



Universidad Nacional
Autónoma de México

Facultad de Ciencias



Variación funcional relacionada
con la tolerancia al estrés salino
de *Gossypium hirsutum* en México

Tesis que para obtener el título
de Bióloga presenta:

Sandra Petrone Mendoza

Directora de tesis:

Ana Laura Wegier Briuolo

2013

Índice

Marco conceptual	4
Antecedentes	5
Estado actual de los suelos salinos y demandas de algodón	6
Mecanismos fisiológicos de tolerancia al estrés salino	10
Respuesta al estrés salino en <i>Gossypium hirsutum</i>	16
Base genética de tolerancia al estrés salino	18
Genes candidatos para tolerancia a estrés salino	21
Justificación	32
Justificación metodológica	33
Objetivo General	35
Objetivos particulares	35
Hipótesis	35
Método	36
Establecimiento del jardín común	36
Micropropagación de <i>G. hirsutum</i>	37
Análisis estadísticos de micropropagación	38
Evaluación <i>in vitro</i> de crecimiento de <i>G. hirsutum</i>	
en condiciones de estrés salino	39
Análisis estadísticos de tolerancia a estrés salino <i>in vitro</i>	39
Selección de genes candidatos	41
Extracción de DNA, amplificación y secuenciación de	
genes candidatos	42
Métodos estadísticos	44
Diversidad genética y pruebas de neutralidad	44
Resultados	48

Establecimiento de jardín común y micropropagación de <i>G. hirsutum</i> silvestre	48
Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>G. hirsutum</i> bajo estrés salino	52
Variación genética en genes candidatos: <i>GhDREB</i> , <i>GhZFP1</i> y <i>GhNAC4</i>	67
Discusión	77
Establecimiento del jardín común y micropropagación de <i>G. hirsutum</i>	77
Caracterización <i>in vitro</i> de <i>G. hirsutum</i> bajo estrés salino y diversidad genética en genes candidatos	80
Conclusiones	91
Perspectivas	93
Bibliografía citada	95
Anexos I, II y III	103

**Variación genética funcional relacionada con la tolerancia al estrés salino de
Gossypium hirsutum en México.**

Sandra Petrone Mendoza

Marco conceptual

El proceso de domesticación se refiere a los cambios evolutivos originados o promovidos por el manejo y selección artificial, lo cual da lugar a diferenciación fenotípica y genotípica entre las poblaciones silvestres y aquellas sujetas a manejo (Diamond, 2002). Las prácticas de selección han dejado una huella en los patrones de diversidad genética en los genomas de las plantas cultivadas. Debido a que los agricultores eligen un número limitado de individuos de la especie progenitora, mucha de la diversidad genética del progenitor se queda atrás. Además, con cada generación durante el proceso de domesticación, sólo semilla de las mejores plantas constituye la siguiente generación. Esto ocasiona cuellos de botella genéticos, lo cual se observa como una reducción de la diversidad genética a lo largo del genoma (Doebley *et al.*, 2006); dicha pérdida de variación difiere entre partes del genoma. La domesticación es un proceso evolutivo, y por lo tanto puede ser continuo en el tiempo, comenzar varias veces (múltiple) y variar en intensidad dependiendo del grado de intervención humana (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009). Como consecuencia, las plantas domesticadas pueden exhibir un amplio rango de diferenciación de sus progenitores silvestres así como grandes niveles de dependencia de los seres humanos.

Los centros de diversidad son áreas geográficas en las que los progenitores silvestres de un cultivo muestran una gran diversidad genética, ecológica, morfológica, etcétera. Al ubicar los centros de diversidad de una especie es posible tomar decisiones con respecto a la conservación de áreas prioritarias e identificar las medidas de manejo que permitan garantizar el potencial evolutivo de la misma (Gepts, 2011).

Elucidar la base genética molecular de los caracteres adaptativos es una de las principales metas de la genética evolutiva (Eckert & Dyer, 2012). La elevada concentración de sales en el hábitat de muchas especies de plantas impone un estrés severo a las mismas y entender la forma en que algunas especies toleran dicho estrés puede ayudar a comprender el proceso de evolución adaptativa.

Antecedentes

Actualmente el algodón (*Gossypium hirsutum* L.) es la fibra natural líder a nivel mundial (FAOSTAT, 2011), se cultiva comercialmente en regiones templadas y tropicales de más de 50 países, con una cobertura total de 34 millones de hectáreas (Badigannavar, 2010). Áreas específicas de producción incluyen a países como E.U.A., India, China, Pakistán, Brasil y Australia, en donde las condiciones climáticas proveen los requerimientos de crecimiento del algodón, incluyendo periodos de tiempo caliente y seco, y en donde hay humedad adecuada disponible, usualmente obtenida mediante irrigación (Khadi *et al.*, 2010).

Aunque el algodón es principalmente cultivado por su fibra, tiene muchos otros valiosos usos. El algodón es la segunda oleaginosa más abundantemente cultivada a nivel mundial, con un total de 39.9 millones de toneladas de aceite producidos en 2010 (FAOSTAT, 2011). La semilla contiene 30% de almidón, 25% de aceite semisecante, y de 16 a 30% de proteína. El aceite es hidrogenado para producir margarina o usado como aceite para cocinar, aceite de ensaladas o para empacar pescado, mientras que el aceite de menor calidad es usado en la manufactura de jabones vegetales y lubricantes (Ashraf, 2002).

El género *Gossypium* consiste de aproximadamente 49 especies diploides y de cinco tetraploides distribuidas a lo largo de regiones áridas y semi-áridas de África, Asia, Australia y Centro y Sur América. Las especies diploides de *Gossypium* se agrupan en ocho grupos citológicos o genomas, designados de la A a la G y K. El número

cromosómico es el mismo para todas las especies diploides de *Gossypium* ($n = 13$), pero el tamaño de su genoma haploide varía de 1 a 3.5 Gb (Wendel *et al.*, 2002).

Las cinco especies alotetraploides son americanas y derivan de un único evento de alopoliploidización que unió el genoma A (euroasiático) con el genoma D (americano), en un citoplasma de genoma A (Brubaker *et al.*, 1999). Los progenitores de genoma A y D deben haber divergido de su ancestro común hace 6–11 millones de años aproximadamente, y se reunieron en un núcleo alotetraploide común hace unos 1.1-1.9 millones de años (Wendel *et al.*, 1995). La formación de los poliploides involucra entonces la migración transoceánica y sobrevivencia de un ancestro del genoma A. La propensión para la migración a larga distancia, de hecho parece ser una característica de la tribu a la que pertenece el género *Gossypium*, y en la que en varias ocasiones se pueden detectar migraciones trans-oceánicas. Los ancestros de las especies alotetraploides fueron especies cercanamente relacionadas a *G. herbaceum* L. (A_1) o *G. arboreum* L (A_2) y un *G. raimondii* L. (D_5) o *G. gossypoides* (Ulbrich) Standley (D_6) (Wendel *et al.*, 2010).

La poliploidización fue seguida de una rápida diversificación morfológica y radiación temprana en tres linajes. *G. mustelinum* Miers ex Watt es el único descendiente de una rama de la radiación más temprana de los poliploides, y está restringido a una pequeña región del noreste de Brasil (Wendel *et al.*, 1994). Los otros dos linajes están representados por dos especies cada uno, una de las cuales es cultivada y la otra es endémica de una isla y se originó por dispersión a larga distancia: por un lado *G. hirsutum* L. con *G. tomentosum* Nuttall ex Seemann (de las Islas Hawái) y *G. barbadense* L. con *G. darwinii* Watt (de las Islas Galápagos). Todas las especies tetraploides tienen 26 cromosomas gaméticos, exhiben apareamiento disómico y tienen genomas de tamaño similar que han sido estimados en 2.2-2.9 Gb (Rong *et al.*, 2004).

Las especies de algodón más extensamente cultivadas son las especies alotetraploides *G. hirsutum* y *G. barbadense*, las cuales suman más del 99% del

abastecimiento mundial de algodón para uso industrial; el resto proviene de dos especies diploides (*G. arboreum* y *G. herbaceum*). Los algodones tetraploides se conocen como americano de tierras altas (*G. hirsutum*) y egipcio (*G. barbadense*; Ashraf, 2002).

Los algodones tetraploides domesticados aparecieron en América hace unos 5,500-4,300 años (Stephen, 1967; Fryxell, 1979) y han sido ampliamente distribuidos por los humanos a lo largo de las latitudes más cálidas del mundo. Los diploides de genoma-A domesticados pueden haber existido en Europa, Egipto e India desde épocas tan tempranas como 8000 a.C. (Moulherat *et al.*, 2002).

México es centro de origen, domesticación y diversidad de la especie *Gossypium hirsutum* (Wegier *et al.*, 2011). En México se distribuyen metapoblaciones silvestres de esta especie desde Centroamérica hasta el sur de Sinaloa en la costa del Océano Pacífico; desde la Península de Yucatán hasta el sur de Tamaulipas en la costa del Golfo de México además de las Islas del Caribe. El mapa de distribución potencial de *G. hirsutum* en México demuestra que existen ocho áreas separadas por barreras geográficas, abarcando varios estados de la República Mexicana por lo que su distribución se describe geopolíticamente: BCS (Sur de Baja California Sur); Pacífico Norte (Centro y Sur de Sinaloa y Norte de Nayarit); Bahía de Banderas (Suroeste de Nayarit y Jalisco); Pacífico Centro (litoral del Centro y Sur de Jalisco, Colima, Michoacán, y Noroeste y Sur de Guerrero); Pacífico Sur (Sureste de Guerrero, litoral de Oaxaca, y Sur de Chiapas); Península de Yucatán (Quintana Roo, Yucatán, Campeche, Noreste y Este de Tabasco); Golfo Sur (Centro y Sureste de Veracruz) y Golfo Norte (Norte de Veracruz, Este de San Luis Potosí, y Sur de Tamaulipas; Wegier *et al.*, 2011).

Estado actual de suelos salinos y demandas de algodón

La salinidad de los suelos es uno de los principales factores abióticos que limitan la productividad de cultivos en muchas áreas alrededor del mundo; lo cual resulta lógico si recordamos que la Tierra es un planeta salado, con la mayoría de su agua conteniendo

aproximadamente 30 g de cloruro de sodio (NaCl) por litro. Esta condición salina ha afectado, y continúa afectando, la tierra en la que los cultivos crecen o pueden crecer (Flowers, 2004).

Los suelos salinos se caracterizan por presentar una alta concentración de sales solubles; y se clasifican como tal cuando la conductividad eléctrica (ECe) es 4 dS/m o más, lo cual es equivalente a aproximadamente 40 mMNaCl y se genera una presión osmótica de aproximadamente 0.2 MPa (Tester & Davenport, 2003). Más de 800 millones de hectáreas de tierra alrededor del mundo están afectadas por contener altas concentraciones de sales; esta cantidad suma más del 6% del total de las áreas de tierra del mundo. La mayoría de estas tierras afectadas se ha originado por causas naturales, a partir de la acumulación de sales por largos periodos de tiempo en zonas áridas y semiáridas. La erosión de las rocas parentales libera sales solubles de varios tipos, principalmente cloruros de sodio, calcio y magnesio, y en menor grado, sulfatos y carbonatos. El NaCl es la sal liberada más soluble y más abundante (Flowers, 2004). La otra causa de acumulación es la deposición de sales oceánicas acarreadas en el viento y la lluvia. El agua de lluvia contiene de 6-50 mg/kg de NaCl; la concentración decrece con la distancia de la costa. La lluvia que contiene 10 mg/kg de NaCl deposita 10 kg/ha de sal por cada 100 mm de lluvia al año (Munns & Tester, 2008).

Aproximadamente la mitad de la superficie de la Tierra es desierto o tierras secas. Estas áreas se pueden hacer más productivas mediante irrigación, la cual aumentó un tercio entre 1979 y 1999, de 207 a 274 millones de hectáreas (Flowers, 2004). Sin embargo, una proporción significativa de tierra agrícola cultivada se ha vuelto salina debido al desmonte e irrigación, lo cual ocasiona un incremento en los niveles freáticos y concentra las sales en la zona de la raíz. De los 1500 millones de ha de tierras con agricultura de temporal, 32 millones (2%) se encuentran afectadas por salinidad secundaria en varios niveles. De los 230 millones de ha de tierras irrigadas, 45 millones

(20%) son afectadas por sal. La tierra irrigada es sólo el 15% del total de tierra cultivada, pero debido a que esta tierra presenta al menos el doble de productividad que las tierras que sólo reciben agua de lluvia, producen un tercio del alimento mundial (Munns & Tester, 2008).

México presenta suelos degradados en 45% de su territorio (SEMARNAT-Colegio de Posgraduados, 2002). En un estudio de suelos realizado por INEGI en 1998 en la República Mexicana, se reporta que el 5.1% de las muestras estudiadas (n=867) presentan valores preocupantes de salinidad. Las zonas más salinas comprendidas dentro de este archivo de datos son las Sierras y llanuras Coahuilenses, Sierra de la Paila, Laguna de Mayran, Sierra de la costa de Jalisco y Colima, Chapala y el Bolsón de Mapimí.

La proporción de tierras afectadas por sales es suficiente para imponer un riesgo a la agricultura, ya que la mayoría de las plantas, ciertamente la mayoría de las plantas cultivadas, no crecerán en altas concentraciones de sal (únicamente las halófilas, por definición, crecen en concentraciones de NaCl mayores a 400 mM; Flowers, 2004). Consecuentemente, la salinidad es una seria amenaza para la producción de cultivos. El crecimiento de la población humana de aproximadamente 50%, de 6.1 mil millones en 2001 a 9.3 mil millones en 2050 (UNFPA, 2001), significa que la producción de cultivos debe incrementar si la seguridad alimentaria ha de ser garantizada. Desafortunadamente, un fuerte vínculo con la salinización arroja una pregunta inmediata sobre la sustentabilidad de usar irrigación para incrementar la producción de alimentos, y ha sido debatido que el valor primordial al incrementar la tolerancia a la salinidad de los cultivos será en la sustentabilidad de la irrigación (Flowers, 2004).

Globalmente, el algodón es cultivado en 34 millones de ha, y se producen aproximadamente 26,247 millones de toneladas de fibra anualmente (Khadi *et al.*, 2010). México cuenta con las condiciones agroecológicas idóneas en diversas regiones para el

cultivo de algodón. En el 2011 un total de 107 mil ha de algodón fueron sembradas en el territorio nacional. El gobierno federal actualmente elabora un Plan Maestro para el Sector Algodonero que planea impactar directamente en la producción, para pasar de la cifra antes mencionada a 175 mil ha. En este proceso, al 2016 se buscará aumentar la producción en Tamaulipas (65 mil ha), La Laguna (30 mil), Chihuahua (110 mil), Baja California (45 mil) y Sonora (50 mil), para llegar a las 300 mil hectáreas. Además, se trabajará para extender polígonos en áreas adjuntas en zonas de Coahuila (15 mil ha), Chihuahua (40 mil), Baja California (15 mil) y Sinaloa (30 mil), para alcanzar otras 100 mil hectáreas de cultivo, a fin de alcanzar un crecimiento anual del 20% (SAGARPA, 2011).

Dado que las demandas de fibra y algodón siguen en aumento, durante años los científicos se han fijado una gran meta para el mejoramiento genético del algodón a través de la aplicación concertada de cruzamiento tradicional de plantas, ingeniería genética y herramientas genéticas moleculares (Badigannavar, 2010). A pesar de que se han alcanzado grandes logros en aumentar el rendimiento por hectárea del algodón, aún muchos países en desarrollo que cultivan algodón tienen un retraso a comparación de los países desarrollados que siembran dicho cultivo (Australia, USA, China, etcétera). Además de varios factores responsables de un bajo rendimiento, la salinidad requiere atención urgente, ya que el crecimiento y la formación de la fibra se ven afectados por las altas concentraciones de sal en su medio de crecimiento (Thomas, 1980), a pesar de que este cultivo es medianamente tolerante a este factor de estrés.

Cultivos tolerantes a la salinidad que aumenten la economía de producción y características de procesamiento de fibras permitirán al algodón competir favorablemente en el mercado con fibras sintéticas derivadas del petróleo y enriquecer la calidad de vida de millones de personas en el mundo (Badigannavar, 2010).

Mecanismos fisiológicos de tolerancia a estrés salino

Todos los organismos se encontrarán en algún punto de su ciclo de vida con condiciones ambientales que ponen en juego el funcionamiento fisiológico de sus células. Cuando esta condición se vuelve lo suficientemente severa para necesitar respuestas para mantener la homeostasis celular, se puede considerar estresante (Morris *et al.*, 2013). Estos factores ambientales juegan un papel integral en la ecología y evolución de los sistemas biológicos. La respuesta al estrés se ha formado como resultado de la selección natural, mejorando la capacidad de los organismos para soportar situaciones que requieran acción (Zhu *et al.* 2001). No existe una definición universal del término estrés, pero para nuestros fines estrés será definido como un factor ambiental o genético que ocasiona un cambio en un sistema biológico, el cual es potencialmente dañino y que tiene alguna consecuencia en la “adecuación Darwiniana” de los organismos (Morris *et al.*, 2013). Por lo tanto, el término estrés salino describe los efectos adversos ocasionados por las cantidades excesivas de sales solubles en el suelo sobre los organismos; mientras que tolerancia a salinidad, por el contrario, engloba las adaptaciones de una planta para contrarrestar los niveles excesivos de sales solubles en el suelo.

El NaCl es la sal más soluble y ampliamente distribuida, las plantas poseen mecanismos para regular su acumulación y seleccionar en contra de ella a favor de otros nutrientes comúnmente presentes en bajas concentraciones, como el K^+ y el NO_3^- . En la mayoría de las especies el Na^+ parece alcanzar concentraciones tóxicas antes que el Cl^- , y por lo tanto la mayoría de los estudios se han concentrado en la exclusión de Na^+ y el control de su transporte de dentro de la **planta (Munns & Tester, 2008)**.

Altas concentraciones de sales en el suelo perturban la homeostasis en el potencial hídrico y en la distribución de iones, tanto a nivel celular como de la planta entera. Las sales en el exterior de las raíces dificultan la extracción de agua, teniendo un efecto inmediato en el crecimiento celular y metabolismo asociado; por otro lado, concentraciones tóxicas de sales se acumulan a lo largo del tiempo dentro de las plantas

antes de que puedan afectar la función de las mismas. Estos cambios drásticos en la homeostasis hídrica e iónica conducen a daño molecular, arresto del crecimiento e incluso la muerte. Para conseguir tolerar la salinidad, tres aspectos interconectados de las actividades de la planta son importantes: el daño debe ser prevenido o atenuado, las condiciones de homeostasis deben restablecerse en el nuevo ambiente estresante, y el crecimiento se debe reanudar, aunque sea a **una tasa reducida (Zhu, 2001)**. En el análisis más sencillo de respuesta de una planta al estrés salino, la reducción en crecimiento apical ocurre en dos fases: una respuesta rápida al incremento en presión osmótica externa y una respuesta más lenta debida a la acumulación de Na^+ en las hojas (Munns, 2005). Los procesos celulares y metabólicos involucrados en la fase osmótica se comparten con las plantas afectadas por sequía (Zhu, 2001). En la fase osmótica, que empieza inmediatamente después de que la concentración de sal alrededor de las raíces aumenta hasta un umbral, la tasa de crecimiento del ápice cae de manera significativa debido al efecto osmótico de la sal fuera de las raíces. El valor del umbral es de aproximadamente 40 mM de NaCl para la mayoría de las plantas (equivalente a 4 ds/m; Munns, 2005). La tasa a la que las hojas en crecimiento se expanden se reduce, nuevas hojas emergen más despacio, y brotes laterales se desarrollan más despacio o permanecen quiescentes, por lo que menos ramas y brotes laterales se forman. El crecimiento del tallo es más sensible que el crecimiento de la raíz (Munns & Tester, 2008). Ni el Na^+ ni el Cl^- se acumulan en los tejidos en crecimiento a concentraciones que inhiben el crecimiento, ya que los tejidos meristemáticos se alimentan principalmente del floema, de donde la sal se excluye eficientemente; y las células que se están elongando pueden acomodar la sal que llega en el xilema dentro de sus vacuolas que se expanden (Munns, 2005).

La segunda fase (ión-específica o estrés iónico) de respuesta de las plantas a la salinidad comienza cuando la sal se acumula a concentraciones tóxicas en las hojas

viejas, que además no se están expandiendo y por lo tanto no diluyen la sal que llega a las mismas como lo hacen las hojas jóvenes en crecimiento, y mueren (Munns & Tester, 2008). La causa del daño es probablemente que la carga de sal excede la habilidad de las células de compartamentalizar las sales en la vacuola. Las sales se acumulan rápidamente en el citoplasma e inhiben la actividad enzimática. Alternativamente, pueden acumularse en las paredes celulares y deshidratar a la célula (Munns, 2005). Si la tasa a la que las hojas mueren es mayor que la tasa a la que nuevas hojas se producen, la capacidad fotosintetizadora de la planta no podrá suplementar los requerimientos de carbohidratos de las hojas jóvenes, que a continuación reducen su propia tasa de crecimiento (Munns & Tester, 2008).

El estrés osmótico tiene un mayor efecto en las tasa de crecimiento que el estrés iónico. El estrés iónico impacta en el crecimiento mucho más tarde y con menos efecto que el estrés osmótico, especialmente a niveles salinos de bajos a moderados. Sólo a concentraciones elevadas de salinidad, el efecto iónico domina al efecto osmótico. En resumen, la reducción inicial en el crecimiento es causada por el efecto osmótico de la sal fuera de las raíces, y la subsecuente reducción en crecimiento, es causada por la inhabilidad de prevenir que la sal alcance niveles tóxicos en las hojas (Munns, 2005).

Los principales mecanismos a través de los cuales las plantas logran tolerar el estrés salino, es minimizando la sal absorbida por las raíces y dividiéndola a nivel de tejido y celular para que no se acumule a concentraciones tóxicas en el citosol de las hojas (Munns, 2005), y se pueden agrupar en tres categorías:

1.-Tolerancia al estrés osmótico: el estrés osmótico inmediatamente reduce la expansión de las células en las puntas de las raíces y en las células jóvenes, y ocasiona el cierre de estomas. Una respuesta reducida al estrés osmótico resultaría en un mayor crecimiento de las hojas y conductancia estomatal, pero el incremento resultante en el área de las hojas únicamente beneficiaría a plantas con suficiente agua en el suelo. Una

mayor expansión en el área foliar sería productiva cuando la fuente de agua está garantizada, como en un sistema irrigado de producción de alimentos, pero podría ser poco deseable en sistemas con agua limitada, y ocasionar que el agua del suelo se agote antes de que la planta madure (Munns & Tester, 2008).

Los mecanismos que regulan el crecimiento de las hojas y el desarrollo del ápice bajo estrés no se conocen muy bien. La reducción del tamaño de las hojas debe estar regulada por señales a larga distancia como hormonas o sus precursores, ya que esta reducción en la tasa de crecimiento de hojas es independiente del abastecimiento de carbohidratos y del estatus hídrico. Cambios en las propiedades de las paredes deben ocurrir, pero su naturaleza permanece desconocida (Zhu, 2001).

2.-Exclusión de Na⁺ de la lámina de las hojas: la exclusión de Na⁺ por las raíces asegura que no se acumule a concentraciones tóxicas dentro de las hojas. Un fracaso en la exclusión de Na⁺ manifiesta su efecto tóxico después de días o semanas, dependiendo de la especie, y ocasiona una muerte prematura de las hojas más viejas (Munns & Tester, 2008).

3.-Tolerancia de los tejidos a la acumulación de Na⁺, o en algunas especies al Cl⁻: la tolerancia requiere la compartimentalización de Na⁺ y Cl⁻ a nivel celular e intracelular para evitar concentraciones tóxicas dentro del citoplasma, especialmente en células mesófilas de hojas. La toxicidad ocurre con el tiempo, después de que el Na⁺ aumenta a elevadas concentraciones en las hojas más viejas (Munns & Tester, 2008).

Distinguir los efectos osmóticos de los ión-específicos requiere observaciones a lo largo del tiempo de la tasa de producción de hojas nuevas y la tasa de aumento en el daño de las hojas viejas. El efecto del estrés osmótico se ve como una rápida inhibición de la tasa de expansión de las hojas jóvenes y una conductancia estomatal reducida de hojas maduras. Mediciones diarias del tamaño de las hojas en crecimiento, o mediciones de la conductancia estomatal con un porómetro, son también buenos indicadores de la

tasa de crecimiento. Un aumento en tolerancia osmótica es principalmente evidente como un aumento en la habilidad para continuar produciendo hojas nuevas. La toxicidad ión-específica se puede ver como un aumento en la tasa de senescencia de las hojas viejas, debida a altas concentraciones de Na^+ en las hojas, o a baja tolerancia a Na^+ acumulado (Munns & Tester, 2008).

Adicionalmente, como consecuencia del estrés iónico y osmótico, usualmente otros estreses secundarios como el oxidativo, ocurren. El estrés salino induce la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que son dañinas para las células vegetales a elevadas concentraciones; éstas causan daño oxidativo a los lípidos de membranas, proteínas y ácidos nucleicos (Pang & Wang, 2008; Yu *et al.*, 2011).

La reducción del O^2 hacia una molécula de oxígeno activa resulta de la adición de uno, dos o más electrones para formar el radical superóxido (O^{2-}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical hidroxilo (OH), respectivamente (Pang & Wang, 2008). La vida media de las ROS es extremadamente pequeña, lo cual dificulta el estudio de su producción *in planta*. Por lo tanto, el daño a proteínas, lípidos y DNA ha sido usado como un índice de estrés oxidativo (Fryer *et al.*, 2001).

Bajo condiciones de alta salinidad, la producción de ROS se incrementa dramáticamente y la homeostasis fisiológica de la célula se interrumpe. Para lidiar con el estrés oxidativo resultante de las ROS, las plantas han desarrollado un complejo sistema antioxidante que consiste de antioxidantes de bajo peso molecular, incluyendo carotenos, ascorbato, glutatión (GSH) y tocoferol (VE, así como enzimas antioxidantes como la superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT) y el ciclo ascorbato-glutatión (Pang & Wang, 2008).

La tasa a la que las hojas mueren es crucial para la supervivencia de las plantas. Si nuevas hojas se producen continuamente a una tasa mayor a la que las viejas mueren,

habrá suficientes hojas fotosintetizadoras para que la planta produzca flores y semillas, aunque en cantidades reducidas. Sin embargo, si las hojas viejas mueren más rápido que lo que las hojas nuevas se desarrollan, la planta puede no sobrevivir para producir semillas. Para las plantas anuales es una carrera en contra del tiempo para iniciar la formación de flores y semillas, mientras la superficie foliar sea adecuada para proveer el fotosintato necesario. En el caso de especies perennes, es una oportunidad para entrar en un estado parecido a la dormancia y por tanto sobrevivir al estrés (Munns, 2005). Un incremento en la tolerancia a ambas fases de estrés permitiría a las plantas crecer a tasas considerablemente rápidas a lo largo de su ciclo de vida aún en ambientes salinos.

Respuestas a estrés salino en *Gossypium hirsutum*

Las plantas difieren grandemente en su tolerancia a la salinidad, como se refleja en sus diferentes respuestas de crecimiento, aunque en general las especies de cultivos son intolerantes a un tercio de la concentración de sales encontrada en agua de mar (Flowers, 2004). De los cereales, el arroz (*Oryza sativa* L.) es el más sensible, y la cebada (*Hordeum vulgare* L.) es el más tolerante (Munns & Tester, 2008). Debido a la importancia económica del algodón, el efecto del estrés salino en su crecimiento y producción ha sido grandemente estudiado, ubicándose a este cultivo en el grupo de plantas moderadamente resistentes a la salinidad. Un límite de salinidad al que se ha visto que el rendimiento inicial del algodón declina es a 7.7 dSm^{-1} , con un 50% de reducción en productividad a 17.0 dSm^{-1} (Maas, 1985). El estrés salino afecta adversamente la producción de biomasa, decrece la superficie de las hojas, el grosor del tallo, peso de ápice y raíces, disminución en la producción de fibra, y finalmente produce una reducción en la producción de semillas de algodón (Ahmad *et al.*, 2002). En este momento resulta de suma importancia resaltar que todos los estudios de estrés salino en *G. hirsutum* se han llevado a cabo en plantas cultivadas, y las poblaciones silvestres no han sido caracterizadas. Por lo tanto, se debe tener presente que lo que a continuación

se describe únicamente corresponde a una sección de la variación total presente en el acervo génico de las poblaciones silvestres.

En cuanto a las relaciones iónicas en el algodón, hay reportes contrastantes en relación al patrón de absorción y acumulación de iones tóxicos (Na^+ y Cl^-) en los tejidos de las plantas sujetos a medio salino. Sin embargo, la mayoría de los estudios reportados hasta el momento en la literatura apoyan el mecanismo de exclusión parcial de iones (exclusión de Na^+ y/o Cl^-) en el algodón. Además, altas tasas de K^+/Na^+ y Ca^+/Na^+ se encontraron positivamente asociadas con la tolerancia a la sal del algodón (Ashraf, 2002; Flowers, 2004). Esto es posible debido a la distribución selectiva de Na^+ , Cl^- y K^+ , con exclusión parcial de Na^+ de los tejidos en crecimiento y transporte de K^+ en células meristemáticas y células de hojas mesófilas. Las proteínas de membrana involucradas en la selectividad catiónica y redistribución de Na^+ y K^+ son bombas de protones, que proveen energía necesaria para el transporte de iones, antiportes de Na^+/H^+ en la membrana plasmática que expulsan exceso de Na^+ fuera de la células, antiportes de Na^+/H^+ en el tonoplasto para bombear Na^+ a la vacuola, y canales catiónicos con alta selectividad por K^+ sobre Na^+ (Ashraf, 2002). Es evidente que la salinidad tiene efectos adversos en la germinación y emergencia del algodón. La elongación de la raíz puede ocurrir a salinidad media, pero una reducción significativa del crecimiento de la raíz a alta salinidad es un fenómeno común en el algodón (Ashraf, 2002). Variabilidad genotípica para longitud primaria de la raíz y número de raíces secundarias ha sido encontrada en cultivares de algodón. Sin embargo, no hay estudios del efecto de la salinidad en el crecimiento de la raíz en el campo, y éstos se reducen a crecimiento de raíz en hidroponía o en sistemas sin suelo, y pueden tener relevancia limitada en condiciones de campo (Gorham *et al.*, 2010).

En cuanto al crecimiento apical de la planta del algodón, éste es adversamente afectado por condiciones salinas. Sin embargo, el crecimiento de raíz y ápice de líneas

genotípicamente diferentes muestra diferentes respuestas al estrés salino. Por otro lado, la tasa ápice/raíz decrece bajo salinidad debido a una mayor sensibilidad de los ápices que de las raíces al estrés salino (Gorham *et al.*, 2010).

Uno de los principales efectos de la salinidad es la reducción en el área foliar total y consecuentemente una reducción en la tasa fotosintética por planta. A salinidad moderada, y nutrición adecuada, esta reducción en crecimiento no está acompañada por síntomas de toxicidad salina, pero a concentraciones de sal mayores se observa senescencia prematura y muda de hojas. Un mayor grosor de las hojas (suculencia) se ha observado con un incremento en la salinidad (Gorham *et al.*, 2010).

Aunque los recursos pueden ser desviados de desarrollo vegetativo a desarrollo reproductivo a baja salinidad, a alta salinidad el número de cápsulas y semillas, así como la calidad de la fibra son reducidas de varias maneras, lo cual puede deberse a la respuesta diferencial de cultivares genéticamente distintos (Ashraf, 2002; Gorhman *et al.*, 2010).

En cuanto al efecto del estrés salino a lo largo de las diferentes etapas del crecimiento de la planta, aún cuando existen reportes contrastantes relacionados con la respuesta de este cultivo a la salinidad, en la mayoría de ellos es evidente que el algodón mantiene su grado de tolerancia a la salinidad consistentemente a lo largo de todas sus fases de desarrollo. Por esta razón, es posible hacer una selección efectiva para la tolerancia a la salinidad a cualquier etapa de crecimiento del cultivo (Ashraf & Ahmad, 2000a).

Base genética de tolerancia a estrés salino

El mejoramiento de la tolerancia de los cultivos a múltiples factores estresantes depende de la existencia de variación genética dentro del pool génico de la especie de interés. En este sentido, variación inter e intraespecífica para tolerancia a la salinidad en algodón sugiere que las variedades de algodón difieren considerablemente al estrés

salino (Gorhman *et al.*, 2010). Tal variación puede ser de considerable valor práctico para aumentar la tolerancia a la salinidad de este cultivo mediante selección y cruzas siempre y cuando la mayor parte de esta variación sea genéticamente aditiva (Ashraf, 2002); cualquier estrategia de cruce para tolerancia a la salinidad depende de la adecuada heredabilidad del carácter completo (Flowers, 2004).

Aunque pocos estudios se han realizado acerca de la base genética para la tolerancia a la salinidad, Ledbetter (1987) estimó la heredabilidad en sentido estricto del algodón para resistencia a la salinidad como 0.38 durante la germinación y emergencia del algodón. Por su parte, Ashraf y Ahmad (2000b) examinaron la herencia de tolerancia a la salinidad en rendimiento de semillas, contenido de aceite en las semillas y características de la fibra de plantas crecidas en suelos salinizados; y encontraron que tanto el efecto de genes aditivos como no aditivos son responsables de la expresión de tolerancia a la salinidad. El alto componente aditivo de la varianza de rendimiento de semillas, número de cápsulas, altura de la planta, fineza de la fibra y madurez de la fibra sugiere que un mejoramiento significativo en estas características en respuesta a la salinidad del suelo sería posible a través de selección y cruzas.

Otros estudios genéticos del algodón en relación a tolerancia a la salinidad muestran que la mayoría de las características del crecimiento, rendimiento y de la fibra tienen una base genética y la mayoría son loci de caracteres cuantitativos (QTLs; Ashraf, 2002; Flowers, 2004). Debido a que los mayores determinantes de rendimiento varían con las condiciones ambientales y a que los QTLs típicamente exhiben una mayor interacción ambiente-genotipo (Flowers, 2004), su identificación será muy útil para entender la complejidad del control génico de tolerancia a la salinidad y proveer oportunidades para cruces más efectivas para tolerancia a la salinidad en cultivos (Madhava, 2006).

La construcción de mapas moleculares de ligamiento se ha convertido en una herramienta esencial para la genética molecular de plantas y la investigación en mejoramiento de las mismas (Lacape, 2003). Un importante paso para el establecimiento de dichos ligamientos es el desarrollo de mapas genéticos; sin embargo, el progreso en el mapeo del genoma del algodón está obstaculizado por genomas relativamente grandes, marcadores de DNA inadecuados y la poliploidía de los algodones tetraploides ampliamente cultivados. A pesar de estas desventajas, varios grupos de investigación han desarrollado mapas que derivan tanto de cruza intraespecíficas de *G. hirsutum* (Shappley *et al.*, 1998; Ulloa & Meredith 2000; Ulloa *et al.*, 2002), como interespecíficas de *G. hirsutum* x *G. barbadense* (Reinisch *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2002). También se han desarrollado mapas de ligamiento para QTLs diversos, como relacionados con la fibra con respecto a la domesticación del algodón (Jiang *et al.*, 1998; Ulloa & Meredith Jr, 2000; Meiet *al.*, 2004) y con la pubescencia de hojas y tallo del algodón (Lacape & Nguyen, 2005). Sin embargo, excepto por un mapa integrado desarrollado recientemente (Lacape *et al.*, 2003), muchos mapas han sido desarrollados independientemente y brindan aproximadamente 10-85% de cobertura del genoma de aproximadamente 5,500-cM del algodón. Hay una necesidad de desarrollar marcadores adicionales e integrar mapas genéticos desarrollados independientemente usando diferentes poblaciones mapeadas (Mei *et al.*, 2004).

Aún cuando los mapas de ligamientos son herramientas muy útiles para el análisis comparativo de evolución del genoma del algodón y selección asistida por marcadores moleculares de caracteres agronómicamente importantes en programas de mejoramiento, la presencia de segregación distorsionada, *hotspots* de recombinación y regiones de supresión sugiere que el genoma del algodón es complejo (Mei *et al.*, 2004), haciendo todavía más grande el reto de identificar y seleccionar un gen usando un enfoque basado en mapeo genético. En consecuencia, se plantea el análisis de genes cuya función

putativa esté relacionada a la tolerancia al estrés salino, aún cuando actualmente se reconoce el papel que juegan los QTLs en la respuesta a dicho estrés.

Genes candidatos para tolerancia a estrés salino

Investigaciones en busca de respuestas celulares a estrés salino han identificado a un gran número de genes inducidos por la sal. La capacidad de adaptación a la sal de las especies puede estar relacionada con la expresión constitutiva de genes que codifican determinantes de tolerancia a la salinidad o en la mayor capacidad para regular la expresión de estos genes en respuesta a la sal. De esta forma es posible categorizar a los genes inducidos por estrés en dos grupos de acuerdo con las funciones de sus productos. El primer grupo consiste de proteínas funcionales como proteínas de membrana que mantienen el movimiento de agua a través de las mismas; enzimas clave de la biosíntesis de osmolitos; enzimas detoxificantes que permiten mantener el metabolismo en niveles normales; y otras proteínas para la protección de macromoléculas. El segundo grupo se compone de proteínas regulatorias, factores de transcripción (FT), cinasas y proteinasas involucradas en la regulación de la transducción de señales y expresión génica (Agarwal *et al.*, 2006).

Otra clasificación en genes que podrían incrementar la tolerancia a estrés salino es en tres principales grupos funcionales: aquellos que controlan la entrada y transporte de sal, aquellos que tienen una función osmótica o protectora, y aquellos que podrían hacer que una planta creciera más rápido en suelo salino (Munns, 2005).

Genes que controlan la entrada y transporte de sal: la mayoría de los estudios se concentran en el transporte de Na^+ en vez de Cl^- ; ya que el control de entrada de Na^+ es probablemente más difícil y demandante de energía que el de Cl^- debido a que las células vegetales tienen un potencial eléctrico negativo (aprox. -180 mV) (Munns, 2005). La prevención de entrada de Na^+ del apoplasto es más demandante en términos de selectividad de iones y costos energéticos que la prevención de entrada de Cl^- . Además,

la variación genética en tolerancia a estrés salino de la planta entera, se correlaciona con el grado al que la planta limita la tasa de transporte de Na^+ a las hojas.

Dentro de este grupo han sido descritas proteínas de membrana que controlan el transporte de Na^+ . Las proteínas que controlan la entrada de Na^+ del suelo y su transporte dentro de la planta se encuentran embebidas en la bicapa lipídica de la membrana, que es de otra manera impermeable a los iones. El Na^+ probablemente entra a las células a través de canales catiónicos no selectivos, y a alta salinidad, posiblemente a través de canales de K^+ o transportadores que son incompletamente selectivos para K^+ (Tester & Davenport, 2003).

El transporte pasivo de iones ocurre a través de canales, que son proteínas de membrana con poros selectivos para iones que permiten el movimiento de iones a través de un gradiente electroquímico. Son altamente selectivos para un ion específico, pero hay una clase de canales catiónicos no selectivos que transportan Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y NH_4^+ (Munns, 2005).

El transporte activo de iones ocurre a través de transportadores tipo simporte y antiporte, que pueden transportar iones en contra de un potencial de gradiente electroquímico; la familia de antiportes NHX es selectiva para Na^+ . El transporte es llevado a cabo por la diferencia en el potencial electroquímico de un soluto acoplado, usualmente H^+ . El potencial electroquímico de protones establecido por las bombas transportadoras de H^+ es responsable de la regulación de pH interno, volumen celular y nivel de Na^+ en el citoplasma. Los transportadores sufren cambios conformacionales cuando transportan iones, y la tasa de transporte es mucho menor que la de los canales. Las bombas de protones son esenciales para proveer la diferencia de potencial eléctrico que utilizan los simportes y antiportes de Na^+ , y no existen bombas de Na^+ clásicas en plantas (Munns, 2005).

El Na^+ que entra a una célula tiene uno de tres destinos (suponiendo que no puede ser retenido en el citoplasma, en donde sería tóxico): el Na^+ se puede mover simplásticamente a una célula adyacente a través de plasmodesmata; puede ser regresado a la pared celular; o puede ser compartimentalizado (transportado a una vacuola). El regreso ocurre a través de antiportes Na^+/H^+ en la membrana plasmática; y la compartimentalización ocurre a través de antiportes vacuolares de Na^+/H^+ como *NHX1*.

El Na^+ y/o Cl^- son secuestrados en vacuolas para evitar un aumento en la fuerza iónica del citoplasma y para evadir el estrés osmótico aumentando la osmolaridad de las células. Las células vegetales son estructuralmente apropiadas para secuestrar iones debido a la presencia de grandes vacuolas rodeadas de membrana. La acumulación de Na^+ en vacuolas a través de la operación de un antiporte de Na^+/H^+ provee una eficiente manera de revertir los efectos deletéreos del Na^+ en el citosol y mantener un balance osmótico usando el Na^+ (y Cl^-) acumulados en la vacuola para meter agua a las células (Wu *et al.*, 2004).

Las funciones del antiporte de vacuola Na^+/H^+ han sido recientemente demostradas para *Arabidopsis*, tomate y arroz transgénicos sobreexpresando genes de antiporte de Na^+/H^+ (Wu *et al.*, 2004). Estos resultados proveen un vistazo a los mecanismos que usan las plantas para regular la expresión génica de respuesta a estrés salino.

Wu y colaboradores construyeron una librería de cDNA inducida con sal usando mRNA aislado de plántulas de un cultivar de *G. hirsutum* tolerante a sal, ZM3, y buscaron mediante hibridación diferencial cDNAs que codificaran proteínas específicas cuya actividad pudiera contribuir a tolerancia salinidad. De esta manera aislaron un clon de cDNA, *GhNHX1*, que codifica para un antiporte de Na^+/H^+ de tonoplasto de algodón y establecieron el patrón de acumulación de mRNA de dicho antiporte de Na^+/H^+ bajo diversas condiciones de estrés salino. Sus resultados indican que la expresión de

GhNHX1 en plántulas de algodón es inducida por estrés salino y las diferencias en variedades en respuesta a salinidad del suelo son consistentes con los niveles de expresión de *GhNHX1*. Tanto levaduras mutantes para antiporte Na^+/H^+ transformadas expresando *GhNHX1*, como plantas de tabaco transgénicas sobreexpresando *GhNHX1* mostraron mayor tolerancia a la sal que las levaduras mutantes y plantas silvestres, respectivamente, demostrando el uso potencial de dicho gen para mejorar la tolerancia a la sal del algodón.

El gen *GhNHX1*, consiste de 2,485 nucleótidos con un ORF de 1,629 nucleótidos, y la secuencia deducida de aminoácidos mostró alta identidad con otros antiportes de Na^+/H^+ de plantas de tipo vacuolar. Análisis de *Northern blot* indicó que la acumulación de mRNA de *GhNHX1* fue fuertemente inducida por estrés salino y ABA en plántulas de algodón. La expresión de *GhNHX1* en levaduras mutantes para antiportes Na^+/H^+ mostró complementación de funciones. Los niveles de mRNA de *GhNHX1* inducidos por sal fueron tres y siete veces mayores en el cultivar de algodón ZM3 tolerante a sal que en los cultivares ZMS17 y ZMS12 sensibles a sal, respectivamente. Juntos, estos resultados sugieren que los productos del gen *GhNHX1* funcionan como un antiporte Na^+/H^+ de tonoplasto y juegan un importante papel en la tolerancia del algodón a la sal (Wu *et al.*, 2004).

Genes con una función osmótica o protectora desconocida. Las moléculas con una función protectora incluye a pequeños compuestos orgánicos que son llamadas osmolitos, osmoprotectores o solutos compatibles. Estos tienen dos funciones: a elevadas concentraciones, ajuste osmótico; y a bajas concentraciones, un papel protector desconocido. Otros productos génicos incluyen a enzimas que “barren” radicales libres, y proteínas que protegen la formación y estabilidad de otras proteínas. Ninguno de estos se limita a salinidad, todos ocurren bajo sequía así como estrés salino, y algunas veces

otros tipos de estrés que también reducen el crecimiento, como las bajas temperaturas (Munns, 2005).

Genes que controlan las tasa de crecimiento celular y de tejidos. Los genes que podrían incrementar la tasa de crecimiento de las plantas en suelos salinos podrían influir en la tasa de producción de nuevas hojas y raíces (controlando la tasa de división celular, el desarrollo de nuevos primordios para ápice o raíz; la tasa de expansión de pared celular, o la dimensión de las células diferenciadas), o podrían influir en la tasa de fotosíntesis (controlando la apertura estomatal, o las dimensiones de las hojas mesófilas, lo que influye en la morfología de las hojas y la eficiencia de transpiración).

Los genes candidatos que controlan el crecimiento están probablemente involucrados en rutas de señalización que empiezan con un sensor e involucran hormonas, factores de transcripción, cinasas, fosfatasa y otras moléculas señalizadoras. Es muy probable que estos genes sean comunes a estrés hídrico, y a otros tipos de estrés, como frío, o condiciones del suelo que reducen el crecimiento como compactación o sodicidad (Munns, 2005).

El progreso en el descubrimiento de factores de transcripción (FT) y otras rutas de señalización es rápido. El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica para aproximadamente 1500 FT, de los cuales los que se relacionan con expresión génica de respuesta a estrés se clasifican tradicionalmente en vías regulatorias ABA-dependientes y ABA-independientes. Los FT también se pueden clasificar en grandes familias, como la AP2/EREBP, bZIP, NAC, MYB, MYC, dedos de zinc y WRKY (Agarwal *et al.*, 2006).

Una familia de FT que siguen una vía de transducción de señales independiente de ABA es la familia AP2/ERF (también llamado AP2/EREBP), y participa en regulación de desarrollo de plantas, respuestas a estrés, respuesta a hormonas, etc. Se ha estimado a unos 145 miembros de FT AP2/ERF en *Arabidopsis*, que se clasifican en cinco grupos: subfamilia AP2, subfamilia DREB, subfamilia ERF, subfamilia RAV y otros.

Las proteínas de unión a elementos en respuesta a deshidratación (DREB, por sus siglas en inglés), se dividen en seis pequeños grupos basado en similitudes en sus dominios de unión. Este grupo de proteínas contienen un dominio de unión a DNA de 58-60 amino ácidos, que específicamente se unen a las regiones promotoras de genes río abajo, activando o suprimiendo la transcripción de estos genes, y finalmente mejorando la tolerancia a estrés de las plantas. Los promotores de los genes río abajo siempre contienen un elemento-*cis* conservado, PyCCGACAT, llamado elemento de respuesta a deshidratación (DRE/CRT), el cual está relacionado con respuestas a estrés abiótico y biótico (Gao *et al.*, 2008). Dicho dominio ERF/AP2 de unión a DNA es altamente conservado y los factores de transcripción que lo contienen se encuentran a lo largo de muchos grupos de plantas (Agarwal *et al.*, 2006).

En la actualidad, 55 miembros pertenecientes a la subfamilia DREB han sido aislados de *Arabidopsis* y subdivididos en seis pequeños grupos (A-1 – A-6) basados en similitudes en sus dominios de unión a DNA (domino ERF/AP2). Los grupos A-1 y A-2 incluyen a las familias génicas DREB1 y DREB2, respectivamente; las funciones de los otros cuatro grupos han sido poco investigadas (Dubouzet *et al.*, 2003). Genes tipo DREB han sido aislados de trigo, tomate, arroz, maíz, pimiento, centeno y cebada, y sobreexpresados en otras plantas, y dicha sobreexpresión mejora la tolerancia de las plantas transgénicas a varios tipos de estrés abiótico (Nevo & Chen, 2010). Elevada tolerancia a sequía, elevada salinidad y congelamiento fue observada en arabidopsis transgénicas que sobreexpresaron *CBF1/DREB1B* y *CBF3/DREB1A* (Gao *et al.*, 2008).

Alineamiento de aminoácidos de diferentes proteínas DREB muestra alta similitud de secuencias en la señal de localización nuclear en la región N-terminal y cierta similitud en el dominio C-terminal. En el dominio ERF/AP2, dos aminoácidos, valina 14° y ácido glutámico 19° juegan un papel crucial en la determinación de especificidad de unión a DNA (Agarwal *et al.*, 2006).

Hasta 2006, tres factores de transcripción DREB de *G. hirsutum*, designados GhDREB1L, GhDBP1 y GhDBP3 habían sido aislados y clasificados en los subgrupos A-1, A-5 y A-4 de DREB (Huang *et al.*, 2006). RT-PCR mostró que GhDREB1L fue inducido en cotiledones de algodón por baja temperatura, así como tratamientos de sequía y NaCl; mientras que GhDBP1 y GhDBP3 fueron fuertemente inducidos por sequía, NaCl, baja temperatura y tratamientos de ABA (Gao *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2006).

En 2008, Gao y sus colaboradores caracterizaron un nuevo gen que codifica para un factor de transcripción de unión a DRE, *GhDREB*, clasificado en el subgrupo A-5. En este estudio, el gen se aisló de una librería de cDNA de algodón cv. Simian 3 por sistema de un híbrido de levadura; y los patrones de expresión, habilidad de unión a DNA y función de *GhDREB* fueron examinadas. El gen *GhDREB*, que codifica para una proteína de 153 aa contiene un dominio conservado AP2/EREBP de 58-60 aa, se une específicamente a la región promotora de genes río abajo, y activa o suprime la transcripción de dichos genes y finalmente mejora la tolerancia de las plantas a estrés. La proteína *GhDREB* se une específicamente al elemento DRE *in vitro*. Análisis funcionales indican que sobreexpresión de *GhDREB* en trigo transgénico mejoró tolerancia a sequía, elevada salinidad y baja temperatura mediante la acumulación de mayores niveles de azúcar soluble y clorofila en hojas luego de tratamientos de estrés. Esto puede indicar que la sobreexpresión de *GhDREB* activó la expresión río abajo de genes relacionados con la biosíntesis de azúcar, que a su vez aumenta tolerancia a estrés; además, los niveles elevados de clorofila pueden deberse a la expresión de genes río abajo que previenen la descomposición de la clorofila, manteniendo así fotosíntesis normal y mejorando la tolerancia al elevado estrés salino (Gao *et al.*, 2008).

Otro FT perteneciente a la subfamilia DREB recientemente descrito por Huang y colaboradores (2008) es GhDBP2, el cual se agrupa en el subgrupo A-6. Los transcritos de *GhDBP2* fueron fuertemente inducidos en tratamientos de sequía, NaCl, baja

temperatura y ABA en cotiledones de algodón. El cDNA designado *GhDBP2* tiene un ORF de 1053 pb, y codifica una proteína de 350 a.a. Esta proteína contiene un dominio AP2/ERF conservado y una región C-terminal que puede actuar como un dominio de activación transcripcional. *GhDBP2* ha sido involucrado en la activación de genes río abajo como *LEA D113* mediante la interacción con el elemento DRE (Huang *et al.*, 2008).

Se ha identificado a los genes tipo *LEA* (genes abundantes de embriogénesis tardía, por sus siglas en inglés) como uno de los genes blanco de las proteínas de unión a DRE usando *Northern blot* y microarreglos. Las proteínas tipo *LEA* se acumulan durante las etapas avanzadas de embriogénesis y en tejidos expuestos a estrés como desecación, estrés osmótico y bajas temperaturas. La sobreexpresión de algunos genes *LEA* o tipo *LEA* ha sido reportada para tolerancia a deshidratación, aunque el mecanismo preciso no se conoce. Por lo tanto, determinar que *GhDBP2* está involucrado en la regulación de algunos genes tipo *LEA* es importante para ilustrar su función (Huang *et al.*, 2008).

Recientemente, otro grupo de FT conocidos como NAC, los cuales son una de las familias más grandes de factores (existen más de 110 FT NAC) específicos de plantas, ha sido caracterizada. La familia génica NAC (NAM, ATAF1,-2 y CUC2) codifica factores de transcripción específicos de plantas que juegan un papel en la respuesta a estrés (Meng *et al.*, 2009).

Los genes de dominio NAC se caracterizan por una región N-terminal altamente conservada y un C-terminal altamente divergente. El N-terminal conservado puede funcionar como región NAC de unión a DNA, mientras que el C-terminal puede servir como región de activación transcripcional. De esta familia génica, se aislaron seis FT putativos completos de *G. hirsutum* (*GhNAC1* – *GhNAC6*), usando proteínas de dominio NAC de *A. thaliana* y *O. sativa* como secuencias de referencia para búsqueda tBLASTn (Altschul *et al.*, 1990) en base de datos EST de *G. hirsutum*. A partir de estas

predicciones, oligos específicos se diseñaron para PCR de cDNA y DNA genómico (Meng *et al.*, 2009).

Una comparación entre secuencias de cDNA y DNA genómico muestra que los seis genes tienen estructura intrón-exón conservada, aunque difieren en el largo de intrón y localización cromosomal. Los primeros dos exones codifican para el dominio NAC conservado, mientras que el último exón codifica el dominio de activación transcripcional C-terminal altamente divergente. Las proteínas predichas, GhNAC1-GhNAC6, son similares en secuencia, especialmente en el dominio NAC; la divergencia en región C-terminal resulta en variación del largo de la proteína GhNAC. Sin embargo, aunque todas estas características apoyan la caracterización de GhNACs como FT putativos, no se encontró un sitio de localización nuclear putativo para ninguna de las seis proteínas GhNAC (Meng *et al.*, 2009).

Todos los genes *GhNAC* fueron altamente expresados en hojas, mientras que tuvieron expresión de baja a nula en tallos, raíces, y fibras de siete días después de anthesis. Para determinar si la expresión de *GhNAC* fue inducida por estrés abiótico y/o por hormonas exógenas, se llevó a cabo RT-PCR tiempo real en plántulas de dos semanas bajo varios tratamientos (sequía, salinidad, frío y ABA). La expresión de *GhNAC1* no fue inducida por ninguno de los cuatro tratamientos. *GhNAC4* y *GhNAC6* fueron los únicos genes inducidos por los cuatro tratamientos. Por lo tanto, estos FT pueden estar relacionados en la cascada de transducción de señales de respuesta de plantas a estrés abiótico y biótico. Regulación génica inducida por estrés puede involucrar vías dependientes e independientes de ABA, y los *GhNACs* están probablemente involucrados en ambas vías (Meng *et al.*, 2009). Éste es el primer reporte en FT de dominio NAC en algodón y ayuda a entender el papel de *GhNACs* como reguladores de estímulos de estrés y otros procesos fisiológicos en el algodón, así como a tener un entendimiento general de vías de transducción de señales en plantas.

Otra superfamilia de FT son las proteínas dedos de zinc, que se relacionan con varios aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas. Los dedos de zinc se han clasificado en nueve tipos de acuerdo a su diversidad estructural y funcional: C₂H₂, C₈, C₆, C₃HC₄, C₂HC, C₂HC₅, C₄, C₄HC₃ y CCCH (C y H representan cisteína e histidina, respectivamente; Guo *et al.*, 2009). Se ha confirmado que muchos dedos de zinc están involucrados en respuestas a estrés biótico y abiótico, a continuación se mencionan algunos ejemplos. La proteína Zat12 es un dedo de zinc tipo C₂H₂ que juega un papel central en la señalización de estrés por especies reactivas de oxígeno y estrés abiótico en *Arabidopsis* (Davletova *et al.*, 2005). Sobreexpresión del gen de dedo de zinc *Os/SAP1* de arroz, confiere tolerancia a frío, deshidratación y estrés salino en tabaco transgénico (Mukhopadyay *et al.*, 2004).

Entre los diferentes tipos de dedos de zinc, aquellos que contienen un dominio en tándem de dedo de zinc caracterizado por tres cisteínas seguidas de una histidina (CCCH) han sido pobremente caracterizados. Recientemente, se reveló que las proteínas dedos de zinc AtSZF (proteína dedo de zinc inducible por estrés salino) y AtSZF2 están involucradas en la regulación de las respuestas a estrés salino en *Arabidopsis* (Sun *et al.*, 2007).

Guo y sus colaboradores (2009) construyeron una librería de cDNA inducida por sal de plántulas de un cultivar de algodón tolerante a salinidad (ZMS19), y usando el método de hibridización diferencial aislaron y caracterizaron una proteína dedo de zinc tipo CCCH, a la cual designaron proteína dedo de zinc 1 de *Gossypium hirsutum* (GhZFP1).

La secuencia completa de *GhZFP1* consistió de 1377 nucleótidos, que codifican para una proteína de 339 a.a. La proteína contiene dos motivos típicos de dedo de zinc, CX₈CX₅CX₃H y CX₅CX₄CX₃, separados por 18 a.a. y pertenecen a una familia inusual de proteínas de dedos de zinc CCCH. Estos genes carecen de intrones; y además se

encontró una señal de localización nuclear potencial (NLS; entre los a.a. 14 y 28) en la región N-terminal, y una secuencia putativa de exportación nuclear rica en leucina (NES; entre los a.a. 331 y 339) en la región C-terminal de la proteína. Estos datos sugieren que esta nueva proteína dedo de zinc tipo CCCH puede funcionar como un regulador en algodón, y se agrupó en una subfamilia de proteínas dedos de zinc de respuesta a estrés (SRZFP; Guo *et al.*, 2009).

El mRNA de *GhZFP1* se induce bajo tratamiento de NaCl, polietilén glicol (PEG) y ácido salicílico (SA) exógeno. Estos transcritos se acumulan dentro de 6 h después de los tratamientos de NaCl y SA, y a las 12 h se expresan fuertemente. En el caso de los tratamientos de PEG, la expresión de *GhZFP1* fue inducida dentro de 6 h, tuvo un pico a las 12 h y disminuyó a las 24 h (Guo *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que la sobreexpresión de *GhZFP1* en plantas mejora la tolerancia a sal mediante la generación de plantas de tabaco transgénicas que expresan dicho gen. En las plantas transgénicas la concentración celular de Na⁺ es menor que en las plantas silvestres que son sometidas a tratamiento de sal, mientras que el contenido de K⁺ en las plantas transgénicas fue mayor que en las plantas silvestres. Estos resultados indican que la mayor tolerancia a sal de las plantas transgénicas puede ser resultado de la habilidad de mantener la homeostasis de Na⁺ o la adquisición de K⁺.

Hasta la fecha, *GhZFP1* es el primer dedo de zinc tipo CCCH de la subfamilia SRZFP en ser identificado y caracterizado funcionalmente en algodón.

Los FT son poderosos blancos para ingeniería genética de tolerancia a estrés, pues la sobreexpresión de un solo FT puede llevar a la regulación positiva o negativa de una amplia gama de genes de respuesta a estrés (Nevo & Chen, 2010).

La contribución de los elementos regulatorios a la evolución de los caracteres adaptativos ha sido muy poco explorada, aún cuando es muy probable que una porción no trivial de la diversidad en caracteres adaptativos se deba a la variación en regiones

regulatorias (Eckert & Dyer, 2012). Aún cuando una proporción significativa de la diversidad se localice en genes estructurales, podría residir a nivel de redes e interacciones epistáticas en vez de a nivel de genes individuales (Cheviron & Brumfield, 2012; Rockman, 2012).

Justificación

México es centro de origen, domesticación y diversidad de un gran número de cultivos, entre los cuales se encuentra el algodón, una de las fibras de mayor importancia a nivel mundial. Las evidencias que permiten sostener a México como dicho centro van desde evidencia filogenética, la distribución geográfica de los parientes silvestres, información antropológica, etcétera. Aunque análisis de variación genética neutral de las metapoblaciones silvestres de *Gossypium hirsutum* han sido realizados e indican que dichas poblaciones albergan una gran diversidad genética y que existe variación genética exclusiva de ciertas poblaciones, aún no se conoce la variación genética adaptativa o funcional presente en las poblaciones silvestres de *G. hirsutum*. Dicha información aumentará la evidencia que permite sostener a México como centro de diversidad de la especie.

Por otro lado, cada año en todo el mundo las demandas de la población por fibras de calidad aumentan, pero las zonas agrícolas adecuadas no muestran el mismo crecimiento, sino que se reduce su fertilidad y aumenta la presión para el cambio de uso de suelo de las tierras que conservan su vegetación. Uno de los principales factores que impactan negativamente a las zonas agrícolas es la salinización de los suelos, por lo que el desarrollo de cultivos mejorados resistentes a estrés salino puede ser uno de los principales retos para garantizar la producción de cultivos de importancia económica.

La evolución opera a partir de la variación genética presente en las poblaciones. Al haber evidencia de un alto componente de heredabilidad en resistencia a estrés salino en algodón, es posible realizar programas de mejoramiento de cultivares a partir de la

variación presente en las poblaciones silvestres. Un entendimiento detallado de la respuesta de las poblaciones silvestres de *Gossypium hirsutum* al estrés salino, puede proveer la base para mejorar la tolerancia general a la salinidad en esta especie. La selección *in vitro* incorporada con genómica molecular y funcional puede proveer una nueva oportunidad para realizar selección efectiva de genotipos con caracteres deseables, como una mayor tolerancia a estrés.

Justificación metodológica

Jardín común

Los jardines comunes se usan para examinar los niveles de diferenciación genotípica entre poblaciones, y estimaciones de heredabilidad y efectos genéticos se pueden generar. Se puede concluir que la variación geográfica refleja adaptación local sólo cuando se establece una base genética para la variación y la respuesta fenotípica plástica a diferencias ambientales se puede descartar (Ballentine & Greenber, 2010). Por lo tanto, para probar si la variación fenotípica observada en respuesta al tratamiento de salinidad en las poblaciones de *G. hirsutum* es una respuesta adaptativa o plástica a la selección, los individuos de diferentes ambientes fueron crecidos en un “jardín común”. Si se mantiene divergencia fenotípica en las poblaciones experimentales, es posible concluir que las diferencias se deben a la divergencia genética subyacente.

Cultivo *in vitro*

La técnica de cultivo de tejidos ha emergido en años recientes como una alternativa accesible y de bajo costo para el desarrollo de plantas tolerantes a estrés. Esta técnica puede operar bajo condiciones controladas y de espacio y tiempo limitados, y tiene el potencial de seleccionar variedades tolerantes a estrés usando instalaciones de laboratorio de bajo costo (Pérez-Clemente & Gómez-Cadenas, 2012).

La tecnología de micropropagación posee un vasto potencial para producir plantas de calidad superior, aislar variedades útiles de genotipos con un buen rendimiento y

mayor resistencia a enfermedades y tolerancia a agentes estresantes. La selección *in vitro* puede disminuir considerablemente el tiempo para la selección de caracteres deseables bajo la presión selectiva con interacción ambiental mínima, y puede complementar la selección en campo. Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofrece la selección *in vitro*, algunas limitaciones se deben tener presentes, como la pérdida de capacidad de regeneración, falta de correlación entre los mecanismos de tolerancia operando en las células, tejidos u órganos en cultivo y los de la planta completa, y fenómenos de adaptación epigenética (Gorham *et al.*, 2010; Rai *et al.*, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, la reducción en crecimiento es un fenómeno común de las plantas estresadas con sal, y esto también se ha observado en células, tejidos y órganos en cultivo en medio suplementado con NaCl. Por otro lado, en cultivo *in vitro* es posible medir la tasa fotosintética (usualmente menores en plantas expuestas a salinidad), que depende de características fisiológicas como el contenido de clorofila, la actividad de la Rubisco y de la eficiencia del fotosistema. El daño en hojas es otro parámetro para evaluar la tolerancia a salinidad, y puede medirse como daño a membrana, pérdida prematura de clorofila o daño al aparato fotosintetizador.

Los mecanismos de tolerancia a estrés salino han sido evaluados en cultivo *in vitro*. Entre ellos se encuentra el sistema de defensa antioxidante, estimando la concentración de enzimas antioxidantes, principalmente superóxidodismutasa (SOD), ascorbatoperoxidasa (APX), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR). Sin embargo, la mayoría de los estudios en relación a selección *in vitro* se han basado en homeostasis iónica y solutos compatibles (Rai *et al.*, 2011).

Cultivares tolerantes de *G. hirsutum* a estrés salino han sido seleccionados mediante cultivo *in vitro*. Gossett y colaboradores (1994, 1996) indujeron el desarrollo de callo de algodón, aplicaron estrés salino y examinaron la concentración de enzimas antioxidantes. Sus resultados indican que las diferencias entre las variedades de algodón

en tolerancia a salinidad observadas en estudios de toda la planta, también son aparentes a nivel celular.

Objetivo General

Caracterizar la variación fenotípica y genotípica intra- e inter-poblacional relacionada con tolerancia a estrés salino en metapoblaciones silvestres de *Gossypium hirsutum* en México.

Objetivos Particulares

- Establecer un “jardín común” con individuos provenientes de las ocho metapoblaciones silvestres de *G. hirsutum*.
- Realizar cultivo *in vitro* de los individuos del “jardín común” para así generar clones de cada individuo.
 - Exponer a los brotes generados en el cultivo *in vitro* a estrés salino, y clasificar a los individuos en susceptibles, tolerantes y sobresalientes en función de su crecimiento en medio con estrés.
 - Seleccionar genes candidatos relacionados con tolerancia a estrés salino, analizar su secuencia y correlacionar la posible presencia de sitios variables (SNPs) con el fenotipo observado bajo el tratamiento de salinidad.

Hipótesis

Considerando la historia evolutiva del género *Gossypium* (migraciones transoceánicas han sido inferidas) y el ambiente actual ocupado por las poblaciones silvestres de algodón (dunas costeras y selvas bajas), aunado al hecho de que México es centro de origen y diversidad de *G. hirsutum*, es posible suponer que existe una gran variación genética y funcional en relación a tolerancia a estrés salino en las poblaciones silvestres mexicanas.

Al someter a los explantes de *G. hirsutum* en cultivo *in vitro* a estrés salino, se encontrarán individuos tolerantes y susceptibles a dicho estrés distribuidos a lo largo de las poblaciones silvestres.

Se observará una mayor diversidad genética en relación a tolerancia a estrés salino en las poblaciones silvestres, que en los cultivares de algodón.

Será posible asociar la frecuencia de ciertos alelos con la tolerancia o susceptibilidad a estrés salino en algodón, y así inferir patrones de adaptación molecular.

Método

Establecimiento de jardín común

Con el fin de establecer un jardín común con un mínimo de 20 individuos de cada metapoblación silvestre de *Gossypium hirsutum*, se escogieron 25 frutos provenientes de individuos distintos por metapoblación. Los frutos seleccionados debían mantenerse completos, a fin de garantizar que las semillas procedieran de un único fruto. Del total de semillas del fruto completo, tres fueron escogidas para germinar. Por otro lado, el jardín común también debía contar con individuos cultivados, por lo que semillas de dos accesiones cultivadas también fueron seleccionadas para germinar.

Debido a que en pruebas previas de germinación una gran cantidad de semillas se contaminaban con hongos, se diseñaron y llevaron a cabo varios protocolos de desinfección de las mismas. El protocolo de desinfección que disminuyó mayormente la contaminación, y que por tanto se utilizó, se describe a continuación:

- 1) Las semillas se hidrataron en agua estéril (aprox. 3 min).
- 2) Semillas fueron sumergidas en *Captan*® 5 min en agitación constante.
- 3) Se realizaron tres enjuagues con agua estéril de un minuto cada uno.
- 4) Semillas fueron sumergidas en solución de hipoclorito de sodio comercial al 70% durante 15 min en agitación constante.

5) Las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua estéril durante un minuto.

Una vez que las semillas se desinfectaron, se pusieron a germinar en cajas Petri sobre sustrato de fieltro y se regaron con aproximadamente 9 mL de agua estéril (hasta que el sustrato estuvo completamente humedecido). Las cajas se sellaron y colocaron en habitación con temperatura mín. de 23° C y máx. 30° C.

Las semillas que presentaron radícula se consideraron germinadas y fueron transplantadas a almácigos de 4 cm de diámetro por 7.5 cm de altura, con una mezcla de sustrato formada por agrolita, vermiculita y peat-moss (1:1:1). Aquellas plántulas que sobrevivieron hasta tener mínimo tres entrenudos (aproximadamente tres meses de edad), se transplantaron a un almácigo de 12 cm de diámetro por 20 cm de altura.

El jardín común se mantienen a un rango de temperatura de 20°C a 30°C y las plantas se riegan cada tercer día con agua suficiente para mantener el sustrato húmedo. Aunque algunas de las plantas ya han desarrollado las primeras estructuras reproductivas, aún no ha sido posible obtener progenie de las mismas.

Micropropagación de *G. hirsutum*

Los individuos del jardín común que sobrevivieron hasta desarrollar por lo menos 7 entrenudos, fueron micropropagados mediante cultivo de nodos en el periodo julio-septiembre de 2012. El ápice y segmentos nodales fueron cortados de los tallos terminales y cultivados en tubos de vidrio con 6 mL de medio MS.

El protocolo de establecimiento *in vitro* consiste en contar cinco nudos desde el ápice y realizar un corte en el tallo, después se corta cada una de las hojas, dejando únicamente el peciolo. El tallo con los cinco nudos se somete al siguiente protocolo de desinfección:

- 1.- Realizar tres enjuagues con agua y jabón.
- 2.- Sumergir el tallo en alcohol etílico al 70% durante 30 seg e inmediatamente después escurrir el mismo.
- 3.- Sumergir el tallo en solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 15 min, y una vez transcurrido este tiempo retirar la solución dentro de la campana de flujo laminar, en donde se realizan tres enjuagues con agua estéril de un minuto cada uno.

El resto del protocolo se realiza en campana de flujo laminar y bajo condiciones de asepsia. Una vez que el tallo ha sido desinfectado, se corta cada nudo y el ápice, dejando únicamente 2 mm de tallo por arriba y por abajo del mismo, y 2 mm de peciolo. El ápice y los cuatro nudos se colocan en medio de cultivo MS (revisar Anexo I), de tal forma que de cada individuo del jardín común se tienen cinco tubos con su respectivo explante. Los tubos se mantienen en ciclos de luz/obscuridad de 12 horas cada uno, a temperatura constante de 28°C.

Aproximadamente 40 días después de que los explantes son colocados en medio nutritivo, se evalúa la respuesta de los individuos a la técnica de cultivo *in vitro* utilizada. Se consideró que aquellos individuos de los cuales uno o más explantes desarrollaron nuevos brotes en cultivo *in vitro* respondieron exitosamente a la técnica de propagación, mientras que los individuos de los que no se obtuvo brotes nuevos, que únicamente desarrollaron callo o que se oxidaron, fueron considerados como micropropagación fallida. Los brotes de aquellos individuos con respuesta exitosa al establecimiento son subcultivados por el mismo método. Los nuevos brotes axilares así generados, se utilizan en la evaluación de respuesta a estrés salino.

Análisis estadísticos de micropropagación

Se aplicó una prueba de χ^2 para determinar si la frecuencia de individuos con micropropagación exitosa y fallida fue similar para las ocho metapoblaciones de *G. hirsutum*. Para calcular los valores esperados se realizó una tabla de contingencia de las dos posibles respuestas al cultivo *in vitro* (exitosa o negativa) de las poblaciones silvestres. Además se hizo una prueba de residuos estandarizados para determinar en qué casillas hubo diferencias significativas entre valores esperados y observados.

Evaluación *in vitro* del crecimiento de *G. hirsutum* en condiciones de estrés salino

Los brotes generados a partir de los explantes originalmente micropropagados, se usaron para evaluar la respuesta fenotípica al imponerse estrés salino. La concentración de NaCl usada fue de 140 mM (revisar anexo II) lo cual equivale aproximadamente a 24 dS/m.

El protocolo consistió en sacar los explantes originalmente micropropagados de cada tubo y cortar los brotes axilares en nodos individuales, de tal forma que el total de nodos se dividió en dos grupos iguales, uno fue el control (medio MS), y el otro se sometió a tratamiento de estrés salino (medio MS-NaCl).

Los brotes control y tratamiento permanecieron 35 días en el respectivo medio de cultivo, y transcurrido este tiempo (Tf) su crecimiento fue evaluado en función del peso húmedo y número de nuevos brotes.

Análisis estadísticos de tolerancia a estrés salino *in vitro*

Análisis por individuo. Se calculó la media y desviación estándar del peso húmedo y el número de brotes de los explantes en medio MS y MS-NaCl de cada individuo; y se llevaron a cabo ANDeVA con el fin de determinar si su crecimiento (en función de peso húmedo y número de brotes) fue el mismo o no en los dos tipos de medio. Previamente, debido a que el número de brotes es una variable discreta, los datos se transformaron con

la fórmula $x' = \sqrt{x + 0.5}$; se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilki para el set de datos de masa y número de brotes y en caso de que no hubiera normalidad, los mismos fueron transformados por Box-Cox (Zar, 2010). Cuando el peso húmedo y el número de brotes de los explantes de cada individuo en medio con y sin estrés salino no resultaron significativamente diferentes, se clasificó al individuo como tolerante; cuando la diferencia entre ambos grupos resultó significativa, el individuo se clasificó como susceptible si el peso húmedo y/o número de brotes fue menor en medio con estrés salino, y como sobresaliente, si el peso húmedo y/o número de brotes resultó mayor en medio con estrés salino.

Análisis intrapoblacional. Con el fin de determinar si a lo largo de la población hubo individuos con un peso húmedo o número de brotes significativamente mayor o menor en medio con estrés salino, sin tomar en cuenta su crecimiento en medio sin agente estresante, se llevó a cabo un ANdeVA de una vía, y en caso de haber diferencia significativa en las medias, se realizó la prueba *post-hoc* de Tukey para localizar aquellos individuos con un crecimiento diferencial. Los datos de la variable número de brotes, fueron transformados con la fórmula $x' = \sqrt{x + 0.5}$. Antes de realizar el ANdeVA, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilki, y en caso de que no hubiera normalidad, los mismos fueron transformados por Box-Cox (Zar, 2010).

Análisis interpoblacional. Para conocer si alguna población tuvo un mayor crecimiento en medio con estrés salino, se compararon las medias del peso húmedo y número de brotes de todos los individuos de las ocho metapoblaciones con un ANdeVA de una vía. En el caso de que se encontraran diferencias significativas, la prueba *post-hoc* de Tukey fue realizada para identificar a las poblaciones con dicha diferencia.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software STATISTICA v. 10.

Selección de genes candidatos

Con base en los antecedentes planteados en la primera parte de este proyecto, seis genes candidatos fueron escogidos para ser analizados en las ocho poblaciones de *G. hirsutum*. Mediante diversas técnicas de biología molecular los genes candidatos han sido aislados, caracterizados y se ha demostrado que su expresión confiere tolerancia a estrés salino en cultivares de *G. hirsutum*; por lo tanto, se seleccionó a dichos genes para ser secuenciados en individuos de las metapoblaciones silvestres.

<u>Gen candidato</u>	<u>Características generales</u>	<u>Número de accesión GenBank</u>
GhNHX1	Antitransportador de Na ⁺ /H ⁺ de plantas de tipo vacuolar (Wu <i>et al.</i> , 2004).	AF515632
GhDREB	Factor de transcripción perteneciente a la familia AP2/ERF. Su sobreexpresión en trigo transformado confiere tolerancia a estrés salino y bajas temperaturas (Gao <i>et al.</i> , 2008).	AF509502
GhDBP2	Factor de transcripción perteneciente a la familia AP2/ERF. Los transcritos de <i>GhDBP2</i> son fuertemente inducidos en tratamientos de sequía, NaCl, baja temperatura y ABA en cotiledones de algodón; GhDBP2 está involucrado en la regulación de algunos genes tipo LEA (Huang <i>et al.</i> , 2008).	AY619718
GhNAC4	Factor de transcripción perteneciente a la familia NAC, cuya expresión está relacionada con tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico (sequía, salinidad, frío y ABA) (Meng <i>et al.</i> , 2009).	EU706347
GhNAC6	Factor de transcripción perteneciente a la familia NAC, cuya expresión está relacionada con tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico (sequía, salinidad, frío y ABA) (Meng <i>et al.</i> , 2009).	EU706349

GhZFP1	Proteína dedo de zinc que se agrupa en una subfamilia de proteínas dedos de zinc de respuesta a estrés (SRZFP). El mRNA de <i>GhZFP1</i> se induce bajo tratamiento de NaCl, polietilén glicol (PEG) y ácido salicílico (SA) exógeno (Guo <i>et al.</i> , 2009). Se ha demostrado que la sobreexpresión de <i>GhZFP1</i> en plantas mejora la tolerancia a sal mediante la generación de plantas de tabaco transgénicas que expresan dicho gen.	AY887895
---------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------

Extracción de DNA, amplificación y secuenciación de genes candidatos

La extracción de DNA se realizó con el buffer CTAB a partir de hojas jóvenes de las plantas del jardín común (Anexo III). Para cuantificar el DNA se usa el espectrofotómetro *NanoDrop 2000*; dicho instrumento, además permite conocer de manera aproximada la pureza de la muestra.

Los cebadores usados para amplificar a los genes candidatos seleccionados se muestran en la Tabla 1. Usando la DNA polimerasa *GoTaq® Flexi de Promega*, se amplificaron exitosamente tres de los seis genes candidatos: *GhZFP1*, *GhDREB* y *GhNAC4*. El programa de PCR usado es el siguiente: 5' – 94° C, seguido de 30 ciclos de 5' – 94° C, 1' – 56° C y 1' – 72° C. Siguen 10' – 72° C de extensión final, y por último la temperatura baja a 4°C.

Para confirmar el éxito de la amplificación se realizó electroforesis de los productos de PCR con un indicador del peso molecular (*NucleicAcidMarkers, 100 pb DNA Ladder, Invitrogen*) en geles de agarosa al 1.2% con buffer TBE 1X durante 1 hora a 100 V. Posteriormente el producto de PCR se visualizó con luz ultravioleta y se fotografió.

Tabla 1. Genes candidatos y oligonucleótidos

<u>Gen candidato</u>	<u>Oligonucleótido</u>
<i>GhNHX1</i>	F 5'- ATGGTGGCTCCGCAGTTAGCT- 3' R 5'-ACCTCATTGCCATTGAGGCAG- 3'
<i>GhDREB</i>	F 5' - ATGGAGCTAGGTGATTGTTGTTTAAAC- 3' R 5'- ATCTTCATCAGAACTGTCAGGGTAC- 3'
<i>GhDBP2</i>	F 5'- ACCTCTTTTAATCCGTTCTGG- 3' R 5'- GAAGAAAACACGATACCAGAG- 3'
<i>GhNAC4</i>	F 5'-TAGAATCATGGGAGTGCC- 3' R 5'- GTTCAACACATTTCGAGTTTT- 3'
<i>GhNAC6</i>	F 5'- GATCGAGTTTTCCCATG- 3' R 5'- TCAAGTTTCAGTAGTTCCA- 3'
<i>GhZFP1</i>	F 5'- ATTTCCGTATGTACGAGTTCAA- 3' R 5'- ACAACAAGTACCGTCCTTGCAT- 3'

Los tres genes amplificados exitosamente en las poblaciones silvestres, *GhZFP1*, *GhDREB* y *GhNAC4*, se amplificaron en cuatro individuos de cada metapoblación silvestre de *Gossypium hirsutum* y se enviaron a secuenciar por el método de Sanger al *High Throughput Genomics Center*.

Los cromatogramas de las secuencias se revisaron usando el software Finch TV. Las secuencias fueron alineadas en MUSCLE (Edgar, 2004); en BioEdit (Hall, 1999) estos alineamientos se revisaron manualmente y las secuencias 3'-5' y reverso complementaria de 5'-3' fueron consensuadas.

Se realizó un BLAST de las secuencias putativas generadas en este trabajo con la base de datos de NCBI, para así asegurarnos que los genes amplificados fueran los esperados; y en caso de que nuestras secuencias correspondieran a los genes esperados, las secuencias del NCBI fueron incluidas en nuestros análisis.

Métodos estadísticos.

Diversidad genética y pruebas de neutralidad

Los estimados de diversidad de los genes candidatos en los individuos silvestres, como número de sitios segregantes (S), número de haplotipos ($NHap$) y diversidad de haplotipos (Hd) así como diversidad nucleotídica (π y θ) se calcularon usando DnaSP v. 5 (Librado & Rozas, 2009). Las pruebas de neutralidad D_T de Tajima y la prueba de Fu y Li, y el análisis de sitios con sustituciones sinónimas y no sinónimas también fueron calculados en DnaSP v. 5.

La diversidad haplotípica (Hd) se calcula como el cociente de las frecuencias de las variantes haplotípicas entre el número de muestra (Nei, 1987):

$$H_d = \frac{n(1 - \sum p_i^2)}{(n - 1)}$$

donde n es el número de individuos muestreados y p_i es la frecuencia del n -ésimo haplotipo.

La diversidad nucleotídica (π) es el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias (Nei, 1987). Se calcula como:

$$\pi = \frac{n}{n - 1} \sum p_i p_j \pi_{ij}$$

Y se define como el número de diferencias por sitio nucleotídico (π_{ij}) entre dos secuencias tomadas al azar ($p_i p_j$).

El parámetro theta, $\theta = 4N\mu$, determina el nivel de variación bajo el modelo neutral de evolución, y asumiendo neutralidad, θ se puede estimar usando la homocigosis esperada a partir de la siguiente ecuación:

$$G = \frac{1}{1 + 4N\mu}$$

Si los datos son secuencias de DNA, es posible usar la teoría de coalescencia e información adicional de la secuencia para obtener un mejor estimado de θ . Cada mutación en un coalescente resulta en un sitio segregante en la muestra. El número de sitios segregantes en una muestra de n alelos, S_n , contiene suficiente información para estimar θ (Gillespie, 2004). La θ de Watterson es un estimado a partir del número de sitios segregantes (S_k) en un grupo de secuencias. Este estadístico depende del tamaño de muestra, por lo que es corregido al ponderarlo por el número de nucleótidos (m_T) y el número de secuencias de la muestra (a_k) (Watterson 1975; Nei, 1987). Puede ser calculada como:

$$\theta = \frac{S_k}{m_T a_k}$$

Donde $a_k = 1 + \frac{1}{2} + \frac{1}{3} + \dots + \frac{1}{k-1}$ es el factor de corrección.

A partir de estas expresiones, se deduce que π se ve mayormente afectada por alelos que poseen mayor frecuencia y es independiente del tamaño de la muestra, mientras que θ se ve afectada por el tamaño de la muestra y por los alelos poco frecuentes (Castillo, 2007). Ya que tanto π como θ son estimadores de $4N\mu$, ambos deben tener un valor similar para una muestra de un locus neutral; el estadístico D_T de Tajima (Tajima, 1983, 1989) es una medida de su diferencia.

$$D_T = \frac{\pi - \theta}{C}$$

En donde C es una constante normalizadora, escogida de tal forma que los valores de D_T menores a -2 o mayores a 2 permiten el rechazo de la hipótesis nula de que el locus es

neutral. Si D_T es negativa, se infiere la presencia de mutaciones deletéreas y selección purificadora; si D_T es positiva, se infiere que algunos alelos se encuentran bajo selección positiva incrementando su frecuencia (Castillo, 2007).

Otra prueba de neutralidad ampliamente utilizada es la de Fu y Li (Fu & Li, 1993), la cual extiende la D_T de Tajima considerando otras especies de tal manera que polariza los cambios (alelos ancestrales versus derivados; Hurst, 2009). El método de Fu y Li supone que las mutaciones antiguas tendrán que encontrarse con mayor probabilidad en las ramas más antiguas de la genealogía, mientras que las mutaciones más recientes, se encontrarán en las ramas más nuevas. Las ramas internas corresponden a la parte más antigua de la genealogía, y las ramas más externas a la parte más reciente. Al comparar el número de mutaciones en ramas internas y externas con los valores esperados de acuerdo al modelo neutral se tiene la siguiente prueba estadística (Fu & Li, 1993):

$$G = \frac{n_e n_i / a - 1}{\sqrt{V(n_e n_i) / (a - 1)}}$$

Donde n_e = al número de mutaciones en ramas externas; y n_i = al número de mutaciones en ramas internas. Si existe selección purificadora se observará un exceso de las mutaciones en las ramas más externas; si existe algún tipo de selección positiva se verá una disminución de las mutaciones en las ramas externas (Castillo, 2007).

Es muy importante tener en cuenta que con estas pruebas, la inferencia de selección o el rechazo de neutralidad tiende a ser sensible a supuestos en relación a la demografía, y una extensa simulación de las posibles alternativas demográficas es necesaria para garantizar algún grado de confianza en estos resultados (Hurst, 2009).

Divergencia entre poblaciones. Se calculó el número promedio de diferencias nucleotídicas entre poblaciones. La divergencia entre poblaciones se estimó calculando

el estadístico de divergencia nucleotídica absoluta D_{xy} , definido como el número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones (Nei, 1987), y el estadístico de divergencia relativa D_a , definido como el número neto de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones (Nei, 1987).

Sustituciones sinónimas y no sinónimas. Las regiones codificantes y no codificantes de proteínas, así como la posición de cada nucleótido en el codón en relación al marco de lectura, fueron asignadas a las secuencias de los genes *GhDREB* y *GhNAC4* con base en la información de las secuencias depositadas en Genbank (esto no pudo realizarse para *GhZFP1* debido a que nuestras secuencias no se alinearon con la secuencia de este gen depositada en dicha base de datos). Una vez asignadas las regiones codificantes, las sustituciones sinónimas y no sinónimas fueron calculadas con base en el código genético nuclear universal.

Considerando a todos los individuos silvestres como un solo grupo, se estimó el número total de sitios sinónimos y no sinónimos y el número de sustituciones sinónimas y no sinónimas. Los sitios sinónimos son los sitios en un codón en los que un cambio nucleotídico resulta en una sustitución sinónima. A continuación se estimó la diversidad nucleotídica dentro de las metapoblaciones silvestres para sitios sinónimos y no sinónimos ($P_i(S)$ y $P_i(NS)$) con la corrección de Jukes-Cantor, así como la proporción $P_i(S) / P_i(NS)$; Nei & Gojobori, 1986). Si una proteína evoluciona neutralmente, entonces una mutación que cambia un amino ácido, debe tener la misma probabilidad de fijarse que una mutación sinónima. Es posible comparar el número de cambios no sinónimos por sitio no sinónimo ($P_i(NS)$) con el número correspondiente de cambios sinónimos por sitio sinónimo ($P_i(S)$; Nei & Gojobori, 1986). De tal forma que la proporción $P_i(NS) / P_i(S)$ es un diagnóstico de cómo evolucionan los genes. Si la proporción es uno, no se puede

inferir la acción de la selección; si es mayor a uno, se puede inferir selección positiva; y si $P_i(NS) / P_i(S) \ll 1$, es indicio de selección purificadora.

Reconstrucción de haplotipos

Los haplotipos fueron reconstruidos usando DnaSP v.5 (Librado y Rozas, 2009) mediante los algoritmos provistos por PHASE (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly 2003). PHASE usa un método bayesiano basado en coalescencia para inferir haplotipos e introduce un modelo que permite recombinación y decaimiento de desequilibrio de ligamiento con distancia, lo cual resulta en estimaciones más precisas de haplotipos.

Redes de haplotipos

Con los haplotipos inferidos, se generaron redes usando el programa TCS v.1.21 (Clement *et al.*, 2000). A diferencia de los métodos filogenéticos, los métodos de redes permiten tomar en cuenta procesos que ocurren a nivel de especie y pueden incorporar predicciones de la teoría de genética de poblaciones para estimar relaciones intraespecíficas. TCS es un programa en Java para estimar redes por parsimonia estadística. El algoritmo de parsimonia estadística comienza por estimar el número máximo de diferencias entre los haplotipos como resultado de substituciones únicas con una confianza estadística del 95%; este número es el límite de conexión parsimonioso. Después de esto, los haplotipos que difieren por un único cambio se conectan, luego los que difieren por dos, por tres, y así sucesivamente, hasta que todos los haplotipos se incluyen en una sola red o se alcance el límite de conexión parsimonioso (Posada & Crandall, 2001).

Resultados

Establecimiento de jardín común y micropropagación de *G. hirsutum* silvestre

La tasa de germinación es significativamente distinta en las ocho metapoblaciones de *G. hirsutum* ($\chi^2 = 29.4$, g.l. = 7, $p = 0.000$); y en la mayoría es relativamente baja (Gráfica 1.1). Por otro lado, una gran cantidad de las plántulas con radícula, murieron antes de que la primera hoja verdadera surgiera, lo cual ocurre aproximadamente cuatro semanas después de que la radícula emerge (Gráfica 1.2). Debido a la baja tasa de germinación y a la elevada mortalidad de las plántulas menores a cuatro semanas, el proceso de selección y germinación de semillas se repitió para todas las poblaciones (excepto Baja California Sur) con el fin de obtener mínimo 20 plántulas por metapoblación.

La sobrevivencia de las plántulas hasta tener la primer hoja y posteriormente hasta tener siete entrenudos no es significativamente distinta para las diferentes metapoblaciones ($\chi^2 = .0687$, g.l. = 7, $p = 1.000$; Gráfica 1.2). Las plantas que crecieron hasta tener por lo menos siete entrenudos (10 meses aproximadamente) fueron sometidas al protocolo de micropropagación.

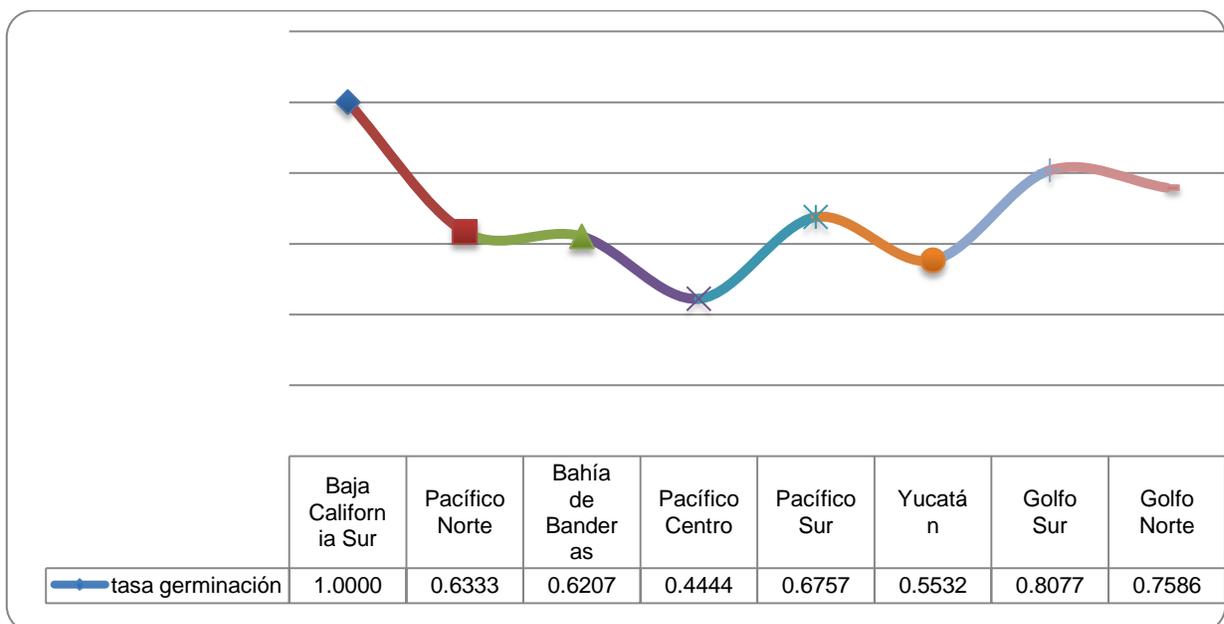
En cuanto a las semillas provenientes de las dos accesiones cultivadas, muchas germinaron, pero una gran cantidad de plántulas murió antes de desarrollar la primera hoja verdadera o antes de tener suficientes entrenudos para micropropagarse. A pesar de que en repetidas ocasiones el proceso de germinación se repitió con estas semillas, ningún individuo sobrevivió hasta tener el mínimo de entrenudos requerido para micropropagación.

Aún cuando todos los individuos del jardín común fueron micropropagados en las mismas condiciones, no todos los individuos pudieron establecerse *in vitro*; es decir, que de algunos individuos no se generaron nuevos brotes en cultivo *in vitro* (Gráfica 1.3). El establecimiento *in vitro* con la técnica de micropropagación usada es significativamente

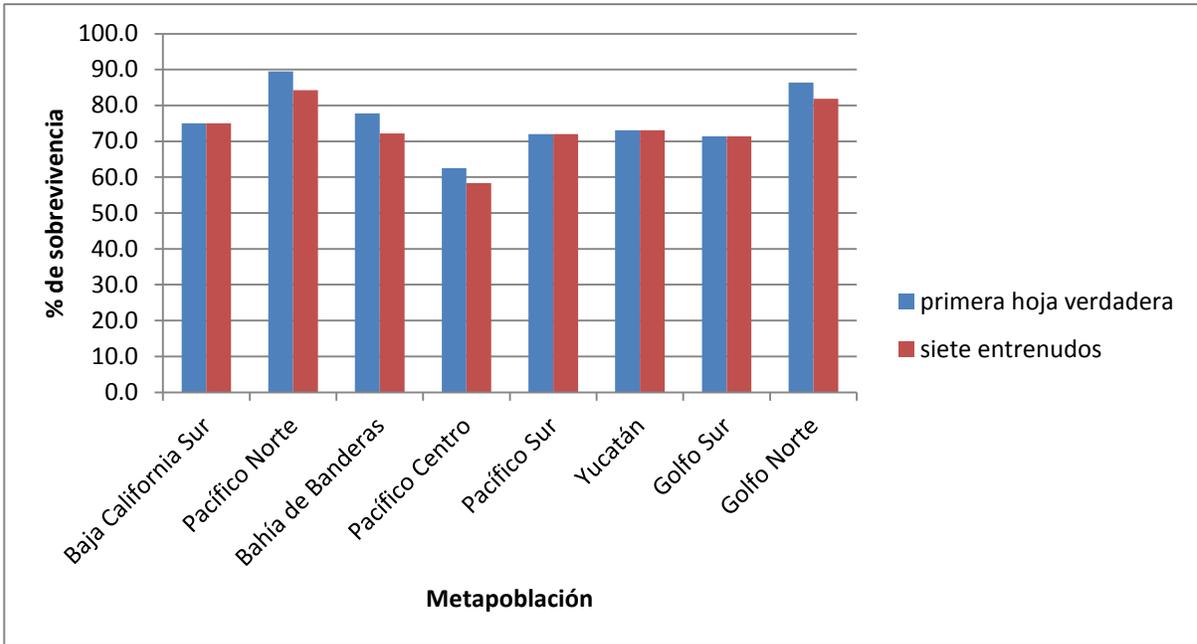
distinto entre las poblaciones silvestres ($\chi^2 = 33.2$, g.l. = 7, $p = 0.000$); es decir, la probabilidad de éxito del establecimiento *in vitro* de una planta depende de la población de la que ésta proviene (Tabla 1.1). Las plantas provenientes de Pacífico Norte tienen una menor respuesta a la micropropagación a través de proliferación de nudos axilares, mientras que las de BCS mostraron una mayor frecuencia de establecimiento exitoso que el resto de las poblaciones.

Debido a las diferencias poblacionales de respuesta a cultivo *in vitro*, no fue posible evaluar el mismo número de individuos y brotes por individuo para todas las poblaciones silvestres de algodón en condiciones de estrés salino.

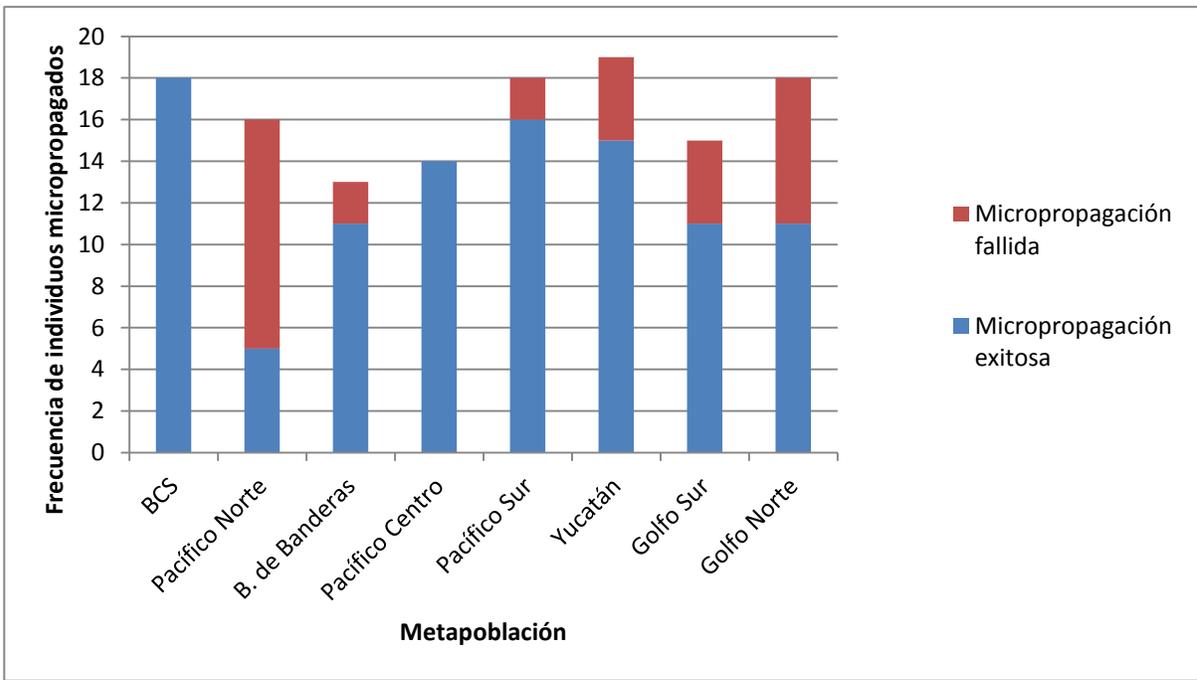
A pesar de que en el jardín común no había individuos cultivados para micropropagación, cinco plantas adultas de la especie *G. hirsutum* adquiridas en mercados del Distrito Federal, fueron micropropagadas en las mismas condiciones que las plantas silvestres del jardín común. Ninguna de estas plantas cultivadas se estableció en cultivo *in vitro*, por lo que la respuesta de algodón cultivado en medio con estrés salino no pudo ser evaluada.



Gráfica 1.1. Tasa de germinación de las ocho metapoblaciones de *G. hirsutum* silvestre



Gráfica 1.2. Porcentaje de sobrevivencia de las plantas de *G. hirsutum* en jardín común hasta desarrollar la primera hoja verdadera y hasta tener siete entrenudos.



Gráfica 1.3. Establecimiento *in vitro* de *Gossypium hirsutum* silvestre.

Tabla 1.1. Frecuencias observadas y esperadas de respuesta al establecimiento *in vitro* de las metapoblaciones de *G. hirsutum*. Se muestran también los valores de los residuos estandarizados. El asterisco denota los valores de los residuos estandarizados significativos.

Población	Establecimiento in vitro	
	Exitoso	Fallido
Baja California Sur	18 (13.9) 1.0997	0 (4.12)* -2.0298
Pacífico Norte	5 (12.3) * -2.0815	11 (3.66)* 3.8367
Bahía de Banderas	11 (10) 0.3162	2 (2.98) -0.5677
Pacífico Centro	14 (10.8) 0.9737	0 (3.21) -1.7916
Pacífico Sur	16 (13.9) 0.5633	2 (4.12) -1.0444
Yucatán	15 (14.6) 0.1047	4 (4.35) -0.1678
Golfo Sur	11 (11.6) -0.1762	4 (3.44) 0.3019
Golfo Norte	11 (13.9) -0.7778	7 (4.12) 1.4189

Crecimiento *in vitro* de *Gossypium hirsutum* bajo estrés salino

A continuación se presenta el análisis del crecimiento bajo estrés salino (140 mM de NaCl) de individuos de las ocho metapoblaciones silvestres de *G. hirsutum* en función del número de brotes y peso húmedo.

Baja California Sur

Análisis individual. Se evaluó el crecimiento bajo estrés salino de 18 individuos, de los cuales únicamente un individuo, GhB17, tiene un crecimiento significativamente menor en función de peso húmedo y número de brotes en medio con NaCl (Tabla 2.1).

Análisis poblacional. No se encuentra crecimiento diferencial en peso húmedo ni en número de brotes al comparar a todos los individuos en medio con estrés salino (Tabla 2.2).

Pacífico Norte

Análisis individual. Muy pocos individuos fueron exitosamente micropropagados, por lo que estadísticamente sólo se pudo analizar el crecimiento de un individuo en estrés salino en función del peso húmedo, y de dos individuos en función del número de brotes. Estos individuos no muestran crecimiento diferencial en función de peso húmedo ni número de brotes en medio con y sin estrés (Tabla 2.3).

Análisis poblacional. No hay individuos con peso húmedo ni número de brotes diferente a lo largo de la población en medio con estrés salino (Tabla 2.2).

Bahía de Banderas

Análisis individual. De los once individuos sometidos a estrés salino, uno no pudo ser estadísticamente evaluado (Tabla 2.4). No hay individuos con número de brotes significativamente distinto en medio control y medio con estrés salino; mientras que hay dos individuos, GhNm2 y GhBBb18, con un peso húmedo significativamente mayor en medio con estrés salino, y uno, GhN1, con menor peso en dicho medio.

Análisis poblacional. No se encuentran individuos con un peso húmedo o número de brotes significativamente diferente en medio con estrés salino a lo largo de la población (Tabla 2.2).

Pacífico Centro

Análisis individual. De los 14 individuos sometidos a estrés salino, el crecimiento en 13 de ellos pudo ser evaluado estadísticamente. El individuo GhJb119 tuvo un peso húmedo significativamente mayor en medio con estrés salino, pero un número significativamente menor de brotes en el mismo medio. GhJd116 tuvo un mayor peso húmedo en medio con

agente estresante. Por otro lado, el individuo km168-2 tuvo un número significativamente menor de brotes en medio con estrés salino (Tabla 2.5).

Análisis poblacional. A lo largo de la población, el peso húmedo es significativamente diferente, y el número de brotes es el mismo (Tabla 2.2). Con la prueba de Tukey se identifica que el individuo GhJb119 tiene un peso húmedo significativamente mayor que GhGuC63.

Pacífico Sur

Análisis individual. De los 19 individuos sometidos a estrés salino en cultivo *in vitro*, tres tuvieron únicamente un explante para cada tratamiento, por lo que no pudieron ser estadísticamente analizados; además, el individuo GhOA8 no tiene variación en el número de brotes en medio con y sin estrés, por lo que no puede ser analizado para esta variable. Tres individuos, GhOC1.1-c, GhOC15 y GhOA-1, no mostraron el mismo crecimiento en función del peso húmedo, siendo mayor la masa en medio con estrés salino en GhOC15, y menor para los otros dos individuos. Por otro lado GhOC3-3 y GhOC1.1-c mostraron un número significativamente menor de brotes (Tabla 2.6).

Análisis poblacional. Al comparar el crecimiento de todos los individuos en estrés salino en función del peso húmedo se encontró que éste es significativamente diferente a lo largo de la población; por otro lado, el número de brotes no es significativamente diferente (Tabla 2.2). Con la prueba post-hoc de Tukey se identificó que el peso húmedo del individuo GhOC1.1-c fue significativamente mayor que el de los individuos GhOC1.1-a, GhOC3-2 y GhOC3-3.

Yucatán

Análisis individual. Quince individuos conformaron el experimento de estrés salino; no hubo individuos con peso húmedo significativamente distinto; mientras que en función del número de brotes se observaron dos individuos, GhY5 y GhYF, con un crecimiento significativamente menor (Tabla 2.7).

Análisis poblacional. No hay individuos con peso húmedo ni número de brotes distinto a lo largo de la población (Tabla 2.2).

Golfo Sur

Análisis individual. De los once individuos sometidos a estrés salino, dos no pudieron evaluarse estadísticamente (Tabla 2.8). El individuo GhVer2-5-b mostró un peso húmedo significativamente mayor en medio con estrés salino.

Análisis poblacional. Al comparar el crecimiento de todos los individuos en estrés salino, se obtiene que el número de brotes no es el mismo a lo largo de la población. La prueba post-hoc de Tukey arroja que el individuo GhVer2-5b tiene un mayor número de brotes que GhVer2-4 y GhVer4-4 (Tabla 2.2).

Golfo Norte

Análisis individual. De los diez individuos inicialmente sometidos al tratamiento de estrés salino, sólo cuatro individuos se pudieron analizar estadísticamente para la variable número de brotes, y seis para peso húmedo; el número de explantes de cada uno fue muy pequeño (Tabla 2.9). GhTam4-1 mostró un menor peso húmedo en medio con NaCl que control; con base en el número de brotes, no hubo individuos con crecimiento diferencial.

Análisis poblacional. Al comparar el crecimiento de todos los individuos en medio con estrés salino, no se encuentra crecimiento diferencial en función de peso húmedo ni número de brotes (Tabla 2.2).

El número de individuos susceptibles, tolerantes y sobresalientes identificados en cada población en función de número de brotes y de peso húmedo se resumen en la Tabla 2.10. La distribución de frecuencias de individuos clasificados como susceptibles, tolerantes y sobresalientes es igual en todas las poblaciones en función del peso húmedo ($\chi^2 = 13.1$, g.l.= 14, $P = 0.518$) y el número de brotes ($\chi^2 = 8.68$, g.l. = 14, $P = 0.851$).

Tabla 2.1. Comparación de las medias del peso húmedo y número de brotes de explantes en medio MS y medio MS-NaCl de individuos de Baja California Sur. Se muestran los valores de *F* y *P* para ANdeVA de una vía, en negritas se señalan los valores significativos y el individuo correspondiente. Se indica el número de explantes analizados para cada individuo. Además se muestra la media y desviación estándar poblacional del peso húmedo y número de brotes.

Individuo	Peso Húmedo (g)								Número de Brotes					
	Control (MS)			Estrés salino			ANdeVA		Control (MS)		Estrés salino		ANdeVA	
	N	Media	D.E.	N	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>	media	D.E.	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>
GhBSJ-2	5	0.05512	0.023549	5	0.08018	0.046562	1.15333	0.31418	2.20	0.837	3.60	3.209	0.27766	0.61254
GhB1	5	0.11490	0.043404	5	0.06834	0.055078	2.20421	0.17593	1.60	1.517	3.20	1.643	2.64627	0.14244
GhB9	5	0.09288	0.055711	5	0.09900	0.042369	0.03823	0.84986	2.00	1.000	3.40	2.074	1.62266	0.23848
GhBSJ-1	5	0.02736	0.018314	6	0.04635	0.020650	2.54812	0.14489	2.60	1.140	2.00	1.549	0.63999	0.44432
GhB18	3	0.07717	0.019156	4	0.06868	0.032415	0.15905	0.70650	6.67	2.309	3.00	1.826	4.95860	0.07647
GhB11	3	0.07703	0.071670	3	0.06983	0.054697	0.01913	0.89667	4.00	3.606	4.00	3.000	0.00138	0.97212
GhB14	5	0.10394	0.034833	5	0.07040	0.018083	3.65148	0.09241	3.00	1.581	4.00	1.414	1.16610	0.31168
GhB16	4	0.11130	0.017251	5	0.06118	0.048281	3.82450	0.09141	3.00	0.816	1.40	1.517	1.16610	0.31168
GhB17	5	0.28932	0.198925	5	0.05092	0.027130	14.27580	0.00540	5.80	2.387	2.00	1.581	7.78038	0.02358
GhB2	5	0.17334	0.265153	5	0.03750	0.024546	0.44668	0.52273	3.60	3.782	1.00	0.707	1.07909	0.32928
GhB3-1	5	0.07380	0.034518	5	0.08236	0.044413	0.11579	0.74241	3.20	1.304	3.00	1.581	0.05784	0.81599
GhB3-2	5	0.06948	0.029757	5	0.07236	0.030791	0.02262	0.88418	3.40	0.894	2.40	1.140	2.40239	0.15975
GhB7	5	0.08416	0.046681	5	0.06854	0.032358	0.37813	0.55569	3.60	2.191	2.40	2.408	0.96230	0.35534
GhBSJ-a	7	0.08779	0.040203	8	0.05899	0.026935	1.43554	0.25225	3.00	1.414	2.88	1.727	0.04392	0.83726
GhD5	5	0.05066	0.030193	5	0.05066	0.025797	0.00000	1.00000	3.20	0.837	2.40	0.548	2.89518	0.12726
GhBSL-1	5	0.07506	0.047733	5	0.04668	0.009926	0.47938	0.50830	3.20	1.304	2.40	0.548	1.07884	0.32933
GhBSL-α	5	0.08230	0.022359	5	0.05018	0.035362	2.94700	0.12437	3.40	1.517	2.20	2.683	1.26622	0.29310
GhBSL-γ	5	0.05844	0.013849	5	0.06238	0.036097	0.40509	0.54225	1.80	0.447	2.20	0.837	0.85587	0.38196
	87	0.09513	0.096658	91	0.06364	0.035109			3.1954	1.934	2.6044	1.7819		

Tabla 2.3. Comparación de las medias del peso húmedo y número de brotes de explantes en medio MS y MS-NaCl de individuos de Pacífico Norte. Se muestran los valores de *F* y *P* para ANdeVA de una vía, en negritas se señalan los valores significativos y el individuo correspondiente. Se indica el número de explantes analizados para cada individuo. Además se muestra la media poblacional y desviación estándar del peso húmedo y número de brotes

Individuo	Peso Húmedo (g)								Número de Brotes					
	Control (MS)			Estrés salino			ANdeVA		Control (MS)		Estrés salino		ANdeVA	
	N	media	D.E.	N	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>	media	D.E.	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>
GhSi1-15	1	0.0105	-	1	0.01490	-	-	-	2.00	-	1.00	-	-	-
GhSi1-16	1	0.0207	-	2	0.02295	0.012657	0.021067	0.908239	1.00	-	1.00	0.000	-	-
GhSi1-28	1	0.0429	-	1	0.01980	-	-	-	4.00	-	3.00	-	-	-
GhSi2-17	1	0.0119	-	1	0.02380	-	-	-	1.00	-	1.00	-	-	-
GhSi2-21	1	0.0327	-	2	0.03015	0.010819	0.03704	0.878962	4.00	-	1.00	1.414	1.66667	0.41957
	5	0.02374	0.013893	7	0.02353	0.008699			2.4	1.517	1.29	0.951		

Tabla 2.4. Comparación de las medias del peso húmedo y número de brotes de explantes en medio MS y MS-NaCl de individuos de Bahía de Banderas. Se muestran los valores de *F* y *P* para ANdeVA de una vía, en negritas se señalan los valores significativos y el individuo correspondiente. Se indica el número de explantes analizados para cada individuo. Además se muestra la media poblacional del peso húmedo y número de brotes.

Individuo	Peso Húmedo (g)								Número de Brotes					
	Control (MS)			Estrés salino			ANdeVA		Control (MS)		Estrés salino		ANdeVA	
	N	media	D.E.	N	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>	media	D.E.	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>
GhNaAC	4	0.02325	0.012214	4	0.02580	0.009102	0.11209	0.74917	1.50	0.577	1.75	0.500	0.42857	0.53696
GhNakm63	5	0.01666	0.008916	5	0.03354	0.03	1.29011	0.28891	0.80	0.837	1.20	2.168	0.10166	0.75802
GhN3	3	0.05920	0.023785	3	0.06950	0.089873	0.03682	0.85717	2.67	0.577	0.67	1.155	6.95357	0.05776
GhN1	2	0.04745	0.002333	3	0.01880	0.005369	46.82610	0.00639	4.50	0.707	2.67	0.577	9.36243	0.05500
GhNm2	5	0.02466	0.019675	5	0.08208	0.024411	16.77029	0.00346	1.40	1.517	1.40	0.548	0.19788	0.66823
GhNm14	3	0.03420	0.0164685	3	0.0189	0.0104997	1.83302	0.24721	4.33	2.082	1.33	0.577	6.58019	0.06230
GhBBb5	3	0.04353	0.031282	4	0.03913	0.016567	0.05991	0.81637	1.33	1.528	1.50	1.291	0.03675	0.85552
GhBBb16	1	0.02420	-	1	0.02240	-	-	-	1.00	-	3.00	-	-	-
GhBBb18	3	0.02040	0.003843	2	0.46600	0.596798	10.29492	0.04901	1.00	1.000	1.50	0.707	0.43057	0.55855
GhBBb14	2	0.06620	0.021779	2	0.04195	0.029062	0.89173	0.44469	3.00	0.000	1.50	0.707	6.89415	0.11958
GhBbB22	2	0.03545	0.024395	3	0.02633	0.012108	0.33681	0.60239	3.00	2.828	2.67	1.155	0.00248	0.96345
	33	0.0331515	0.0214301	35	0.0650514	0.1472281			2.0303	1.6486	1.6286	1.1653		

Tabla 2.5. Comparación de las medias del peso húmedo y número de brotes de explantes en medio MS y MS-NaCl de individuos de la población Pacífico Centro. Se muestran los valores de *F* y *P* para ANdeVA de una vía, en negritas se señalan los valores significativos y el individuo correspondiente. Se indica el número de explantes analizados para cada individuo. Además se muestra la media poblacional del peso húmedo y número de brotes.

Individuo	Peso Húmedo (g)								Número de Brotes					
	Control (MS)			Estrés salino			ANdeVA		Control (MS)		Estrés salino		ANdeVA	
	N	media	D.E.	N	Media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>	media	D.E.	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>
GhJb114	2	0.03870	0.017253	3	0.04223	0.016607	0.05292	0.83285	1.50	0.707	0.67	0.577	1.82899	0.26916
GhJb119	3	0.02500	0.001311	4	0.08303	0.083025	23.19741	0.00481	5.33	0.577	3.25	0.500	26.35589	0.00366
GhJd115	3	0.03623	0.022694	3	0.04123	0.007715	0.13054	0.73615	1.00	1.000	1.00	1.000	0.00000	1.00000
GhJd116	5	0.02346	0.008275	5	0.05522	0.033338	6.87858	0.03052	1.80	1.304	1.40	1.140	0.34148	0.57508
km 168	7	0.04713	0.017764	8	0.04175	0.018609	0.32521	0.57822	1.57	0.535	1.75	1.488	0.00412	0.94979
km 168-2	5	0.12264	0.121034	5	0.0497	0.025414	0.52436	0.48962	5.60	1.817	1.20	0.837	25.48176	0.00099
Las Peñas-1	4	0.10420	0.065547	3	0.08303	0.016267	0.28619	0.61560	2.75	2.630	1.00	0.000	0.40357	0.55318
Las Peñas-2	5	0.04618	0.033440	4	0.08213	0.058089	1.37701	0.27899	4.40	1.673	4.00	2.582	0.15873	0.70220
GhCO3	3	0.03843	0.037904	4	0.02810	0.022531	0.20818	0.66733	2.33	2.082	0.50	1.000	1.46240	0.28060
GhC.deOrtega	5	0.04496	0.030743	5	0.02794	0.024729	0.93045	0.36299	1.80	1.924	1.20	1.304	0.30916	0.59340
GhGuA80	3	0.02617	0.008001	4	0.02690	0.005694	0.02046	0.89185	1.33	1.528	1.75	0.957	0.38038	0.56440
GhJb128	1	0.00840	-	1	0.01210	-	-	-	1.00	-	1.00	-	-	-
GhGuC62	3	0.03587	0.020543	4	0.02054	0.013549	0.18031	0.68876	1.33	0.577	2.25	2.062	0.22086	0.65817
GhGuC63	2	0.01155	0.002051	2	0.01100	0.006788	0.01203	0.92267	2.50	0.707	1.50	2.121	0.53118	0.54190
	51	0.04955	0.052741	55	0.04608	0.030787			2.61	2.031	1.66	1.505		

Tabla 2.6. Comparación de las medias de peso húmedo y número de brotes de explantes en medio MS y medio MS-NaCl de individuos de Pacífico Sur. Se muestran los valores de *F* y *P* para ANdeVA de una vía, en negritas se señalan los valores significativos y el individuo correspondiente. Se indica el número de explantes analizados para cada individuo. Además se muestra la media poblacional del peso húmedo y número de brotes.

Individuo	Peso Húmedo (g)								Número de Brotes					
	Control (MS)			Estrés salino			ANdeVA		Control (MS)		Estrés salino		ANdeVA	
	N	media	D.E.	N	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>	media	D.E.	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>
GhOA1-c	5	0.07024	0.024251	5	0.05304	0.044814	0.5697	0.4720	1.40	0.548	1.00	1.225	0.9033	0.3697
GhOA8	2	0.02565	0.014779	1	0.01220	-	0.5522	0.5932	0.00	0.000	0.00	0.000	-	-
GhOA9	5	0.07374	0.015656	5	0.05884	0.021890	1.5326	0.2508	2.00	2.121	1.80	1.483	0.0000	0.9984
GhOB1-1	5	0.02868	0.015120	5	0.04278	0.024262	1.2163	0.3022	1.20	1.304	2.20	1.924	0.8154	0.3929
GhOB2-1	5	0.08234	0.030556	5	0.05108	0.031535	2.5340	0.1501	2.40	1.673	1.40	0.894	1.4833	0.2580
GhOB2-2	1	0.00910	-	1	0.00810	-	-	-	1.00	-	0.00	-	-	-
GhOC1.1-a	11	0.04605	0.039871	11	0.03795	0.027912	0.1286	0.7236	2.09	1.578	1.55	1.214	0.6027	0.4466
GhOC1.1-c	11	0.19595	0.097757	11	0.11465	0.058212	5.6165	0.0280	4.82	1.601	2.00	1.549	16.7296	0.0006
GhOC15	4	0.02045	0.016546	4	0.08200	0.045431	6.4822	0.0437	0.75	1.500	2.75	1.708	4.0765	0.0900
GhOC17	3	0.03980	0.026515	4	0.03730	0.026324	0.0154	0.9062	2.67	1.528	3.00	1.414	0.1169	0.7464
GhOC18	5	0.18126	0.192673	5	0.07398	0.043916	1.0594	0.3335	4.80	1.924	2.80	1.924	2.4284	0.1578
GhOC18-b	5	0.03540	0.018971	5	0.06068	0.052829	1.5301	0.2512	1.20	1.095	3.00	1.732	4.8889	0.0580
GhOC24	1	0.01140	-	1	0.04260	-	-	-	1.00	-	3.00	-	-	-
GhOB-14	5	0.06434	0.019624	5	0.06940	0.032126	0.0903	0.7714	0.60	0.548	2.60	1.817	6.7299	0.0319
GhOC3-2	5	0.01786	0.015638	5	0.01598	0.006747	0.0609	0.8113	1.40	1.517	1.20	0.837	0.0016	0.9688
GhOC3-3	3	0.02553	0.008248	5	0.01758	0.018612	0.4677	0.5196	3.00	1.000	0.40	0.894	12.3357	0.0126
GhOA-1	5	0.12570	0.030190	5	0.07076	0.028303	8.8131	0.0179	4.20	1.304	2.80	1.304	2.8657	0.1289
GhOA11.1	1	0.01810	-	1	0.02270	-	-	-	1.00	-	2.00	-	-	-
GhOC1-11	3	0.07487	0.049864	3	0.04523	0.032716	0.7407	0.4380	4.00	2.646	3.00	2.000	0.1861	0.6884
	85	0.07826	0.084299	87	0.0561057	0.044413			2.44	2.015	1.98	1.540		

Tabla 2.7. Comparación de las medias del peso húmedo y número de brotes de explantes en medio MS y MS-NaCl de individuos de la población Yucatán. Se muestran los valores de *F* y *P* para ANdeVA de una vía, en negritas se señalan los valores significativos y el individuo correspondiente. Se indica el número de explantes analizados para cada individuo. Además se muestra la media poblacional del peso húmedo y número de brotes.

Individuo	Peso Húmedo (g)								Número de Brotes					
	Control (MS)			Estrés salino			ANdeVA		Control (MS)		Estrés salino		ANdeVA	
	N	media	D.E.	N	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>	media	D.E.	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>
GhY10	4	0.03250	0.008752	5	0.05970	0.027247	5.19937	0.05662	2.25	1.500	2.00	2.345	0.18407	0.68079
GhY12.6	4	0.05968	0.044797	5	0.01630	0.020622	5.36533	0.05368	3.25	2.872	0.20	0.447	5.42019	0.05276
GhY13	5	0.06238	0.042533	5	0.03224	0.027949	1.75359	0.22201	3.20	1.643	1.20	1.789	3.96984	0.08146
GhY14	5	0.06006	0.055700	5	0.03118	0.017505	3.64882	0.09250	1.80	1.789	1.00	1.414	0.97447	0.35248
GhY15	4	0.07008	0.051964	5	0.03622	0.032003	1.52079	0.25730	3.25	1.500	3.20	1.4832	0.00250	0.96151
GhY7-b	6	0.03878	0.016608	7	0.05096	0.013684	2.10458	0.17477	2.33	1.633	2.43	1.718	0.00527	0.94344
GhY18	3	0.05517	0.068859	4	0.03303	0.009618	0.17766	0.69090	0.67	1.155	1.25	1.893	0.12244	0.74066
GhY16	3	0.03097	0.013280	3	0.06277	0.026385	3.47702	0.13566	3.33	2.517	2.00	2.646	0.54724	0.50051
GhY12	4	0.09213	0.039494	5	0.05970	0.010433	1.73426	0.22934	3.00	2.582	1.40	2.074	1.04750	0.34015
GhY351	2	0.08065	0.062296	2	0.03980	0.035072	0.65301	0.50388	2.00	0.000	0.50	0.707	5.65013	0.14060
GhY3	3	0.02807	0.032600	2	0.06700	0.061377	0.92606	0.40688	3.67	4.726	3.50	4.950	0.00329	0.95784
GhY5	2	0.05050	0.012587	2	0.07395	0.007849	4.99855	0.15488	5.50	0.707	3.00	0.000	31.85366	0.02999
GhY7	6	0.03835	0.020876	6	0.03952	0.014005	0.01292	0.91174	2.67	2.066	2.17	1.472	0.09073	0.76942
GhY11	5	0.06698	0.049423	5	0.04798	0.048458	0.37676	0.55639	2.00	2.345	2.40	2.881	0.01050	0.92091
GhYF	4	0.07700	0.059480	4	0.05143	0.029108	0.59663	0.46919	3.75	2.630	0.75	0.500	6.12204	0.04818
	60	0.055672	0.038975	65	0.04508	0.027363			2.80	2.1236	1.77	1.8957		

Tabla 2.8. Comparación de las medias del peso húmedo y número de brotes de explantes en medio MS y MS-NaCl de individuos de la población Golfo Sur. Se muestran los valores de *F* y *P* para ANdeVA de una vía, en negritas se señalan los valores significativos y el individuo correspondiente. Se indica el número de explantes analizados para cada individuo. Además se muestra la media poblacional del peso húmedo y número de brotes.

Individuo	Peso Húmedo (g)								Número de Brotes					
	Control (MS)			Estrés salino			ANdeVA		Control (MS)		Estrés salino		ANdeVA	
	N	media	D.E.	N	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>	media	D.E.	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>
GhVer2	1	0.03610	-	1	0.06240	-	-	-	3.00	-	1.00	-	-	-
GhVer2-2	4	0.03245	0.010029	4	0.03375	0.027179	0.00805	0.93141	2.00	1.414	1.50	0.577	0.12644	0.73432
GhVer2-4	5	0.04254	0.015827	5	0.04016	0.015819	0.05656	0.81799	3.00	2.000	1.00	1.414	3.70841	0.09031
GhVer4-3	3	0.02290	0.004518	3	0.02583	0.019373	0.06523	0.81101	0.33	0.577	0.67	1.155	0.00607	0.94165
GhVer4-4	3	0.03660	0.012676	3	0.03103	0.014040	0.25982	0.63708	1.00	0.000	0.33	0.577	4.00000	0.11612
GhVer4-6	2	0.02935	0.010112	2	0.02905	0.007849	0.00110	0.97657	1.00	1.414	1.00	1.414	0.00000	1.00000
GhVer2-5	4	0.02645	0.013094	3	0.03107	0.018356	0.15375	0.71114	1.25	0.957	2.00	0.000	2.04676	0.21193
GhVer3	1	0.03170	-	1	0.02620	-	-	-	2.00	-	3.00	-	-	-
GhVer2-7	5	0.08700	0.063417	6	0.06283	0.045690	0.54045	0.48096	1.80	2.049	2.00	1.095	0.20201	0.66373
GhVer5	2	0.03880	0.027719	3	0.02772	0.022058	0.19854	0.68610	1.00	1.414	2.33	1.528	1.13210	0.36538
GhVer2-5-b	5	0.05554	0.019140	5	0.12018	0.058931	5.44170	0.04796	2.80	1.304	4.80	2.387	1.97772	0.19727
	35	0.04410	0.031848	36	0.05031	0.042888			1.83	1.524	1.92	1.779		

Tabla 2.9. Comparación de las medias del peso húmedo y número de brotes de explantes en medio MS y MS-NaCl de individuos de la población Golfo Norte. Se muestran los valores de *F* y *P* para ANdeVA de una vía, en negritas se señalan los valores significativos y el individuo correspondiente. Se indica el número de explantes analizados para cada individuo. Además se muestra la media poblacional del peso húmedo y número de brotes.

Individuo	Peso Húmedo (g)								Número de Brotes					
	Control (MS)			Estrés salino			ANdeVA		Control (MS)		Estrés salino		ANdeVA	
	N	media	D.E.	N	Media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>	media	D.E.	media	D.E.	<i>F</i>	<i>P</i>
GhTam1-1-c	2	0.03965	0.013647	3	0.01877	0.015509	2.3527	0.2226	2.00	2.828	2.00	2.828	0.0055	0.9454
GhTam1-1	1	0.02670	-	1	0.04240	-	-	-	4.00	-	4.00	-	-	-
GhTam1-4	2	0.01880	0.007778	2	0.03185	0.004596	4.1728	0.1778	2.00	1.414	3.00	0.000	1.0000	0.4226
GhTam1-10	1	0.00730	-	1	0.01360	-	-	-	1.00	-	2.00	-	-	-
GhTam1-7	1	0.02050	-	1	0.05220	-	-	-	1.00	-	4.00	-	-	-
GhTam3-27	1	0.01600	-	1	0.01280	-	-	-	1.00	-	0.00	-	-	-
GhTam4-1	2	0.03295	0.000212	1	0.01750	-	330368.4	0.0011	2.00	0.000	1.00	-	-	-
GhTam4-2	1	0.01350	-	2	0.03190	0.018526	0.6576	0.5662	2.00	-	3.00	0.000	-	-
GhTam4-5	5	0.07900	0.026534	5	0.07294	0.072940	0.0981	0.7622	5.40	3.847	3.20	2.683	0.9558	0.3569
GhTam1-13	2	0.03655	0.029062	2	0.03405	0.008697	0.0136	0.9179	1.00	1.414	0.50	0.707	0.1231	0.7592
	18	0.04083	0.030125	19	0.03974	0.028677			1.68	0.691	1.61	0.595		

Tabla 2.2. Peso húmedo y número de brotes promedio por individuo en medio con estrés salino por población. Se comparan dichas medias, y se muestran los valores de *F* y *P* para ANdeVA de una vía, señalándose en negritas aquellos valores significativos. Se indica el número de explantes sujetos a estrés salino en cada población.

Población	N explantes	Peso húmedo (g)				Número de brotes			
		Media	D. E.	<i>F</i>	<i>P</i>	media	D. E.	<i>F</i>	<i>P</i>
Pacífico Sur	87	0.05611	0.044413	3.6872	0.0001	1.98	1.540	1.7535	0.0507
Pacífico Centro	55	0.04608	0.030787	2.6790	0.0081	1.66	1.505	1.5305	0.1477
Baja California Sur	91	0.06364	0.035109	0.9538	0.5173	2.6	1.782	1.1528	0.3244
Bahía de Banderas	35	0.065051	0.147228	1.8689	0.1016	1.63	1.165	1.1109	0.3938
Yucatán	65	0.04508	0.027363	1.8156	0.0623	1.77	1.896	0.9152	0.5489
Golfo Sur	36	0.05031	0.042888	1.2804	0.2933	1.83	1.524	2.5412	0.0285
Golfo Norte	19	0.03974	0.028677	2.1052	0.1413	1.61	0.595	0.7659	0.6512
Pacífico Norte	7	0.02353	0.008699	0.3188	0.8484	1.29	0.951	0.5195	0.7404

Tabla 2.10. Número de individuos clasificados como susceptibles, tolerantes y sobresalientes por población en función de su peso húmedo y número de brotes. Se muestra también el total de individuos en dichas categorías para todas las metapoblaciones.

Población	peso húmedo			número de brotes		
	Susceptibles	Tolerantes	sobresalientes	susceptibles	tolerantes	sobresalientes
Pacífico Sur	2	13	1	2	13	0
Pacífico Centro	0	11	2	2	11	0
BCS	1	17	0	1	17	0
B. de Banderas	1	7	2	0	10	0
Yucatán	0	15	0	2	13	0
Golfo Sur	0	8	1	0	9	0
Golfo Norte	1	5	0	0	4	0
Sinaloa	0	2	0	0	1	0
	5	78	6	7	78	0

Análisis interpoblacional

Al comparar la masa de los explantes en medio con estrés salino de todas las poblaciones, el ANDeVA indica que hay diferencias significativas en función de dicha variable ($F = 3.451$, $P = 0.00135$). La prueba post-hoc de Tukey indica que los explantes de BCS tuvieron una masa significativamente mayor que los de las poblaciones de Pacífico Centro y Yucatán. Al comparar el número de brotes de los explantes en medio con estrés salino, también se aprecian diferencias significativas en las poblaciones ($F = 3.3128$, $P = 0.001948$). La prueba de Tukey señala un número significativamente mayor de brotes en medio con estrés salino en explantes de BCS que Pacífico Centro y Yucatán.

Variación genética en tres genes candidatos: *GhDREB*, *GhZFP1* y *GhNAC4*

El BLAST de nuestras secuencias putativas *GhDREB* con la base de datos del NCBI genera un alineamiento con el mRNA de la proteína de unión DRE de *Gossypium hirsutum* con un Max score de 702, cobertura del 100%, valor E de 0.0 e identidad máxima del 99% (número de accesoión AY174160.1). En el caso de la secuencia putativa *GhNAC4*, ésta se alineó con el gen de la proteína de dominio NAC4 de *Gossypium hirsutum* depositada en la base de datos del NCBI, con un Max score de 1373, cobertura del 93%, valor E de 0.0 e identidad máxima del 100% (número de accesoión EU706347.1). Por lo tanto, estamos seguros de haber amplificado los genes correctos, y las secuencias de Genbank fueron incluidas en los análisis pertinentes.

El mejor alineamiento al realizar el BLAST de nuestra secuencia putativa *GhZFP1* es con un marcador de secuencia simple repetida de mRNA del clon NBR1 D2 de *Gossypium herbaceum*, con un Max score de 206, cobertura del 97%, valor E de $9e-50$ e identidad máxima del 82%. Al no haberse alineado nuestra secuencia putativa *GhZFP1* con la secuencia depositada en la base de datos del NCBI del factor de transcripción dedo de zinc tipo CCCH de *Gossypium hirsutum*, no podemos estar seguros de que la

secuencia que nosotros amplificamos corresponda a dicho gen; sin embargo, las secuencias aquí presentadas serán tratadas como *GhZFP1*.

El gen *GhZFP1* se secuenció en 32 individuos provenientes de las ocho metapoblaciones silvestres (cuatro de cada una) y en dos individuos cultivados provenientes de mercados del Distrito Federal. Los estadísticos de diversidad nucleotídica y de las pruebas D_7 de Tajima y D^* de Fu y Li se muestran en la Tabla 3.1. Los sitios polimórficos de los alelos inferidos para el gen *GhZFP1* se muestran a continuación, así como la frecuencia absoluta de cada uno:

1. AGAC	33
2. AGAA	1
3. TAGC	32
4. TAGA	2

La red generada con estos alelos se presenta en la Figura 3.1.

El número promedio de diferencias nucleotídicas entre las metapoblaciones silvestres para el gen *GhZFP1* se muestra en la tabla 3.3; y la divergencia entre las mismas estimada como el número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio (D_{xy}), y el número neto de sustituciones nucleotídicas por sitio (D_a) se presentan en la tabla 3.4.

El gen *GhDREB* se secuenció en 31 individuos silvestres de las ocho metapoblaciones (cuatro de cada una, excepto Pacífico Sur con tres individuos) y dos individuos cultivados provenientes de mercados del Distrito Federal. Todos los nucleótidos de la secuencia corresponden al único exón del gen. Los estadísticos de diversidad nucleotídica y de las pruebas D_7 de Tajima y D^* de Fu y Li se muestran en la Tabla 3.1. Los sitios polimórficos de los cinco alelos inferidos del gen *GhDREB* así como su frecuencia absoluta, se muestran a continuación, y la red de los mismos se muestra en la figura 3.2:

1. TTAGGA	24
-----------	----

2. CTAGGA	1
3. CTAGAA	10
4. CCCTGG	1
5. CCTTGG	32

El número promedio de diferencias nucleotídicas entre las metapoblaciones silvestres para el gen *GhDREB* se muestra en la tabla 3.5; y la divergencia entre las mismas estimada como el número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio (D_{xy}), y el número neto de sustituciones nucleotídicas por sitio (D_a) se presentan en la tabla 3.6.

A pesar de que todos los productos de PCR del gen *GhNAC4* fueron corridos en gel de electroforesis antes de ser secuenciados, y la banda correspondiente a dicho gen se observó en cuatro individuos silvestres por población, únicamente se obtuvo la secuencia de 20 individuos silvestres (dos de Golfo Norte y Sur, Pacífico Centro y Norte; tres de Yucatán, BCS y Bahía de Banderas y Pacífico Sur) y un individuo cultivado proveniente de mercado del D.F. Las secuencias generadas corresponden a una parte del 2^{do} exón (sitio 1 al 130), el segundo intrón (sitio 131 a 215) y una porción del 3^{er} exón (sitio 216 a 637) del gen *GhNAC4*. Los estadísticos de diversidad nucleotídica y de las pruebas D_T de Tajima y D^* de Fu y Li se muestran en la Tabla 3.1. Los sitios polimórficos de los alelos inferidos con PHASE y su frecuencia absoluta son los siguientes (el símbolo “-” representa gaps, los cuales fueron considerados como el quinto estado de carácter en la inferencia de las redes) y la red generada con dichos alelos se muestra en la figura 3.3:

1. A----TGGGGGG	15
2. A----TGGGTGG	1
3. A----TGGTGCG	1
4. A----TGTGGGG	1
5. A----TAGGGGG	2
6. ATTTTATAGGGGG	2

7. T----TGGGGGG	2
8. T-----GGGGGG	16
9. T-----GGGGGA	1
10. T-----GGTGGG	1

El número promedio de diferencias nucleotídicas entre las metapoblaciones silvestres para el gen *GhNAC4* se muestra en la tabla 3.7; y la divergencia entre las mismas estimada como el número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio (D_{xy}), y el número neto de sustituciones nucleotídicas por sitio (D_a) se presentan en la tabla 3.8.

Una vez que los alelos para los tres genes candidatos han sido inferidos para cada individuo, es posible conjuntar la respuesta de los individuos al estrés salino con su genotipo (Tabla 3.9). En las redes de haplotipos de los tres genes se marca con un asterisco aquellos haplotipos que se asociaron a un individuo clasificado como susceptible, mientras que con dos asteriscos se marcan los haplotipos asociados a individuos sobresalientes (en función de peso húmedo ó número de brotes).

El número de sitios sinónimos y no sinónimos, y los sitios polimórficos en dichos sitios en los individuos silvestres de *G. hirsutum* se muestran en la Tabla 3.2. Además, la divergencia de los individuos silvestres y los cultivados se estimó para sitios sinónimos y no sinónimos (Tabla 3.2).

Tabla 3.1. Diversidad genética de *Gossypium hirsutum* silvestre en tres genes candidatos (N= número de muestra; S = sitios segregantes, h = número de haplotipos; H_d = diversidad haplotípica; π y θ = diversidad nucleotídica; los valores de la D de Tajima y D^* de Fu y Li significativos se denotan con un *).

Gen	N	Sitios nucleotídicos	S	h	H_d	π	θ sitios	θ secuencia	D de Tajima	D^* de Fu y Li
<i>GhDREB</i>	31	388	6	5	0.646	0.00713	0.00329	1.278	2.84777 *	0.26622
<i>GhZFP1</i>	32	187	4	4	0.553	0.00863	0.00452	0.846	1.95760	0.98078
<i>GhNAC4</i>	20	637	7	8	0.704	0.00157	0.00260	1.646	-1.10365	-1.72026

Tabla 3.2. Sustituciones sinónimas y no sinónimas en dos genes candidatos de *G. hirsutum* silvestres y divergencia con individuos cultivados (SS = sitios sinónimos, NS = sitios no sinónimos, S = sinónimo, NS = no sinónimo, P_i = diversidad nucleotídica con corrección de Jukes Cantor).

Gen	Codones	Núm. total de SS	Núm. total de NS	Núm. de sustituciones S	Núm. de sustituciones NS	P_i (S)	P_i (NS)	P_i (NS)/ P_i (S)
<i>GhDREB</i>	129	94.257	292.743	6	1	0.02692	0.00094	0.035
<i>GhNAC4</i>	183	126.849	422.151	1	5	0.00146	0.00070	0.484

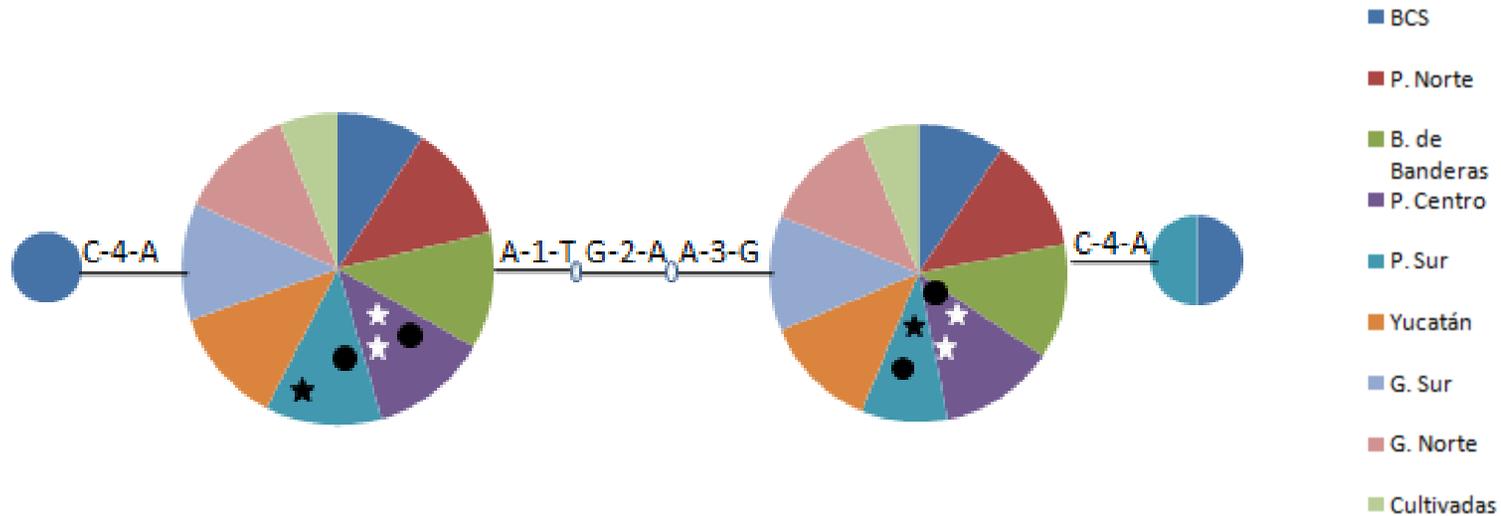


Figura 3.1. Red de haplotipos del gen *GhZFP1*. Cada círculo corresponde a un haplotipo, y los colores representan a las metapoblaciones silvestres o a los individuos cultivados (la clave se muestra a la derecha). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de individuos que poseen dicho haplotipo. Los haplotipos de individuos sobresalientes en función de peso húmero y número de brotes se marcan con ☆ y ○ respectivamente. Los haplotipos de individuos susceptibles en función de peso húmedo y número de brotes se marcan con ★ y ● respectivamente.

Tabla 3.3. Divergencia entre poblaciones en el gen *GhZFP1*. Número promedio de diferencias nucleotídicas entre poblaciones.

	BCS	P. Norte	B. de Banderas	P. Centro	P. Sur	Yucatán	Golfo Sur	Golfo Norte
BCS	-							
P. Norte	1.75	-						
B. de Banderas	1.75	1.5	-					
P. Centro	1.75	1.5	1.5	-				
P. Sur	1.813	1.625	1.625	1.625	-			
Yucatán	1.75	1.5	1.5	1.5	1.625	-		
Golfo Sur	1.75	1.5	1.5	1.5	1.625	1.5	-	
Golfo Norte	1.75	1.5	1.5	1.5	1.625	1.5	1.5	-

Tabla 3.4. Divergencia entre poblaciones en el gen *GhZFP1*. Divergencia nucleotídica absoluta (D_{xy} ; por debajo de la diagonal) y divergencia relativa (D_a ; por encima de la diagonal).

$D_{xy} D_a$	BCS	P. Norte	B. de Banderas	P. Centro	P. Sur	Yucatán	Golfo Sur	Golfo Norte
BCS	-	-0.00095	-0.00095	-0.00095	-0.00129	-0.00095	-0.00095	-0.00095
P. Norte	0.00936	-	-0.00115	-0.00115	-0.00115	-0.00115	-0.00115	-0.00115
B. de Banderas	0.00936	0.00802	-	-0.00115	-0.00115	-0.00115	-0.00115	-0.00115
P. Centro	0.00936	0.00802	0.00802	-	-0.00115	-0.00115	-0.00115	-0.00115
P. Sur	0.00969	0.00869	0.00869	0.00869	-	-0.00115	-0.00115	-0.00115
Yucatán	0.00936	0.00802	0.00802	0.00802	0.00869	-	-0.00115	-0.00115
Golfo Sur	0.00936	0.00802	0.00802	0.00802	0.00869	0.00802	-	-0.00115
Golfo Norte	0.00936	0.00802	0.00802	0.00802	0.00869	0.00802	0.00802	-

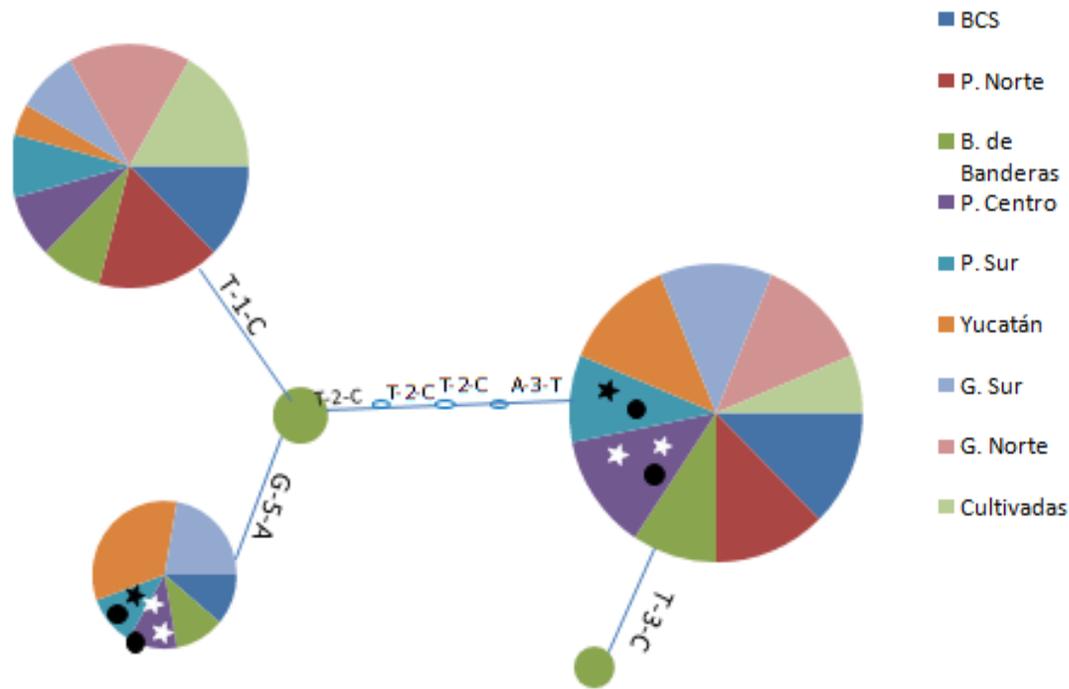


Figura 3.2. Red de haplotipos del gen *GhDREB*. Cada círculo corresponde a un haplotipos, y los colores representan a las ocho metapoblaciones silvestres y a los individuos cultivados (clave de colores a la derecha). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de individuos que poseen dicho haplotipos. Los haplotipos de individuos sobresalientes en función de peso húmero y número de brotes se marcan con ☆ y ○ respectivamente. Los haplotipos de individuos susceptibles en función de peso húmedo y número de brotes se marcan con ★ y ● respectivamente.

Tabla 3.5. Divergencia entre poblaciones en el gen *GhDREB*. Número promedio de diferencias nucleotídicas entre poblaciones.

	BCS	P. Norte	B. de Banderas	P. Centro	P. Sur	Yucatán	Golfo Sur	Golfo Norte
BCS	-							
P. Norte	2.625	-						
B. de Banderas	2.719	2.688	-					
P. Centro	2.75	2.75	2.75	-				
P. Sur	2.708	2.667	2.729	2.75	-			
Yucatán	2.813	2.875	2.781	2.75	2.792	-		
Golfo Sur	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75	-	
Golfo Norte	2.625	2.5	2.688	2.75	2.667	2.875	2.75	-

Tabla 3.6. Divergencia entre poblaciones en el gen *GhDREB*. Divergencia nucleotídica absoluta (D_{xy} ; por debajo de la diagonal) y divergencia relativa (D_{ai} ; por encima de la diagonal).

	BCS	P. Norte	B. de Banderas	P. Centro	P. Sur	Yucatán	Golfo Sur	Golfo Norte
BCS	-	-0.00087	-0.00091	-0.00092	-0.00119	-0.00067	-0.00092	0.00087
P. Norte	0.00677	-	-0.00071	-0.00064	-0.00102	-0.00023	-0.00064	-0.00092
B. de Banderas	0.00701	0.00693	-	-0.00092	-0.00113	-0.00075	-0.00092	-0.00071
P. Centro	0.00709	0.00709	0.00709	-	-0.00117	-0.00092	-0.00101	-0.00064
P. Sur	0.00698	0.00687	0.00703	0.00709	-	-0.00097	-0.00117	-0.00102
Yucatán	0.00725	0.00741	0.00717	0.00709	0.0072	-	-0.00092	-0.00023
Golfo Sur	0.00709	0.00709	0.00709	0.00709	0.00709	0.00709	-	-0.00064
Golfo Norte	0.00677	0.00644	0.00693	0.00709	0.00687	0.00741	0.00709	-

Tabla 3.7. Divergencia entre poblaciones en el gen *GhNAC4*. Número promedio de diferencias nucleotídicas entre poblaciones.

	BCS	P. Norte	B. de Banderas	P. Centro	P. Sur	Yucatán	Golfo Sur	Golfo Norte
BCS	-							
P. Norte	0.583	-						
B. de Banderas	0.889	1.25	-					
P. Centro	0.917	1.5	0.917	-				
P. Sur	1.167	1.083	1.611	2	-			
Yucatán	0.833	1.417	0.833	0.417	2	-		
Golfo Sur	0.5	0.75	0.833	0.75	1.333	0.667	-	
Golfo Norte	0.333	0.25	1	1.25	0.833	1.167	0.5	-

Tabla 3.8. Divergencia entre poblaciones en el gen *GhNAC4*. Divergencia nucleotídica absoluta (D_{xy} ; por debajo de la diagonal) y divergencia relativa (D_{ai} ; por encima de la diagonal).

	BCS	P. Norte	B. de Banderas	P. Centro	P. Sur	Yucatán	Golfo Sur	Golfo Norte
BCS	-	0.00011	0.00014	0.00063	0.00021	0.00063	-0.00016	-0.00011
P. Norte	0.00092	-	0.00074	0.00158	0.00011	0.00158	0.00026	0
B. de Banderas	0.00141	0.00198	-	0.00021	0.00049	0.00021	-0.00005	0.00074
P. Centro	0.00145	0.00237	0.00145	-	0.00156	0	0.00026	0.00158
P. Sur	0.00185	0.00171	0.00255	0.00316	-	0.00169	0.00037	0.00011
Yucatán	0.00132	0.00224	0.00132	0.00066	0.00316	-	0.00026	0.00158
Golfo Sur	0.00079	0.00119	0.00132	0.00119	0.00211	0.00105	-	0.00026
Golfo Norte	0.00053	0.00039	0.00158	0.00198	0.00132	0.00185	0.00079	-

Tabla 3.9. Resumen de respuesta a estrés salino y genotipo de *G. hirsutum* silvestre (T = tolerante, S = susceptible, SS= sobresaliente, SR = sin respuesta a cultivo in vitro, NA = no se pudo analizar estadísticamente).

Población	Individuos	respuesta a estrés salino		Genotipo		
		Masa	Brotes	DREB	ZFP1	NAC4
BCS	GhB3-1	T	T	1,5	1,4	1,1
	GhB2	T	T	1,5	1,3	-
	GhBSJ-2	T	T	1,5	2,3	1,1
	GhBSJ-1	T	T	3,5	1,3	8,8
Pacífico Norte	GhSi1-21	S. R.	S. R.	1,5	1,3	-
	GhSi1-28	N.A.	N.A.	1,5	1,3	1,2
	GhSi1-17	S.R.	S.R.	1,5	1,3	1,1
	GhSi1-15	N.A.	N.A.	1,5	1,3	-
Bahía de Banderas	GhN3	T	T	2,4	1,3	5,5
	GhNm14	T	T	1,5	1,3	8,8
	GhNaAC	T	T	1,5	1,3	7,7
	GhNaKm63	T	T	3,5	1,3	-
Pacífico Centro	GhJd16	-	-	1,5	1,3	-
	GhJd115	T	T	1,5	1,3	-
	GhJb119	SS	SS	3,5	1,3	8,8
	GhJd116	SS	S	3,5	1,3	8,10
Pacífico Sur	GhOA1	S	T	1,5	1,3	1,3
	GhOB1-1	T	T	1,5	1,3	1,4
	GhOC24	N.A.	N.A.	-	1,4	-
	GhOC1.1-c	S	S	3,5	1,3	6,6
Yucatán	GhY12	T	T	1,5	1,3	8,8
	GhY13	T	T	3,5	1,3	8,9
	GhY10	T	T	3,5	1,3	-
	GhY15	T	T	3,5	1,3	8,8
Golfo Sur	GhVer4-4	T	T	1,5	1,3	-
	GhVer2	N.A.	N.A.	3,5	1,3	1,1
	GhVer2-2	T	T	1,5	1,3	8,8
	GhVer2-4	T	T	3,5	1,3	-
Golfo Norte	GhTam4-5	T	T	1,5	1,3	1,1
	GhTam1-13	T	T	1,5	1,3	-
	GhTam1-7	N.A.	N.A.	1,5	1,3	1,1
	GhTam1-1	N.A.	N.A.	1,5	1,3	-
Cultivadas	Cult J	S.R.	S.R.	1,5	1,3	-
	Cult D	S.R.	S.R.	1,5	1,3	-
	Gb	-	-	1,1	-	8,8

Discusión

Establecimiento del jardín común y micropropagación de *G. hirsutum*

La germinación y el desarrollo de la plántula de algodón son muy sensibles a diversos factores ambientales en el momento de la siembra y varias semanas después de ésta; entre estos factores se encuentra la temperatura (mínimo 16°C), disponibilidad de agua, condiciones de suelo como compactación, gases de la rizósfera, patógenos de la semillas y plántula, así como la interacción entre estos y otros factores bióticos y abióticos del microambiente en que la semilla emerge (Bradow & Bauer, 2010). Los factores más importantes son la temperatura y la disponibilidad de agua, y ambos fueron óptimos y estrictamente controlados durante la germinación de las semillas y el establecimiento de las plántulas; sin embargo, la tasa de germinación es muy distinta entre las poblaciones, por ejemplo, todos la tasa de germinación de BCS fue del 100%, mientras que de poblaciones como Pacífico Centro y Yucatán la tasa de germinación fue aproximadamente del 50% (gráfica 1.1).

La diferencia en la tasa de germinación de las metapoblaciones podría atribuirse al genotipo de las semillas o a las condiciones ambientales y nutricionales a que ha estado sometida la planta madre durante el periodo de formación de las mismas (efecto materno; Roach & Wulff, 1987). Otro factor que pudo haber tenido un efecto sobre la tasa de germinación, es que las semillas provenían de colectas realizadas en diferentes fechas (desde 2004 hasta 2011), por lo que es posible que algunas semillas hubieran perdido su capacidad para germinar. La reducción de viabilidad en semillas de *G. hirsutum* debido al tiempo no ha sido reportado, pero se sabe que son importantes las condiciones de almacenamiento como humedad y temperatura. Por lo tanto, con el experimento realizado no se puede concluir sobre los factores que influenciaron la diferencia en la tasa de germinación observada.

En todas las metapoblaciones se presentó una elevada mortalidad de las plántulas antes de que la primera hoja verdadera emergiera, es posible que nuevamente factores intrínsecos a las semillas afectaran el vigor de las mismas, como su genotipo, el efecto materno, tamaño y peso de la semilla (Roach & Wulff, 1987). Sin embargo, factores extrínsecos de las condiciones de manejo, principalmente el sustrato estéril sin inóculos micorrízicos pudieron haber tenido un efecto, ya que se ha demostrado que el algodón es altamente dependiente de estas asociaciones durante el desarrollo de las plántulas (McMichael *et al.*, 2010).

El estadio más crítico en el establecimiento de las plantas silvestres de algodón en la condiciones ambientales del jardín común fue a partir de que emergió la radícula y hasta que la primer hoja verdadera emergió, después la probabilidad de sobrevivencia hasta la formación de siete entrenudos es alta.

En décadas recientes, las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas han surgido como una herramienta biotecnológica muy útil, pues se pueden producir cientos de clones de genotipos seleccionados en condiciones controladas, como nutrientes disponibles, pH del medio, temperatura, etcétera (Pérez-Clemente & Gómez-Cadenas, 2012; Mitic *et al.*, 2006; Yıldız, 2012). Los métodos de propagación *in vitro* de plantas se pueden agrupar esencialmente en dos, multiplicación de brotes a partir de yemas axilares o apicales y formación de embriones somáticos ya sea directamente de explantes o removidos de la planta madre (George *et al.*, 2008).

La propagación vegetativa de plantas a través del cultivo de yemas axilares o apicales ha demostrado ser el método más confiable porque garantiza estabilidad clonal, ya que hay menor probabilidad de desarrollo de callo, por lo que el subcultivo tiene menor riesgo de presentar irregularidad genética inducida (George *et al.*, 2008). Por esta razón, el sistema de cultivo *in vitro* seleccionado para evaluar la respuesta al estrés salino de *G. hirsutum*, fue micropropagación a través de cultivo de yemas axilares y apicales, en donde

se induce al meristemo apical y a la yema axilar de cada nodo para producir un nuevo brote, que se elonga y puede ser subcultivado indefinidamente.

La capacidad de regeneración *in vitro* de individuos de *G. hirsutum* resultó significativamente distinta entre metapoblaciones. La capacidad de regeneración de plantas muestra amplias diferencias entre familias, géneros, especies e incluso entre genotipos de la misma especie, lo cual fue evidente al micropropagar *G. hirsutum*. Generalmente las dicotiledóneas se regeneran más fácilmente que las monocotiledóneas. Algunas familias dicotiledóneas con alta capacidad de regeneración son Solanaceae (*Nicotiana* L., *Petunia* Juss. y *Datura* L.), Cruciferae (*Brassica* L. y *Arabidopsis* L.), Gesneriaceae (*Achimenes* Pers. y *Streptocarpus* Lindl.), Begoniaceae y Crassulaceae. En general, las herbáceas se regeneran más fácilmente que las plantas leñosas, como árboles y arbustos. La capacidad de regeneración en la familia Malvaceae y particularmente en el género *Gossypium* se considera difícil (Yildiz, 2012). Dada esta baja capacidad de regeneración, algunos individuos no pudieron ser sometidos a estrés salino y de algunos no se generaron suficientes brotes para poder evaluar estadísticamente su crecimiento bajo dicho estrés.

Aún cuando el genotipo se considera uno de los factores más importantes en la capacidad de regeneración de una planta en cultivo de tejidos, existen otros factores que también afectan esta capacidad, como el estado fisiológico de la planta donadora, la fuente del explante, edad y tamaño del explante y su posición en la planta donadora. La micropropagación de *G. hirsutum* se realizó con las plantas del jardín común, en el mismo estado fisiológico edad, tamaño y posición del explante. Por lo tanto, el genotipo es el factor determinante en la regeneración de las plantas silvestres de algodón del jardín común.

Identificar genotipos con una alta frecuencia de regeneración de brotes resulta indispensable si se desea establecer un sistema de estudio eficiente, llevar a cabo

programas de propagación con fines comerciales o clonar plantas amenazadas (Yildiz, 2012); con base en los resultados de micropropagación aquí presentados se puede recomendar a los individuos de la metapoblación BCS y Pacífico Centro como material biológico para programas de propagación *in vitro*.

Caracterización *in vitro* de *G. hirsutum* bajo estrés salino y diversidad genética en genes candidatos

Considerando la compleja naturaleza de diversos estreses abióticos, entre ellos el estrés salino, analizar la respuesta de las plantas a dichos estreses en el campo o en el invernadero resulta muy complicado, de tal forma que un enfoque que ha ganado terreno es la selección *in vitro* mediante la aplicación del agente estresante en el medio de cultivo (Rai *et al.*, 2011). La variación en la habilidad para tolerar concentraciones elevadas de NaCl en el medio de cultivo ha sido monitoreada en diversos sistemas de cultivo *in vitro*, (callo, cultivos en suspensión, embriones somáticos y cultivo de brotes; Pérez-Clemente & Gómez-Cadenas, 2012; George *et al.*, 2008).

Debido a que uno de los principales efectos adversos del estrés salino es un decremento en la producción de biomasa (Ahmad *et al.*, 2002), el peso húmedo fue seleccionado como una variable de respuesta para evaluar el desempeño del algodón en medio con elevadas concentraciones de NaCl. Con base en esta variable, cinco individuos del total sometido a estrés (5.61%) se clasificaron como susceptibles, 78 como tolerantes (87.64%) y seis (6.74%) como sobresalientes. La segunda variable de respuesta seleccionada fue el número de brotes, ya que el exceso de sal en el medio disminuye la tasa a la que nuevas hojas emergen (Munns & Tester, 2008). En función del número de brotes, siete individuos (8.23%) se clasificaron como susceptibles, 78 (91.76%) como tolerantes y ningún individuo como sobresaliente. Aunque las dos variables de

respuesta seleccionadas muestran una gran congruencia en este sistema, el número de brotes parece ser una variable más sensible al estrés salino.

La supuesta mayor sensibilidad observada en la emergencia de nuevos brotes puede deberse a que cuando las plantas se encuentran bajo estrés osmótico (1^{ra} fase de respuesta al estrés salino), sintetizan solutos compatibles para contrarrestar el desbalance osmótico generado por el exceso de Na⁺ extracelular (Munns, 2005; Zhu, 2001). La sal que no es eficientemente excluida de las células, se compartamentaliza en vacuolas, protegiendo así al citoplasma de toxicidad iónica (Flowers & Yeo, 1986). Si el Na⁺ y Cl⁻ son secuestrados en vacuolas en la célula, solutos orgánicos se deben acumular en el citoplasma y organelos para balancear la presión osmótica del Na⁺ y Cl⁻ en la vacuola (Munns, 2005). La biosíntesis de solutos compatibles y no una mayor producción de biomasa, pudo haber aumentado el número de individuos clasificados como sobresalientes y disminuido el número de susceptibles; por lo que en este sentido, la variable número de brotes pudiera ser un mejor indicador de la tolerancia de *G. hirsutum* a estrés salino. Sin embargo, dado que la acumulación de solutos compatibles está relacionada con una mayor tolerancia al exceso de sales (Flowers & Yeo, 1986), el peso húmedo sí puede considerarse un buen indicador de la tolerancia al estrés salino de los explantes.

La segunda fase de respuesta de las plantas a la salinidad se observa como daño a las hojas más viejas, en donde la sal se acumula en el citoplasma hasta concentraciones tóxicas (Munns & Tester, 2008). El efecto iónico no fue medido en este análisis, pero debido a que el peso húmedo de la mayoría de los individuos analizados no fue significativamente distinto en medio con y sin estrés salino, y de hecho continúan produciendo brotes nuevos en medio con NaCl, es altamente probable que la sal haya sido excluida de la planta de manera eficiente y/o compartamentalizada (Munns, 2005) y que la fase de estrés iónico aún no hubiera sido alcanzada. Estas observaciones apoyan

el mecanismo de exclusión parcial de iones propuesto para cultivares de algodón (Ashraf, 2002); la exclusión de Na^+ por las raíces garantiza que este ion no se acumule a concentraciones tóxicas en las hojas ocasionando su muerte (Munns & Tester, 2008). Sin embargo, para poder distinguir claramente los efectos osmóticos de los iónicos, hubiera sido necesario realizar observaciones en un periodo donde se pueda comparar la tasa de producción de brotes nuevos y el tamaño de las hojas en crecimiento, así como del daño en las hojas viejas (Zhu, 2001; Tester & Davenport, 2003) por lo que únicamente podemos especular acerca de la tolerancia de *G. hirsutum* silvestre en ambas fases de respuesta a estrés salino.

Mediante el análisis individual de los explantes en medio con y sin estrés se detecta a un mayor número de individuos con crecimiento diferencial que en el análisis poblacional (comparación del crecimiento de todos los explantes de una metapoblación en medio con agente estresante). Por ejemplo, en la metapoblación BCS un individuo, GhB17, se clasificó como susceptible al comparar el peso húmedo y número de brotes de sus explantes en medio con y sin estrés (Tabla 2.1); sin embargo, el crecimiento de todos los explantes en estrés salino de la metapoblación BCS no fue significativamente distinto (Tabla 2.2).

Únicamente en el análisis de todos los explantes en medio con NaCl de las metapoblaciones Pacífico Centro y Pacífico Sur en función del peso húmedo y de Golfo Sur en función del número de brotes se detectaron individuos con crecimiento significativamente distinto (Tabla 2.2). Para Pacífico Sur, el individuo GhOC1.1-c tuvo un peso significativamente mayor al de GhOC1.1-a, GhOC3-2 y GhOC3-3, ninguno de estos últimos tres fue clasificado como susceptible en el análisis individual; mientras GhOC1.1-c se había clasificado como susceptible en el análisis individual, por lo que se puede inferir que GhOC1.1-c tiene un crecimiento muy bueno en cultivo *in vitro*, aunque puede ser susceptible a estrés salino. En cuanto a las poblaciones Pacífico Centro y Golfo Sur, los

individuos detectados como sobresalientes en el análisis individual, son los mismos que en el análisis poblacional tienen crecimiento diferente al del resto de la metapoblación.

Al comparar únicamente el crecimiento de los explantes en medio con estrés salino no es posible saber si el crecimiento que observamos se debe a una mayor o menor tolerancia al estrés o simplemente es una mejor respuesta a la técnica de cultivo *in vitro* utilizada; por lo tanto, la comparación a nivel individual de los explantes en medio con y sin estrés resulta más adecuada si se quiere identificar aquellos individuos mejor adaptados a condiciones de estrés salino. Por otro lado, no se debe descartar la hipótesis de que las plantas que fueron susceptibles al estrés impuesto no están adaptadas a esta condición adversa, ya que esto pudiera deberse a que dichas plantas necesitasen una adaptación gradual para la expresión correcta de genes responsables de la adquisición de la tolerancia (Bartels & Sunkaer, 2005).

En cuanto al análisis interpoblacional realizado, la metapoblación BCS resultó tener un crecimiento significativamente mayor en función de peso húmedo y número de brotes que las metapoblaciones Pacífico Centro y Yucatán. Nuevamente es muy importante considerar que con este análisis no es posible distinguir entre la respuesta de los individuos al establecimiento *in vitro* y al estrés salino, ya que sólo se compara el crecimiento de los explantes bajo medio con NaCl. Teniendo en mente dicha consideración, y dado que la distribución de frecuencias de individuos susceptibles, tolerantes y sobresalientes detectados mediante el análisis individual es la misma para todas las metapoblaciones, no se puede afirmar que los individuos de BCS están mejor adaptados para tolerar el estrés salino. De hecho, la metapoblación BCS tuvo una mayor frecuencia de individuos exitosamente establecidos en cultivo *in vitro* mediante proliferación de nudos axilares (Tabla 1.1) y lo que se podría interpretar como mayor tolerancia de BCS al estrés salino puede ser únicamente la mejor respuesta a la técnica de micropropagación. Esta información resulta muy valiosa para otros fines, por ejemplo

si se desea seleccionar una metapoblación como fuente de germoplasma para micropropagar *G. hirsutum* silvestre a gran escala, como se discutió en la primera sección de esta discusión.

La concentración de NaCl usada en la caracterización de respuesta de *G. hirsutum* al estrés salino (140 mM, equivalente a 24dSm^{-1}) es suficiente para imponer un estrés considerable a cualquier planta (excepto a halófitas; Flowers, 2004). Aún cuando estos datos provienen de experimentos *in vitro*, la elevada frecuencia de individuos que no tuvieron un peso húmedo ni número de brotes menor en medio con estrés salino, nos permite suponer que los individuos de *G. hirsutum* que observamos en su ambiente natural han desarrollado mecanismos que les permiten tolerar concentraciones muy elevadas de NaCl en el suelo.

El hecho de que todas las poblaciones hayan tenido la misma distribución de frecuencias de individuos tolerantes, susceptibles y sobresalientes, es decir, que no haya diferenciación aparente en respuesta a estrés salino en las poblaciones en México, puede tener dos explicaciones distintas. La primera es que todas las poblaciones han estado sometidas una presión de selección similar de estrés salino durante un largo periodo de tiempo y que por lo tanto, la respuesta actualmente se observa homogénea, ya que los susceptibles fueron depurados de la poblaciones y por lo tanto todas las metapoblaciones se encuentran igualmente adaptadas para tolerar elevadas concentraciones de NaCl. La segunda, es que esta tolerancia puede ser ancestral, ya que durante la evolución del género *Gossypium* hay varias evidencias de migraciones transoceánicas y sobrevivencia en dunas costeras por lo que es posible que sea una característica compartida entre las especies de este género (Wendel, 2010). Sin embargo, para poder probar la significancia de la adaptación observada en tolerancia a estrés salino son necesarias comparaciones a largo plazo y observando las respuestas en los diferentes estadios de vida y su efectos

sobre la adecuación de los individuos, además de cuantificar la salinidad en los hábitats, para tener un escenario completo (Sletvold & Agren, 2012).

Los estudios de *G. hirsutum* cultivado sugieren que el límite al cual el rendimiento del algodón comienza a declinar es 7.7 dSm^{-1} , con un 50% de reducción en productividad a 17.0 dSm^{-1} (Maas, 1985). Recientemente, se ha caracterizado la respuesta de varias accesiones de *G. hirsutum* a estrés salino (Ashraf & Ahmad, 2000; Ashraf, 2002), y aunque variación significativa ha sido encontrada en ellas, en todos los casos hay una disminución en las variables de crecimiento analizadas bajo condiciones de estrés salino. En este estudio utilizamos 140 mM, equivalente a 24 dSm^{-1} , sin encontrar el decremento reportado en cultivadas, por lo que es posible suponer que las plantas silvestres son más tolerantes a estrés salino que las plantas cultivadas. Los ensayos para establecer en esta investigación plantas de *G. hirsutum* cultivado no fueron exitosos, por lo que no se logró la caracterización de su respuesta bajo estrés salino *in vitro* y la comparación en las mismas condiciones.

Durante el proceso de domesticación, se seleccionan únicamente plantas con las características deseadas por el agricultor, características mayor cantidad y calidad de la fibra en el caso del algodón, por lo que sólo semilla de las “mejores” plantas constituye la siguiente generación (Wendel, 2010). Esta selección ocasiona cuellos de botella genéticos, reduciendo la diversidad a lo largo del genoma; sin embargo, esta pérdida de diversidad es diferente entre los genes del genoma. Los genes involucrados en la expresión del fenotipo seleccionado experimentan una pérdida drástica de diversidad (los alelos favorecidos contribuyen más progenie a la siguiente generación, eliminando a los otros alelos de la población), mientras que para el resto del genoma la pérdida de diversidad es una función del tamaño poblacional y duración del cuello de botella (Doebley *et al.*, 2006).

Una vez que la variación funcional en tolerancia a estrés salino ha sido explorada en las poblaciones silvestres de *G. hirsutum*, podemos explorar la diversidad en los genes candidatos con el fin de generar una aproximación inicial de la variación adaptativa encontrada en dichas poblaciones y dar un primer paso para elucidar la base molecular de la adaptación (Eckert & Dyer, 2012).

Gossypium hirsutum es una especie alotetraploide, es decir posee dos copias del genoma A y dos copias del genoma D (Wendel *et al.*, 1992). La inferencia de haplotipos a partir de datos de SNP con fase ambigua ha sido posible a través de varios enfoques basados en métodos estadísticos, como el algoritmo EM o el muestro de Gibbs, o mediante el principio de parsimonia (Stephens *et al.*, 2001). Sin embargo, estos enfoques han sido desarrollados para marcadores bialélicos y especies diploides, por lo que hasta hace poco tiempo, no era posible inferir haplotipos de especies poliploides como el algodón (Neigenfind *et al.*, 2008). Recientemente Neigenfind y colaboradores (2008) desarrollaron un software que permite calcular los haplotipos de especies poliploides con base en un enfoque matemático SAT, llamado SATlotyper. Al revisar los cromatogramas de las secuencias de los tres genes, no se encontró ningún sitio nucleotídico con más de dos picos de nucleótidos. Por lo tanto, asumimos que únicamente se amplificó el gen en uno de los dos genomas (A o D), o que ambas copias del genoma A y del genoma D son idénticas y que podemos tratarlos como diploides e inferir los inferir los haplotipos usando PHASE (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly 2003).

Los genes candidatos secuenciados: *GhDREB*, *GhNAC4* y *GhZFP1*, codifican factores de transcripción, por lo que controlan la expresión de otros genes mediante la unión a los promotores de elementos-cis (Martin *et al.*, 2010). Los loci regulatorios pueden jugar un papel muy importante en la adaptación fisiológica mediante el control de la expresión temporal y espacial de loci estructurales (Puruggannan, 2000). Hasta hace poco tiempo, se pensaba que los genes regulatorios tendrían muy poca diversidad, ya que

al tener un efecto pleiotrópico en el fenotipo, estarían bajo fuerte selección estabilizadora y por lo tanto tendrían poca variación; sin embargo, recientemente se han estudiado los patrones de diversidad en genes regulatorios, y en general, los niveles de diversidad en estos genes no parecen ser distintos de otros tipos de loci en el genoma de estas especies (Purugganan, 2000). Sin embargo, en algunos casos sí hay una menor diversidad en genes regulatorios; la diversidad molecular reducida en loci específicos puede surgir de la acción de selección adaptativa o selección positiva en un gen, por ejemplo debido a selección positiva durante el proceso de selección.

A pesar de grandes esfuerzos por descifrar la forma en que los genes regulatorios evolucionan, aún conocemos muy poco acerca de las fuerzas evolutivas que moldean la diversificación de los sistemas regulatorios, y en específico su papel en la adaptación. Las preguntas que nos planteamos y que a continuación se intentan resolver son: ¿existe variación genética intraespecífica en *G. hirsutum* silvestre en genes regulatorios?, ¿qué fuerzas evolutivas moldean la variación en estos genes regulatorios? y ¿esta variación molecular corresponde en variación fenotípica entre las poblaciones? Al resolver estas preguntas intentamos establecer el papel que han jugado los factores de transcripción en la variación adaptativa a estrés salino en *G. hirsutum*.

En los tres factores de transcripción analizados en *G. hirsutum* silvestre la diversidad haplotípica encontrada es considerablemente alta (H_d varía entre 0.5 y 0.7 para los tres genes; Tabla 3.1). Los estadísticos de diversidad nucleotídica π y θ son también considerables en los tres genes, siendo π más elevado en *GhDREB* y *GhZFP1* que en *GhNAC4*; mientras que el estadístico θ resultó mayor en *GhNAC4*, esto se debe al mayor número de sitios segregantes encontrados en este gen y al menor tamaño de muestra.

El estrés salino es un importante agente selectivo en el hábitat de muchas especies, entre ellas *G. hirsutum*; si la selección ha moldeado los niveles y patrones de

diversidad nucleotídica en los genes candidatos, los niveles observados de diversidad no serán consistentes con los esperados bajo la hipótesis nula de neutralidad, y por lo tanto, las desviaciones significativas de las expectativas bajo neutralidad pueden ser indicativos de la acción de selección (Hedrick, 2010; Ehrenreich & Purugganan, 2006). En el gen *GhDREB* los niveles de variación son significativamente distintos a lo esperado bajo neutralidad, lo cual se refleja en un valor de D_T positivo y es posible inferir selección balanceadora. La ventaja del heterocigoto o cuellos de botella recientes, pueden reducir S ; y por lo tanto el estimado de π puede ser mayor que el de θ_S , y la diferencia resultar positiva. Sin embargo, dado que no se observan valores positivos de D_T en los tres genes analizados, es posible descartar eventos demográficos afectando el valor de D_T , y asumir selección balanceadora en *GhDREB* (Hedrick, 2010). Los valores de D_T de los otros genes y los de D^* de Fu y Li en los tres genes, no son significativos ($p > 0.5$), por lo que no es posible rechazar la hipótesis nula de neutralidad con base en dichos valores.

La huella de la selección balanceadora en el gen *GhDREB* es un indicio de que es o ha sido importante funcionalmente, por lo que se retienen los variantes genéticos ancestrales, y puede haber un exceso de variantes intermedios, mientras que los variantes raros (derivados) son eliminados de la población (Wright & Gaut, 2004). En la red de haplotipos de este gen, se observa que efectivamente, los alelos se distribuyen uniformemente en todas las poblaciones y hay muy pocos hay alelos derivados. Por otro lado, la proporción de sustituciones no sinónimas y sinónimas en los individuos silvestres, resultó ser muy cercana a cero. Esta proporción cercana a cero ($P_i(NS) / P_i(S) = 0.035$) pueden implicar que el gen *GhDREB* está sujeto a restricciones funcionales, de tal forma que las sustituciones no sinónimas de amino ácidos son deletéreas y purgadas de la población (Biswas & Akey, 2006), mientras que las frecuencias intermedias de los alelos ancestrales se mantienen.

El gen *GhNAC4* tiene una proporción de sustitución de sitios no sinónimos y sinónimas menor a 1, aunque no tan baja como la observada para *GhDREB*, lo cual es también indicio de selección que elimina variantes derivadas aunque de una manera menos intensa. Los cambios no sinónimos muy pocas veces son neutrales, por lo que valores positivos para estas proporciones son muy poco frecuentes a lo largo de los genomas (Hedrick, 2010), y si la salinidad es una condición que impone un estrés severo a los organismos, aquellas variantes que les permiten sobrevivir a dicho estrés serán mantenidas en las poblaciones, mientras que cualquier nuevo alelo será eliminado.

La divergencia entre poblaciones determinada a partir de D_{xy} y D_a resultó sumamente baja entre poblaciones para los tres genes candidatos; esta falta de estructura entre poblaciones es también evidente en la redes de haplotipos, en donde vemos que éstos se distribuyen de manera homogénea a lo largo de las metapoblaciones silvestres. Este patrón es congruente con una hipótesis de selección que elimina de las poblaciones los alelos derivados, y podemos inferir que los alelos observados son ancestrales y han sido mantenidos en frecuencias intermedias en las poblaciones.

No fue posible asociar a los pocos individuos susceptibles y sobresalientes detectados en cultivo *in vitro* a un haplotipo derivado; es decir, el genotipo de dichos individuos no difiere del observado en los individuos tolerantes. La tolerancia al estrés salino es un carácter cuantitativo, por lo que polimorfismos en varios genes candidatos deben contribuir a la adaptación a estrés salino (Juenger, 2013). Explorar mayores regiones del genoma permitirá detectar dichos genes y polimorfismos, y de manera particularmente importante, la significancia funcional de los polimorfismos observados a nivel molecular debe ser medida. Finalmente, los niveles de expresión y cambios epigenéticos como la metilación pueden influir en la variación fenotípica estable y heredable en poblaciones naturales también debe ser explorado (Martin *et al.*, 2010).

La gran cantidad de individuos capaces de tolerar elevada salinidad en el medio de cultivo, la poca diferenciación genética a través de la distribución geográfica de *G. hirsutum* en genes candidatos de tolerancia a dicho estrés y el hecho de no haber podido asociar determinados alelos con fenotipos susceptibles o sobresalientes, puede significar que el ancestro de las poblaciones actuales poseía la capacidad para sobrevivir en ambientes salinos, y sus descendientes aún poseen dichos alelos y la capacidad para sobrevivir bajo estrés salino. Stephens (1958) propuso que las semillas del género *Gossypium* poseen la capacidad de dispersarse a través del océano y permanecer viables durante prolongados periodos de inmersión marina, y germinar y establecer plántulas cerca del mar. Esta capacidad explica las migraciones transoceánicas que han sido inferidas en la historia evolutiva del género (Wendel *et al.*, 2010). Aún cuando en este trabajo no se determinó la capacidad germinativa de las semillas luego de prolongados periodos de inmersión en agua salada, la capacidad de los explantes en cultivo *in vitro* de mantener su crecimiento bajo estrés salino podría estar determinada por los mismos factores genéticos que le permiten a las semillas sobrevivir a dichas inmersiones.

La evolución requiere de variación genética en las poblaciones (Juenger, 2013). Hay evidencia de variación heredable en resistencia a salinidad en las poblaciones silvestres de las cuales se originaron los cultivos de los cuales depende la humanidad; esas poblaciones poseen alelos que ayudarán a dirigir esfuerzos para la conservación de las poblaciones, así como para realizar mejoramiento de cultivos en relación a dicho carácter.

Conclusiones

En el presente trabajo la variación en genes candidatos y la respuesta de *G. hirsutum* silvestre al estrés salino fue caracterizada. Para lograr este objetivo se estableció un “jardín común” con individuos provenientes de todas las metapoblaciones silvestres, y las pruebas de tolerancia al estrés salino se realizaron en cultivo *in vitro* de dichos individuos. Adicionalmente la variación genética en tres genes candidatos, *GhDREB*, *GhZFP1* y *GhNAC4*, fue caracterizada, pero no fue posible asociar la presencia de polimorfismos con una respuesta al estrés salino.

La tasa de germinación de las semillas de *G. hirsutum* silvestre es variable entre las ocho metapoblaciones; sin embargo, estos resultados se deben tomar con cautela debido al efecto materno y al tiempo de almacenamiento de las semillas. Debido a que el tiempo que las semillas permanecen viables y las condiciones óptimas de almacenamiento no se conocen para dicha especie, será necesario realizar los estudios pertinentes para así llevar a cabo estrategias efectivas de conservación de germoplasma. Por otro lado, es necesario explorar los factores bióticos y abióticos que determinan el establecimiento de la plántulas, así como las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento de *G. hirsutum* si un jardín común en el que los individuos desarrollen estructuras reproductivas ha de ser generado.

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta con un gran potencial para evaluar el crecimiento de plantas en ambientes estrictamente controlados; sin embargo, el éxito de dichas evaluaciones depende de la capacidad de la especie y/o genotipos para micropropagarse. La metapoblación silvestre de *Gossypium hirsutum* de Baja California Sur tiene el mayor potencial para desarrollar líneas de investigación diversas, pues presenta una gran capacidad de micropropagación a través de proliferación de nodos axilares. Sin embargo, será necesario realizar estandarizar los protocolos de micropropagación para mejorar la tasa de establecimiento del resto de las poblaciones.

Los cultivares de algodón se clasifican como cultivos medianamente tolerantes al estrés salino, y su crecimiento declina a 7.7 dS/m. Las poblaciones silvestres de *G. hirsutum* toleran elevadas concentraciones de NaCl en cultivo *in vitro* (140 mM, 24dS/m) y muy pocos individuos susceptibles fueron detectados a lo largo de la distribución silvestre de la especie. Esta mayor tolerancia al estrés salino en los individuos silvestres puede explicarse por la historia evolutiva del género *Gossypium* y al ambiente actual ocupado por las poblaciones silvestres. Estudios futuros deberán caracterizar detalladamente los mecanismos fisiológicos, morfológicos y moleculares, que permiten a *G. hirsutum* tolerar concentraciones de sal tan elevadas; es decir, las fases de respuesta a estrés salino, osmótica e iónica, deben ser estudiadas. Por otro lado, evaluar un mayor rango de concentración de NaCl en el crecimiento de algodón silvestre y cultivado, podría permitir detectar más individuos susceptibles o sobresalientes y una posible diferenciación poblacional, además sería interesante conocer el efecto del proceso de domesticación sobre la tolerancia a estrés salino. A pesar de las ventajas que el cultivo de tejidos ofrece, se deberán realizar evaluaciones en campo para validar los resultados obtenidos *in vitro*.

En el presente trabajo se exploró la diversidad genética en tres genes que codifican factores de transcripción, y se detectó variación considerable en los genes regulatorios analizados; sin embargo, no pudieron ser correlacionadas con las respuestas obtenidas de los experimentos *in vitro* por su homogénea respuesta al estrés. La contribución de elementos regulatorios a la evolución de caracteres adaptativos en especies de plantas no modelo ha sido muy poco explorada (Martin *et al.*, 2010), por lo que resultará interesante caracterizar los cambios en los patrones de transcripción derivados de la variación molecular en dichos loci, así como sus consecuencias ecológicas.

Se detectó la huella de la selección natural en *GhDREB* y *GhNAC4*, lo cual resulta bastante lógico considerando que la salinidad ha sido y será un régimen de selección

fuerte e importante a lo largo de la distribución de poblaciones naturales de *G. hirsutum*, aunque otros factores que limitan la distribución de la especie también pueden haber tenido un efecto en dichos genes. Las herramientas genómicas disponibles en la actualidad facilitarán la identificación de un mayor número de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) y se podrá detectar selección en una gran cantidad de genes.

Perspectivas

Los suelos en los que *G. hirsutum* se distribuye deberán ser caracterizados para conocer el rango en la concentración de NaCl así como de diversos iones y nutrientes que afectan el crecimiento de algodón. Esta información aunada a la caracterización de mayores regiones genómicas, permitirá detectar estructuración poblacional y correlacionarla con las características del suelo, para así comprender procesos de adaptación local y la forma en que nuevas mutaciones benéficas se distribuyen a través de las metapoblaciones (Manel *et al.*, 2003).

El perfil de los suelos también permitirá enfocar la caracterización funcional de los individuos que habitan en ambientes con las mayores concentraciones de NaCl, y los mecanismos fisiológicos y moleculares que permiten a los individuos sobrevivir en dichos ambientes ser elucidados. Además, seleccionar localidades con la mayor y menor concentración de NaCl permitirá realizar transplantes recíprocos, lo cual contribuirá al entendimiento de procesos de adaptación local.

Conocer la distribución de la variación genética adaptativa permitirá comprender la forma en que las plantas se adaptan a su ambiente, pero además contribuirá en la toma de decisiones para conservación de recursos genéticos sobre todo frente a escenarios de cambio climático (Mane *et al.*, 2010).

Este estudio de la variación en caracteres funcionales constituye la primera aproximación al análisis de la variación funcional encontrada en las poblaciones silvestres de *G. hirsutum*; y es sólo el primer paso para examinar la arquitectura genómica de

caracteres adaptativos, por lo que será necesario integrar los componentes genómicos, ambientales y fenotípicos en paisajes de adecuación (Eckert & Dyer, 2012).

Bibliografía citada

- Agarwal, P. K., P. Agarwal, M. K. Reddy & S. K. Sopory. 2006. Role of DREB transcription factores in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 25: 1263-1274
- Aguilar-Meléndez, A., P. L. Morrell, M. L. Roose & S-C Kim (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanacea) from Mexico. *American Journal of Botany* 96 (6): 1190.1202.
- Ahmad, S., N.I. Khan, M.Z. Iqbal, A. Hussain and M. Hassan, 2002. Salt tolerance of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Asian J. Plant Sci.*, 1: 715-719.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ashraf, M. & S. Ahmad. 2000a. Influence of sodium chloride on ion accumulation, yield components, and fiber characteristics in salt tolerant and salt-sensitive lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Field Crops Res.* 66: 115-127.
- Ashraf, M. & S. Ahmad. 2000b. Genetic effects for yield componenets and fibre characteristics in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivated under salinized (NaCl) conditions. *Agronomie* 20: 917-926.
- Ashraf, M. 2002. Salt Tolerance of Cotton: Some New Advances. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21 (1): 1-30.
- Badigannavar, A. 2010. Characterization of quantitative traits using association genetics in tetraploid and genetic linkage mapping in diploid cotton (*Gossypium* spp.) A Dissertation. <http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-01042010-165217/unrestricted/Badigannavar_diss.pdf>. Consultado el 23 de mayo de 2012.
- Ballentine, B. & R. Greenberg. 2010. Common garden experiment reveals genetic control of phenotypic divergence between swamp sparrow subspecies that lack divergence in natural genotypes. *PLoS ONE* 5(4): e10229.
- Bartels, D. & R. Sunkar. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 23-58.
- Biswas, S. & J. M. Akey. 2006. Genomic insights into positive selection. *TRENDS in Genetics* 22 (8).
- Bradow, J. M. & P. J. Bauer. 2010. Germination and seedling development. En: *Physiology of Cotton* Edited by J. McD. Stewart, D. M. Oosterhuis, J. J. Heitholt, J. R. Mauney. Springer Sciene+Business Media.

- Brubaker C. L., A. H. Paterson y J. F. Wendel. 1999. Comparative genetic mapping of allotetraploid cotton and its diploid progenitors. *Genome*, 42: 184-203.
- Castillo, C. A. 2007. La selección natural a nivel molecular. *En Ecología Molecular*.
 Compiladores: Luis Eguiarte, Valeria Souza & Xitlali Aguirre, México.
- Clement M, Posada D and Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660
- Cheviron Z. A. & R. T. Brumfield. 2012. Genomic insights into adaptation to high-altitude environments. *Heredity* 108: 354-361.
- Churchill G. A. y R. H. Doerge. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963-971.
- Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R. 2005. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139: 847–856.
- Diamond, J. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418: 700-708
- Doebley, J. F., Gaut, B. S. & B. D. Smith. 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127 (7): 1309-1321.
- Dubouzet, J. G., Y. Sajuma, Y. Ito, M. Kasuga, E. G. Duzouzet, S. Miura, M. Seki, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki. 2003. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high salt-, and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal* 33: 751-763.
- Eckert, J. A. & R. J. Dyer. 2012. Defining the landscape of adaptive genetic diversity. *Molecular Ecology* 21: 2836-2838.
- Edgar, R. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-97.
- Flowers, T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 55: 307-319.
- Flowers, T. J & A. R. Yeo. 1986. Ion relations of plants under drought and salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 75-91.
- Fryer, M. J., K.Oxborough, P. M. Mullineaux & N. R. Baker. Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *Journal of Experimental Botany* 53 (372): 1249-1254.
- Fryxell, P.A. 1979. The natural history of the cotton tribe. Texas A and M University Press, College Station, Texas.

- Fu, Y. X. & W. H. Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133, 693-709.
- Gao, S., M. Chen, L. Xia, H. Xiu, Z. Xu, L. Li, C. Zhao, X. Cheng and Y. Ma. 2008. A cotton DRE-binding transcription factor gene, GhDREB, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat. *Plant Cell Rep* 28: 301-311.
- García-Palacios, P., R. Milla, M. Delgado-Baquerizo, N. Martín-Robles, M. Álvaro-Sánchez & D. H. Wall (2013). Side-effects of plant domestication: ecosystem impacts of changes in litter quality. *New Phytologist* 198 (2).
- George, E. F., M. A. Hall, G-J De Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background. Springer.
- Gillespie, J. H. 2004. *Population Genetics: a Concise Guide*. The John Hopkins University Press.
- Gorham, J., A. Läuchli & E. O. Leidi. 2010. Plant responses to salinity. Pp. 139-151, en: Stewart, J. McD., D. M. Osterhuis, J. J. Heitholt & J. R. Mauney (eds.). *Physiology of cotton*. Springer, USA.
- Guo, Y-H., Y-P. Yu, D. Wang, C. Wu, G. Yang, J. Huang & C. Zheng. 2009. GhZFP1, a novel CCCH-type zinc finger protein from cotton, enhances salt stress tolerance and fungal disease resistance in transgenic tobacco by interacting with GZIRD21A and GZIPR5. *New Phytologist* 183: 62-75.
- Hall, T. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-95.
- Huang, B., L. G. Jin and J. Y. Liu. 2006. Identification and characterization of the novel gene GhDBP2 encoding a DRE-binding protein from cotton (*Gossypium hirsutum*). *J Plant Physiol* 165: 214-223.
- Hurst, L. D. 2009. Genetics and the understanding of selection. *Nature Reviews Genetics*, 10: 83-93.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 1998. Banco de Información sobre Perfiles de Suelo, versión 1.0. México. <<http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/prodyserv/prods-geograficos/perfiles/perf.pdf>> Consultado el 23 de mayo de 2012.
- Jiang, C., R. J. Wright, K. M. El-Zik & A. H. Paterson. 1998. Polyploid formation created unique avenues for responses to selection in *Gossypium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4419-4424.
- Khadi, B. M., V. Santhy & M. S. Yadav. 2010. *Cotton: Biotechnological Advances*. En *Cotton: An Introduction* U. B. Zehr (editor) pp. 1-5. Springer-Verlag.

- Kumar, S., P. Sharma, D. Pental. 1998. A genetic approach to in vitro regeneration of non-regenerating cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. *Plant Cell Reports* 18: 59-63.
- Lacape, J-M., T-B. Nguyen, S. Thibivilliers, B. Bojinov, B. Courtois, R. G. Cantrell, B. Burr & B. Hau. 2003. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense* backcross population. *Genome* 46: 612-626.
- Lacape, J. M. y T. B. Nguyen. 2005. Mapping Quantitative Trait Loci Associated with Leaf and Stem Pubescence in Cotton. *Journal of Heredity* 96 (4): 441-444.
- Ledbetter, C.A. 1987. Heritability of salt tolerance during germination and emergence in short staple cotton. *Dissertation-Abstracts-International, Sciences and Engineering*. 47 (11):113.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Maas, E.V. 1985. Crop tolerance to saline sprinkling water. *Plant Soil*. 89: 273–284.
- Madhava K. V., A. S. Raghavendra, and K. Janardhan. 2006. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springerlink, Netherlands.
- Manel, S., M. K. Schwartz, G. Luikart & P. Taberlet. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 18 (4).
- Martin, C., N. Ellis & F. Rook. 2010. Do transcription factors play special roles in adaptive variation? *Plant Physiology* 154: 506-511.
- Mei, M., N. H. Syed, W. Gao, P. M. Thaxton, C. W. Smith, D. M. Stelly, Z. J. Chen. 2004. Genetic mapping and QTL analysis of fiber-related traits in cotton (*Gossypium*). *Theor Appl Genet* 108: 280-291.
- Mehrgarh, Pakistan: Analysis of Mineralized Fibres from a Copper Bead. *Journal of Archaeological Science*, 29: 1393-1401.
- Meng, C., C. Cai, T. Zhang and W. Guo. 2009. Characterization of six novel NAC genes and their responses to abiotic stresses in *Gossypium hirsutum* L. *Plant Science* 176: 352-359.
- Mishra, R., H-Y. Wang, N. R. Yadav & T. A. Wilkins. 2003. Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa) – a step towards genotype-independent regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 21-35.
- Mitic, N., D. Dodig & R. Nikolic. 2006. Variability of in vitro culture response in wheat genotypes, McMichael, B. L. D. M. Oosterhuis, J. C. Zak & C. A. Beyrouthy. Growth and Development of root systems. Libro physiology
- Mitic, N., D. Dodig & R. Nikolic. 2006. Variability of in vitro culture response in wheat genotypes, genotype and environmental effects. *Genetika*, 38 (3) 183-192.

- Morris, J. P., S. Thatje & C. Hauton. 2013. The use of stress-70 proteins in physiology: a re-appraisal. *Molecular Ecology* 22 (6): 1494-1502 (2002).
- Moulherat C., M. Tengberg, J-F. Haquet & B. Mille. 2002. First Evidence of Cotton at Neolithic
- Mukhopadhyay, A., S. Vij & A. Tyagi. 2004. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *PNAS* 101 (16): 6309-6314.
- Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167: 645-663.
- Munns, R. & M. Tester. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-81.
- Nei, M. & T. Gojobori, 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418-426.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York. Columbia University Press.
- Neigenfind, J., G. Gyetvai, R. Basekow, S. Diehl, U. Achenback, C. Gebhardt, J. Selbig & B. Kersten. 2008. Haplotype inference from unphased SNP data in heterozygous polyploids based on SAT. *BMC Genomics* 9: 356.
- Nevo E. & G. Chen. 2010. Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell & Environment* 33: 670-685.
- Pang, C-H & B-S Wang. 2008. Oxidative stress and salt tolerance in plants. . U. Lüttge et al. (eds.), *Progress in Botany* 69. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Pérez-Clemente, R. M. & A. Gómez-Cadenas. *In vitro* tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions InTech. Capítulo de Agricultural and Biological Sciences "Recent advances in plant in vitro culture", edited by Annairta Leva and Laura M. R. Rinaldi. 2012.
- Posada, D. & K. A. Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 1.
- Rai, M., R. Kalia, R. Singh, M. P. Gangola & A. K. Dhawan. 2011. Developing stress tolerant plants through in vitro selection-An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* 71: 89-98.
- Reinisch, A., J. M. Dong, C. L. Brubaker, D. M. Stelly, J. F. Wendell & A. H. Paterson. 1994. A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* x *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome. *Genetics*, 138: 829-847.
- Roach, D. & R. Wulff. 1987. Maternal Effects in Plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 209-35.

- Rockman, M. V. 2012. The QTN program and the alleles that matter for evolution: all that's gold does not glitter. *Evolution* 66: 1-17.
- Rong, J., C. Abbey, J. E. Bowers, C. L. Brubaker, C. Chang, P. W. Chee, T. A. Delmonte, X. Ding, J. J. Garza, B. S. Marler, C. Park, G. J. Pierce, K. M. Rainey, V. K. Rastogi, S. R. Schulze, N. L. Trolinder, J. F. Wendel, T. A. Wilkins, T. D. Williams-Coplin, R. A. Wing, R. J. Wright, X. Zhao, L. Zhu & A. H. Paterson. 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.
- SEMARNAT-Colegio de Posgraduados. 2002. Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre en la República Mexicana, escala 1:250,000. Memoria Nacional, SEMARNAT-Colegio de Posgraduados, México, 58 pp. SEMARNAT, México.
- SFA-SAGARPA. 2011. Perspectivas de largo plazo para el sector agropecuario de México 2011.2020. http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/estudios_economicos/escenariobase/perspectivalp_11-20.pdf. Consultado el 5 de junio de 2012.
- Shappley, Z. W., J. N. Jenkins, W. R. Meredith & J. C. McCarty Jr. 1998. An RFLP linkage map of upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. *Theor Appl Genet* 97: 756-761.
- Sletvold, N. & Agren, J. 2012. Variation in tolerance to drought among Scandinavian populations of *Arabidopsis lyrata*. *Evol. Ecol* 26: 559-577.
- Stephens, S. G. 1958. Salt water tolerance of seeds of *Gossypium* species as a possible factor in seed dispersal. *The American Naturalist* XCII, 863.
- Stephens, S. G. 1967. Evolution under domestication of the New World cottons (*Gossypium* spp.). *Ciencia e Cultura* 19: 118-134.
- Stephens, M., N. Smith & P. Donnelly. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68: 978-989.
- Stephens, M. & P. Donnelly, 2003. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American Journal of Human Genetics*, 73: 1162-1169.
- Sul, I.W. & S.S. Korban. 1996 A highly efficient method for isolating genomic DNA from plant tissues. *Plant Tissue Culture Biotechnology*, 2, 113–116.
- Sun, J., H. Jiang, Y. Xu, H. Li, X. Wu, Q. Xie & C. Li. 2007. The CCCH-type zinc finger proteins AtSZF1 and AtSZF2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 48: 1148-1158.

- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tester, M. & R. Davenport. 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-527.
- Thomas, J.R. 1980. Osmotic and specific salt effects on growth of cotton. *Agron. J.*, 72: 407–412.
- Thorpe, R. S., J. T. Reardon, & A. Malhotra. 2005. Common Garden and Natural Selection Experiments Support Ecotypic Differentiation in the Dominican Anole (*Anolis oculatus*). *The American Journalist* 165 (4): 495-504.
- Ulloa, M., R. Meredith Jr. 2000. Genetic linkage map and QTL analysis of agronomic and fiber quality traits in an interspecific population. *J Cotton Sci* 4: 161-170.
- Ulloa, M., W. R. Meredith Jr., Z. W. Shappley, and A. L. Kahler. 2002. RFLP genetic linkage maps from four F2-3 populations and a joinmap of *Gossypium hirsutum* L. *Theor. Appl. Genet.* 104: 200-208.
- Wegier, A. L., A. Alavez, V., L. O. Jardón, L. Moyers, D. Ortega del Vecchyo & D. Piñero. 2009. *Análisis para la determinación de los centros de origen y diversidad de las especies mexicanas del género Gossypium*, Instituto de Ecología, UNAM.
- Wegier, A., A. Piñeyro-Nelson, J. Alarcón, A. Gálvez-Mariscal, E. R. Álvarez-Buylla, and D. Piñero. 2011. Recent long-distance transgene flow into wild populations conforms to historical patterns of gene flow in cotton (*Gossypium hirsutum*) at its center of origin. *Molecular Ecology*, 20 (19): 4182-4194.
- Wendel, J. F., C. L. Brubaker & A. E. Percival. 1992. Genetic Diversity in *Gossypium hirsutum* and the Origin of Upland Cotton. *American Journal of Botany*, 79 (11): 1291-1310.
- Wendel, J. F. & C. L. Brubaker. 1994. Reevaluating the Origin of Domesticated Cotton (*Gossypium hirsutum*: Malvaceae) using Restriction Fragment Length Polimorphism (RFLPs). *American Journal of Botany*, 81(10): 1309-1326.
- Wendel J. F., A. Shnabel & T. Seelanan. 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 280-284.
- Wendel, J. F., C. L. Brubaker & T. Seelanan. 2010. *The origin and evolution of Gossypium*. En: Physiology of Cotton. J. McD. Stewart, D. M. Oosterhuis, J. J. Heitholt & J. R. Mauney (editors) pp 1-18. Springer.

- Wu, C.A., G.D. Yang, Q. W. Meng and C. C. Zheng. 2004. The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiology* 45: 600-607.
- Yildiz, M. The prerequisite of the success in plant tissue culture: high frequency shoot regeneration. Capitulo de Agricultural and Biological Sciences "Recent advances in plant in vitro culture", edited by Annairta Leva and Laura M. R. Rinaldi. 2012.
- Yu, S., W. Wang & B. Wang. 2012. Recent progress of salinity tolerance research in plants. *Russian Journal of Genetics* 48 (5): 497-505.
- Zar, J. H. 2010. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River. 944 pp.
- Zhang, J. W. & Guo, T. Zhang. 2002. Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. x *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population. *Theor Appl Genet* 105: 1166-1174.
- Zhu, Jian-Kang. 2001. Plant salt tolerance. *TRENDS in Plant Science* 6 (2).

Anexo I: Preparación de Medio de Cultivo Murashige&Skoog (MS)

Para un litro de medio:

4.43 g de formulación comercial de medio MS (poner marcas usadas)

30.0 g de D-Sacarosa

Ajustar pH a 5.7 con NaOH y agregar 8 g de agar (marca).

Esta solución debe llevarse a ebullición hasta que el agar se disuelva completamente; a continuación se colocan 5 mL de medio en tubos de (poner capacidad) vidrio con tapa y se esteriliza en autoclave (15 lb/in² a 121°C durante 15 min).

Anexo II: Preparación de Medio de Cultivo MS con NaCl [140 mM]

Para un litro de medio:

4.43 g de formulación comercial de medio MS

30.0 g de D-Sacarosa

Ajustar pH a 5.7 con NaOH

Agregar 8.174 g de NaCl

La conductividad eléctrica de esta solución es aproximadamente 24 mS/cm.

Agregar 8 g de agar y llevar a ebullición hasta que el agar se disuelva completamente; a continuación se colocan 5 mL de medio en tubos de vidrio con tapa y se esteriliza en autoclave (15 lb/in² a 121°C durante 15 min).

Anexo III: Extracción de DNA con el buffer CTAB(modificado de *Wegier* et al, 2011 y Sul & Korban 1996)

- 1.- Aproximadamente 1 g de tejido se muele en un mortero con 1 mL de buffer de extracción CTAB2x (Tris-HCl 100 mM pH8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% y β -ME 0.3%) con el objeto de romper las paredes celulares y extraer el DNA.
- 2.- La mezcla de CTAB2x y tejido se recupera en un tubo de 1.5 mL y se centrifuga a 10,000 rpm durante 8 min a 4°C.
- 3.- Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 1 mL de buffer CTAB2x. Una vez resuspendido, se incuba en un baño a 60°C durante 10 min.
- 4.- Posteriormente se agregan 600 μ L 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).
- 5.- El sobrenadante se recupera (aproximadamente 600 μ L) y traslada a un tubo nuevo, el DNA aquí se precipita con 500 μ L de isopropanol frío, se agita suavemente y se deja reposar de 30 min a temperatura ambiente o de 12 a 24 horas en refrigeración-4°C.
- 6.- A continuación se centrifuga a 9000 rpm durante 5 min a 4°C y se elimina el sobrenadante. El DNA se limpia agregando 1 mL de etanol 70% frío y centrifugando a 7000 rpm durante 5 min a 4°C.
- 7.- Por último, tras eliminar el sobrenadante y dejar evaporar el etanol (30 min aprox.), el pellet se resuspende con 200 μ L de ddH₂O y la muestra se almacena a -20°C (a largo plazo a -86°C).
- 8.- Dilución de trabajo 1:10