

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

"Aislamiento por distancia de algodón (*Gossypium hirsutum*)
en México: consecuencias para el manejo de plantas
transgénicas"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(AMBIENTAL)

PRESENTA

ANA LAURA WEGIER BRIUOLO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU

MÉXICO, D.F.



MARZO, 2005

COORDINACIÓN

M. 341200



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

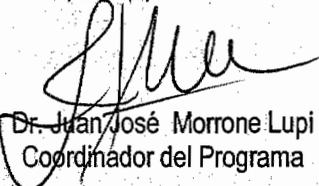
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de octubre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental) del(a) alumno(a) Wegier Briuolo Ana Laura, con número de cuenta 97565150 con la tesis titulada: "Aislamiento por distancia de algodón (*Gossypium hirsutum*) en México: Consecuencias para el manejo de plantas transgénicas", bajo la dirección del(a) Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau.

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| Presidente: | Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán |
| Vocal: | Dra. Ella Vázquez Domínguez |
| Secretario: | Dr. Daniel Piñero Dalmau |
| Suplente: | Dr. León Patricio Martínez Castilla |
| Suplente: | Dr. Luis Felipe Jiménez García |

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 24 de noviembre del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



A Diego

El amor que me has dado es el que me impulsa a luchar por mis metas, es el que me mantiene disfrutando de lo que me gusta y es tu apoyo el que me ha permitido llegar hasta donde estoy, te agradezco infinitamente por tu amor y tu confianza.

A mi Padre

A mi abuelo Beto

A mi Madre

A mi familia

Wegieres, Briuolos, y Ruiz Sabios, con mucho cariño

A Pepe

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo de la beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y el complemento de beca de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

Las colectas se realizaron con el permiso otorgado, por la Dirección General de Vida Silvestre de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, número 03740.

Quiero agradecerle al Dr. Daniel Piñero, por darme su apoyo para la realización de este trabajo, por responder siempre mis preguntas y por enseñarme tantas cosas de la vida. Por ser el ejemplo de lo que quiero ser, de lo que tengo que hacer y por mostrarme mis errores. Nadie puede dudar que fuiste, eres y serás el mejor padre académico. Gracias.

Muchas gracias a mi comité tutorial: la Dra. Judith Márquez y el Dr. Luis Felipe Jiménez, por acompañarme y nunca abandonarme durante estos enriquecedores años de trabajo.

El eslabón clave de la cadena de favores que hicieron posible esta maestría se llama Andrey, mi compañero y amigo, en todo momento.

Gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Genética y Evolución: Valentina, Argelia, Ale Vázquez, Rodolfo, Erika Aguirre, Ale Moreno, Miroslava, Lev y Erika Díaz, por hacer de mi estancia en el laboratorio toda una experiencia, con sus virtudes, y con todos sus errores, por lo que quieran, no sé pero no los extrañaré, porque esta historia continua...

Un muy especial agradecimiento a Oscar Rodríguez Ávila, por su valiosa colaboración y compañía durante la realización de esta investigación. A Carolina, que me ayudo en los interminables tramites del posgrado. A Anabel, Don José y Doña Silvia (Doña Chivis), por regalarme una sonrisa cada día.

Durante estos años Valentina me hizo compañía, en las buenas y en las malas, en las materias y en mi casa, en el laboratorio y en la comida, encontrar las palabras para agradecer una amistad así es difícil, sólo puedo decir "Gracias por todo amiga mía". A Marta Villanueva, por sus cuidados y cariño, literalmente hicieron posible que sobreviviera en estos años de trabajo en el laboratorio.

A mis compañeros de la salida al norte. A mis compañeros del maravilloso e inolvidable viaje a Oaxaca, Chiapas, Tabasco y Veracruz: Bego, Tany, Karla, Diego y Mora. A Rodolfo y Ale V. por acompañarme a recorrer toda la Península de Yucatán, siempre vestidos hasta las orejas frente al espléndido Caribe Mexicano.

A Diego que me acompañó a Tamaulipas y Veracruz (tres veces) sin éxito en las colectas, y por siempre querer recorrer caminos nuevos en busca de las poblaciones nunca vistas. Por interesarse y comprender este proyecto que fue posible por su ayuda y comprensión. Mil gracias.

Índice

| | |
|--|----|
| Resumen | 6 |
| Abstract | 7 |
| 1 Introducción | 8 |
| 1.1 Caracterización y evolución del género <i>Gossypium</i> | 9 |
| 1.1.1 Historia evolutiva | 11 |
| 1.1.2 Distribución actual | 14 |
| 1.2 Descripción de la especie | 16 |
| 1.2.1 El algodón cultivado | 16 |
| 1.2.2 Algodón Transgénico | 18 |
| 1.3 Genética de poblaciones | 20 |
| 1.3.1 La estructura de las poblaciones | 21 |
| 1.3.2 Aislamiento por distancia | 23 |
| 1.3.3 Métodos para la estimación del flujo génico | 25 |
| 1.3.3.1 Métodos directos | 25 |
| 1.3.3.1.1 Antecedentes de métodos directos para la estimación del flujo génico en la especie <i>Gossypium hirsutum</i> | 26 |
| 1.3.3.2 Los métodos indirectos | 27 |
| 1.4 Marcadores moleculares | 31 |
| 2 El problema | 38 |
| 2.1 Definición del problema de estudio | 38 |
| 2.2 Objetivos | 39 |
| 2.3 Hipótesis | 39 |
| 3 Material y método | 40 |
| 3.1 Material biológico | 40 |
| 3.2 Extracción de DNA | 42 |
| 3.3 Amplificación y elección de los microsatélites | 44 |
| 3.3.1 Microsatélites obtenidos de <i>Gossypium hirsutum</i> | 44 |
| 3.3.2 Microsatélites del cloroplasto de angiospermas dicotiledóneas | 45 |
| 3.4 Secuenciación | 46 |
| 3.5 Análisis de resultados | 48 |
| 3.5.1 Variación genética | 48 |
| 3.5.2 Estructura de las poblaciones | 49 |
| 3.5.3 Comparación entre poblaciones | 50 |
| 3.5.4 Asociaciones entre haplotipos | 52 |
| 4 Resultados | 54 |
| 4.1 Variación genética | 54 |
| 4.2 Comparación entre poblaciones | 56 |
| 4.3 Asociaciones entre haplotipos | 62 |
| 5 Discusión | 68 |
| 5.1 Variación genética | 68 |
| 5.2 Estructura genética de las poblaciones | 68 |
| 5.3 Patrones históricos | 70 |
| 5.4 Precauciones necesarias para el manejo de plantas transgénicas | 72 |
| 6 Conclusiones | 76 |
| 7 Bibliografía | 78 |
| 8 Apéndice 1 | 87 |
| 9 Apéndice 2 | 92 |
| 10 Apéndice 3 | 93 |

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo mencionado.
NOMBRE: Ana Laura Ulegua Brivolo

FECHA: 23/02/05

FIRMA: [Firma]

Resumen

La especie *Gossypium hirsutum* tuvo su centro de origen en México y en la actualidad se considera endémica de Mesoamérica. Los objetivos de esta investigación incluyeron el conocer la diversidad genética de las poblaciones de México. Con esta información se planteó comparar los datos sobre distancias genéticas y distancias geográficas, y de esa manera, poder sugerir la distancia a la que se interrumpe el flujo genético. Esto ayudará a proponer medidas de bioseguridad para el cultivo de plantas transgénicas. Se analizaron 141 individuos pertenecientes a 13 poblaciones, utilizando cinco loci polimórficos de microsatélites de cloroplasto. La diversidad genética encontrada fue alta ($H_e = 0.98 \pm 0.004$), e identificamos 40 haplotipos. Las poblaciones de *Gossypium hirsutum*, están moderadamente estructuradas. Aún así, hay cuatro regiones altamente diferenciadas (Nayarit, Campeche, Península de Yucatán Noreste y Península de Yucatán Noroeste). Esta fuerte estructura fue probablemente producto de dos fenómenos que ocurrieron en diferentes áreas y distinta intensidad, ampliaciones del rango de distribución de la especie y por el otro aislamiento por distancia entre las poblaciones. Estos patrones sugieren que a distancias menores de 265 Km existen poblaciones muy parecidas mientras que a distancias mayores existe una razonable estructuración genética. Por ello, también podemos concluir que la dispersión de las semillas es mayor a la que pudiesen aportar los polinizadores (5 Km). Con estos resultados, las precauciones necesarias para el cultivo de plantas transgénicas de algodón son: la distancia mínima de 265 Km de poblaciones naturales, utilizando en todos los casos trampas para semillas y alejados de cuerpos de agua. Finalmente, es necesario analizar profundamente la desaparición de las poblaciones en el Golfo de México, e inferir las medidas necesarias para la conservación de esta especie.

Abstract

The species *Gossypium hirsutum* has its center of origin in Mexico and nowadays it is considered endemic to Mesoamerica.

The main objective of this research included the knowledge of the genetic diversity on Mexican populations. With this information, we compared the genetic and the geographic distances to suggest limits to genetic flow.

This information will be useful to establish biosecurity procedures for transgenic plants management. We analyzed 141 individuals from 13 populations with five polymorphic chloroplast microsatellite loci. The genetic diversity was high ($H_E = 0.98 \pm 0.004$) and we identified 40 haplotypes. The populations of *Gossypium hirsutum* that we analyzed showed moderate genetic differentiation, even though there are four highly structured regions (Nayarit, Campeche, Northwestern Yucatan peninsula and northeastern Yucatan peninsula)

This strong structure was probably due to two main phenomena that occurred in different areas and with different intensity, range expansion events and isolation by distance. These patterns suggest that for distances less than 265 Km there are very similar populations, while in greater distances there is a considerable genetic structure. We can conclude that the seed dispersal is higher than pollinators dispersal distances reported (5 Km).

With these results, we suggest some precautionary procedures for cotton transgenic plants management; including cultivated fields at a minimum distance of 265 Km from natural populations, the employment of seed traps and sowing far away from body waters.

Finally, it is necessary to analyze the populations that disappeared from the Coast of Mexico and take into consideration new strategies for the conservation of this important species.

1 Introducción

La especie *Gossypium hirsutum*, una de las especies de plantas de algodón, es endémica de Mesoamérica, zona que incluye a las islas del Caribe, a Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Costa Rica y parte de México (Fryxell, 1979). En la industria, el algodón debe su importancia a que es el cultivo de fibra suave más utilizado y es de donde se extrae la mayor cantidad de aceite de semilla en el mundo (Mei, *et al.* 2004).

En el sector científico, el algodón ha despertado gran interés, ya que se están obteniendo plantas genéticamente modificadas para la solución de los problemas con plagas que tiene su cultivo. Las investigaciones han sido muy abundantes en la última década, y en consecuencia se han desarrollado marcadores moleculares de sus organelos y del núcleo. Los más utilizados han sido los microsatélites (SSRs), desarrollados por Reddy y colaboradores en 2001.

El objetivo de la genética de poblaciones es comprender la composición genética de las poblaciones y los procesos que provocan su cambio. En cualquier especie, la variación genética dentro de una población y entre poblaciones se debe a la existencia de varios alelos en diferentes loci. La medida fundamental es la frecuencia de los alelos de un gen en la población. Dicha frecuencia alélica puede cambiar debido a una mutación recurrente, selección y migración (Griffiths *et al.* 1996).

La biología de las poblaciones consiste en dos partes distintas pero interrelacionadas: la estructura demográfica y la estructura genética. La

estructura demográfica está determinada por todos los procesos asociados al nacimiento, muerte y dispersión de los organismos, incluyendo el sistema de apareamiento y la historia de vida. La estructura genética está determinada por la estructura de la población, pero también por procesos como la selección, la recombinación y la mutación (Slatkin y Hudson, 1991). Para determinar la estructura genética, es necesario comprender el patrón de variación genética de la especie, lo que significa evaluar los genotipos de diferentes individuos (Slatkin y Hudson, 1991).

Uno de los problemas en el análisis de la estructura de las poblaciones es determinar la cantidad de flujo génico. El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe un alto flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente (Slatkin, 1995).

1.1 Caracterización y evolución del género *Gossypium*

El género del algodón (*Gossypium*) incluye aproximadamente 45 especies distribuidas desde las regiones áridas a semiáridas de los trópicos y subtropicos (Fryxell, 1984). Las especies de *Gossypium* exhiben variación morfológica extraordinaria, pueden ser perennes herbáceas o árboles pequeños, presentan diversas características reproductivas y vegetativas. A nivel genómico también ha habido un gran aumento en la diversidad

durante la Radiación global del género (Endrizzi *et al.*, 1984) conduciendo a la evolución de ocho grupos de especies diploides ($n=13$), llamados A, B,

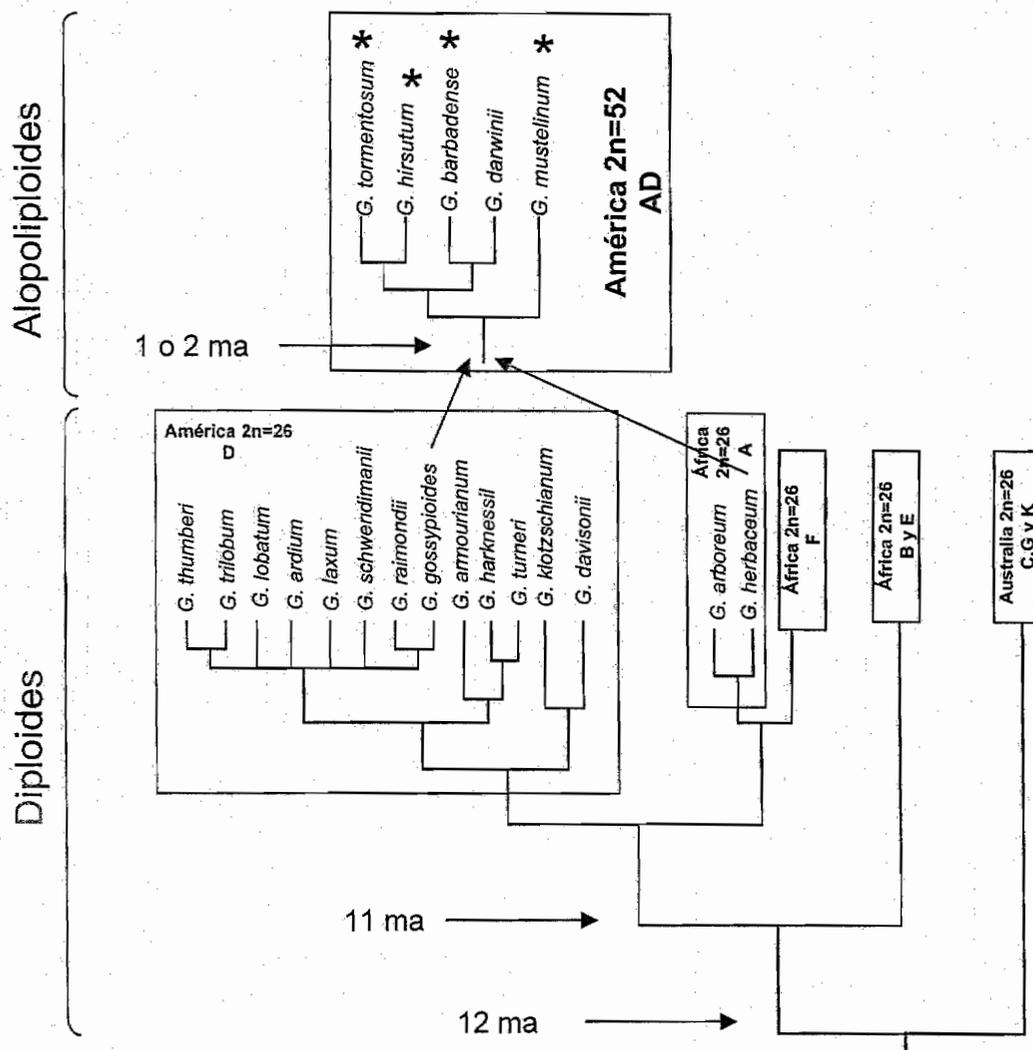


Figura 1. Historia evolutiva del género *Gossypium*, según la filogenia molecular múltiple, las especies marcadas con un asterisco han sido cultivadas

C, D, E, F, G y K (Figura 1). La historia evolutiva del género incluyó episodios múltiples de dispersión transoceánica, de invasión de nuevos nichos ecológicos, y alta frecuencia de hibridación inter específica entre los linajes que están actualmente aislados reproductivamente (Wendel, 2000).

1.1.1 Historia evolutiva

Las investigaciones recientes han esclarecido muchos aspectos de la historia evolutiva del género *Gossypium*, incluyendo las relaciones dentro y entre los ocho grupos de genomas, el origen de los algodones alotetraploides (Figura 1) y la domesticación de cada una de las cuatro especies cultivadas. Los datos indican el origen del género hace 12 millones de años y una rápida diversificación temprana de los grupos principales. Los algodones aloploiploides parecen haberse formado hace uno o dos millones de años, a consecuencia de la dispersión transoceánica del genoma A al nuevo mundo, seguida por la hibridación con el genoma D. Después de formarse los aloploiploides ocurrió una radiación en tres linajes modernos, incluyendo esos a *Gossypium hirsutum*, la especie comercialmente más importante y objeto de esta investigación, y a *G. barbadense*, también económicamente relevante, ya que entre estas dos especies cubren el 95% de la producción global de algodón (Mei *et al.* 2004).

El origen del algodón poliploide se puede apreciar en el contexto de la historia evolutiva del género y de su tribu. En este sentido, existen investigaciones más recientes que consideran aspectos taxonómicos tradicionales y acercamientos modernos que implican el análisis comparativo de las secuencias de DNA (Seelanan *et al.*, 1997; Wendel y Liu, 2002). Estos estudios han conducido a un concepto taxonómico en el que un grupo de los géneros se alinean en una tribu pequeña, llamada Gossypieae. Esta tribu, que incluye ocho géneros (Fryxell, 1984), se ha distinguido tradicionalmente de otros miembros de la familia Malvaceae debido a características morfológicas y anatómicas del embrión, la madera, cubierta de la semilla, y por la presencia de glándulas que secretan gossypol, que se distribuyen de forma distinta en la planta. Recientemente, realizando un análisis comparativo entre sitios variables del DNA de cloroplasto, se ha confirmado que son un grupo monofilético (Figura 1) (LaDuke y Doebley, 1995). Cuatro de los ocho géneros en el Gossypieae son contienen pocas especies, con distribución geográfica restringida (Fryxell, 1984). *Lebronnecia* es un endémico monotípico de las islas de Marquesas. *Cephalohibiscus*, de Nueva Guinea y las islas de Salomón, también contiene una sola especie. Dos especies de África y del este de Madagascar se describen en *Gossypioides*. El género *Kokia*, endémico hawaiano incluye cuatro especies, de las cuales una está extinta. Además de estos cuatro géneros pequeños, la tribu incluye cuatro géneros con distribuciones más amplias: *Hampea* con 21 especies que es

neotropical, *Cienfuegosia* incluye 25 especies y se distribuye en la franja neotropical y en algunos lugares de África, y 17 especies se reconocen en *Thespesia*, que es pantropical.

Los linajes más cercanos de *Gossypium*, son los del género *Gossypoides* de África y el género endémico hawaiano *Kokia*. Después de su probable origen mioceno, *Gossypium* se dividió en tres linajes importantes: los diploides del nuevo mundo (D); los diploides de África y Asia (A, B, E y F); y el grupo australiano (C, G y K). Esta radiación global fue mediada por varios acontecimientos de transporte oceánico y acompañada por la diferenciación morfológica, ecológica, y citogenética. El algodón poliploide originado probablemente durante el pleistoceno, con las cinco especies modernas representando a los descendientes de una colonización temprana y rápida de las zonas tropicales y subtropicales de América.

1.1.2 Distribución actual

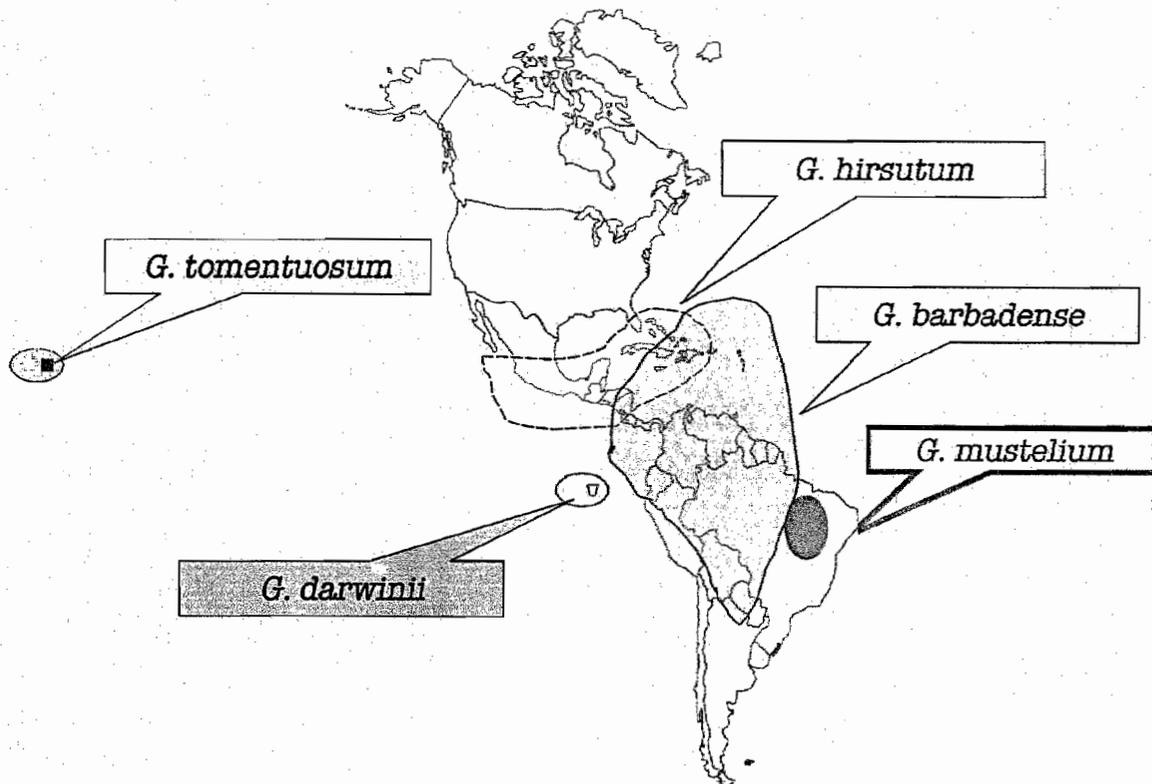


Figura 2. Mapa de la distribución geográfica de las especies poliploides del género *Gossypium* en América. (Fryxell, 1979).

La Figura 2 muestra la distribución de las especies tetraploides según lo reportado por Fryxell en 1984. *Gossypium hirsutum* es endémico de Mesoamérica, zona que incluye a las islas del Caribe, a Belice, Guatemala y la mayoría del territorio mexicano. La Figura 3 corresponde a la distribución de *Gossypium hirsutum* en México, la información fue obtenida de los herbarios y de las colectas de esta investigación.

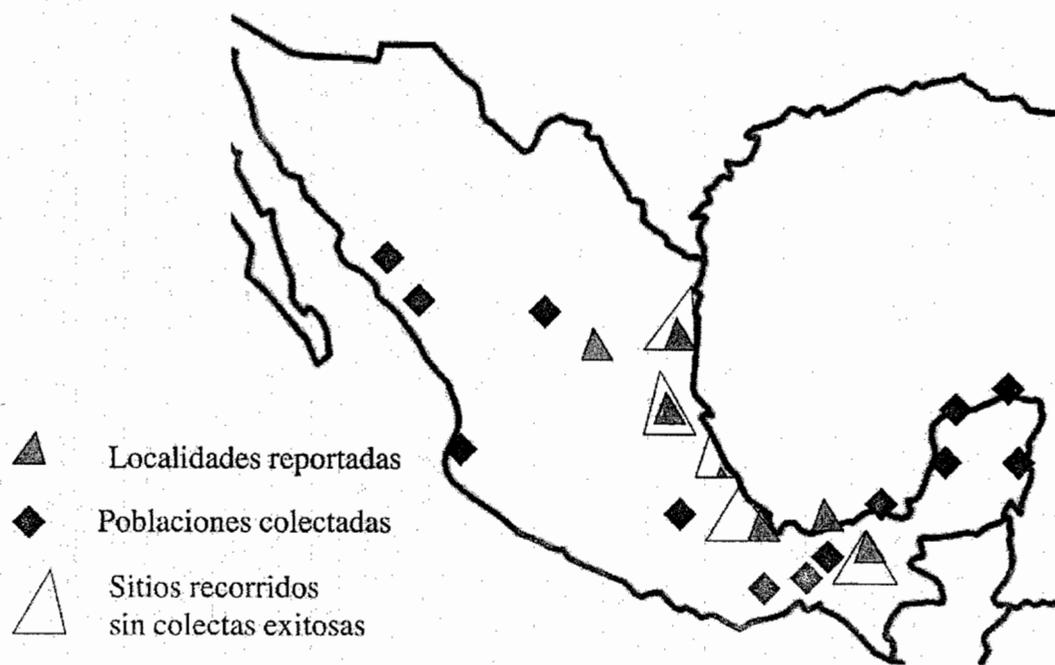


Figura 3. Mapa de la distribución geográfica de la especie *Gossypium hirsutum*, en la República Mexicana.

1.2 Descripción de la especie

Gossypium hirsutum presenta una raíz principal pivotante o axonomorfa. Las raíces secundarias siguen una dirección horizontal. En suelos profundos y de buen drenaje, las raíces pueden llegar hasta los dos metros de profundidad. En los de poco fondo o mal drenaje apenas alcanzan los 50 cm. El tallo principal es erguido, y los tallos secundarios, que parten del principal, pueden ser vegetativos o fructíferos. Las flores son dialipétalas, con 4 brácteas y estambres numerosos que envuelven al pistilo. El fruto es una cápsula con tres a cinco carpelos, que tiene seis a diez semillas cada uno. Las células epidérmicas de las semillas constituyen la fibra llamada algodón. La longitud de la fibra varía entre 20 y 45 cm., y el calibre, entre 15 y 25 micras. Después de la maduración del fruto se produce la dehiscencia, abriéndose la cápsula, y dejando la fibra al descubierto (Fryxell, 1979)

1.2.1 El algodón cultivado

Una fracción sustancial de los más importantes cultivos del mundo fueron domesticados en América, la lista incluye maíz, papa, camote, yuca, frijol, cacahuate, girasol, tomate, algodón y tabaco. Por medio del fechado con carbono radioactivo, ahora se sabe también que estos cultivos están entre los más antiguos (Evans y Libery, 1992). En México la primera región en la que se cree que se cultivó el algodón fue en Veracruz. Se tenía una

producción en el siglo XIV de 116 millones de libras (1 libra=0.43 kg), pero disminuyó al llegar los españoles. A partir de 1860 aumentó el interés en varias partes de México (Rodríguez, 1982). Las zonas que se dedicaban a su cultivo están situadas en el norte, cerca de los Estados Unidos.

El algodón es la planta textil de fibra suave más importante del mundo y su cultivo es de los más antiguos. La palabra algodón proviene de la India en donde significaba tejido fino. Históricamente, el algodón ha sido un cultivo importante para los pequeños agricultores. India es un ejemplo típico. Allí, más de 17 millones de personas dependen del cultivo de algodón, en su mayoría agricultores pobres que sostienen a sus familias con lo producido en menos de 2 hectáreas de tierra.

Los ataques de plagas más incidentes en el cultivo de algodón son: heliothis (*Heliothis armigera*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), araña roja (*Tetranychus urticae*), pulgones sobre todo la especie *Aphis gossypii*.

Existen otras plagas que atacan al cultivo pero en menor medida y son las siguientes: Oruga espinosa (*Arias insulana*), mosca blanca (*Remisa tabaci*), prodenia (*Spodoptera litoralis*), trips (*Thrips angusticeps* y *T. tabaci*), gusano gris (*Agrotis segetum*), gardana (*Spodoptera exigua*).

1.2.2 Algodón transgénico

De todos los cultivos del mundo, el algodón es en el que se aplican más pesticidas. En él se utiliza más del 10% de los pesticidas (incluso algunos de los más peligrosos) y aproximadamente el 25% de los insecticidas del mundo. Aun cuando el algodón es cultivado en tan solo el 5% de la tierra agrícola de la India, más del 55% de todos los plaguicidas utilizados en la se aplican a su producción.

El algodón fue uno de los primeros cultivos en ser manipulados genéticamente por la industria y también uno de los cultivos transgénicos más rápidamente adoptado desde su introducción comercial en 1996.

El algodón Bollgard, desarrollado por Monsanto y ensayado en campo desde 1992, produce una proteína para el control de insectos (Cry1Ac) derivada de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k.), presente naturalmente en el suelo. La producción de la proteína Cry1Ac en la planta de algodón otorga una protección contra plagas claves de insectos Lepidópteros (*Heliothis armigera*, *Pectinophora gossypiella*, *Earias insulana*, y *Agrotis segetum*). En numerosos países en todo el mundo se han realizado formulaciones microbianas de *Bacillus thuringiensis* que contienen la proteína insecticida Cry1Ac, y han sido utilizado largo tiempo sin daños colaterales registrados (Berberich *et al.*, 1996). La proteína Cry1Ac producida en el algodón Bollgard es casi idéntica en estructura y actividad a la proteína Cry1Ac encontrada en la naturaleza y en

formulaciones microbianas B.t.k. comerciales. *Bacillus thuringiensis* y las formulaciones microbianas B.t.k. han demostrado ser específicas para las plagas de insecto a las cuales están dirigidas (insectos blanco) y no parecen tener efectos nocivos para organismos no-blanco como insectos benéficos, pájaros, peces y mamíferos, incluyendo humanos (U.S. E.P.A., 1989).

En nuestro territorio podemos encontrar cultivos transgénicos en las siguientes regiones:

Sinaloa, Tecomán, Colima, Sonora Norte, Cd. Mante, Sonora Sur, Baja California, Comarca Lagunera, Tampico Tamaulipas, Chihuahua, y Planicie Huasteca.

1.3 Genética de poblaciones

La Ley de Hardy-Weinberg, describe una población diploide en equilibrio, bajo los siguientes supuestos: apareamiento al azar (*panmixia*), ausencia de mutación, sin deriva génica (tamaño infinito de población), sin migración y sin selección, es decir, una población que no evoluciona. La Ley de Hardy-Weinberg establece un punto de referencia a partir del cual comparamos poblaciones reales (Griffiths *et al.* 1996). Dicho equilibrio es expresado en una ecuación, el binomio $(p+q)^2$, que incluye las frecuencias genotípicas esperadas en una población diploide para un solo locus (las frecuencias genotípicas de los homocigos de los alelos AA (D) y aa (R), y la frecuencia genotípica del heterocigo, Aa (H). Según la ecuación de equilibrio en ausencia de fuerzas evolutivas, las frecuencias genotípicas se mantienen constantes de generación en generación. Esto es:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$p^2 = f(AA) = D$$

$$2pq = f(Aa) = H$$

$$q^2 = f(aa) = R$$

Donde, $p = f(A)$ es la frecuencia del alelo "A", $q = f(a)$, es la frecuencia del alelo "a", dado que se trata de se trata de una población diploide, donde, $p + q = 1$ (Hartl y Clark, 1989).

1.3.1 La estructura de las poblaciones

De los tres pioneros de la teoría de la genética de poblaciones, R. Fisher, J.B.S. Haldane y S. Wright, el último fue el que más se interesó en la estructura de las poblaciones y su rol en la evolución. Haldane y Fisher se centraron más en la evolución en las grandes poblaciones con apareamientos al azar en las cuales la estructura poblacional no era un tema relevante. Gran parte del trabajo teórico de Wright puede ser considerado como una demostración de cómo la estructura demográfica de una población determina su estructura genética. Wright se percató de la diversidad de estructuras demográficas que puede tener una especie, e intentó siempre que fuera posible reducir esa complejidad a ecuaciones simples que bastaran para predecir los rasgos más importantes de la estructura genética (Slatkin, 1995).

El trabajo de Wright sobre la determinación del coeficiente de endogamia de un pedigrí es un ejemplo excelente de los métodos de Wright. Mostró cómo el efecto de cualquier patrón del linaje en la correlación del estado genético de un locus puede ser resumido por un valor único, el coeficiente de endogamia, el cual puede ser determinado mediante el trazado de caminos en un linaje del árbol genealógico (Wright, 1969). Antes del método de Wright no existía ninguna razón para asumir de antemano que la endogamia en distintos pedigríes pudiera ser caracterizada tan fácilmente. Diferentes clases de endogamias podrían haber resultado de

diferentes clases de ancestralidad común. Wright mostró que un sólo número era suficiente.

La teoría de Wright del tamaño efectivo poblacional es un resultado del mismo tipo. Mostró que las complejidades de un sistema de apareamiento tales como la proporción de los sexos o los efectos de la variación temporal del tamaño poblacional pueden ser resumidas en un único número -el tamaño efectivo poblacional- que determina la fuerza global de la deriva genética en una población. En este caso, trabajos posteriores de Kimura y Crow (1964), entre otros, han demostrado que para diferentes propósitos se requieren diferentes definiciones del tamaño efectivo poblacional.

El análisis de Wright acerca de las poblaciones geográficamente subdivididas tenía el mismo objetivo. Mostró que en muchos casos el efecto de una dispersión restringida podía ser descrita por un sólo valor. En su "modelo de isla", en el cual cada población local reemplazaba una fracción "m" de sus residentes con individuos elegidos al azar de una gran colección de poblaciones locales, mostró que la varianza en las frecuencias alélicas entre las islas es aproximadamente

$$V_P = p(1-p) / (1 + Nm)$$

Donde N es el tamaño efectivo poblacional de cada población local, m es la tasa de inmigración, y p es la frecuencia promedio del alelo entre los inmigrantes (Wright, 1931). La varianza depende sólo de la combinación de los parámetros, Nm, y no de cada parámetro separadamente.

1.3.2 Aislamiento por distancia

Más tarde, Wright consideró el problema del aislamiento por distancia (Wright, 1943) y modeló una situación en la cual la dispersión de las especies que ocupaban un área geográfica estaba restringida. Procuró computar la varianza en las frecuencias alélicas entre áreas locales y la relación de los coeficientes de endogamia en áreas de diferentes tamaños. Concluyó que lo que él había definido como tamaño del vecindario -el número de individuos en un área de la cual fueron muestreados los padres de cada individuo- era equivalente al tamaño efectivo poblacional de una sola población y era suficiente para predecir el grado de variación en las frecuencias alélicas entre las localidades.

Otro trabajo teórico sobre el problema del aislamiento por distancia, en particular por Malécot (1965) y por Kimura y Crow (1964), mostró que el análisis de Wright (1943) era incompleto. Estos autores mostraron que de hecho la varianza entre las frecuencias alélicas de áreas diferentes no puede ser computada, como Wright había afirmado, solamente a partir del tamaño del vecindario. Para alelos neutros en un locus, la varianza en las frecuencias alélicas entre localidades depende tanto del tamaño del vecindario como de la tasa de mutación en ese locus. Además, la disminución en la covarianza de las frecuencias alélicas con la distancia geográfica depende también de la tasa de mutación. No es posible, entonces, lograr el objetivo de Wright de caracterizar el efecto del aislamiento por distancia estrictamente en términos de la estructura

demográfica de la población, al menos utilizando varianzas y covarianzas genéticas. El tamaño del vecindario depende de las distancias de dispersión y de las densidades de población, las cuales forman parte de la estructura demográfica, pero la tasa de mutación depende de procesos genéticos que variarán de un locus a otro.

El resultado de Wright para el modelo de la isla nos habla del equilibrio alcanzado entre el flujo génico y la deriva genética. Si Nm es mucho mayor que 1, el flujo génico sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local. Si Nm es mucho menor que 1, la deriva actúa en forma casi independiente en cada población. Trabajos más recientes (Takahata, 1983) han demostrado que a una población le lleva un tiempo t , el cual es aproximadamente el mayor de $2N$ y $1/m$, alcanzar este equilibrio. Antes de t , la composición genética será determinada principalmente por las condiciones iniciales, y después de t la composición será determinada por Nm . Haldane (1930) consideró el problema del equilibrio entre el flujo génico y la selección. Asumió que los inmigrantes llegados a una isla portaban un alelo a que en la isla es deletéreo. Si el coeficiente de selección en favor del otro alelo "A", en la isla es s y la tasa de inmigración es m , entonces la frecuencia de equilibrio de "A" en la isla es $p = 1 - s/m$, si $s < m$, y 0 (cero), si $s > m$. El tiempo que lleva alcanzar este equilibrio es aproximadamente $1/(s-m)$. Este resultado ha sido extendido por Nagylaki (1976) a modelos más generales de selección. Por supuesto, la selección que favorece al mismo alelo en diferentes poblaciones en general impedirá

la diferenciación sin importar la cantidad de flujo génico. Estos resultados teóricos nos dicen que el flujo génico podría impedir la diferenciación en algunos loci, -aquellos que son neutros o que están bajo una selección débil- pero no en los loci que se encuentran bajo una selección fuerte (Slatkin, 1995).

1.3.3 Métodos para la estimación del flujo génico

1.3.3.1 Métodos directos

Los métodos para estimar el flujo génico en poblaciones naturales se diferencian en directos e indirectos (Slatkin, 1987). Los métodos "directos" son aquellos que implican observaciones detalladas de la especie o experimentos que miden el grado de dispersión. Por ejemplo, mediciones de la distancia a la que se dispersan las semillas o el polen, e incluso seguimiento de los dispersores, y cuando es posible liberación y recaptura de individuos, estos datos pueden proveer estimaciones de la distancia promedio entre el punto de liberación y el punto de recaptura, las estimaciones de las distancias de dispersión pueden ser convertidas en estimaciones del flujo génico si se asume que los individuos que se dispersan poseen las mismas oportunidades de aparearse que los residentes. También es posible seguir el progreso de alelos distintivos dentro de una población que no contiene dichos alelos, mostrando por tanto que el flujo génico ha ocurrido y comprendiendo sus propiedades (Handel, 1982). Un método ligeramente diferente es la utilización de métodos

genéticos para la determinación de la paternidad y computar la distancia entre los progenitores y sus descendientes (Ehrlich y Raven, 1969, Ellstrand y Marshall, 1985).

Las estimaciones directas indican los detalles de la dispersión, incluyendo el periodo en la historia de vida de la especie en el cual ocurre la dispersión.

1.3.3.1.1 Antecedentes de métodos directos para la estimación del flujo génico en la especie *Gossypium hirsutum*.

La especie *Gossypium hirsutum* es generalmente auto polinizada, pero en presencia de los polinizadores convenientes presenta polinización cruzada. Las abejas *Bombus* spp, las abejas de Melissodes, y las abejas de la miel (*Apis mellifera*) son los polinizadores primarios (McGregor, 1976). La concentración de polinizadores varía por la localización y por la estación, y en los cultivos es considerablemente suprimida por uso de insecticidas. Cuando las condiciones son favorables, la distribución del polen disminuye considerablemente con el aumento de distancia. McGregor 1976, divulgó resultados de un experimento en un campo de algodón rodeado por una gran cantidad de colonias de abejas y donde el movimiento del polen fue medido por medio de partículas fluorescentes (150 y 200 pies), 1.6% de las flores mostraron presencia de las partículas. La distancia máxima a la que se encontraron partículas del polen marcado fué 435 m. Registrando

entonces que el aislamiento comienza después de esta distancia. Aunque demuestra que el movimiento del polen disminuye rápidamente después de 40 pies (12 metros).

Otro experimento fue realizado por Umbeck en 1991, donde sembró 9,800 plantas transgénicas en el centro de varios cinturones de plantas no transgénicas y evaluó las distancias a las que se había dispersado el polen, y observando la expresión de la proteína transgénica en las semillas producidas en los cinturones, concluyendo que hay un aislamiento a 12.5 metros de largo, y que la siembra de cinturones de plantas no transgénicas puede ser un método efectivo para establecer sembradíos de transgénicos de algodón con menores riesgos de contaminación.

El escape de los genes del algodón puede producirse a través del polen o de la semilla, aunque no se tienen registros de las distancias que esta última puede recorrer, sin embargo, como precaución en Estados Unidos se exige en los cultivos transgénicos, utilizar trampas para las semillas que pudieran desprenderse y volar (U.S. E.P.A., 1999).

1.3.3.2 Los métodos indirectos

Los métodos indirectos son aquellos que utilizan observaciones de las frecuencias alélicas u otras características medibles de las especies, para deducir qué cantidad de flujo génico ocurrió para producir los patrones espaciales observados. Los métodos indirectos dependen de modelos

matemáticos qué predicen que patrones se observarían con las diferentes tasas de flujo génico.

Las estimaciones indirectas tienen la ventaja de que incorporan los efectos de todos los tipos de dispersión y promedian en forma efectiva las variaciones en la dispersión a través del tiempo. Los métodos indirectos poseen la desventaja de que dependen de supuestos acerca de los procesos que afectan a las frecuencias alélicas, y estos supuestos no pueden ser probados en forma independiente. Por ejemplo, las estimaciones indirectas asumen que la especie se encuentra en equilibrio genético y demográfico, algo que puede no ser cierto.

El método indirecto más comúnmente utilizado se basa en el estadístico F_{ST} de Wright, el cual es una medida de la correlación entre los genes en una subpoblación en relación con la población entera. El mismo Wright lo definió como la cantidad de consanguinidad causada por las diferencias en las frecuencias génicas entre las poblaciones y encontró que en un solo locus:

$$F_{ST} = \delta p^2 / p(1-p)$$

donde p y δp^2 , son la media y la varianza de las frecuencias alélicas entre poblaciones, y es equivalente a la siguiente fórmula:

$$F_{ST} = 1 / 4 N_e m + 1$$

Donde la proporción F_{ST} es la variación alélica total que es atribuible a las diferencias entre las poblaciones y predice que la divergencia neutral del locus, es determinada por el número de alelos que se intercambian entre

poblaciones en cada generación (Latta, 2004). Así que representa la diferenciación genética entre las poblaciones y es un estimador, en el equilibrio, de la migración, por lo tanto es un reflejo del aislamiento que existe entre las mismas (Ouborg *et al.*, 1999).

Slatkin (1993), encontró más recientemente que F_{ST} puede proveer más información si se calcula para cada par de poblaciones muestreadas, considerando la tasa de aproximación al equilibrio de F_{ST} en el modelo "paso a paso", ya que aún cuando el tiempo total que le lleva a F_{ST} alcanzar sus valores de equilibrio entre pares de poblaciones es bastante largo, el patrón de los valores de F_{ST} antes de que se alcance el equilibrio es también revelador. Es un modelo en el cual hay un conjunto de sitios vacíos que son colonizados todos a un mismo tiempo τ en el pasado por poblaciones que descienden de una única población ancestral. Este modelo representa dispersión rápida de una especie dentro de un área previamente desocupada. Entre el tiempo τ y el presente existe flujo génico entre poblaciones adyacentes y que el patrón de equilibrio de M ($M = 4Nm/k$, donde k es la distancia que separa a las poblaciones) es una función de la distancia observada entre las poblaciones que se encuentran suficientemente cerca, y que no habría ninguna relación entre M y la distancia para las poblaciones que se encuentran separadas por distancias más grandes. En otras palabras, el patrón de aislamiento por distancia aumenta a medida que crecen los valores de τ . El diámetro del área en la

cual el patrón de equilibrio es detectable es aproximadamente proporcional a $\sqrt{Nm} \tau$.

Numerosos estudios han aplicado tanto los métodos directos como los indirectos a poblaciones naturales. El utilizar cada método en forma separada provee de información acerca de la especie estudiada, pero en ausencia de otros conocimientos acerca de la especie es difícil saber qué es lo que verdaderamente se está aprendiendo. Los estudios en los cuales se han utilizado métodos directos e indirectos, sugieren que las especies caen a grandes rasgos en tres categorías (Slatkin, 1993). La primera contiene a las especies que los estudios directos indican que poseen una gran capacidad de dispersión y que los estudios indirectos indican altos niveles de flujo génico. Muchas especies de aves son de este tipo (Barrowclough y Johnson, 1988). La segunda categoría contiene a las especies que tanto los métodos directos como indirectos indican que existe una muy baja dispersión. Especies de salamandras son de este tipo (Slatkin, 1987). La tercera categoría, contiene a las especies en las cuales los estudios directos indican que la dispersión ocurre sobre distancias muy cortas, pero los estudios indirectos indican que ocurre un flujo génico sustancial sobre distancias mucho más grandes.

Hay dos explicaciones para la diferencia entre las estimaciones directas e indirectas del flujo génico (Slatkin, 1987). Una es que la dispersión es altamente variable en el tiempo. Puede ser que los estudios directos se pierdan los eventos raros de dispersión que son los responsables de los

altos niveles de flujo génico hallados en los estudios indirectos. Esto es probablemente cierto para algunas especies debido a que la dispersión a largas distancias puede ser provocada por condiciones ecológicas inusuales, que favorecen el flujo génico, como lo serían huracanes, o cambios en las corrientes marítimas, cualquier condición climática que no podemos percibir fácilmente pero que pueda influir en el flujo génico. Otra explicación es que estas especies no se encuentran aún en equilibrio génico bajo sus actuales condiciones demográficas. Este sería el caso si, por ejemplo, la especie hubiera expandido recientemente su distribución geográfica. Sabemos que este proceso puede ocurrir muy rápidamente. El que una especie se encuentre o no en equilibrio génico es de interés para comprender el potencial evolutivo de las especies. El flujo génico puede restringir la evolución de las poblaciones impidiendo la adaptación a las condiciones locales, aunque, si una especie no se encuentra en equilibrio bajo los niveles actuales de flujo génico, entonces la selección no está restringida por el flujo génico y las adaptaciones locales pueden evolucionar (Slatkin y Hudson, 1991).

1.4 Marcadores moleculares

Los microsatélites o simples secuencias repetidas (SSRs) (Litt y Luty, 1989), son unidades de DNA formados de 1-10 pares de bases, por ejemplo mononucleótidos (TT)_n, dinucleótidos (AT)_n, o tetranucleótidos (AAGG)_n. Estos loci genéticos se encuentran en regiones codificadoras y no

codificadoras del DNA genómico y una de las hipótesis más probables sobre su origen es que se forman por eventos de rompimiento durante la replicación de estos sitios los cuales generan polimorfismos con valores superiores al 90% (Gupta *et al.*, 1996). Los microsátélites de DNA nuclear han sido detectados en múltiples grupos de plantas y animales, y han sido utilizados fundamentalmente para estudios sobre la variación genética intra e inter específica, análisis de linajes y sobre los sistemas reproductivos. Recientemente se han encontrado microsátélites en algunos organelos citoplasmáticos, como el cloroplasto (Vendramín *et al.*, 1996) y la mitocondria. Por no ser recombinantes, y por que los organelos son heredados uniparentalmente han sido exitosamente utilizados.

En estudios realizados con el mtDNA de animales, se han observado altas tasas de sustitución que han proporcionado información en muchos aspectos de biología evolutiva de las poblaciones, incluyendo patrones de la migración y niveles de diferenciación (Hedrick, 1983).

En plantas, sin embargo, el genoma de la mitocondria es sumamente diverso, caracterizado por un tamaño grande e índices lentos de sustitución del nucleótidos, además, presenta recombinación intramolecular, por lo que ha estado limitado su uso en genética de poblaciones (Jarne y Lagoda, 1996).

El genoma del cloroplasto, sin embargo, comparte muchas características con el DNA mitocondrial de los animales, presenta alto grado de conservación, una carencia general de heteroplasma y de recombinación,

por ello es el genoma del cloroplasto una herramienta atractiva para estudios filogenéticos de las plantas (Jarne y Lagoda, 1996). Además, la herencia maternal generalmente en angiospermas y paternal en gimnospermas permite aclarar las contribuciones relativas del flujo de la semilla y del polen a la estructura genética de poblaciones (Goldstein *et al.*, 1995).

En los últimos años se realizaron investigaciones que describen el desarrollo de microsatélites en *Gossypium hirsutum*, las cuales se citan a continuación.

Reddy, *et al* (2001), desarrollaron una investigación para obtener todos los microsatélites posibles en el genoma del algodón, para después poder establecer la estructura y como base para poder realizar otros estudios posteriormente. Obtuvieron la secuencia de 588 microsatélites, logrando amplificar 307 (305 en el núcleo y 2 en el cloroplasto), de los cuales realizaron pruebas de los polimorfismos para 152, resultando polimórficos 74. Todos los datos se encuentran en el GenBank, incluyendo a los dos SSR de cloroplasto para los cuales no se realizó ninguna prueba de amplificación y polimorfismo.

Siu, *et al.* (2001), aseguran que los microsatélites representan una nueva era de marcadores moleculares en el algodón, ellos asignaron los microsatélites del núcleo a diferentes lugares de los cromosomas, caracterizando así las diferentes regiones del genoma, y confirmando que

una región del genoma que es llamada subgenoma A está conservada en la evolución del género.

Gutiérrez, *et al.* (2002), estiman las distancias genéticas entre las diferentes generaciones, para asociar la divergencia con el mejoramiento de las cosechas de algodones, utilizando microsatélites del núcleo, y correlacionando la descendencia con características fenotípicas de la fibra producida alrededor de las semillas. La distancia genética más elevada fue 0.34, resultado de una cruce de dos cultivos australiano, mientras que la más baja fue 0.06. para los mismos cultivos. Este estudio demostró que los SSR son secuencias muy útiles para la selección de ciertos fenotipos que se presentan en la F₂.

Zhou, *et al.* (2002), utilizan microsatélites nucleares desarrollados para la canola en diferentes cultivos como el algodón, el trigo, el arroz, naranja, col y uva, y amplifican con las mismas temperaturas en el PCR, obteniendo bandas polimórficas en geles de poliacrilamida.

Liu y Wendel (2002), describen a los microsatélites como herramientas muy útiles en la identificación de una característica que se considera un beneficio en la cosecha. Las flores de *Gossypium hirsutum* son receptoras de polen durante un solo día; si no se logra la polinización, entonces no se presentará la formación de las semillas. Los agricultores se dedican a seleccionar a las flores que abren más tiempo y con los microsatélites se pueden detectar cuáles son los mejores padres para las siguientes cosechas, así como analizar la distancia genética entre la nueva

al.(2003), utilizaron seis genes de núcleo y cloroplasto, para evaluar la rápida diversificación del género *Gossypium* en América, y analizar la posibilidad de una incongruencia en el origen del género, ya que concluyeron que se trata de un grupo monofilético pero no pueden establecer que género es el grupo hermano, así como las rutas que convergieron para la diversificación, ya que esta, fue muy rápida para los marcadores que utilizaron, resultando ser informativos los del núcleo y no los del cloroplasto. Sin embargo, también utilizan los datos anteriores para realizar una evaluación sobre la evolución del tamaño de los genomas de las plantas, y las consecuencias ecológicas que implica la formación de las poliploidias, aunque en el caso del algodón no se encuentra acompañada por rápidos cambios en la diversificación del genoma, como sucede con el trigo y la canola, y por lo tanto diferencian dentro del genoma del algodón a dos subgenomas el A (que antes ya se había descrito) y el subgenoma D, el cual está menos conservado.

Se han realizado estudios comparativos de los marcadores moleculares en el genoma del algodón, Liu y Wendel (2001), reportan confianza en el uso de ISSR (Inter. Simple Sequence Repeats), comparadas con los SSR, ya que se obtiene resultados rápidamente y al no ser necesaria la secuencia del marcador, resultan más económicos, son polimórficos y tienen amplia distribución en el genoma. La mayor utilidad que presentara este estudio en el futuro, es que ante la baja variación genética que se encuentra en las plantas cultivadas.

Ulloa y Percey (2002), publicaron un mapa genético de *Gossypium hirsutum*, realizado con RFLPs, para el cual utilizaron únicamente variedades cultivadas. Y aunque trataron de probar alguna característica de calidad de la fibra ligada a los marcadores de RFLP, sin encontrarla, el mapa es el primero que presenta marcadores en los 26 cromosomas, además, Nguyen en 2004, retoma el mapa y logra colocar 466 microsatélites.

2 El problema

2.1 Definición del problema de estudio

Gossypium hirsutum es una especie que tuvo su centro de origen en México, es en donde esta mayormente distribuida en la actualidad, adquiere más importancia por su relevante uso para la humanidad. Saber en que estado se encuentra su diversidad genética, es también saber cual es la reserva de genes que pueden tener uso en la industria, pero también es necesario saberlo, para poder establecer como preservar la diversidad de esta especie en estado silvestre, aun más por el cultivo de plantas genéticamente modificadas, ya que pudiese estar en peligro la diversidad genética de las plantas silvestres si fueran contaminadas.

Para poder establecer cual es el riesgo de contaminación es necesario primero, evaluar la estructura de las poblaciones y estimar el flujo génico que existe entre estas. El análisis del aislamiento que brinda la distancia, es lo que nos ayudara a inferir las estrategias de conservación.

2.2 Objetivos

Determinar la estructura genética de poblaciones de *Gossypium hirsutum*.

Estimar las distancias genéticas entre las poblaciones.

Relacionar los datos sobre distancia genética con las distancias geográficas entre las poblaciones determinando si existe aislamiento reproductivo por distancia entre ellas.

Sugerir las precauciones necesarias para el manejo de plantas transgénicas en México.

2.3 Hipótesis

Las plantas de *Gossypium hirsutum*, son autógamas, y según las estimaciones, sus polinizadores tienen baja dispersión, por lo tanto, esperamos que las poblaciones se encuentren estructuradas debido a la ausencia del flujo génico entre las mismas.

3 Material y método

3.1 Material biológico

Las localidades de las poblaciones fueron obtenidas de la red de biodiversidad de CONABIO (REMIB) en la que se encontraron ejemplares de *Gossypium hirsutum* en las siguientes colecciones:

Herbario XAL del Instituto de Ecología, A.C., México (33 ejemplares)

Banco Nacional de Germoplasma Vegetal, México (1 ejemplar)

Herbario IEB del Instituto de Ecología, A.C., México (12 ejemplares)

Herbario de la Universidad de Texas - Austin TEX, LL, EUA (26 ejemplares)

Árboles de la Península de Yucatán, Flora del Distrito de Tehuantepec, Oaxaca y la Familia Asteraceae en México (9 ejemplares)

Herbario Nacional MEXU (109 ejemplares)

Todas las referencias fueron revisadas, y descartadas las provenientes de cultivos e introducidas. Las coordenadas geográficas fueron utilizadas para encontrar los sitios de muestreo. Además se revisaron los ejemplares de la colección del Herbario Nacional en el Instituto de Biología de la UNAM, en la cual se aprendió a reconocer a las plantas y a utilizar la clave taxonómica de Fryxell (1979).

Con base en información se elaboró un mapa con divisiones de las provincias biogeográficas de México.

Las localidades en los estados de Tamaulipas, Veracruz, San Luis Potosí, Tabasco y Chiapas no fueron encontradas, mientras que en los siguientes estados se realizaron colectas: Sinaloa, Nayarit, Oaxaca, Campeche, Morelos, Durango, Yucatán y Quintana Roo.

El tamaño de la muestra se definió en función del tamaño de las poblaciones, sin embargo, desde el inicio de la investigación se encontraron muy pocas plantas por lo que todas fueron colectadas, y esa es la razón para que el número de ejemplares de cada población sea diferente. En las tres colectas del estado de Oaxaca, y en tres de la Península de Yucatán se colectaron plantas en localidades muy cercanas, que después fueron reunidas en poblaciones. En el Apéndice 1 se encuentran las coordenadas geográficas de las poblaciones, así como, las coordenadas geográficas de las localidades que integran las poblaciones de Oaxaca y la Península de Yucatán con mapas, las cuales fueron obtenidas con un GPS. La Tabla 1, muestra la distancia geográfica que separa a las trece poblaciones con las que se trabajó en esta investigación.

La Península de Yucatán fue dividida en 4 regiones: Península de Yucatán Noreste (YNE), Península de Yucatán Noroeste (YNO), Península de Yucatán Sureste (YSE) y Península de Yucatán Suroeste (YSO).

Tabla 1. Distancia geográfica entre trece poblaciones de *Gossypium hirsutum* (donde, OA es Oaxaca A, OC es Oaxaca C, OB es Oaxaca B, Na es Nayarit, Si1 es Sinaloa 1, Si2 es Sinaloa 2, Cam es Campeche, Mor es Morelos, YNO es Península de Yucatán Noroeste, YSO es Península de Yucatán Suroeste, YNE es Península de Yucatán Noreste, YSE es Península de Yucatán Sureste y Du es Durango).

| Km | OA | OC | OB | Na | Si1 | Si2 | Cam | Mor | YNO | YSO | YNE | YSE | DU |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| OA | 0 | 191 | 71.1 | 1162 | 1323 | 1274 | 377 | 493 | 695 | 586 | 831 | 755 | 1190 |
| OC | 191 | 0 | 155 | 1077 | 1267 | 1216 | 567 | 445 | 887 | 777 | 1021 | 937 | 1148 |
| OB | 71.1 | 155 | 0 | 1187 | 1358 | 1309 | 420 | 525 | 747 | 632 | 872 | 783 | 1229 |
| Na | 1162 | 1077 | 1187 | 0 | 264 | 224 | 1427 | 673 | 1601 | 1569 | 1791 | 1806 | 279 |
| Si1 | 1323 | 1267 | 1358 | 264 | 0 | 50.7 | 1538 | 832 | 1664 | 1653 | 1857 | 1898 | 157 |
| Si2 | 1274 | 1216 | 1309 | 224 | 50.7 | 0 | 1493 | 782 | 1625 | 1611 | 1817 | 1856 | 126 |
| Cam | 377 | 567 | 420 | 1427 | 1538 | 1493 | 0 | 767 | 334 | 212 | 454 | 393 | 1390 |
| Mor | 493 | 445 | 525 | 673 | 832 | 782 | 767 | 0 | 990 | 932 | 1170 | 1156 | 706 |
| YNO | 695 | 887 | 747 | 1601 | 1664 | 1625 | 334 | 990 | 0 | 136 | 192 | 294 | 1508 |
| YSO | 586 | 777 | 632 | 1569 | 1653 | 1611 | 212 | 932 | 136 | 0 | 247 | 247 | 1499 |
| YNE | 831 | 1021 | 872 | 1791 | 1857 | 1817 | 454 | 1170 | 192 | 247 | 0 | 190 | 1701 |
| YSE | 755 | 937 | 783 | 1806 | 1898 | 1856 | 393 | 1156 | 294 | 247 | 190 | 0 | 1745 |
| DU | 1190 | 1148 | 1229 | 279 | 157 | 126 | 1390 | 706 | 1508 | 1499 | 1701 | 1745 | 0 |

3.2 Extracción de DNA

Chaudhry *et al.*, en 1999 y Zhang *et al.*, en 2001, publicaron métodos para la extracción de DNA en los que hacen notable el problema de extraer con calidad eliminando terpenos, polisacáridos y fenoles que contienen en las plantas de *G. hirsutum*. Por lo que se utilizó el método CTAB 2%, modificado por Vázquez-Lobo (1996), pero modificándolo para que fuera aun más astringente, utilizando un buffer CTAB 2% PVP, aunque después de realizar extracciones de mala calidad, tomamos las sugerencias de los protocolos elaborados por Chaudhry *et al.* (1999) y Zhang *et al.* (2001)

donde utilizan hojas jóvenes provenientes de plantas juveniles, germinadas en cámaras especiales, de manera que se logró que la cantidad de polisacáridos y fenoles disminuyera considerablemente, y por lo tanto no evitara la amplificación de los microsátélites.

Se estandarizaron las condiciones de germinación de las semillas colectadas: ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno, se mantuvo la humedad a 50% y la temperatura a 35°C durante la fase luminosa y 25°C durante la fase oscura. Posteriormente se realizó el siguiente protocolo. Comienza moliendo en un mortero estéril las hojas con ayuda de nitrógeno líquido, se agrega 1 ml de buffer de extracción CTAB2% (Tris-HCl 100mM pH8, NaCl 1.4M, EDTA 20mM, CTAB 2% y b-ME 0.3%) con el objeto de romper las paredes celulares y extraer el DNA. La mezcla con CTAB2% se recupera en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifuga a 10,000 rpm durante 8 min a 4°C. Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 1 ml de buffer CTAB2%. Una vez resuspendido, se incuba en un baño a 60°C durante 10 min. Posteriormente se agregan 600 µl de cloroformo:octanol 24:1 y se agita hasta homogeneizar para después centrifugar a 7000 rpm durante 15 min (hasta que el sobrenadante quede transparente). El sobrenadante se recupera (aproximadamente 600 µl) y traslada a un tubo nuevo, el DNA aquí se precipita con aproximadamente 500 µl de isopropanol frío y se deja reposar de 24 a 48 horas a -20°C. A continuación se centrifuga a 9000 rpm durante 5 min a 4°C y se elimina el

sobrenadante. El DNA (pellet) puede limpiarse agregando 1 ml de etanol 70% frío y centrifugando a 7000 rpm durante 5 min a 4°C. Por último, tras eliminar el sobrenadante y dejar evaporar el etanol (30 min aproximadamente) el pellet se resuspende con 200µl de ddH₂O.

Las muestras de DNA obtenidas se dividieron en 2, la mitad se almacenó en un congelador a -70°C y la otra mitad se mantuvo a -20°C para utilizarla constantemente en los experimentos. De la muestra almacenada a -20°C se realizaron diluciones 1µl en 18µl de ddH₂O.

3.3 Amplificación y elección de los microsatélites

3.3.1 Microsatélites obtenidos de *Gossypium hirsutum*

Reddy *et al* (2001), encontraron dos microsatélites de cloroplasto en su exploración de todo el genoma de *G. hirsutum* (Gh1 y Gh2), ellos no determinaron si eran polimórficos o monomórficos, ni el método de amplificación.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador, en un volumen total de reacción de 25 µl. La solución que se preparó para realizar esta reacción, por individuo, fue la siguiente: 2.5 µl de buffer para PCR 10x (10X PCR Buffer minus Mg 1 ml de Life Technologies, Invitrogen BRL), 1 µl de MgCl₂ 50 mM (50 mM Magnesium Chloride 1 ml de Life Technologies, Invitrogen BRL), 0.5 µl de la mezcla 20 mM de los 4 dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato) (Ultrapure dNTP Set (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 50 mM Invitrogen), 2.5 µl de Primer *F* 10 pM, 2.5 µl de Primer *R* 10

pM, 0.05 U de Taq polimerasa (Taq DNA Polymerase 125 U, 2.5 U/ μ l de Life Technologies, Invitrogen, o Taq obtenida en el laboratorio de *E. coli*), 25 ng de DNA genómico y el volumen de agua bidestilada estéril necesario para lograr un volumen total de 25 μ l.

PCR (Gh1 y Gh2)

desnaturalización inicial a 95°C por 5 min.

80°C por 5 min.

26 ciclos de:

desnaturalización a 94°C por 1 min.

alineamiento a 55°C por 1 min.

extensión a 72°C por 1 min.

extensión final a 72°C por 5 min.

3.3.2 Microsatélites diseñados para el cloroplasto de angiospermas dicotiledóneas.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador, en un volumen total de reacción de 25 μ l. La solución que se preparó para realizar esta reacción, por individuo, fue la siguiente: 2.5 μ l de buffer para PCR 10x (10X PCR Buffer minus Mg 1 ml de Life Technologies, Invitrogen), 1 μ l de MgCl₂ 50 mM (50 mM Magnesium Chloride 1 ml de Life Technologies, Invitrogen), 0.5 μ l de la mezcla 20 mM de los 4 dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato) (Ultrapure dNTP Set (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 100 mM Invitrogen), 2.5 μ l de Primer *F* 10 pM, 2.5 μ l de Primer *R*

10 pM, 0.05 U de Taq polimerasa (Taq DNA Polymerase 125 U, 2.5 U/ μ l de Life Technologies, Invitrogen o sintetizada en el laboratorio con una cepa de *E. coli*), 25 ng de DNA genómico y el volumen de agua bidestilada estéril necesario para lograr un volumen total de 25 μ l.

PCR (CCMP 1 y CCMP 2)

desnaturalización inicial a 94°C por 5 min.

58°C por 1 min.

74°C por 1 min.

29 ciclos de:

desnaturalización a 94°C por 1 min.

alineamiento a 58°C por 1 min.

extensión a 72°C por 1 min.

extensión final a 72°C por 5 min.

Los siguientes PCR únicamente cambian en la temperatura de alineamiento

CCMP 5: 62°C por 1 min.

CCMP 10: 56°C por 1 min.

3. 4 Secuenciación

Las secuenciaciones se llevaron a cabo para comprobar que los análisis se realizaran con los fragmentos correctos, y poder cuantificar el tamaño exacto de los fragmentos.

Las fragmentos se extrajeron de geles de agarosa con el Kit QIAquick de Quiagen, posteriormente se clonaron con el plásmido PGEM -TE easy Vector System II de Promega, la reacción de secuenciación se realizó con BigDye 3.1 y finalmente la secuenciación se llevo a cabo en un ABI 377.

3.5 Análisis de resultados

3.5.1 Variación genética

Los estimadores de variación genética se calcularon con el programa Arlequín ver. 2.0 (Schneider *et al.*, 2000). Se estimó la frecuencia relativa de cada alelo y de cada haplotipo, tanto dentro de las poblaciones como en el total de la muestra. La diversidad genética fue estimada como la heterocigosis esperada para datos diploides (H_e ; Nei, 1987), lo cual se estimó tanto para el conjunto de las poblaciones (H_T) como para cada población por separado.

Se utilizó el índice theta [$\theta = 2Mu$ donde, en este caso M es igual al tamaño poblacional (N) por utilizar un marcador haploide y u es la tasa de mutación (Schneider *et al.*, 2000)], como un estimador indirecto del tamaño efectivo poblacional, asumiendo el modelo de mutación "alelos infinitos".

Otra manera de estimar la variación genética es utilizando la heterocigosis esperada (H_e), la cual se puede estimar para cada una de las poblaciones o para la especie, utilizando toda la muestra. La heterocigosis está definida desde la ecuación por los heterocigos, $2pq$ o H , este valor representa una frecuencia y por lo tanto siempre estará entre 0 y 1, y su valor bajo las reglas del equilibrio de Hardy-Weinberg será 0.5 (Hartl y Clark, 1989).

3.5.2 Estructura de las poblaciones

El análisis teórico de poblaciones subdivididas sigue el razonamiento que, cuando las poblaciones son finitas, la deriva genética al azar conducirá eventualmente a la pérdida de variación genética en cada subpoblación, siempre que las tasas de flujo genético y de la mutación sean bajas, y que los alelos neutrales a la presión selectiva (Hartl y Clark, 1989). Sin embargo, la variación genética total puede aumentar entre subpoblaciones, si diversos alelos están fijados en las diversas localidades. La evolución en poblaciones subdivididas se trata a través del modelo de islas y de "tiro de piedra" (Stepping stone model). En el primero la estructura de la población (Wright, 1969), es un sistema infinito de islas, con el mismo tamaño efectivo N y, sin ninguna estructura geográfica, que intercambia una proporción (m) de migrantes cada generación. Bajo este panorama, la diferenciación de la población es descrita por un parámetro F_{ST} , que es la probabilidad de que dos alelos encontrados al azar en una subpoblación sean idénticos por descendencia. En el equilibrio Hardy-Weinberg, con índices bajos de migración, y sin selección o mutación, F_{ST} mide la reducción de heterocigos debido a las diferencias genéticas entre las poblaciones, con relación a lo que sería si no hubiese subdivisión. Estas estimaciones se realizaron también con el programa Arlequín ver. 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

Las relaciones entre individuos de las poblaciones se obtuvieron con el programa STRUCTURE 2.0 (Pritchard *et al.*, 2002), el cual obtiene los datos

de los individuos de una lista sin asociaciones entre los mismos, y prueba la probabilidad de cada individuo pertenezca a cada uno de los grupos, así establece también en cuantos grupos se distribuyen mejor los datos. Los resultados son el número de grupos que realizando la prueba un millón de veces obtuvieron el menor LN P (D) y la F_{ST} para cada uno de estos grupos, además de la probabilidad de cada uno de los individuos a pertenecer a los grupos artificialmente formados por este programa.

3.5.3 Comparación entre poblaciones

Las comparaciones entre pares de poblaciones realizadas se basan en la propuesta de Slatkin (1993). Esta estimación del flujo genético es una herramienta para encontrar la tasa de migración entre los pares de poblaciones. Se utilizó el programa Arlequín ver. 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

Existen varias maneras de estimar las distancias genéticas entre las poblaciones, pero todas se encuentran ligadas a la F_{ST} . Una de las medidas de distancia genética más utilizada es la D de Nei (1987), la cual estima la identidad genética normalizada (I), que es la probabilidad de que al escoger al azar un alelo en 2 poblaciones diferentes (X y Y), resulten ser idénticos, en relación a la probabilidad de hallar alelos idénticos tomados al azar dentro de cada una de las poblaciones (Hartl y Clark, 1989), esto es:

$$I = J_{XY} / (J_{XX}J_{YY})^{1/2}$$

Donde:

$J_{XX} = \sum p_i^2$; probabilidad de hallar 2 alelos idénticos tomándolos al azar en la población X.

$J_{YY} = \sum q_i^2$; probabilidad de hallar 2 alelos idénticos tomándolos al azar en la población Y.

$J_{XY} = \sum p_i q_i$; probabilidad de hallar 2 alelos idénticos tomando al azar uno de la población X y uno de la población Y.

A partir de las identidades genéticas, se puede conocer la distancia genética (D), de la siguiente manera:

$$D = -\ln(I)$$

Cuando las frecuencias alélicas no se parecen, la identidad (I) es igual a cero y D es infinito, mientras que, si son iguales I vale uno y D vale 0 (Hedrick, 1983). También se estimó D con el programa Arlequín ver. 2.0 (Schneider, *et al.* 2000).

Utilizando el programa NJBAFD (Naoko Tekezaki, Instituto Nacional de Genética, Japón) se construyó un árbol de neighbor-joining entre las poblaciones, el soporte de las ramas se estimó haciendo 1000 replicaciones de bootstrap y la aproximación fue realizada utilizando la distancia de Shiver (D_{sw} , Shiver *et al.*, 1993), la cual es específica para loci altamente polimórficos, con tasas de mutación elevadas como los microsatélites.

3.5.4 Asociaciones entre haplotipos

Se realizaron tres métodos para establecer las relaciones entre los haplotipos. El primero fue la red de haplotipos, el cual interconecta a los mismos por una serie de eventos mutacionales utilizando parsimonia estadística (Templeton, 1998, Carbone y Khon, 2001, Templeton 2004), el resultado es una red de conexiones igualmente parsimoniosas, donde los haplotipos se encuentran ubicados como nodos o como puntas de una rama. Este análisis se llevó a cabo con el programa TCS: estimating gene genealogies (Clements *et al.*, 2000). El cual utiliza para esta estimación una matriz que contiene el número de diferencias en tamaño entre los distintos haplotipos, que a su vez es el número de mutaciones que separan a los haplotipos.

Posteriormente utilizando las reglas de anidamiento de Templeton 2004, se estiman los clados anidados. Cada haplotipo punta que este separado por un solo evento mutacional se enlazarán en el nivel uno, y así continuaran enlazándose en los niveles superiores (dos eventos en el nivel 2, etc.) por esta razón el programa también inventa los pasos mutacionales faltantes en la red, dibujando haplotipos que enlazarían los clados.

La segunda herramienta necesita al método anterior para introducir los datos, fue propuesto por los mismos autores debido a que realizar inferencias sobre la red de haplotipos puede ser muy confuso, además cada suposición al respecto carece de peso estadístico. Es necesario para ello

establecer dos tipos de distancias. La primera: Dc (clade distance), mide la distribución geográfica dentro del clado específico; y para esto estima la dispersión de cada haplotipo con un centro geográfico respecto a todos los haplotipos que integran el mismo clado anidado. La segunda: Dn (nested clade distance), mide como se distribuye geográficamente un clado con respecto a sus clados hermanos, estimando la distancia entre que un haplotipo perteneciente a un clado de anidado, y el centro de todos los haplotipos del mismo nivel de ese clado, finalmente también realiza una estimación entre las distancias de los nodos y las puntas, estas comparaciones deben ser significativas para poderse analizar y rechazar la hipótesis nula de ninguna asociación geográfica entre los haplotipos. El programa GeoDis 2.0 fue diseñado por Posada y Templeton 2004 para realizar esta prueba, así como la clave de inferencia biológica publicada en julio de 2004 con la se interpretaron los resultados significativos.

El tercer método fue, realizar un árbol de haplotipos utilizando el programa Mega 3 (Kumar, 2004), el cual aplica el método de neighbor-joining, a partir de una matriz de estados de carácter de cada alelo en los diferentes loci.

4 Resultados

Se colectaron, germinaron, extrajeron y analizaron 141 individuos de *Gossypium hirsutum*, colectados en 13 poblaciones de la República Mexicana.

Durante esta investigación se utilizaron 6 microsatélites de cloroplasto, dos desarrollados con *Gossypium hirsutum*, que no habían sido amplificados, y que durante esta investigación se estandarizaron, y amplificaron, pero solo se utilizó uno para el análisis de resultados, ya que el otro resultó monomórfico y por lo tanto, no era informativo.

Los otros cuatro microsatélites de cloroplasto utilizados, se obtuvieron de los publicados para angiospermas dicotiledóneas (Weising y Gardner, 1999). Los microsatélites fueron secuenciados para corroborar la existencia de las repeticiones en el fragmento que se estaba amplificando y el tamaño del mismo, dichas secuencias se muestran en el Apéndice 2.

4.1 Variación genética

La Tabla 2 muestra los índices estándar de diversidad genética obtenidos con el programa Arlequín ver. 2.0 (Schneider *et al.* 2000), en donde las colectas de uno y dos individuos carecen de theta, ya que no es posible realizar dicha estimación, y por la misma razón la heterocigosis esperada (H_e) no resulta informativa, así como algunas F_{ST} de la Tabla 3 no son significativas (marcadas con asterisco).

La heterocigosis total es 0.98 ± 0.004 , lo que indica que la variación intraespecífica en las poblaciones de *Gossypium hirsutum* es muy alta, consecuentemente en la misma tabla podemos observar que los índices de heterocigocidad más altos los presentan las poblaciones Nayarit y Península de Yucatán Noreste (Y NE), seguidas por Oaxaca A y B, Sinaloa 1, Campeche, y Península de Yucatán Noroeste (Y NO), estos resultados indican que la mayoría de las poblaciones de *Gossypium hirsutum* presentan alta variación genética intrapoblacional. El resultado que esperaríamos si estas poblaciones se encontraran cerca del equilibrio sería 0.5 y celo la población de Oaxaca C, esta cerca de esta probabilidad.

Tabla 2. Descripción de la variación genética encontrada en las poblaciones de *Gossypium hirsutum*.

| Poblaciones | No. De ind. | Haplotipos | Sitios polimórficos | He | SD He | Theta | SD Theta |
|-------------|-------------|------------|---------------------|------|-------------|-------|------------|
| Oaxaca C | 17 | 5 | 3 | 0.43 | 0.14 | 0.55 | ± 0.33 |
| Oaxaca A | 17 | 7 | 3 | 0.85 | ± 0.05 | 4.75 | ± 2.19 |
| Oaxaca B | 9 | 4 | 2 | 0.83 | ± 0.08 | 4.04 | ± 2.5 |
| Nayarit | 9 | 7 | 5 | 0.94 | ± 0.07 | 15.4 | ± 22.2 |
| Sinaloa 1 | 23 | 9 | 3 | 0.83 | ± 0.05 | 4.06 | ± 1.5 |
| Sinaloa 2 | 7 | 4 | 3 | 0.71 | ± 0.18 | 1.91 | ± 1.7 |
| Campeche | 7 | 4 | 3 | 0.85 | ± 0.1 | 4.93 | ± 4.52 |
| Morelos | 2 | 2 | 2 | - | - | - | - |
| YNO | 14 | 7 | 4 | 0.85 | ± 0.6 | 4.93 | ± 2.8 |
| YSO | 3 | 2 | 2 | - | - | - | - |
| YNE | 28 | 14 | 5 | 0.94 | ± 0.1 | 17.27 | ± 6.8 |
| YSE | 5 | 3 | 2 | 0.8 | ± 0.16 | 3.17 | ± 3.51 |
| Durango | 1 | 1 | 0 | - | - | - | - |
| TOTAL | 141 | 40 | 5 | 0.98 | ± 0.004 | 48.82 | 11.55 |

El análisis realizado con el programa STRUCTURE, crea grupos de individuos y asigna a cada uno la probabilidad de pertenecer a cada grupo, en este caso encontraron 12 grupos, de los cuales solo 3 presentan alta afinidad de sus integrantes al mismo, el resto presentan integrantes con iguales posibilidades de estar en casi cualquiera de los grupos (entre 10% y 15% en cada uno), consecuentemente los tres grupos determinados por individuos con altas probabilidades también están definidos geográficamente. El primer grupo está integrado por individuos de la población Nayarit, cuyas probabilidades se encuentran entre el 82% y el 57%. El segundo, está integrado por individuos de las poblaciones YNO y YNE, con probabilidades del 32% al 25%. Finalmente el tercer grupo está integrado por los individuos de la población Campeche con el 25% y el 24% de probabilidad.

Este resultado indica que no todas las poblaciones están fuertemente estructuradas, sin embargo es el primer indicio de que existen poblaciones bien diferenciadas, y es probable que esto se deba a la ausencia del flujo génico de estas con el resto de las poblaciones.

4.2 Comparación entre poblaciones

Las comparaciones entre poblaciones fueron tres, la primera fue la estimación de F_{ST} , la segunda fue la estimación de Nm , y la tercera la realización de un fenograma de poblaciones.

Gossypium hirsutum presenta F_{ST} altas, este resultado indica que existe alta probabilidad de que se fijen alelos alternativos en las poblaciones, así como también, que las poblaciones presentan algún grado de estructuración genética, mientras que no es posible determinar si existe alguna estructura geográfica entre las mismas.

Las estimaciones pareadas entre poblaciones de *Gossypium hirsutum* que presentan F_{st} altas en las comparaciones, e indican subdivisión poblacional de la especie, son: Nayarit, Campeche, Península de Yucatán SO, Península de Yucatán SE.

La estimación de Nm , se realiza también para cada par de poblaciones e indica cuando es cercano a 0 que predomina la deriva génica, y cuando es mayor de 1 indica que predomina el flujo génico. En las poblaciones de *Gossypium hirsutum* podemos observar ambos casos, el problema es determinar si es realmente el flujo génico lo que está provocando los índices altos de Nm , sin embargo este tema lo abordare en la discusión, por ahora estos datos muestran que predomina el flujo génico entre algunas poblaciones, sin embargo antes de comparar es importante darnos cuenta que Morelos presenta

Tabla 3. Valores de F_{st} , encontrados en las poblaciones de *Gossypium hirsutum* (presentan asterisco cuando no son significativos).

| | Oc 1 | Oa 2 | Ob 3 | N 4 | S 15 | S 2 6 | DU 7 | YNO8 | YNE9 | YSE10 | YSO11 | M12 | C13 |
|-------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|-------|-----|-----|
| Oc 1 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| Oa 2 | 0.19 | 0 | | | | | | | | | | | |
| Ob 3 | 0.23 | - | 0 | | | | | | | | | | |
| N 4 | 0.58 | 0.47 | 0.45 | 0 | | | | | | | | | |
| S 15 | 0.11 | 0.10 | 0.12 | 0.48 | 0 | | | | | | | | |
| S 2 6 | 0.45 | 0.18 | 0.22 | 0.43 | 0.07 | 0 | | | | | | | |
| DU 7 | - | - | - | - | - | - | 0 | | | | | | |
| YNO8 | 0.18 | 0.27 | 0.24 | 0.42 | 0.24 | 0.40 | - | 0 | | | | | |
| YNE9 | 0.23 | 0.20 | 0.24 | 0.29 | 0.17 | 0.19 | - | 0.14 | 0 | | | | |
| YSE10 | 0.55 | 0.42 | 0.53 | 0.49 | 0.42 | 0.52 | - | 0.44 | 0.27 | 0 | | | |
| YSO11 | 0.64 | 0.51 | 0.52 | 0.35 | 0.47 | 0.54 | - | 0.36 | 0.25 | 0.52 | 0 | | |
| M12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | |
| C13 | 0.55 | 0.39 | 0.37 | 0.37 | 0.34 | 0.29 | - | 0.45 | 0.33 | 0.55 | 0.55 | - | 0 |

dos individuos y Durango uno, y por esta razón cualquier individuo que se le parezca hace suponer que hay flujo génico, por ahora no los vamos a mencionar, ya que si Nm es igual a infinito, quiere decir que las poblaciones tiene tanto flujo génico que no están diferenciadas, así que son idénticas, por eso es fácil obtener como resultado valores infinitos en Morelos y Durango ya que no se comparan muchos individuos. Las poblaciones Oaxaca A y B presentan el más elevado flujo génico, a su vez presentan flujo con Sinaloa. Todos los valores se pueden observar en la Tabla 4, donde podemos determinar que son predominantes las relaciones de Oaxaca, Sinaloa y Península de Yucatán Noroeste, sin embargo hay poblaciones que

podemos ver que predominan los valores bajos, Nayarit es una de ellas, podríamos decir que se encuentra aislada del resto, ya que comparte Nm altas únicamente con Durango y Morelos, por las razones ya mencionadas. Las poblaciones YSO y YNE presenta flujo genético entre sí, pero se encuentran aisladas del resto de las poblaciones, excepto YNE con Campeche que a su vez se encuentra aislada del resto de las poblaciones, estos resultados están indicando que aunque no se tenga una estructura para todas las poblaciones algunas de ellas si presentan aislamiento por distancia.

El siguiente análisis realizado fue visualizar las relaciones entre las poblaciones con un árbol, construido por el programa NJBAFD (Figura 4), el cual dibuja algunas sospechas que ya teníamos, la primera es que las tres poblaciones de Oaxaca están más relacionadas entre ellas que con el resto de las poblaciones. Las dos poblaciones de Sinaloa están relacionadas entre sí, pero resulta informativo saber que la población de Nayarit que parecía aislada esta más cercana a las poblaciones de Sinaloa, lo cual concuerda con los datos geográficos.

Finalmente Campeche y Yucatán Sureste están relacionadas entre ellas pero claramente aisladas actualmente, el problema de este árbol es que es el más parsimonioso pero no esta altamente sostenido, únicamente la división de Oaxaca A y B presenta más de 80% y la división de Sinaloa y Nayarit con el resto de las poblaciones presenta 56%.

Tabla 4. Resultados de los valores de M para trece poblaciones de

Gossypium hirsutum, donde $M = Nm$, ya que se trata de datos haplodides

| | Oc 1 | Oa 2 | Ob 3 | N 4 | S 15 | S 26 | DU7 | YNO8 | YNE9 | YSE10 | YSO11 | M12 | C13 |
|-------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|-------|-------|------|-----|
| OC 1 | | | | | | | | | | | | | |
| OA 2 | 2.11 | | | | | | | | | | | | |
| OB 3 | 1.69 | 9.66 | | | | | | | | | | | |
| N 4 | 0.36 | 0.56 | 0.60 | | | | | | | | | | |
| S 15 | 4.11 | 4.32 | 3.80 | 0.55 | | | | | | | | | |
| S 26 | 0.62 | 2.31 | 1.81 | 0.67 | 6.67 | | | | | | | | |
| DU 7 | . | . | . | . | . | . | | | | | | | |
| YNO8 | 2.24 | 1.34 | 1.58 | 0.68 | 1.60 | 0.7 | . | | | | | | |
| YNE9 | 1.64 | 2.04 | 1.57 | 1.22 | 2.36 | 2.10 | . | 3.17 | | | | | |
| YSE10 | 0.40 | 0.68 | 0.44 | 0.53 | 0.69 | 0.47 | . | 0.63 | 1.39 | | | | |
| YSO11 | 0.28 | 0.49 | 0.46 | 0.93 | 0.55 | 0.43 | . | 0.89 | 1.48 | 0.45 | | | |
| M 12 | 1.84 | 3.51 | 1.46 | 1.75 | 2.53 | 1.04 | . | inf | inf | 1.25 | 1.50 | | |
| C 13 | 0.41 | 0.79 | 0.84 | 0.85 | 0.96 | 1.21 | . | 0.62 | 1.00 | 0.41 | 0.40 | 0.82 | |

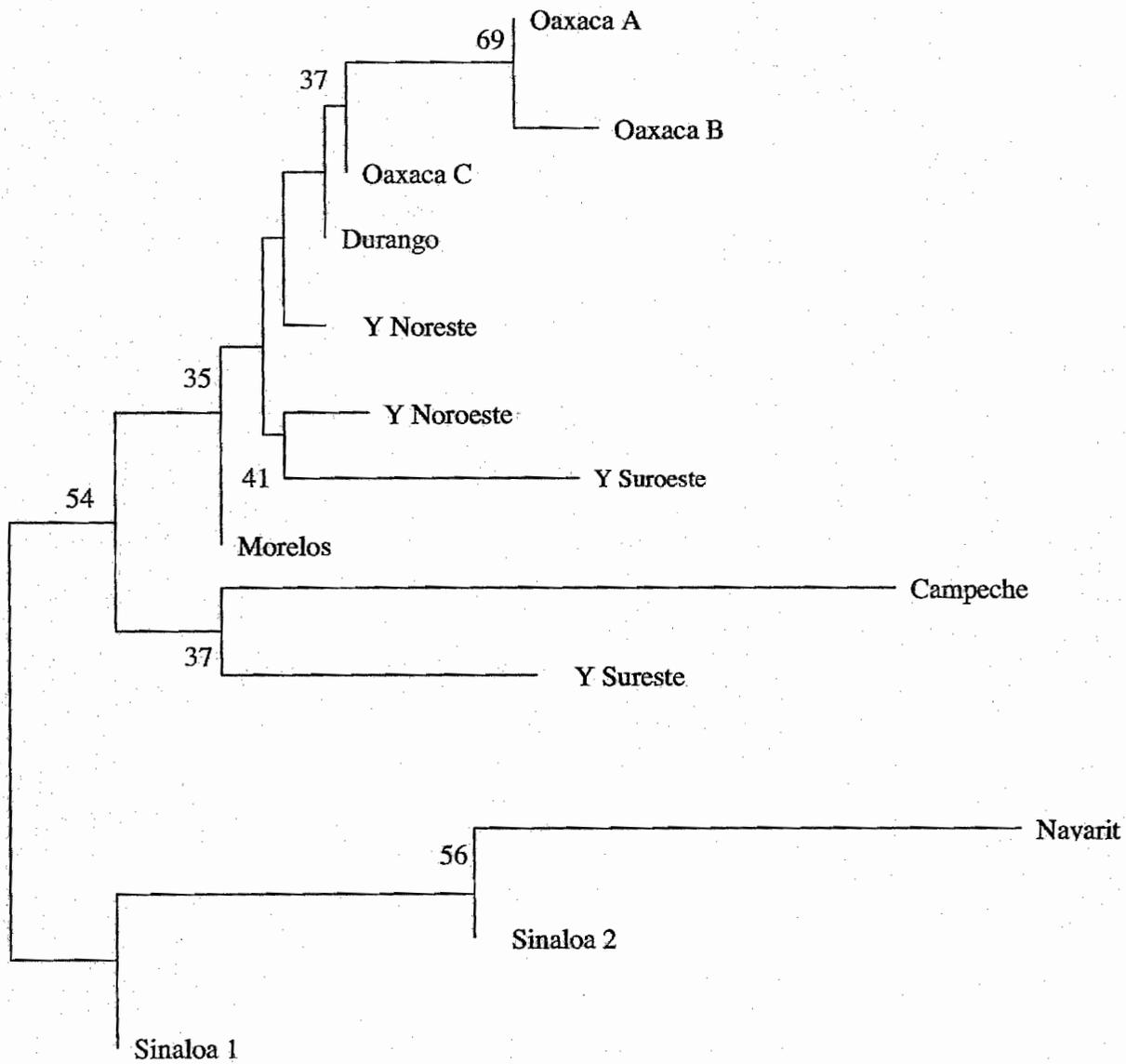


Figura 4. Construcción del fenograma de las poblaciones de *Gossypium hirsutum* con el programa NJBAFD, utilizando neighbor joining.

4.3 Asociaciones entre haplotipos

Las asociaciones entre haplotipos se realizaron con tres enfoques, el primero, la red de haplotipos y el análisis de clados anidados (Figuras 5, 6, 7 y 8), el segundo las asociaciones geográficas de estos, que se realizaron con el programa GeoDis 2.0 (Figuras 6, 7 y 8) y el tercero el árbol de haplotipos realizado con el programa Mega 3.

En la red de haplotipos (Figura 5) es difícil deducir las asociaciones geográficas, y aunque estas están presentes, inferir el proceso y la significancia de este, es todavía más difícil. La Figura 6, muestra los clados anidados en el nivel 1, la red no se muestra tan interconectada, y podemos ver sobre la misma Figura el resultado utilizando la clave de inferencia biológica de Templeton (2004).

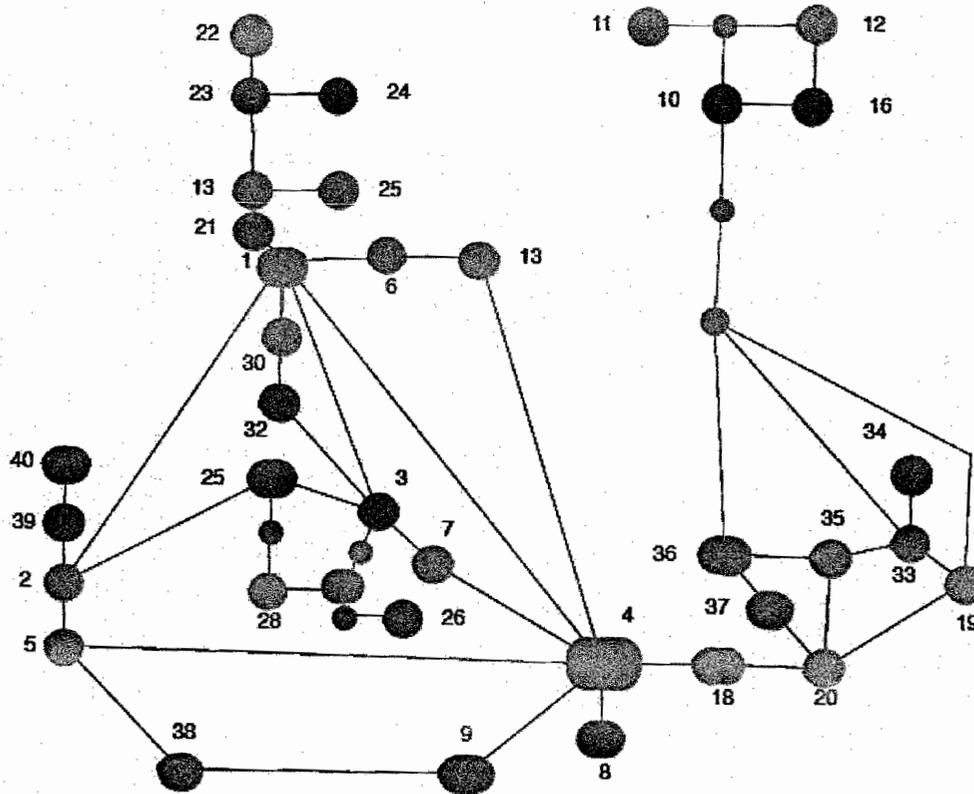


Figura 5 Red mínima de haplotipos, los círculos grandes y numerados son los haplotipos encontrados en las poblaciones silvestres de *Gossypium hirsutum*.

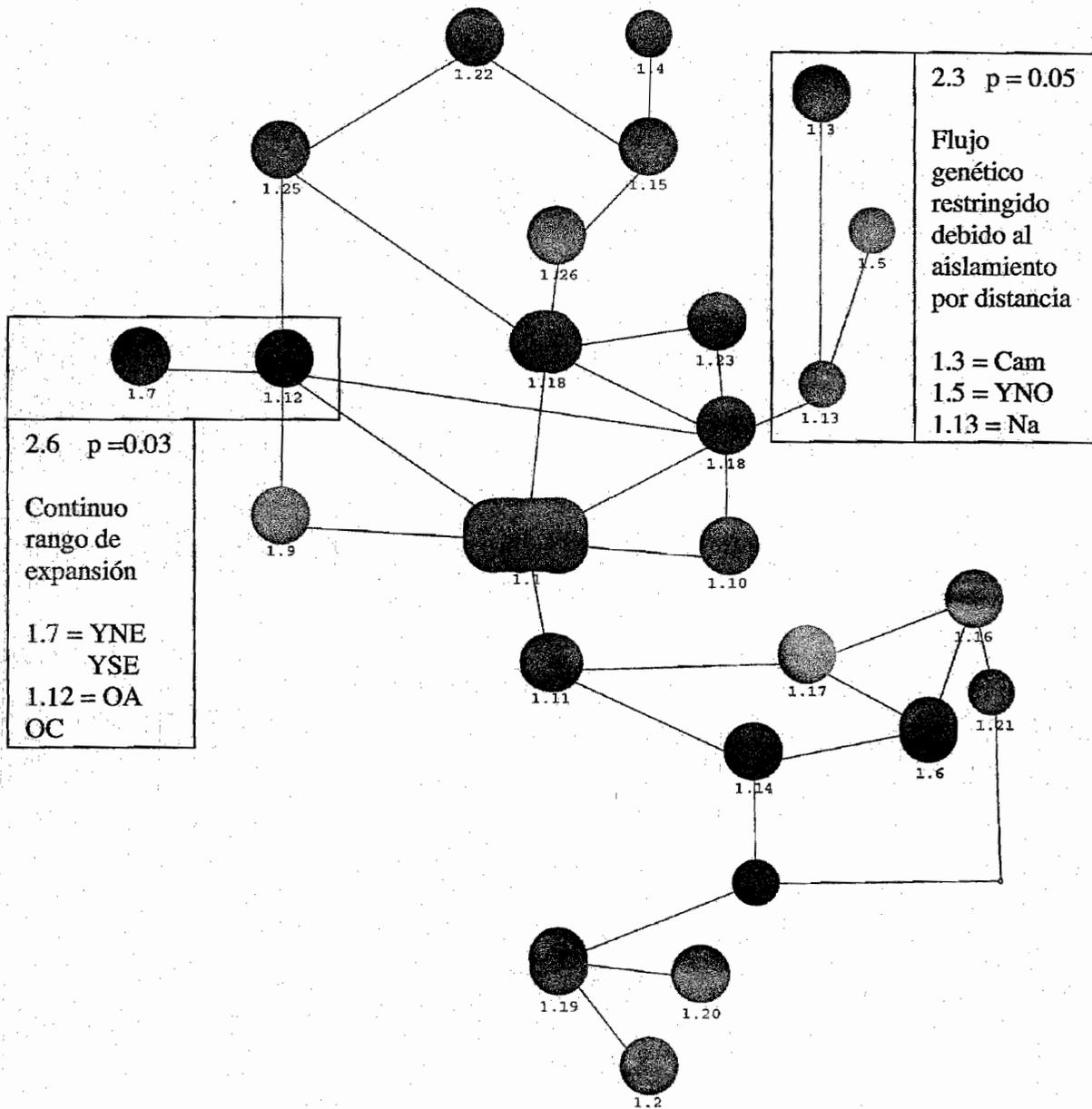


Figura 6. Red mínima de haplotipos y clados anidados nivel 1. Los clados 1.7 y 1.12 son significativos al agruparse en el siguiente nivel ($p=0.03$), de la misma manera 1.3, 1.5 y 1.13 ($p=0.05$).

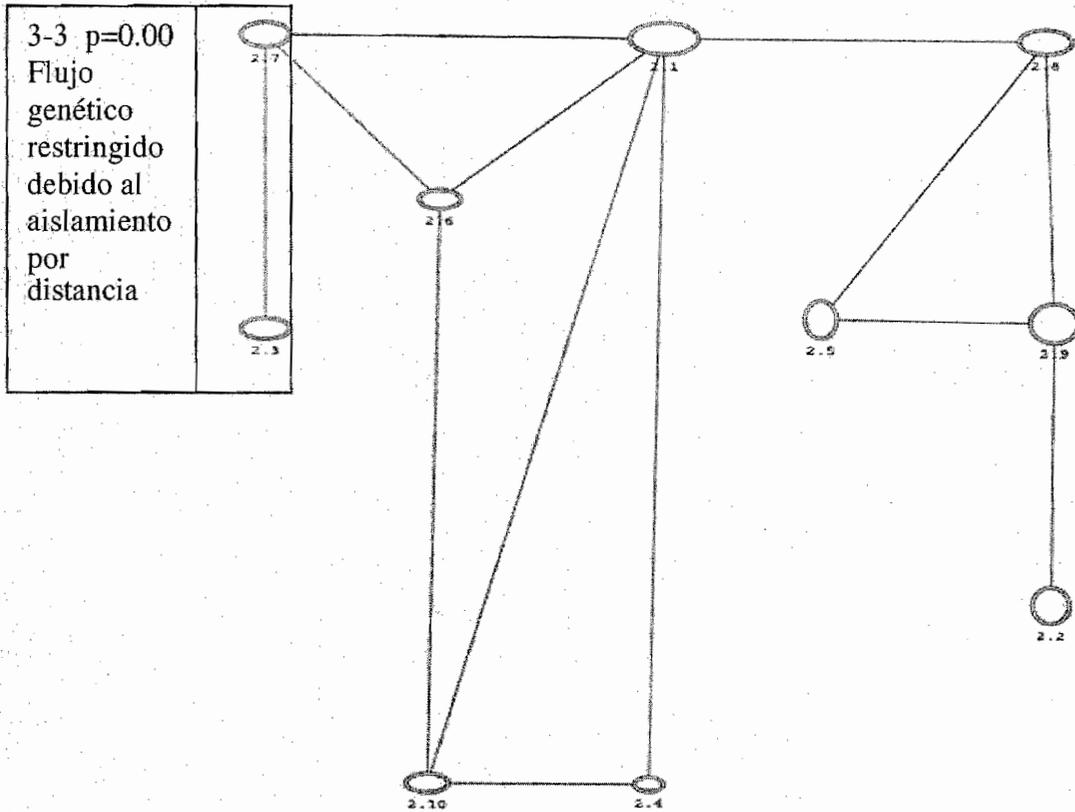


Figura 7. Red mínima de haplotipos y clados anidados nivel 2. Los clados 2.3 y 2.7, agrupados en el nivel tres son significativos ($p=0.00$).

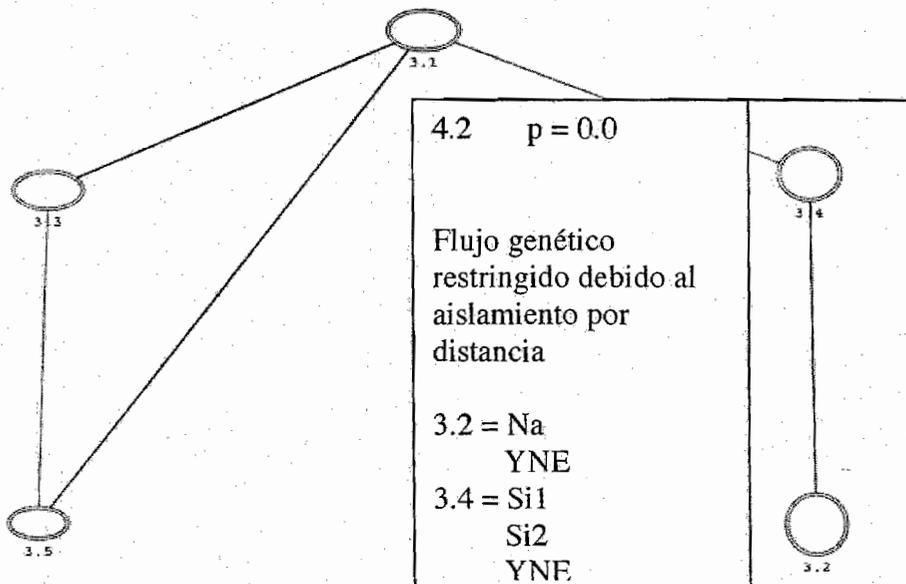


Figura 8. Red mínima de haplotipos y clados anidados nivel 3. Los clados 3.2 y 3.4, se agrupan en el nivel 4 con resultado significativo ($p=0.0$)

El clado 1.7 contiene individuos de las siguientes poblaciones: OC, OA, Si1, YNE y YSE, mientras que el clado 1.12 contiene individuos de YNE y YSE. Ambos clados se agrupan en el siguiente nivel (2.6), y la clave de inferencia nos lleva al siguiente resultado significativo ($p=0.03$): los individuos de estos clados presentan asociación geográfica porque están en *contiguo rango de expansión* (Figura 6).

El clado 1.13 se agrupa con los clados 1.3 y 1.5 en el siguiente nivel (2.3), la asociación geográfica de estos es significativa ($p=0.05$), y la clave indica que presenta *flujo genético restringido debido al aislamiento por distancia*. Los individuos del clado 1.13 habitan en Nayarit (N), los individuos del clado 1.3 habitan en Campeche (C) y los individuos del 1.15 en YNO, así que el resultado de la clave esta indicando que no hay flujo genético entre estas tres poblaciones.

Los clados 2.3 y 2.7 se agrupan en al clado anidado 3.3, con asociación geográfica significativa ($p=0.0$), asumiendo flujo genético restringido debido al aislamiento por distancia. Anteriormente se estableció que el clado 2.3 presenta flujo genético restringido, es el mismo resultado de estos individuos en dos niveles consecutivos, esto representa que cada una de las poblaciones N, C y YNO, esta aislada por la distancia de las poblaciones OA, OC, Si1, Si2, YNE, YSO, y M (Figura 7).

Las relaciones geográficas que podemos inferir en el árbol de haplotipos, pueden estar equivocadas según asegura Templeton (2004), pero sirve

para visualizar las distancias entre los haplotipos, aparentemente los ampliamente distribuidos entre las poblaciones están cercanos entre sí, mientras que los haplotipos únicos de las poblaciones Campeche, Nayarit y Península de Yucatán Noroeste, forman grupos monofiléticos con distancias prolongadas, entre el centro y los mismo haplotipos, e incluso dentro de los grupos de haplotipos las distancias son más grandes, que entre los ancestrales.

5 Discusión

5.1 Variación genética

La variación genética encontrada de las poblaciones naturales de *Gossypium hirsutum*, es alta, ya que encontramos un valor de heterocigosis esperada de 0.98 ± 0.004 , y aunque Mei y colaboradores en 2004, no mencionan cual fue el valor de la heterocigosis por el cual concluyen que las plantas cultivadas de *Gossypium hirsutum* son poco diversas genéticamente, podemos concluir que las poblaciones silvestres son altamente diversas en comparación con sus parientes cultivados, lo que resalta la importancia de la conservación de las mismas.

5.2 Estructura genética de las poblaciones

Encontramos en las poblaciones naturales de *Gossypium hirsutum*, una F_{ST} de 0.28, que representa la divergencia entre las poblaciones analizadas. Esto sugiere flujo genético restringido, lo que ocasiona que alelos alternativos se fijen fácilmente dentro de las poblaciones. Es probable, que en el caso particular de *Gossypium hirsutum*, una F_{ST} elevada, también represente a un sistema principalmente autógamo de polinización, debido a que estos sistemas reproductivos tienden a la fijación de alelos alternativos como lo planteamos en la hipótesis.

Las comparaciones pareadas de las poblaciones de *Gossypium hirsutum*, nos muestran poblaciones altamente divergentes y poblaciones estrechamente relacionadas entre sí, la Tabla 3, muestra los valores

encontrados en estas comparaciones, las poblaciones de Oaxaca están poco diferenciadas entre sí, lo mismo que las poblaciones de Sinaloa, y las poblaciones Nayarit, Campeche y Península de Yucatán Suroeste, presentan los valores de divergencia más altos, y estos se mantienen en las comparaciones con todas las poblaciones.

Encontrar cuales son las asociaciones entre las poblaciones de *Gossypium hirsutum* es uno de los objetivos de esta investigación. Realizamos un fenograma de poblaciones (Figura 4) en el cual podemos distinguir varias de las relaciones. Las poblaciones se dividen en dos grandes grupos, las poblaciones de Sinaloa y Nayarit, se relacionan en la Figura 4 como lo esperaríamos por su asociación geográfica. El segundo grupo esta formado por el resto de las poblaciones, donde encontramos a las tres poblaciones de Oaxaca en el mismo clado. La población de Campeche es hermana de la población Península de Yucatán Sureste, sin embargo la distancia que las separa es alta, mientras que las poblaciones Península de Yucatán Noroeste y Suroeste, forman el grupo hermano de Península de Yucatán Noreste. Sin embargo también, observamos que las poblaciones de la costa del Pacífico (Sinaloa, Nayarit y Oaxaca), no están tan relacionadas entre sí, así como que las poblaciones de la Península de Yucatán forman varios grupos diferentes. Es necesario para esclarecer las asociaciones entre las poblaciones determinar si estas, se encuentran estructuradas genéticamente, y posteriormente analizar las asociaciones

estadísticamente significativa entre la estructura genética y la asociación geográfica.

Para sustentar estadísticamente los resultados, utilizamos la asociación de los individuos sin identidad geográfica en grupos definidos por la probabilidad de asociación, y fue entonces, cuando encontramos a las poblaciones estructuradas de *Gossypium hirsutum*, estas fueron Nayarit (57%-82%), Campeche (24%-25%) y Península de Yucatán Noreste con Península de Yucatán Noroeste (25%-32%), y demostrando que la probabilidad de que los individuos del resto de las poblaciones se agrupara con los individuos de su población o con los de cualquier otra era la misma. El resultado, sin embargo, es muy favorable, debido a que encontramos poblaciones altamente diferenciadas y por lo tanto estadísticamente estructuradas, sugiriendo que es posible reconocer los procesos históricos de estas poblaciones.

5.3 Patrones históricos

Encontramos patrones históricos en las poblaciones de *Gossypium hirsutum* estadísticamente significativos. Estos resultados se localizaron en varios niveles, los cuales indican el número de pasos mutacionales que agrupan a los haplotipos, y por lo tanto cuanto mayor es el nivel agrupa a un número mayor de haplotipos y de individuos, los sucesos detectados en los niveles altos son más antiguos que en los niveles bajos, esto nos permite reconstruir la historia de la especie.

5.4 Precauciones necesarias para el manejo de plantas transgénicas

Las observaciones en el caso particular de Oaxaca son las siguientes, una de las poblaciones, Oaxaca C, presenta particularidades; la heterocigosis esperada es la más pequeña de todas las poblaciones, la Nm es menor a 1. En el árbol, las poblaciones de Oaxaca forman un grupo monofilético, sin embargo, parece estar aislada, y la distancia que la separa de las otras dos es 155 y 191 Km, mientras que la distancia entre Oaxaca A y Oaxaca B es de 71 Km, existe otro dato importante, Oaxaca A, está en el Istmo de Tehuantepec, mientras que las otras se ubican sobre la costa, sin embargo, al carecer de elementos para esclarecer las causas que restringen el flujo genético, suponemos que los procesos en el Istmo de Tehuantepec cambian respecto a la costa, y esta pudiese ser la causa de la diferenciación que encontramos, pero vamos a suponer que el flujo genético se reduce por la duplicación de la distancia (155 Km) entre las poblaciones.

La población de Campeche fue encontrada en Atasta cerca de Laguna de Términos, sobre el Golfo de México, la población más cercana en el árbol es YSE, que esta a su vez asociada a las poblaciones de la Península de Yucatán. El aislamiento de esta población es posiblemente debido a la distancia, aunque también es posible que existan otros factores ambientales y geográficos. La población más cercana es la de la Península de Yucatán Sureste (212 Km), y no encontramos asociaciones entre ellas, la distancia u alguna otra condición mantiene el flujo genético restringido.

La población Península de Yucatán Noroeste, presenta resultados significativos, de aislamiento por distancia. Sin embargo, también presenta valores de Nm mayores a 1 con las poblaciones cercanas, Península de Yucatán Noreste y Suroeste, las distancias que las separan son 189 Km y 136 Km respectivamente, así que no podemos sugerir que el flujo genético está completamente restringido, además, tenemos el antecedente de Oaxaca que a mayor distancia mantiene el flujo genético. Las otras poblaciones de la Península de Yucatán, también presentan flujo genético entre las mismas, incluso a 247 Km entre Península de Yucatán Suroeste y Noreste.

Las consecuencias de los procesos históricos deben poderse distinguir utilizando marcadores moleculares donde pueda estimarse la tasa de mutación y el reloj molecular, y así distinguiremos el flujo genético que pueda presentarse en las poblaciones actuales y el flujo genético que hubo entre las mismas en el pasado.

Es necesario continuar la investigación utilizando otros marcadores en el núcleo para poder registrar la dispersión del polen. El flujo genético registrado es producido de la dispersión del cloroplasto, que en el caso de *Gossypium hirsutum* se encuentra en las semillas, por lo tanto, la primera medida que recomendamos es la ya utilizada en Estados Unidos, donde en los cultivos transgénicos se deben usar trampas de semillas para evitar que las semillas se dispersen (U.S. E.P.A., 1999).

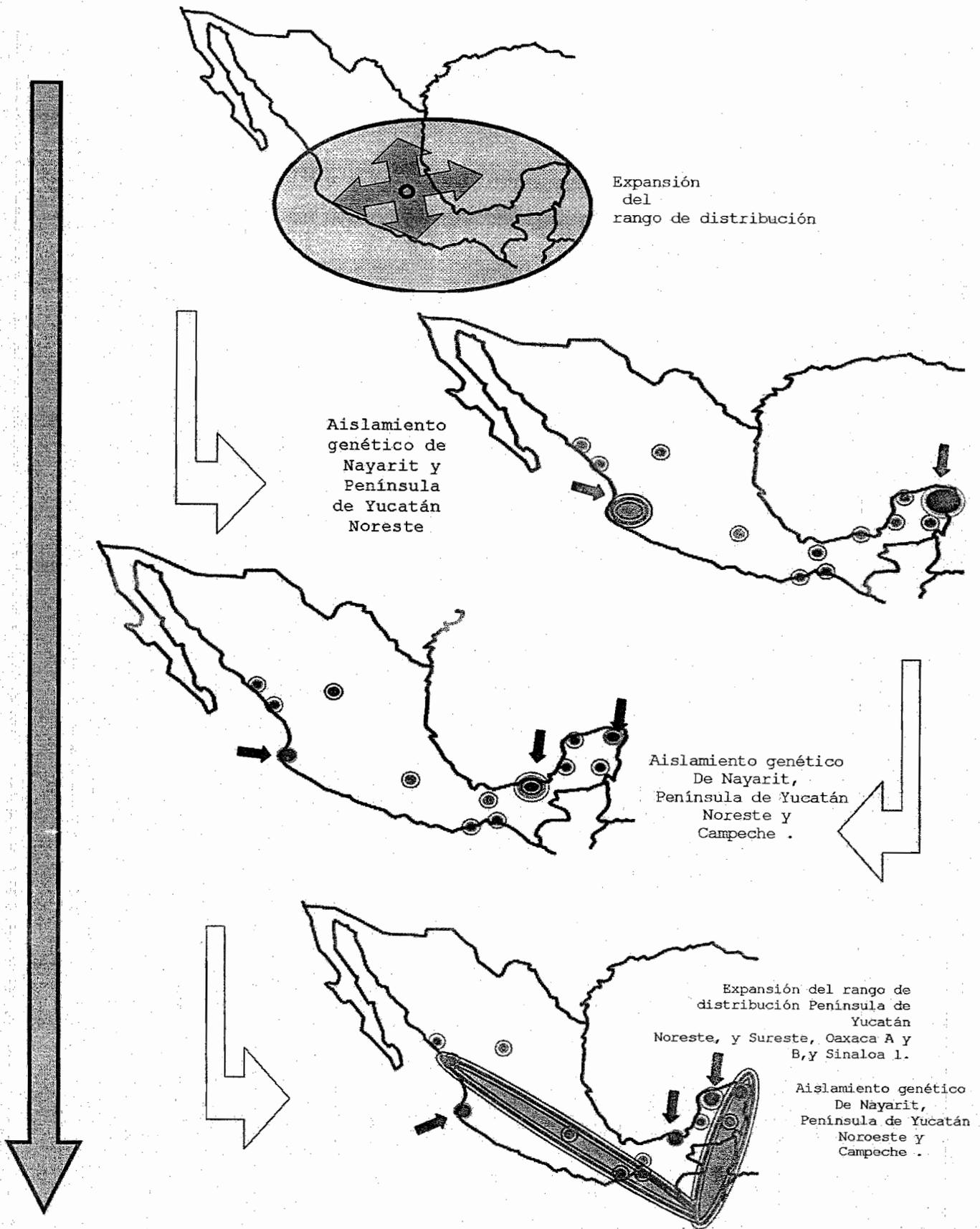


Figura 9. Esquema de los patrones históricos de *Gossypium*

hirsutum

La segunda medida evitar que los cultivos estén cerca de grandes cuerpos de agua, sabemos la capacidad de la especie de moverse a través de estos, incluso entre océanos que queda demostrado por el origen bicontinental de las especies que al hibridizar formaron las *G. hirsutum* y sus parientes cercanos.

Así, la sugerencia que haríamos acerca de la distancia a la que se deben sembrar cultivos transgénicos de los no modificados genéticamente y de las poblaciones naturales, debe de ser mayor a los 265 Km, alejado de cuerpos de agua y utilizando trampas para semillas.

6 Conclusiones

Las poblaciones silvestres de *Gossypium hirsutum* muestran en esta investigación alta variación genética, y podemos concluir que dichas poblaciones son altamente diversas en comparación con sus parientes cultivados, lo que resalta la importancia de la conservación de las mismas (Mei *et al.* 2004).

Las poblaciones silvestres de la República Mexicana mostraron la siguiente estructura:

Campeche, Nayarit, Península de Yucatán Noroeste, y Península de Yucatán Noroeste presentaron diferenciación respecto a las poblaciones Oaxaca A, Oaxaca B, Oaxaca C, Sinaloa 1, Sinaloa 2, Morelos, Durango, Península de Yucatán Sureste y Suroeste. Podemos asegurar que la diferenciación de las poblaciones es el resultado de varios sucesos históricos diferidos en el tiempo.

Determinamos que existe flujo genético restringido debido al aislamiento por distancia entre las poblaciones de Nayarit, Campeche, Península de Yucatán Noroeste Y Noreste.

Realizar una recomendación precisa sobre la distancia entre los cultivos transgénicos y las poblaciones silvestres con los resultados obtenidos, sería un error debido a que las tres poblaciones que presentan aislamiento por distancia se encuentran separadas de la población más cercana entre 136 y 264 Km, mientras que por abajo y por arriba de estas distancias, otras poblaciones aparentan mantener flujo genético. Sin

embargo, las medidas precautorias que deben comenzar a utilizarse son las siguientes:

La distancia mínima que debe separar a los cultivos genéticamente modificados es 265 Km.

Estrictamente necesaria la colocación de trampas para semillas, en todos los casos, aunque la distancia sea mayor a la sugerida.

No pueden ser autorizados estos cultivos cerca de grandes cuerpos de agua.

Nuestra hipótesis:

Las plantas de *Gossypium hirsutum*, son principalmente autógamas, y según las estimaciones, sus polinizadores tienen baja dispersión (5 Km), por lo tanto, esperamos que las poblaciones se encuentren estructuradas debido a la ausencia del flujo génico entre las mismas, es desechada en esta investigación debido a que la distancia a la que se mantiene flujo genético en Sinaloa es (51 Km) y Oaxaca (71 y 130 Km), son mayores a la dispersión de los polinizadores (5 Km), y debido a la herencia materna del cloroplasto, las semillas presentan el flujo genético que en esta investigación hemos confirmado. Encontramos estructura genética en tres poblaciones de trece localizadas.

Por último, es muy importante profundizar en el caso del Golfo de México, si las poblaciones de Tamaulipas, Veracruz, y Tabasco están extintas, esta especie pudiese estar en peligro y resultar en una grave pérdida biológica y económica.

7 Bibliografía

- Arumuganathan K., y Earle E. (1991). Nuclear DNA content of some important species. *Plant Molecular Biology Report* 9:208-220.
- Barrowclough G. y N. K. Johnson. (1988). Genetic structure of North American birds: Proceedings of the International Ornithological Congress 19:1630-1638, 1669-1673
- Berberich S.A., J.E. Ream, T.L. Jackson, R. Wood, R. Stipanovic, P. Harvey, S. Patzer y R.L. Fuchs. (1996). Safety Assessment of Insect-Protected Cotton: The Composition of the Cottonseed is Equivalent to Conventional Cottonseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41:365-371.
- Brubaker, C. L. y 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.
- Carbone I. y L. M. Kohn (2001) A microbial population-species interface: nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. *Molecular Ecology* 10:947-964
- Chaudhry B, A. Yasmeen , T. Husnain, y S. Riazuddin. (1999). Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. *Plant Molecular Biology* 17:1-7.
- Clement M., D. Posada y A. Crandal. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. 9, 10:1657.
- Clements, K. M., C. E. Sorenson, B. M. Wiegmann, y R. M. Roe. (2000). Insecticide resistance in the *Myzus persicae* complex (Homoptera: Aphididae) with emphasis on tobacco pest management. *Rev. in Tox.* 3:1-23

- Croizat, L. (1981). Biogeography: Past, Present and Future. Chapter 12, pp. 501-523. En: Vicariance Biogeography: A Critique: Symposium of the Systematics Discussion Group of the American Museum of Natural History, May 2-4, 1979. Editores: Gareth Nelson and Donn E. Rosen. Columbia University Press, New York, NY.
- Cronn, R.C., R.L. Small, T. Haselkorn, y J.F. Wendel. (2003). Cryptic repeated genomic recombination during speciation in *Gossypium gossypoides*. *Evolution* 57:2475-2489.
- Ehrlich, P. R. y P. H. Raven. (1969). Differentiation of populations. *Science* 165:1228-1232
- Ellstrand, N. C., y D. L. Marshall. (1985). Interpopulation gene flow by pollen in Wild Radish, *Raphanus sativus*. *The American Naturalist* 126:606-615.
- Endrizzi, J. E., Turcotte, E. L., y Kohel, R. J. (1984). Qualitative Genetics, Cytology, and Cytogenetics. pp. 82-129. En Kohel, R. J. y Lewis, C. F., Editors. Cotton. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.
- Evans N. y B. Ilbery. (1992). Geographical aspects of farm-based accommodation. *Journal of the Royal Agricultural Society of England* 159:67-80
- Fryxell P.A. (1979). The natural history of the cotton tribe. Texas A and M University Press, College Station, Texas.
- Fryxell, P. A. (1984). Taxonomy and Germplasm Resources. pp. 27-57. En Kohel, R. J. y Lewis, C. F., Editors. Cotton. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.
- Gillespie, J. (1998). Population Genetics A concise guide. The Johns Hopkins University Press. USA.

- Goldstein, D.B., A.R., Linares, L.L Cavalli-Sforza y M.W. Fledman. (1995)
An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci.
Genetics. 139: 463-471.
- Griffiths A.J.F., J.H. Miller, D.T. Susuki, R.C. Lewontin y W.M. Gelbart.
(1996). An Introduction to Genetic Analysis. W.H. Freeman and
Company. USA.
- Gupta M., Y-S Chy, J. Romero-Severson y J. L. Own. (1996). Amplification
of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single
primers of simple-sequence repeats. Theoretical Applied Genetics
89: 998-1006.
- Gutierrez O. A., S. Basu, S. Saha, J. N. Jenkins, D. B. Shoemaker, C.
Cheatham, y Jr. J.C. McCarty. (2002). Genetic distance of cotton
cultivars and germplasm lines based on SSR markers and its
association with agronomic and fiber traits of their F2 hybrids. Crop
Science 42:1841-1847.
- Haldane J. B. S. (1930). A mathematical theory of natural and artificial
selection. Proc. Cambridge Phil. Soc. 23, 19-41, 158-163, 363-372,
607-615, 838-844
- Handel, S. N. (1982). Dynamics of Gene Flow in an Experimental
Population of Cucumis melo (Cucurbitaceae). American Journal of
Botany 69:1538-1546
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. (1989). Principles of Population Genetics. Sinauer.
USA.
- Hedrick, P.W. (1983). Genetics of Populations. Science Books Int. USA.
- Jarne, P. y P.J.L. Lagoda. (1996). Microsatellites, from molecules to
populations and back. Tree 11: 424-429
- Kimura, M. y J.F. Crow. (1964). The number of alleles that can be
maintained in a finite population. Genetics 49: 725-738

- Kumar S., Tamura K., y M. Nei (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:2 (In press).
- LaDuke, J.C. y J.F. Doebley, (1995). A chloroplast DNA based phylogeny of the Malvaceae. Systematic Botany 20: 259-271.
- Latta R. (2004) Gene flow, adaptive population divergence and comparative population structure across loci. New Phytologist 161 1: 51-60
- Litt, M. Y J. A. Luty. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. American Journal Human Genetics. 44:397-401
- Liu L., Guo W., Zhu X., y T. Zhang (2003) Inheritance and fine mapping of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in *Gossypium hirsutum*. Theoretical Applied Genetics 106:461-469.
- Liu S, S. Saha, D. Stelly, B. Burr, R.G. Cantrell. (2000). Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. Journal of Heredity, 91:326-332
- Liu, B. y J. F. Wendel. (2002). Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution. Current Genomics Vol. 3, No. 6.
- Liu, B. y J.F.Wendel. (2001). Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. Molecular Ecology Notes 1:205-208.
- Malecot, G. (1965). Evolution continue des frequences d'un g`ene mendelien (dans le cas demigration homogene entre groupes d'effectif fini constant). Ann. Inst. Henri Poincare 137-150.
- McGregor, S. E. (1976). Insect Pollination of Cultivated Crop Plants. Agriculture Handbook No. 496. Agricultural Research Service, U. S. Department of Agriculture, Washington, D. C.

- Mei M, N. Syed, W. Gao, M. Thaxton, C. Smith, D. Stelly, y Z. Chen. (2004). Genetic mapping and QTL analysis of fiber-related traits in cotton (*Gossypium*). *Theoretical Applied Genetics* 108:280-291.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. USA.
- Nagylaki, T. (1976). The decay of genetic variability in geographically structured populations. II. *Theoretical Populations Biology* 10:70-82
- Nguyen T.B., M. Giband, P. Brottier, A.M. Risterucci, y J.M. Lacape. (2004). Wide coverage of the tetraploid cotton genome using newly developed microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 2: 14997301.
- Nordborg M (2001) Coalescent theory. In: *Handbook of Statistical Genetics* Editores: Balding D, Bishop M, Cannings C, pp. 179-212. Wiley, Chichester, UK.
- Ouborg NJ, Y. Piquot, y JM. van Groenendael (1999). Population genetics, molecular markers, and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87: 551-569
- Pillay M. y G.O. Myers (1999). Genetic diversity in cotton assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers. *Crop Science* 39:1881-1886
- Posada D, K.A. Crandall, y A.R. Templeton. (2000). GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*. 94:487-8.
- Provan J, W. Powell, y P.M. Hollingsworth. (2001). Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 16:142-147.

- Pritchard K., M. Stephens y P. Donnelly (2002) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 5: 945-959.
- Reddy O., E. Pepper, I. Abdurakhmonov, S. Saha, N. Jenkins, T. Brooks, Y. Bolek , y M. El-Zik. (2001). New Dinucleotide and Trinucleotide Microsatellite Marker Resources for Cotton Genome Research *The Journal of Cotton Science* 5:103-113
- REMI, CONABIO (<http://www.conabio.gob.mx>).
- Rodríguez J. (1982). *Ixcatl, el algodón mexicano*. Fondo de Cultura Económica. México.
- Rong, J., R.S. Small, R.C. Cronn, y J. F. Wendel. (2004). A 3347-Locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*). *Genetics* 166: 389-417.
- Schneider S, D. Roessli, y L. Excoffier (2000). *Arlequin Ver. 2.0: A Software for Population Genetics Data Analysis*. Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Seelanan T, A. Schnabel y J.F Wendel. (1997). Congruence and consensus in the cotton tribe (Malvaceae). *Systematic Botany* 22:259-290.
- Senchina, D.S., I. Alvarez, R.C. Cronn, B. Liu, J. Rong, R.D. Noyes, A.H. Paterson, R.A. Wing, T.A. Wilkins, y J.F. Wendel (2003). Rate variation among nuclear genes and the age of polyploidy in *Gossypium*. *Molecular Biology Evolution* 20:633-643.
- Shiver M.D., L. Jin, R. Chakraborty y E. Boerwinkle. (1993). VNTR allele frequency distribution under the stepwise mutation model: A computer simulation. *Approach. Genetics* 134: 983-993.
- Slatkin, M. (1987). Gene Flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 237: 787-792.

- Slatkin, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47:264-279.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics* 139: 457-462.
- Slatkin M., y R.R. Hudson. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129:555-562.
- Small, R.S., R.C. Cronn, y J. F. Wendel. (2004). Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Australian Systematic Botany* 17:145-170.
- Takahata, N. (1983). Gene identity and genetic differentiation of populations in the finite island model. *Genetics* 104:497-512.
- Takezaki, N. (1997). NJBAFD: Neighbor joining tree construction from allele frequency data. National Institute of Genetics, 1997. Japan
- Tatineni, V., R.G. Cantrell, y D.D. Davis. (1996). Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPD. *Crop Science* 36:186-192
- Templeton A.R. (1998) Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypothesis about gene flow and population hystory. *Molecular Ecology*, 7:381-397.
- Templeton A.R. (2004) Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13:789-809.
- U.S. EnviroNmental Protection Agency. (1989). Guidelines for Ecological Risk Assessment, EPA/630/R-95/002F.
- U.S. EnviroNmental Protection Agency. (1999). Guidelines for Ecological Risk Assessment, EPA/630/R-95/002F.
- Ulloa, M. Y R.G. Percy. (2002). Comparison of genetic diversity within improved germplasm of cottons with rflp, ssr, and rapd

markers..Crop Science abstracts, Annual Meeting ASA, CSSA, and SSSA. p. 189.

- Umbeck, P. F., K. A. Barton, E. V. Nordheim, J. C. McCarty, W. L. Parrott y J. N. Jenkins. (1991). Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. *Journal of Economic Entomology* 84:1943-1950
- Vázquez-Lobo A. (1996). Filogenía de hongos endófitos del género *Pinus* L.: Implementaciones de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.
- Vendramin G. G., L. Lelli, P. Rossi, y M. Morgante. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5: 595-598
- Weising K. y C. Gardner. (1999). A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19
- Wendel, J.F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42, 225-249.
- Wendel JF, C.L. Brubaker y A.E. Percival. (1992). Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland cotton. *American Journal of Botany*, 79:1291-1310.
- Wendel, J. F. y B. Liu. (2002). Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution. *Current Genomics* 3 6.2:489-505
- Wright S. (1931). Evolution in mammalian populations. *Genetics* 16:97-159.
- Wright S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28:114-138.
- Wright S. (1949). Adaptation and selection. En: *Genetics, Paleontology and Evolution*. Editores Jepson, G.L., G.G. Simpson y E. Mayr. Princenton University Press. USA.

Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.*
15:323-354

Wright S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics
with special regard to systems of mating. *Evol.* 19: 395-420.

Wright S. (1969). *Evolution and the genetics of populations. Vol. 2 The
theory of gene frequencies.* Univ. of Chicago Press, Chicago.

Zhang DX, J.A. Smith, C. Rico y G.M. Hewitt. (2001). Isolation and
characterization of 10 microsatellite loci in poor cod *Trisopterus
minutus* (L). *Molecular Ecology notes*, 1:50-52.

Apéndice 1

Tabla 1.A. Coordenadas geográficas de las localidades de *Gossypium hirsutum*, y nombre de la población a la que pertenecen las colectas.

| Nombre de la población | Clave de colecta | Latitud | Longitud | | |
|------------------------|------------------|---------|----------|-----|----|
| Oaxaca A | Oa 1 | 16 | 52 | 95 | 2 |
| Oaxaca C | Oc 2 | 15 | 46 | 96 | 27 |
| Oaxaca B | Ob 3 | 16 | 12 | 95 | 4 |
| Nayarit | N 4 | 17 | 56 | 92 | 97 |
| Sinaloa 1 | s1 5 | 23 | 7 | 106 | 3 |
| Sinaloa 2 | s2 6 | 22 | 47 | 105 | 41 |
| Campeche | C 7 | 18 | 37 | 91 | 56 |
| Morelos | M 8 | 18 | 55 | 99 | 13 |
| Y NE | Y1 9 | 21 | 18 | 89 | 31 |
| Y NE | Y2 10 | 21 | 19 | 89 | 27 |
| Y NE | Y3 11 | 21 | 21 | 89 | 11 |
| Y NE | Y4 12 | 21 | 10 | 90 | 0 |
| Y NE | Y6 13 | 20 | 52 | 90 | 23 |
| Y SO | Y7 14 | 19 | 55 | 90 | 23 |
| Y NE | Y9 15 | 20 | 23 | 89 | 32 |
| Y NO | Y11 16 | 21 | 18 | 88 | 9 |
| Y NO | Y12 17 | 21 | 25 | 88 | 8 |
| Y NO | Y13 18 | 21 | 34 | 88 | 9 |
| Y NO | Y14 19 | 20 | 48 | 88 | 11 |
| Y SO | Y16 20 | 19 | 3 | 88 | 10 |
| Y SE | Y17 21 | 18 | 59 | 88 | 13 |
| Durango | DU 22 | 23 | 11 | 104 | 31 |
| Oaxaca B | Ob 3.2 | 16 | 1 | 95 | 35 |
| Oaxaca A | Oa 1.2 | 16 | 52 | 95 | 4 |
| Oaxaca B | Ob 3.3 | 16 | 14 | 95 | 4 |
| Oaxaca C | Oc 2.1 | 15 | 45 | 96 | 28 |
| Oaxaca C | Oc 2.2 | 15 | 43 | 96 | 28 |
| Oaxaca C | Oc 2.3 | 15 | 43 | 96 | 30 |

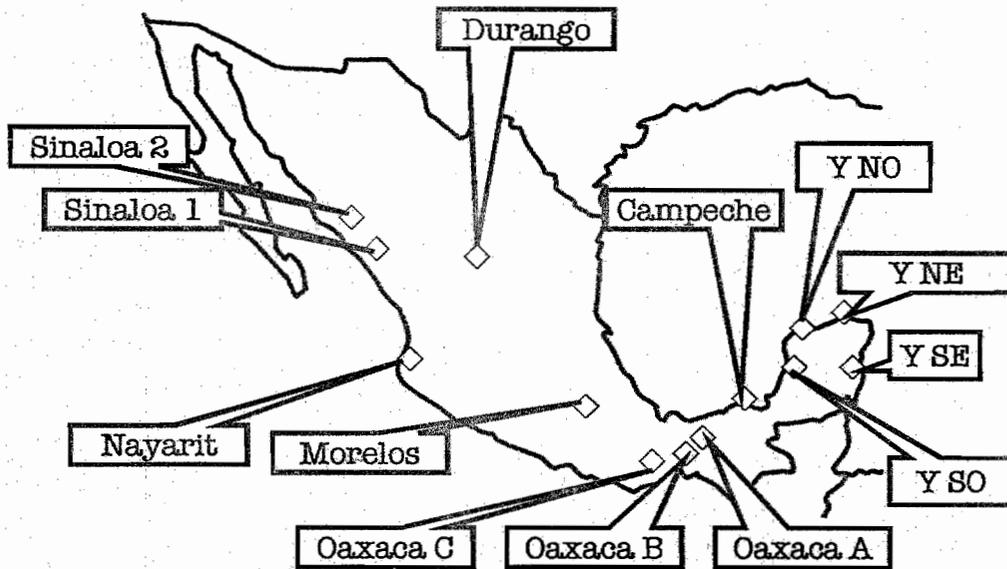


Figura 1 A. Poblaciones colectadas de *Gossypium hirsutum* en México

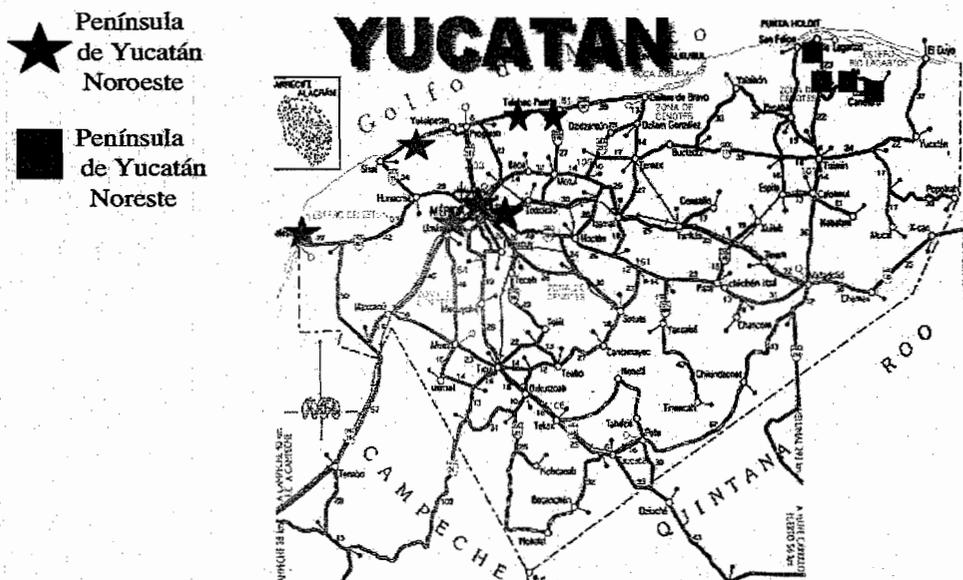


Figura 2 A. Localidades colectadas de las poblaciones Península de Yucatán

Noreste y Noroeste

- ★ Oaxaca A
- Oaxaca B
- ⊕ Oaxaca C

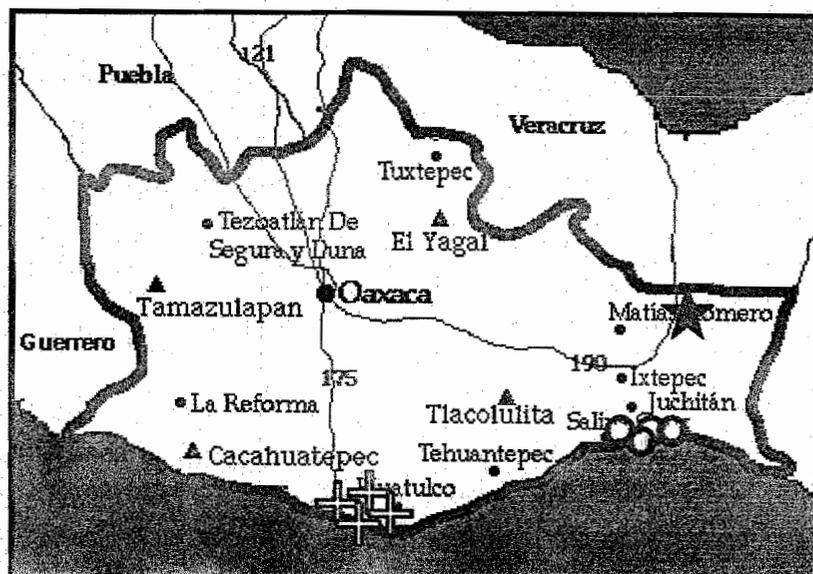


Figura 3 A. Localidades colectadas de las poblaciones de Oaxaca .

Tabla 2 A. Distancia geográfica (Km) entre las localidades colectadas de

Gossypium hirsutum

PARTE 1

| | Oa 1 | Oc 2 | Ob 3 | N 4 | S1 5 | s2 6 | C 7 | M 8 | Y1 9 | Y2 10 |
|--------|--------|------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|
| OA 1 | 0 | 191 | 71.1 | 188 | 1323 | 1274 | 376.8 | 493 | 743 | 750 |
| OC2 | 191.28 | 0 | 155 | 379 | 1267 | 1216 | 566.9 | 445 | 935 | 941 |
| OB 3 | 71.106 | 155 | 0 | 240 | 1358 | 1309 | 419.6 | 525 | 793 | 799 |
| N 4 | 188.04 | 379 | 240 | 0 | 1402 | 1355 | 191.7 | 599 | 555 | 562 |
| s1 5 | 1322.6 | 1267 | 1358 | 1402 | 0 | 50.7 | 1538 | 832 | 1711 | 1718 |
| s2 6 | 1273.6 | 1216 | 1309 | 1355 | 50.7 | 0 | 1493 | 782 | 1672 | 1679 |
| C 7 | 376.76 | 567 | 420 | 192 | 1538 | 1493 | 0 | 767 | 377 | 383 |
| M 8 | 492.63 | 445 | 525 | 599 | 832 | 782 | 766.9 | 0 | 1042 | 1049 |
| Y1 9 | 743.21 | 935 | 793 | 555 | 1711 | 1672 | 377.2 | 1042 | 0 | 7.11 |
| Y2 10 | 749.73 | 941 | 799 | 562 | 1718 | 1679 | 383.1 | 1049 | 7.11 | 0 |
| Y3 11 | 773.87 | 965 | 823 | 586 | 1744 | 1706 | 404.9 | 1077 | 34.9 | 27.8 |
| Y4 12 | 695.47 | 887 | 747 | 508 | 1664 | 1625 | 334.4 | 990 | 51.9 | 59 |
| Y6 13 | 644.96 | 836 | 697 | 458 | 1631 | 1591 | 285.8 | 945 | 100 | 107 |
| Y7 14 | 586.38 | 777 | 632 | 399 | 1653 | 1611 | 212.2 | 932 | 170 | 175 |
| Y9 15 | 687.42 | 878 | 732 | 500 | 1728 | 1687 | 312.2 | 1025 | 95.2 | 97.3 |
| Y11 16 | 859.79 | 1051 | 904 | 672 | 1851 | 1812 | 484.5 | 1181 | 141 | 135 |
| Y12 17 | 867.64 | 1059 | 913 | 680 | 1851 | 1812 | 492.8 | 1185 | 144 | 137 |
| Y13 18 | 874.57 | 1066 | 920 | 686 | 1847 | 1809 | 500.7 | 1186 | 144 | 137 |
| Y14 19 | 830.74 | 1021 | 872 | 644 | 1857 | 1817 | 453.9 | 1170 | 148 | 142 |
| Y16 20 | 761.66 | 945 | 791 | 586 | 1902 | 1859 | 398.8 | 1161 | 274 | 272 |
| Y17 21 | 754.65 | 937 | 783 | 580 | 1898 | 1856 | 392.9 | 1156 | 277 | 275 |
| DU 22 | 1189.6 | 1148 | 1229 | 1259 | 157 | 126 | 1390 | 706 | 1555 | 1561 |
| Ob 3.2 | 107.9 | 96.4 | 58.5 | 292 | 1324 | 1274 | 475.4 | 493 | 847 | 853 |
| Oa 1.2 | 3.5447 | 188 | 71 | 191 | 1320 | 1271 | 379.8 | 489 | 746 | 752 |
| Ob 3.3 | 67.554 | 156 | 3.56 | 237 | 1356 | 1307 | 417.4 | 524 | 791 | 797 |
| Oc 2.1 | 193.78 | 2.52 | 157 | 382 | 1267 | 1216 | 569.4 | 445 | 937 | 944 |
| Oc 2.2 | 196 | 5.64 | 158 | 384 | 1269 | 1218 | 571.4 | 448 | 939 | 946 |
| Oc 2.3 | 198.79 | 7.56 | 162 | 387 | 1266 | 1216 | 574.3 | 445 | 942 | 949 |

PARTE 2

| OA 1 | Y3 11 | Y4 12 | Y6 13 | Y7 14 | Y9 15 | Y11 16 | Y12 17 | Y13 18 | Y14 19 | Y16 20 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| OC 2 | 774 | 695 | 645 | 586 | 687 | 859.8 | 867.64 | 874.57 | 830.74 | 761.66 |
| OB 3 | 965 | 887 | 836 | 777 | 878 | 1051 | 1058.9 | 1066 | 1021.2 | 944.76 |
| N 4 | 823 | 747 | 697 | 632 | 732 | 904.2 | 912.67 | 920.44 | 872.41 | 790.62 |
| s1 5 | 586 | 508 | 458 | 399 | 500 | 672 | 679.71 | 686.48 | 644.01 | 586.27 |
| s2 6 | 1744 | 1664 | 1631 | 1653 | 1728 | 1851 | 1850.7 | 1846.6 | 1856.7 | 1901.5 |
| C 7 | 1706 | 1625 | 1591 | 1611 | 1687 | 1812 | 1812.3 | 1808.5 | 1817.2 | 1859 |
| M 8 | 405 | 334 | 286 | 212 | 312 | 484.5 | 492.82 | 500.66 | 453.94 | 398.76 |
| Y1 9 | 1077 | 990 | 945 | 932 | 1025 | 1181 | 1185.1 | 1186.4 | 1169.8 | 1161.2 |
| Y2 10 | 34.9 | 51.9 | 100 | 170 | 95.2 | 141.5 | 143.67 | 144.03 | 147.68 | 273.68 |
| Y3 11 | 27.8 | 59 | 107 | 175 | 97.3 | 134.6 | 136.64 | 136.92 | 141.86 | 271.67 |

| | | | | | | | | | | |
|--------|------|------|------|------|------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Y4 12 | 0 | 86.7 | 134 | 194 | 107 | 107.1 | 108.86 | 109.19 | 118.34 | 262.24 |
| Y6 13 | 86.7 | 0 | 50.5 | 136 | 94.7 | 192.1 | 194.99 | 195.87 | 192.28 | 292.2 |
| Y7 14 | 134 | 50.5 | 0 | 98.9 | 102 | 235.9 | 240.06 | 242.44 | 228.59 | 299.34 |
| Y9 15 | 194 | 136 | 98.9 | 0 | 101 | 273.2 | 281.15 | 288.55 | 246.98 | 249.33 |
| Y11 16 | 107 | 94.7 | 102 | 101 | 0 | 172.3 | 180.63 | 188.88 | 146.96 | 199.73 |
| Y12 17 | 107 | 192 | 236 | 273 | 172 | 0 | 12.196 | 27.583 | 51.967 | 234.69 |
| Y13 18 | 109 | 195 | 240 | 281 | 181 | 12.2 | 0 | 15.605 | 64.136 | 246.78 |
| Y14 19 | 109 | 196 | 242 | 289 | 189 | 27.58 | 15.605 | 0 | 79.511 | 262.27 |
| Y16 20 | 118 | 192 | 229 | 247 | 147 | 51.97 | 64.136 | 79.511 | 0 | 182.83 |
| Y17 21 | 262 | 292 | 299 | 249 | 200 | 234.7 | 246.78 | 262.27 | 182.83 | 0 |
| DU 22 | 267 | 294 | 300 | 247 | 201 | 241.8 | 253.91 | 269.36 | 189.86 | 8.7546 |
| Ob 3.2 | 1588 | 1508 | 1475 | 1499 | 1573 | 1694 | 1694.1 | 1689.9 | 1700.7 | 1748.1 |
| Oa 1.2 | 877 | 800 | 750 | 687 | 788 | 960.1 | 968.37 | 975.88 | 929.02 | 849.04 |
| Ob 3.3 | 777 | 698 | 648 | 589 | 690 | 862.7 | 870.57 | 877.46 | 833.78 | 765.02 |
| Oc 2.1 | 820 | 744 | 694 | 629 | 730 | 902.1 | 910.47 | 918.21 | 870.38 | 789.2 |
| Oc 2.2 | 968 | 889 | 839 | 780 | 881 | 1053 | 1061.4 | 1068.5 | 1023.6 | 947.1 |
| Oc 2.3 | 970 | 891 | 841 | 782 | 883 | 1056 | 1063.5 | 1070.6 | 1025.6 | 948.5 |

PARTE 3

| | | | | | | | | |
|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| OA 1 | Y17 21 | DU 22 | Ob 3.2 | Oa 1.2 | Ob 3.3 | Oc 2.1 | Oc 2.2 | Oc 2.3 |
| OC 2 | 754.65 | 1190 | 107.9 | 3.545 | 67.6 | 194 | 196 | 199 |
| OB 3 | 937.41 | 1148 | 96.4 | 188.5 | 156 | 2.52 | 5.64 | 7.56 |
| N 4 | 783.19 | 1229 | 58.527 | 71.02 | 3.56 | 157 | 158 | 162 |
| s1 5 | 579.84 | 1259 | 291.86 | 190.9 | 237 | 382 | 384 | 387 |
| s2 6 | 1898.4 | 156.8 | 1324.2 | 1320 | 1356 | 1267 | 1269 | 1266 |
| C 7 | 1855.8 | 126.2 | 1274.2 | 1271 | 1307 | 1216 | 1218 | 1216 |
| M 8 | 392.86 | 1390 | 475.4 | 379.8 | 417 | 569 | 571 | 574 |
| Y1 9 | 1156.1 | 705.6 | 492.75 | 489.5 | 524 | 445 | 448 | 445 |
| Y2 10 | 277.14 | 1555 | 846.95 | 745.9 | 791 | 937 | 939 | 942 |
| Y3 11 | 275.32 | 1561 | 853.36 | 752.5 | 797 | 944 | 946 | 949 |
| Y4 12 | 266.66 | 1588 | 876.95 | 776.7 | 820 | 968 | 970 | 973 |
| Y6 13 | 294.22 | 1508 | 800 | 698.1 | 744 | 889 | 891 | 894 |
| Y7 14 | 299.91 | 1475 | 749.57 | 647.6 | 694 | 839 | 841 | 844 |
| Y9 15 | 247.19 | 1499 | 687.06 | 589.3 | 629 | 780 | 782 | 785 |
| Y11 16 | 201.08 | 1573 | 787.62 | 690.4 | 730 | 881 | 883 | 886 |
| Y12 17 | 241.78 | 1694 | 960.12 | 862.7 | 902 | 1053 | 1056 | 1058 |
| Y13 18 | 253.91 | 1694 | 968.37 | 870.6 | 910 | 1061 | 1064 | 1066 |
| Y14 19 | 269.36 | 1690 | 975.88 | 877.5 | 918 | 1068 | 1071 | 1073 |
| Y16 20 | 189.86 | 1701 | 929.02 | 833.8 | 870 | 1024 | 1026 | 1029 |
| Y17 21 | 8.7546 | 1748 | 849.04 | 765 | 789 | 947 | 949 | 952 |
| DU 22 | 0 | 1745 | 841.63 | 758 | 782 | 940 | 941 | 944 |
| Ob 3.2 | 1745.2 | 0 | 1198.9 | 1187 | 1227 | 1148 | 1150 | 1148 |
| Oa 1.2 | 841.63 | 1199 | 0 | 106 | 59.8 | 98.6 | 99.7 | 103 |
| Ob 3.3 | 758.01 | 1187 | 106.01 | 0 | 67.5 | 191 | 193 | 196 |
| Oc 2.1 | 781.79 | 1227 | 59.807 | 67.46 | 0 | 158 | 159 | 163 |
| Oc 2.2 | 939.75 | 1148 | 98.617 | 191 | 158 | 0 | 3.57 | 5.04 |
| Oc 2.3 | 941.13 | 1150 | 99.713 | 193.2 | 159 | 3.57 | 0 | 3.57 |

Apéndice 2

Secuencias de los microsátélites.

CCMP 3

TGTTCCAATATCTTCTTGTCATTTCTGTTTIGCACTTCCTCTCTCTCTCTTTTTTT
TTTTAAGTAAAAAAAAAAGAGAGACAAGACACCCTGAAATAAATAATTGTTC
GATGGAACC

CCMP 5

TTCGTCGGCGTAGTAAATAGGAGAGATTATTCCTTTCTTCGTCTTTACAAAA
CAAAAAATATATTTTTAAAAGAAAAATGACACGTTCACTAAAAAAAAA

Gh 1

AATGCTGAATCGATGACCTATGTATAAAGGGAGAAGAATTCTTTGAATTTGA
AGAAAAAAAAAGAAACAACCTTTGCTGACAAATTACAATTATACATTATACAAT
TCTAAGTACAATTAGAAATCCAAATTATATGTAACTTTTTTATTATTATTTT
TTTATTATACTTTTTAGTTTTTTGATATATTTTCTATTTTGGTCAGAAGAGTCCT
CCGAATATTTTGG

CCMP 10

GATCCCGGACGTAATCCTGGACGCGAAGAATAAAAAAGGGAGAGTTCCTTG
CTTCATTTTTAGAAATGGTATTAGGATTTGATCTATTCCACTACGAAAAACC
GAAACGGAAAGAGAGGGATTGGAACCCTCGGTACGA

Apéndice 3

Tabla 3 A Haplotipos encontrados en las poblaciones de *Gossypium*

hirsutum, y el número de individuos en los que fueron identificados en cada una de las poblaciones.

| P I | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 7 | 11 | 12 | 13 | TOTAL HP |
|--------|---------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|----|-------------|
| | | OC | OA | OB | NA | SI1 | SI2 | CAM | MOR | NE | SE | YNO | YSO | DU | |
| Gh 1 | 100 174 110 125 138 | 13 | 4 | 3 | 0 | 7 | 1 | 0 | 1 | 4 | 0 | 2 | 0 | 1 | 36 |
| Gh 2 | 100 174 111 125 138 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 8 |
| Gh 3 | 100 174 110 125 139 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 3 | 0 | 0 | 8 |
| Gh 4 | 100 176 110 125 138 | 1 | 5 | 2 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 |
| Gh 5 | 100 176 111 125 138 | 1 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 6 |
| Gh 6 | 100 174 109 125 138 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 7 |
| Gh 7 | 100 176 110 125 139 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 8 | 100 176 110 125 137 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Gh 9 | 100 178 110 125 138 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Gh 10 | 100 170 110 129 137 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 11 | 99 170 110 129 139 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Gh 12 | 99 170 111 129 137 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 13 | 100 170 110 125 138 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 14 | 100 174 110 129 138 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 15 | 100 174 111 129 139 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Gh 16 | 100 170 111 129 137 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 17 | 100 176 109 125 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Gh 18 | 100 176 110 126 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 19 | 100 174 110 127 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| Gh 20 | 100 176 110 127 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Gh 21 | 100 172 110 125 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Gh 22 | 100 170 109 123 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Gh 23 | 100 170 110 123 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 24 | 100 168 110 123 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Gh 25 | 100 174 111 125 139 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 26 | 100 174 110 123 143 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 27 | 100 174 110 125 143 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Gh 28 | 100 174 111 125 143 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 29 | 100 168 110 125 137 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 30 | 99 174 110 125 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 31 | 99 174 110 125 139 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 |
| Gh 32 | 100 174 111 127 139 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 33 | 100 174 110 127 139 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| Gh 34 | 100 174 109 127 139 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 |
| Gh 35 | 100 176 110 127 139 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 36 | 100 176 111 127 139 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Gh 37 | 100 176 111 127 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Gh 38 | 100 178 111 125 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Gh 39 | 100 174 112 125 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 3 |
| Gh 40 | 99 174 112 125 138 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | | 17 | 17 | 9 | 9 | 23 | 7 | 7 | 2 | 14 | 2 | 28 | 5 | 1 | 141 |

Fin

