, 31(3), 315-320. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4253853>