

Caracterización morfológica y molecular de poblaciones de pasto banderita (*Bouteloua curtipendula*) en Chihuahua, México

Morphological and molecular characterization of sideoats grama (*Bouteloua curtipendula*) populations in Chihuahua, Mexico

Carlos Raúl Morales Nieto^a, Carlos Avendaño Arrazate^b, Alicia Melgoza Castillo^a,
Katia del Carmen Gil Vega^c, Adrián Quero Carrillo^d, Pedro Jurado Guerra^e,
Martin Martínez Salvadore^e

RESUMEN

El pasto banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.] es una especie nativa de importancia ganadera; sin embargo, prácticas inadecuadas de pastoreo han reducido su diversidad genética. Se exploró y analizó la diversidad morfológica y genética de 51 poblaciones de pasto banderita del estado de Chihuahua. Las plantas se trasplantaron bajo condiciones de temporal. Dos años después se realizó la caracterización morfológica. Para evaluar la variabilidad genética se utilizaron marcadores moleculares AFLP. El análisis de componentes principales (ACP) mostró que los tres primeros componentes (CP), explican el 73.83 % de la variación. El CP1 presentó una correlación significativa ($P < 0.0001$) con rendimiento de materia seca (88 %), densidad de tallos (85 %), diámetro de macollo (83 %), altura de follaje (82 %), altura de planta (79 %) y longitud de hoja (65 %). El análisis de AFLP con cuatro pares de iniciadores detectó 186 bandas; 80.67 % (150 bandas) presentó polimorfismo. El mayor porcentaje de polimorfismo (93.75 %) y bandas polimórficas (48) se obtuvo con la combinación de iniciadores *EcoRI*-ACT+*MseI*-CTG. Las poblaciones de banderita presentaron alta variabilidad morfológica y molecular. Se detectaron ecotipos (444, 359 y 557) con potencial forrajero de acuerdo a su variabilidad morfológica y molecular para ser incluidos en programas de restauración de pastizales.

PALABRAS CLAVE: *Bouteloua curtipendula*, Variación morfológica, Caracterización molecular, Poblaciones.

ABSTRACT

Sideoats grama [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.] is an important native species for cattle production. However, inappropriate grazing practices have reduced its genetic diversity. The morphological and genetic diversity of 51 populations of sideoats grama in Chihuahua State was explored and analyzed. Transplanting was performed under natural conditions; two years later, morphological characterization was performed. To assess genetic variability AFLP molecular markers were used. Principal component analysis (PCA) showed that the first three components (PC) explained 73.83 % of variation. PC1 showed a significant correlation ($P < 0.0001$) in dry matter yield (88 %), stem density (85 %), tiller diameter (83 %), height of foliage (82 %), plant height (79 %), and leaf length (65 %). An AFLP analysis with four pairs of primers detected 186 bands; 80.67 % (150 bands) had polymorphism. The highest percentage of polymorphism (93.75 %) and polymorphic bands (48) was obtained with the primer combination of *EcoRI*-ACT + *MseI*-CTG. Sideoats grama population presented a high morphological and molecular variability. Based on high forage potential, ecotypes (444, 359 y 557) were selected to be included in grassland restoration programs.

KEY WORDS: *Bouteloua curtipendula*, Morphological diversity, Molecular characterization, Populations.

Recibido el 13 de abril de 2015. Aceptado el 13 de agosto de 2015.

a Facultad de Zootecnia y Ecología-Universidad Autónoma de Chihuahua. México.

b Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). C. E. Rosario Izapa, Chiapas. Km. 18. Carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla Chico, Chiapas. CP. 30780. avendano.carlos@inifap.gob.mx. Correspondencia al segundo autor.

c CINESTAV-Irapuato. México.

d Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo. México.

e Sitio Experimental La Campana-INIFAP. México.

INTRODUCCIÓN

El 65 % de los pastizales nativos de la región centro y norte de México presentan erosión y desaparición de especies forrajeras de importancia ganadera⁽¹⁾. En el estado de Chihuahua el sobrepastoreo y la fuerte invasión de especies exóticas, han sido las principales causas de este deterioro⁽²⁾. Por lo anterior, es importante recolectar y conservar materiales forrajeros nativos en los centros de origen, ya que constituye la base para asegurar la alimentación del ganado⁽³⁾.

El pasto banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.] es una especie nativa presente en planicies y lomeríos rocosos, produce abundante forraje apetecido por el ganado, se adapta a diferentes tipos de suelo y condiciones climáticas y es resistente a la sequía⁽⁴⁾. Presenta buen valor forrajero y es considerado como excelente forraje para pastoreo y fauna silvestre⁽⁵⁾; sin embargo, el sobrepastoreo ha provocado la reducción y desaparición de grandes poblaciones de esta especie⁽⁶⁾. El pasto banderita es una especie que se adapta a diversos ambientes y puede dar lugar a diferentes ecotipos con diferencias morfológicas, motivo por el cual es importante hacer evaluaciones *ex situ*, donde todos los ecotipos se colocan en un mismo ambiente para detectar características de importancia dentro de la especie⁽⁷⁾. De esa manera, se pueden identificar características sobresalientes evaluando descriptores morfológicos en la diversidad de poblaciones nativas⁽⁸⁾.

Las caracterizaciones morfológicas se han llevado a cabo en gramíneas nativas dentro de los géneros *Andropogon*⁽⁹⁾, *Panicum*^(10,11), *Hymenachne*⁽¹²⁾, *Bouteloua*⁽¹³⁾, entre otros. Además, en la caracterización morfológica se han detectado correlaciones significativas y no significativas entre la diversidad de características morfológicas y localidad de sitios muestreados⁽¹⁴⁾. Por lo tanto, es importante evaluar características morfológicas y genéticas, ya que las características morfológicas son influenciadas por el ambiente. El uso de marcadores moleculares como es el polimorfismo

INTRODUCTION

In central and northern Mexico region 65 %, of native grasslands present erosion and reduction of important livestock forage species⁽¹⁾. In the State of Chihuahua, overgrazing and invasion of exotic species have been among the main causes of this deterioration⁽²⁾. Thus, it is important to collect and preserve native forage materials in the centers of origin, since it constitutes the foundation for ensuring feedstock for cattle⁽³⁾.

Sideoats grama [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.] is a native species found in plains and rocky hillocks, produces abundant high quality forage for livestock, adapts to different types of soil and climatic conditions and possess drought tolerance⁽⁴⁾. It has a good forage value and it is regarded as an excellent fodder for grazing and wildlife⁽⁵⁾; however, overgrazing has led to its reduction and disappearance of large populations of this species⁽⁶⁾. Sideoats grama is a species that adapts to different environments and several morphological-based ecotypes can be found, that is why it is important to carry out evaluations *ex situ*, where all ecotypes are placed in the same environment to detect characteristics of importance within the species⁽⁷⁾. In such a way, it is possible to identify exceptional characteristics by evaluating morphological descriptors in the diversity of native populations⁽⁸⁾.

Morphological characterizations have been performed with native grasses within the genera *Andropogon*⁽⁹⁾, *Panicum*^(10,11), *Hymenachne*⁽¹²⁾, *Bouteloua*⁽¹³⁾, among others. In addition, the morphological characterization has detected some significant correlations between diversity of morphological characteristics and location of sampling sites⁽¹⁴⁾. Therefore, it is important to evaluate morphologic and genetic characteristics, as the environment influences the morphologic characteristics. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is a molecular marker that it is not affected by the environment. In addition, it can detect genotype level diversity and has been used with grasses^(15,16) to determine their

en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), no son afectados por el ambiente. Además estos pueden detectar diversidad a nivel del genotipo y han sido empleados en pastos^(15,16) para conocer su variabilidad genética⁽¹⁷⁾. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la diversidad morfológica y molecular en poblaciones de pasto banderita, recolectadas en varias localidades de Chihuahua para detectar poblaciones con alto potencial forrajero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el año 2006 se recolectaron 135 ecotipos de pasto banderita en ranchos

genetic variability⁽¹⁷⁾. The aim of this study was to characterize the morphological and molecular diversity in populations of sideoats grama, collected from various locations in Chihuahua to detect populations with high forage potential.

MATERIAL AND METHODS

During 2006, 135 ecotypes of sideoats grama were collected in cattle ranches in the state of Chihuahua (29 municipalities) and grouped into 51 populations, which were used for evaluations to understand and define the population structure. Table 1 shows the municipalities and some environmental variables of the collection sites.

Cuadro 1. Características ambientales de sitios de recolecta de 51 poblaciones de pasto banderita (135 ecotipos) en Chihuahua, México

Table 1. Environmental characteristics of 51 collection sites of sideoats grama populations (135 ecotypes) in Chihuahua, Mexico

POB-ECO	PRECI	TEMP	ALTITUD	Municipality	POB-ECO	PRECI	TEMP	ALTITUD	Municipality
1-9	415	18	1679	Chihuahua	27-341	319	16.2	1543	Buenaventura
2-13	415	18	1547	Chihuahua	28-342	319	16.2	1543	Buenaventura
3-35	462	18.3	1484	Satevó	29-359	319	16.2	1534	Buenaventura
4-41	452	18.9	1656	Valle de Zaragoza	30-375	319	16.2	1522	Buenaventura
5-58	471	16	1665	Parral	31-396	415	18	1553	Chihuahua
6-68	471	16	1665	Parral	32-444	374	18.7	1383	Jiménez
7-83	454	17.3	1665	Valle de Allende	33-448	346	19.4	1318	Camargo
8-89	364	18.3	1877	Villa López	34-455	346	19.4	1403	Camargo
9-99	470	14.3	2180	Huejotitán	35-463	18.5	18.3	1567	Julimes
10-104	470	16	1608	San Fco del Oro	36-477	415	18	1602	Chihuahua
11-116	470	17.8	2174	Balleza	37-495	415	18	1577	Chihuahua
12-127	683	10.0	2068	Bocoyna	38-511	415	18	1310	Chihuahua
13-139	420	13.7	1892	Bachíniva	39-517	306	18.4	1233	Aldama
14-158	439	14	1964	Namiquipa	40-531	307	20	1309	Coyame
15-165	478	14.2	2004	Cuauhtémoc	41-540	307	20	1343	Coyame
16-171	496.7	16.4	1873	Gran Morelos	42-547	307	20	1386	Coyame
17-180	478	14.2	1646	General Trías	43-557	265	21.9	1163	Ojinaga
18-192	415	18	1617	Chihuahua	44-563	305.2	19	1180	Manuel Benavides
19-200	415	18	1589	Chihuahua	45-582	265	21.9	1204	Ojinaga
20-217	415	18	1615	Chihuahua	46-594	265	21.9	1204	Ojinaga
21-233	341	17.2	1422	Villa Ahumada	47-600	265	21.9	1282	Ojinaga
22-243	341	17.2	1213	Villa Ahumada	48-619	290	19.1	1327	Rosales
23-275	297.2	15.4	1339	Ascensión	49-650	415	18	1837	Chihuahua
24-286	372	16	1384	Janos	50-665	415	18	1653	Chihuahua
25-303	372	16	1399	Janos	51-700	439.3	14	1662	Namiquipa
26-317	346	16.4	1477	Casas Grandes					

POB=population; ECO=ecotype; PRECI=precipitation; TEMP=temperature.

ganaderos del estado de Chihuahua y se agruparon en 51 poblaciones (29 municipios), las cuales se utilizaron para las evaluaciones y para conocer y definir la estructura poblacional. En el Cuadro 1 se enlistan los municipios y algunas variables ambientales de los sitios de recolecta. En cada sitio de muestreo se extrajeron cuatro plantas, con un diámetro de 2.5 cm y provistas de raíz. La parte aérea se cortó a una altura de 15 a 20 cm y cada planta se identificó con un número de colecta, donde cada población se consideró como ecotipo diferente. Las plantas se colocaron en cajas de plástico, provistas con suelo húmedo para su transporte y trasplante en el Campo Experimental La Campana del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

La topografía del sitio donde se trasplantó el material es plana con suelos de origen aluvial, textura franco arenoso y pH de 6.5. El clima es seco templado con veranos cálidos BWk, temperatura media anual de 15 a 18 °C y precipitación promedio de 355 mm anuales⁽¹⁸⁾. Se aplicó un riego de auxilio al momento del trasplante para asegurar su establecimiento. Posteriormente, las plantas se dejaron bajo condiciones de temporal (sin riego).

Caracterización morfológica

Durante la floración y dos años después del establecimiento, se evaluaron los siguientes descriptores morfológicos: altura total de la planta (AP), altura de follaje (AF), densidad de tallos (DT), grosor de tallos (GT), ancho de hoja (AH), largo de hoja (LH), longitud de inflorescencia (LI), diámetro del macollo (DM) y rendimiento de materia seca (RMS). La AP se midió desde el nivel del suelo hasta la punta de la inflorescencia más alta. La AF se midió desde el suelo hasta la altura de las hojas. El GT se midió con un vernier, tomando un tallo al azar de la parte central de la planta. Para medir LH y AH se tomó una hoja al azar de la parte central de la planta. La LI se midió tomando una inflorescencia al azar y midiendo de la base

At each sampling site four plants were extracted with a diameter of 2.5 cm, including root. The aerial part was cut at a height of 15 to 20 cm, each plant was identified with a collection number, and each population was considered as a different ecotype. The plants were placed in plastic boxes, supplied with moist soil for transport and transplantation in the “Campo Experimental La Campana” of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. The topography of the transplantation site is flat, while soils are of alluvial origin, sandy loam texture and pH of 6.5. The climate is temperate dry with warm summers BWk, annual average temperature of 16.5 °C and average annual rainfall of 355 mm⁽¹⁸⁾. Irrigation was provided at the time of transplant to promote their establishment. Subsequently, the plants were left in rainfed conditions (without irrigation).

Morphological characterization

During flowering and two years after plant establishment, the following morphological descriptors were evaluated: Total plant height (PH), foliage height (FH), stem density (SD), stem thickness (ST), leaf width (LW), leaf length (LL), inflorescence length (IL), tillering diameter (TD) and dry matter yield (DMY). PH was measured from the ground level to the tip of the highest inflorescence. The FH was measured from the ground to the height of the leaves. The ST was measured using a Vernier, randomly taking a stem of the central part of the plant. To measure LL and LW a random leaf was selected from the central part of the plant. The IL was measured by taking an inflorescence at random and measuring from the base to the tip of it. The TD was measured at the base, at ground level. The DMY was obtained by cutting the plants 5 cm above the soil and then forage was placed in paper bags and dried in a forced air oven at 70 °C for 48 h.

Molecular characterization

Ecotypes were grouped into 51 populations for analysis. DNA extraction was performed following the method of Doyle and Doyle⁽¹⁹⁾

hasta la punta de la misma. El DM se midió en la base, a nivel del suelo. El RMS se obtuvo cortando las plantas a 5 cm sobre el nivel del suelo y el forraje se colocó en bolsas de papel y se secó en una estufa de aire forzado a 70 °C por 48 h.

Caracterización molecular

Los ecotipos se agruparon en 51 poblaciones para su análisis. La extracción de ADN se realizó siguiendo el método de Doyle y Doyle⁽¹⁹⁾ y para el análisis AFLP el protocolo de Vos *et al*⁽²⁰⁾ que incluye los siguientes componentes:

a) Digestión: se añadieron 1.5 µl de solución amortiguadora de reacción (RL) 10X, 2 µl de templado de DNA a 50 ng/µl, 0.5 µl de enzima Eco RI (10 U/µl), 0.5 µL de enzima Mse I (10 U/µl) y se llevó la reacción hasta un volumen de 12.5 µl con agua desionizada estéril. La mezcla se centrifugó e incubó a 37 °C durante 2 h y por 15 min a 70 °C para inactivar las enzimas de restricción. Se corroboró en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

b) Ligación de adaptadores: a la reacción de digestión se añadieron 0.3 µl de adaptador Eco RI (50 pmol), 0.3 µl de adaptador Mse I (50 pmol), 1.2 µl de ATP (10 mM, pH 7.0), 1.0 µl de solución amortiguadora de reacción (RL) 10X, 1.0 µl de T4 DNA ligasa (5U/µl) y 6.2 µl de agua desionizada estéril, se mezcló, centrifugó e incubó por 2 h a 16 °C.

c) Preamplificación: se añadieron 2.5 µl de DNA digerido, ligado y diluido 1:10, 1.15 µl de Oligo Eco RI + A (50 ng/µl), 1.15 µl de Oligo Mse I + A (50 ng/µl), 0.5 µl de dNTPs (10 mM), 2.5 µl de solución amortiguadora de reacción de la enzima Taq DNA polimerasa, para PCR (10X), 0.65 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.2 µl de enzima Taq DNA polimerasa (5 U/µl) y 16.85 µl de agua desionizada estéril. Se mezcló, centrifugó y se puso en un termociclador a 20 ciclos a 94 °C por 30 seg, un min a 56 °C y 1 min a 72 °C, y mantenimiento final a 4 °C.

and for analysis of AFLP the protocol by Vos *et al*⁽²⁰⁾, which included the following components:

a) Digestion: 1.5 µl of buffer reaction (RL) 10X, 2 µl of DNA were added to 50 ng/µl, 0.5 µl of enzyme Eco RI (10 U/ µl), 0.5 µl of enzyme Mse I (10 U /µl) and the reaction was brought to a volume of 12.5 µl with sterile deionized water. The mixture was centrifuged and incubated at 37 °C for 2 h and 15 min at 70 °C to inactivate the restriction enzymes. It was confirmed on an agarose gel at 1% stained with ethidium bromide.

b) Ligation of adapters: to the digestion reaction 0.3 µl of adapter Eco RI (50 pmol), 0.3. µl of adapter Mse I (50 pmol), 1.2 µl of ATP (10 mM, pH 7.0), 1.0 µl of solution was added buffer reaction (RL) 10X, 1.0 µl of T4 DNA ligase (5U/ µl) and 6.2 µl of sterile deionized water, mixed, centrifuged and incubated for 2 h at 16 °C.

c) Pre-amplification: 2.5 µl of digested DNA, ligated and diluted 1:10, 1.15 µl of Oligo Eco RI + A (50 ng/µl); 1.15 µl of Oligo Mse I + A (50 ng/µl), 0.5 µl dNTPs (10 mM); 2.5 µl of buffer enzyme reaction Taq DNA polymerase PCR (10X); 0.65 µl of MgCl₂ (50 mM); 0.2 µl of Taq DNA polymerase (5 U/µl) and 16.85 µl sterile deionized water. This was mixed, centrifuged and placed in a thermocycler for 20 cycles at 94 °C for 30 s, for 1 min at 56 °C and 1 min at 72 °C, and finally maintained at 4 °C.

d) Selective amplification: 2.0 µl of DNA pre-amplified and diluted 1:40 with 4.9 µl of sterile deionized water; 1.1 µl of reaction buffer Taq DNA enzyme polymerase; PCR (10X), 0.3 µl of MgCl₂ (50 mM); 0.5 µl of Taq DNA polymerase (5 U/µl); 1.0 µl of Oligo Mse I + 4 selective bases (30 ng/µl); 0.2 µl dNTPs (10 mM); 0.5 µl of Oligo Eco RI + 3 selective bases marked 700, 0.5 µl of Oligo Eco RI + 3 selective bases marked 800 were added. The thermocycler was programmed for one cycle at 94 °C for 30 s, 30 s at 65 °C and 1 min at 72 °C. Twelve cycles where subsequently carried out to reach the annealing temperature (65 °C) at a reduction

d) Amplificación selectiva: se añadieron 2.0 µl de DNA preamplificado y diluido 1:40, 4.9 µl de agua desionizada estéril, 1.1 µl de solución amortiguadora de reacción de la enzima Taq DNA polimerasa, para PCR (10X), 0.3 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.5 µl de enzima Taq DNA polimerasa (5 U/µl), 1.0 µl de Oligo Mse I + 4 bases selectivas (30 ng/ µl), 0.2 µl de dNTPs (10 mM), 0.5 µl de Oligo Eco RI + 3 bases selectivas marcado a 700, 0.5 µl de Oligo Eco RI + 3 bases selectivas marcado a 800. Se programó el termociclador con 1 ciclo a 94 °C por 30 seg, 30 seg a 65 °C y 1 min a 72 °C. Doce ciclos en donde subsecuentemente se disminuye la temperatura de hibridación (65 °C) 0.7 °C por ciclo, mientras las otras temperaturas se mantienen igual. Seguido de 23 ciclos a 94 °C por 30 seg, 30 seg a 56 °C y un minuto a 72 °C, al final, se mantuvo la reacción a 4 °C. La electroforesis se realizó en gel de acrilamida al 6.5%, con urea 8M y TBE 1X (Tris 1M, ácido bórico 1M, EDTA 20 mM, pH 7.0). La separación de los fragmentos amplificados se hizo en el analizador de DNA LI-COR, cargando 0.8 µl de muestra en un pozo y utilizando el marcador de peso molecular de 50 a 700 pb. Se utilizaron oligos o primers, marcados con fluorescencia, a diferentes longitudes de onda (700 nm y 800 nm)⁽²⁰⁾. Los marcadores de AFLP utilizados fueron del tipo quimioluminiscentes⁽²¹⁾.

A los datos morfológicos se les realizó un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis de conglomerados (AC), mediante el método de Ward⁽²²⁾. Para obtener la gráfica de dispersión se utilizó el programa PC-ORD y el MINITAB v15 para obtener el dendrograma. Con el patrón de bandeo de los datos moleculares se realizó una matriz binaria de presencia y ausencia de bandas. Estos datos moleculares se analizaron con el paquete estadístico NTSysPC (v 2.1). También, se estimó la similitud genética entre los ecotipos, utilizando el programa SIMQUAL con el coeficiente Dice y como método de agrupamiento, se utilizó el de Promedio Aritmético por Grupos de Pares No Ponderadas (UPGMA).

rate of 0.7 °C per cycle, while the other temperatures remain the same. Followed by 23 cycles at 94 °C for 30 s, 30 s at 56 °C and 72 °C for one minute, at the end, the reaction was kept at 4 °C. Electrophoresis was performed in acrylamide gel 6.5%, with 8M urea and 1X TBE (Tris 1M, 1M boric acid, 20 mM EDTA, pH 7.0). Separation of the amplified fragments was carried out in the DNA analyzer LI-COR Model 4200, with 0.8 µl of sample loading into a well and using the molecular weight marker 50 to 700 bp. Oligos or primers were used, fluorescently labeled, at different wavelengths (700 nm and 800 nm)⁽²⁰⁾ were used. Chemiluminescent AFLP markers were used⁽²¹⁾.

Morphological data were analyzed with principal component analyses (PCA) and cluster analyses (CA), by Ward method⁽²²⁾. PC-ORD and MINITAB v15 program were used to obtain the scatterplot and the dendrogram. A binary matrix was obtained for the presence and absence of bands with the banding pattern of the molecular data. Molecular data was statistically analyzed with NTSysPc (v 2.1). Genetic similarity between ecotypes were also estimated using the program SIMQUAL with the Dice coefficient, and the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic (UPGMA) was used as clustering method.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological characterization

Plant height ranged from 40 to 104 cm and foliage height 25 to 62 cm. The stem density and thickness ranged from 20 to 352 and 1.0 to 3.0 mm, respectively. The leaf width was 2.0 to 8.0 cm and leaf length was 6.0 to 25 cm. The inflorescence length varied from 12 to 37 cm and the tillering diameter ranged from 4 to 20 cm. Finally, the dry matter yield values were from 4 to 260 g/plant. Some of these morphological variables including foliage height, plant height, density of stems per plant, among others, agree with those values reported by Schellenberg *et al*⁽²³⁾ when assessing the phenotypic variation of sideoats grama collections in Canada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica

La altura de planta varió de 40 hasta 104 cm y la del follaje de 25 hasta 62 cm. La densidad y grosor de tallos tuvo un rango de 20 a 352 y de 1.0 a 3.0 mm, respectivamente. El ancho de hoja fue de 2.0 a 8.0 cm y la longitud de hoja de 6.0 a 25 cm. La longitud de inflorescencia mantuvo una variación de 12 a 37 cm y el rango del diámetro de macollo fue de 4 a 20 cm. Finalmente, los valores de rendimiento de materia seca fueron de 4 a 260 g/planta. Algunas de estas variables morfológicas como altura de follaje, altura de planta, densidad de tallos por planta, entre otros, coinciden con las reportadas por Schellenberg *et al*⁽²³⁾, al evaluar la variación fenotípica de colecciones de pasto banderita en Canadá.

El análisis de componentes principales (ACP) mostró que los tres primeros componentes

The principal component analysis (PCA) showed that the first three principal components (PC) explain 73.83 % of the variation. Phenotypic variables that contributed most to PC1 were dry matter yield (0.430), stem density (0.414) and tillering diameter (0.402). These variables are related to forage production potential. For PC2, leaf width (0.68) and stem thickness (0.64) contributed the most and may be related to forage quality. Similar results were obtained by Schellenberg *et al*⁽²³⁾, with positive correlations in stem density (0.51) and tillering diameter (0.50) with PC1 (Table 2).

By correlating dry matter yield with other original variables, significant correlations were observed with stem density ($r = 0.81$; $P < 0.0001$), tillering diameter ($r = 0.71$; $P < 0.0001$), foliage height ($r = 0.68$; $P < 0.0001$) and plant height ($r = 0.56$; $P < 0.0001$). In addition, the nine variables were correlated with the first three principal components. PC1 showed a significant correlation ($P < 0.0001$) with dry matter yield

Cuadro 2. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo respecto a su componente principal en 51 poblaciones de pasto banderita

Table 2. Characteristic vectors of the variables of higher descriptive value with respect to its principal component in 51 populations of sideoats grama

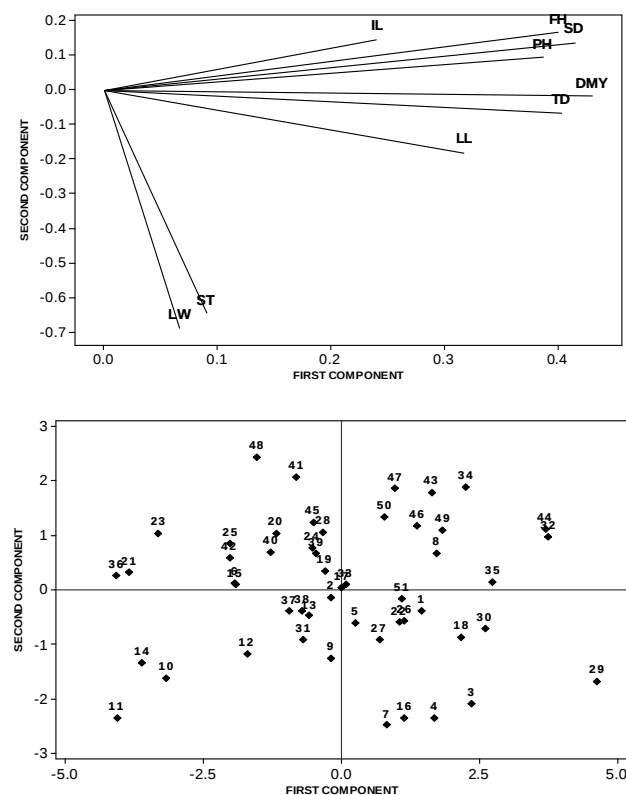
Variable	Vector characteristic		
	CP1	CP2	CP3
Foliage height, cm	0.400	-0.166	-0.068
Plant height, cm	0.386	-0.095	0.046
Stem density	0.414	-0.137	-0.265
Stem thickness, mm	0.089	0.644	-0.229
Leaf width, mm	0.066	0.686	0.288
Leaf length, cm	0.317	0.181	0.242
Inflorescence length, cm	0.240	-0.146	0.804
Tillering diameter, cm	0.402	0.065	-0.267
Dry matter yield*	0.430	0.018	- 0.096
Characteristic value	4.24	1.54	0.86
Proportion of variance	47.12	17.10	09.60
Cumulative proportion of variance	47.12	64.22	73.83

* (g/plant/35 d).

principales (CP), explican el 73.83 % de la variación. Las variables fenotípicas que más contribuyeron con el CP1 fueron rendimiento de materia seca (0.430), densidad de tallos (0.414) y diámetro de macollo (0.402). Estas variables están relacionadas con potencial para producción de forraje. Para el CP2 las variables ancho de hoja (0.68 y grosor de tallos (0.64) fueron las de mayor contribución y pueden estar relacionadas con calidad de forraje. Resultados similares mencionan Schellenberg *et al.*⁽²³⁾, quienes reportan correlaciones positivas en densidad de tallos (0.51) y diámetro del macollo (0.50) con el CP1 (Cuadro 2).

Figura 1. Distribución de la diversidad morfológica de 51 poblaciones de pasto bandera en función de los dos primeros componentes principales, obtenidos con la matriz de correlación de las nueve variables

Figure 1. Distribution of the morphological diversity of 51 populations of sideoats grama based on the first two principal components obtained from the correlation matrix of the nine variables



(88 %), stem density (85 %), tillering diameter (83 %), foliage height (82 %), plant height (79 %) and leaf length (65 %). PC2 showed a significant correlation ($P<0.0001$) only with leaf width (85 %) and stem thickness (80 %). Finally, PC3 presented only significant correlation ($P<0.0001$) with inflorescence length (74 %). Considering the above, it was found that *ex situ* collection of sideoats grama showed wide morphological diversity, probably due to environmental conditions in the sites of origin⁽²⁴⁾, thus some of these ecotypes (B444, B359, B563, B557 and B455) are important to be considered in grassland restoration.

From the correlations obtained, ecotypes can be selected (B444, B359 and B563), considering the potential for protection and soil stability. These correlations and observed variances are consistent with those obtained by Schellenberg *et al.*⁽²³⁾, in assessing the behavior of phenotypic variation of several collections of sideoats grama, collected in several locations in Canada, where they report that the first two PC explained 91 % of the variance within the collection. In addition, other studies with grasses of the genus *Lolium*⁽²⁵⁾, *Panicum*⁽¹⁰⁾, *Bromus*⁽²⁶⁾ and *Bouteloua*⁽²⁴⁾, concluded that the assessment of morphological variability is the basis for selecting material for various uses in ecological restoration or rehabilitation, forage production, materials with potential to retain soil, drought resistant ecotypes, among other purposes.

Figure 1 shows the extent of the existing morphological diversity in populations of sideoats grama. It was observed that the variables that contributed most were dry matter yield, stem density, forage height, plant height and tillering diameter. Morphological and genetic variability is useful in the search and selection of characters such as forage yield and seed quality. Since sideoats grama has the property of being an apomictic species, which allows their progeny to inherit these characteristics. With the observed variation, a gene bank can be established to preserve and evaluate this variation in breeding programs and create

Al correlacionar el rendimiento de materia seca con las otras variables originales, se presentaron correlaciones significativas con las variables densidad de tallos ($r = 0.81$; $P < 0.0001$), diámetro de macollo ($r = 0.71$; $P < 0.0001$), altura de follaje ($r = 0.68$; $P < 0.0001$) y altura de planta ($r = 0.56$; $P < 0.0001$). Además, se correlacionaron las nueve variables con los tres primeros componentes principales. El CP1 presentó una correlación significativa ($P < 0.0001$) con rendimiento de materia seca (88 %), densidad de tallos (85 %), diámetro de macollo (83 %), altura de follaje (82 %), altura de planta (79 %) y longitud de hoja (65 %). El CP2 presentó una correlación significativa ($P < 0.0001$) solo con ancho de hoja (85 %) y grosor de tallos (80 %). Por último, el CP3 presentó solo correlación significativa ($P < 0.0001$) con longitud de inflorescencia (74 %). Considerando lo anterior, se encontró que la colección *ex situ* de pasto banderita presentó amplia diversidad morfológica, debida probablemente a las condiciones ambientales de los sitios de origen⁽²⁴⁾, por lo que algunos de estos ecotipos (B444, B359, B563, B557 y B455) tienen características importantes para ser considerados en la restauración de pastizales.

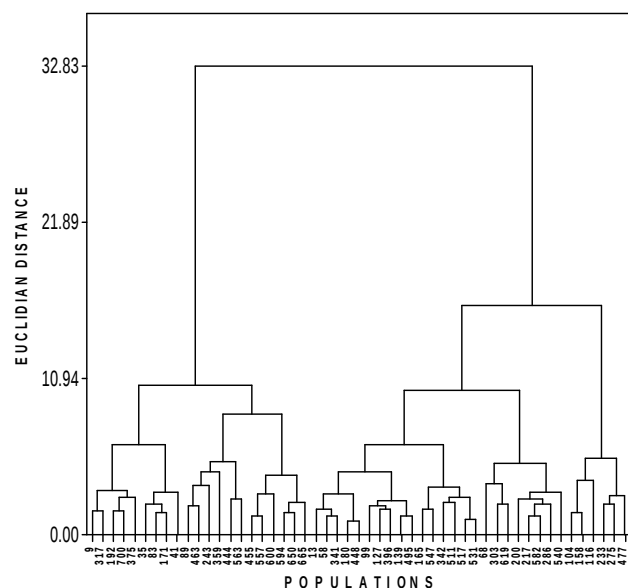
A partir de las correlaciones obtenidas se pueden seleccionar los ecotipos B444, B359 y B563, considerando el potencial que tienen para protección y estabilidad de suelo. Estas correlaciones y varianzas observadas, son congruentes con las obtenidas por Schellenberg *et al*⁽²³⁾, al evaluar el comportamiento en la variación fenotípica de varias colecciones de pasto banderita, recolectas en varias localidades de Canadá, donde reporta que los primeros dos CP explicaron el 91 % de la varianza entre colección. Además, se han realizado otros estudios en pastos del género *Lolium*⁽²⁵⁾, *Panicum*⁽¹⁰⁾, *Bromus*⁽²⁶⁾ y *Bouteloua*⁽²⁴⁾, los cuales concluyen que la evaluación de la variabilidad morfológica constituye la base para seleccionar material para diversos usos en la rehabilitación o restauración ecológica; producción forrajera, materiales con potencial para retener suelo, ecotipos resistentes a sequía, entre otros propósitos.

improved ecotypes according to these descriptors and potential for use in grassland rehabilitation programs.

Cluster analysis combined three groups based on Ward method (Figure 2). Group I (GI) integrated 21 populations from 15 municipalities (Chihuahua, Casas Grandes, Namiquipa, Buenaventura, Satevó, Valle de Allende, Gran Morelos, Valle de Zaragoza, Villa Lopez, Julimes, Villa Ahumada, Jimenez, Manuel Benavides, Camargo and Ojinaga). These ecotypes are characterized by having the highest values of all nine variables evaluated. Subgroup I-a integrated nine populations and was characterized because it had the highest plant height (96 cm). The I-b subgroup combined six populations that had on average the highest stem density values (271), length of leaves (20 cm), inflorescence length (32 cm) tillering diameter (16 cm) and yield of dry matter (176 g/plant). The subgroup I-c also combined

Figura 2. Dendrograma del análisis de nueve variables morfológicas cuantitativas en 51 poblaciones de pasto banderita con base en el método de ligamiento Ward

Figure 2. Dendrogram analysis of nine quantitative morphological variables in 51 populations of sideoats grama based on the Ward cluster method



La Figura 1 muestra la amplitud de la diversidad morfológica existente en las poblaciones de pasto banderita. Las variables que más contribuyeron fueron rendimiento de materia seca, densidad de tallos, altura de forraje, altura de planta y diámetro de macollo. Esta variabilidad morfológica y genética encontrada es de gran utilidad en la búsqueda y selección de caracteres como rendimiento de forraje y de semilla, además de la calidad; ya que el pasto banderita tiene la cualidad de ser una especie apomíctica, lo cual permite heredar a su descendencia estas características. Con esta variación observada, se puede establecer un banco de germoplasma para conservar y evaluar dicha variación en programas de mejoramiento genético y crear ecotipos mejorados de acuerdo a estos descriptores y con potencial para su uso en programas de rehabilitación de pastizales.

El análisis de conglomerados integró a tres grupos basados en el método de ligamiento WARD (Figura 2). El grupo I (G-I) integró 21 poblaciones originarias de 15 municipios (Chihuahua, Casas Grandes, Namiquipa, Buenaventura, Satevó, Valle de Allende, Gran Morelos, Valle de Zaragoza, Villa López, Julimez, Villa Ahumada, Jiménez, Manuel Benavides, Camargo y Ojinaga). Estos ecotipos se caracterizan por presentar los valores más altos de todas las nueve variables evaluadas. El subgrupo I-a integró nueve poblaciones y se caracterizó porque presentaron las mayores

together six populations with the highest foliage height (60 cm), coming from municipalities of Ojinaga and Chihuahua. Group II (G-II) integrated 24 original populations from 15 municipalities, showing in general, intermediate values of morphological variables. Finally, group III (G-III) integrated six populations coming from the municipalities of San Francisco del Oro, Namiquipa, Balleza, Villa Ahumada, Ascensión and Chihuahua. These populations were characterized by the lowest values of foliage height (29 cm), plant height (58 cm), stem density (30), leaf length (12 cm), inflorescence length (23 cm) tillering diameter (6.2 cm) and dry matter yield (8.7 g/plant).

Molecular characterization

The AFLP analysis with the four pairs of primers detected 186 bands; 80.67 % (150 bands) showed polymorphism (Table 3). The number of polymorphic bands was 35, 45, 35 and 35 for the initiator combinations *EcoRI*-AAG+*MseI*-CTG, *EcoRI*-ACT+*MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG+*MseI*-CAG and *EcoRI*-AAC+*MseI*-CAG, respectively. The highest percentage of polymorphism (93.75 %) and polymorphic bands (48) was obtained with the combination of primers *EcoRI*-ACT + *MseI*-CTG. These results in the number of bands obtained are consistent with other findings, with respect to efficiency to use this technique to generate greatest number of polymorphisms⁽²⁷⁾. For future studies of genetic

Cuadro 3. Nivel de polimorfismo detectado en 51 poblaciones de pasto banderita para cada combinación de iniciadores, empleados en el análisis de AFLP

Table 3. Level of polymorphism detected in 51 sideoats grama populations for each combination of primers used in the analysis of AFLP

Combination of primers	Total bands	Total polymorphic bands	Percentage of polymorphism
<i>EcoRI</i> -AAG+ <i>MseI</i> -CTG	49	35	71.43
<i>EcoRI</i> -ACT+ <i>MseI</i> -CTG	48	45	93.75
<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CAG	43	35	81.4
<i>EcoRI</i> -AAC+ <i>MseI</i> - CAG	46	35	76.09
Total	186	150	
Average	46.5	37.5	80.67

alturas de planta (96 cm). El subgrupo I-b integró a las seis poblaciones que presentaron en promedio los valores más altos de densidad de tallos (271), longitud de hojas (20 cm), longitud de inflorescencia (32 cm), diámetro de macollo (16 cm) y rendimiento de materia seca (176 g/planta). El subgrupo I-c agrupó también a seis poblaciones con las mayores alturas de follaje (60 cm), originarias de los municipios de Ojinaga y Chihuahua. El grupo II (G-II) integró 24 poblaciones originarias de 15 municipios y en general este grupo presentó valores intermedios de las variables morfológicas evaluadas. Por último, el grupo III (G-III) integró seis poblaciones originarias de los municipios de San Francisco del Oro, Namiquipa, Balleza, Villa ahumada, Ascensión y Chihuahua. Estas poblaciones se caracterizaron porque presentaron los valores más bajos de altura de follaje (29 cm), altura de planta (58 cm), densidad de tallos (30), longitud de hoja (12 cm), longitud de inflorescencia (23 cm), diámetro de macollo (6.2 cm) y rendimiento de materia seca (8.7 g/planta).

Caracterización molecular

El análisis de AFLP, con los cuatro pares de iniciadores, detectó 186 bandas; 80.67 % (150 bandas) presenta polimorfismo (Cuadro 3). El número de bandas polimórficas fue de 35, 45, 35 y 35 para las combinaciones de iniciadores *EcoRI*-AAG+*MseI*-CTG, *EcoRI*-ACT+*MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG+*MseI*-CAG y *EcoRI*-AAC+*MseI*-CAG, respectivamente. El mayor porcentaje de polimorfismo (93.75 %) y bandas polimórficas (48) se obtuvo con la combinación de iniciadores *EcoRI*-ACT+*MseI*-CTG. Estos resultados en el número de bandas obtenidas son congruentes con otras investigaciones realizadas, con relación a la eficiencia para utilizar esta técnica para generar mayor número de polimorfismo⁽²⁷⁾. Para estudios futuros de diversidad genética en poblaciones de pasto banderita, se recomienda utilizar la combinación *EcoRI*-ACT+*MseI*-CTG, ya que detectó la mayor variabilidad. Trabajos realizados en *Agrostis stolonifera*, obtuvieron de 100 a 150 bandas con 22 a 94 bandas

diversity in populations of sideoats grama, we recommend using the *EcoRI*-ACT+*MseI*-CTG combination because it detected the greatest variability. A study in *Agrostis stolonifera* obtained from 100 to 150 bands with 22 to 94 polymorphic bands⁽²⁸⁾. However, in *Schizachyrium scoparium* it is reported 854 stem fragments and 653 in seed with 158 well-defined bands. In general, it was detected a greater than 91 % polymorphism in these populations⁽²⁹⁾.

The similarity values obtained using the Dice coefficient in pairwise comparisons of 51 sideoats grama populations varied between 0.267 and 0.96 (data obtained from genetic similarity matrix). Considering these similarity values, it is evident that there is high genetic diversity within this species, essential to meet the requirement to start breeding programs. The ranges obtained for the similarity coefficient in sideoats grama populations are consistent with those reported in some species of the genus *Festuca* and *Cynodon transvaalensis*⁽³⁰⁾.

Cluster analysis based on molecular data using the Dice coefficient (Figure 3), apparently separated into a greater number of groups, compared to dendrogram analyses based on morphological variables as shown in Figure 2. There are some nodes that group grass populations from municipalities nearby. For example, analyzing in Figure 3 the tree from top to bottom, starts a node with B104 and B99 that are two neighboring towns (San Francisco del Oro and Huejotitán), located south of the state of Chihuahua, but not always do these cluster groupings occurred. Below, the node that groups the B200 and B217 populations (also on the right), is the node closest to 1 on the scale of the dendrogram, coinciding obviously with the highest value of similarity that was presented in populations (96 %, data obtained from genetic similarity matrix). These populations with high genetic similarity originated in the same municipality of Chihuahua, have the most genetic homogeneity, as they showed similarity in five of the descriptors evaluated. These populations were

polimórficas⁽²⁸⁾. Sin embargo, en *Schizachyrium scoparium* reportan 854 fragmentos en tallo y 653 en semilla con 158 bandas bien definidas. En general, detectan un polimorfismo mayor a 91 % en estas poblaciones⁽²⁹⁾.

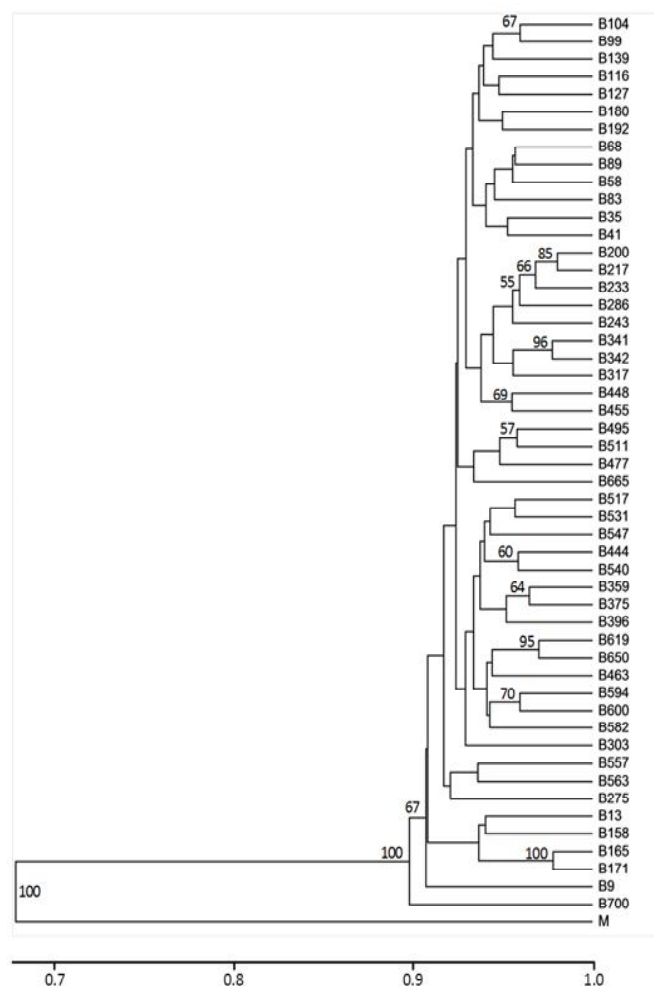
Los valores de similitud obtenidos al utilizar el coeficiente de Dice en las comparaciones pareadas de las 51 poblaciones del pasto banderita, variaron entre 0.267 y 0.96 (datos obtenidos de matriz de similitud genética). Considerando estos valores de similitud, nos indican que existe alta diversidad genética en esta especie, requisito indispensable para iniciar programas de mejoramiento genético. Los rangos obtenidos en el coeficiente de similitud de las poblaciones de pasto banderita, son congruentes con los reportados en especies del género *Festuca* y en *Cynodon transvaalensis*⁽³⁰⁾.

El análisis de conglomerados, basado en datos moleculares utilizando el coeficiente de Dice (Figura 3), separó aparentemente en un número mayor de grupos, en comparación al dendrograma basado en variables morfológicas mostrado en la Figura 2. Hay algunos nodos que agrupan poblaciones de municipios cercanos, por ejemplo: analizando en la Figura 3 el árbol de arriba hacia abajo, inicia un nodo con B104 y B99 que son de 2 municipios colindantes (San Francisco del Oro y Huejotitán), ubicados al sur del estado de Chihuahua, pero no siempre ocurrieron estas agrupaciones. Más abajo, el nodo que agrupa las poblaciones B200 y B217 (también en ubicación hacia la derecha), es el nodo más cercano a 1 en la escala del dendrograma, coincide obviamente con el valor mayor de similitud que se presentó en las poblaciones (96 %, dato obtenido de matriz de similitud genética). Estas poblaciones con similitud genética alta, son originarias del mismo municipio: las de Chihuahua, son las de mayor homogeneidad genética, ya que presentaron similitud en cinco de los descriptores evaluados. Estas poblaciones fueron recolectadas a una altitud aproximada de 1,589 y 1,615 m, respectivamente y provenientes de este mismo municipio, Chihuahua. Además se observa más

collected at an altitude of 1,589 and 1,615 m, respectively. Coming from the same municipality, Chihuahua, it is noted below in the tree that there is another subgroup integrated by B495, B511, B477 and B665 populations were collected at altitudes from 1,577, 1,310, 1,602 and 1,653 m, respectively.

Figura 3. Análisis de agrupamiento de 51 poblaciones del pasto banderita mediante el coeficiente de Dice, utilizando como método de agrupamiento-UPGMA, sobre la base de 186 marcadores AFLP, generados con cuatro combinaciones de iniciadores

Figure 3. Cluster analysis of 51 populations of sideoats grama by Dice coefficient, using UPGMA-cluster method, based on 186 AFLP markers generated with four combinations of primers



abajo en el árbol otro subgrupo donde se integran las poblaciones B495, B511, B477 y B665, cuyas altitudes de recolecta van de 1,577, 1,310, 1,602 y 1,653 m, respectivamente. Algo similar sucede con las poblaciones provenientes del municipio de Buenaventura, donde se agruparon B341 y B342 con un valor bootstrap alto (96), también presentan prácticamente iguales cinco descriptores fenotípicos de los caracteres evaluados. Las poblaciones B359 y B375 con un valor bootstrap aceptable (64) con altitudes de recolecta prácticamente iguales 1,522 a 1,543 m, con mínimas oscilaciones, comparten similares características fenotípicas en los descriptores de las hojas (ancho y largo) y alturas de follaje cercanas. Del municipio de Camargo, también sus dos poblaciones analizadas, B448 y B455 se agruparon, también compartieron algunos descriptores fenotípicos similares, aunque sus altitudes varían un poco (1,318 vs 1,403 m). Otro ejemplo que se observa es el grupo de las tres poblaciones de Ojinaga (B594, B600 y B582), también con algunas características similares fenotípicas entre ellas quienes a su vez, se agrupan con otras poblaciones de municipios cercanos, B463 de Julimes, B650 de Chihuahua y B619 de Rosales que están colindando dentro del estado hacia el centro. Esto indica que algunas poblaciones cercanas genéticamente también están correlacionadas con su morfología y ubicación geográfica, aunque no es una situación general. También, esta representación gráfica indica la existencia de diversidad genética, lo cual se requiere para trabajos sustentables del recurso filogenético. Estos resultados son congruentes con relación a la efectividad del uso de la técnica AFLP para estudios de diversidad genética en pastos, similar a lo descrito por Roldán-Ruiz *et al*⁽³¹⁾. Además, se muestra que esta técnica facilita valoraciones rápidas y eficientes de la diversidad genética en este tipo de poblaciones nativas⁽³²⁾.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Los recursos genéticos de pasto banderita recolectados en el estado de Chihuahua,

Something similar happened with grass populations coming from the municipality of Buenaventura, where B341 and B342 were clustered with high bootstrap values (96), and showing almost the same five phenotypic descriptors of the characters evaluated. B359 and B375 populations had an acceptable bootstrap value (64) with collections acquired at almost identical altitudes from 1,522 to 1,543 m, with minimum oscillations, sharing similar phenotypic characteristic descriptors in their leaves (width and length) and close foliage heights. The municipality of Camargo also had two populations B448 and B455. Combined, they shared some similar phenotypic descriptors, although their altitudes varied (1,318 vs 1,403 m). Another example observed is a group of three populations from Ojinaga (B594, B600 and B582), also with some similar phenotypic characteristics among them, and that can be grouped with other grass populations of nearby municipalities, B463 from Julimes, B650 from Chihuahua and B619 from Rosales that are located in the central part of the state. This indicates that some populations are genetically close, since they are also correlated with morphology and location, although it is not a universal condition. Also, this graphical representation indicates the existence of genetic diversity, which is a requirement for the sustainable use of this phylogenetic resource. These results are reliable with respect to the effectiveness of using the AFLP technique for studies of genetic diversity in grasses, similar to that described by Roldán-Ruiz *et al*⁽³¹⁾. In addition, it is shown that this technique facilitates fast and efficient assessments of genetic diversity in this type of native grass populations⁽³²⁾.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Genetic resources of sideoats grama collected in the state of Chihuahua, showed high morphologic and molecular variability. Morphological variables with more variation were dry matter yield, stem density, tillering diameter, foliage height, plant height and leaf length. The

presentaron alta variabilidad morfológica y molecular. Las variables morfológicas con mayor variación fueron rendimiento de materia seca, densidad de tallos, diámetro de macollo, altura de follaje, altura de planta y longitud de hoja. La combinación de iniciadores *EcoRI*-ACT+*MseI*-CTG detectó el mayor polimorfismo, revelando los niveles de variación genética más elevados. Se pueden elegir a los ecotipos B444, B359 y B563 por su alto potencial y atributos sobresalientes.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Fondo Mixto CONACyT-Gobierno del estado de Chihuahua por el apoyo financiero (clave del proyecto: CHIH-2005-C01-23250). A la Dra. June Simpson, Dra. Corina Hayano, Tec. Emigdia Alfaro de CINVESTAV-Irapuato, por el apoyo en los análisis AFLP y por el uso del secuenciador.

combination of primers *EcoRI*-ACT+*MseI*-CTG showed the greatest amount of polymorphism, revealing high levels of genetic variation. Based on their morphological and genetic characteristics, B444, B359 and B563 ecotypes can be selected for its high potential and outstanding attributes to be included in grass breeding programs and grassland rehabilitation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and Chihuahua state government for financial support (key project: CHIH-2005-C01-23250) Mixed Fund. Sincere thanks to Dr. June Simpson, Dr. Corina Hayano and technician Emigdia Alfaro of CINVESTAV-Irapuato for their support in the AFLP analysis and the use of the sequencer.

End of english version

LITERATURA CITADA

- Gauthier DA, Lafon A, Toombs TP, Hoth J, Wiken E. Grasslands toward a North American conservation strategy. Canadian Plains Research Center. Montreal, Canada. 2003:99.
- Valerio AE, Carreon A, Lafon JM, Ochoa P, Calderon DM, Soto C, Chacon EF. Distribución, extensión espacial y condición de los pastizales en el estado de Chihuahua. Protección de la fauna mexicana, A.C. The Nature Conservancy. Chihuahua, Mexico. 2005.
- Do Valle CB. Genetic resources for tropical areas: achievements and perspectives. Proc XIX Int Grassland Cong. São Pedro, São Paulo, Brazil. Brazilian. Soc Bras Zoot 2001;477-482.
- Willard EE, Schuster JL. An evaluation of an interseeded sideoats gramma stand four years after establishment. J Range Manage 1971;(24):223-226.
- Stubbendieck J, Hatch SL, Kju KJ. North American range plants. 2nd ed. Lincoln, NE: University of Nebraska Press; 1982.
- Holecheck JL, Pieper RD, Herbel CH. Range management principles and practices. New Jersey, USA: Regents Prentice-Hall, Inc; 1989.
- Erickson VJ, Mandel NL, Sorensen FC. Landscape patterns of phenotypic variation and population structuring in a selfing

- grass, *Elymus glaucus* (blue wildrye). Can J Bot 2004;(82):1776-1790.
- Steiner JJ, Piccioni E, Falcinelli M, Liston A. Germplasm diversity among cultivars and the NPGS crimson clover collection. Crop Sci 1998;(38):263-271.
- Smart AJ, Moser LE, Vogel KP. Morphological characteristic of big bluestem and switchgrass plants divergently selected for seedling tiller number. Crop Sci 2004;(44):607-613.
- Casler MD. Ecotypic variation among switchgrass populations from the Northern USA. Crop Sci 2005;(45):388-398.
- Das MK, Fuentes RG, Taliaferro ChM. Genetic variability and trait relationships in switchgrass. Crop Sci 2004;(44):443-448.
- Enríquez F, Quero A, Hernández A, García E. Azuche *Hymenachne amplexicaulis* (Rudge) Nees forage genetic resources for floodplains in tropical Mexico. Gen Res Crop Evol 2006;(53):1405-1412.
- Morales NC, Quero AR, LeBlanc O, Hernández A, Pérez J, González S. Caracterización de la diversidad del pasto nativo *Bouteloua curtipendula* (Michx) Torr., mediante marcadores de AFLP. Agrociencia 2006;(40):711-720.
- Peter-Schmid MK, Kèolliker R, Boller B. Value of permanent grassland habitats as reservoirs of *Festuca pratensis* Huds. and *Lolium multiflorum* Lam. populations for breeding and conservation. Euphytica 2008;(164):239-253.
- Puecher DI, Robredo CG, Rios R, Rimieri P. Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. Populations and

- cultivars with RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 2001;(121):229-236.
16. Renganayaki K, Read JC, Fritz AK. Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theor Appl Gen* 2001;(102):1037-1045.
17. Meudt HM, Clarke AC. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Tren Plant Sci* 2006;(12):1360-1385.
18. Royo MM, Lafón A. Descripción fisiográfica, diversidad vegetal y vertebrados del rancho experimental La Campana. Chávez A. Carrillo R editores. Rancho Experimental La Campana 50 Años de Investigación y Transferencia de Tecnología en Pastizales y Producción Animal. INIFAP. Chihuahua, Chih. 2008.
19. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 1990;(12):13-15.
20. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M. *et al.* AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Ac Res* 1995;(23):4407-4414.
21. Hoisington D, Khairallah M, González de-León D. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Second ed. México, DF: CIMMYT; 1998.
22. Statistical Analysis System (SAS). Institute Inc. User's guide. Statistics. Version 8. Sixth edition. SAS Inc. Cary, North Carolina, USA. 1999.
23. Schellenberg MP, Biligetu B, McLeod GJ, Wang Z. Phenotypic variation of side-oats grama grass [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.] collections from the Canadian prairie. *Can J Pl Sci* 2012;(92):1043-1048.
24. Morales NC, Quero CA, Melgoza CA, Martínez SM, Jurado GP. Diversidad forrajera del pasto banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], en poblaciones de zonas áridas y semiáridas de México. *Téc Pecu Mex* 2009;(47):231-244.
25. Bennett SJ, Hayward MD; Marshall DF. Morphological differentiation in four species of the genus *Lolium*. *Gen Res Crop Evol* 2000;(47):247-255.
26. Fernandez YSN, Coulman BE. Genetic relationships among smooth brome grass cultivars of different ecotypes detected by AFLP markers. *Crop Sci* 2004(44):241-247.
27. Valdés-Infante, J. Utilización de caracteres morfoagronómicos y de marcadores de ADN para el desarrollo de una metodología que contribuya al mejoramiento genético del guayabo (*Psidium guajava* L.) en Cuba [Tesis doctorado]. La Habana, Cuba: Universidad de la Habana; 2009.
28. Vergara GV, Bughara S. Genetic differentiation of tetraploid creeping bentgrass and hexaploid redtop bentgrass genotypes by AFLP and their use in turfgrass breeding. *Crop Sci* 2004;(44):884-890.
29. Fu YB, Fernandez YSN, Phan AT, Coulman BE, Richards KW. Genetic diversity in natural populations and corresponding seed collections of little bluestem as revealed by AFLP markers. *Crop Sci* 2004(44):2254-2260.
30. Mian MA, A Hopkins, Zwonitzer J. Determination of genetic diversity in Tall Fescue with AFLP markers. *Crop Sci* 2002;(42):944-950.
31. Roldán-Ruiz I, Dendaauw J, Van Bockstaele E, Depicker A, De Loose M. AFLP markers reveal high polymorphism rates in ryegrass (*Lolium spp.*). *Mol Breed* 2000;(6):125-134.
32. Hammer KA. Paradigm shift in the discipline of plant genetic resources. *Gen Res Crop Evol* 2003;(43):337-341.