

## Distinción de especies del género *Persea* mediante RAPD e ISSR de ADN<sup>1\*</sup>

### Distinction of species of the genus *Persea* by RAPD and ISSR DNA markers<sup>1</sup>

Juan Carlos Reyes-Alemán<sup>1</sup>, Ernestina Valadez-Moctezuma<sup>2</sup>, Lisandro Simuta-Velázco<sup>3</sup>, Alejandro Facundo Barrientos-Priego<sup>2§</sup> y Clemente Gallegos-Vázquez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S. C. Ignacio Zaragoza No. 6 Coatepec Harinas, México. C. P. 1700. (reyesaleman@hotmail.com). <sup>2</sup>Posgrado en Horticultura, Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, km 38.5. Texcoco Estado de México, México. C. P. 56230. (nestty56@yahoo.com.mx). <sup>3</sup>Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Revolución esq. Berlín. Uruapan, Michoacán, México. (subgenpersea@gmail.com). <sup>4</sup>Centro Regional Universitario Centro Norte, Universidad Autónoma Chapingo, México. A. P. 196. Zacatecas, Zacatecas. C. P. 98001. México. (clemgava5@hotmail.com). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: abarrien@correo.chapingo.mx.

## Resumen

Con la finalidad de establecer bases para diferenciar parte de la diversidad genética de *Persea* y en especial del subgénero *Persea* resguardado en la colección nacional de germoplasma de aguacate de México, se estudiaron ocho especies (*P. americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *P. floccosa*, *P. cinerascens* y *P. indica*) con marcadores moleculares mediante las técnicas de RAPD e ISSR, donde los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida. Las huellas de ADN se analizaron con métodos estadísticos multivariadas y de remuestreo para conocer su relación genómica. Se detectaron fragmentos polimorfismos de ADN útiles para la distinción inter e intraespecífica de las ocho especies del género *Persea* en estudio. Los análisis estadísticos de las huellas de ADN mediante RAPD a diferencia de ISSR, agruparon de forma congruente a las diferentes especies de acuerdo a la taxonomía actual. De acuerdo al presente estudio, *P. indica* y *P. lingue* mantienen poca relación genómica con el resto de las especies estudiadas por pertenecen al subgénero *Eriodaphne*. Por otra parte los resultados permitieron diferenciar genotipos de las diferentes especies del subgénero *Persea* incluyendo a *P. americana* y un híbrido interespecífico incluido en el estudio.

## Abstract

With the aim of establishing a basis to differentiate part of the *Persea* genetic diversity, specially of the subgenus *Persea* maintained in the National Avocado Germplasm Repository of Mexico, eight species were studied (*P. americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *P. floccosa*, *P. cinerascens* y *P. indica*) with molecular markers by means of RAPD and ISSR techniques, where the PCR products were separated in acrylamide gels. The DNA fingerprinting was analyzed with multivariate statistical methods and bootstrapping to establish their genomic relationships. Useful DNA polymorphic fragments were found for the inter and intra-specific distinction of the eight species of *Persea* considered in the study. The statistical analysis of the DNA fingerprints by means of RAPD grouped the different species congruently with the actual taxonomic classification, compared with ISSR. According to the present study, *P. indica* y *P. lingue* show less genomic relationship with the rest of the species studied, and this is accordance to the fact that they correspond to the subgenus *Eriodaphne*. The results permitted to differentiate genotypes of the different species of the subgenus *Persea* that includes *P. americana* and an inter-specific hybrid included in the study.

\* Recibido: octubre de 2012  
Aceptado: marzo de 2013

**Palabras clave:** germoplasma, marcadores moleculares, recursos fitogenéticos.

**Key words:** Lauraceae, avocado, germplasm, molecular markers, plant genetic resources.

## Introducción

México cuenta con amplia variabilidad en aguacate y existen en el al menos 20 diferentes especies relacionadas con el aguacate (Barrientos *et al.*, 2007). El género *Persea* que pertenece a la familia *Lauraceae* es considerado como uno de los más difíciles de abordar taxonómicamente (Kopp, 1966). Hace unos años se publicó que el subgénero *Persea* sólo está formado por *P. americana* y *P. schiedeana*, dejando fuera a *P. nubigena*, *P. steyermarkii*, *P. parvifolia*, *P. tolimanensis*, *P. floccosa*, y *P. zentmyerii*, y se indicó que la variabilidad en aguacate se debe a los procesos de selección y cultivo que el hombre ha hecho a través del tiempo (Van der Werff, 2002).

Mediante RFLP se pudo separar *P. nubigena* y *P. steyermarkii* y a *P. floccosa* de *P. americana* (Furnier *et al.*, 1990); sin embargo, indicó que pueden ser solo variantes de *P. americana*. Recientemente se planteó que los subgéneros *Persea* y *Eriodhaphne* se consideren como géneros, basado en un análisis de parsimonia algorítmica (Campos *et al.*, 2006), donde también reconoce a la mayoría de las especies del subgénero *Persea*.

Las dificultades en la clasificación de las razas de aguacate, junto con la influencia del hombre, es el hecho de que su progenie es extremadamente variable (Gama, 1994), por lo que las herramientas como los marcadores moleculares podría tener una aplicación directa para resolver la ubicación taxonómica dentro del complejo *Persea*, existen ya antecedentes en aguacate con RFLP (Davies *et al.*, 1998), con SSR (Mhameed *et al.*, 1997), con RAPD (Fiedler *et al.*, 1998), con AFLP (Chao *et al.*, 2003) y con microsatélites (Ashworth y Clegg, 2003).

Si se dan las condiciones estandarizadas y estrictas a lo ensayos con marcadores basados en RAPD, se pueden realizar pruebas rápidas y de menor demanda técnica, comparados con minisatélites y microsatélites (Fiedler *et al.*, 1998). Asimismo, estos mismos autores indicaron que los RAPD pueden ayudar a elucidar la variación genética de todo el subgénero *Persea*, ya que se demostró la detección de fragmentos monomórficos específicos para cada raza de *P. americana*, lo cual no se ha encontrado con microsatélites (Schnell *et al.*, 2003).

## Introduction

Mexico has a large variety of avocados, with at least 20 different species (Barrientos *et al.*, 2007). The genus *Persea*, which belongs to the family *Lauraceae*, is considered one of the most difficult to classify taxonomically (Kopp, 1966). A few years ago it was reported that the subgenus *Persea* comprises only *P. americana* and *P. schiedeana*, leaving out *P. nubigena*, *P. steyermarkii*, *P. parvifolia*, *P. tolimanensis*, *P. floccosa*, and *P. zentmyerii*, and it was also indicated that the variability in avocado is due to the selection and cultivation processes carried out by man over time (van der Werff, 2002).

RFLP allowed to separate *P. nubigena*, *P. steyermarkii* and *P. floccosa* from *P. americana* (Furnier *et al.*, 1990); however, it was indicated that they might be variants of *P. americana*. Recently, it was suggested that the subgenera *Persea* and *Eriodhaphne* should be considered as genera, based on an algorithmic parsimony analysis (Campos *et al.*, 2006), which also recognizes most of the species of the subgenus *Persea*.

The difficulties found in the classification of the races of avocado are due to, along with the influence of man, the extreme variability of their progeny (Gama, 1994), so that tools such as molecular markers could have a direct application to solve the taxonomic problem of assigning a location for avocado within the complex *Persea*. There already precedents for avocado with RFLP (Davies *et al.*, 1998), SSR (Mhameed *et al.*, 1997), RAPD (Fiedler *et al.*, 1998), AFLP (Chao *et al.*, 2003) and microsatellites (Ashworth and Clegg, 2003).

If the RAPD- based assays are carried out under strict and standardized conditions, it is possible to perform tests quickly and less technically demanding compared to minisatellites and microsatellites (Fiedler *et al.*, 1998). Furthermore, these same authors indicated that RAPD may help elucidate the genetic variation of the entire subgenus *Persea*, as the presence of specific monomorphic fragments for each race of *P. americana* was demonstrated by this method, a finding that microsatellites have not been able to achieve (Schnell *et al.*, 2003).

Por lo anterior se planteó como objetivo, establecer las bases para la distinción mediante marcadores moleculares de genotipos representativos del subgénero *Persea* y *Eriodaphne*, con énfasis en el primero.

## Materiales y métodos

En el presente estudio se realizó durante 2008, un total de 14 genotipos de *Persea* fueron evaluados, provenientes del banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S.C. localizado en Coatepec Harinas, Estado de México, México. Correspondiendo a ocho especies del género *Persea*: *P. americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *P. floccosa*, *P. cinerascens*, *P. indica*, posible híbrido *P. nubigena* x *P. americana* y un híbrido *P. schiedeana* x *P. americana* var. *guatemalensis* (Cuadro 1).

Therefore, we proposed as the objective of this study to distinguish, by way of molecular markers, representative genotypes of the subgenera *Persea* and *Eriodaphne*, especially of the former.

## Materials and methods

The present study was conducted during 2008; a total of 14 genotypes of *Persea* were evaluated, all them from the Germplasm Bank of the Salvador Sánchez Colin Foundation, CICTAMEX, S. C., located in Coatepec Harinas, State of Mexico, Mexico. The genotypes correspond to eight species of the genus *Persea*: *P. americana*, *P. steyermarkii*, *P. schiedeana*, *P. lingue*, *P. nubigena*, *P. floccosa*, *P. cinerascens*, *P. indica*, the possible hybrid *P. nubigena* x *P. americana* and a hybrid, *P. schiedeana* x *americana* var. *guatemalensis* (Table 1).

### Cuadro 1. Genotipos de *Persea* tipificados mediante RAPD e ISSR en el estudio.

Table 1. *Persea* genotypes typified using RAPD and ISSR in the study.

Origen	Nombre designado	Núm. en lote	Especie, raza o parentesco
España	Indica	1	<i>P. indica</i>
México	Canelillo	2	<i>P. cinerascens</i>
Guatemala	Gigantea	3	<i>P. gigantea</i>
México	Floccosa	10	<i>P. floccosa</i>
Guatemala	Nubigena 1/7	12	Posible híbrido <i>P. nubigena</i> x <i>P. americana</i>
Guatemala	Martín Grande c	19	Híbrido <i>P. schiedeana</i> x <i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>
México	ScrMer 7 S1	60	<i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>
México	Rodeo 1	70	<i>P. nubigena</i>
México	CRM	76	<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>
México	Olanca 2 S3	114	<i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>
México	Tochimilco 1	208	<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>
México	Steyermarkii	232	<i>P. steyermarkii</i>
Honduras	Lino	44	<i>P. schiedeana</i>
Chile	Lingue	32	<i>P. lingue</i>

ScrMer 7 S1= San Cristóbal de las Casas Mercado 7 Semilla 1; CRM= Criollo de la Raza Mexicana.

### Extracción de ADN

Basándose en el método del CTAB ("cetyltrimethylammonium bromide") conforme en los protocolos ya establecidos (Saghai-Marooft *et al.*, 1984), con leves modificaciones, se realizó la extracción de ADN de hojas frescas de aguacate de los genotipos correspondientes. Posteriormente el ADN obtenido se almacenó a 4 °C hasta su uso.

### DNA extraction

We extracted DNA from fresh leaves of avocado of the corresponding genotypes based on the CTAB method ("cetyltrimethylammonium bromide") and according to established protocols slightly modified (Saghai-Marooft *et al.*, 1984). Subsequently, the DNA obtained was stored at 4 °C until use.

## Condiciones de PCR

Mediante la técnica de la reacción de polimerización en cadena (PCR) se sintetizaron *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar mediante el uso del termociclador secuencias específicas en el genoma de hojas de aguacate. Se usó para RAPD e ISSR un equipo Gene Amp PCR System 2700. Para RAPD el programa de termociclaje comprendió un ciclo inicial de desnaturalización de 1'00'' a 94 °C, 35 ciclos comprendiendo la desnaturalización, alineamiento y extensión de 0'30'' a 94 °C, 0'30'' a 40 °C y 1'30'' a 72 °C, respectivamente, y al final 1 ciclo de extensión de 2'30'' a 72 °C. Para ISSR se utilizó un ciclo inicial de desnaturalización de 1'00'' a 94 °C, 38 ciclos comprendiendo desnaturalización, alineamiento y extensión de 0'30'' a 94 °C, 0'30'' a 48 °C y 2'00'' a 72 °C, respectivamente, y al final 1 ciclo de extensión de 2'30'' a 72 °C.

Los componentes de reacción para el análisis tipo RAPD se colocaron en tubos de 500 µl conteniendo cada uno 25 µl de los siguientes componentes; 5 µl de ADN (20 ng µl<sup>-1</sup>), 0.3 µl enzima Taq polimerasa (5 U µl<sup>-1</sup>), 10 ml DNTPs (500 µM), 2.5 µl amortiguador Taq (1x), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl de Primer y 3.2 µl de agua.

Los componentes de reacción para el análisis tipo ISSR fueron los mismos que se utilizaron para RAPD solo que en este caso se utilizaron; 2.5 µl de ADN [20 ng µl<sup>-1</sup>] y 3 µl de MgCl<sub>2</sub> [25 mM].

Se utilizaron siete iniciadores para el caso de RAPD (Cuadro 2) y cinco para ISSR (Cuadro 3).

### Cuadro 2. Iniciadores RAPD utilizados e información de fragmentos de ADN de genotipos de *Persea* spp.

Table 2. RAPD primers used and information about the DNA fragments of genotypes of *Persea* spp.

Secuencia de iniciador	Fragmentos detectados	Fragmentos Polimórficos (%)	Fragmentos de individuales entre genotipos
5'-TTC CGA ACC C-3'	15	80.0	3
5'-TGT CTG GGT G-3'	48	83.3	8
5'-AAG CCT CGT C-3'	43	93.0	3
5'-TGG ACC GGT G-3'	51	88.2	6
5'-TGC GGC TGA G-3'	61	90.1	6
5'-GGT GAC TGT G-3'	68	94.1	4
5'-GGA CTG CAG A-3'	53	92.4	4

## PCR conditions

Using the polymerase chain reaction (PCR) technique, we synthesized *in vitro* specific DNA fragments with the aim of detecting, with the use of the thermocycler, specific sequences in the genome of avocado leaves. For RAPD and ISSR, we used a Gene Amp PCR System 2700 equipment. For RAPD, the thermocycling program included an initial denaturation cycle of 1' 00" at 94 °C, with 35 cycles comprising denaturation, alignment and extension of 0' 30" at 94 °C, 0' 30" at 40 °C, and 1' 30" at 72 °C, respectively; and at the end, one extension cycle of 2' 30" at 72 °C. For ISSR we used an initial denaturation cycle of 1' 00" at 94 °C, with 38 cycles comprising denaturation, alignment and extension of 0' 30" at 94 °C, 0' 30" at 48 °C and 2' 00" at 72 °C, respectively, and at the end one extension cycle of 2' 30" at 72 °C.

The reaction components for the RAPD analysis were placed in 500 µl tubes, each containing 25 µl of the following components: 5 µl of DNA (20 ng µl<sup>-1</sup>), 0.3 µl of the Taq polymerase enzyme (5 U µl<sup>-1</sup>), 10 ml DNTPs (500 µM), 2.5 µl of Taq buffer (1x), 2 µl of MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl of primer and 3.2 µl of water.

The reaction components for the ISSR analysis were the same as were used for RAPD but in this case the quantities used were: 2.5 µl of DNA [20 ng µl<sup>-1</sup>] and 3 µl of MgCl<sub>2</sub> [25 mM].

Seven primers were used for RAPD (Table 2) and five for ISSR (Table 3).

**Cuadro 3. Iniciadores ISSR utilizados e información de fragmentos de ADN de genotipos de *Persea* spp.**  
**Table 3. ISSR primers used and information about the DNA fragment of genotypes of *Persea* spp.**

Secuencia de Iniciador <sup>z</sup>	Fragmentos de detectados	Fragmentos Polimórficos (%)	Fragmentos de individuales entre genotipos
5'-(AC) <sub>8</sub> YG-3'	25	80.0	5
5'-(GA) <sub>8</sub> YC-3'	26	93.3	2
5'-(TCC) <sub>5</sub> RY-3'	19	89.4	2
5'-(GACA) <sub>4</sub> -3'	18	83.3	3
5'-(GATA) <sub>4</sub> -3'	17	88.2	2

<sup>z</sup>Y sustituye residuos C (citosina) y T (timina); R sustituye G (guanina) y A (adenina).

### Elaboración de geles

Los productos amplificados de PCR se separaron mediante electroforesis con una cámara en sistema vertical mediante geles de poliacrilamida 8%. Para el corrimiento de las muestras se utilizaron 2.5 µl de la mezcla del producto de la reacción de PCR agregando 1 µl de buffer de carga "blue orange" y se utilizó un marcador estándar de 1 Kb. Los geles se corrieron a 280 volts por 2.5 h en amortiguador TBE 1X y se tiñeron con AgNO<sub>3</sub> 0.2% de acuerdo al protocolo convencional. Para la documentación de las huellas de ADN se utilizó el sistema Digital Science 1D V.2.0.3.

### Análisis estadístico

Mediante los perfiles de bandas obtenidos en los geles se elaboró una matriz básica de datos correspondiente a cada iniciador utilizado, donde la presencia y ausencia de bandas fue registrado, asignando 1 y 0, respectivamente.

Para el análisis de los datos obtenidos y agrupados en cada matriz, respectiva, se utilizó el criterio de distancias de similitud mediante el índice Jaccard (Jaccard, 1908) y para el agrupamiento se utilizó el método Neighbor-Joining recomendado para generar grupos por similitud (Saitou y Nei 1987), este método ha sido utilizado con RAPD en germoplasma de cacao (Whitkus *et al.*, 1999) y RAPD para germoplasma de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) donde se comprobó que el mejor método de agrupamiento fue Neighbor-Joining con valores del índice de Jaccard (Demey *et al.*, 2003). Para elaborar el árbol se utilizó el programa FreeTree v. 0.9.1.50 (Pavliceck *et al.* 1999), y se realizó un remuestreo ("bootstrapp") de 1000 repeticiones, obteniendo el árbol consenso con las frecuencias de cada uno de los agrupamientos (Hampl *et al.* 2001), para visualizar el árbol obtenido se utilizó el programa Tree View v. 1.6.6 (Page, 1996).

### Preparation of gels

The PCR amplified products were separated by electrophoresis with a camera mounted on a vertical system using 8% polyacrylamide gels. 2.5 µl of the mixture produced by the PCR reaction were used for running the samples, adding 1 µl of loading buffer "blue orange", and using a standard 1 Kb marker. The gels were run at 280 volts for 2.5 h in TBE 1X buffer and stained with 0.2% AgNO<sub>3</sub> according to the conventional protocol (Valadez and Kahl, 2000). The Digital Science 1D system, V.2.0.3, was used for recording the DNA fingerprints.

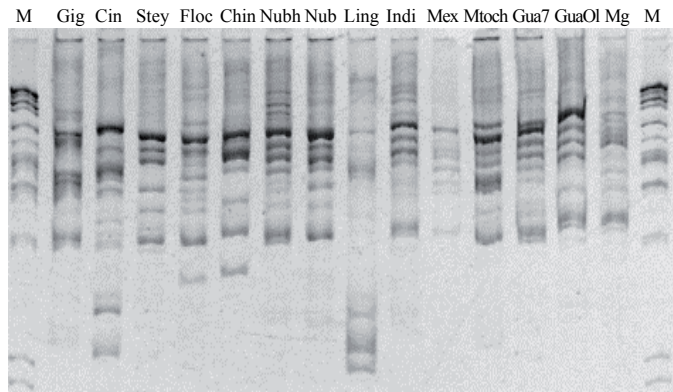
### Statistical analysis

From the band profiles obtained with the gels we prepared a basic data matrix for each primer used where we registered the presence and absence of bands, assigning 1 and 0, respectively.

To analyze the data collected and grouped in each matrix we used the criteria of similarity distances by way of the Jaccard index (Jaccard, 1908). For grouping we used the Neighbor-Joining method recommended to generate groups by similarity (Saitou and Nei 1987); this method has been used with RAPD on cocoa germplasm (Whitkus *et al.*, 1999) and on cassava germplasm (*Manihot esculenta* Crantz), from which it was found that the best grouping method was Neighbor-Joining with values from the Jaccard index (Demey *et al.*, 2003). We used the FreeTree program, v. 0.9.1.50, to make the tree. (Pavliceck *et al.* 1999), and performed a bootstrap of 1000 replicates, obtaining the consensus tree with the frequencies of each of the groupings (Hampl *et al.* 2001); to visualize the tree obtained we used Tree View program, v. 1.6.6 (Page, 1996).

## Resultados y discusión

Cada iniciador derivó diversos fragmentos de ADN que sirvieron para generar las dos matrices, tanto con RAPD e ISSR (Figuras 1 y 2).



**Figura 1.** Ejemplo de perfiles de fragmentos derivados de ADN genómico de especies del género *Persea* mediante RAPD del iniciador 5'-GGT GAC TGT G-3'.

**Figure 1.** Example of amplified genomic DNA fragments of species belonging to the genus *Persea* using the primer RAPD 5'-GGT GAC TGT G-3'.

Dichos fragmentos fueron más abundantes en la mayoría de los iniciadores RAPD (Cuadro 2), mientras que en los ISSR fueron menos abundantes (Cuadro 3); donde todos los iniciadores mostraron 80% o más fragmentos polimórficos.

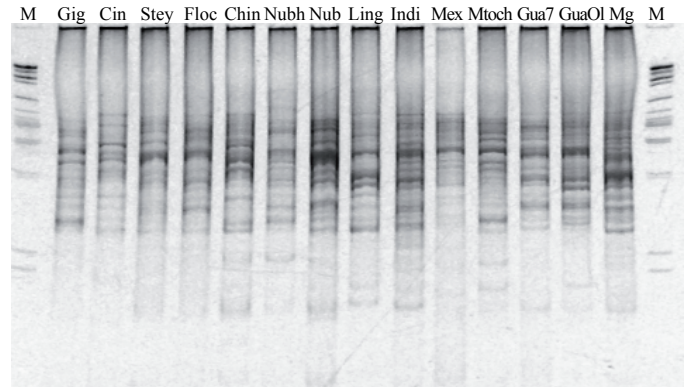
El patrón de bandeo en general defirió marcadamente entre individuos, donde se detectaron bandas únicas para cada uno de los individuos variando en su número con RAPD (Cuadro 4); sin embargo, para ISSR solo se encontraron fragmentos únicos para algunos individuos. Los patrones de las bandas detectadas para todos los iniciadores fueron altamente informativos y distintivos para cada uno de los individuos.

La matriz de datos para RAPD contó con 3 808 caracteres de todos los 14 individuos, mientras que para ISSR la matriz se constituyó de 1 470 caracteres. Dichas matrices fueron utilizadas para derivar árboles filogenéticos (filogramas) para RAPD e ISSR.

Todos los individuos se pudieron diferenciar y no existieron redundancias. La distancia genética más lejana para el caso de RAPD fue de 0.875 entre *P. schiedeana* y *P. indica*, y la con mayor cercanía fue entre *P. nubigena* y para el posible híbrido *P. nubigena* x *P. americana* con 0.511. Para ISSR la

## Results and discussion

Each primer amplified various DNA fragments which served to generate the two matrices, both with RAPD and with ISSR (Figures 1 and 2).



**Figura 2.** Ejemplo de perfiles de fragmentos derivados de ADN nuclear de especies del género *Persea* mediante ISSR del iniciador (GA)<sub>8</sub>YC.

**Figure 2.** Example of amplified nuclear DNA fragments of species belonging to the genus *Persea* by ISSR of the primer (GA)<sub>8</sub>YC.

These fragments were most abundant in most RAPD primers (Table 2), whereas in the ISSR were less abundant (Table 3); in the latter all primers showed 80% or more polymorphic fragments.

The overall banding pattern differed markedly between individuals; single bands were detected for each of the individuals, their number varying with RAPD (Table 4); however, with ISSR unique fragments were found for only some individuals. The band patterns detected for all primers were highly informative and distinctive for each of the individuals.

The data matrix for RAPD had 3808 characters of all 14 individuals, while for ISSR the matrix consisted of 1470 characters. These matrices were used to derive phylogenetic trees (phylograms) for RAPD and ISSR.

All individuals were different and there were no redundancies. The greatest genetic distance in the case of RAPD was 0.875, between *P. schiedeana* and *P. indica*, and the shortest was between *P. nubigena* and the possible hybrid *P. nubigena* x *P. americana*, with 0.511. For ISSR

distancia genética más lejana fue de 0.903 entre *P. gigantea* y *P. nubigena*, mientras que la menor distancia fue para el híbrido *P. nubigena* x *P. americana* y *P. americana* var. *drymifolia* ("Tochimilco") con una 0.604.

the greatest genetic distance was 0.903 between *P. gigantea* and *P. nubigena*, while the shortest was for the hybrid *P. nubigena* x *P. americana* and *P. americana* var. *drymifolia* ("Tochimilco") with 0.604.

**Cuadro 4. Genotipos de *Persea* y fragmentos únicos de ADN genómico detectados mediante RAPD e ISSR.**  
**Table 4. *Persea* Genotypes and unique fragments of genomic DNA detected by RAPD and ISSR.**

Nombre designado	Especie, raza o parentesco	Fragmentos únicos RAPD	Fragmentos únicos ISSR
Indica	<i>P. indica</i>	1	3
Canelillo	<i>P. cinerascens</i>	5	0
Gigantea	<i>P. gigantea</i>	3	0
Floccosa	<i>P. floccosa</i>	2	1
Nubigena 1/7	Posible híbrido <i>P. nubigena</i> x <i>P. americana</i>	2	2
Martín Grande c	Híbrido <i>P. schiedeana</i> x <i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	1	0
ScrMer7 S1	<i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	2	1
Rodeo 1	<i>P. nubigena</i>	2	1
CRM	<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	3	0
Olanca2 S3	<i>P. americana</i> var. <i>guatemalensis</i>	1	1
Tochimilco 1	<i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i>	2	1
Steyermarkii	<i>P. steyermarkii</i>	2	0
Lino	<i>P. schiedeana</i>	3	1
Lingue	<i>P. lingue</i>	5	2

Mediante RAPD los individuos formaron una marcada separación inicial que fue entre *P. indica* y el resto de los individuos, lo cual fue soportado por un alto valor de remuestreo (100%). La siguiente bifurcación fue de *P. lingue* con el restante de los individuos (Figura 3). La tercera bifurcación formó dos grupos que incluyeron a todo el subgénero *Persea*, con la excepción de *P. cinerascens*.

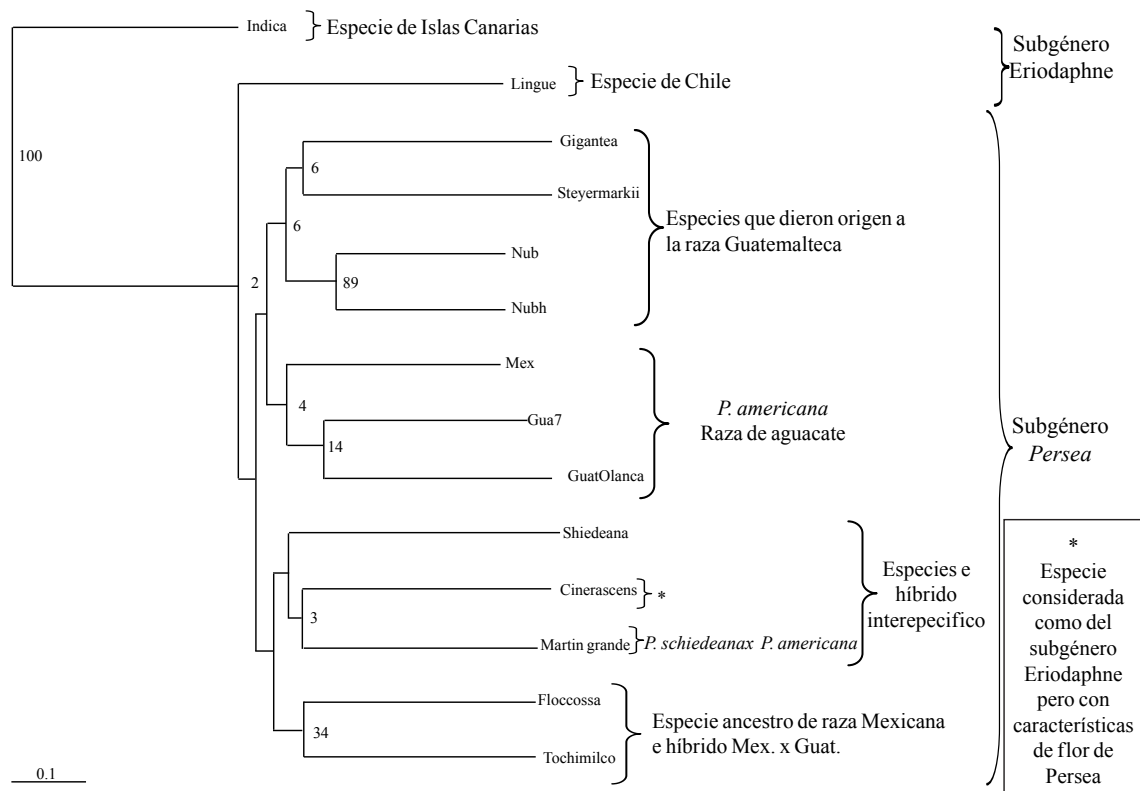
En el caso de RAPD la formación de un árbol filogenético resultó en separación y agrupación general conforme a la taxonomía indicada para el subgénero *Persea* (Williams, 1977) y parcial con la de todo el género *Persea* (Kopp, 1966). Donde fue marcada la separación de *P. indica*, especie de las Islas Canarias, España (Kopp, 1966) y que hasta hace unos años era la única *Persea* fuera de las Américas; sin embargo, se ha indicado la existencia de especies del género *Persea* en Asia designados dentro del subgénero *Machilus* (Chanderbali *et al.*, 2001). La separación clara de *P. indica* fue seguida por la de *P. lingue*, especie proveniente de Chile, por lo que la separación de estas dos primeras ramas del árbol incluyó a las dos especies del subgénero *Eriodaphne* del presente estudio, lo cual coincidió en otro estudio donde se dio la separación del subgénero *Persea* de *Eriodaphne* con secuencias ITS (Chanderbali *et al.*, 2001); sin embargo, en otro trabajo donde se consideró a 10 especies, tanto del

With RAPD, there was an initial separation between *P. indica* and the rest of the individuals, which was supported by a high bootstrap value (100%). The next bifurcation marked the separation between *P. lingue* and the rest of the individuals (Figure 3). The third branch formed two groups that included all the subgenus *Persea*, with the exception of *P. cinerascens*.

In the case of RAPD, the formation of a phylogenetic tree resulted in general separation and grouping according to the taxonomy indicated for the subgenus *Persea* (Williams, 1977), and partial separation and grouping with respect to the taxonomy of the whole genus *Persea* (Kopp, 1966). The marks the separation of *P. indica*, a species of the Canary Islands, Spain (Kopp, 1966), which until recently was the only *Persea* outside the Americas; however, indicated the existence of species of the genus *Persea* in Asia has been indicated, assigned to the subgenus *Machilus* (Chanderbali *et al.*, 2001). The clear separation of *P. indica* was followed by that of *P. lingue*, a species from Chile, so that the separation of these two first branches of the tree included the two species of the subgenus *Eriodaphne* of the present study, which coincided with another study where there was a separation of the subgenus *Persea* from *Eriodaphne* with ITS sequences (Chanderbali *et al.*, 2001). However, in another work where 10 species were considered, both of the subgenus *Persea* (six)

subgénero *Persea* (seis) y *Eriodaphne* (cuatro), así como las tres razas de aguacate, no se pudo separar los dos subgéneros con marcadores SSR (Mhameed *et al.*, 1997), pero si a *P. americana* del resto de las especies, y además dentro de *P. americana* se tuvo clara separación entre las razas.

and the subgenus *Eriodaphne* (four), as well as the three races of avocado, it was not possible to separate the two subgenera using SSR markers (Mhameed *et al.*, 1997), but *P. americana* could be separated from the rest of the species, and within *P. americana* a clear separation between the races was obtained.



**Figura 3. Filograma de 14 accesiones de *Persea* obtenido mediante RAPD, considerando un análisis estadístico combinado entre siete iniciadores, utilizando el índice Jaccard y el método Neighbor-joining con un remuestreo de 1 000 repeticiones (“bootstrap”).**

**Figure 3. Phylogram of 14 accessions of *Persea* obtained by RAPD, considering a combined statistical analysis of seven primers, using the Jaccard index and the Neighbor-joining method with a bootstrap of 1 000 replicates.**

En el presente estudio tres individuos de *Persea americana* se agruparon y se pudieron separar, con excepción de “Tochimilco” que se agrupó con *Persea floccosa*, especie que se piensa es ancestro de *Persea americana* var. *drymifolia* (Scora y Bergh, 1990).

“Tochimilco” se estudió anteriormente con AFLP y se encontró dentro de un grupo muy específico de aguacates de la raza Mexicana donde se formaron un total de siete grupos de la raza Mexicana con una gran variación genética. Cabe indicar que los posibles antecesores de la raza Guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*) como *P. nubigena* (Williams 1977), *P. gigantea* y *P. steyermarkii* (Schieber y Zentmyer 1977), se agruparon y se separan del mismo nodo

In this study, three individuals were of *Persea americana* were grouped and could be separated, with the exception of “Tochimilco”, which was grouped with *Persea floccosa*, a species thought to be the ancestor of *Persea americana* var. *drymifolia* (Scora and Bergh, 1990).

“Tochimilco” was previously studied with AFLP (Chao *et al.*, 1990) and was found to be within a very specific group of avocados of the Mexican race; a total of seven groups of the Mexican race were formed, with a great genetic variation. It is worth noting that the possible ancestors of the Guatemalan race (*P. americana* var. *guatemalensis*) such as *P. nubigena* (Williams 1977), *P. gigantea* and *P. steyermarkii* (Schieber and Zentmyer 1977), were grouped together and separated



donde se agrupó la raza Guatemalteca, referente a esto, se encontró mediante RFLP evidencia de que *P. nubigena* y *P. steyermarkii* pudieron dar origen a *P. americana* var. *guatemalensis* (raza Guatemalteca) (Furnier *et al.*, 1990), por lo que su cercanía concuerda con lo encontrado en el presente estudio.

La inclusión de *P. cinerascens* que es del subgénero *Eriodaphne* contrasta al agruparse con *P. schiedeana* y el híbrido interespecífico *P. schiedeana* x *P. americana* var. *guatemalensis*, *P. schiedeana* es la especie más distintiva del subgénero *Persea* y se ha encontrado que es altamente variable, donde probablemente existen razas dentro de *P. schiedeana* (Barrientos *et al.*, 1992) y por las evidencias encontradas con marcadores SSR donde se encontró alta variación en tres fuentes de *P. schiedeana* (Mhameed *et al.*, 1997). *P. cinerascens* tiene características intermedias entre los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* al igual que *P. pallida* y *P. rigens* (Kopp, 1966), como es la pubescencia en el pistilo que es característico del subgénero *Persea* y donde las especies del subgénero *Eriodaphne* no tienen pubescencia, de hecho se ha reportado la posible existencia de híbridos interespecíficos entre *P. cinerascens* y *P. americana* (García, 1973), por lo que es posible que comparta algunas características genéticas con *P. schiedeana*, ya que con los marcadores ISSR también se encontró una alta afinidad.

La separación de los individuos de acuerdo a la taxonomía clásica del aguacate, hasta el nivel de razas, ya había sido indicada con anterioridad, donde se pudieron separar con RAPD las tres razas (Fiedler *et al.* 1998) y la nueva posible raza Costaricensis (Ben-Ya'acov *et al.*, 1995), además que las mismas presentaron una distancia genética equidistantes, tal como ya lo había indicado anteriormente Bergh (1975) y de igual forma también con AFLP (Chao, 2003).

Es probable que esta separación conforme a la taxonomía se deba a que los marcadores moleculares de ADN genómico con base a RAPD usan iniciadores arbitrarios de oligonucleótidos de 10 bases y que toman al azar secuencias a lo largo de todo el genoma o sea muestreos al azar del mismo (Williams, 1990), lo cual no es el caso de otros marcadores moleculares de la categoría de anclados como los SSR (Zietkiewicz *et al.*, 1994), permitiendo a RAPD mostrar un aspecto general de similitudes.

En comparación con aloenzimas y microsátélites, existen algunas limitaciones y defectos de los RAPD, tales como marcadores de alelos dominantes y algunas veces baja

from the same node where the Guatemalan race was grouped; concerning this, RFLP allowed to find evidence that *P. nubigena* and *P. steyermarkii* could have been the origin of *P. americana* var. *guatemalensis* (Guatemalan race) (Furnier *et al.*, 1990), so their proximity agrees with the findings of the present study.

The inclusion of *P. cinerascens*, which belongs to the subgenus *Eriodaphne*, contrasts when grouped with *P. schiedeana* and the interspecific hybrid *P. schiedeana* x *P. americana* var. *guatemalensis*. *P. schiedeana* is the most distinctive species of the subgenus *Persea*, and it has been found to be highly variable; there are probably races within it (Barrientos *et al.*, 1992) and suggested by the evidence found with SSR markers which showed a high variation in three sources of *P. schiedeana* (Mhameed *et al.*, 1997). *P. cinerascens* has intermediate characteristics between the subgenera *Persea* and *Eriodaphne*, like *P. pallida* and *P. rigens* (Kopp, 1966); these characteristics include the pubescence of the pistil which is characteristic of the subgenus *Persea*. The species of the subgenus *Eriodaphne* do not show this pubescence; actually, it has been reported the possible existence of interspecific hybrids between *P. cinerascens* and *P. americana* (García, 1973), so it is possible that *P. cinerascens* shares some genetic features with *P. schiedeana*, given that a high affinity was also found with ISSR markers.

The separation of the individuals to the level of races, according to the classical taxonomy of avocado, was indicated previously, when it was possible to separate, with RAPD, the three races (Fiedler *et al.* 1998) and the new possible race Costaricensis (Ben-Ya'acov *et al.*, 1995); these races showed to be genetically equidistant to each other, as had been indicated by Bergh (1975), and similarly also with AFLP (Chao, 2003).

It is likely that this separation according to the taxonomy is due to the fact that genomic DNA molecular markers based on RAPD use arbitrary oligonucleotide primers of 10 bases, taking random sequences from the entire genome (i.e. random samplings) (Williams, 1990), which is not the case with anchored molecular markers such as the SSR markers (Zietkiewicz *et al.*, 1994). This random sampling allows RAPD to exhibit an overall outlook of similarities.

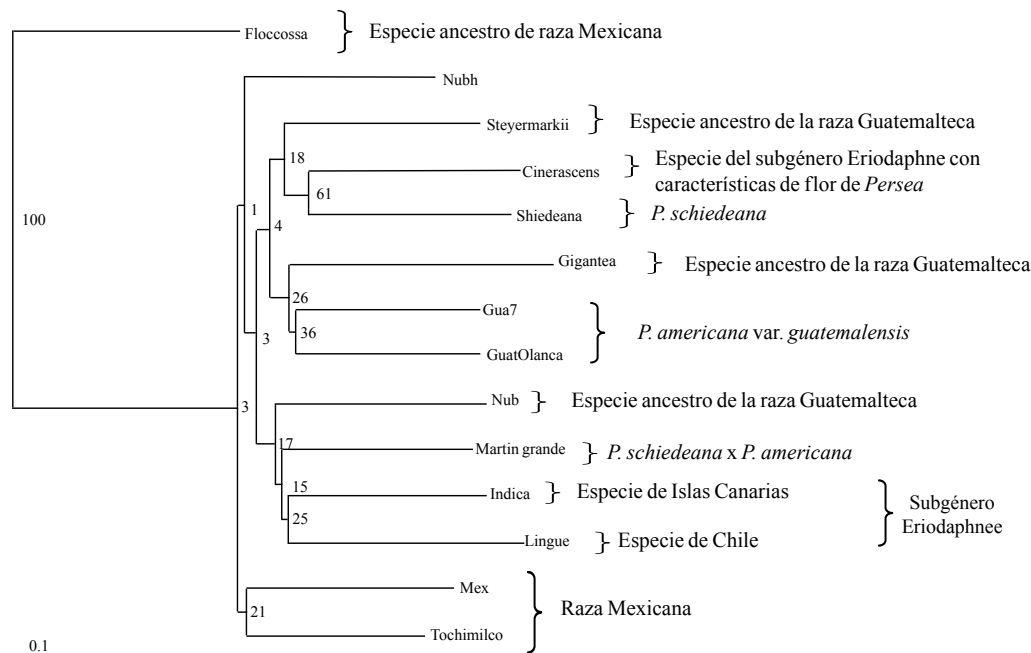
Compared with allozymes and microsattellites, RAPD has some limitations and shortcomings, such as dominant allele markers and sometimes low reproducibility, which may

reproductividad, lo cual pudo haber desalentado a muchos investigadores del uso de RAPD; sin embargo, sus ventajas pesan más que sus desventajas además de que se ha probado que al tener un buen control del perfil de temperatura en los tubos los fragmentos de RAPD son reproducibles (Penner *et al.*, 1993).

En el caso de ISSR los genotipos formaron una marcada separación inicial que fue entre *P. floccosa* y el resto de los individuos (Figura 4), lo cual estuvo sustentado por un alto valor de remuestreo (100%). La siguiente bifurcación fue de un grupo que abarcó dos individuos de *P. americana* var. *drymifolia* (raza Mexicana) y en otro grupo el restante de los individuos, incluyendo a los dos subgéneros.

have discouraged many researchers from using RAPD; however, its advantages outweigh its disadvantages (Sung and Wong, 2001), and it has been proven that, as it is possible to maintain good control of the temperature profile in the tubes, the RAPD fragments are reproducible (Penner *et al.*, 1993).

In the case of ISSR, the genotypes showed a pronounced initial separation between *P. floccosa* and the rest of the individuals (Figure 4), which was supported by a high bootstrap value (100%). The next bifurcation marks the separation between a group that included two individuals of *P. americana* var. *drymifolia* (Mexican race) and the rest of the individuals, including the two subgenera.



**Figura 4. Filograma de 14 accesiones de *Persea* obtenido mediante RAPD, considerando un análisis estadístico combinado entre cinco, utilizando el índice Jaccard y el método Neighbor-joining con un remuestreo de 1 000 repeticiones (“bootstrap”).**  
**Figure 4. Phylogram of 14 accessions of *Persea* obtained by RAPD, considering a combined statistical analysis between five of them, using the Jaccard index and the Neighbor-joining method with a bootstrap of 1 000 replicates.**

La separación con ISSR no fue como en RAPD, ya que no concordó con la taxonomía clásica de *Persea*. Sin embargo, si permitió diferenciar todos los genotipos. Los marcadores ISSR se piensa que son particularmente útiles para el estudio de individuos relativamente cercanos que exhiben bajos niveles de polimorfismo (Zietkiewicz *et al.*, 1994) y se han utilizado exitosamente como una buena alternativa para obtener la huella genética y análisis genético en especies frutales incluyendo a los cítricos (*Citrus* spp.) (Fang y Roose, 1997; Fang *et al.*, 1998), vid (*Vitis vinifera* L.) (Moreno *et al.*, 1998), grosella (*Ribes*

The separation with ISSR was not like the one with RAPD, as it did not agree with the classical taxonomy of *Persea*. However, it allowed to differentiate all the genotypes. ISSR markers are thought to be particularly useful for studying relatively close individuals exhibiting low levels of polymorphism (Zietkiewicz *et al.*, 1994); it has been successfully used as a good alternative for obtaining the genetic fingerprinting and the genetic analysis of fruit trees, including citrus (*Citrus* spp.) (Fang and Roose, 1997; Fang *et al.*, 1998), grapevine (*Vitis vinifera* L.) (Moreno *et al.*, 1998), currant (*Opuntia*

*grossularia*) (Lanham y Brennan, 1999) y ciruelo (*Prunus* sp.) (Goulão *et al.*, 2001) y nopal tunero (*Opuntia* spp.) (Luna-Páez *et al.*, 2007).

En el presente estudio, con ISSR se agruparon algunos individuos con características en común como a los dos individuos de la raza Mexicana, a los dos individuos de la raza Guatemalteca, y a *Persea lingue* y *Persea indica* del género *Eriodaphne* (Kopp, 1966). No así a *P. nubigena*, al posible híbrido *P. nubigena* x *P. americana*, *P. gigantea* y *P. steyermarkii*, que son especies que se sabe dieron origen a la raza Guatemalteca (Furnier *et al.*, 1990), donde se mostraron dispersos en cuadro ramificaciones diferentes. Algo parecido sucedió con *P. schiedeana* y el híbrido interespecífico *P. schiedeana* x *P. americana* var. *guatemalensis* (Ellstrand *et al.*, 1986), que también se ubicó en ramificaciones distintas, al igual que *P. cinerascens* y *P. floccosa*.

Al respecto es marcada la falta de afinidad entre las especies e híbridos tanto del subgénero *Persea* (con excepción de las razas de *P. americana*) como de *Eriodaphne*, lo anterior también se ha encontrado con marcadores SSR para especies diferentes a *P. americana* cuando se analizaron junto a esta última (Mhameed *et al.*, 1997), donde sí se pudo separar las tres razas de aguacate del resto de las especies.

En general los resultados indicaron que el género *Persea* es polifilético tal como se ha planteado (Chanderbali *et al.*, 2001), así como *P. americana* (Furnier *et al.*, 1990). Sin embargo, indudablemente se debe abarcar una buena cantidad de genotipos para un estudio futuro con el fin de confirmar lo encontrado.

Se concluye que tanto los marcadores basados en RAPD e ISSR fueron útiles para diferenciar los diferentes individuos de *Persea* estudiados. Sin embargo, los marcadores RAPD presentaron un amplio polimorfismo y permitió una agrupación congruente en general con la taxonomía.

## Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero a través del Proyecto clave 61 “Estudio de las relaciones genéticas entre especies del género *Persea* subgénero *Persea*” de la Red Aguacate del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura SNICS-SAGARPA del Gobierno Federal de México.

(Lanham and Brennan, 1999), plum (*Prunus* sp.) (Goulão *et al.*, 2001), and prickly pear (*Opuntia* spp.) (Luna-Páez *et al.*, 2007).

In the present study, some individuals with common characteristics were grouped with ISSR, such as two individuals of the Mexican race, two individuals of the Guatemalan race, and *Persea lingue* and *Persea indica*, of the genus *Eriodaphne* (Kopp, 1966). No groupings were made of *P. nubigena*, the possible hybrid *P. nubigena* x *P. americana*, *P. gigantea* and *P. steyermarkii*, which are species known to have originated the Guatemalan race (Furnier *et al.*, 1990), all of which were scattered among different branches. Something similar happened with *P. schiedeana* and the interspecific hybrid *P. schiedeana* x *P. americana* var. *guatemalensis* (Ellstrand *et al.*, 1986), which were also located in different branches, like *P. cinerascens* and *P. floccosa*.

In this regard, the lack of affinity between species and hybrids of both the subgenus *Persea* is very marked (excepting the races of *P. americana*) and *Eriodaphne*. This was found also for species other than *P. americana* when analyzing them together with SSR markers (Mhameed *et al.*, 1997); in this case it was possible to separate the three races of avocado from the other species.

In general, the results indicated that the genus *Persea* is polyphyletic, as has been proposed (Chanderbali *et al.*, 2001), and as is also the case with *P. americana* (Furnier *et al.*, 1990). However, these findings should undoubtedly be confirmed by studying a large amount of genotypes.

We conclude that markers based on both RAPD and ISSR were useful in differentiating the various *Persea* individuals studied. However, RAPD markers exhibited a wide polymorphism, allowing us to define groups congruent with the taxonomy.

*End of the English version*



## Literatura citada

- Ashworth, V. T. M. and Clegg, M. T. 2003. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): Genealogical relationships among cultivated avocado genotypes. *J. Heredity* 94:407-415.
- Barrientos-Priego, A. F.; Borys, M. W.; Escamilla-Prado, E.; Ben-Ya'acov, A.; De La Cruz-Torres, E. and López-López, L. 1992. A study of the avocado germplasm resources, 1988-1990. IV. Findings in the Mexican Gulf region. *Proceedings of the Second World Avocado Congress* I:551-558.

- Barrientos-Priego, A. F.; Muñoz-Pérez, R.; Borys, M. W. y Martínez-Damián, M. T. 2007. Taxonomía, cultivares y portainjertos. *In*: Téliz, D.; Mora, A. (Ed.). El aguacate y su manejo integrado. 2ª edición. Mundi-Prensa México, S. A. de C. V. México, D. F. 30-62 pp.
- Ben-Ya'acov, A.; Solís Molina, A. and Peri, E. 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. October 22-27. Tel Aviv, Israel. 109 pp.
- Bergh, B. O. 1975. Avocados. *In*: Janick, J.; Moore, J. N. (Ed.). Advances in fruit breeding. Purdue University Press. West Lafayette, USA. 541-567 pp.
- Campos, R.; Terrazas, E. T. and López-Mata, L. 2006. *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 Renner, S. S. 2001. Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. Annals of the Missouri Botanical Garden 88:104-134.
- Chao, T. 2003. Marcadores AFLP en aguacate (entrevista). University of California Riverside. Riverside, USA.
- Chao, C. T.; Barrientos-Priego, A. F.; Reyes-Alemán, J. C. and Devanand, P. S. 2003. Genetic relationships among accessions from California and Mexico characterized by AFLP markers. Word Avocado Congress V. Málaga, España. 208-209 pp.
- Davis, J.; Henderson, D.; Kobayashi, M.; Clegg, M. T. and Clegg, M. T. 1998. Genealogical relationships among cultivated avocado as revealed through RFLP analyses. J. Heredity 89:319-323.
- Demey, J. R.; Zambrano, A. Y. y Fuenmayor, F. 2003. Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. Interciencia 28(12):684-689.
- Ellstrand, N. C.; Lee, J. M.; Bergh, B. O.; Coffey, M. D. and Zentmyer, G. A. 1986. Isozymes confirm hybrid parentage for 'G755' selections. California Avocado Society Yearbook 70:99-203.
- Fang, D. Q.; Krueger, R. R. and Roose, M. L. 1998. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 123:612-617.
- Fang, D. Q. and Roose, M. L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theoretical and Applied Genetics 95:408-417.
- Fiedler, J.; Bufler, G. and Bangerth, F. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPDS markers. Euphytica 101:249-255.
- Furnier, G. R.; Cummings, M. P. and Clegg, M. T. 1990. Evolution of the avocados as related by DNA restriction fragment variation. J. Heredity 81:183-188.
- Gama, C. L. M. 1994. Studies on the systematic and ethobotany of the subgenus *Persea*. Ph.D. Thesis. University of California Riverside. Riverside, USA. 294 p.
- Goulão, L.; Monte-Corvo, L. and Oliveira, C. M. 2001. Phenetic characterization of cultivars of plum (*Prunus* sp.) by high multiplex ratio markers: amplified fragment length polymorphisms and inter-simple sequence repeats. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 126:72-77.
- Hapl, V.; Pavlíček, A. and Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. International J. Sys. Ev. Microbiol. 51:731-735. J
- Accard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin Société Vaudoise des Sciences Naturelles 44:223-270.
- 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.
- Lanham, P. G. and Brennan, R. M. 1999. Genetic characterization of gooseberry (*Ribes grossularia* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 74:361-366.
- Luna-Páez, A.; Valadez-Moctezuma, E.; Barrientos-Priego, A. F. and Gallegos-Vázquez, C. 2007. Caracterización de *Opuntia* spp. mediante semilla con marcadores moleculares RAPD e ISSR y su posible uso para diferenciación. Journal of the Professional Association for Cactus Development 9:43-59.
- Moreno, S.; Martín, J. P. and Ortiz, J. M. 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. Euphytica 101:117-125.
- Mhameed, S.; Sharon, D.; Kaufman, D.; Lahav, E.; Hillel, J.; Degani, C. and Lavi, U. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between species. Theoretical and Applied Genetics 94:279-286.
- Page, R. D. 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in Biosciences 12:357-358.
- Pavlíček, A.; Hradá, S. and Flegr, J. 1999. Free-Tree--freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. Folia Biológica 45:97-99.
- Penner, G. A.; Bush, A.; Wise, R.; Kim, W.; Domier, L.; Kasha, K.; Laroche, A.; Scoles, G.; Molnar, S. J. and Fedak, G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR Methods and Applications 2:341-345.
- Saghai-Maroo, M. A.; Soliman, K. M.; Jorgensen, R. A. and Allard, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics (ribosomal DNA spacer-length variation/restriction fragment-length polymorphisms/Rn1/Rn2). Proceedings of the National Academy of Science 81:8014-8018.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biol. Ev. 4:406-425.
- Schnell, R. J.; Brown, J. S.; Olano, C. T.; Power, E. J.; Krol, C. A.; Kuhn, D. N. and Motamayor, J. C. 2003. Evaluation of avocado germplasm using microsatellite markers. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 128:881-889.
- Scora, R. W. and Bergh, B. O. 1990. The origin and taxonomy of avocado (*Persea americana* Mill.). Lauraceae. Acta Hort. 275:387-394.
- Sun, M. and Wong, K. C. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. Am. J. Bot. 88:2180-2188.
- van der Werff, H. 2002. A synopsis of *Persea* (Lauraceae) in Central America. Novon 12:575-586.

Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, J. K.; Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 8:6531-6535.

Williams, L. O. 1977. The avocado, a synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Econ. Bot.* 31:315-320.

Whitkus, R.; de la Cruz, M.; Mota-Bravo, L. and Gómez-Pompa, A. 1998. Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. *Theoretical Appl. Genetics* 96:621-627.

Zietkiewicz, E.; Rafalski, A. and Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.