



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE COLECCIONES DE ALGODÓN (*Gossypium hirsutum* L.) DE LA REGIÓN CAÑADA DEL ESTADO DE OAXACA

Tesis

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta

HEBERT RÉGULES RIVERA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIO ESCOLARES
GRUPO DE EXAMENES PROFESIONALES

Bajo la supervisión de:

DR. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

Chapingo, Estado de México, enero de 2019



Instituto de Horticultura

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE COLECCIONES
DE ALGODÓN (*Gossypium hirsutum* L.) DE LA REGIÓN CAÑADA DEL
ESTADO DE OAXACA**

Tesis realizada por Hebert Régules Rivera, bajo la supervisión del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el
grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



DR. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

ASESOR:



DRA. MARÍA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

ASESOR:



DR. ALEANDRO F. BARRIENTOS PRIEGO

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
DEDICATORIAS	XI
AGRADECIMIENTOS	XII
RESUMEN GENERAL	XIII
GENERAL ABSTRACT	XIV
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Objetivo general.....	4
1.1.1 Objetivos específicos	4
1.2 Hipótesis General	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Origen del algodón	5
2.2. Aparición del género <i>Gossypium</i>	7
2.3. Diversidad genética	8
2.4. Descripción de <i>Gossypium hirsutum</i> L.....	9
2.4.1. Información taxonómica	9
2.4.2. Familia.....	10
2.4.3. Hojas	11
2.4.4. Flor	11
2.4.5. Biología floral	12
2.4.6. Fruto.....	12
2.4.7. Semilla	12

2.4.8.	Fibra	13
2.4.9.	Tipo de polinización.....	14
2.4.10.	Dispersión del tipo de polen.....	14
2.4.11.	Distancia de dispersión	14
2.4.12.	Porte	14
2.4.13.	Sistema radical	14
2.5.	Distribución de <i>Gossypium hirsutum</i> L.....	15
2.6.	Algodón en México	15
2.7.	Algodón en Oaxaca	16
2.8.	Producción de algodón	17
2.9.	Uso e importancia del algodón	18
2.10.	Marcadores moleculares	20
2.10.1.	Tipos de marcadores moleculares	21
2.11.	Reacción en cadena de la polimerasa.....	24
2.12.	Antecedentes sobre caracterización morfológica en el estudio del algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>).....	25
2.13.	Antecedentes sobre el uso de marcadores moleculares tipo ISSR-PCR en el estudio del algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>)	26
2.14.	Literatura citada.....	42
III.	CARACTERIZACIÓN MÓRFOLÓGICA DE GERMOPLASMA DE ALGODÓN (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) DE LA REGIÓN CAÑADA DEL ESTADO DE OAXACA	49
3.1.	RESUMEN.....	49
3.2.	ABSTRACT.....	50
3.3.	INTRODUCCIÓN.....	51
3.4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	52

3.4.1.	Localización del experimento	52
3.4.2.	Material vegetal	52
3.4.3.	Evaluación de descriptores	53
3.4.4.	Análisis de datos	54
3.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
3.5.1.	Análisis de valores estadísticos generales.....	56
3.5.2.	Análisis de correlación de caracteres.....	59
3.5.3.	Relaciones entre las poblaciones.....	60
3.5.4.	Análisis de componentes principales	66
3.5.5.	Comparación entre matrices	74
3.6.	CONCLUSIONES	77
3.7.	LITERATURA CITADA	77
IV.	ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE ALGODÓN (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES ISSR.....	79
4.1.	RESUMEN.....	79
4.2.	ABSTRACT.....	80
4.3.	INTRODUCCIÓN.....	81
4.4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
4.4.1.	Localización del experimento	84
4.4.2.	Material vegetal	84
4.4.3.	Extracción y purificación de ADN genómico.....	85
4.4.4.	Cantidad y calidad de ADN genómico.....	86
4.4.5.	Amplificación por PCR	87
4.4.6.	Electroforesis	89

4.4.7. Análisis de datos	90
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
4.5.1. Huella genética de las poblaciones	91
4.5.2. Comparación entre matrices	97
4.5.3. Análisis de diversidad genética	99
4.6. CONCLUSIONES	108
4.7. LITERATURA CITADA	108
V. DISCUSIÓN GENERAL	111
VI. CONCLUSIÓN GENERAL	115
VII. LITERATURA CITADA	115

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Jerarquía taxonómica del género <i>Gossypium</i>	10
Cuadro 2. Clasificación de las cuatro especies comerciales de algodón de acuerdo con la longitud de la fibra.	13
Cuadro 3. Sitios de colecta de material vegetal de algodón <i>Gossypium hirsutum</i> L.....	53
Cuadro 4. Valores estadísticos generales para las variables evaluadas en accesiones de algodón de la región Cañada Oaxaqueña.....	58
Cuadro 5. Coeficientes de correlación de las características de accesiones del algodón de la región Cañada Oaxaqueña.	60
Cuadro 6. Eigen valores de cuatro componentes principales según las variables morfológicas cualitativas de accesiones de algodón.....	66
Cuadro 7. Contribución de variables morfológicas cualitativas de accesiones de algodón, en sus primeros cuatro componentes principales.	66
Cuadro 8. Eigen valores de los componentes principales según las variables morfológicas cuantitativas de accesiones de algodón de la Cañada Oaxaqueña.	68
Cuadro 9. Contribución de variables morfológicas cuantitativas de accesiones de algodón de la Cañada Oaxaqueña a los primeros cuatro componentes principales.	69
Cuadro 10. Eigen valores de los componentes principales según las variables morfológicas cualitativas y cuantitativas de accesiones de algodón de la Cañada Oaxaqueña.	71
Cuadro 11. Contribución de variables morfológicas cualitativas y cuantitativas de accesiones de algodón de la Cañada Oaxaqueña a los primeros cuatro componentes principales.....	72
Cuadro 12. Sitios de colecta de material vegetal de algodón <i>Gossypium hirsutum</i> L.....	85
Cuadro 13. Nombre y secuencia de bases de los iniciadores utilizados en el análisis de huellas genéticas de accesiones de algodón de Oaxaca-Puebla.	88

Cuadro 14. Nombre y secuencia de los iniciadores utilizados en el análisis de diversidad genética.....	89
Cuadro 15. Nombre, secuencia, número de bandas polimórficas, número de bandas monomórficas, total de bandas y porcentaje de polimorfismo de 17 iniciadores ISSR utilizados en el análisis de materiales de algodón de la región Cañada Oaxaqueña.....	93
Cuadro 16. Matriz de similitud entre las poblaciones de algodón mediante el uso del coeficiente de similitud de DICE.	94
Cuadro 17. Nombre, secuencia, número de bandas polimórficas, número de bandas monomórficas, total de bandas y porcentaje de polimorfismo de nueve iniciadores ISSR utilizados en el análisis de diversidad genética de materiales de algodón de la región Cañada Oaxaqueña.....	100
Cuadro 18. Parámetros de diversidad genética evaluados en cinco poblaciones de <i>Gossypium hirsutum</i> L.	101
Cuadro 19. Distancia genética de Nei (bajo la diagonal) e Identidad Genética de Nei (sobre la diagonal) para cinco poblaciones de <i>Gossypium hirsutum</i> L. evaluadas.....	103
Cuadro 20. Valores promedio de parámetros de diversidad genética entre las poblaciones de algodón.	104
Cuadro 21. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para cinco poblaciones de <i>Gossypium hirsutum</i> L.	106

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Órganos de <i>Gossypium hirsutum</i> L.....	55
Figura 2. Dendrogramas generados usando datos de caracteres morfológicos.....	64
Figura 3. Dendrogramas generados usando datos de caracteres morfológicos de accesiones de algodón y el coeficiente de distancia taxonómica media (DIST).....	65
Figura 4. Componentes principales de variables morfológicas cualitativas evaluadas en materiales de algodón.....	67
Figura 5. Proyección de las poblaciones sobre los componentes principales de variables morfológicas cualitativas de algodón.....	68
Figura 6. Componentes principales de variables morfológicas cuantitativas evaluadas en materiales de algodón.	70
Figura 7. Proyección de las poblaciones sobre los componentes principales de variables morfológicas cuantitativas de algodón.....	71
Figura 8. Componentes principales de variables morfológicas cualitativas y cuantitativas evaluadas en materiales de algodón.	73
Figura 9. Componentes principales de variables morfológicas cualitativas y cuantitativas evaluadas en materiales de cinco poblaciones algodón.	74
Figura 10. Diagramas de correlación resultantes de la prueba de Mantel usando matrices generadas con el coeficiente de distancia taxonómica media (DIST).....	76
Figura 11. Amplificación ISSR de mezclas de ADN de 10 individuos correspondientes a las cinco poblaciones de algodón.....	91
Figura 12. Dendrograma de cinco poblaciones de algodón basado en marcadores moleculares ISSR, el coeficiente de similitud de DICE y el método de agrupamiento UPGMA.....	95
Figura 13. Análisis de Escalado Multidimensional.	96
Figura 14. Diagramas de correlación resultantes de la prueba de Mantel y basados en el coeficiente de distancia taxonómica media (DIST).	98

Figura 15. Amplificación ISSR de 10 individuos correspondientes a las 5 poblaciones de algodón.	99
Figura 16. Dendrograma basado en la Distancia Genética de Nei (1972), usando el método de agrupamiento UPGMA para cinco poblaciones de <i>Gossypium hirsutum</i> L.	103
Figura 17. Porcentajes de varianza molecular.	107
Figura 18. Gráfico de dos Coordenadas Principales para datos moleculares ISSR de cinco poblaciones de <i>Gossypium hirsutum</i> L..	108

DEDICATORIAS

A Dios, por la vida y la salud.

A mi madre, por su amor, paciencia y apoyo incondicional.

A mis hermanos, Velia, Casimiro†, Ignacio y Leonel, por animarme a luchar y cumplir mis sueños.

A mis amigos de la maestría, Leticia Reyes Márquez, Edgar Francisco Vidal Siles y Adriana Herrero Galindo por los buenos y malos momentos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Fitotecnia por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Juan Porfirio Legaria Solano por toda la paciencia, dirección y apoyo para realizar el presente trabajo.

Al Dr. Alejandro F. Barrientos Priego y Dra. María del Rosario García Mateos, por sus observaciones y sugerencias para realizar la investigación.

A las autoridades de las diferentes localidades por el permiso otorgado para coleccionar el material vegetal usado en la presente investigación.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE COLECCIONES DE ALGODÓN (*Gossypium hirsutum* L.) DE LA REGIÓN CAÑADA DEL ESTADO DE OAXACA

RESUMEN GENERAL

El algodón es un producto comercial importante por sus usos diversos en la industria agroalimentaria, siendo ampliamente cultivado en todo el mundo. México es considerado centro de origen y de diversidad genética de *Gossypium hirsutum* L., y representa un recurso fitogenético vegetal con un alto valor real y potencial para su inclusión en programas de mejoramiento genético. El primer paso en esta dirección es el estudio de la disponibilidad de variabilidad genética dentro de la especie. Es por ello, que considerando los escasos estudios sobre diversidad y variabilidad genética existentes en el país, se propuso un estudio exploratorio sobre la caracterización morfológica y molecular de *Gossypium* en la región “Cañada” del estado de Oaxaca, aún sin explorar. Para el presente estudio, se consideraron cinco poblaciones con 10 materiales colectados por cada una. Trece variables morfológicas fueron evaluadas. Mientras que para el análisis molecular se evaluaron 17 y 9 iniciadores ISSR, para la determinación de huellas genéticas y el análisis de diversidad, respectivamente. Los resultados indicaron que existió una moderada variabilidad morfológica, destacando la presencia de dos colores de fibra, blanca y café. Los 17 iniciadores utilizados en el análisis de huellas genéticas, amplificaron un total de 80 bandas, de las cuales 41 fueron monomórficas y 39 fueron polimórficas, lo que permitió revelar un 50.04 % promedio de polimorfismo. En el análisis de diversidad genética dentro de poblaciones se encontró un porcentaje de *loci* polimórficos de 78 %, diversidad de Nei de 0.30 e Índice de Shannon de 0.44. El análisis AMOVA determinó que el 92 % de la variación genética se distribuyó dentro de las poblaciones y el resto (8 %) entre ellas. Se obtuvo un valor de diferenciación genética entre las poblaciones G_{ST} de 0.17 y un valor de individuos migrantes por generación N_m de 2.4.

Palabras clave: *Gossypium hirsutum* L., recursos fitogenéticos, iniciadores, polimorfismo, diversidad genética.

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF COTTON COLLECTIONS (*Gossypium hirsutum* L.) FROM THE CAÑADA REGION OF THE STATE OF OAXACA

GENERAL ABSTRACT

Cotton is an important commercial product due to its different uses in the agri-food industry, being widely cultivated throughout the world. Mexico is a center of origin and genetic diversity of *Gossypium hirsutum* L., and represents a vegetal phylogenetic resource with a high real value and potential for its inclusion in breeding programs. The first step in this direction is the study of the availability of the variability in this species. For this reason, a study on the morphological and molecular characterization of *Gossypium hirsutum* in the “Cañada” region of the state of Oaxaca, still unexplored, was proposed. For the present study, five populations with 10 materials collected from each one were considered. Thirteen morphological variables were evaluated. While for the molecular analysis 17 and 9 ISSR primers were evaluated, for determining the genetic fingerprints and diversity analysis, respectively. The results showed that there was a moderate morphological variability highlighting the presence of two colors of fiber, white and brown. The 17 primers used in the analysis of genetic fingerprints amplified a total of 80 bands, of which 41 were monomorphic and 39 were polymorphic, which revealed a polymorphism average of 50.04 %. In the analysis of the genetic diversity within the populations, it was found a polymorphic *loci* percentage of 78 %, the Nei diversity of 0.30 and the Shannon Index of 0.44. The AMOVA analysis determined that 92 % of the genetic variation was distributed within the populations and the rest (8 %) among them. A G_{ST} value of 0.17 and an N_m value of 2.4 was obtained.

Key words: *Gossypium hirsutum* L., phylogenetic resources, primers, polymorphism, genetic diversity.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El conocimiento de la biodiversidad de México es aún incompleto (Luna, Castañón & Raz, 2011). Los inventarios obtenidos de las colecciones conformadas de la biota mexicana constituyen una parte imprescindible de las actividades y los programas de conservación nacional. Además, con una perspectiva clara de la riqueza biológica de nuestro territorio se podrá identificar lo que se está perdiendo como resultado de las alteraciones ambientales que el hombre ha generado en las últimas décadas; cambio climático, apertura de áreas para siembra de cultivos y la presencia de incendios, entre otros (Zamorano, 2009; Luna *et al.*, 2011; Sarukhán, Carabias, Koleff & Urquiza, 2012).

La evaluación, preservación y conocimiento de la variabilidad genética de las especies son actividades estratégicas que deben ser incluidas en los planes de desarrollo agrícola, ya que representan un recurso natural de riesgo continuo. En los casos de las especies vegetales, de las cuales México es centro de origen, estas actividades requieren atención especial. Cabe resaltar que estos recursos genéticos vegetales tienen un valor real y potencial para la agricultura, la industria y la alimentación de la población mundial (Pérez *et al.*, 2011).

En este contexto, México es considerado centro de origen y de diversidad genética de *Gossypium hirsutum* L., siendo ampliamente cultivado en todo el mundo. Se trata de uno de los cultivos que más se producen en el país. Además, el algodón es reconocido ampliamente debido a su uso extensivo en la

industria textil (Hinze *et al.*, 2017) por su buena calidad de fibra, así como por ser una buena fuente de aceite de cocina y alimento para el ganado. Se le conoce por varios nombres comunes: acala, algodón upland, algodón de fibra corta, algodón mocó y algodón cambodia (Ulloa *et al.*, 2006).

En el territorio nacional se han encontrado varias especies silvestres del género *Gossypium*, de las cuales 11 son diploides y una tetraploide (*Gossypium hirsutum*) (Ulloa *et al.*, 2006; Feng, Ulloa, Pérez & Stewart, 2011). Todas las razas de *G. hirsutum* han sido y son, la fuente primaria de germoplasma con un amplio reservorio genético para su explotación. Para el desarrollo de la producción algodонера mundial, México representa una referencia necesaria (Vavílov, 1930).

La búsqueda de razas primitivas, cultivadas y formas silvestres iniciales en las regiones montañosas del sur de México y las montañas de Guatemala pueden aportar materiales valiosos para la agricultura. La presencia de algodones locales Upland primitivos en el sur de México, es muy diversa. Vavilov da cuenta de ello refiriendo colores de fibra diferentes, hojas pubescentes o glabras, corola amarilla o crema, distintas formas de hojas, de alta producción de fibra, considerablemente precoces, y otros (Vavílov, 1930).

Aunque estas especies silvestres siguen siendo un recurso genético, en gran parte sin explotar, abundan ejemplos de su inclusión productiva en programas de mejoramiento genético, los cuales dependen en gran parte de la disponibilidad de la variabilidad de este género. Una mayor utilización de los muchos parientes silvestres de los algodones cultivados requiere primero que entendamos su biología y sus relaciones. Esta comprensión surge de una combinación de exploración básica de plantas, investigaciones taxonómicas detalladas y estudios filogenéticos diseñados para incorporar lo que se conoce sobre la biología de las especies en una perspectiva evolutiva (Godoy, García & Manjarrez, 2002; Wendel, Brubaker & Seelanan, 2010). Esta diversidad

genética permanece *in situ* y se encuentra limitada a plantas que crecen de manera casual en áreas de poco uso o como plantas de jardín en casas ubicadas en las comunidades rurales (Godoy *et al.*, 2002). Sin embargo, son pocas las personas que las toleran o fomentan en sus patios y jardines usándolas principalmente como plantas de ornato y medicinales. Aunque la gente tolera la presencia de las plantas por considerarlas de ornato, no dudan en eliminarlas cuando se requiere espacio para otras actividades o especies ornamentales.

La importancia que tiene México a nivel mundial como centro de origen y diversidad del algodón es de gran relevancia; sin embargo, las investigaciones y trabajos en materia de recursos genéticos de algodón han sido limitadas por diversos factores, como la falta de recursos humanos y financieros para explorar, recolectar y utilizar la diversidad existente de algodón en el país (Pérez *et al.*, 2011).

En México, el estado de Oaxaca es una de las 27 entidades en las que se encuentra el mayor número de especies silvestres del género *Gossypium* distribuidas en sitios específicos (Báez, 2015). Además, la Cañada oaxaqueña, es una región localizada dentro del polígono de la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán (RBTC) (UMAFOR, 2010), la cual ofrece una extraordinaria diversidad, y ha sido reconocida como un sitio de especial importancia en términos biológicos. Hasta antes del presente estudio, no se disponía de estudios biológicos sobre *Gossypium* en tal región de Oaxaca.

Considerando los escasos estudios sobre diversidad y variabilidad genética existentes en el país; y sobre todo la limitada información y trabajos disponibles enfocados a la recolección y caracterización de *Gossypium* en el estado de Oaxaca, no obstante que allí se concentra la mayor cantidad de especies silvestres y semi-domesticadas de algodón (Pérez *et al.*, 2011) y con presencia

en varias regiones, se propuso un estudio exploratorio para la caracterización morfológica y molecular de *Gossypium* en la región Cañada, aún sin explorar.

1.1 Objetivo general

Caracterizar morfológica y molecularmente accesiones de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) recolectados en la región de la Cañada del estado de Oaxaca, con la finalidad de documentar apropiadamente la variabilidad genética y morfológica de ese recurso natural.

1.1.1 Objetivos específicos

Describir la morfología de accesiones de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) de la región de la Cañada de Oaxaca con base en descriptores UPOV o botánicos y así contribuir al conocimiento de la biología de este taxón, mismas que se colectarán *in situ*.

Describir molecularmente mediante marcadores tipo ISSR la variabilidad intra e inter poblacional de accesiones de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) colectadas *in situ*, a fin de conocer la diversidad genética presente en materiales de la región de la Cañada de Oaxaca.

1.2 Hipótesis General

Existe una alta variabilidad morfológica y molecular de *Gossypium hirsutum* L. dentro las poblaciones presentes en la región Cañada del Estado de Oaxaca debido a las características ambientales y factores ecológicos de la misma.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen del algodón

El origen de los algodones poliploides, sigue siendo objeto de especulación. ¿Cómo y dónde ocurrió la poliploidización y cuáles fueron las especies parentales?; estas preguntas están aún por esclarecerse. Sin embargo, existen algunas evidencias de investigaciones moleculares y citogenéticas que se han publicado recientemente y que pretenden darles respuesta (León, 2000).

En este contexto, el género *Gossypium* tiene una larga historia de estudio taxonómico y evolutivo. Una notable diversificación morfológica propició la distribución global de *Gossypium* en respuesta a las demandas de determinados ambientes ecológicos y ambientes selectivos (Wendel *et al.*, 2010).

Una consecuencia notable de esta expansión global y de la diversificación natural ha sido que proporcionó la oportunidad a diferentes culturas humanas antiguas, en varios continentes, de domesticar independientemente cuatro especies diferentes de algodón: dos alopoliploides de las Américas, *G. hirsutum* L. y *G. barbadense* L. y dos diploides de África-Asia, *G. arboreum* L. y *G. herbaceum* L. Este antecedente, implica sucesos múltiples de hibridación aparentemente imposibles, a menudo entre linajes que actualmente están separados geográficamente o incluso en diferentes continentes, así como múltiples casos transoceánicos, dispersiones a larga distancia. Estos sucesos han permitido la diversidad del género y colonizado en gran parte, las regiones áridas y semiáridas de los trópicos y subtropicos (Wendel & Grover, 2015).

Las especies americanas cultivadas son tetraploides, AADD. El genomio A se encuentra también en los algodones del Viejo Mundo. El genomio D es común en todos los algodones silvestres del Nuevo Mundo. La explicación más corriente asume que un antecesor africano portador del genomio A, llegó a la costa de América del Sur y formó con una especie local, el antecesor de los algodones poliploides. Esto tiene soporte en el descubrimiento reciente de un algodón silvestre tetraploide, *G. mustelinum* Miers ex G. Watt, en el noreste de Brasil. La especie silvestre diploide más cercana geográficamente es *G. raimondii* Ulbrich, de la costa de Perú (León, 2000).

Existe otra teoría alternativa. El taxón africano con el genomio A pudo expandirse por Asia y sus semillas llegar a América en una dispersión transpacífica. Al llegar a Mesoamérica se encontraría con varias especies diploides en el noroeste de México, y sería en Mesoamérica en donde se formaría el antecesor común de *G. barbadense* L., y *G. hirsutum* L. De cualquier forma, el antecesor se expandió rápida y ampliamente, de México a Brasil. *G. barbadense* L., se domesticó en el noroeste de América del Sur, y de allí se extendió por las Antillas y el resto de América del Sur. *G. hirsutum* L., tiene poblaciones silvestres muy variables en Mesoamérica y las Antillas (León, 2000).

La evidencia arqueológica está limitada a regiones secas; en México hay restos de *G. hirsutum* L., de 5500 años; de esta misma edad, hay restos de *G. barbadense* L. en Perú y Chile. En Asia, la edad de muestras arqueológicas más antiguas es de 4000 años para *G. arboreum* L., en el valle de Hindus (León, 2000).

2.2. Aparición del género *Gossypium*

El género de algodón pertenece a *Gossypieae*, una pequeña tribu taxonómica que incluye sólo nueve géneros, ocho de los cuales son clásicamente reconocidos y uno que es un nuevo segregado de *Cienfuegosia* (Phuphathanaphong, 2006). Cinco de estos géneros son pequeños con distribuciones geográficas restringidas (Fryxell, 1968, 1979, Phuphathanaphong, 2006) incluyendo *Lebronnecia* (Islas Marquesas), *Cephalohibiscus* (Nueva Guinea, Islas Salomón), *Gossypoides* (África Oriental, Madagascar), *Thepparatia* (norte de Tailandia) y *Kokia* (Hawai). La tribu incluye también cuatro géneros de tamaño moderado con rangos geográficos más amplios: *Hampea* (21 especies neotropicales), la relativamente diversa *Cienfuegosia* (25 especies de los neotrópicos y partes de África), *Thespesia* (17 especies tropicales) y *Gossypium*, cuyas especies (59 reconocidas) lo convierten en el género más grande y más ampliamente distribuido en la tribu. Por lo tanto, en conjunto esta pequeña tribu taxonómica ha alcanzado un amplio rango geográfico, aunque muchos de los taxones incluidos son bastante raros y/o estrechamente distribuidos.

Los análisis filogenéticos moleculares han arrojado a la luz tres aspectos importantes de la historia evolutiva de la tribu (Seelanan, Schnabel & Wendel, 1997; Cronn, Small, Haselkorn & Wendel, 2002). El primero y más importante es que a pesar de su amplia distribución y extraordinaria diversidad, el grupo de especies que pertenecen a *Gossypium* constituyen un solo linaje natural. Un segundo reporte importante ha sido la identidad de los parientes más cercanos de *Gossypium*, es decir, el género Africano-Madagascar *Gossypoides* y el género endémico hawaiano *Kokia*. Se trata de un hallazgo dudoso, dada su biogeografía y su menor número de cromosomas ($n= 12$), pero es muy importante por el hecho de que pueden servir como base en los análisis filogenéticos, lo que proporciona un contexto esencial tanto para estudiar patrones evolutivos y procesos dentro de *Gossypium*, como para la

comprensión de la evolución del genoma. La tercera visión importante obtenida de estos análisis moleculares fue la provisión de un componente temporal a las principales divergencias. Utilizando datos de divergencia de secuencias como aproximaciones del tiempo transcurrido (un “proxy” para el tiempo, es decir, un “reloj molecular”), Seelanan *et al.* (1997) sugirieron que *Gossypium* divergía de *Kokia* y *Gossypoides* alrededor de 12.5 mya, una estimación reforzada por un conjunto de datos más extenso y posterior, generados por un estudio realizado por Cronn *et al.* (2002), que incluyó 10 genes nucleares diferentes. Colectivamente, todos los datos moleculares sugieren que *Gossypium* divergió de sus parientes más cercanos hace aproximadamente 10-15 millones de años durante el Mioceno y adquirió su distribución mundial moderna por múltiples dispersiones transoceánicas combinadas con especies regionales. León (2000) mencionó que los poliploides tuvieron antecesores comunes y se formaron sólo una vez, posiblemente durante el Pleistoceno, hace 1-2 millones de años.

2.3. Diversidad genética

En el mundo existe una gran diversidad genética de especies silvestres de algodón. Actualmente, 363 especies del género *Gossypium* han sido registradas, de las cuales 59 han sido aceptadas, 292 son sinónimos y 12 hay sin resolver (The Plant List, 2013). Sólo cuatro de ellas se cultivan. De estas cuatro especies, *G. arboreum* L. y *G. herbaceum* L., son diploides ($2n= 26$) y se denominan algodón del Viejo Mundo (África y Asia), mientras que las otras dos especies *G. hirsutum* L., y *G. barbadense* L., son tetraploides ($2n= 52$) y son conocidas como algodón del Nuevo Mundo (América) (Arijit & Nag, 2015). Todas son perennes, pero en el cultivo se han desarrollado tipos anuales que son los que suplen la producción comercial. *G. hirsutum* y *G. barbadense* son las principales especies de algodón cultivado actualmente, representando el 90 % y 5 % de la producción mundial, respectivamente (León, 2000; Arijit & Nag, 2015). Se tratan como las especies centrales y las otras son referidas comparativamente a ellas.

Las poblaciones espontáneas de *G. hirsutum* han sido clasificadas en 'razas':

- a) '*Marie Galante*', perenne y de porte alto, de las Antillas y parte de América del Sur.
- b) *Punctatum*, perenne, porte mediano, del sur de México y Florida.
- c) *Yucatanense*.
- d) *Latifolium*, anual, de México y Guatemala.
- e) *Morilli*.
- f) *Palmeri*, de México.

Cabe mencionar que la raza nativa silvestre conocida como *Yucatanense* (Prado *et al.*, 1978), es la única verdadera forma silvestre de *Gossypium hirsutum* L., y; probablemente, es la forma ancestral a partir de la cual fue domesticado el algodón (Brubaker & Wendel, 1994; Ulloa *et al.*, 2006; CONABIO, 2012). Cientos de años después, aparecieron nuevas razas regionales al sur y al oeste de su centro de origen en México.

2.4. Descripción de *Gossypium hirsutum* L.

2.4.1. Información taxonómica

En el Cuadro 1 se proporciona la información taxonómica de *Gossypium hirsutum* L., desde reino a especie.

Cuadro 1. Jerarquía taxonómica del género *Gossypium*.

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Streptophyta

Superdivisión: Embryophyta

División: Tracheophyta

Subdivisión: Spermatophytina

Clase: Magnoliopsida

Superorden: Rosanae

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae

Tribu: Gossypieae

Género: *Gossypium* L.

Especie: *Gossypium hirsutum* L.

Fuente: ITIS, 2017.

2.4.2. Familia

El algodón es una especie vegetal que pertenece a la familia de las Malváceas, las cuales son plantas arbustivas o herbáceas, con hoja de nervadura palmeada y flores con uno o más involucros. El cáliz y la corola constan generalmente de cinco partes. El carácter más típico de la familia es la agrupación de los estambres en una columna, por cuyo centro pasa el pistilo. Se distinguen por la riqueza de fibras en el floema del tallo (kenaf) o en las semillas (algodón); por la presencia de canales de mucílago en las partes vegetativas y reproductivas, y por el indumento sobre el tallo y hojas formado por pelos estrellados. Se les utiliza por las fibras: algodón, kenaf, aramina, rosella; y otros, por los frutos comestibles: okra, rosella. Hay muchas especies ornamentales de valor económico, como los *Hibiscus* (León, 2000).

2.4.3. Hojas

Las hojas presentan una gran variedad de formas, aun en la misma planta. La lámina se divide en tres a nueve lóbulos, por lo común tres a cinco; la pubescencia es extremadamente variable. Las hojas tienen en la base del peciolo dos estípulas finas. El peciolo es largo, de tres a seis centímetros, cilíndrico y pubescente, y se prolonga en la base de la lámina en dos a nueve venas principales (venas palmeada); en cada uno de éstos, cerca de la inserción del peciolo, hay uno o más nectarios, cavidades muy pequeñas, lisas o con pelos estrellados o sencillos. La epidermis inferior es de superficie más irregular y contiene más estomas que la superior (León, 2000).

2.4.4. Flor

La flor está envuelta en el botón por un involucre formado por tres brácteas verdes y triangulares, profundamente recortadas. Estas brácteas son permanentes y rodean por algún tiempo al fruto en desarrollo, constituyendo un obstáculo para la recolección de la fibra; por lo común dos de ellas son iguales y la tercera menor. Dentro de las brácteas en muchos cultivares se encuentran otros dos o tres órganos similares aunque mucho más pequeños, las bractéolas. El cáliz es tubular, con cinco dientes cortos; en su parte exterior tiene tres nectarios y en la pared externa hay filas de glándulas, de color más claro. Hacia el interior, entre el cáliz y la corola, se hallan varias estructuras finas, a manera de otro cáliz, constituidas por dientes agudos. Los cinco pétalos están unidos sólo por la base y son delgados y suaves, de color blancuzco a amarillo. Los estambres se unen formando la columna estaminal, que lleva de 100 a 150 estambres. Los filamentos son finos, de longitud diferente, poco compactos y terminan en anteras redondas bilobuladas. El pistilo está constituido por un ovario con dos a seis carpelos y se prolonga dentro de la columna estaminal, sobresaliendo de ella y dividiéndose en varias ramas estigmáticas (León, 2000).

2.4.5. Biología floral

Las flores del algodón duran un día; al abrirse en la mañana ya hay suficiente polen suelto en los estigmas para producir la autofecundación; la flor se cierra por la tarde y la corola se desprende tres días después. A pesar de la gran cantidad de polen producido por una flor, los insectos que la visitan activamente pueden traer polen de otras flores y la fertilización cruzada ocurre en bajo porcentaje (León, 2000).

2.4.6. Fruto

El fruto es una cápsula ovoide de superficie lisa y verde oscura, cubierta por las brácteas, con tres a cinco celdas que contienen de 5 a 10 semillas cada una. La cápsula tarda unos 50 días en madurar, crece rápidamente y alcanza su tamaño normal tres semanas después de su fertilización (León, 2000).

2.4.7. Semilla

La semilla del algodón contiene de 15 a 20 % de proteínas y hasta 20 % de aceite; es por lo tanto un subproducto de gran valor económico en la alimentación y la industria. Un obstáculo para su uso es la presencia de una sustancia venenosa, el gósipol, en los tegumentos, la que debe ser eliminada antes de que la semilla sea usada en la alimentación; la torta constituye un excelente alimento para el ganado (León, 2000).

La semilla se compone de la testa, dos grandes cotiledones y un embrión pequeño y piriforme. La testa incluye primero la epidermis, luego una capa externa de pigmentos, una gruesa capa de empalizada y otra capa externa de pigmentos. De la epidermis se desarrollan las fibras, de dos clases: las primeras largas y delgadas, de 1.5 a 6 centímetros de longitud, pueden ser tejidas o

hiladas; mientras que las segundas, más cortas y adheridas a la semilla, constituyen lo que se llama borra o pelusa (León, 2000).

2.4.8. Fibra

G. hirsutum, *G. barbadense*, *G. arboreum* y *G. herbaceum*, son las cuatro especies del género *Gossypium* de mayor importancia. Se diferencian de sus congéneres silvestres por tener fibras en la superficie de la semilla, que pueden ser hiladas y elaboradas en tejidos. Se distinguen por la longitud de sus fibras (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación de las cuatro especies comerciales de algodón de acuerdo con la longitud de la fibra.

Longitud de la fibra	Especie
Extra larga (más de 3.5 cm)	<i>G. barbadense</i>
Mediana a larga (2.5 a 3.5 cm)	<i>G. hirsutum</i>
Cortas (menos de 2.2 cm)	<i>G. arboreum</i> y <i>G. herbaceum</i>

Fuente: León, 2000.

Las fibras grandes inician su crecimiento como prolongaciones de las células epidérmicas al momento de abrirse la flor, mientras que las que forman la borra lo hacen cuatro o seis días después. Las fibras comienzan como protuberancias redondeadas que se van estirando hasta formar un cilindro de paredes muy delgadas que a los 20 días ha alcanzado su longitud máxima. Es común que éstas fibras tengan una longitud 300 veces mayor que su diámetro. Las condiciones ambientales, especialmente el agua disponible, afectan profundamente la elongación de las fibras, pero son los factores genéticos varietales los que determinan principalmente sus características (León, 2000).

2.4.9. Tipo de polinización

Polinización cruzada. El índice de los visitantes en las flores de algodón favorece o sobrestima la polinización cruzada y los nectarios son el blanco para los visitantes, por tanto es una atracción olfatoria. Si no existieran los polinizadores adecuados, entonces se lleva a cabo la autopolinización (León, 200).

2.4.10. Dispersión del tipo de polen

La dispersión es por insectos (vectores entomófilos). La dispersión no es por viento, ya que los granos de polen son pesados y están cubiertos de un material viscoso que los adhiere entre sí (León, 200).

2.4.11. Distancia de dispersión

La dispersión o viabilidad del polen decrece rápidamente después de los 12 metros. Por tanto, la distribución del polen también decrece con el incremento de la distancia (León, 200).

2.4.12. Porte

Los algodones silvestres que crecen cerca de los trópicos son perennes y alcanzan hasta seis metros de alto, con porte irregular; los tipos cultivados, en cambio, son anuales, bajos y de diferente arquitectura según el cultivar (León, 2000).

2.4.13. Sistema radical

En el algodón hay una raíz principal que crece en sentido vertical y que una vez que ha alcanzado niveles profundos se ramifica intensamente. Las raíces de

segundo orden aparecen en cuatro filas verticales, no siempre bien definidas, que corresponden a los cuatro rebordes del cilindro central. En las plantas jóvenes la raíz principal tiene una longitud hasta diez veces mayor que el tallo aéreo. La ramificación abundante de las raíces es característica de todas las especies del género *Gossypium*, que por lo común son originarias de sitios secos (León, 2000).

2.5. Distribución de *Gossypium hirsutum* L.

México es centro de origen y de diversidad genética de *Gossypium hirsutum*. Esta especie es ampliamente cultivada en el mundo (Brubaker & Wendel, 1994; CONABIO, 2012).

2.6. Algodón en México

En el territorio nacional se han encontrado varias especies silvestres del género *Gossypium*. Once de las 13 especies de este género en el hemisferio occidental son endémicas de nuestro país, las cuales tienen relevancia cultural, económica y biológica en el mundo. De ellas, 11 son diploides (*G. armourianum*, *G. lobatum*, *G. gossypoides*, *G. aridum*, *G. laxum*, *G. shwendimanii*, *G. thurberi*, *G. trilobum*, *G. davisonii*, *G. turneri* y *G. harknesii*) y una tetraploide (*Gossypium hirsutum*) (Ulloa *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2011; Pérez, Tovar, Obispo, Legorreta & Ruiz, 2016). Cabe resaltar, que hasta el momento se han recolectado 10 especies, lo que representa el 77 % de la diversidad. Además, se han recolectado 1,190 accesiones (601 como silvestres, 442 semidomesticadas y 147 como cultivadas) abarcando 24 estados de la república (SNICS, 2017), y se mantienen resguardadas en seis Centros de Conservación de Semillas Ortodoxas.

Todas esas razas de *G. hirsutum* son y han sido, la fuente primaria de germoplasma con un amplio reservorio genético para su explotación. Como es de entenderse, para el desarrollo de la producción aldononera mundial, México representa una referencia necesaria (Vavílov, 1994).

2.7. Algodón en Oaxaca

Oaxaca es una de las 27 entidades mexicanas en las que se encuentra el mayor número de especies silvestres del género *Gossypium* (Báez, 2015). Aunque el algodón se encuentra distribuido por varios estados del país, o dentro de lo que es considerado como Mesoamérica, en Oaxaca se han determinado sitios específicos donde se distribuyen diferentes especies de algodón: *Gossypium gossypinoides* y *Gossypium aridum* en la región del Istmo de Tehuantepec; *Gossypium hirsutum* de fibra de color café principalmente en la Costa; *Gossypium barbadense* en la Sierra Sur; y en varias comunidades el algodón de fibra blanca (Báez, 2015).

Cabe destacar que Oaxaca es el único estado de la República Mexicana que utiliza el germoplasma nativo del algodón “Coyuche” para la elaboración de artesanías textiles. Desde el año 2012, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) realiza trabajos en conjunto con algunas comunidades del Estado de Oaxaca donde crece el algodón “Coyuche” para identificar qué fibras y características agronómicas de productividad son mejores para la confección de artesanías (Báez, 2015). Como resultado han identificado tres materiales sobresalientes de la raza *latifolium*, uno de la raza *morrilli* y uno de la raza *palmerii*, todas de la especie *G. hirsutum*, los cuales presentaron diferente grado de manejo. Además, también se documenta el proceso de elaboración tradicional de hilo y prendas a partir de la fibra.

Además, un estudio etnobotánico en el cultivo de algodón (*Gossypium* spp.) realizado durante el 2010 en diferentes estados (incluido Oaxaca) a través de

encuestas, se reportó que más de la mitad de los entrevistados solo conoce el algodón que produce. La principal razón por la que los conservan es porque les gusta la planta, porque crece de forma natural y por la utilidad de su fibra en sus actividades cotidianas. Se reportan 12 usos diferentes entre los que destaca el ornamental, material de curación y como relleno; el 47 % de los entrevistados indicó que las plantas de algodón nacieron de forma espontánea en sus predios, mientras que el 20 % obtuvo la semilla o la planta con sus vecinos. Solo el 12 % de los entrevistados en Oaxaca refirió cultivar algodón de fibra café o “Coyuche” (SNICS, 2017).

2.8. Producción de algodón

El algodón se cultiva en muchas regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo (Vincent & Fajardo, 2007; Arjit & Nag, 2015). Dicho cultivo es catalogado como el cultivo no alimentario más importante a nivel mundial, ya que su papel es estratégico en muchos países y en el caso de México su cadena de valor representa negocios por varios millones de pesos por año (SAGARPA, 2014).

El algodón ocupa el primer lugar en el mundo como productor de fibra, y el segundo como oleaginosa, por el aceite y la harina de la semilla. Todas las especies son perennes, pero en el cultivo se han desarrollado tipos anuales que son los que suplen la producción comercial.

El cultivo del algodón es tan extenso, que tan solo en 2016 se sembraron 31 millones de hectáreas (ha) en todo el mundo de acuerdo con el reporte del Servicio Nacional de Estadísticas Agrícolas (USDA NASS, 2016), y se cultiva en más de 80 países, en cinco continentes.

En México, el cultivo de algodón se realiza en entidades del norte del país. Chihuahua, Baja California, Coahuila, Tamaulipas, Sonora, Durango y Sinaloa,

son los siete estados que comprenden la producción de algodón, destacando Chihuahua porque su producción genera siete de cada 10 pesos de la venta del bien agrícola. Cabe destacar, que en una hectárea de cultivo de algodón de alta densidad se siembran entre 100 mil y 120 mil plantas (SIAP, 2017).

Por otra parte, en 2017, el aumento significativo en la superficie de siembra de algodón en las siete entidades con el cultivo, permitió una cosecha mayor en 103 % a la del año previo. Este año, México reportó una superficie sembrada de 9,178 ha y un rendimiento de 3.068 (t/ha). Su precio en el mercado internacional a junio de 2018 fue de 1,516.78 dólares por tonelada; 3.1 % mayor respecto de mayo y 0.6 % inferior en relación con el mismo mes del año anterior. La cotización en el mercado a julio de 2018; fue de 1,971.40 dólares por tonelada; 30 % mayor al del físico de junio de 2018. Cabe destacar, que el precio promedio de la oleaginosa en el primer trimestre de 2018, fue de 1,499.14 dólares por tonelada: 0.5 % menor a 2017 (mil 507.23 dólares por tonelada) (SIAP, 2018).

2.9. Uso e importancia del algodón

Hoy en día, *G. hirsutum* y *G. barbadense* son las principales especies de algodón cultivado; representando el 90 % y 5 % de la producción mundial, respectivamente (León, 2000).

Entre sus principales usos se encuentra la fibra de algodón que es ampliamente reconocida debido a su uso extensivo en la industria textil (Hinze *et al.*, 2017), así como aplicaciones higiénicas en la fabricación de vendas, gasas, tampones o toallas sanitarias, hiposos de algodón y otros (Arjit & Nag, 2015). En comparación con las fibras sintéticas, el algodón proporciona algunos beneficios importantes para el medio ambiente y la sociedad. En primer lugar, a diferencia de los sintéticos, es un recurso renovable. En segundo lugar, su cultivo, procesamiento y uso en la industria textil provee el sustento de un número

mucho mayor de personas comparadas con las fibras sintéticas (SAGARPA, 2014; Rathore, Campbell, Sherwood & Nunes, 2015).

La importancia de la semilla de algodón como fuente de aceite de cocina y alimento para el ganado es menos reconocida y ha sido mucho menos estudiada (Hinze *et al.*, 2017). Ya que se sabe que el algodón contiene sustancias que pueden ser tóxicas y adversas para la salud humana y animal. Sin embargo, los rumiantes son menos afectados porque estos compuestos son desintoxicados por la digestión en el rumen (Kandyliis, Nikokyris & Deligiannis, 1998). Así que, la semilla de algodón como fuente de alimentación se limita a una proporción relativamente pequeña en la dieta y debe introducirse gradualmente para evitar los efectos potencialmente tóxicos (Blasi & Drouillard, 2002).

Además, el algodón está siendo estudiado más detalladamente por sus componentes medicinales como remedio para varios tipos de enfermedad. La fibra de algodón procesada contiene más del 99 % de celulosa y se utiliza ampliamente en aplicaciones farmacéuticas y médicas debido a su baja capacidad de causar irritación (Wakelyn *et al.*, 2007). Se emplea como analgésico en dolores de cabeza, fiebre, disentería y otros padecimientos. Los indios usaron semillas de algodón para el tratamiento de la tos, el estreñimiento y la gonorrea. Las mordeduras de serpiente y las picaduras de escorpión pueden ser tratadas con infusiones o mezclas de semillas y hojas (Kew, 2017; Arjit & Nag, 2015). Kew (2017) describe otros usos del algodón como: curar heridas, llagas, auxiliar en el parto, reducir la presión, acedido (respiración dificultosa) y asma. Para estos dos últimos usos, las hojas se soasan y el jugo se unta en el pecho.

Por otra parte, la planta de algodón contiene terpenoides aldehídos en una matriz oleosa soluble en agua, que forma un aceite esencial conocido como 'gosipol'. Esta sustancia es tóxica para los mamíferos no rumiantes, las aves y

muchos insectos y microbios, proporcionando así una defensa constitutiva e inducible contra el ataque herbívoro y microbiano. Durante los últimos años, el 'gospol' ha atraído mucha atención especialmente debido a sus propiedades antifertilidad ya que está siendo investigado y se ha utilizado como anticonceptivo masculino, así como propiedades antiparasitarias y anti-VIH. Las semillas pueden contener hasta 10 % de 'gospol'.

Como puede apreciarse, la utilización y la aplicación del algodón son muy diversas y falta mucho por estudiar.

2.10. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como la evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses, estudios de diversidad y también para la selección asistida por marcadores. Además se utilizan para localizar y aislar genes de interés (Simpson, 1997).

Se definen como secuencias genómicas localizadas en un mismo locus y difieren en su secuencia de bases nitrogenadas a consecuencia de mutaciones o arreglos cromosómicos, de manera que reflejan directamente las variaciones a nivel del ADN, son dominantes o codominantes, y son estables e independientes del ambiente de desarrollo del organismo analizado. Estas características los hacen útiles en la identificación varietal (Valadez & Kahl, 1999). Miles, Maass & Valle. (1998), definen los marcadores moleculares como secuencias de ADN que permiten diferenciar entre un genotipo y otro a nivel del ADN. Pueden ser genes o segmentos de ADN sin ninguna función o codificación conocida, pero su herencia puede seguirse fácilmente mediante el empleo de procedimientos de laboratorio bien establecidos. Además, el locus que muestra variación experimental (polimorfismo) entre los padres y los

individuos de la población de mapeo se considera como un marcador genético (Kumar & Singh, 2014).

Las propiedades más importantes para la buena calidad de un marcador genético son: (a) naturaleza altamente polimórfica; (b) herencia co-dominante; (c) ocurrencia frecuente en el genoma; (d) comportamiento neutral selectivo; (e) ensayo fácil y rápido; (f) alta reproducibilidad; y (g) interacción baja o nula con otros marcadores que permita el uso de muchos marcadores al mismo tiempo en una población segregante (Kumar & Singh, 2014).

Para el caso específico de plantas, los marcadores moleculares juegan un papel muy importante en la selección y mejoramiento de variedades agrónomicamente superiores, proporcionando a los fitomejoradores la posibilidad de combinar caracteres o rasgos favorables presentes en diferentes líneas parentales de especies cultivadas o sus parientes silvestres. Cuando el mejoramiento se realiza por el método convencional se consume mucho tiempo y el proceso es menos preciso en comparación con la selección directa de plantas basada en marcadores moleculares (Preetha & Rveendren, 2008). Dichas bondades hacen que los marcadores moleculares sean de gran utilidad en la agronomía.

2.10.1. Tipos de marcadores moleculares

En la actualidad existen varias técnicas bioquímicas y moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997).

Para el algodón hay diferentes tecnologías de marcadores disponibles. Los marcadores de ADN más comúnmente utilizados para detectar el polimorfismo del ADN se basan en técnicas como RFLP, RAPD, AFLP, ISSR, SSR y SNP, cada marcador tiene sus propias ventajas y desventajas. En el presente estudio nos enfocaremos en los marcadores moleculares tipo ISSR-PCR, ya que se han reportado como marcadores bastante útiles para revelar polimorfismos en genotipos de algodón (Liu & Wendel, 2001).

2.10.1.1. ISSR

Tipo de marcador molecular conocido como Inter Secuencias Simples Repetidas, el cual permite detectar niveles de variación entre las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como (CT)_n o (CA)_n, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte (Zietkiewicz, Rafalski & Labuda, 1994; Wolfe, 2000). Los motivos repetidos, llamados también SSR (secuencias simples repetidas) pueden ser penta, tetra, tri y dinucleótidos. Dicho de otra forma, la técnica ISSR implica la amplificación del segmento de ADN presente a una distancia amplificable entre dos regiones idénticas de repetición de microsatélites orientadas en dirección opuesta. Es una técnica relativamente nueva que combina la mayoría de los beneficios de AFLP y el análisis de microsatélites con la universalidad y similitud a los RAPD, excepto que en los ISSR el iniciador es un di o trinucleótido repetido de 16 a 25 pb de longitud (Culler & Wolfe, 2001; Khanam, Sham, Bennetzen & Aly, 2012). Entre las ventajas principales de los ISSR se tiene que generan un gran número de bandas polimórficas. Asimismo, para su análisis no son necesarias altas concentraciones de ADN, y para diseñar los 'primers' no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio. Son sencillos de montar, rápidos, eficientes y poco costosos. Las bandas que se obtienen con este marcador van de 100 a 2000 pb. La variación alélica en los ISSR consiste de la

presencia o ausencia de los productos amplificados. Las bandas de ISSR segregan principalmente como marcadores dominantes siguiendo una herencia mendeliana simple. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homocigoto o heterocigoto), mientras que su ausencia representa el genotipo homocigoto recesivo. Comparadas con los 'primers' RAPD las secuencias de los ISSR son usualmente largas lo que resulta en una mayor reproducibilidad de las bandas. Su detección por el método de electroforesis puede ser por: a) gel de agarosa visualizado con bromuro de etidio, y b) geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata (Rentería, 2007).

Los ISSR son marcadores semi-arbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de un oligonucleótido o 'primer' complementario a un microsatélite, diseñado y dirigido a múltiples *loci* genómicos para amplificar y unirse a los motivos repetidos. En ocasiones es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos extra arbitrarios en el extremo 3' o en el 5', que jugaran el papel de "anclas" asegurando así que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite, respectivamente (Pradeep, Sarla & Siddiq, 2002; Khanam *et al.*, 2012).

La molécula generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un "locus", que representa el segmento de ADN entre los microsatélites. Se ha visto que los ISSR frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Este patrón característico de productos de PCR se considera la "huella digital genética" de cada uno de los individuos analizados. El polimorfismo entre individuos de la misma población puede detectarse, ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el 'primer' y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Algunas de las limitaciones de los marcadores ISSR son:

Las bandas, al ser leídas como marcadores dominantes no se sabe si el individuo es homocigoto dominante o heterocigoto.

La diversidad genética está basada considerando que cada banda representa un locus con dos alelos y que el alelo dominante está en equilibrio de Hardy- Weinberg con un alelo recesivo.

Es una técnica relativamente cara cuando se involucra el uso de geles de poliacrilamida y para su visualización nitrato de plata.

Los ISSR pueden utilizarse como marcadores en la resolución de múltiples problemas biológicos. Los polimorfismos que presentan, además de su heredabilidad, pueden aplicarse en la identificación de individuos, distinción de variedades intraespecíficas (particularmente en especies con importancia económica), identificación de paternidad y maternidad, mapeo genético, evaluación de diversidad y subdivisión genética en poblaciones, reconstrucciones filogenéticas, introgresión e hibridación, y distinción de individuos con origen clonal y sexual (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2000; Pradeep *et al.*, 2002).

2.11. Reacción en cadena de la polimerasa

La forma para detectar ISSR en un determinado genoma es mediante el uso y diseño de iniciadores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction o PCR) es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula que funciona como molde. La enzima más importante en la replicación es la polimerasa dependiente de ADN,

comúnmente conocida como ADN polimerasa, porque es la encargada de incorporar nucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN (Bohinski, 1991). Esta enzima trabaja a temperaturas muy elevadas ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79 °C a 85 °C), de ahí su nombre comercial más conocido: taq ADN polimerasa (Espinosa, 2007).

En la PCR se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar; la ADN polimerasa; los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la replicación); desoxiribonucleótidos (dNTPs); cloruro de magnesio (MgCl₂) u otro co-factor necesario para que trabaje la ADN polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis (Espinosa, 2007). Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR) que sustituye a la mayoría de las proteínas que actúan en la replicación celular. El ciclo de PCR se puede resumir en tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN.

2.12. Antecedentes sobre caracterización morfológica en el estudio del algodón (*Gossypium hirsutum*)

SNICS (2017), reportó la caracterización morfológica y bioquímica de 58 accesiones de cinco especies del género *Gossypium* originarias de los estados de Campeche, Colima, Oaxaca, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Quintana Roo y Yucatán. Se encontró que 25 accesiones pertenecieron a la especie *G. hirsutum* raza palmerii; donde todas las accesiones tuvieron flores de color amarillo; el 77 % no presentaron manchas y mostraron polen en su mayoría color crema; el 79 % de las accesiones fueron plantas de forma globosa y el resto cónica; así mismo se

identificó que todas las accesiones presentaron nectarios en las hojas en diferente grado. Dichos resultados indicaron la existencia de alta variabilidad fenotípica en las características agronómicas de interés para su incorporación a un programa de mejoramiento genético del algodón domesticado. La caracterización bioquímica realizada en *G. hirsutum* reportó que en promedio las semillas se encuentran conformadas por 65-70 % de endospermo y el resto por cascarilla en todas las especies evaluadas; respecto al contenido de grasas, en el endospermo se cuantificó hasta 38 %; tuvieron 30 % de proteína y porcentajes apenas perceptibles de fibra; mientras que en la cascarilla se identificaron valores de 3 % de grasas, 10 % de proteína y hasta 55 % de fibra, lo que la hace promisoría para su uso como complemento para la alimentación animal. Una accesión proveniente de Zihuatanejo, Guerrero fue la más sobresaliente al presentar los mayores contenidos de aceite, proteína y la menor concentración de fibra.

Pérez *et al.* (2011) al estudiar el recurso fitogenético del algodón mexicano recolectan un total de 235 accesiones procedentes de 12 estados (no se incluye a Oaxaca); destacando las colectas de *G. hirsutum*, seguidas de *G. aridum*, *G. barbadense*, *G. laxum* y *G. spp.* Los materiales exhibieron diferencias entre la forma y el tamaño de la hoja, tamaño de cápsulas, número de semillas, días a floración y tipo de hábito, lo cual resulta esencial para efectuar el mejoramiento genético.

2.13. Antecedentes sobre el uso de marcadores moleculares tipo ISSR-PCR en el estudio del algodón (*Gossypium hirsutum*)

Sonika & Sangwan (2018) empleando marcadores moleculares ISSR para estudiar la diversidad genética en algodón americano (*Gossypium hirsutum* L.) de 4 genotipos (parentales e híbridos) susceptibles a la enfermedad del enrollamiento de la hoja de algodón, encontraron que 21 de 28 iniciadores fueron polimórficos. Un total de 175 alelos se amplificaron por estos 28

iniciadores ISSR, de los cuales 127 alelos fueron polimórficos (72.57 % de polimorfismo) y variaron en tamaño desde 150 hasta 1000 pb. Cabe destacar que el número de alelos por iniciador varió de 2 a 13, con un promedio de 6.25 por iniciador. De igual manera, el número de alelos polimórficos por iniciador polimórfico varió de 0 a 11, con un promedio de 6.04 por iniciador polimórfico. También, el porcentaje de polimorfismo varió de 0 a 100 % (7 iniciadores resultaron polimórficos al 100 %). El valor del Contenido de Información Polimórfica (PIC) se encontró en el rango de 0.49 a 0.91. El iniciador UBC 834 mostró el valor más notable de PIC, el cual tenía el valor máximo de PIC de 0.91 y se encontró que era más adecuado e informativo para usarse en la selección temprana de las líneas de germoplasma. Además, el análisis del árbol de conglomerados UPGMA condujo a la agrupación de los padres y sus F1 en dos grupos principales en un índice de similitud de 0.54 a 0.85. Esto fue respaldado por el Análisis de Componentes Principales bidimensional y tridimensional (PCA), los cuales también mostraron resultados similares a los del dendrograma.

Bilwal, Vadodariya, Rakumar & Lahane (2017) analizando la diversidad genética entre nueve genotipos de algodón utilizando marcadores moleculares RAPD, ISSR y SSR, encontraron que 25 iniciadores RAPD amplificaron un total de 171 bandas de las cuales 156 fueron polimórficas, lo que corresponde a un 91.22 % de polimorfismo. El número de bandas por iniciador varió de 3 a 14, mientras que el número de bandas polimórficas por iniciador fue de 0 a 11. Por otra parte, 22 iniciadores ISSR amplificaron un total de 209 bandas, de las cuales 142 resultaron polimórficas, lo que representa el 67.94 % de polimorfismo. El número de alelos por locus varió de 5 a 15, mientras que el número de alelos polimórficos fue de 2 a 11. Para el caso de los marcadores SSR, 16 iniciadores amplificaron 22 bandas, de las cuales 24 fueron polimórficas, que representan el 72.72 % de polimorfismo. El número de alelos por locus varió de 1 a 4, mientras que el número de alelos polimórficos fue de 1 a 2. Además, el

dendrograma mostró similitud genética entre los nueve cultivares de algodón que varió de 0.72 a 0.93 y reveló dos grupos distintos.

Saif, Riad & Elbagoury (2017) empleando marcadores moleculares RAPD, ISSR y SSR para caracterizar morfológica y molecularmente 5 variedades de algodón egipcio, encontraron que 5 iniciadores RAPD amplificaron 190 bandas de las cuales 76 fueron polimórficas, que representan el 40 % de polimorfismo. El tamaño de las bandas varió de 200 a 2700 pb. El número de bandas amplificadas varió de 25 a 40, con un promedio de 38 bandas por iniciador. El número de bandas polimórficas fue de 8 a 20, con un promedio de 15.2, mientras que el porcentaje de polimorfismo anduvo entre 32 a 47.5 %. Del mismo modo, 5 iniciadores ISSR amplificaron 140 bandas de las cuales 33 fueron polimórficas, lo que representa el 23.5 % de polimorfismo. El tamaño de las bandas varió de 350 a 3100 pb. El número de bandas amplificadas fue de 25 a 35, con un promedio de 28 bandas por iniciador. El número de bandas polimórficas varió de 4 a 10, con un promedio de 6.6, mientras que el porcentaje de polimorfismo estuvo en un rango de 16 a 28.5 %. Además, 6 iniciadores SSR amplificaron 130 bandas de las cuales 50 fueron polimórficas, representando el 38 % de polimorfismo. El tamaño de las bandas varió de 50 a 2000 pb. El número de bandas amplificadas fue de 15 a 35, con un promedio de 21.6 bandas por iniciador. El número de bandas polimórficas varió de 3 a 12, con un promedio de 8.3, mientras que el porcentaje de polimorfismo fue de 20 a 60 %. Además, la prueba de Alto Volumen del Instrumento (HVI) permitió evaluar características de la fibra de algodón y encontraron que las 5 variedades de algodón se clasificaron desde fina para las variedades de algodón de fibra larga hasta extrafina para las variedades de algodón de fibra extra larga. Todas las variedades evaluadas se determinaron como de fibras muy fuertes. La construcción de dendrogramas por el método UPGMA generó dos grupos con porcentaje de similitud del 56 %. En este estudio, el mayor número de fragmentos polimórficos y el porcentaje de polimorfismo se encontraron para los marcadores tipo RAPD. Por el contrario, los valores mínimos se indicaron para

los marcadores ISSR. Sin embargo, el resultado general de los datos indicó que los tres análisis detectaron suficiente diversidad genética como para diferenciar las cinco variedades de algodón egipcio.

Ashraf *et al.* (2016) comparando la diversidad genética entre 30 genotipos de algodón Bt, utilizando marcadores moleculares EST-SSR, ISSR y morfológicos, encontraron que de 20 pares de iniciadores EST-SSR, cinco fueron polimórficos y amplificaron 30 alelos. El número de alelos por locus varió de 1 a 3, con un promedio de 1.5. El número promedio de bandas polimórficas por par de iniciador fue 0.40. La heterocigosidad esperada (H_{ep}) fue 0.29. El valor del Contenido de Información Polimórfica (PIC) varió de 0.59 a 0.75. La Probabilidad de Confusión (C_j) estuvo en un rango de 0.24 a 0.82, y el Poder discriminatorio (D_j) fue de 0.59 a 0.76. El tamaño de las bandas obtenidas fue de 130 a 340 pb. La estimación de la relación múltiplex efectiva fue 2.69 y el Índice Marcador (MI) fue 0.78. De forma similar, de 20 ISSR, 13 cebadores amplificaron un total de 79 alelos que variaron de 280 a 2200 pb. Entre estos 13 iniciadores, 10 se encontraron polimórficos para los genotipos de algodón Bt. El número de alelos varió de 3 a 12, con un promedio de 6.08. El número promedio de bandas polimórficas por iniciador fue 2.69. La heterocigosidad esperada (H_{ep}) fue 0.71. El valor de PIC varió de 0.064 a 0.491. La Probabilidad de Confusión (C_j) estuvo entre 0.49 a 0.93, y el valor de D_j varió de 0.067 a 0.754. La estimación de la relación múltiplex efectiva fue 0.40 y el Índice Marcador (MI) fue 0.28. La similitud genética de los marcadores EST-SSR e ISSR varió de 0.73 a 1.00, con una media de 0.88 y de 0.77 a 0.97, con una media de 0.88, respectivamente, entre los genotipos de algodón Bt que mostraron bajo nivel de diversidad genética. En este estudio, los dendrogramas basados en marcadores de EST-SSR e ISSR mostraron diferencias en el número total de conglomerados y la posición de los genotipos dentro de los conglomerados. Además, tres dendrogramas diferentes basados en 20 EST-SSR, 13 ISSR y 20 marcadores morfológicos dividieron los genotipos de algodón de 30 Bt en cinco, seis y tres conglomerados, respectivamente.

Sethi, Siwach, Kumar & Sihag (2015) evaluando la diversidad genética de 95 genotipos de *Gossypium arboreum* L. con marcadores ISSR y el empleo de 100 marcadores seleccionados produjeron un total de 397 bandas, de las cuales 368 eran polimórficas (92.6 %). El número medio de alelos efectivos (N_e) fue 1.409, el valor medio del índice de información de Shannon (I) fue de 0.36 y un valor promedio de 0.24 de heterocigosidad esperada (H_e). El número de bandas por locus varió de 2 a 15, con número promedio de bandas de 3.97. El tamaño de las bandas obtenidas anduvo desde un mínimo de 200 pb hasta un máximo de 1700 pb. Los valores del Contenido de Información de Polimorfismo (PIC), variaron de 0.23 a 0.50 con un promedio de 0.40. La prueba AMOVA mostró un 17 % de variación genética entre las poblaciones seleccionadas (6 grupos de población) y el resto (83 %) se debió a la varianza genética entre las accesiones en cada grupo de población. Las seis poblaciones se distribuyeron en dos grupos principales por UPGMA. El coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) entre 6 grupos de población varió de 0.038 a 0.163.

Abou & Fayed *et al.* (2014) empleando marcadores moleculares RAPD, ISSR y SSR para determinar huellas genéticas en la identificación de polimorfismo genético y rasgos agronómicos de 37 genotipos de algodón egipcio, indicaron la existencia de diferencias significativas entre genotipos para todos los rasgos agronómicos evaluados. Por otra parte, 8 iniciadores RAPD amplificaron un total de 1455 bandas, de las cuales 1449 fueron polimórficas, lo que representa un 99.58 % de polimorfismo. El número de bandas amplificadas varió de 108 a 248, con un promedio de 181.87 por iniciador, el número de bandas polimórficas estuvo entre 106 a 248, con un promedio de 181.12 bandas por iniciador y el Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) varió de 0.70 a 0.87, con un promedio de 0.78. El análisis ISSR, reveló que 7 iniciadores amplificaron un total de 993 bandas de las cuales 973 fueron polimórficas y representan el 97.98 % de polimorfismo. El número de bandas amplificadas varió de 118 a 170, con un promedio de 141.86 por iniciador, el número de bandas polimórficas fue de 116 a 169, con un promedio de 139 bandas por

iniciador y el Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) estuvo en un rango de 0.77 a 0.82, con un promedio de 0.80. El análisis SSR reveló que 4 pares de iniciadores amplificaron un total de 242 bandas de las cuales 240 fueron polimórficas, que representan el 99.17 % de polimorfismo. El número de bandas amplificadas varió de 37 a 74, con un promedio de 60.5 por iniciador, el número de bandas polimórficas fue de 36 a 73, con un promedio de 60 bandas por iniciador y el Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) varió de 0.51 a 0.76 con un promedio de 0.64. El análisis de conglomerados de 37 genotipos separó dos grupos principales y mostró que la distancia genética varió de 0.67 a 0.80. La técnica SSR fue más efectiva en la detección de alto nivel de polimorfismo debido al mayor porcentaje de bandas polimórficas obtenidas en comparación con las otras técnicas.

Patel, Patel, Jha, Rajkumar & Kumar (2014) empleando marcadores RAPD, ISSR y SSR para evaluar la diversidad genética en tres genotipos de algodón *Gossypium hirsutum* y tres genotipos de algodón *Gossypium barbadense*, encontraron que 25 iniciadores RAPD, 19 ISSR y 26 SSR generaron un total de 124, 65 y 71 alelos; de los cuales 72, 45 y 59 alelos fueron polimórficos, resultando en 58.06, 69.23 y 83.09 % de polimorfismo, respectivamente. Además, el número de alelos por marcador RAPD, ISSR y SSR varió de 1 a 9, con un promedio de 4.96 alelos por iniciador; de 1 a 6, con un promedio de 3.42 alelos por iniciador y de 1 a 4, con un promedio de 2.73 alelos por par de iniciador, respectivamente. El coeficiente de similitud basado en los marcadores RAPD, SSR e ISSR varió de 0.57 a 0.81 con un promedio de 0.67, lo que sugiere una considerable variación genética entre los genotipos de algodón estudiados. Del mismo modo, el número de alelos polimórficos por marcador RAPD, ISSR y SSR fue de 0 a 7, con un promedio de 2.32 alelos polimórficos por iniciador; de 0 a 6, con un promedio de 3.64 alelos polimórficos por iniciador y de 1 a 4, con un promedio de 3.19 alelos polimórficos por iniciador, respectivamente. Además, el dendrograma generado por el análisis de conglomerados UPGMA basado en el coeficiente de similitud de Jaccard,

agrupó las seis líneas parentales en dos grupos distintos que comprenden variedades de *G.hirsutum* (Grupo A) y variedades de *G. barbadense* (Grupo B). La agrupación basada en el análisis de conglomerados se confirmó con el pedigrí disponible, la información de antecedentes genéticos y también con la clasificación taxonómica de los genotipos usados. Los resultados moleculares en este estudio fueron eficientes para evaluar la diversidad genética en genotipos de algodón.

Parkhiya, Gohel & Mehta (2014) analizando la diversidad genética de 15 genotipos de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) mediante marcadores moleculares ISSR, encontraron que de 15 iniciadores, 9 amplificaron en total 86 bandas, de las cuales 54 mostraron polimorfismo, con un promedio de 6 bandas por iniciador. El porcentaje de polimorfismo promedio fue de 62.79 %. El Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) osciló entre 0.87 y 0.91, con un promedio de 88.41, mientras que la similitud genética de Jaccard (GS) varió de 0.60 a 0.92. El análisis de agrupamiento reveló dos grupos principales con el 66 % de similitud. El tamaño de los productos amplificados ISSR estuvo en un rango de 117 a 2571 pb. El índice de iniciador ISSR (IPI) varió de 6.98 a 10.84 con un promedio de 8.46. La prueba de Mantel indicó que el grado de bondad de ajuste para el análisis de conglomerados (correlación matricial: $r=0.87$) estaba dentro de la categoría de "buen ajuste" según la clasificación de Rohlf (2000).

Noormohammadi, Farahani, Sheidai, Barakki & Alishah (2013a) empleando marcadores moleculares ISSR, SSR y RAPD para el análisis de características agronómicas y diversidad genética en híbridos de algodón Opal (*Gossypium hirsutum*) y en las progenies F₂, encontraron que diez iniciadores ISSR produjeron 206 bandas reproducibles, con 49.4 % de polimorfismo. Los tamaños de los fragmentos obtenidos fueron de 250 a 2600 pb. Además, el rango del Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) fue de 0 a 4.5 con un promedio de 0.32, el rango de alelos efectivos (N_e) fue de 1.0 a 1.81, con un

promedio de 1.40. Por otra parte, cuatro *loci* de microsatélites produjeron 12 alelos, que variaron de 181 a 236 pb, con un 54 % de polimorfismo; mientras que 17 de 26 iniciadores RAPD produjeron 251 bandas reproducibles que variaron de 200 a 3700 pb, con 22 % de polimorfismo. El coeficiente de similitud obtenido en el análisis de RAPD osciló de 0.84 a 0.97 entre los genotipos estudiados, mientras que los rangos fueron de 0.70 a 0.95 y de 0.58 a 1.00 en el análisis ISSR y SSR, respectivamente. La prueba de Mantel realizada entre las matrices de distancia genética obtenidas de ISSR, SSR y RAPD mostró una regresión no significativa entre RAPD versus ISSR e ISSR versus SSR, mientras que RAPD versus SSR mostró una regresión significativa. El análisis de conglomerados basado en estos tres tipos de marcadores moleculares diferenció los genotipos del algodón y sus progenies. Entre los marcadores moleculares, ISSR reveló más variación genética entre los genotipos.

Noormohammadi, Taghavi, Foroutanb, Sheidai & Alishah (2013b) evaluando la diversidad genética de 34 genotipos de algodón (parentales e híbridos) tetraploides y diploides, con el uso de marcadores moleculares homo y hetero ISSR, reportaron que 10 iniciadores de 35, amplificaron 163 bandas polimórficas. El valor medio de los alelos efectivos (N_e), la diversidad genética de Nei (H), el índice de Shannon (I) y el porcentaje de polimorfismo obtenido fueron 1.23, 0.15, 0.26 y 97.5 %, respectivamente. La agrupación de los genotipos basados en la distancia genética de Nei mediante los métodos UPGMA y NJ produjo resultados similares. El árbol NJ mostró un valor de correlación co-fenética alto ($r= 0.98$). Se formaron 2 grupos principales. El primer grupo estuvo compuesto por genotipos tetraploides que incluyen genotipos parentales y sus híbridos interespecíficos. Los genotipos parentales diploides y sus híbridos interespecíficos formaron el segundo grupo. El análisis de red mostró la existencia de intercambio génico/similitud alélica entre genotipos parentales y sus progenies. También se observaron algunos alelos comunes entre genotipos diploides y tetraploides. La matriz Q construida con el programa STRUCTURE mostró una afinidad cercana entre los genotipos

diploides, mientras que los genotipos tetraploides se ubicaron lejos de ellos. Esta matriz mostró alelos comunes entre los genotipos diploides, mientras que los genotipos tetraploides difirieron en sus frecuencias de alelos comunes. En conclusión, la diversidad genética fue más alta en los híbridos interespecíficos.

Abdi *et al.* (2012) usó marcadores moleculares ISSR para estudiar la diversidad genética de 28 cultivares de algodón en relación con la tolerancia a sal, los autores reportaron que el análisis de agrupamiento de cultivares basado en rasgos agronómicos (longitud de la raíz, peso fresco de la raíz, peso seco de la raíz, índice de clorofila y fluorescencia, contenido de K^+ y Na^+ en brotes (biomasa aérea) y relación K^+/Na^+) medidos por el método de Ward, mostró dos cultivares más tolerantes a sal. Por otra parte, el análisis molecular reveló que 14 iniciadores ISSR de 34 estudiados produjeron 85 bandas, de los cuales 65 resultaron polimórficas, que representan 76.4 % de polimorfismo. Además, el número de bandas polimórficas por iniciador varió de 3 a 8, con un promedio de 4.6 bandas. El valor del Contenido de Información Polimórfica (PIC) estuvo entre 0.10 y 0.38 con un promedio de 0.28. El Índice de Marcador (MI) varió de 0.34 a 2.03, con un promedio de 1.26. La diversidad de genes de Nei varió de 0.10 a 0.40, con un promedio de 0.30. El coeficiente de correlación fue estadísticamente significativo ($r= 0.84$, $\alpha= 1\%$). El análisis de conglomerados reveló que los genotipos estudiados se agruparon en tres grupos. El análisis de regresión de los marcadores en relación con los resultados de los rasgos agronómicos evaluados, reveló que 23, 33 y 30 marcadores estuvieron asociados con los tres tratamientos con sal evaluados, respectivamente. Los resultados mostraron que el marcador molecular ISSR podría servir como un método útil en el mejoramiento de la tolerancia a la sal en el algodón.

Bardak & Bolek (2012) empleando marcadores moleculares ISSR y SSR para determinar la diversidad genética de 25 genotipos de algodón diploide y tetraploide cultivados y silvestres en diferentes partes del mundo (13 y 10 accesiones, respectivamente), reportaron que 39 marcadores SSR y 5 ISSR

amplificaron 173 alelos o bandas de los cuales 155 resultaron polimórficos, por lo tanto, el porcentaje de polimorfismo fue de 89.6 %. El promedio de alelos por locus o por iniciador fue 3.93, oscilando entre 1 y 8 alelos. El valor del Contenido de Información Polimórfica (PIC) estuvo entre 0.0040 y 0.9993 con un promedio de 0.4396. La diversidad genética o nivel de distancia genética (GD) varió de 0.04 a 0.58 entre todos los genotipos inspeccionados. Esta relación fue 0.04-0.23 dentro de *G. hirsutum* L. y 0.07-0.26 dentro de especies de *G. barbadense* L. En estas dos especies, la diversidad genética varió de 0.23 a 0.57 cuando se compararon con otras especies diploides y tetraploides. El análisis de componentes principales por el método NJ mostró relaciones similares entre algodones diploides y tetraploides. Por otra parte, el análisis de conglomerados diferenció claramente al algodón diploide de tipo silvestre de otros tipos silvestres tetraploides, accesiones y genotipos, separándolos en dos grupos principales. En éste estudio la diversidad genética fue baja dentro de cultivares comerciales que también se utilizan con frecuencia en programas de mejoramiento (0.08-0.20).

Sheidai *et al.* (2012) usando marcadores moleculares ISSR y SSR para analizar la diversidad genética en plantas regeneradas de cultivo tisular de tres cultivares de algodón: Mehr, Sindose y su híbrido Mehr x Sindose; informaron que los iniciadores ISSR mostraron diferentes niveles de polimorfismos en cada cultivar: 78.3 % (65 bandas de 83 fueron polimórficas), 70.42 % (50 bandas de 71 fueron polimórficas) y 90.8 % (79 bandas de 87 fueron polimórficas), respectivamente. El número medio de alelos obtenidos en el cultivar Mehr y Mehr x Sindose fue 1.06, mientras que para Sindose fue 0.99. De forma similar, el número medio de alelos efectivos en las plantas regeneradas de Mehr fue de 1.24, en Sindose 1.22 y para el híbrido Mehr x Sindose 1.21. El valor medio de la diversidad genética de Nei (H) y el índice de información de Shannon (I) fue 0.14 y 0.20, respectivamente para Mehr; 0.13 y 0.19 respectivamente para Sindose y 0.12 y 0.19 para el híbrido, respectivamente. Los valores más altos de diversidad genética en ISSR se obtuvieron en el cultivar Mehr. El análisis de

la variación molecular (AMOVA) mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) para los marcadores ISSR tanto dentro como entre los genotipos estudiados. La prueba mostró un 34 % de la varianza total entre genotipos y un 66 % dentro de genotipos. Por otra parte, la amplificación de los marcadores SSR produjo 10 alelos reproducibles en el cultivar. El tamaño de los alelos obtenidos varió de 217 pb a 235 pb. Tanto el cultivar Sindose como el híbrido Mehr x Sindose presentaron ocho alelos SSR. El número medio de alelos obtenidos en el cultivar Mehr fue de 1.14, mientras que en Sindose fue 1.10. De forma similar, el número medio de alelos efectivos en las plantas regeneradas de Mehr fue de 1.30 mientras que en Sindose fue de 1.17 y de 1.24 en las plantas regeneradas de cultivo tisular híbrido Mehr x Sindose. Los valores medios de heterocigosidad esperada (H) y los Índices de información de Shannon (I) para marcadores de SSR fueron 0.18 y 0.27 respectivamente en Mehr, 0.106 y 0.160 respectivamente para las plantas regeneradas Sindose y 0.133 y 0.190 para las plantas regeneradas de cultivo híbrido. Por lo tanto, los valores más altos de diversidad genética en marcadores de SSR también se obtuvieron en el cultivar Mehr. El análisis de la variación molecular (AMOVA) no mostró diferencias significativas ($p < 0.90$) para los marcadores de SSR entre los genotipos estudiados.

Fouad, Abdallah, Mohammad, Mohammad & Abdelraouf (2012) analizando la diversidad genética de veintiocho genotipos de algodón egipcio (*Gossypium barbadense* L.) (Variedades e híbridos) con el uso de marcadores ISSR, SSR y EST, encontraron que los marcadores ISSR amplificaron un total de 47 bandas de las cuales 43 fueron polimórficas, representando 91.4 % de polimorfismo. El rango del Contenido de Información de Polimorfismo (PIC) de los iniciadores ISSR varió de 0.75 a 0.94. Los marcadores SSR mostraron 84.6 % de polimorfismo (44 de 52 bandas amplificadas fueron polimórficas) con un promedio de 7.3 bandas polimórficas por par de iniciadores. El PIC varió de 0.80 a 0.91. Los marcadores EST amplificaron un total de 28 bandas de las cuales 24 resultaron polimórficas. El porcentaje de bandas polimórficas fue de

85.7 % con un promedio de 4.8 % de bandas polimórficas por par de iniciador. El PIC osciló de 0.45 a 0.92. Utilizando el algoritmo de coincidencia simple y el método de agrupamiento UPGMA, los 28 genotipos utilizados se separaron en cuatro grupos utilizando todos los datos generados a partir de los tres marcadores moleculares diferentes. El análisis de coordenadas principales (PCOORDA), mostró que los genotipos de algodón se separaron por las tres primeras coordenadas principales (PC1, PC2 y PC3) que representaron 11.5, 8.6 y 7.2 % de la varianza genética total, respectivamente. Los resultados del PCOORDA mostraron una mejor resolución de la diversidad genética que el análisis de conglomerados, especialmente en la ilustración del desarrollo varietal del algodón. Esto significa que el análisis de coordenadas principales se puede usar en gran medida, ya sea solo o en combinación con el análisis de conglomerados para analizar la diversidad genética y el desarrollo varietal en los genotipos del algodón.

Noormohammadi, Shojaei, Sheidai, Farahani & Alishah (2011a) empleando marcadores moleculares ISSR Y RAPD para analizar la diversidad genética de 12 genotipos del cultivar de algodón Mehr (*Gossypium hirsutum*) incluyendo sus progenies cruzadas, encontraron que 9 de 10 iniciadores ISSR, amplificaron 113 bandas polimórficas, con un promedio de 12.55 bandas por iniciador y 54.35 % de polimorfismo. El número medio de alelos diferentes (N_a), número de alelos efectivos (N_e), índice de Shannon (I), diversidad genética de Nei (H) fueron 1.55, 1.34, 0.29 y 0.196, respectivamente. Además, el porcentaje de polimorfismo varió de 22.2 a 80.0, N_a de 1.22 a 1.8, N_e de 1.03 a 1.50, I de 0.052 a 0.422 y H de 0.027 a 0.290. Por otra parte, 21 de 30 iniciadores RAPD amplificaron 220 bandas polimórficas, con un promedio de 10.47 bandas por iniciador y un porcentaje promedio de polimorfismo de 80.12 %. Así mismo, el número medio de alelos diferentes (N_a), número de alelos efectivos (N_e), índice de Shannon (I), diversidad genética de Nei (H) fueron 1.81, 1.51, 0.43 y 0.29, respectivamente. Cabe destacar que el porcentaje de polimorfismo varió de 20 al 100 %, N_a fue de 1.4 a 2.0, N_e de 1.1 a 1.83, I de 0.099 a 0.622 y H de 0.064

a 0.437. Los dendrogramas UPGMA y NJ, así como la agrupación bayesiana de datos ISSR, produjeron resultados similares respaldados por la ordenación de PCoA. La correlación co-fenética del árbol de NJ fue alta ($r= 0.96$). Los resultados mostraron que algunas bandas ISSR estaban presentes en las progenies F1, pero ausentes en los genotipos parentales, y viceversa. Este evento se presentó también en los marcadores RAPD.

Noormohammadi, Shawi, Sheidai & Alishah (2011b) empleando marcadores ISSR y RAPD para estudiar aspectos agronómicos y moleculares de trece genotipos de algodón F1 y F2 (*Gossypium hirsutum*), encontraron que de 30 iniciadores RAPD utilizados 19 de ellos produjeron un total de 191 bandas amplificadas, de las cuales 63 resultaron polimórficas, lo cual representa un 32.98 % de polimorfismo. Por otra parte 8 iniciadores ISSR amplificaron 86 bandas, de las cuales 27 fueron polimórficas. El porcentaje de polimorfismo fue de 31.39 %. Los resultados mostraron que algunas bandas estuvieron presentes en las progenies F1 pero ausentes en las progenies F2 del mismo genotipo. Además los valores medios de la diversidad genética (H) y los Índices de información de Shannon (I) para los marcadores ISSR en las progenies F1 fueron de 0.27 y 0.40, respectivamente; mientras que los mismos valores en las progenies F2 fueron 0.18 y 0.26, respectivamente. De manera similar, los valores medios de H e I de las progenies F1 para los marcadores RAPD fueron de 0.07 y 0.11, respectivamente; mientras que los mismos valores en las progenies F2 fueron 0.09 y 0.13. El ANOVA seguido de la Prueba Menos Significativa (LSD) mostró una diferencia significativa para la mayoría de los caracteres agronómicos estudiados. Además, los dendrogramas UPGMA y NJ, así como la agrupación bayesiana de datos ISSR y RAPD produjeron resultados similares, respaldados por el Análisis de Coordenadas Principales (PCO). La correlación co-fenética del árbol de NJ fue alta en ambos marcadores; $r=0.96$ para ISSR y $r=0.98$ para RAPD.

Dongre, Raut, Paikrao & Ashtiar (2011) investigando la diversidad genética de 24 germoplasmas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) resistentes a la plaga bacteriana y gusano de la cápsula, ampliamente cultivados en la India, por análisis RAPD, ISSR y SSR. Encontraron que 40 iniciadores RAPD y 19 iniciadores ISSR, revelaron un porcentaje de polimorfismo de 68.68 y 76.55 %, respectivamente, lo que indica que el marcador ISSR es más informativo que RAPD. Además, el valor de los coeficientes de similitud del dendrograma calculado por los marcadores RAPD e ISSR osciló entre 0.55 a 0.94 y 0.39 a 0.98, respectivamente.

Kumar, Khandelwal, Jha, Kumar & Shah (2009) empleando marcadores moleculares RAPD, ISSR e isoenzimas para analizar la diversidad genética de 9 líneas parentales de algodón de élite, encontraron que 25 iniciadores RAPD amplificaron 154 bandas, de las cuales 97 fueron polimórficas, que representan el 62.98 % de polimorfismo. El total de bandas amplificadas varió de 2 a 10, con un promedio de 6.16 bandas por iniciador. El número de bandas polimórficas varió de 0 a 9, con un promedio de 4.21 bandas por iniciador polimórfico y el porcentaje de polimorfismo varió de 0 a 100 %. Por otra parte, 3 iniciadores ISSR amplificaron 21 bandas, de las cuales 14 fueron polimórficas, que representan el 66.66 % de polimorfismo. El total de bandas amplificadas varió de 6 a 8, con un promedio de 7 bandas por iniciador. El número de bandas polimórficas varió de 3 a 6, con un promedio de 4.66 bandas por iniciador polimórfico y el porcentaje de polimorfismo osciló de 37.50 a 85.71 %. También, dos sistemas isoenzimáticos revelaron 14 bandas, de las cuales seis fueron polimórficas, que representan el 42.85 % de polimorfismo. El total de bandas varió de 6 a 8, con un promedio de 7 bandas. El número de bandas polimórficas varió de 1 a 5, con un promedio de 3 bandas y el porcentaje de polimorfismo fue de 16.66 a 62.50 %. El dendrograma UPGMA de las líneas de algodón mostró dos grupos principales. Y el análisis del coeficiente de similitud de Jaccard varió de 0 a 100 %.

Sharaf, El-kadi, Alatwani, Gamal El-Din & Abd El-Hadi (2009) citados por Parkhiya *et al.* (2014) estudiando diez cebadores ISSR para conocer la relación genética de genotipos de algodón encontraron una amplificación de 70 fragmentos, 62 de ellos polimórficos. Por lo anterior, el porcentaje de polimorfismo fue de 88.5 %. El índice de diversidad genética de Nei fue 0.28.

Wei, Hong-bo & Jue-min (2008), estudiando la diversidad genética de 48 accesiones de algodón con marcadores moleculares ISSR, encontraron que 11 cebadores de 60 que emplearon detectaron un total de 92 bandas, de las cuales 77 mostraron ser polimórficas. Por lo anterior, el porcentaje de bandas polimórficas fue 83.70 %. El análisis de conglomerados basado en ISSR mostró que el coeficiente de similitud genética (GS) de 48 accesiones varió de 0.27 a 0.93.

Dongre, Bhandarkar & Banerjee (2007) usando marcadores moleculares tipo SSR e ISSR para caracterizar la diversidad genética en algodón entre genotipos tetraploides (*G. hirsutum*) y diploides (*G. arboreum*) indicaron que el análisis de conglomerados no sólo mostró la separación de los genotipos de las dos especies principales (*G. arboreum* y *G. hirsutum*) en grupos diferentes, sino también la separación de los genotipos entre cada grupo. Cabe resaltar que de un total de 25 iniciadores SSR usados, 17 produjeron un total de 56 bandas polimórficas, 4 iniciadores fueron monomórficos y 4 produjeron bandas no evaluables y no reproducibles. Por otra parte, de 19 iniciadores ISSR usados, 15 produjeron 72 bandas polimórficas, 1 fue monomórfico y 3 produjeron bandas no evaluables y no reproducibles. Dongre *et al.* (2007), resaltan que los fragmentos polimórficos amplificados de los genotipos pueden estar asociados con rasgos morfológicos u otros caracteres agronómicos. El coeficiente de similitud basado en ISSR y marcadores microsatélites varió de 0.59 a 0.90 y 0.59 a 0.93, respectivamente, lo que sugiere una considerable variación genética entre las especies de algodón estudiadas. Tanto los ISSR como los marcadores SSR fueron útiles y consistentes en el análisis de diversidad

genética. Ambos sistemas marcadores indicaron la relación similar entre las dos especies *G. hirsutum* y *G. arboreum*.

Husseini, Amina, Soltan & Adawy (2006) citados por Parkhiya *et al.* (2014) utilizando doce iniciadores ISSR para estimar las relaciones genéticas entre veintidós accesiones de algodón, encontraron 125 bandas polimórficas con un 49.6 % de polimorfismo.

Dongre, Parkhi & Gahukar (2004) utilizando marcadores ISSR y RAPD para caracterizar 25 genotipos de algodón (*G. hirsutum*), encontraron similitudes significativas en la agrupación de ISSR y análisis de RAPD. En el análisis de dendrogramas por el método UPGMA, ISSR mostró tres grupos, mientras que el de RAPD mostró cuatro. El coeficiente de similitud de Jaccard de ISSR entre los 25 germoplasmas de algodón varió de 60 % a 95 %. Cabe destacar que de 45 iniciadores ISSR y 40 iniciadores RAPD que se utilizaron para amplificar los genotipos, 19 iniciadores ISSR fueron reproducibles, mientras que sólo 21 iniciadores RAPD fueron reproducibles; estos generaron 90 y 150 bandas, respectivamente. Doce de 19 iniciadores ISSR y 15 de 21 RAPD fueron polimórficos y mostraron 49 y 76 bandas, respectivamente. El porcentaje promedio de polimorfismo para ISSR y RAPD fue 54.44 % y 50.66 %, respectivamente. El tamaño de los productos amplificados para ISSR y RAPD fue de 100 a 1444 pb y de 100 a 2000 pb. El número promedio de bandas polimórficas por iniciador polimórfico para ISSR y RAPD, fue de 4.08 y 5.06, respectivamente. Además, se usaron seis valores agronómicos para la caracterización del germoplasma. El análisis mostró que 25 genotipos de algodón se agruparon en seis grupos principales. Se descubrió que los grupos del análisis de valor agronómico eran completamente diferentes de los análisis ISSR y RAPD. Además, uno de los objetivos de este estudio fue observar duplicados.

2.14. Literatura citada

- Abdi, A. A., Sofalian, O., Asghari, A., Shokrpour, M., Baqheri, H., & Seyyed M., S. Y. (2012).** Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers to Study Genetic Diversity Among Cotton Cultivars in Associated with Salt Tolerance. *Notulae Scientia Biologicae*, 4(4),120-126.
- Abou E., M. A., & Fayed, A. M. A. (2014).** Molecular fingerprinting in identifying genetic polymorphism and relationship with quantitative traits in some cotton genotypes. *Journal Agricultural Chemistry and Biotechnology Mansoura University*, 5(11), 235-251.
- Arjit & Nag. (2015).** Medical Value of Cotton. *International Journal of MediPharm Research*, 1(3),147-149.
- Ashraf, J., Malik, W., Iqbal, M. Z., Khan, A.A, Qayyum, A, Noor, E, Abid, M. A, Naseer C., H. M., & Ahmad, M. Q. (2016).** Comparative Analysis of Genetic Diversity among BtCotton Genotypes Using EST-SSR, ISSR and Morphological Markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(2),517-531.
- Báez, C. (2015).** Protegen al algodón nativo de Oaxaca. Agencia Informativa Conacyt. México. En línea: <http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/ambiente/847-protege-inifap-algodon-nativo-de-oaxaca>
- Bardak, A., & Bolek, Y. (2012).** Genetic diversity of diploid and tetraploid cottons determined by SSR and ISSR markers. *Turkish Journal of Field Crops*, 17(2), 139-144.
- Becelaere, G.V., Lubbers, E.L., Paterson, A. H., & Chee, P.W. (2005).** Pedigree- vs. DNA marker-based genetic similarity estimates in cotton. *Crop Science Society of America*, 45, 2281–2287.
- Bilwal, B. B., Vadodariya, K. V., Rakumar, B. K., & Lahane, G. R. (2017).** Genetic diversity of parents using RAPD, ISSR and SSR molecular markers in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 6(8), 51-57.
- Blasi D. A. & Drouillard J. (2002).** Composition and Feeding Value of Cottonseed Feed Products for Beef Cattle. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service MF-2538:1-20.
- Casas, A., & Caballero, J. (1995).** Domesticación de plantas y origen de la agricultura en Mesoamérica. *Ciencias*, 40, 36-45.
- CONABIO & SEMARNAT. (2009).** Cuarto Informe Nacional de México al Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB). Comisión Nacional para el

Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D.F.pp:1-187.

- CONABIO. (2012).** *Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal, 2012-2030*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. pp:1-91.
- Culley M.T. & A.D. Wolfe. (2001).** Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, 86,545-556.
- Dahab, A. A., Saeed, M. & Mohamed, B. B. (2013).** Genetic diversity assessment of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genotypes from Pakistan using simple sequence repeat marker. *Australian Journal of Crop Science*, 7(2), 261–267.
- Diamond, J. (2002).** Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418(6898), 700-707.
- Dongre, A. B., Bhandarkar, M. & Banerjee, S. (2007).** Genetic diversity in tetraploid and diploid cotton (*Gossypium spp.*) using ISSR and SSR DNA markers. *Indian Journal Biotechnology*, 6(3), 349-353.
- Dongre, A. B., Raut, M., Paikrao, V., & Ashtikar, S. S. (2011).** Use of RAPD and ISSR for determining genetic diversity of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Working Sample Journal of Cotton Research and Development*, 25(2), 137-143.
- Dongre, A., Parkhi, V., & Gahukar, S. (2004).** Characterization of Cotton (*G. hirsutum*) Germplasm by ISSR, RAPD Markers and Agronomic Value. *Indian Journal Biotechnology*, 3(3), 388-393.
- Espinosa L. (2007).** Guía práctica sobre la técnica de PCR. *En: Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). Ecología molecular*. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., México. pp:517-526.
- Feng, Ch., M. Ulloa, C. Perez M. & J. McD. Stewart. (2011).** Distribution and Molecular Diversity of Arborescent *Gossypium* Species. *Botany*, 89(9), 615-624.
- Fisher G. S., Frank A. W. & Cherry J. P. (1988).** Total gossypol content of glandless cottonseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36 (1), 42-44.
- Fouad A., K., Abdallah K., Y., Mohammad E., Y., Mohammad E., M., & Abdelraouf S., Y. (2012).** Molecular Diversity of Egyptian Cotton (*Gossypium barbadense* L.) and its Relation to Varietal Development. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 15(2), 93-99.

- Franco, T. L & Hidalgo, R. (2003).** Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Colombia. 89p.
- Godoy, A. S., E. A. García C. & M. Manjarrez S. (2002.).** Establecimiento de un banco de germoplasma de especies silvestres y razas de algodón. Informe Anual de Actividades. CEIGUA-CIRPAS-INIFAP. México. 20p.
- Hawkes, J. G. (1983).** The diversity of crop plants. Harvard University Press. London, Inglaterra. pp:1-184.
- Hussein E., H. A., Amina, A. M., Soltan, A. M. & Adawy, S. S. (2006).** Molecular characterization and genetic relationship among cotton genotypes with RAPD, ISSR and SSR analysis. *Arabian Journal of Biotechnology*, 9(2), 222-229.
- IBPGR. (1985).** Descriptors for wheat. International Board for Plant Genetic Resources. Rome. 12p.
- ITIS. (2017).** Integrated Taxonomic Information System. En línea: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=21711#null
- Kandylis K., Nikokyris P. N. & Deligiannis K. (1998).** Performance of growing-fattening lambs fed whole cotton seed. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 78(2), 281-239.
- Kew. (2017).** The Royal Botanic Gardens. En línea: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30042843-2>
- Khanam, S. A., Sham, J. L., Bennetzen, & Aly, M. A. M. (2012).** Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Australian Journal Crop Science*, 6(8), 1236-1244.
- Kumar M., M., Khandelwal, V., Jha, S. K., Kumar, V., & Shah, R. R. (2009).** Genetic diversity analysis of elite parental lines of cotton using Rapd, Issr and isozyme markers. *Indian Journal Plant Physiology*, 14(2), 105-110.
- Kumar M., R., & Singh T., R. (2014).** Molecular Markers and their Application in Genetic Mapping. *European Academic Research*, 2(3), 4012-4040.
- Kumar M., T. (2002).** Assessment of genetic diversity of tea (*Camellia sinensis* L.O. Kuntze) by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction. *Euphytica*, 128(3), 307-315.
- León, J. (2000).** Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 3ª.edición revisada y aumentada. San José, Costa Rica. pp:1-522.

- Liu, B. & Wendel, J. F. (2001).** Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, 1(3), 205-208.
- Lowe A., Harris S, & Ashton P. (2004).** *Ecological Genetics. Design, Analysis and Application.* Blackwell Publishing. Company. MA. USA. 326p.
- Luna P, R., Castañon B, Antonio., & Raz G, A. (2011).** La biodiversidad en México: su conservación y las colecciones biológicas. *Ciencias*, 101, 36-43.
- Miles J., Maass B., & Valle C. (1998).** Brachiaria: Biología, Agronomía y Mejoramiento. CIAT. Colombia. 216p.
- Noormohammadi , Z., Hasheminejad A. F. , Y., Sheidai, M., Ghasemzadeh B., S., & Alishah, O. (2013).** Genetic diversity analysis in Opal cotton hybrids based on SSR, ISSR, and RAPD markers. *Genetics and Molecular Research*, 12(1), 256-269.
- Noormohammadi Z., Shojaei J., F., Sheidai M., Farahani F., & Alishah O. (2011a).** Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis of Genetic Diversity in Mehr Cotton Cultivar and its Crossing Progenies. *African Journal of Biotechnology*, 10(56), 11839-11847.
- Noormohammadi, Z., Farahani, Y. H. A., Sheidai, M., Baraki, S. G., & Alishah, O. (2013a).** Genetic Diversity Analysis in Opal Cotton Hybrids Based on SSR, ISSR, and RAPD markers. *Genetic and Molecular Research*, 12(1), 256-269.
- Noormohammadi, Z., Shawi A., M.T., Sheidai M., & Alishah O. (2011b).** ISSR, RAPD and agronomic study in some F1 and F2 cotton genotypes. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(2), 219-225.
- Noormohammadi, Z., Taghavi, E., Foroutanb, M., Sheidai, M. & Alishah, O. (2013b).** Structure Analysis of Genetic Diversity in Tetraploid and Diploid Cotton Genotypes. *International Journal Plant Animal and Environmental Sciences*, 3(1), 79-90.
- Parkhiya, S., Gohel, K., & Mehta, D. R. (2014).** Genetic diversity analysis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genotypes using ISSR markers. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture*, 1(1), 7-19.
- Patel, D. H., Patel, D. U., Jha, S., Rajkumar, B. K., & Kumar, V. (2014).** Genetic diversity assessment in cotton genotypes (*Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*) using PCR based markers. *Green Farming*, 5(6), 1016-1019.

- Pérez M., C., Tovar G., M. R., Pedraza S., M. E., Madrid C., E., Mijangos C., J. O., Enriquez Q., J. F., Flores Z., M., Tavitas F., L., & Obispo G., Q. (2011).** Evaluación, manejo y uso sustentable de los recursos genéticos del algodón en México. *En: Resultados en conservación, uso y aprovechamiento sustentable de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura.* 1ra Ed. pp:19-22.
- Pérez M., C., Tovar G., M. R., Obispo G., Q., Legorreta P., F. J., & Ruiz C., A. (2016).** Recursos genéticos del algodón en México: conservación *ex situ*, *in situ* y su utilización. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7 (1), 5-16.
- Pradeep M., Sarla N. & Siddiq E. (2002).** Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128 (1), 9-17.
- Prado, M. R., G. Quintín O. & S. Godoy A. (1978).** Algodón II. Panorama Nacional. *Análisis de los recursos genéticos disponibles a México.* Sociedad Mexicana de Fitogenética. México. pp:385-387.
- Preetha, S. & Raveendren T. S. (2008).** Molecular marker technology in cotton. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 3(2), 032-045.
- Rathore S., K., Campbell M., L., Sherwood, S., & Nunes, E. (2015).** Cotton (*Gossypium hirsutum L.*). *Methods in Molecular Biology*, 1224, 11-23.
- Rentería A., M. (2007).** Breve revisión de los marcadores moleculares. *En: Ecología Molecular.* Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Autónoma de México. 1er Ed. 573p.
- Saif, I., M. A., S., Riad, S., & Elbagoury, M. (2017).** Molecular Characterization of Some Egyptian cotton Varieties. *Alexandria Science Exchange Journal*, 38(1), 44-52.
- Sarukhán, J., Carabias, J., Koleff, P & Urquiza, T. (2012).** Capital natural de México: Acciones estratégicas para su valoración, preservación y recuperación. Comisión nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. pp:5-81.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SAGARPA. (2014).** Análisis de la cadena de valor en la producción de algodón en México. Informe final. México. pp:1-90.
- Seelanan, T., Schnabel, A. y Wendel, J.F. (1997).** Congruence and consensus in the cotton tribe (Malvaceae). *Systematic Botany*, 22(2), 259-290.
- Servicio Nacional de Inspección & Certificación de Semillas (2017).** En línea: <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/estudios-etnobotanicos-en-el-cultivo-de-algodon>

- Sethi, K., Siwach, P, Kumar V., S., & Sihag, M. (2015).** Assessing genetic diversity among *Gossypium arboreum* L., genotypes using ISSR markers. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 6(1), 201-208.
- Sharaf, A. N., El-kadi, D. A., Alatwani, H. F., Gamal El-Din, A. Y., & Abd El-Hadi A. A. (2009).** Genetic studies on some cotton genotypes using DNA molecular markers. In: 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture. pp:167-178.
- Sheidai, M., Noormohammadi, Z., Shojaei J., F., Ghsemzadeh B., S., Farahani, F., & Alishah, O. (2012).** Simple sequence repeat (SSR) and inter simple sequence repeat (ISSR) analyses of genetic diversity in tissue culture regenerated plants of cotton. *African Journal of Biotechnology*, 11(56), 11894-11900.
- Simpson J. (1997).** Amplified fragment length polymorphisms. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60(1), 73-76.
- Sonika & Sangwan, R. S. (2018).** Study of Genetic Diversity in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) of Cotton Leaf Curl Disease Resistant and Susceptible Genotypes by Using ISSRs. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(3), 570-582.
- The Plant List. (2013).** En línea: <http://www.theplantlist.org/browse/A/Malvaceae/Gossypium/>
- Ulloa, M., J. McD. Stewart, E. A. García C., S. Godoy A., A. Gaytán M. & S. Acosta N. (2006).** Cotton Genetic Resources in The Western States of México: *In situ* Conservation Status and Germplasm Collection for *Ex situ* Preservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(4), 653–668.
- UPOV. (2001).** Unión internacional para la protección de las obtenciones vegetales. Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad. Algodón. *Gossypium* L. 20p.
- Valadez, E., & Kahl, G. (1999).** Categorías básicas para el análisis de marcadores genético-moleculares. Depto. de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México. 182p.
- Vavílov, N. I. (1930).** México y Centroamérica como centro básico de origen de las plantas cultivadas del nuevo mundo. En: Revista de Geografía Agrícola. Estudios de la agricultura mexicana. Recursos Fitogenéticos de México. Universidad Autónoma Chapingo. pp:15-33.
- Vinent E. & O. Fajardo. (2007).** Parámetros agrícolas de ocho cultivares de algodón (*Gossypium hirsutum*) obtenidos en Cuba. *Ciencia e Investigación Agraria*, 34(2), 151-158.

- Wakelyn P. J., Bertoniere N. R., French A. D., Thibodeaux D. P., Triplett B. A., Rousselle M. A., Goynes J. R., Edwards J. V., Hunter L., McAlister D. D. & Gamble G. R. (2007).** *Cotton Fiber Chemistry and Technology*. CRC Press. 1 Ed. Boca Raton, Florida. 176p.
- Wei, J., Hong-bo, Z., & Jue-min, H (2008).** Genetic diversity in germplasm resources of cotton from different area based on ISSR markers. *Cotton Science China*, 20(5), 348-353.
- Wendel, J. F., & Grover, C. E. (2015).** Taxonomy and evolution of the cotton genus. In: Fang D, Percy R. (eds.). *Cotton*, Agronomy Monograph 24. Madison (WI): ASA-CSSA-SSSA. pp:25–44.
- Wendel, J.F., Brubaker, C. L., & Seelanan. T. (2010).** The origin and evolution of *Gossypium*. In: J.M. Stewart, D. Oosterhuis, J.J. Heitholt, and J.R. Mauney (eds.). *Physiology of cotton*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp:1–18.
- Wolfe A. (2000).** ISSR Resource Website. <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>
- Zamorano H, P. (2009).** La flora y fauna silvestres en México y su regulación. *Procuraduría Agraria*, 40(1), 159-167.
- Zietkiewicz E., Rafalski A. & Labuda D. (1994).** Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.

III. CARACTERIZACIÓN MÓRFOLÓGICA DE GERMOPLASMA DE ALGODÓN (*Gossypium hirsutum* L.) DE LA REGIÓN CAÑADA DEL ESTADO DE OAXACA

3.1. RESUMEN

México es considerado como uno de los reservorios de diversidad vegetal más importantes del mundo. Todas las especies tienen especial importancia. Por su parte, el algodón ha sido estudiado en las últimas décadas debido a que México es considerado centro de origen y de diversidad genética del género *Gossypium*, y representa un recurso genético potencialmente aprovechable en áreas de producción agrícola y pecuaria. Las investigaciones y trabajos en materia de recursos genéticos de algodón han sido limitadas por diversos factores. El presente trabajo tuvo como objetivo describir la morfología de accesiones de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) de la región de la Cañada de Oaxaca. Para el estudio se consideraron cinco poblaciones con 10 materiales colectados por cada una. Trece variables morfológicas fueron evaluadas. Los resultados indicaron que hubo una moderada variabilidad morfológica. En las accesiones se destacó la presencia de dos colores de fibra, blanca (88 %) y café (12 %), en un rango de longitud de 1.5 a 3.6 cm, en donde las longitudes de fibra más cortas fueron las de color café. Por tal motivo, hubo una correlación moderada negativa (-0.52) entre ambas variables. El dendrograma generado a partir de las trece variables evaluadas, mostró tres grupos principales, mismos que también se observaron en los resultados del análisis de componentes principales.

**MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF COTTON GERMPLASM
(*Gossypium hirsutum* L.) FROM THE CAÑADA REGION OF THE STATE OF
OAXACA**

3.2. ABSTRACT

Mexico is considered one of the most important reservoirs of plant diversity in the world. All these species have special importance. For its part, cotton has been studied in recent decades because Mexico is considered a center of origin and genetic diversity of the genus *Gossypium*, and represents a potentially useful genetic resource in areas of agricultural production and livestock. Research and work on cotton genetic resources has been limited by several factors. The objective of this work was to describe the morphology of cotton accessions (*Gossypium hirsutum* L.) from the region of 'La Cañada' of Oaxaca. For the study, five populations with 10 materials collected by each were considered. Thirteen morphological variables were evaluated. The results indicate that there was a moderate morphological variability. The presence of two fiber colors, white (88 %) and brown (12 %), was highlighted, which had a length range of 1.5 to 3.6 cm, where the shorter fiber lengths were brown fibers. For this reason, there was a moderate negative correlation (-0.52) between both variables. The dendrogram generated from the thirteen variables, formed three main groups, which were observed in the analysis of major components.

3.3. INTRODUCCIÓN

México es considerado como uno de los reservorios de diversidad vegetal más importantes del mundo, con 25,000 a 30,000 especies de plantas vasculares. Así mismo, en el ámbito geográfico, la parte considerada como Mesoamérica representa uno de los principales centros de domesticación de plantas. Se han documentado en México alrededor de 7, 000 especies de plantas útiles, de las cuales alrededor de 200 especies nativas se encuentran en estado avanzado de domesticación, incluyendo algunas especies de plantas de importancia mundial tales como el maíz, frijoles, chiles, calabazas, cacao, algodón, agaves y amarantos, entre otras (Casas & Parra, 2007). Todas estas especies tienen especial importancia. Por su parte el algodón es uno de los cultivos que en las últimas décadas ha sido estudiado por profesionales debido a sus nuevas formas de uso (León, 2000).

En este contexto, nuestro territorio es considerado centro de origen y de diversidad genética de *Gossypium hirsutum* L., (Hinze *et al.*, 2017). Esta diversidad genética permanece *in situ* y se encuentra limitada a plantas que crecen de manera casual en áreas de poco uso o como plantas de jardín en casas ubicadas en las comunidades rurales (Godoy, García & Manarrez, 2002). Sin embargo, aunque esta especie representa un recurso genético potencialmente aprovechable en áreas de producción agrícola y pecuaria (Ulloa *et al.*, 2006), las investigaciones y trabajos en materia de recursos genéticos de algodón han sido limitadas por diversos factores, como la falta de recursos humanos y financieros para explorar, recolectar y utilizar la diversidad existente de algodón en el país (Pérez *et al.*, 2011).

En México, el estado de Oaxaca es una de las 27 entidades en las que se encuentra el mayor número de especies silvestres del género *Gossypium* distribuidas en sitios específicos (Báez, 2015). Se tienen registros sobre la presencia de éste género en varias regiones de este Estado. Sin embargo, en la

Región de la Cañada Oaxaqueña se dispone de escasos estudios biológicos sobre *Gossypium*.

Por tal motivo, la presente investigación tuvo como objetivo describir la morfología de accesiones de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) de la región de la Cañada de Oaxaca con base en descriptores UPOV o botánicos y así contribuir al conocimiento de la biología de éste taxón.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Localización del experimento

La fase experimental de la presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.4.2. Material vegetal

El material vegetal se recolectó en cinco localidades, cuatro pertenecientes al Distrito de Teotitlán de Flores Magón en la Región Cañada del Estado de Oaxaca y uno perteneciente al Estado de Puebla (Cuadro 3), todas ellas pertenecientes a la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán. Diez individuos de *G. hirsutum* fueron colectados en cada localidad. Los órganos vegetales colectados se guardaron en bolsas plásticas con cierre hermético, debidamente identificadas. Las muestras se mantuvieron en una hielera para mantenerlas en frescas hasta su traslado al laboratorio y así evitar o disminuir la pérdida de material por daño mecánico. A su llegada al laboratorio se colocaron en refrigeración hasta su posterior análisis.

Cuadro 3. Sitios de colecta de material vegetal de algodón *Gossypium hirsutum* L.

Población	Localidad	Ubicación geográfica	Municipio/Estado
1	Santa María Tecomavaca	LN: 17°57' LO: 97°01' Altura: 600 msnm.	Santa María Tecomavaca, Oaxaca
2	San Juan de los Cués	LN: 18°03' LO: 97°03' Altura: 860 msnm	San Juan de los Cués, Oaxaca
3	San Martín toxpalan	LN: 18°06' LO: 96°03' Altura: 1020 msnm	San Martín toxpala, Oaxaca
4	Teotitlán de Flores Magón	LN: 18°08' LO: 97°04' Altura: 1020 msnm	Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca
5	San Rafael	LN: 18°18' LO: 97°14' Altura: 874 msnm	Coxcatlán, Puebla

3.4.3. Evaluación de descriptores

Los caracteres seleccionados fueron evaluados de acuerdo con Bioversity International (IBPGR, 1985) y la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2001), utilizando 10 plantas por población.

- **Longitud de cápsula (LC).** Se midió con un vernier electrónico en centímetros (cm).
- **Ancho de cápsula (AC).** Se midió con un vernier electrónico en centímetros (cm).
- **Número de semillas por cápsula (NSC).** Se contó el número de semillas después de la dehiscencia de los frutos.
- **Longitud de hoja (LH).** Se midió con un vernier electrónico en centímetros (cm).

- **Ancho de hoja (AH).** Se midió con un vernier electrónico en centímetros (cm).
- **Área foliar (AF).** El área foliar fue calculada con el programa de análisis de imagen ImageJ versión 1.46.
- **Longitud de fibra (LF).** Se midió con un vernier electrónico en centímetros (cm).
- **Longitud de semilla (LS).** Se midió con un vernier electrónico en centímetros (cm).
- **Ancho de semilla (AS).** Se midió con un vernier electrónico en centímetros (cm).
- **Forma de hoja (FH).** La forma de la hoja fue clasificada como palmada (1), palmada a digitada (2), digitada (3) y lanceolada (4).
- **Forma de la sección longitudinal de cápsula (FSLC).** La forma de la sección longitudinal fue clasificada como redonda (1), elíptica (2), oval (3) y cónica (4).
- **Prominencia de la punta de cápsula (PPC).** La prominencia de la punta de cápsula fue clasificada en débil (3), media (5) y fuerte (7).
- **Color de fibra (CF).** El color de la fibra se clasificó como blanco (1), crema (2), café claro (3) y café (4).

3.4.4. Análisis de datos

Se elaboró una matriz en Excel a partir de los datos recabados de cada carácter evaluado para su posterior análisis en el programa NTSYS (Numerical Taxonomic Analysis System) versión 2.21 (Rohlf, 2002), en el cual se realizó un análisis “cluster” utilizando el coeficiente de distancia taxonómica media (DIST) para determinar relaciones entre las poblaciones. El análisis consistió en la elaboración de dendrogramas que representaran datos cualitativos, cuantitativos y una mezcla de ellos, para su mejor interpretación. Fue necesario realizar una estandarización previa en el programa antes mencionado con el fin de que los caracteres tuvieran la misma amplitud. Además, se realizó un

Análisis de Componentes Principales (ACP), obteniendo gráficos en 2D y 3D, siguiendo el mismo procedimiento anterior, con el fin de observar agrupamientos con características similares a partir de los resultados de las mediciones. Se realizó también un análisis de correlación entre características evaluadas y una tabla de datos estadísticos típicos que nos permitieran un mejor análisis e interpretación de los resultados. Los datos anteriores se obtuvieron con el programa estadístico R X 64 versión 3.3.2 . Finalmente, se realizó una prueba de Mantel que nos permitiera conocer la correlación que existe entre datos cualitativos, cuantitativos y la matriz mixta, así como su comparación con los resultados de marcadores moleculares.

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 6 se muestran características de los órganos de plantas de *Gossypium hirsutum* L. colectados en la región Cañada del estado de Oaxaca.



Figura 1. Órganos de *Gossypium hirsutum* L. A. Flor. B. Cápsula. C. Fibra. D. Hoja. E. Hábito de crecimiento.

3.5.1. Análisis de valores estadísticos generales

Para cada carácter evaluado se determinó la media, desviación estándar, varianza, coeficiente de variación y los valores mínimos y máximos, los cuales se muestran en el Cuadro 4.

Todas las características presentaron datos relevantes para el presente análisis, sin embargo, algunos de ellos sobresalen por sus valores. Tal es el caso del número de semillas por cápsula (NSC) el cual fue muy variable, ya que se obtuvo un mínimo de 5 y un máximo de 28 semillas por cápsula, con un promedio de 13 semillas. Lo que indicó que existen diferentes tamaños de cápsula tanto en longitud como en ancho.

Otra variable sobresaliente fue la longitud de fibra (LF), la cual estuvo en un intervalo de 1.5 a 3.6 cm, con un promedio de 2.2. El 80 % de los individuos evaluados tuvieron longitudes de fibra menores a 2.5 cm, ubicándose en la clasificación descrita por León (2000), como pertenecientes a las especies de *G. arboreum* y *G. herbaceum*. Cabe destacar que con esta mención no se afirma que los materiales colectados pertenezcan a estas especies. Las longitudes de fibra más cortas fueron las fibras de color café en comparación con las blancas, las cuales estuvieron en un rango de 1.56 a 1.90 cm.

Por otra parte, el coeficiente de variación más alto lo obtuvo el color de fibra con 72.4 %, lo cual parece estar relacionado con que 88 % de las fibras analizadas fueron de color blanco y las restantes (12 %) de color café.

Respecto a las hojas, como se aprecia en la Figura 6, existe una alta diversidad fenotípica. Ello se puede relacionar con los datos mostrados en el Cuadro 4, donde se observan los intervalos de longitud y ancho de hoja. En relación a esto, Uscanga (2013), al evaluar la variación foliar del algodón (*Gossypium hirsutum*) silvestre y cultivado en México de seis meta-poblaciones propuestas

por Wegier (2013), encontró que las poblaciones silvestres de algodón presentan dos formas foliares correspondientes a los morfo-tipos Okra y Normal, conocidos en el algodón domesticado. Además, la diversidad foliar se distribuyó de manera heterogénea en las meta-poblaciones, mismas que mantuvieron distinta variación foliar ($F=12.20$, $P<0.0001$) y no todas resultaron ser distintas entre sí. Así mismo, indicó que la frecuencias de las dos formas foliares parece estar relacionada con las condiciones de precipitación. Cabe destacar que en la meta-población Pacífico Sur que incluye el estado de Oaxaca, los individuos presentaron hojas de lóbulos cortos. Materiales de tres localidades del estado de Oaxaca como Morro Ayuta (Costa), San José del Progreso (Valles Centrales) y Santiago Jamiltepec (Costa), presentaron hojas tipo Normal, Okra y Okra, respectivamente. No se presentaron datos para la Región Cañada.

Cabe resaltar, que algunas otras variables no fueron consideradas para su evaluación, ya que desde la selección de variables se consideraron poco discriminantes. Tal es el caso del color de los pétalos de la flor, ya que todos resultaron ser amarillos al final de su desarrollo. Así mismo, todas las flores presentaron mancha en la base del pétalo. El color del polen fue amarillo en todos los individuos. Estos resultados concuerdan con los datos reportados por el SNICS (2017), al evaluar 58 accesiones de algodón pertenecientes a cinco especies del género *Gossypium* originarias de 11 estados. Se encontró que 25 accesiones pertenecientes a la especie *G. hirsutum* raza palmerii, tuvieron flores de color amarillo. Sin embargo, el 77 % no presentaron manchas y mostraron polen en su mayoría color crema. Lo que podría indicar que se trata de una raza de *Gossypium hirsutum* diferente a la que se encuentra en la región Cañada del Estado de Oaxaca. En éste contexto, Pérez, Tovar, Obispo, Legorreta & Ruiz (2016), mencionaron que *G. gossypoides* es endémica del estado de Oaxaca, y tiene presencia en la región de la Cañada, junto con *Gossypium hirsutum* L. Cabe destacar, que para esta última especie se presentaron dos colores de fibra, banca y café. Unido a esto, Pérez *et al.*

(2016), menciona que geográficamente en el sur del país se concentra la mayor diversidad genética del género *Gossypium*.

Cuadro 4. Valores estadísticos generales para las variables evaluadas en accesiones de algodón de la región Cañada Oaxaqueña.

Variable	Estadísticos					
	Media	Desviación estándar	Varianza	Coficiente de variación (%)	Mínimo	Máximo
Longitud de cápsula (LC)	2.2	0.4	0.2	19.6	1.3	3.9
Ancho de cápsula (AC)	1.7	0.3	0.1	14.9	1.2	2.6
Número de semillas por cápsula (NSC)	13.4	4.1	17.0	30.7	5.0	28.0
Longitud de hoja (LH)	5.1	0.8	0.6	15.0	3.4	6.9
Ancho de hoja (AH)	5.4	0.7	0.5	13.6	3.9	7.3
Área foliar (AF)	3.2	0.8	0.6	23.5	1.2	4.9
Longitud de fibra (LF)	2.2	0.4	0.1	16.4	1.5	3.6
Longitud de semilla (LS)	0.8	0.2	0.0	25.8	0.6	2.1
Ancho de semilla (AS)	0.5	0.1	0.0	27.9	0.4	1.3
Forma de hoja (FH)	1.4	0.5	0.2	35.7	1.0	2.0
Forma de la sección longitudinal de cápsula (FSLC)	2.7	0.6	0.3	21.0	1.0	3.0
Prominencia de la punta de cápsula (PPC)	6.2	1.0	1.0	16.0	5.0	7.0
Color de fibra (CF)	1.4	1.0	1.0	72.4	1.0	4.0

Además, El número de carpelos de la cápsula fue de tres a cuatro. Respecto al hábito de crecimiento, la mayoría de los individuos fueron de tipo arbustivo, mientras que algunos otros tuvieron apariencia de árbol.

El conjunto de resultados obtenidos, indican la existencia de alta variabilidad fenotípica, y dadas sus características es posible su evaluación agronómica para su incorporación a programas de mejoramiento genético.

3.5.2. Análisis de correlación de caracteres

Durante la caracterización de las variables se encontraron correlaciones positivas y negativas (Cuadro 5). Entre ellas, el ancho de cápsula (AC) mantuvo una correlación fuerte y positiva con la longitud de cápsula (LC) con un valor de $r= 0.79$; esto puede significar que los factores que intervienen en el crecimiento o no de la cápsula de algodón, hacen, que a medida que crece una, lo hace también la otra variable. Similarmente, el ancho de hoja (AH) tuvo una correlación fuerte y positiva con la longitud de hoja (LH) con un valor de $r= 0.76$. El número de semillas por cápsula (NSC) también mostró una correlación intermedia y positiva ($r= 0.57$) con el ancho de cápsula (AC) y una correlación positiva que va de moderada a débil ($r= 0.50$) con la longitud de cápsula (LC). Lo que posiblemente indicó, que el número de semillas por cápsula depende en gran medida del ancho de la misma y no tanto de su longitud. Además, la longitud de fibra (LF) mostró correlación moderada y positiva ($r= 0.52$) con la longitud de cápsula (LC), mientras que mantuvo una correlación positiva que va de moderada a débil ($r= 0.50$) con el ancho de cápsula (AC). Lo que sugiere que ésta variable depende en gran medida de la longitud del fruto y no tanto del ancho. Entre las correlaciones negativas obtenidas destaca el color de fibra (CF), la cual estableció una correlación moderada negativa con la longitud de fibra (LF) con un valor de $r= -0.52$. Se observó que las fibras de color café mostraron una longitud inferior en comparación con las fibras de color blanco. Finalmente, para algunas variables se presentaron correlaciones prácticamente inexistentes o nulas, tanto positivas como negativas. Tal es el caso del ancho de la semilla (AS), forma de la hoja (FH) y color de fibra (CF), las cuales no presentaron correlación con el número de semillas por cápsula (NSP), ancho

de cápsula (AC) y la forma de la sección longitudinal de la cápsula (FSLC), respectivamente.

Cuadro 5. Coeficientes de correlación de las características de accesiones del algodón de la región Cañada Oaxaqueña.

Accesión	LC	AC	NSC	LH	AH	AF	LF	LS	AS	FH	FSLC	PPC	CF
LC	1												
AC	0.79	1											
NSC	0.50	0.57	1										
LH	0.13	0.27	0.26	1									
AH	0.25	0.28	0.18	0.76	1								
AF	0.23	0.08	0.15	0.07	0.13	1							
LF	0.52	0.50	0.23	0.15	0.08	0.09	1						
LS	0.14	0.10	0.08	0.10	0.06	-0.03	0.02	1					
AS	0.05	0.02	0.00	-0.08	-0.05	-0.04	-0.18	0.05	1				
FH	-0.11	0.00	-0.16	0.06	0.05	-0.31	0.07	-0.11	0.16	1			
FSLC	-0.40	-0.37	-0.24	-0.16	-0.05	-0.10	-0.22	-0.40	0.02	-0.22	1		
PPC	0.27	-0.03	-0.06	-0.13	0.06	0.15	0.02	0.27	-0.29	-0.07	-0.21	1	
CF	-0.04	-0.19	0.04	-0.19	-0.01	0.16	-0.52	-0.04	0.42	-0.02	0.00	-0.08	1

Longitud de cápsula (LC), Ancho de cápsula (AC), Número de semillas por cápsula (NSC), Longitud de hoja (LH), Ancho de hoja (AH), Área foliar (AF), Longitud de fibra (LF), Longitud de semilla (LS), Ancho de semilla (AS), Forma de hoja (FH), Forma de la sección longitudinal de cápsula (FSLC), Prominencia de la punta de cápsula (PPC), Color de fibra (CF).

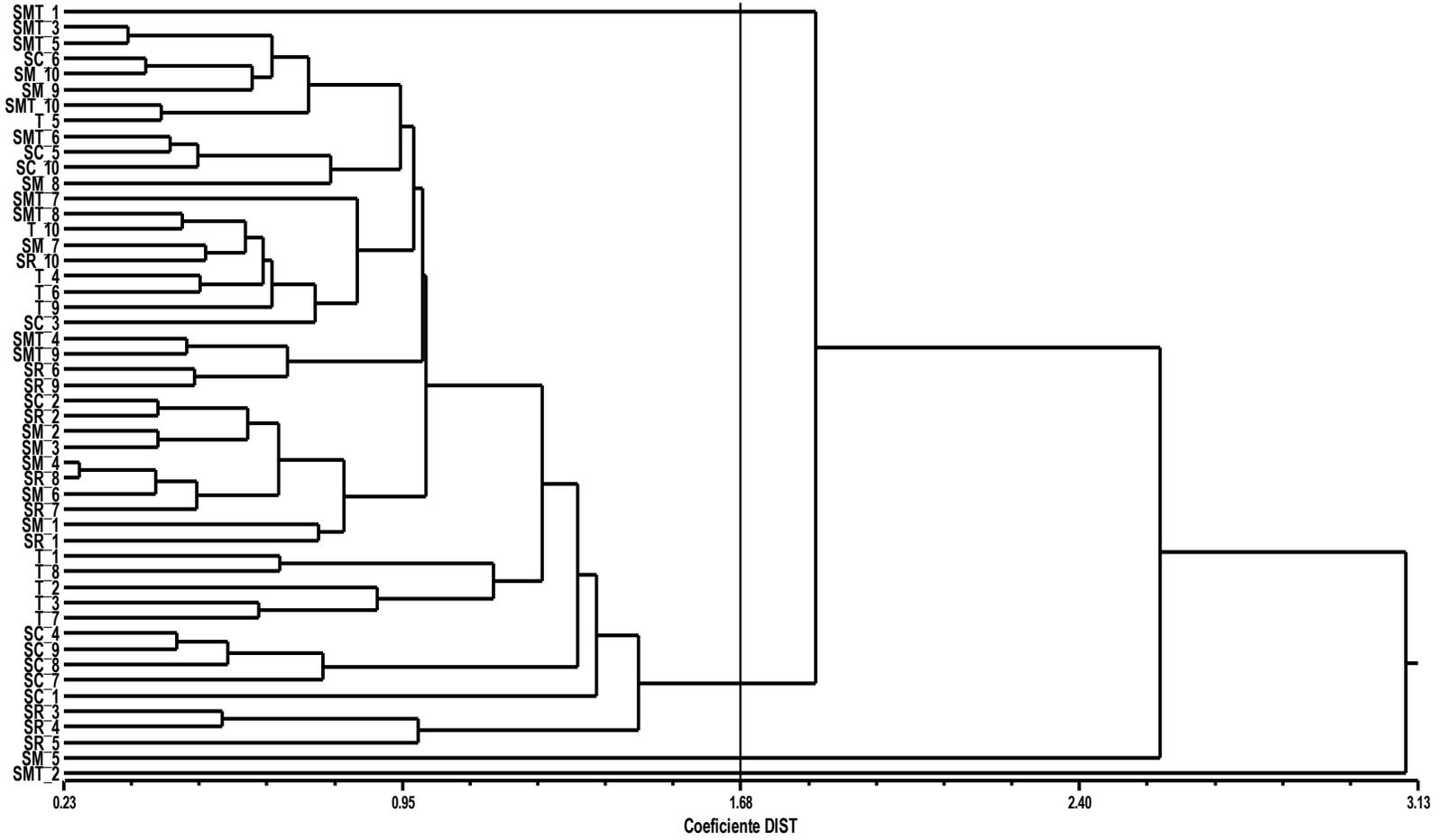
3.5.3. Relaciones entre las poblaciones

En la Figura 7A se muestra el dendrograma construido usando datos de variables cualitativas, en el cual se estableció una línea de corte a un coeficiente de distancia DIST de 1.02, formándose 9 grupos. Los individuos de una misma población no todos agruparon juntos, sino que algunos se mezclaron con los de otras poblaciones, lo que sugiere que las poblaciones están muy relacionadas, posiblemente debido a que existe fuerte flujo genético entre las mismas. Los dendrogramas para variables cuantitativas (Figura 7B) y cualitativas-cuantitativas (Figura 7C) formaron 4 grupos principales. Ambos dendrogramas presentaron similitud en el agrupamiento de los individuos de las poblaciones.

Para definir de manera más precisa las relaciones entre las poblaciones y para evitar la mezcla de individuos entre las mismas, se usó promedios de las variables evaluadas para construir los dendrogramas que se muestran en la Figura 8. El dendrograma generado usando variables cualitativas (Figura 8A) muestra la formación de tres grupos principales. El primer grupo incluyó únicamente a la población de Santa María Tecomavaca (SMT). El segundo grupo integró a las poblaciones de San Juan de los Cués (SC) y San Rafael (SR). En el tercer grupo se encuentran San Martín Toxpalan (SM) y Teotitlán de Flores Magón (T). Según los datos cualitativos las poblaciones más relacionadas son SC y SR, luego SM y T y la más alejada es SMT.

Por otra parte, tanto el dendrograma construido usando variables cuantitativas (Figura 8B) como el dendrograma para variables cualitativas-cuantitativas (Figura 8C) agruparon a las poblaciones en tres grupos principales. El primero incluyó únicamente a la población de Santa María Tecomavaca (SMT). El segundo agrupó a las poblaciones de San Juan de los Cués (SC), San Martín Toxpalan (SM) y San Rafael (SR) y el tercer grupo lo formó la población de Teotitlán de Flores Magón (T). Las poblaciones más relacionadas fueron SM y SR, mientras que la más alejada fue T. También, cabe destacar que en éste análisis, la población de Santa María Tecomavaca (SMT) siempre se diferenció de las demás al ubicarse como un solo grupo.

B. CUANTITATIVO



C. CUALITATIVO-CUANTITATIVO

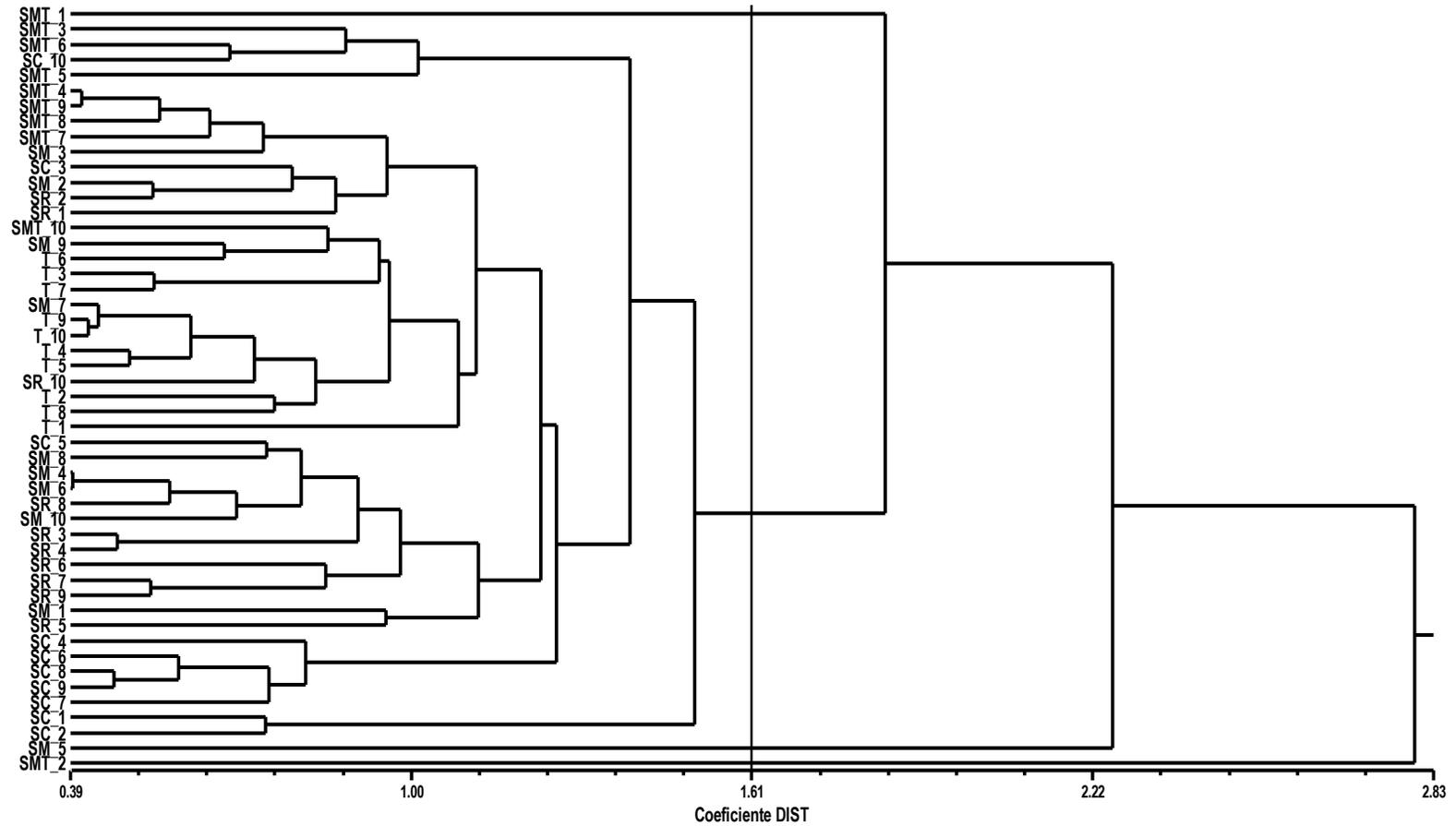


Figura 2. Dendrogramas generados usando datos de caracteres morfológicos cualitativos (A), cuantitativos (B) y cualitativos-cuantitativos (C) y el coeficiente de distancia taxonómica media (DIST) a partir de accesiones de algodón. El dendrograma representa accesiones de 5 poblaciones evaluadas usando caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

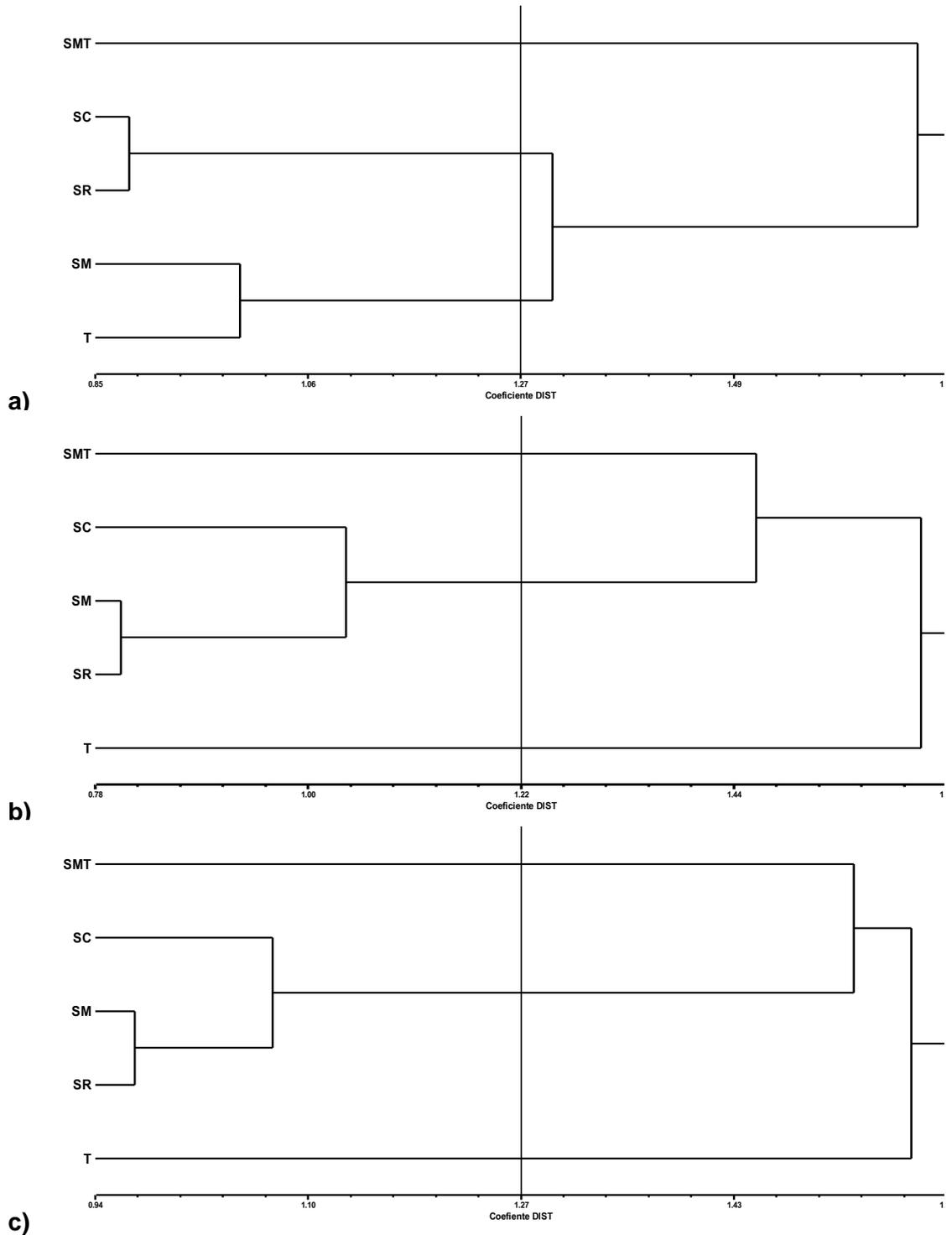


Figura 3. Dendrogramas generados usando datos de caracteres morfológicos de accesiones de algodón y el coeficiente de distancia taxonómica media (DIST). a) Con caracteres morfológicos cualitativos. b) Con caracteres morfológicos cuantitativos. c) Con caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

3.5.4. Análisis de componentes principales

3.5.4.1. Análisis de componentes principales para variables cualitativas

Los datos indicaron que el primer Componente Principal (CP) explicó el 31.92 % de la variabilidad total (Cuadro 6), seguido de los segundo, tercer y cuarto componentes principales con valores de 27.14, 24.51 y 16.43 %. Cabe destacar, que los dos primeros componentes son los de mayor importancia ya que concentraron más de 50 % de la variabilidad total.

Cuadro 6. Eigen valores de cuatro componentes principales según las variables morfológicas cualitativas de accesiones de algodón.

CP	Eigen valores	Porcentaje (%)	Porcentaje acumulado (%)
1	1.28	31.92	31.92
2	1.09	27.14	59.06
3	0.98	24.51	83.57
4	0.66	16.43	>100 %

Además, las variables que contribuyeron en mayor proporción al Componente 1 fueron: la forma de la sección longitudinal de la cápsula (FSLC), prominencia de la punta de cápsula (PPC) y la forma de hoja (FH). Las variables: forma de hoja (FH) y prominencia de la punta de cápsula (PPC) explicaron el Componente 2. Los Componentes 3 y 4 fueron explicados por el color de fibra (CF) y forma de la sección longitudinal de la cápsula (FSLC), respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Contribución de variables morfológicas cualitativas de accesiones de algodón, en sus primeros cuatro componentes principales.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4
Forma de hoja (FH)	0.53	0.68	0.28	0.43
Forma de la sección longitudinal de cápsula (FSLC)	-0.82	-0.10	0.20	0.53
Prominencia de la punta de cápsula (PPC)	0.54	-0.66	-0.29	0.43
Color de fibra (CF)	-0.20	0.42	-0.88	0.11

En la Figura 4 se muestran los gráficos en dos y tres dimensiones (2D y 3D, respectivamente) de los Componentes Principales, de las variables cualitativas.

Se observó la formación de 7 grupos. Igual que para los análisis realizados para obtener los dendrogramas, los individuos de las poblaciones se mezclaron entre sí, lo que sugiere que están muy relacionados.

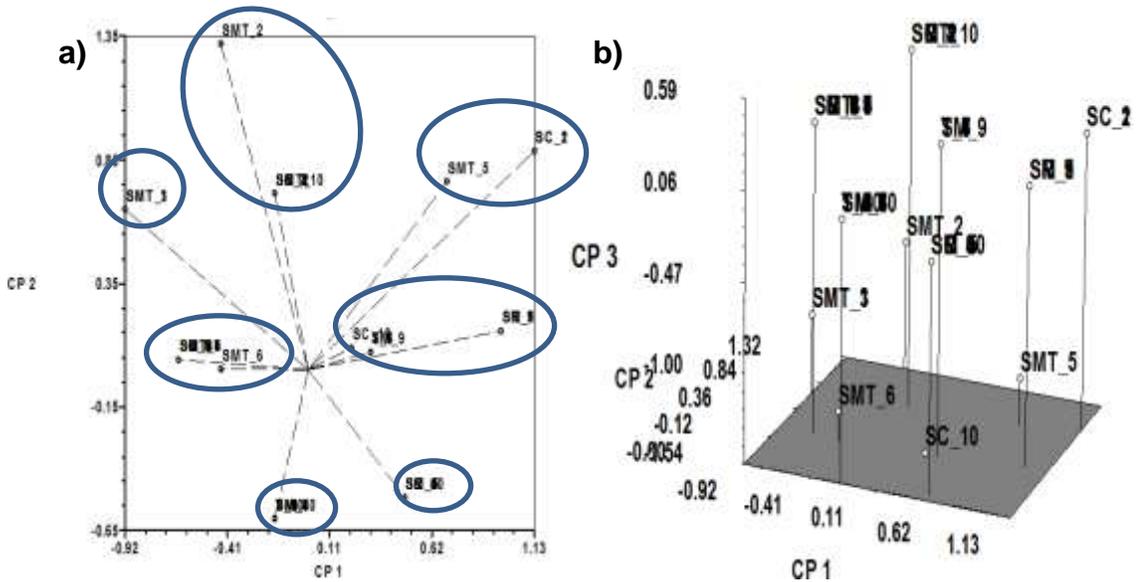


Figura 4. Componentes principales de variables morfológicas cualitativas evaluadas en materiales de algodón. a) Gráfico en 2D y b) 3D. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

Para definir de manera más precisa las relaciones entre las poblaciones y para evitar la mezcla de individuos entre las mismas, se usó promedios de las variables evaluadas para hacer los mismos análisis. Se apreció la formación de tres grupos tanto en el gráfico en 2D como en el de 3D (Figura 5). Un grupo integrado por las poblaciones de San Juan de los Cués y San Rafael, otro conformado por las poblaciones de San Martín Toxpalan y Teotitlán de Flores Magón y el tercer grupo lo conformó la población de Santa María Tecomavaca. Este mismo comportamiento se observó en el dendrograma de la Figura 3A.

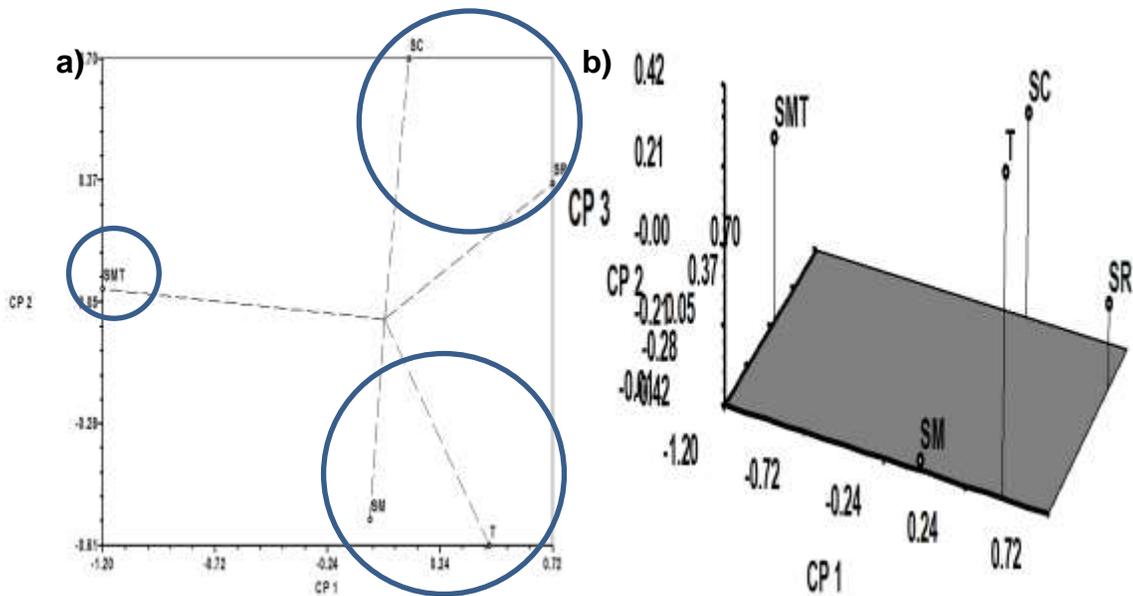


Figura 5. Proyección de las poblaciones sobre los componentes principales de variables morfológicas cualitativas de algodón. a) Gráfico en 2D y b) 3D. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

3.5.4.2. Análisis de componentes principales para variables cuantitativas

Los cuatro primeros Componentes Principales (CP) concentraron la mayor variabilidad total (Cuadro 8). El primer Componente concentró 32.85 % de variabilidad, el segundo 20.53 %, el tercero 16.49 % y el cuarto 10.79 %. Los dos primeros Componentes fueron los de mayor importancia ya que concentraron más del 50 % de la variabilidad total.

Cuadro 8. Eigen valores de los componentes principales según las variables morfológicas cuantitativas de accesiones de algodón de la Cañada Oaxaqueña.

CP	Eigen valores	Porcentaje (%)	Porcentaje acumulado (%)
1	2.96	32.86	32.86
2	1.85	20.53	53.39
3	1.48	16.49	69.88
4	0.97	10.80	80.67
5	0.76	8.41	89.08
6	0.48	5.33	94.41
7	0.22	2.49	96.90
8	0.16	1.74	98.64
9	0.12	1.36	>100%

Por otra parte, las variables que contribuyeron en mayor proporción al Componente 1 fueron: la longitud de cápsula (LC), ancho de cápsula (AC) y número de semillas por cápsula (NSC). Las variables: longitud de semilla (LS) y ancho de semilla (AS) explicaron el Componente 2. El Componente 3 es explicado por la longitud de hoja (LH) y ancho de hoja (AH). En tanto que el área foliar (AF) explicó el Componente 4 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Contribución de variables morfológicas cuantitativas de accesiones de algodón de la Cañada Oaxaqueña a los primeros cuatro componentes principales.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4
Longitud de cápsula (LC)	0.83	0.05	0.36	0.03
Ancho de cápsula (AC)	0.86	0.01	0.25	-0.16
Número de semillas por cápsula (NSC)	0.68	0.01	0.14	0.03
Longitud de hoja (LH)	0.54	-0.09	-0.76	-0.10
Ancho de hoja (AH)	0.55	-0.09	-0.75	0.00
Área foliar (AF)	0.27	-0.10	0.01	0.95
Longitud de fibra (LF)	0.60	-0.18	0.37	-0.17
Longitud de semilla (LS)	0.18	0.93	-0.08	-0.00
Ancho de semilla (AS)	0.01	0.96	-0.01	0.07

En los gráficos de los Componentes Principales de las variables cuantitativas se formaron dos grupos entre los individuos evaluados (Figura 6). En uno de ellos, se concentró la mayoría de los individuos pertenecientes a la población de Teotitlán de Flores Magón, que al parecer tienen características diferentes al resto de los individuos. En la otra agrupación hubo una aglomeración del resto de los individuos. Esto posiblemente porque comparten algunas características muy similares. Algunos individuos parecen poseer características muy diferentes al resto, ya que se concentraron en los límites del gráfico.

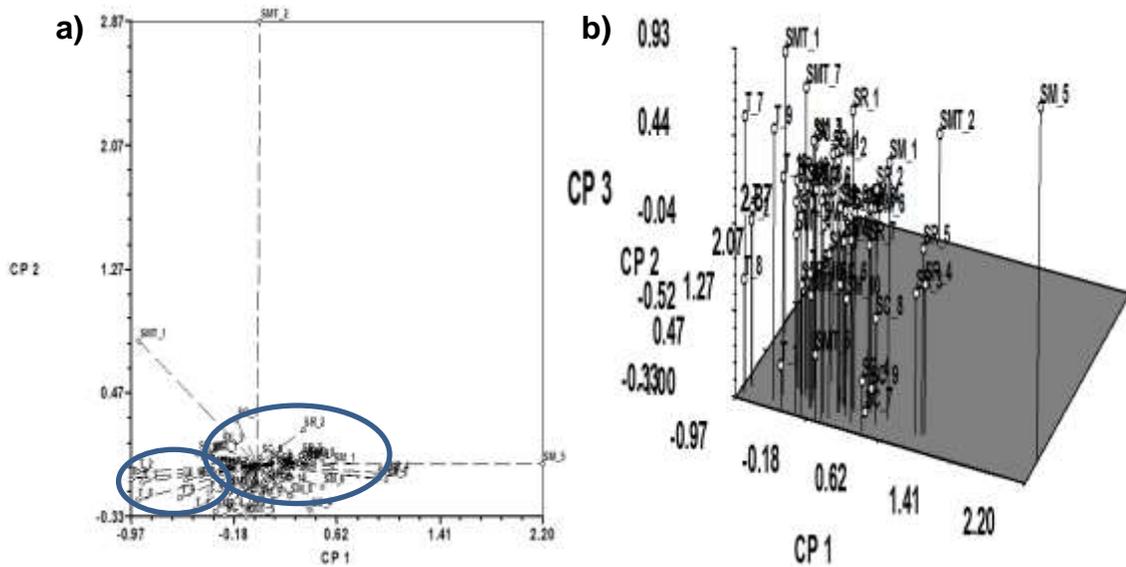


Figura 6. Componentes principales de variables morfológicas cuantitativas evaluadas en materiales de algodón. a) Gráfico en 2D y b) 3D. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

En la proyección de poblaciones sobre los Componentes Principales para el análisis de variables cuantitativas, se apreciaron tres agrupaciones principales (Figura 7), tanto en el gráfico en 2D como en el 3D. Un grupo conformado exclusivamente por la población de Santa María Tecomavaca, otro integrado por la población de Teotitlán de Flores Magón y el tercer grupo por las poblaciones de San Martín Toxpalan, San Juan de los Cués y San Rafael. Tanto los individuos como la población en general de la localidad de Teotitlán de Flores Magón se mostraron muy diferentes del resto.

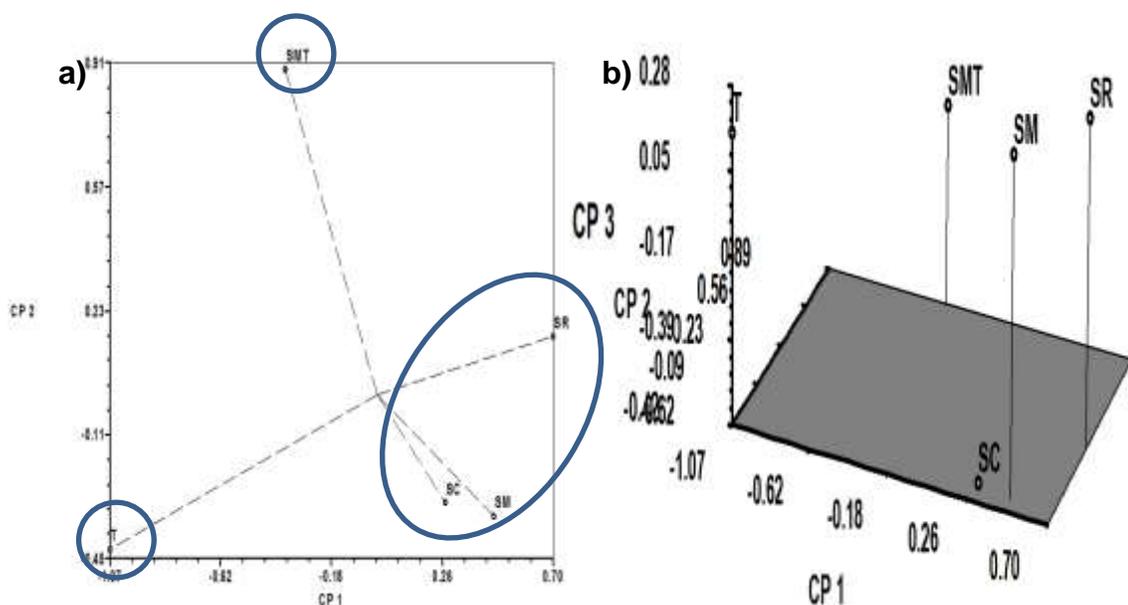


Figura 7. Proyección de las poblaciones sobre los componentes principales de variables morfológicas cuantitativas de algodón. a) Gráfico en 2D y b) 3D. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

3.5.4.3. Análisis de componentes principales para variables cualitativas y cuantitativas

Cuadro 10. Eigen valores de los componentes principales según las variables morfológicas cualitativas y cuantitativas de accesiones de algodón de la Cañada Oaxaqueña.

CP	Eigen valores	Porcentaje (%)	Porcentaje acumulado (%)
1	3.20	24.64	24.64
2	2.25	17.34	41.98
3	1.59	12.23	54.21
4	1.50	11.57	65.21
5	1.19	9.12	74.89
6	0.89	6.81	81.71
7	0.73	5.61	87.32
8	0.53	4.08	91.40
9	0.45	3.46	94.87
10	0.30	2.31	97.18
11	0.15	1.15	98.33
12	0.13	1.03	99.35
13	0.08	0.65	>100%

Los cuatro primeros Componentes Principales (CP) concentraron la mayor variabilidad total (Cuadro 10). El primer Componente concentró 24.64 % de variabilidad, el segundo 17.33 %, el tercero 12.23 % y el cuarto 11.57 %. Los tres primeros componentes fueron los de mayor importancia ya que concentraron más de 50 % de la variabilidad total.

En el análisis mixto de variables morfológicas cualitativas y cuantitativas, las variables que contribuyeron en mayor proporción al Componente 1 fueron: la longitud de cápsula (LC) y ancho de cápsula (AC) (Cuadro 11). Las variables: longitud de semilla (LS) y ancho de semilla (AS) explicaron el Componente 2. El Componente 3 fue explicado por la longitud de hoja (LH). En tanto que el ancho de hoja (AH) lo explicó el Componente 4. Cabe destacar que las variables más discriminantes en éste análisis fueron prácticamente las mismas que las que se presentaron en el Cuadro 9. Además, ninguna variable cualitativa resultó ser discriminante para éste ejercicio.

Cuadro 11. Contribución de variables morfológicas cualitativas y cuantitativas de accesiones de algodón de la Cañada Oaxaqueña a los primeros cuatro componentes principales.

Variable	CP1	CP2	CP3	CP4
Longitud de cápsula (LC)	0.84	0.09	0.36	0.13
Ancho de cápsula (AC)	0.86	0.12	0.08	0.17
Número de semillas por cápsula (NSC)	0.64	0.15	0.22	-0.12
Longitud de hoja (LH)	0.51	0.11	-0.61	-0.50
Ancho de hoja (AH)	0.49	0.11	-0.46	-0.61
Área foliar (AF)	0.25	-0.06	0.47	-0.46
Longitud de fibra (LF)	0.65	-0.18	-0.12	0.45
Longitud de semilla (LS)	0.06	0.88	-0.04	0.13
Ancho de semilla (AS)	-0.12	0.91	0.15	0.09
Forma de hoja (FH)	-0.03	0.27	-0.46	0.44
Forma de la sección longitudinal de cápsula (FSLC)	-0.50	-0.03	-0.14	-0.23
Prominencia de la punta de cápsula (PPC)	0.14	-0.47	0.34	-0.02
Color de fibra (CF)	-0.28	0.50	0.47	-0.38

En los gráficos de los Componentes Principales de las variables cualitativas y cuantitativas, al igual que en el ACP de variables cuantitativas, se observaron dos agrupaciones principales entre los individuos evaluados (Figura 8). El

comportamiento de los individuos fue muy similar, donde uno de los grupos concentró la mayoría de los individuos pertenecientes a la población de Teotitlán de Flores Magón y el segundo grupo incluyó al resto de los individuos de las poblaciones, donde algunos individuos se concentraron en los límites del gráfico.

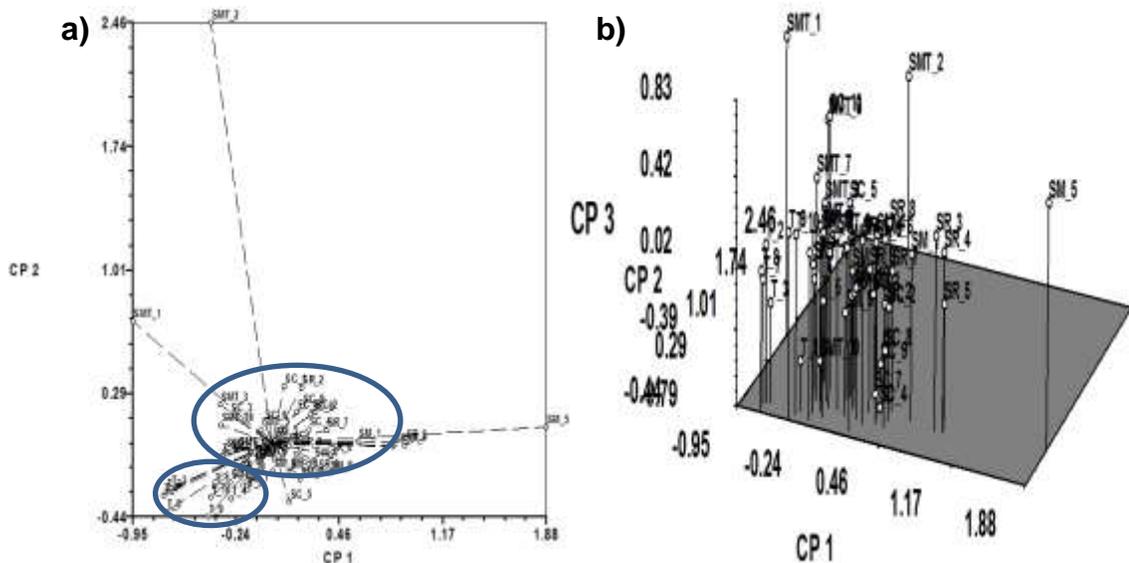


Figura 8. Componentes principales de variables morfológicas cualitativas y cuantitativas evaluadas en materiales de algodón. a) Gráfico en 2D y b) 3D. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

En la proyección de poblaciones sobre los Componentes Principales para el análisis de variables cuantitativas-cualitativas, se apreciaron tres agrupaciones principales, tanto en el gráfico 2D como en el 3D (Figura 9). El agrupamiento según éste análisis también fue muy similar a la proyección de variables cuantitativas, en dónde al parecer las variables cualitativas no tuvieron mucha influencia al realizar un análisis mixto. Las agrupaciones antes mencionadas fueron similares al dendrograma de la Figura 8c.

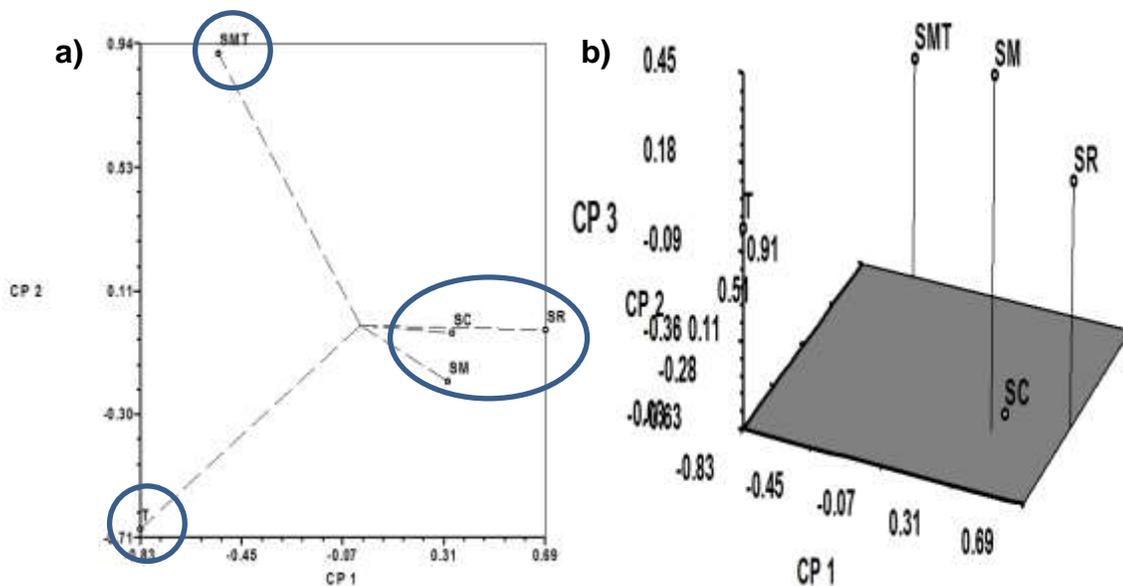


Figura 9. Componentes principales de variables morfológicas cualitativas y cuantitativas evaluadas en materiales de cinco poblaciones algodón. a) Gráfico en 2D y b) 3D. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

3.5.5. Comparación entre matrices

3.5.5.1. Prueba de Mantel entre matrices de variables cualitativas, cuantitativas y cualitativas-cuantitativas

Para determinar la correlación entre matrices de distancia generadas del análisis morfológico para variables cualitativas, cuantitativas y cualitativas-cuantitativas se realizó una prueba de Mantel en el programa NTSYS (Figura 15). El resultado del análisis de la prueba de Mantel para variables cualitativas vs cuantitativas fue de $r = 0.201$, lo que sugiere que las matrices presentan una correlación lineal positiva prácticamente inexistente (Figura 15a). Este comportamiento se puede apreciar en el Cuadro 5, en donde la mayoría de estos dos tipos de variables presentaron correlaciones prácticamente inexistentes o nulas, tanto positivas como negativas. Sin embargo, entre ellas el color de fibra (CF) y longitud de fibra (LF) destacaron al presentar una correlación fuerte negativa.

La prueba de Mantel para las matrices de distancia cualitativas vs matriz mixta resultó para $r = 0.524$ (Figura 15b). Lo que indicó que en general ambas matrices mantienen una correlación mediana y positiva. Mientras que el análisis de Mantel para las matrices de variables cuantitativas vs. matriz mixta presentaron $r = 0.932$ (Figura 15c), es decir alta y positiva. Siendo este, el valor de correlación más alto para este ejercicio. Los anteriores resultados parecen indicar que las variables cualitativas no son tan discriminantes o no aportan suficiente información para este tipo de análisis como lo hacen las variables cuantitativas. Otro factor de importancia que pudo influir en los resultados podría ser el hecho de que el número de variables cualitativas analizadas fue menor en comparación con el número de variables cuantitativas.

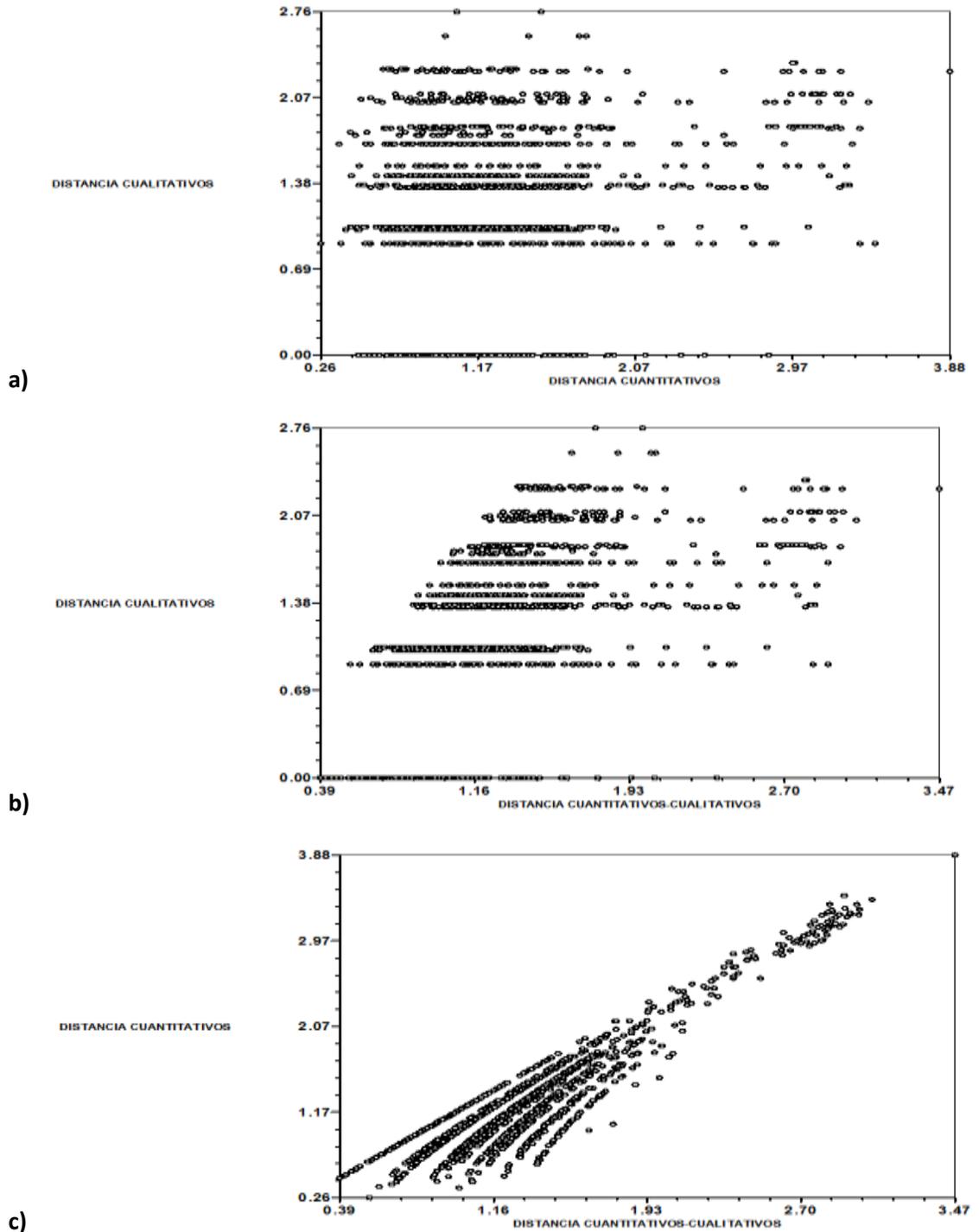


Figura 10. Diagramas de correlación resultantes de la prueba de Mantel usando matrices generadas con el coeficiente de distancia taxonómica media (DIST). a) Correlación entre datos cuantitativos vs. cualitativos. b) Correlación entre datos cuantitativos-cualitativos vs. cualitativos. c) Correlación entre datos cuantitativos-cualitativos vs. cuantitativos.

3.6. CONCLUSIONES

Se detectó la existencia de diversidad molecular en las colecciones de *Gossypium hirsutum* L. de la región Cañada del Estado de Oaxaca. Los marcadores morfológicos fueron efectivos para agrupar a las poblaciones. Además, se encontraron algodones con colores de fibra blanco y café. Hubo una correlación alta y positiva entre los marcadores morfológicos cuantitativos y los marcadores moleculares.

3.7. LITERATURA CITADA

- Báez, C. (2015).** Protegen al algodón nativo de Oaxaca. Agencia Informativa Conacyt. México. En línea :<http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/ambiente/847-protege-inifap-algodon-nativo-de-oaxaca>
- Casas, A., & Parra, F. (2007).** Agrobiodiversidad, parientes silvestres y cultura. *LEISA: Revista de agroecología*, 23(2), 5-8.
- Godoy, A. S., E. A. García C. & M. Manjarrez S. (2002.)**. Establecimiento de un banco de germoplasma de especies silvestres y razas de algodón. Informe Anual de Actividades. CEIGUA-CIRPAS-INIFAP. México. 20p.
- Hinze, L. L., Hulse K., A. M., Wilson, L. W, Zhu, Q., Llewellyn, D. J., Taylor, J. M., Spriggs, A., Fang, D. D., Ulloa, M., Burke, J. J., Giband, M., Lacape, J. M., Deynze, A. V., Udall, J. A., Scheffer, J. A., Hague, S., Wendel, J. F., Pepper, A. E., Frelichowski, J., Lawley, C. T., Jones, D. C., Percy, R. G., & Stelly, D. M. (2017).** Diversity analysis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) germplasm using the CottonSNP63K Array. *BMC Plant Biology*, 17(1), 37.
- IBPGR. (1985).** Descriptors for wheat. International Board for Plant Genetic Resources. Rome. 12p.
- León, J. (2000).** Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 3ª.edición revisada y aumentada. San José, Costa Rica. pp:1-522.
- Pérez M., C., Tovar G., M. R., Pedraza S., M. E., Madrid C., E., Mijangos C., J. O., Enriquez Q., J. F., Flores Z., M., Tavitás F., L., & Obispo G., Q. (2011).** Evaluación, manejo y uso sustentable de los recursos genéticos del algodón en México. *En: Resultados en conservación, uso y*

aprovechamiento sustentable de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. 1ra Ed. pp:19-22.

- Pérez M., C., Tovar G., M. R., Obispo G., Q., Legorreta P., F. J., & Ruiz C., A. (2016).** Recursos genéticos del algodón en México: conservación *ex situ*, *in situ* y su utilización. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7 (1), 5-16.
- Rohlf, F.J. (2002).** NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, Version 2.1. Exeter Publishing, Setauket, N.Y., U. S. A.
- Servicio Nacional de Inspección & Certificación de Semillas (2017).** En línea: <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/estudios-etnobotanicos-en-el-cultivo-de-algodon>
- Ulloa, M., J. McD. Stewart, E. A. García C., S. Godoy A., A. Gaytán M. & S. Acosta N. (2006).** Cotton Genetic Resources in The Western States of México: *In situ* Conservation Status and Germplasm Collection for *Ex situ* Preservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(4), 653–668.
- UPOV. (2001).** Unión internacional para la protección de las obtenciones vegetales. Directrices para la ejecución del exámen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad. Algodón. *Gossypium* L. 20p.
- Uscanga C., A. (2013).** Variación foliar del algodón (*Gossypium hirsutum*) silvestre y cultivado en México. Universidad Nacional Autónoma de México. pp:1-57.
- Wegier B., A. L. (2013).** Diversidad genética y conservación de *Gossypium hirsutum* silvestre y cultivado en México. Universidad Nacional Autónoma de México. pp:9-103.

IV. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE ALGODÓN (*Gossypium hirsutum* L.) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES ISSR

4.1. RESUMEN

El algodón es un cultivo importante en la industria agroalimentaria, ampliamente cultivado en todo el mundo. La importancia que tiene México a nivel mundial como centro de origen y de diversidad del algodón es de gran relevancia para el desarrollo de variedades que contribuyan a satisfacer problemas y demandas a las que nos enfrentamos en este siglo. La búsqueda de razas primitivas, cultivadas y formas silvestres en las regiones del sur de México pueden aportar un material valioso para su explotación. El primer paso en esta dirección es el estudio de la disponibilidad de variabilidad genética dentro de la especie. El presente estudio tuvo como objetivo describir molecularmente mediante marcadores tipo ISSR la variabilidad *intra* e *inter* poblacional de accesiones de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) colectadas en de la región de la Cañada de Oaxaca. Se consideraron cinco poblaciones con 10 materiales colectados por cada una. Para el análisis molecular se evaluaron 17 y 9 iniciadores ISSR, para la determinación de huellas genéticas y el análisis de diversidad, respectivamente. Los 17 iniciadores utilizados en el análisis de huellas genéticas, amplificaron un total de 80 bandas, de las cuales 41 fueron monomórficas y 39 fueron polimórficas, lo que permitió revelar un 50.04 % promedio de polimorfismo. En el análisis de diversidad genética dentro de poblaciones se encontró un porcentaje de *loci* polimórficos de 78 %, diversidad de Nei de 0.30 e Índice de Shannon de 0.44. El análisis AMOVA determinó que el 92 % de la variación genética se distribuyó dentro de las poblaciones y el resto (8 %) entre ellas. Se obtuvo un valor de diferenciación genética entre las poblaciones G_{ST} de 0.17 y un valor de individuos migrantes por generación N_m de 2.4.

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN COTTON POPULATIONS (*Gossypium hirsutum* L.) USING MOLECULAR MARKERS ISSR

4.2. ABSTRACT

Cotton is an important crop in the agri-food industry, widely cultivated throughout the world. The importance that Mexico has worldwide as a center of origin and diversity of cotton is of great relevance for the development of varieties that contribute to satisfy problems and demands that we face in this century. The search for primitive races, cultivated and wild forms in the southern regions of Mexico can provide valuable material for their exploitation. The first step in this direction is the study of the availability of genetic variability within the species. The objective of this study was to molecularly describe, using ISSR markers, the intra- and inter-population variability of cotton accessions (*Gossypium hirsutum* L.) collected from the region of 'La Cañada' of Oaxaca. Five populations with 10 materials collected per each were considered. For the molecular analysis, 17 and 9 ISSR primers were evaluated for the determination of genetic fingerprints and diversity analysis, respectively. The 17 initiators used in the analysis of genetic fingerprints amplified a total of 80 bands, of which 41 were monomorphic and 39 were polymorphic, which allowed revealing an average of 50.04 % polymorphism. In the analysis of genetic diversity within populations, a percentage of polymorphic *loci* of 78 %, Nei diversity of 0.30 and Shannon Index of 0.44 was found. The AMOVA analysis determined that 92 % of the genetic variation was distributed within the populations and the rest (8 %) among them. A value of genetic differentiation was obtained between the G_{ST} populations of 0.17 and a value of migrant individuals per generation N_m of 2.4.

4.3. INTRODUCCIÓN

El algodón como cultivo y como producto comercial básico desempeña un papel importante por sus diversos usos en la industria agroalimentaria, siendo ampliamente cultivado en todo el mundo. Es reconocido debido a su uso extensivo en la industria textil (Hinze *et al.*, 2017) por su buena calidad de fibra, así como por ser una buena fuente de aceite de cocina y alimento para el ganado (Ulloa *et al.*, 2006). En términos económicos, a través de su producción y procesamiento en la industria textil provee el sustento mediante la generación de empleos directos e indirectos de un número mucho mayor de personas en comparación con las fibras sintéticas (SAGARPA, 2014; Rathore, Campbell, Sherwood & Nunes, 2015).

En el mundo existe una gran diversidad genética de especies silvestres de algodón. Actualmente, 363 especies del género *Gossypium* han sido registradas, de las cuales 59 han sido aceptadas, 292 son sinónimos y 12 hay sin resolver (The Plant List, 2013). Sólo cuatro de ellas se cultivan. De estas cuatro especies, *G. arboreum* L. y *G. herbaceum* L., son diploides ($2n= 26$) y se denominan algodón del Viejo Mundo (África y Asia), mientras que las otras dos especies *G. hirsutum* L., y *G. barbadense* L., son tetraploides ($2n= 52$) y son conocidas como algodón del Nuevo Mundo (América) (Arjit & Nag, 2015). *G. hirsutum* y *G. barbadense* son las principales especies de algodón cultivado actualmente, representando el 90 % y 5 % de la producción mundial, respectivamente (León, 2000; Arjit & Nag, 2015).

En la actualidad, al igual que otros cultivos, la baja productividad del algodón se debe principalmente a la alta incidencia de plagas de insectos y enfermedades causadas por patógenos fúngicos, bacterianos y virales, siendo estos factores una amenaza para la producción de algodón. El uso de químicos para controlar estos factores bióticos no es económico y tampoco es tan efectivo. Además, puede ser peligroso para los seres vivos y el medio ambiente. Por lo tanto, el

desarrollo de variedades que contribuyan a satisfacer estas necesidades es fundamental para atender problemas y demandas globales y nacionales a las que nos enfrentamos en este siglo (Sonika & Sangwan, 2018).

México es centro de origen y de diversidad genética del género *Gossypium* (Brubaker & Wendel, 1994; CONABIO, 2012). En el territorio nacional se han encontrado varias especies silvestres. Once de las 13 especies de este género en el hemisferio occidental son endémicas de nuestro país, las cuales tienen relevancia cultural, económica y biológica en el mundo. De ellas, 11 son diploides (*G. armourianum*, *G. lobatum*, *G. gossypoides*, *G. aridum*, *G. laxum*, *G. shwendimanii*, *G. thurberi*, *G. trilobum*, *G. davisonii*, *G. turneri* y *G. harknesii*) y una tetraploide (*Gossypium hirsutum*) (Ulloa *et al.*, 2006; Feng, Ulloa, Pérez & Stewart, 2011; Pérez, Tovar, Obispo, Legorreta & Ruiz, 2016).

En nuestro territorio, el estado de Oaxaca es una de las 27 entidades en las que se encuentra el mayor número de especies silvestres del género *Gossypium* distribuidas en sitios específicos (Báez, 2015). Además, la Cañada oaxaqueña, es una región localizada dentro del polígono de la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán (RBTC) (UMAFOR, 2010), la cual ofrece una extraordinaria diversidad, y ha sido reconocida como un sitio de especial importancia en términos biológicos. Hasta antes del presente estudio, no se disponía de estudios biológicos sobre *Gossypium* en esta región de Oaxaca.

La búsqueda de razas primitivas, cultivadas y formas silvestres iniciales en las regiones montañosas del sur de México y las montañas de Guatemala pueden aportar materiales valiosos para la agricultura (Vavílov, 1930). Aunque estas especies silvestres siguen siendo un recurso genético, en gran parte sin explotar, abundan ejemplos de su inclusión productiva en programas de mejoramiento genético, los cuales dependen en gran parte de la disponibilidad de la variabilidad de este género (Godoy, García & Manarrez, 2002; Wendel, Brubaker & Seelanan, 2010).

El conocimiento de la diversidad genética de una especie es fundamental para su mejora. El mejoramiento del algodón a través del método convencional requiere mucho tiempo. La tecnología de marcadores de ADN proporciona a los fitomejoradores una herramienta para seleccionar plantas deseables directamente sobre la base del genotipo en lugar del fenotipo, ya que son más confiables y pueden reducir el tiempo y el dinero requeridos para las pruebas de campo (Preetha & Rveendren, 2008).

Para el estudio del algodón *Gosypium hirsutum* L., los marcadores moleculares conocidos como Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR) son una técnica simple, rápida y eficiente basada en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La cual tiene una alta reproducibilidad y no requiere radiactividad y es útil para el mapeo y la biología evolutiva en una amplia gama de especies de cultivos (Pradeep, Sarla & Siddiq, 2002).

Diversos estudios sugieren que los marcadores ISSR permiten obtener resultados altamente reproducibles y ayudan a la detección de alto polimorfismo, por lo que varios investigadores lo utilizan en diferentes áreas de mejoramiento de las plantas, así como en estudios de marcado de genes y análisis de diversidad genética (Ashraf *et al.*, 2016; Saif, Riad & Elbagoury, 2017; Sonika & Sangwan, 2018).

Teniendo en cuenta lo anterior, se planeó la presente investigación para describir molecularmente mediante marcadores tipo ISSR la variabilidad *intra* e *inter* poblacional de accesiones de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) colectadas *in situ*, a fin de conocer la diversidad genética presente en materiales de la región de la Cañada de Oaxaca.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1. Localización del experimento

La fase experimental de la presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.4.2. Material vegetal

El material vegetal se recolectó en cinco localidades, cuatro pertenecientes al Distrito de Teotitlán de Flores Magón en la Región Cañada del Estado de Oaxaca y uno perteneciente al Estado de Puebla (Cuadro 12), todas ellas pertenecientes a la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán.

Diez individuos de *G. hirsutum* fueron colectados en cada localidad. La distancia mínima entre individuos cercanos fue de 30 metros, para evitar coleccionar materiales emparentados. Se colectaron hojas jóvenes por cada individuo con un peso total de aproximadamente 50 g. Las hojas se guardaron en bolsas plásticas con cierre hermético, debidamente identificadas.

Las muestras se mantuvieron sobre una capa de hielo en una hielera para mantenerlas en frío hasta su traslado al laboratorio y así evitar o disminuir la pérdida de material por degradación del ADN. A su llegada al laboratorio se colocaron en un ultracongelador hasta su posterior extracción y purificación de ADN.

Cuadro 12. Sitios de colecta de material vegetal de algodón *Gossypium hirsutum* L.

Población	Localidad	Ubicación geográfica	Municipio/Estado
1	Santa María Tecomavaca	LN:17°57' LO:97°01' Altura: 600 msnm.	Santa María Tecomavaca, Oaxaca
2	San Juan de los Cués	LN: 18°03' LO: 97°03' Altura: 860 msnm	San Juan de los Cués, Oaxaca
3	San Martín toxpalan	LN: 18°06' LO: 96°03' Altura: 1020 msnm	San Martín toxpala, Oaxaca
4	Teotitlán de Flores Magón	LN: 18°08' LO: 97°04' Altura: 1020 msnm	Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca
5	San Rafael	LN: 18°18' LO: 97°14' Altura: 874 msnm	Coxcatlán, Puebla

4.4.3. Extracción y purificación de ADN genómico

Para la obtención de ADN genómico se utilizó el método descrito por Dellaporta (1983), al cual se le añadió polivinilpirrolidona (PVP) a 1 % en amortiguador de extracción de ADN (Tris-HCl 100 mM, EDTA-Na₂ 50 mM, NaCl 500 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, SDS 0.1 %, pH= 8.0) para evitar el aislamiento conjunto de compuestos fenólicos y polisacáridos en el ADN.

Las hojas frescas (0.3 g) se congelaron con nitrógeno líquido y se maceraron en un mortero para obtener un polvo fino. El producto se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 µL que contenían 750 µL de CTAB más 0.3 % de 2-mercaptoetanol, previamente colocados a 65 °C por 15 min. Posteriormente se agitaron suavemente y se incubaron por 30 min a 65 °C. Después de añadir 300 µL de acetato de potasio 5 M, se mezclaron suavemente e incubaron en hielo por 15 min. Los tubos se centrifugaron 5 min a 12,000 rpm. El

sobrenadante se transfirió a tubos nuevos de 1.5 µL y se lavaron con un volumen de 500 µL de cloroformo: octanol (24:1), se mezclaron suavemente por inmersión del tubo y se centrifugaron 5 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos eppendorf que contenían 500 µL de isopropanol frío para precipitar y se mantuvieron en congelación por 30 min. Para “peletizar” el ADN, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min y se decantó (eliminó) el sobrenadante. El ADN precipitado se resuspendió en 200 µL de solución de dilución y para eliminar el ARN se añadió 2 µL de ARNasa A por 1 h a 37 °C. Para precipitar el ADN nuevamente, se adicionó 20 µL de acetato de sodio 3M y 200 µL de isopropanol frío, se mezcló suavemente por inversión y se dejó incubar 1 h a -20°C. Se centrifugó a 12, 000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante. La pastilla de ADN que se formó se lavó en 200 µL de etanol frío al 70 % y se centrifugó nuevamente a 12, 000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar por 30 min. Por último, el producto precipitado se resuspendió en 100 µL de TE y se guardó en refrigeración a 4 °C.

4.4.4. Cantidad y calidad de ADN genómico

Para conocer la concentración de ADN ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) de cada muestra se realizó una dilución 1 en 100 agregando 10 µL de muestra de ADN + 990 µL de H₂O bi destilada estéril y por medio de un espectrofotómetro Genesys10 UV/Vis a una longitud de onda de 260 nm se midió la absorbancia y la concentración por medio de la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración ADN} \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right) = \frac{OD_{260\text{nm}} * 50 * 100}{1000}$$

Dónde:

$OD_{260\text{nm}}$ = Absorbancia.

50 = Factor.

100 = Factor de dilución.

1000 = Volumen total.

La calidad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v). Se mezcló 3 μL de ADN y una gota de amortiguador de carga (0.1 % azul de bromofenol, 0.1 % de xilen cianol, 30 % de Ficol y 1 % de SDS) y se cargó a los pozos del gel.

Como amortiguador de corrida se utilizó TAE 10X (40 mM Tris-acetato, pH 7.6, 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$), diluido a una proporción de 0.5X. La electroforesis se realizó a 100 V hasta que las muestras recorrieron tres cuartas partes del gel para luego ser teñido con bromuro de etidio (0.5 mg. mL^{-1}) por 15 min. Posteriormente el gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta KODAK EDAS-290.

4.4.5. Amplificación por PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo en 25 μL de reacción, compuesta de: 2.2 μL de H_2O PCR, 10 μL de dNTPs ($500 \mu\text{M}$), 2.5 μL de amortiguador 10X, 2.0 μL de MgCl_2 (25 mM), 3.0 μL de iniciador (10 pMol), 0.3 μL de Taq ADN polimerasa ($5\text{U.}\mu\text{L}^{-1}$) y 5.0 μL de ADN ($10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$). Los componentes de reacción se colocaron en tubos eppendorf de 200 μL .

El estudio a nivel molecular se realizó en dos fases. En la primera se obtuvo la huella genética de las poblaciones para determinar relaciones genéticas entre las mismas; mientras que en la segunda se obtuvieron patrones de 10 individuos de cada población para estimar la diversidad y estructura genética.

1. **Huella genética de poblaciones:** ADN de 10 individuos (5 μL por individuo) seleccionados al azar, se mezcló para determinar la huella genética de cada una de las poblaciones. El ADN se diluyó a una concentración de $10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$.

2. **Diversidad y estructura genética de las poblaciones:** el ADN de cada uno de los individuos colectados se analizó para estimar la diversidad genética y estructura genética de las poblaciones. La concentración del ADN fue de 10 ng.µL⁻¹.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador marca Techne TC-512 bajo las condiciones siguientes: un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 3 min fue seguido por 30 ciclos con un paso de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación o apareamiento del iniciador a 50 °C por 1 min y la amplificación a 72 °C por 2 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min.

Para realizar el análisis de huellas genéticas se utilizaron aquellos iniciadores que revelaron bandas durante la prueba de los mismos. En el Cuadro 13 se indica la secuencia de bases de los iniciadores utilizados.

Cuadro 13. Nombre y secuencia de bases de los iniciadores utilizados en el análisis de huellas genéticas de accesiones de algodón de Oaxaca-Puebla.

Número	Iniciador	Secuencia 5' - 3'
1	A2	CCGCCGCCGCCGCCGCCG
2	A3	CTCCTCCTCCTCCTCCTC
3	P2	CTGAGAGAGAGAGAGAGAG
4	P5	AGAGAGAGAGAGAGAGAG
5	7939	AGGAGGAGGAGGAGGAGG
6	7942	GAGAGAGAGAGAGAGAT
7	7943	AGAGAGAGAGAGAGAGC
8	7944	AGAGAGAGAGAGAGAGG
9	7946	GAGAGAGAGAGAGAGAA
10	7947	CTCTCTCTCTCTCTG
11	7948	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
12	7953	GGAGAGGAGAGGAGA
13	7954	TAGATCTGATATCTGAATTCCC
14	7955	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
15	7957	ACACACACACACACACYG
16	7960	DBDACACACACACACAC
17	7962	AGAGAGAGAGAGAGAGC

Para el análisis polimórfico de los individuos se eligieron, a partir de los patrones obtenidos en la huella genética de las poblaciones, los iniciadores más prometedores, en los que se identificó una mejor nitidez y separación de bandas y que generaron el mayor número de éstas, con el fin de obtener la mayor información posible. Por lo que se eligieron nueve iniciadores ISSR para el análisis (Cuadro 14).

Cuadro 14. Nombre y secuencia de los iniciadores utilizados en el análisis de diversidad genética.

Número	Iniciador	Secuencia 5´ - 3´
1	P2	CTGAGAGAGAGAGAGAGAG
2	P5	AGAGAGAGAGAGAGAGAG
3	7942	GAGAGAGAGAGAGAGAT
4	7944	AGAGAGAGAGAGAGAGG
5	7946	GAGAGAGAGAGAGAGAA
6	7953	GGAGAGGAGAGGAGA
7	7955	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
8	7957	ACACACACACACACACYG
9	7962	AGAGAGAGAGAGAGAGC

4.4.6. Electroforesis

Los productos amplificados de PCR de ISSR se separaron en un gel de agarosa al 1.2 % (p/v) utilizando TAE 0.5X como amortiguador. Esta actividad se realizó en una cámara electroforética horizontal a 120 V cargando 25 µL de muestra y de 1-2 µL de colorante de carga, por pocillo. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular (GeneRuler™, 0.1µg/µL, Fermentas). El tiempo de corrida de 1 h aproximadamente. Finalmente, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15 minutos y para la documentación de los patrones de bandas de ADN se utilizó el sistema Kodak High Performance Ultraviolet Transiluminator EDAS-290.

4.4.7. Análisis de datos

4.4.7.1. Huellas genéticas

Las bandas de ADN amplificadas y observadas en gel bajo transiluminador UV se codificaron como 1 para la presencia y 0 para la ausencia de bandas y se elaboró una matriz básica de datos en Excel, la cual, posteriormente fue analizada con el programa NTSYS (Numerical Taxonomic Analysis System) versión 2.21 (Rohlf, 2002), donde se utilizó el coeficiente de similitud de Dice (Dice, 1945), el cual expresa la probabilidad de que una banda en un individuo esté también en otro y es el índice que se ve menos afectado por las bandas erráticas cuando la similitud entre muestras se debe más a dobles presencias que a dobles ausencias. Los valores de similitud obtenidos en una matriz se utilizaron luego para agrupar poblaciones mediante el método de medias aritméticas (UPGMA) y obtener un dendrograma, tomando cada población como una unidad taxonómica operacional (OTU). Además, con los patrones de bandas obtenidos se determinó el número total de las mismas, así como el número de bandas polimórficas, monomórficas y el porcentaje de polimorfismo por cada iniciador evaluado. Finalmente, se realizó un análisis de Escalado Multidimensional para determinar la formación de grupos entre poblaciones, obteniendo gráficos en 2D y 3D.

4.4.7.2. Diversidad genética

Se elaboró una matriz binaria de datos en el programa Office Excel, a partir de las bandas obtenidas, las cuales se codificaron como 1 para la presencia y 0 para la ausencia de bandas. Posteriormente, se realizó el análisis de variabilidad genética intra e inter poblacional en el programa PopGen 1.31 (Yeh, Yang & Boyle, 1999), y se estimaron los siguientes parámetros: porcentaje de *loci* polimórficos (P), índice de diversidad genética de Nei (H) e índice de diversidad genética de Shannon (Lewontin, 1972). Además, con el mismo

programa se estimó el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}) y el número de individuos migrantes (N_m), parámetro que mide de manera indirecta el flujo génico entre las poblaciones. Se consideraron el mismo número de individuos para cada población. Para describir la estructura genética se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el programa Gen Alex (Peakall & Smouse, 2006) versión 6.5 (2012).

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. Huella genética de las poblaciones

El uso de marcadores moleculares ISSR permitió la identificación de polimorfismos en los materiales de algodón *Gossypium hirsutum* colectados en la región Cañada del estado de Oaxaca como se aprecia en la Figura 16.

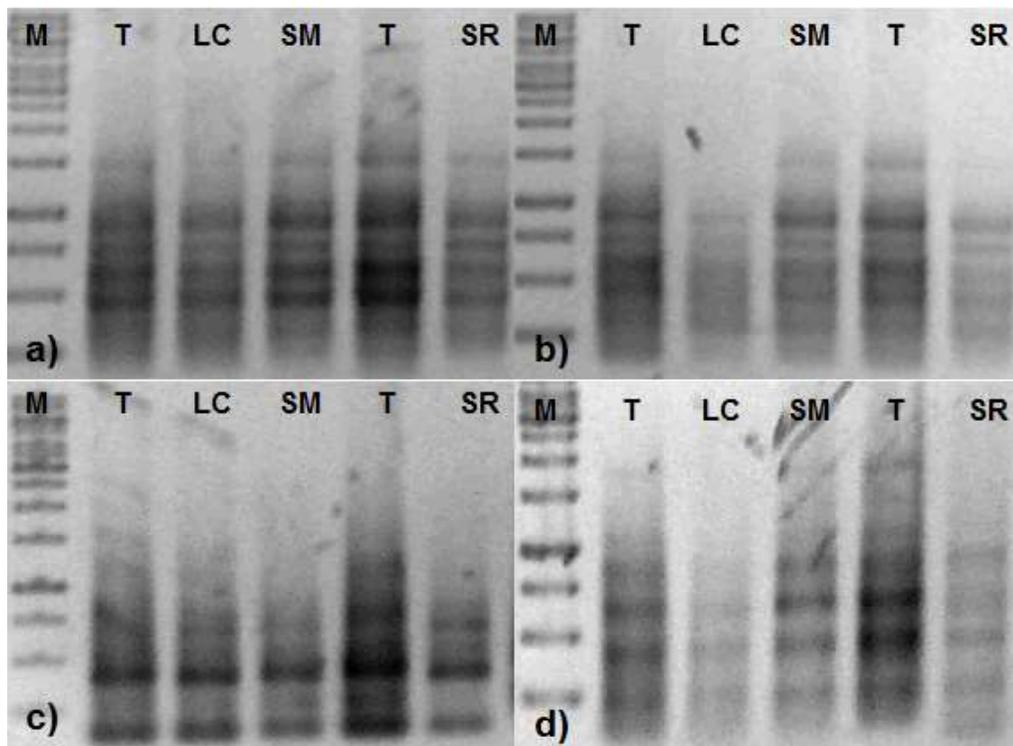


Figura 11. Amplificación ISSR de mezclas de ADN de 10 individuos correspondientes a las cinco poblaciones de algodón analizadas con los iniciadores: a) P2, b) P5, c) 7939 y d) 7962. M= Marcador de peso molecular, SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

Para determinar huellas genéticas en las poblaciones estudiadas, se evaluaron un total de 40 iniciadores ISSR. Entre estos, solo 17 revelaron bandas durante la prueba de iniciadores, los cuales se consideraron para el análisis. Además, para cada uno de ellos se determinó el número de bandas polimórficas, número de bandas monomórficas, total de bandas y porcentaje de polimorfismo. Los datos se muestran en la Cuadro 15.

Se obtuvo un total de 80 bandas, donde el iniciador 7962 reveló el mayor número de ellas (8), mientras que el iniciador 7954 amplificó el menor número de bandas (3). El promedio de bandas por iniciador fue 4.7. Además, se obtuvo un total de 39 bandas polimórficas, donde el mayor número de bandas polimórficas lo mostraron los iniciadores 7942 y 7953 (4), mientras que los iniciadores 7939, 7943 y 7954 revelaron el menor número de bandas polimórficas (1). El promedio de bandas polimórficas por iniciador fue 2.3. El porcentaje de polimorfismo varió de 25 a 100 % para los iniciadores 7939 y 7953, respectivamente; con un promedio de 50.4 %. Lo que indica que entre las poblaciones de algodón *Gossypium hirsutum* de la Región de la Cañada del estado de Oaxaca existe un polimorfismo moderado.

Por otra parte, con el total de bandas obtenidas se procedió a realizar una matriz binaria de datos (1, para la presencia y 0, para la ausencia) para la construcción de un dendrograma basado en datos de marcadores moleculares, como se muestra en la Figura 17.

Cuadro 15. Nombre, secuencia, número de bandas polimórficas, número de bandas monomórficas, total de bandas y porcentaje de polimorfismo de 17 iniciadores ISSR utilizados en el análisis de materiales de algodón de la región Cañada Oaxaqueña.

INICIADOR	NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	NÚMERO DE BANDAS POLIMÓRFICAS	NÚMERO DE BANDAS MONOMÓRFICAS	TOTAL DE BANDAS	PORCENTAJE DE POLIMORFISMO (%)
1	A2	CCGCCGCCGCCGCCGCCG	2	3	5	40.0
2	A3	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	3	1	4	75.0
3	P2	CTGAGAGAGAGAGAGAGAG	2	5	7	28.6
4	P5	AGAGAGAGAGAGAGAGAG	3	4	7	42.9
5	7939	AGGAGGAGGAGGAGGAGG	1	3	4	25.0
6	7942	GAGAGAGAGAGAGAGAT	4	1	5	80.0
7	7943	AGAGAGAGAGAGAGAGC	1	2	3	33.3
8	7944	AGAGAGAGAGAGAGAGG	2	2	4	50.0
9	7946	GAGAGAGAGAGAGAGAA	2	3	5	40.0
10	7947	CTCTCTCTCTCTCTG	3	1	4	75.0
11	7948	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	2	2	4	50.0
12	7953	GGAGAGGAGAGGAGA	4	0	4	100.0
13	7954	TAGATCTGATATCTGAATTCCC	1	2	3	33.3
14	7955	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	2	2	4	50.0
15	7957	ACACACACACACACACYG	2	3	5	40.0
16	7960	DBDACACACACACACAC	2	2	4	50.0
17	7962	AGAGAGAGAGAGAGAGC	3	5	8	37.5
TOTAL			39	41	80	-
PROMEDIO			2.3	2.4	4.7	50.04

4.5.1.1. Relaciones entre las poblaciones usando marcadores moleculares ISSR (dendrograma molecular)

Se generó una matriz de similitud con el programa NTSYS entre las poblaciones en estudio, cuyos valores obtenidos fueron altos (Cuadro 16). El intervalo de similitud varió de 0.765 a 0.947, que como puede apreciarse los valores no están muy lejanos. Esto podría indicar que las poblaciones no se encuentran muy diferenciadas y ello podría deberse a la mezcla aleatoria de ADN de individuos que se hizo para determinar las huellas genéticas. Las poblaciones que presentaron mayor similitud genética fueron las de Teotitlán de Flores Magón y Santa María Tecomavaca. Sin embargo, geográficamente no son las poblaciones más cercanas. Por el contrario, las poblaciones que presentaron menor similitud genética fueron las de San Rafael y Teotitlán de Flores Magón. Esto posiblemente porque aunque la distancia geográfica no es muy lejana, ambas poblaciones pertenecen a diferentes estados, Oaxaca y Puebla, respectivamente, y los materiales analizados pudieron haberse diferenciado a lo largo del tiempo.

Cuadro 16. Matriz de similitud entre las poblaciones de algodón mediante el uso del coeficiente de similitud de DICE.

	Santa María Tecomavaca (SMT)	San Juan de los Cués (SC)	San Martín Toxpalan (SM)	Teotitlán de Flores Magón (T)	San Rafael (SR)
Santa María Tecomavaca (SMT)	1				
San Juan de los Cués (SC)	0.8500	1			
San Martín Toxpalan (SM)	0.8571	0.8919	1		
Teotitlán de Flores Magón (T)	0.9474	0.8235	0.8764	1	
San Rafael (SR)	0.8158	0.9091	0.8857	0.7654	1

Al usar el método de agrupamiento de medias aritméticas (UPGMA), se obtuvo un dendrograma basado en marcadores moleculares ISSR, estableciéndose una línea de corte a un coeficiente de similitud de DICE de 0.885 (Figura 17).

Las poblaciones formaron dos grupos. El grupo I incluyó a las poblaciones de Santa María Tecomavaca y Teotitlán de Flores Magón. Mientras que el grupo II, se subdividió en dos subgrupos. En el primer subgrupo se agruparon las poblaciones de San Juan de los Cués y San Rafael, mientras que en el segundo subgrupo la población de San Martín Toxpalan (Figura 17).

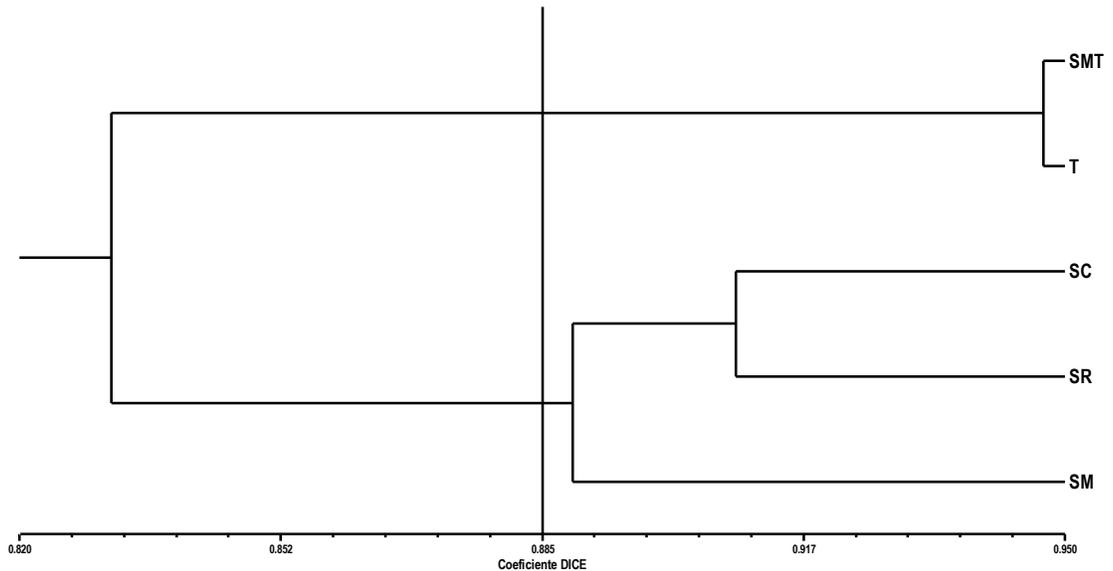


Figura 12. Dendrograma de cinco poblaciones de algodón basado en marcadores moleculares ISSR, el coeficiente de similitud de DICE y el método de agrupamiento UPGMA. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

4.5.1.2. Análisis de escalado multidimensional para determinar la formación de grupos entre poblaciones

A partir del cálculo de la matriz de similitud entre las poblaciones con datos de marcadores moleculares ISSR, se realizó un análisis de Escalado Multidimensional con el fin de observar la distribución y ordenamiento de las poblaciones. En la Figura 18 se muestran los gráficos en dos y tres dimensiones.

En ambos gráficos se aprecia la formación de dos grupos principales, semejantes a los formados en el dendrograma de la Figura 17. Un grupo lo conforman las poblaciones de Santa María Tecomavaca y Teotitlán de Flores Magón, mientras que el otro se subdivide en dos subgrupos, uno integrado por las poblaciones de San Juan de los Cués y San Rafael y otro por San Martín Toxpalan.

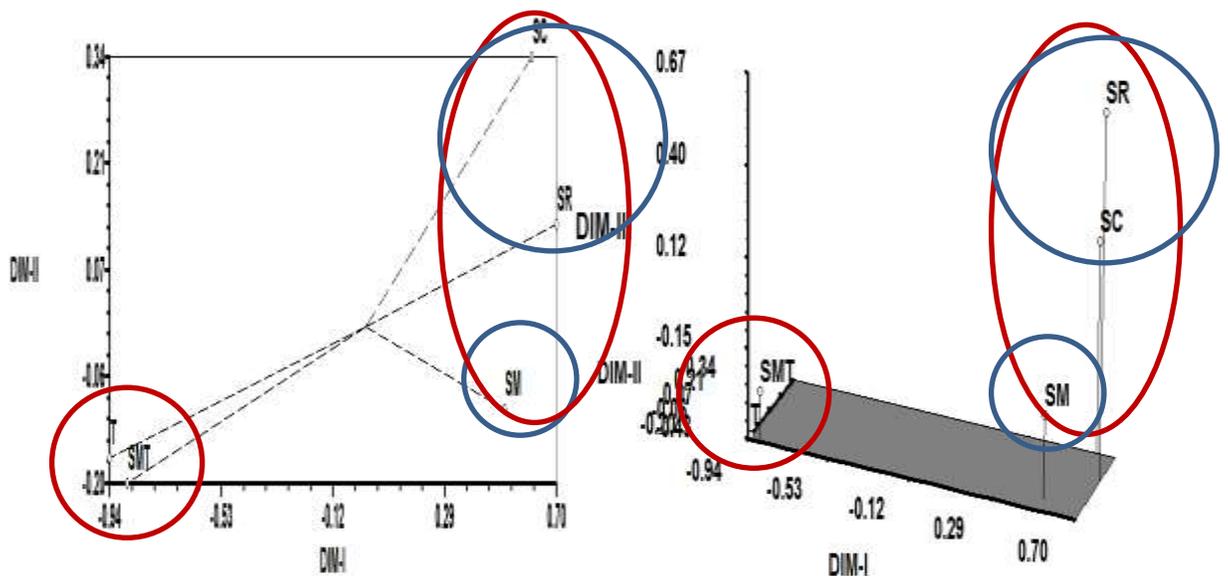


Figura 13. Análisis de Escalado Multidimensional. a) Gráfico en 2D y b) 3D. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

4.5.2. Comparación entre matrices

4.5.2.1. Prueba de Mantel entre matrices de variables cualitativas, cuantitativas y cualitativas-cuantitativas vs matriz de datos moleculares

Para determinar la correlación entre matrices de distancia generadas del análisis morfológico para variables cualitativas, cuantitativas y cualitativas-cuantitativas vs datos moleculares se realizó una prueba de Mantel en el Programa NTSYS (Figura 19). El valor de correlación entre la matriz de datos cualitativos vs datos moleculares fue igual a $r = 0.04957$ (Figura 19a), positivo pero muy bajo, cercano a cero.

Por otra parte, el análisis de la prueba de Mantel para las matrices de datos cuantitativos vs datos moleculares, dio como resultado $r = 0.629$ (Figura 19b). Este resultado indica que entre ambas matrices existe una correlación lineal alta y positiva. Mientras que la correlación para las matrices de datos mixtos vs datos moleculares dio como resultado $r = 0.578$ (Figura 19c). Lo que indicó que entre ambas matrices existe una correlación lineal mediana o intermedia y positiva. Cabe destacar que para este ejercicio el valor más alto de correlación fue para los datos cuantitativos vs datos moleculares, similares a los resultados de correlación obtenidos para las matrices de distancia de datos cuantitativos vs. datos mixtos.

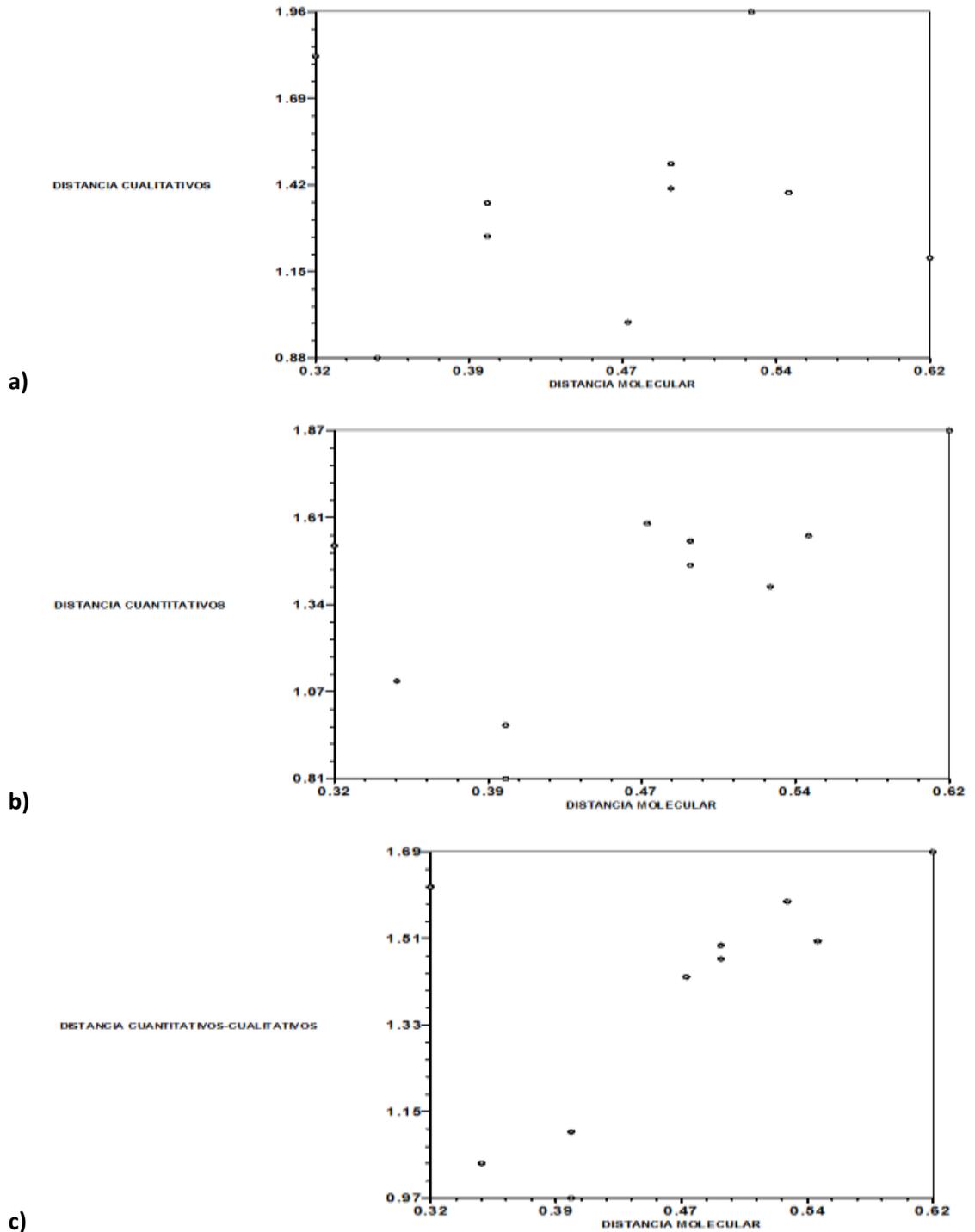


Figura 14. Diagramas de correlación resultantes de la prueba de Mantel y basados en el coeficiente de distancia taxonómica media (DIST). a) Correlación entre datos moleculares vs. cualitativos. b) Correlación entre datos moleculares vs. cuantitativos. b) Correlación entre datos moleculares vs. cuantitativos-cualitativos.

4.5.3. Análisis de diversidad genética

4.5.3.1. Análisis *intra* poblacional

En la Figura 20 se presentan algunos de los patrones de bandeo obtenidos por amplificación ISSR. Con los nueve iniciadores que se utilizaron se obtuvo un total de 79 bandas, con un promedio de nueve bandas por iniciador. El número de bandas estuvo en un intervalo de ocho (iniciadores P2, 7944, 7953, 7942, P5) a 11 (iniciador 7955). El porcentaje de polimorfismo fue alto, entre 75 a 100 %, con un promedio de 95.8 % (Cuadro 17).

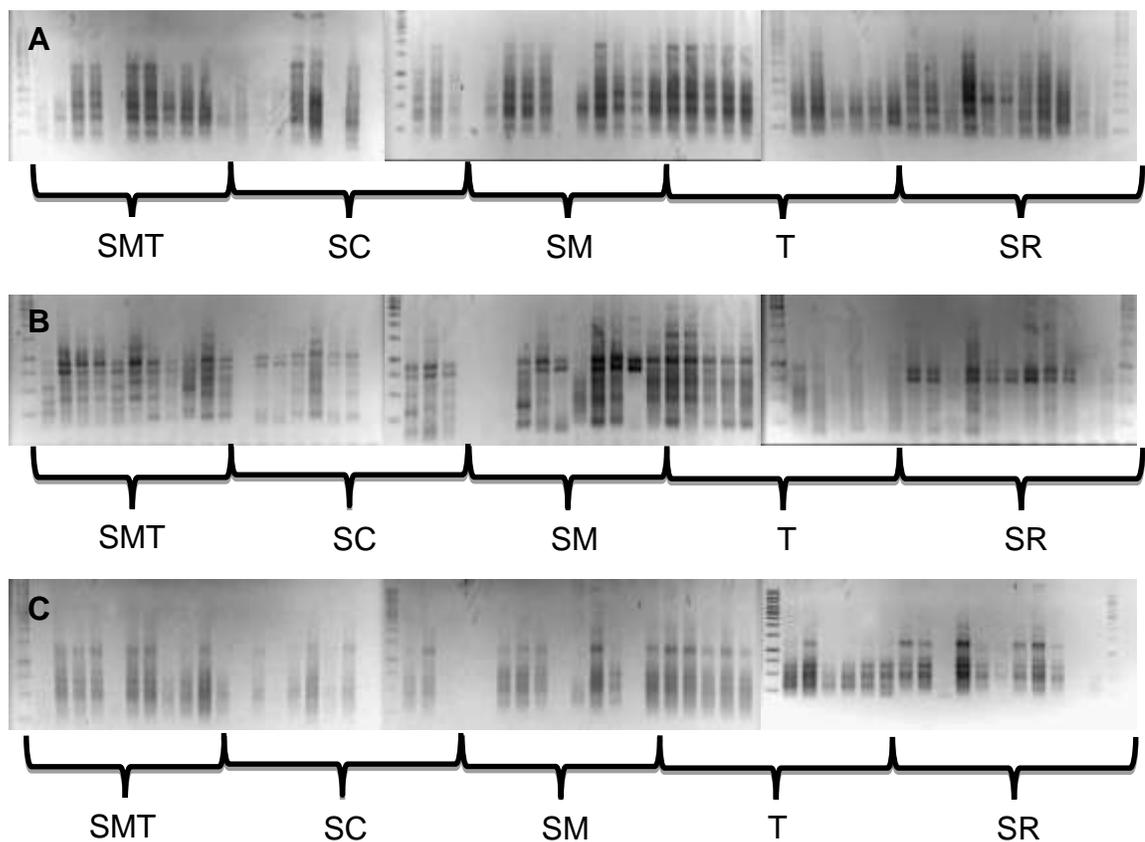


Figura 15. Amplificación ISSR de 10 individuos correspondientes a las 5 poblaciones de algodón analizadas con los iniciadores: A) 7962, B) 7957 y C) 7953. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

Cuadro 17. Nombre, secuencia, número de bandas polimórficas, número de bandas monomórficas, total de bandas y porcentaje de polimorfismo de nueve iniciadores ISSR utilizados en el análisis de diversidad genética de materiales de algodón de la región Cañada Oaxaqueña.

INICIADOR	NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	NÚMERO DE BANDAS POLIMÓRFICAS	NÚMERO DE BANDAS MONOMÓRFICAS	TOTAL DE BANDAS	PORCENTAJE DE POLIMORFISMO (%)
1	P2	CTGAGAGAGAGAGAGAGAG	7	1	8	87.5
2	P5	AGAGAGAGAGAGAGAG	8	0	8	100
3	7942	GAGAGAGAGAGAGAGAT	8	0	8	100
4	7944	AGAGAGAGAGAGAGAGG	6	2	8	75.0
5	7946	GAGAGAGAGAGAGAGAA	9	0	9	100
6	7953	GGAGAGGAGAGGAGA	8	0	8	100
7	7955	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	11	0	11	100
8	7957	ACACACACACACACACYG	10	0	10	100
9	7962	AGAGAGAGAGAGAGAGC	9	0	9	100
TOTAL			76	3	79	-
PROMEDIO			8.4	0.3	8.7	95.8

Para el análisis dentro de las poblaciones estudiadas, se calcularon los siguientes parámetros de diversidad: número de *loci* polimórficos (N), porcentaje de polimorfismo (P), diversidad genética de Nei e Índice de diversidad de Shannon (S), los cuales se muestran en el Cuadro 18.

El número de *loci* polimórficos por población estuvo en un intervalo de 58 a 69, con un promedio de 62; mientras que el porcentaje de *loci* polimórficos varió 73.4 % para Teotitlán de Flores Magón a 87.3 % para San Rafael, con un promedio de 78 %. Respecto a la diversidad genética de Nei, ésta fue de 0.28 a 0.35 para Teotitlán de Flores Magón y San Rafael, respectivamente. El índice de diversidad de Shannon estuvo en un intervalo de 0.41 a 0.51, con un promedio de 0.44. La población de San Rafael, fue la que presentó los valores más altos en todos los parámetros de diversidad calculados.

Cuadro 18. Parámetros de diversidad genética evaluados en cinco poblaciones de *Gossypium hirsutum* L.

Localidad	N	P	Div. Gen. (Nei)	S
Santa María Tecomavaca	59	74.7	0.29	0.43
San Juan de los Cués	63	79.8	0.31	0.45
San Martín Toxpalan	59	74.7	0.30	0.43
Teotitlán de Flores Magón	58	73.4	0.28	0.41
San Rafael	69	87.3	0.35	0.51
Promedio	62	78.0	0.30	0.44

N= Número de *loci* polimórficos, **P**= % de *loci* polimórficos, **Div. Gen.**= Diversidad Genética de Nei, **S**= Índice de diversidad de Shannon.

Wegier (2013) evaluó algunos parámetros de diversidad genética como la heterocigosis esperada, riqueza alélica y riqueza alélica privada de ocho meta-poblaciones, en las que Oaxaca se encuentra incluida en una de ellas (Pacífico Sur). Los resultados indicaron que la meta-población Pacífico Sur ocupó el tercer lugar con mejores valores en los tres parámetros evaluados ($H_e = 0.81$;

riqueza alélica= 5.55; riqueza alélica privada= 2.43), después de Bahía de Banderas y la Península de Yucatán. Lo que podría estar relacionado con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

4.5.3.2. Diferenciación genética entre las poblaciones

4.5.3.2.1. Distancia genética

Los valores de distancia genética “D” que se encontraron entre las cinco poblaciones evaluadas se muestran en el Cuadro 19. Estos estuvieron en un rango de 0.084 a 1.16. El análisis indica que las poblaciones más alejadas genéticamente fueron San Martín Toxpalan (SM) y San Rafael (SR). Sin embargo, ambas poblaciones no son las más distantes geográficamente. Por el contrario, Teotitlán de Flores Magón (T) y San Martín Toxpalan (SM) fueron las poblaciones más cercanas genéticamente. Cabe destacar, que ambas son las poblaciones que se encuentran más cercanas geográficamente. Además, los resultados indicaron que San Martín Toxpalan (SM) y Santa María Tecomavaca (SMT) son las poblaciones que se diferenciaron en mayor medida de las otras poblaciones, al presentar los valores más altos de “D”.

Por otra parte, los valores de identidad genética estuvieron en un intervalo de 0.85 a 0.92. Se encontró de manera similar al análisis de distancia genética que, Teotitlán de Flores Magón (T) y San Martín Toxpalan (SM), son las poblaciones con mayor identidad genética con un valor de 0.92. Esto quiere decir que existe una alta probabilidad de que dos alelos (uno de cada población) sean idénticos. Por el contrario, las poblaciones con menor identidad genética fueron San Rafael (SR) y San Martín Toxpalan (SM), con un valor de 0.85. Cabe recalcar, que el intervalo de identidad genética no fue muy amplio, por lo que la mayoría de las poblaciones puede que compartan alelos similares.

Cuadro 19. Distancia genética de Nei (bajo la diagonal) e Identidad Genética de Nei (sobre la diagonal) para cinco poblaciones de *Gossypium hirsutum* L. evaluadas.

	Santa María Tecomavaca (SMT)	San Juan de los Cués (SC)	San Martín Toxpalan (SM)	Teotitlán de Flores Magón (T)	San Rafael (SR)
Santa María Tecomavaca (SMT)	0	0.90	0.86	0.90	0.87
San Juan de los Cués (SC)	0.11	0	0.87	0.91	0.90
San Martín Toxpalan (SM)	0.15	0.13	0	0.92	0.85
Teotitlán de Flores Magón (T)	0.11	0.09	0.08	0	0.87
San Rafael (SR)	0.14	0.10	0.16	0.14	0

A partir de los valores de distancia genética obtenidos, se generó un dendrograma de relaciones entre las poblaciones, el cual se aprecia en la Figura 21.

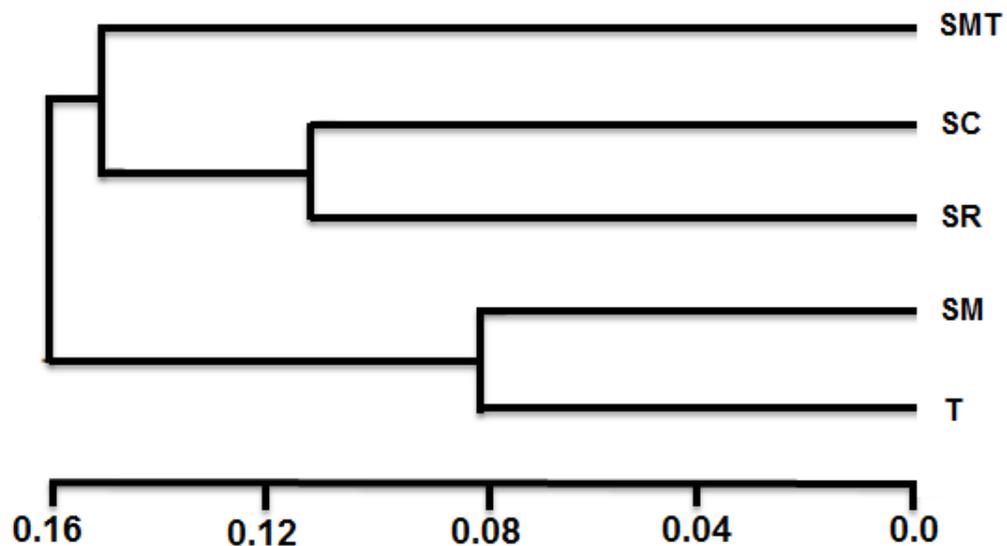


Figura 16. Dendrograma basado en la Distancia Genética de Nei (1972), usando el método de agrupamiento UPGMA para cinco poblaciones de *Gossypium hirsutum* L. SMT= Santa María Tecomavaca, SC= San Juan de los Cués, SM= San Martín Toxpalan, T= Teotitlán de Flores Magón y SR= San Rafael.

Se formaron tres grupos. Uno que incluye a la población de Santa María Tecomavaca (SMT). Otro que concentra las poblaciones de San Juan de los Cués (SC) y San Rafael (SR). Y, un último grupo que relaciona a las poblaciones de Teotitlán de Flores Magón (T) y San Martín Toxpalan (SM).

Los resultados presentes, comparados con las relaciones entre poblaciones observadas en el análisis morfológico, fueron muy similares. En los dos análisis la población de Santa María Tecomavaca (SMT) agrupa sola, lo que sugiere que esta población es genéticamente muy diferente del resto. Las demás poblaciones se agruparon de manera similar a como agruparon en el dendrograma generado en el análisis de huellas genéticas (Figura 17).

4.5.3.2.2. Estructura genética entre las poblaciones

En el Cuadro 20 se muestran los valores de parámetros de diversidad genética entre las poblaciones. Se observó un índice de diversidad de Nei de 0.37 y un índice de diversidad de Shannon de 0.54, los cuales son valores más altos que los obtenidos en el análisis dentro de las poblaciones.

Cuadro 20. Valores promedio de parámetros de diversidad genética entre las poblaciones de algodón.

	N	P	Div. Gen. (Nei)	S
Promedio	77	97.5	0.37	0.54

N= Número de *loci* polimórficos, **P**= % de *loci* polimórficos, **Div. Gen.**= Diversidad Genética de Nei, **S**= Índice de diversidad de Shannon.

El valor del coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones (G_{ST}) fue 0.17, lo que indica que las poblaciones se encuentran poco diferenciadas. Cabe destacar, que existe una distancia geográfica corta entre las poblaciones evaluadas por lo que estas pueden estar intercambiando genes de manera constante, lo que evita la diferenciación. El número estimado de individuos

migrantes por generación (N_m) fue 2.4, lo que implica que existe flujo génico suficiente entre las poblaciones, como para impedir la diferenciación. Según Lowe, Harris & Ashton (2004) basta un individuo migrante por generación entre las poblaciones para evitar la diferenciación genética. Mecanismos tales como el traslado de plantas o dispersión de polen y semillas generan movimiento de genes de una población a otra.

Wegier (2013) en ocho meta-poblaciones de algodón silvestre en México, evaluó el flujo de genes a través de la migración histórica de semillas, con el uso de microsatélites de cloroplasto. También, utilizando transgenes como marcadores en poblaciones silvestres de *G. hirsutum*, encontró altas tasas de migración ($m = 66/270 = 0.24$). Los resultados indicaron que esto no se debió a la migración de semillas, sino más bien a factores como la migración a larga distancia de la semilla y el entrecruzamiento de plantas silvestres con poblaciones que tienen el haplotipo del algodón domesticado. Las poblaciones evaluadas siguen conservando el haplotipo silvestre (84.1 %), mientras que 15.9 % de las plantas fueron positivas a la presencia de las proteínas recombinantes.

Nuestros resultados sugieren que en la Región Cañada del estado de Oaxaca, existe un moderado polimorfismo, dentro y entre las poblaciones de *Gossypium hirsutum* L. Esto concuerda con algunos de los resultados obtenidos por Wegier (2013), quien menciona que a pesar de las altas tasas de flujo genético, aún se pueden distinguir polimorfismos ancestrales.

Para evaluar la estructura genética de *Gossypium hirsutum* L., se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), cuyos resultados se muestran en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para cinco poblaciones de *Gossypium hirsutum* L.

FUENTE DE VARIACIÓN	DE	G.L.	SS	MS	VC	PV
ENTRE LAS POBLACIONES		4	99.3	24.8	1.2	8
DENTRO DE LAS POBLACIONES		45	592.5	13.2	13.2	92
TOTAL		49	691.8		14.3	100

G.L.= Grados de Libertad; **SS**= Suma de Cuadrados; **MS**= Cuadrados Medios; **VC**= Varianza de los componentes; **PV**= Porcentaje de variación.

Los resultados indicaron que 92 % de la variación genética se distribuyó dentro de las poblaciones, lo cual concuerda con la hipótesis planteada; el resto (8 %) se encuentra entre las poblaciones (Cuadro 21 y Figura 22).

Según Wegier (2013) la interacción del flujo génico a larga distancia y las barreras geográficas de México han contribuido a formar la estructura genética de las poblaciones actuales de *G. hirsutum*, favorecida por la dinámica ecológica que obstaculiza la homogeneización genética dentro y entre poblaciones. Además, menciona que las poblaciones del algodón *G. hirsutum* en México están estructuradas, lo que significa que distintas regiones de México muestran diferencias importantes en su composición genética, ya sea porque cada grupo de poblaciones tiene diferentes alelos, o porque los grupos de poblaciones poseen los mismos alelos en frecuencias diferentes entre grupos, o una combinación de ambas.

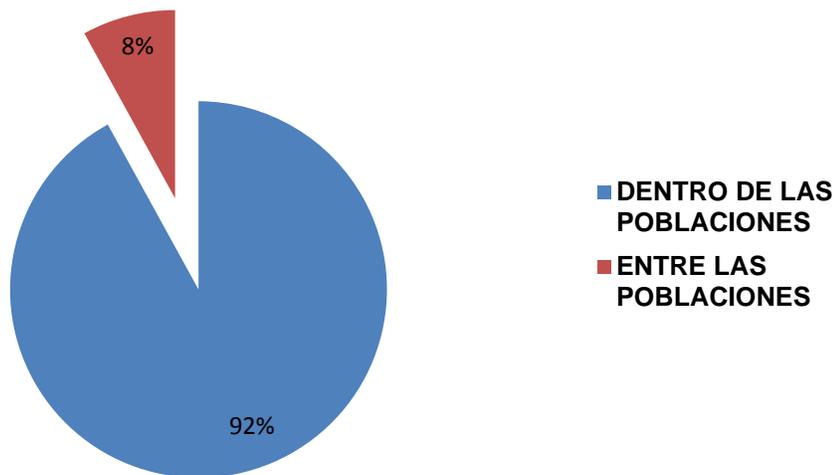


Figura 17. Porcentajes de varianza molecular.

4.5.3.2.3. Análisis de Coordenadas Principales de las poblaciones (ACoP)

Para conocer el comportamiento de las cinco poblaciones estudiadas con base en los datos moleculares derivado del análisis ISSR, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) y los resultados se muestran en la Figura 23.

Se observó la formación de cuatro grupos. El primero incluyó a las poblaciones de San Rafael y San Juan de los Cués, el segundo agrupó a la población de San Martín Toxpalan, el tercero a Teotitlán de Flores Magón y el cuarto a Santa María Tecomavaca. Los grupos formados son muy similares a los obtenidos en resultados anteriores, como lo es el dendrograma morfológico para variables mixtas, así como para el dendrograma de huellas genéticas y dendrograma de diversidad entre las poblaciones. En dichos dendrogramas se separan las poblaciones de Teotitlán de Flores Magón y Santa María Tecomavaca. Y podría suponerse también que las poblaciones de San Rafael y San Juan de los Cués mantienen características morfológicas y moleculares similares.



Figura 18. Gráfico de dos Coordenadas Principales para datos moleculares ISSR de cinco poblaciones de *Gossypium hirsutum* L.

4.6. CONCLUSIONES

Se detectó la existencia de diversidad genética en las colecciones de *Gossypium hirsutum* L., de la región Cañada del Estado de Oaxaca. De acuerdo con el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), la mayor proporción de la diversidad se encontró dentro de las poblaciones y la menor entre las poblaciones. Por lo tanto, los marcadores moleculares fueron efectivos para agrupar a las mismas. Cabe destacar, que las poblaciones se encuentran genéticamente poco diferenciadas debido a la existencia de flujo genético relativamente alto entre las mismas. Hubo una correlación alta y positiva entre los marcadores morfológicos cuantitativos y los marcadores moleculares.

4.7. LITERATURA CITADA

- Arjit & Nag. (2015).** Medical Value of Cotton. *International Journal of MediPharm Research*, 1(3), 147-149.
- Ashraf, J., Malik, W., Iqbal, M. Z., Khan, A.A, Qayyum, A, Noor, E, Abid, M. A, Naseer C., H. M., & Ahmad, M. Q. (2016).** Comparative Analysis of Genetic Diversity among BtCotton Genotypes Using EST-SSR, ISSR

- and Morphological Markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(2), 517-531.
- Báez, C. (2015).** Protegen al algodón nativo de Oaxaca. Agencia Informativa Conacyt. México. En línea: <http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/ambiente/847-protege-inifap-algodon-nativo-de-oaxaca>
- Brubaker C.L. & J.F. Wendel. (1994).** Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*; Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *American Journal of Botany*, 81, 1309-1326.
- CONABIO. (2012).** *Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal, 2012-2030*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. pp:1-91.
- Dellaporta S., Wood J., & Hicks J. (1983).** A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.
- Feng, Ch., M. Ulloa, C. Perez M. & J. McD. Stewart. (2011).** Distribution and Molecular Diversity of Arborescent *Gossypium* Species. *Botany*, 89(9), 615-624.
- Godoy, A. S., E. A. García C. & M. Manjarrez S. (2002.).** Establecimiento de un banco de germoplasma de especies silvestres y razas de algodón. Informe Anual de Actividades. CEIGUA-CIRPAS-INIFAP. México. 20p.
- Hinze, L. L., Hulse K., A. M., Wilson, L. W, Zhu, Q., Llewellyn, D. J., Taylor, J. M., Spriggs, A., Fang, D. D., Ulloa, M., Burke, J. J., Giband, M., Lacape, J. M., Deynze, A. V., Udall, J. A., Scheffer, J. A., Hague, S., Wendel, J. F., Pepper, A. E., Frelichowski, J., Lawley, C. T., Jones, D. C., Percy, R. G., & Stelly, D. M. (2017).** Diversity analysis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) germplasm using the CottonSNP63K Array. *BMC Plant Biology*, 17 (1), 37.
- León, J. (2000).** Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 3ª.edición revisada y aumentada. San José, Costa Rica. pp :1-522.
- Lewontin, R. C. (1972).** The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, 6, 381–398.
- Lowe A., Harris S, & Ashton P. (2004).** *Ecological Genetics. Design, Analysis and Application*. Blackwell Publishing Company. MA. USA. 326p.
- Peakall, R. & Smouse, P. (2006).** GENALEX (Versión 6.5) [Software]. The Australian National University, Australia and Rutgers University, U.S.A.
- Pérez M., C., Tovar G., M. R., Obispo G., Q., Legorreta P., F. J., & Ruiz C., A. (2016).** Recursos genéticos del algodón en México: conservación *ex situ*,

- in situ* y su utilización. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7 (1), 5-16.
- Pradeep M., Sarla N. & Siddiq E. (2002).** Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128 (1), 9-17.
- Preetha, S. & Raveendren T. S. (2008).** Molecular marker technology in cotton. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 3(2), 032-045.
- Rathore S., K., Campbell M., L., Sherwood, S., & Nunes, E. (2015).** Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Methods in Molecular Biology*, 1224, 11-23.
- Rohlf, F.J. (2002).** NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, Version 2.1. Exeter Publishing, Setauket, N.Y., U. S. A.
- Saif, I., M. A., S., Riad, S., & Elbagoury, M. (2017).** Molecular Characterization of Some Egyptian cotton Varieties. *Alexandria Science Exchange Journal*, 38(1), 44-52.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca & Alimentación. SAGARPA. (2014).** Análisis de la cadena de valor en la producción de algodón en México. Informe final. México. pp:1-90.
- Sonika & Sangwan, R. S. (2018).** Study of Genetic Diversity in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) of Cotton Leaf Curl Disease Resistant and Susceptible Genotypes by Using ISSRs. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(3), 570-582.
- The Plant List. (2013).** En línea: <http://www.theplantlist.org/browse/A/Malvaceae/Gossypium/>
- Ulloa, M., J. McD. Stewart, E. A. García C., S. Godoy A., A. Gaytán M. & S. Acosta N. (2006).** Cotton Genetic Resources in The Western States of México: *In situ* Conservation Status and Germplasm Collection for *Ex situ* Preservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(4), 653–668.
- Ulloa, M., J. McD. Stewart, E. A. García C., S. Godoy A., A. Gaytán M. & S. Acosta N. (2006).** Cotton Genetic Resources in The Western States of México: *In situ* Conservation Status and Germplasm Collection for *Ex situ* Preservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(4), 653–668.
- Vavílov, N. I. (1930).** México y Centroamérica como centro básico de origen de las plantas cultivadas del nuevo mundo. En: *Revista de Geografía Agrícola. Estudios de la agricultura mexicana. Recursos Fitogenéticos de México.* Universidad Autónoma Chapingo. pp:15-33.
- Wegier B., A. L. (2013).** Diversidad genética y conservación de *Gossypium hirsutum* silvestre y cultivado en México. Universidad Nacional Autónoma de México. pp:9-103.

- Wendel, J.F., Brubaker, C. L., & Seelanan. T. (2010).** The origin and evolution of *Gossypium*. In: J.M. Stewart, D. Oosterhuis, J.J. Heitholt, and J.R. Mauney(eds.). *Physiology of cotton*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp:1–18.
- Yeh, F., Yang, R. & Boyle, T. (1999).** Popgene 32 (Versión 1.31) [Software]. University of Alberta, Canada.

V. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos para el presente trabajo fueron de gran relevancia. Tal es el caso del número de semillas por cápsula (NSC), ya que se obtuvo un mínimo de 5 y un máximo de 28 semillas por cápsula, con un promedio de 13 semillas. Lo que indicó que existen diferentes tamaños de cápsula. Esta característica es muy importante en los programas de mejoramiento genético, ya que para lograr híbridos con un mayor porcentaje de fibra (principal uso del algodón) (Bowman *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2008), los genotipos parentales, además de presentar alto porcentaje de esta característica, deben estar asociados a cápsulas de menor tamaño y peso, con menor número de semillas por cápsula, ya que ello permite una mayor área de superficie en la producción de fibra (Bednarz *et al.*, 2007). Por otra parte, Ahuja *et al.*, 2006, mencionan que en el mejoramiento de fibra la longitud de la misma tiene un efecto directo negativo, en tanto que la resistencia un efecto positivo. Para el presente estudio ésta característica estuvo en una amplitud de 1.5 a 3.6 cm, con un promedio de 2.2 cm, ubicándose en la clasificación descrita por León (2000), como fibras cortas. Se encontraron diferentes tamaños de fruto tanto en longitud como en ancho, así como cápsulas con bajo número de semillas como se puede observar en el Cuadro 4.

Por otra parte, aunque no todas las características evaluadas en el presente estudio están relacionadas al principio de mejoramiento genético, nos acercó a conocer la especie a la que pertenecen los materiales evaluados. Dando como resultado, que morfológicamente la mayoría perteneció a *Gossypium hirsutum*

L. Este resultado es similar al que reporta Pérez *et al.* (2016) para la región Cañada del Estado de Oaxaca. De manera similar nuestros resultados coinciden con estudios realizados por el SNICS (2017), quienes evaluaron 58 accesiones de algodón pertenecientes a 11 estados. Encontraron que 25 materiales pertenecieron a la especie *G. hisutum* raza *palmerii*.

Respecto a las relaciones morfológicas entre las poblaciones, existió mezcla de individuos entre las mismas. Lo que sugiere que las poblaciones están muy relacionadas, posiblemente debido a que existe fuerte flujo genético entre las poblaciones en estudio. Dicho análisis facilitó la obtención de gráficos, en los cuales se puede observar que las poblaciones de Santa María Tecomavaca (SMT) y Teotitlán de Flores Magón (T) formaron grupos independientes, mientras que las poblaciones de San Juan de los Cués (SC), San Martín Toxpalan (SM) y San Rafael (SR) formaron un grupo.

Con el uso y el resultado del proceso de análisis separado de variables cuantitativas y cualitativas-cuantitativas, se observó un mejor y similar agrupamiento de las poblaciones. Al respecto, Carballo & Guelmes (2016), mencionan que la agrupación bajo una misma denominación de un conjunto de fenómenos facilita y posibilita diferenciar un conjunto de elementos de otro denominado de forma diferente. Así mismo, hubo una correlación significativa en ambos análisis durante la comparación de matrices, $r = 0.524$ y 0.932 , respectivamente. Los resultados parecen indicar que las variables cualitativas ($r = 0.201$) no son tan discriminantes o no aportan suficiente información para este tipo de análisis como lo hacen las variables cuantitativas. Esto posiblemente, debido a su naturaleza, porque mientras las variables cuantitativas son susceptibles de medida o conteo, las variables cualitativas varían respecto a la observación (Carballo & Guelmes, 2016). Por lo tanto, la manipulación y operacionalización de los datos recabados, no será la misma en ambos casos. Sin embargo, permitirá la selección y utilización de los métodos estadísticos adecuados para su análisis y posterior interpretación.

En el análisis de huellas genéticas, las poblaciones presentaron un polimorfismo moderado, el cual estuvo en un intervalo de 25 a 100 %, respectivamente; con un promedio de 50.4 %. Además, los valores de similitud entre las poblaciones fueron altos, lo que indica que se encuentran poco diferenciadas y ello podría deberse a la mezcla aleatoria de ADN de individuos que se hizo para determinar las huellas genéticas. En éste contexto, las poblaciones que presentaron mayor similitud genética fueron las de Teotitlán de Flores Magón y Santa María Tecomavaca. Sin embargo, geográficamente no son las poblaciones más cercanas. Cabe destacar que este resultado es diferente al obtenido en el análisis de agrupamiento de poblaciones. Esto, posiblemente porque a pesar de su emparentamiento genético, las condiciones ecológicas están haciendo que morfológicamente sean distintas, lo que podría ser un principio para empezar a diferenciarse hasta formar una nueva especie o raza. Por mencionar un ejemplo, Brown, Oosterhuis & Coker (2001), mencionan que algunas características de herencia cuantitativa obedecen a una interacción genotipo-ambiente, lo cual daría como resultado fenotipos distintos a los usados u observados inicialmente. Tal es el caso del porcentaje de fibra en cápsulas de algodón.

Por otra parte, los resultados de la Prueba de Mantel indican que hubo una correlación alta y positiva ($r= 0.629$) entre datos morfológicos cuantitativos y datos moleculares. Estos últimos, al ser supuestamente neutrales no tienen por qué reflejar la variación para caracteres cuantitativos. Las comparaciones de diversidad y diferenciación para marcadores moleculares y para caracteres cuantitativos muestran una correlación positiva significativa, pero en general débil y muy variable entre poblaciones, caracteres y estudios, siendo todavía una cuestión controvertida (McKay & Latta, 2002).

Respecto a la diversidad genética, el polimorfismo que se encontró fue alto con un valor promedio de 95.8 %. Pérez *et al.* (2016), mencionaron que geográficamente en el sur del país se concentra la mayor diversidad genética

del género *Gossypium*. Y más específicamente en la Región Cañada, se tienen indicios de la presencia de dos especies: *Gossypium hirsutum* L., y *Gossypium gossypoides*. El resultado de polimorfismo para el presente trabajo posiblemente se deba a estos antecedentes. Abou & Fayed (2014) empleando marcadores moleculares ISSR para determinar huellas genéticas de 37 genotipos de algodón egipcio encontraron un 97.98 % de polimorfismo. Otros trabajos al estudiar la diversidad de genotipos de algodón semi-domesticado, domesticado, comercial y algunos materiales silvestres reportan valores de polimorfismo alto, similar a nuestros resultados (Sonika & Sangwan, 2018; Bilwal *et al.*, 2017; Sethi *et al.*, 2015).

La diversidad genética (H_e) promedio obtenida mediante marcadores moleculares ISSR fue moderada ($H_e = 0.30$) comparada con otros trabajos. Wegier (2013) reportó $H_e = 0.81$ para la meta-población Pacífico Sur, en la que Oaxaca se encuentra incluida. El valor obtenido en el presente trabajo posiblemente se deba a que los sitios de colecta pertenecen a un área geográfica bastante inferior al estudiado por el autor antes mencionado.

De la misma manera, la diversidad genética promedio del Índice de Shannon fue moderada (0.44). De manera similar Sethi *et al.* (2015) reporta un valor promedio de Índice de Shannon de 0.36, cuando evaluó la diversidad genética de 95 genotipos de *Gossypium arboreum* L. con el uso de marcadores moleculares ISSR.

De acuerdo al AMOVA, el 92 % de la variación genética se distribuyó dentro de las poblaciones, lo cual concuerda con la hipótesis planteada; el resto (8 %) se encuentra entre las poblaciones. Según Wegier (2013) la interacción del flujo génico a larga distancia y las barreras geográficas de México han contribuido a formar la estructura genética de las poblaciones actuales de *G. hirsutum*, favorecida por la dinámica ecológica que obstaculiza la homogeneización genética dentro y entre poblaciones. Además, menciona que las poblaciones

del algodón *G. hirsutum* en México están estructuradas, lo que significa que distintas regiones de México muestran diferencias importantes en su composición genética, ya sea porque cada grupo de poblaciones tiene diferentes alelos, o porque los grupos de poblaciones poseen los mismos alelos en frecuencias diferentes entre grupos, o una combinación de ambas.

VI. CONCLUSIÓN GENERAL

Se detectó la existencia de diversidad molecular en las colecciones de *Gossypium hirsutum* L. de la región Cañada del Estado de Oaxaca. Los marcadores morfológicos fueron efectivos para agrupar a las poblaciones. Además, se encontraron algodones con colores de fibra blanco y café. Hubo una correlación alta y positiva entre los marcadores morfológicos cuantitativos y los marcadores moleculares. Respecto al análisis molecular se detectó la existencia de diversidad genética en las colecciones de *Gossypium hirsutum* L., de la región Cañada del Estado de Oaxaca. De acuerdo con el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), la mayor proporción de la diversidad se encontró dentro de las poblaciones y la menor entre las poblaciones y por lo tanto, los marcadores moleculares fueron efectivos para agrupar a las mismas. Las poblaciones se encuentran genéticamente poco diferenciadas debido a la existencia de flujo genético relativamente alto entre las mismas.

VII. LITERATURA CITADA

- Ahuja, S.; Dhayal, L.; Prakash, R. (2006).** A correlation and path coefficient análisis of components in *G. hirsutum* L. Hybrids by usual and fibre quality grouping. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 30 (6): 317-324.
- Bednarz, C.; Nichols, R.; Brown, S. (2007).** Within – Boll yiel components of high yielding cotton cultivars. Crop Science 47 (5): 2108 – 2112.
- Bilwal, B. B., Vadodariya, K. V., Rakumar, B. K., y Lahane, G. R. (2017).** Genetic diversity of parents using RAPD, ISSR and SSR molecular

- markers in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 6(8), 51-57.
- Bowman, D.T.; May, O.L.; Creech, J.B. (2003).** Genetic uniformity of the U.S . Upland cotton crop since the introduction of transgenic cottons. *Crop science* 43 (2):515-518.
- Brown, R.; Oosterhuis, D.; Coker, D. (2001).** Genotypic and environmental effects on partitioning in the cotton plant and boll for explaining yield variability. *Summaries of Arkansas Cotton Research Series*. 497: 64-69.
- Carballo B., C. M & Guelmes V., E. L. (2016).** Algunas consideraciones acerca de las variables en las investigaciones que se desarrollan en la educación. *Universidad y Sociedad* 8 (1): 140-150.
- Gómez, G.; Royo, I.; Etchart, J.; Pacheco, M.; Diaz, D. (2008).** Aplicación de marcadores de ADN en el mejoramiento genético de algodón. *INTA Año VIII* (10):10-14.
- León, J. (2000).** Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 3ª.edición revisada y aumentada. San José, Costa Rica. pp:1-522.
- McKay, J.K., Latta, R.G. (2002).** Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology and Evolution* 17:285-291.
- Pérez M., C., Tovar G., M. R., Obispo G., Q., Legorreta P., F. J., y Ruiz C., A. (2016).** Recursos genéticos del algodón en México: conservación *ex situ*, *in situ* y su utilización. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7 (1), 5-16.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (2017).** En línea: <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/estudios-etnobotanicos-en-el-cultivo-de-algodon>
- Sethi, K., Siwach, P, Kumar V., S., y Sihag, M. (2015).** Assessing genetic diversity among *Gossypium arboreum* L., genotypes using issr markers. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 6(1), 201-208.
- Sonika y Sangwan, R. S. (2018).** Study of Genetic Diversity in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) of Cotton Leaf Curl Disease Resistant and Susceptible Genotypes by Using ISSRs. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(3), 570-582.
- Uscanga C., A. (2013).** Variación foliar del algodón (*Gossypium hirsutum*) silvestre y cultivado en México. Universidad Nacional Autónoma de México. pp:1-57.
- Wegier B., A. L. (2013).** Diversidad genética y conservación de *Gossypium hirsutum* silvestre y cultivado en México. Universidad Nacional Autónoma de México. pp:9-103.