

Caracterización fenotípica y molecular de poblaciones de zacate punta blanca (*Digitaria californica* (Benth.) Henr.)

Phenotypic and molecular characterization of populations of arizona cottontop [*Digitaria californica* (Benth.) Henr.]

Carlos Raúl Morales Nieto^a, Alicia Melgoza Castillo^b, Pedro Jurado Guerra^a, Martín Martínez Salvador^a, Carlos Avendaño Arrazate^c

RESUMEN

Se exploró y caracterizó la diversidad fenotípica y genotípica de poblaciones del pasto punta blanca [*Digitaria californica* (Benth.) Henr.], en pastizales de Chihuahua. Se realizó análisis de componentes principales y conglomerados. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre variables, indicando alta diversidad fenotípica y molecular entre poblaciones. Los tres primeros componentes explicaron 79 % de la variación morfológica mostrada por los 91 ecotipos. Para el CP1, las variables que mejor explicaron la variabilidad morfológica fueron densidad de tallos, rendimiento de forraje y altura de forraje, las cuales se caracterizan por agrupar variables relacionadas con producción de forraje. Al analizar la correlación del CP1 con rendimiento de forraje, se observó que a medida que la densidad de tallos se incrementó, el rendimiento de forraje se incrementó casi en la misma proporción ($r = 0.94$). Efecto similar ocurrió sobre rendimiento de forraje con altura de forraje ($r = 0.77$), altura de planta ($r = 0.72$) y diámetro de macollo ($r = 0.72$). Los marcadores moleculares presentaron 179 bandas, donde el 86.6 % presentan polimorfismo y 13.7 % monomorfismo. El número de bandas polimórficas fue de 38, 38, 38 y 40 para las combinaciones de iniciadores *EcoRI*-AAG+*MseI*-CTG, *EcoRI*-ACT+*MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG+*MseI*-CAG y *EcoRI*-AAC+*MseI*-CAG, respectivamente. El dendrograma presentó cuatro grupos. Los valores de similitud, muestran a los ecotipos PB-270 y PB-277 por un lado y PB-313 y PB-337 como los de mayor heterogeneidad genética, al presentar el valor más bajo de similitud (0.14). Se identificaron y seleccionaron los ecotipos 505 y 596 por su alto potencial forrajero de acuerdo a su variabilidad morfológica.

PALABRAS CLAVE: *Digitaria californica*, Diversidad fenotípica, Diversidad molecular, Recursos genéticos, Variación morfológica.

ABSTRACT

Phenotypic and genotypic diversity were explored and characterized in arizona cottontop [*Digitaria californica* (Benth.) Henr.] populations at Chihuahua state grasslands. Principal component and cluster analysis were applied to the data using Ward method. There were differences ($P < 0.05$) within variables and high phenotypic and genotypic diversity were detected among populations. Three principal components explain 79 % of the variation on 91 ecotypes. For the PC1, shoots number, biomass and forage height were the variables contributed on morphological diversity. Those variables are related with forage production and regrowth. When analyzing the correlation of PC1 with forage yield, was observed that as stem density increased, forage yield was also increased at about the same proportion ($r = 0.94$, $P < 0.01$). A similar effect occurred on the forage yield with forage height ($r = 0.77$, $P < 0.01$), plant height ($r = 0.72$, $P < 0.01$) and tiller diameter ($r = 0.72$, $P < 0.01$). According with Ward method, five groups were detected. Molecular markers showed 179 bands which represents 86.3 % of the polymorphism (154 bands) and 13.7 % of the monomorphism (25 bands). Polymorphic bands were 38, 38, 38, and 40 for *EcoRI*-AAG+*MseI*-CTG, *EcoRI*-ACT+*MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG+*MseI*-CAG y *EcoRI*-AAC+*MseI*-CAG combination, respectively. The AFLP discriminated the 30 populations evaluated with similitud values between 0.14 and 0.55. Ecotypes PB-270 and PB-277 in one side and PB-313 and PB-337 had the highest genetic heterogeneity; they have the lowest similitude (0.14). Ecotypes with high forage potential, based on morphology and genetic variability, were identified (ecotypes 505 y 596).

KEY WORDS: *Digitaria californica*, Phenotypic variation, Molecular variation, Genetic resources.

Recibido el 5 de enero de 2011. Aceptado el 10 marzo de 2011.

^a Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Campana-Madera. Km 33.3 carretera Chihuahua-Ojinaga. México. morales.carlos@inifap.gob.mx. Correspondencia al primer autor.

^b Facultad de Zootecnia y Ecología, UACH.

^c Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. C. E. Rosario Izapa, Chiapas.

INTRODUCCIÓN

La pérdida de biodiversidad es un problema presente en las tierras de pastoreo de México⁽¹⁾. En especies forrajeras nativas, esta pérdida adquiere mayor relevancia al desaparecer especies con características que pueden servir en programas de mejoramiento. No sólo los ecosistemas pierden su funcionalidad⁽²⁾, sino que como consecuencia se reducen los servicios naturales o ambientales (ecoturismo, hábitat, agua, etc.) que se obtienen como forraje⁽³⁾. Entre las especies perennes nativas del norte de México, se encuentra el pasto punta blanca [*Digitaria californica* (Benth.) Henr.], distribuido en pastizales amacollados, pastizales medianos y matorrales, especie apetecida por el ganado, produce altos rendimientos de forraje y responde rápidamente a la defoliación por pastoreo^(4,5,6).

En la rehabilitación de pastizales es necesario utilizar especies nativas con alto rendimiento de forraje y adaptadas al medio. Un primer paso en la rehabilitación, es caracterizar y determinar la variabilidad fenotípica y genética para identificar y seleccionar ecotipos con atributos forrajeros sobresalientes⁽⁷⁾. Las características morfológicas, citológicas o bioquímicas ligadas a los caracteres de interés, son importantes para su empleo en selección y mejoramiento genético de especies^(8,9,10), y para desarrollar variedades con alta producción de forraje y calidad. Esto se logró al caracterizar la diversidad morfológica de 177 ecotipos del pasto banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], utilizando descriptores como altura de forraje, altura de planta, densidad de tallos, grosor del tallo, ancho de hoja, largo de hoja, longitud de inflorescencia, ramillas por inflorescencia, espiguillas por ramillas, longitud de ramillas, raquis de inflorescencia, longitud del pedicelo y rendimiento de forraje⁽¹¹⁾. También, Peter-Schmid et al⁽¹⁰⁾ evaluaron 16 características morfológicas y fisiológicas en *Festuca pratensis* y *Lolium multiflorum*. En *F. pratensis* hubo correlación significativa entre la diversidad de características morfológicas y localidad de sitios muestreados. Para *L. multiflorum* no se observó una clara separación por grupos de la variabilidad de los 38 sitios muestreados. Sin embargo,

INTRODUCTION

Biodiversity loss is a problem in the rangelands of Mexico⁽¹⁾. In native forage species, this loss becomes more important with the disappearance of species with characteristics that can be used in breeding programs. When ecosystems lose their biodiversity functionality is affected on their goods and services⁽²⁾. Services such as ecotourism, habitat, water, among others and goods as forage are reduced⁽³⁾. Among the perennial species native to northern Mexico, is the Arizona cottontop grass [*Digitaria californica* (Benth.) Henr.] distributed in grasslands and shrublands, high palatability; produces high forage yields and responds quickly to defoliation by grazing^(4,5,6).

In rangeland rehabilitation it is necessary to use native species of high forage yield and adapted to the environment. A first step in rehabilitation is to characterize and determine the phenotypic and genetic variability to identify and select outstanding forage ecotypes⁽⁷⁾. The morphological, cytological and biochemical characteristics linked to traits of interest, are important for use in plant species selection and breeding^(8,9,10), and to develop varieties with high forage production and quality.

This was achieved when the morphological diversity of 177 ecotypes of [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], was characterized using descriptors such as height of crop, plant height, stem density, stem diameter, leaf width, length leaf, inflorescence length, twigs per inflorescence, spikelets per branches, twigs length, inflorescence rachis, pedicel length and forage yield⁽¹¹⁾. Also, Peter-Schmid et al⁽¹⁰⁾ evaluated 16 morphological and physiological characteristics in *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. In *F. pratensis* there was no significant correlation between the diversity of morphological characteristics and location of sites sampled. *L. multiflorum* did not show a clear separation of groups in the variability of the 38 sampled sites. However, considering that the morphological characteristics are influenced by the environment, it is necessary to use DNA markers not affected by the environment, and detect variants at genotype level.

considerando que las características morfológicas son influenciadas por el ambiente, es necesario utilizar marcadores de ADN que no son afectados por el ambiente, y detectan variantes a nivel del genotipo.

El uso de marcadores moleculares como es el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), ha sido utilizado en estudios de diversidad genética en pastos⁽¹²⁻¹⁵⁾. El uso de estos marcadores, facilita una valoración rápida y eficiente de esta diversidad, comparada con otros marcadores^(12,16), al generar mayor número de bandas polimórficas⁽¹⁷⁾. La recolecta de poblaciones en diversas localidades es una práctica para evaluar persistencia de ciertas características deseables en plantas. Es mejor trabajar en la selección de una característica que sea heredable, en vez de múltiples características por ecotipo, porque es más fácil y rápido el proceso de mejoramiento⁽¹⁸⁾. En otro estudio se concluye que la evaluación de material *ex situ*, en condiciones climáticas naturales y simulación de pastoreo, permite determinar ecotipos resistentes a sequía y pastoreo⁽¹⁹⁾. El objetivo del presente trabajo fue explorar y caracterizar la diversidad fenotípica y genotípica de poblaciones de pasto punta blanca para producción de forraje, presentes en los pastizales del estado de Chihuahua, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección

En 2006 se recolectaron 91 ecotipos del pasto punta blanca en diferentes ranchos ganaderos, distribuidos en todo el estado de Chihuahua, México (Cuadro 1; Figura 1). Se recolectaron cuatro plantas por ecotipo, con un diámetro de 2.5 cm, provista de raíz; la parte aérea se cortó a una altura de 15 a 20 cm y se identificó cada planta (ecotipo)⁽²⁰⁾. Los ejemplares se transportaron en hieleras, provistas de suelo comercial de jardín húmedo, y se trasplantaron en el área agronómica del Campo Experimental La Campana, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Este sitio experimental cuenta con una topografía plana, clima seco templado con veranos

The use of molecular markers such as the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) have been used in studies of genetic diversity in grasses⁽¹²⁻¹⁵⁾. Using these markers, facilitates rapid and efficient assessment of this diversity, compared with other markers^(12,16), generating the largest number of polymorphic bands⁽¹⁷⁾. The collection of populations in different locations is a practice to evaluate persistence of certain desirable characteristics in plants. It is better to work in the selection of a characteristic that is inherited, rather than multiple features for ecotype, because the process of improvement is easier and faster⁽¹⁸⁾. Another study concludes that the evaluation of *ex situ* material in natural weather conditions and grazing simulation, allow to determine ecotypes resistant to drought and grazing⁽¹⁹⁾. The aim of this study was to explore and characterize the phenotypic and genotypic diversity of populations of Arizona cottontop grass for forage production, present in the grasslands of Chihuahua, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Plant collection

In 2006, 91 Arizona cottontop grass ecotypes were collected on different ranches, distributed throughout the State of Chihuahua, Mexico (Table 1, Figure 1). Four plants of each ecotype were collected, with a diameter of 2.5 cm, with roots; the aerial part was cut to a height of 15 to 20 cm and each ecotype was identified⁽²⁰⁾. The specimens were transported in coolers with a plant substrate, and transplanted in La Campana Experimental Station, from the National Institute for Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP). The experimental site has a flat topography, dry climate with warm summers, average annual temperature of 15 to 18 °C and 355 mm average rainfall per year. The alluvial soils are sandy loam texture, pH of 6.5 and open grassland vegetation⁽²¹⁾. Subsequently, the ecotypes were handled under natural rainfall.

Phenotypic characterization

After the establishment and during blooming in the second year of growth, the following characteristics were evaluated in each ecotype: forage height, from

Cuadro 1. Características ambientales de los municipios donde se recolectaron 91 ecotipos del pasto punta blanca

Table 1. Environmental characteristics of the municipalities where the 91 Arizona cottontop ecotypes were collected

Ecotype	Precipitation (mm)	Temperature (°C)	Altitude (m)	Municipalities	Ecotype	Precipitation (mm)	Temperature (°C)	Altitude (m)	Municipalities
19	415	18.0	1508	CHIH	385	415	18.0	1587	CHIH
20	415	18.0	1508	CHIH	386	415	18.0	1587	CHIH
21	415	18.0	1508	CHIH	387	415	18.0	1587	CHIH
32	462	18.3	1442	SATEVO	403	415	18.0	1485	CHIH
33	462	18.3	1442	SATEVO	404	415	18.0	1485	CHIH
76	471	16.0	1625	PARRAL	405	415	18.0	1485	CHIH
77	471	16.0	1625	PARRAL	413	350	18.0	1531	CHIH
78	471	16.0	1625	PARRAL	414	350	18.0	1531	CHIH
161	486	14.7	1923	NAMIQUEIPA	431	350	18.0	1304	CHIH
184	415	18.0	1923	CHIH	433	350	18.0	1304	CHIH
185	415	18.0	1923	CHIH	451	346	19.4	1395	CAMARGO
186	415	18.0	1552	CHIH	452	346	19.4	1395	CAMARGO
208	415	18.0	1527	CHIH	478	350	18.0	1569	CHIH
209	415	18.0	1527	CHIH	479	350	18.0	1569	CHIH
210	415	18.0	1527	CHIH	480	350	18.0	1569	CHIH
223	367	14.5	1553	V. AHUMADA	481	350	18.0	1569	CHIH
224	367	14.5	1553	V. AHUMADA	504	355	18.0	1555	CHIH
225	367	14.5	1553	V. AHUMADA	505	355	18.0	1555	CHIH
238	323	17.4	1377	V. AHUMADA	543	306	18.4	1320	ALDAMA
240	323	17.4	1377	V. AHUMADA	544	306	18.4	1320	ALDAMA
244	323	17.4	1377	V. AHUMADA	545	306	18.4	1320	ALDAMA
245	323	17.4	1185	V. AHUMADA	548	306	18.4	1369	ALDAMA
246	323	17.4	1185	V. AHUMADA	550	306	18.4	1369	ALDAMA
253	323	17.4	1185	V. AHUMADA	552	306	18.4	1369	ALDAMA
255	323	17.4	1236	V. AHUMADA	567	346	19.4	1185	CAMARGO
256	231	18.1	1301	CD. JUAREZ	568	346	19.4	1185	CAMARGO
257	231	18.1	1301	CD. JUAREZ	569	346	19.4	1185	CAMARGO
258	231	18.1	1301	CD. JUAREZ	570	346	19.4	1185	CAMARGO
268	269	17.1	1298	ASCENSION	578	346	19.4	1040	CAMARGO
269	269	17.1	1298	ASCENSION	579	346	19.4	1040	CAMARGO
270	269	17.1	1298	ASCENSION	580	346	19.4	1040	CAMARGO
277	372	16	1384	JANOS	581	346	19.4	1040	CAMARGO
278	372	16	1384	JANOS	595	265	21.9	1080	OJINAGA
279	372	16	1331	JANOS	596	265	21.9	1080	OJINAGA
313	346	16.4	1550	CASAS GRANDES	597	265	21.9	1080	OJINAGA
315	346	16.4	1550	CASAS GRANDES	598	265	21.9	1080	OJINAGA
337	319	16.2	1550	BUENAVENTURA	603	265	21.9	1268	OJINAGA
338	319	16.2	1507	BUENAVENTURA	604	265	21.9	1268	OJINAGA
339	319	16.2	1507	BUENAVENTURA	605	265	21.9	1268	OJINAGA
341	319	16.2	1507	BUENAVENTURA	621	350	18.0	1329	CHIH
355	319	16.2	1575	BUENAVENTURA	644	350	18.0	1708	CHIH
356	319	16.2	1575	BUENAVENTURA	651	415	18.0	1837	CHIH
357	319	16.2	1575	BUENAVENTURA	652	415	18.0	1837	CHIH
364	320	16	1464	FLORES MAGON	653	415	18.0	1837	CHIH
365	320	16	1464	FLORES MAGON	654	415	18.0	1837	CHIH
366	320	16	1464	FLORES MAGON					

cálidos BWk, temperatura media anual de 15 a 18 °C y precipitación promedio de 355 mm anuales. Los suelos son de origen aluvial con textura franco arenosa, pH de 6.5 y vegetación de pastizal mediano abierto⁽²¹⁾. Posteriormente, los ecotipos se manejaron en condiciones naturales.

Caracterización fenotípica

Después del establecimiento y durante la floración del segundo año de crecimiento, se evaluaron en cada ecotipo las siguientes características: altura de forraje, desde el suelo hasta la presencia de hojas (en cm); altura de planta, desde el nivel del suelo hasta la punta de la inflorescencia (en cm); densidad de tallos; grosor de tallos, tomando al azar un tallo de la parte central (en mm); ancho de hoja, tomando una hoja al azar de la parte central (en cm); largo de hoja, tomando una hoja al azar en la parte central (en cm); longitud de inflorescencia, tomando una inflorescencia desde la base hasta la punta de la misma (en cm); diámetro del macollo, en la base al nivel del suelo (en cm); rendimiento de forraje, en materia seca. Las plantas, se cortaron a 5 a 7 cm del nivel del suelo y las muestras se pesaron y colocaron en estufa de aire forzado a 60 °C por 48 h, hasta alcanzar un peso seco constante.

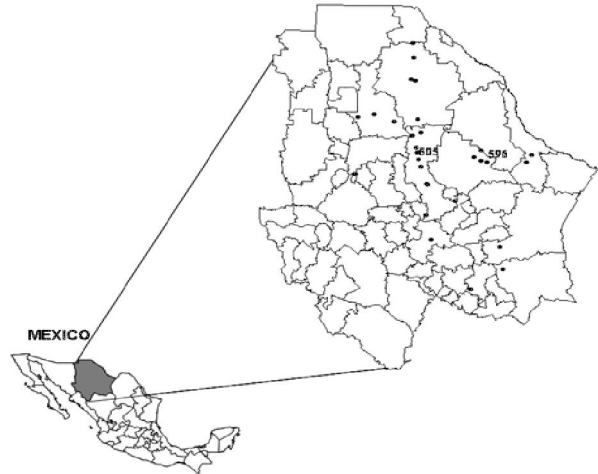
Caracterización genética

Extracción de ADN y análisis AFLP: para realizar el análisis molecular, se agruparon en 30 poblaciones, las cuales representaban a todos los ecotipos muestreados. Para aislar el ADN se utilizó el método descrito por Doyle y Doyle⁽²²⁾. Las reacciones de AFLP se realizaron con el protocolo establecido por Vos *et al*⁽¹²⁾.

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 deionizada 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.

Figura 1. Ubicación de los 91 ecotipos del pasto punta blanca recolectados en diferentes ranchos ganaderos en el estado de Chihuahua, México

Figure 1. Location of the 91 Arizona cottontop grass ecotypes, collected in Chihuahua, Mexico



the floor to the presence of leaves (cm); plant height, from ground level to the tip of the inflorescence (cm); stem density; stem thickness, taking at random from the central stem (in mm); leaf width, taking a leaf at random from the central part (in cm); long leaf, taking a leaf at random in the center (in cm); inflorescence length, taking an inflorescence from base to the tip of the same (in cm); tiller diameter in the base at ground level (in cm); forage yield, in dry matter. Plants were cut at 5 to 7 cm of soil level, and samples were weighed and placed in forced air oven at 60 °C for 48 h, reaching a constant dry weight.

Genetic characterization

DNA extraction and AFLP analysis: 30 populations were grouped for molecular analysis, which represented all sampled ecotypes. To isolate the DNA, the method described by Doyle and Doyle was used⁽²²⁾. AFLP reactions were performed using the protocol established by Vos *et al*⁽¹²⁾.

Digestion: 1.5 µl of reaction buffer (RL) 10X, 2 µl of DNA annealing at 50 ng /µl, 0.5 µl of enzyme Eco RI (10 U /µl), 0.5 µl of enzyme Mse I (10 U /

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 (5 U/µl) y 6.2 µl de agua deionizada estéril, se mezcló, centrifugó e incubó por 2 h a 16 °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 deionizada estéril. Se mezcló, centrifugó y se puso en un termociclador a 20 ciclos a 94 °C por 30 seg, un minuto a 56 °C y un minuto a 72 °C, y mantenimiento final a 4 °C.

Amplificación selectiva: se añadieron 2.0 µl de DNA preamplificado y diluido 1:40, 4.9 µl de agua deionizada 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 un minuto 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 y 800 nm)⁽¹²⁾.

µl) were added, and the reaction was carried to a volume of 12.5 µl with sterile deionized water. The mixture was centrifuged and incubated at 37 °C for 2 h for 15 min at 70 °C to inactivate the restriction enzymes. It was confirmed on an agarose gel stained with 1% ethidium bromide.

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

Preamplification: there was an addition of 2.5 µl of DNA digested, 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 of dNTPs (10 mM), 2.5 µl of reaction buffer of Taq DNA polymerase for 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. Mixed, centrifuged and placed in a thermocycler for 20 cycles at 94 °C for 30 sec, one minute at 56 °C and one minute at 72 °C and final maintenance at 4 °C.

Selective amplification: 2.0 µl of DNA preamplified and diluted 1:40, 4.9 µl of sterile deionized water, 1.1 µl of reaction buffer of Taq DNA polymerase for 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 of dNTPs (10 mM), 0.5 µl of EcoRI Oligo + 3 marked at 700 test basis, 0.5 µl of Oligo EcoRI + 3 selective bases marked to 800 were added. Thermocycler was programmed with 1 cycle at 94 °C for 30 sec, 30 sec at 65 °C and one minute at 72 °C. Twelve cycles which subsequently decreases the temperature of hybridization (65 °C) 0.7 °C per cycle, while the other temperatures remain equal. Followed by 23 cycles at 94 °C for 30 sec, 30 sec at 56 °C and one minute at 72 °C; in the end, the reaction was maintained at 4 °C. Electrophoresis was performed in gel on 6.5 % acrylamide, 8 M urea and 1X TBE (Tris 1M, 1M boric acid, 20 mM EDTA, pH 7.0). The separation of the amplified fragments was done in the analyzer LI-COR DNA, 0.8 µl of sample

Análisis de datos

A los datos morfológicos se les realizó un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis de conglomerados (AC), mediante el método de Ward⁽²³⁾. Para obtener la grafica de dispersión se utilizó el programa PC-ORD y el MINITAB v15 y obtener el dendrograma. Con el patrón de bandeo se realizó una matriz binaria de presencia y ausencia de bandas. Los datos moleculares se analizaron con el paquete estadístico NTSysPC (v 2.1). Además, 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 Medias Aritméticas por Grupo No Ponderadas (UPGMA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fenotípica

En general se registraron incrementos en rendimientos de forraje (g/planta), asociados a incrementos en densidad de tallo, altura de forraje, altura de planta y densidad de macollo. El análisis de componentes principales (CP) mostró que los tres primeros explican 79 % de la variación (Cuadro 2). Al obtener el coeficiente de determinación (R^2) para cada una de las variables originales, respecto

loaded into a well and using the marker of 50 to 700 bp molecular weight. Oligos or primers fluorescently labeled at different wavelengths (700 and 800 nm) were used⁽¹²⁾.

Data analysis

Morphological data were subjected to principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA), using Ward's method⁽²³⁾. Plot PC-ORD was used to get the scatter plot, and MINITAB v15 was used to obtain the dendrogram. With the banding pattern a binary matrix of presence and absence of bands was made. Molecular data were analyzed using the Statistical Package NTSysSpc (v 2.1). Genetic similarity among ecotypes was done using the SIMQUAL program, the Dice coefficient and as a method of grouping the unweighted program group mathematical mean (UPGMA).

RESULTS AND DISCUSSION

Phenotypic characterization

In general, there were increases in forage yields (g/plant), associated with increases in stem density, height of forage, plant height and tiller density. The principal component analysis (PC) showed that the first three explain 79 % of the variation (Table 2).

Cuadro 2. Vectores característicos y coeficiente de determinación (R^2) de las variables de mayor valor descriptivo, respecto a su componente principal en poblaciones del pasto punta blanca

Table 2. Characteristic vectors and determination coefficients (R^2) of the variables with most descriptive value with respect to its principal component in populations of Arizona cottontop

	Characteristic vector			Determination coefficients (R^2)		
	CP1	CP2	CP3	CP1	CP2	CP3
Forage height, cm	0.389	-0.093	0.162	0.90**	- 0.10ns	0.13ns
Plant height, cm	0.385	-0.132	0.161	0.88**	-0.14ns	0.13ns
Tiller density (tillers per plant)	0.392	-0.157	- 0.357	0.90**	-0.17ns	-0.29*
Tiller thickness at medium height, mm	0.209	0.616	-0.210	0.47**	0.67**	-0.17ns
Leaf width at medium length, mm	0.219	0.658	0.176	0.50**	0.71**	0.14s
Leaf length, cm	0.297	0.194	0.158	0.67*	0.21*	0.13ns
Inflorescence length, cm	0.308	-0.202	0.704	0.70**	-0.22*	0.58**
Tiller diameter, cm	0.342	-0.197	- 0.281	0.78**	-0.21*	-0.23*
Forage yield, g/plant*	0.391	-0.132	- 0.378	0.90**	-0.14ns	-0.31*
Characteristic value	5.23	1.19	0.69			
Proportion of the variance	58.1	13.2	7.7			
Proportion of cumulative variance	58.1	71.4	79.0			

* Dry matter yield (g/plant/35 d).

a los tres primeros CP, se presentaron correlaciones significativas en todas las variables evaluadas en las diversas poblaciones de pasto.

Al analizar la correlación del CP1 con las variables originales, se encontró que las variables con mayor contribución fueron: densidad de tallos ($r = 0.89$; $P < 0.01$), altura de forraje ($r = 0.89$; $P < 0.01$), altura de planta ($r = 0.88$; $P < 0.01$) y diámetro de macollos ($r = 0.78$; $P < 0.01$) (Cuadro 3). Sin embargo, cuando se analizó la correlación del CP2 con las variables originales, se encontró que las variables con mayor contribución fueron: ancho de hoja ($r = 0.71$; $P < 0.01$) y grosor de tallo ($r = 0.67$; $P < 0.01$). Algunas de estas correlaciones y el porcentaje de la varianza observada, coinciden de alguna manera con los obtenidos por otros trabajos⁽²⁴⁾, cuando determinaron la extensión y los patrones de distribución de la variación morfológica de 15 caracteres cuantitativos en 415 accesiones de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), al reportar que los primeros cinco CP, explicaron el 79 % de la varianza total, y que variables como altura de planta, longitud de hoja, longitud de inflorescencia, entre otras, fueron agrupadas por el CP1; sin embargo, grosor de tallo, longitud de hoja y número de hojas se agruparon en el CP2. También, estudios similares se han llevado a cabo en otros pastos del género *Lolium*⁽²⁵⁾, *Sorghum*⁽²⁶⁾, *Panicum*⁽²⁷⁾, *Bromus*⁽²⁸⁾ y *Bouteloua*⁽²⁹⁾.

Al analizar la correlación del CP1 con el rendimiento de forraje, se observó que a medida que la densidad de tallos se incrementó, el rendimiento de forraje se incrementó también casi en la misma proporción ($r = 0.94$; $P < 0.01$). Un efecto similar ocurrió sobre el rendimiento de forraje

By obtaining the coefficient of determination (R^2) for each of the original variables, for the three first PC, there were significant correlations for all variables evaluated in different grass populations.

By analyzing the correlation of PC1 with the original variables, those with higher contribution were: stem density ($r = 0.89$, $P < 0.01$), forage height ($r = 0.89$, $P < 0.01$), plant height ($r = 0.88$, $P < 0.01$) and tiller diameter ($r = 0.78$, $P < 0.01$) (Table 3). However, when analyzing the correlation of PC2 with the original variables, it was found that the greatest contribution variables were: blade width ($r = 0.71$, $P < 0.01$) and stem thickness ($r = 0.67$, $P < 0.01$). Some of these correlations and the percentage of the observed variance, somehow agree with those obtained by other studies⁽²⁴⁾, where they determined the extent and distribution patterns of morphological variation of 15 quantitative traits in 415 accessions of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), and reporting that the first five PC, accounted for 79 % of the total variance, and variables such as plant height, leaf length, length of inflorescence, among others, were grouped by PC1; however, stem thickness, leaf length and number of leaves clustered at PC2. Similar studies have also been conducted in other grasses of the genus *Lolium*⁽²⁵⁾, *Sorghum*⁽²⁶⁾, *Panicum*⁽²⁷⁾, *Bromus*⁽²⁸⁾ and *Bouteloua*⁽²⁹⁾.

By analyzing the correlation of PC1 with forage yield, it was observed that as stem density increased, forage yield also increased at about the same proportion ($r = 0.94$, $P < 0.01$). A similar effect occurred on the forage yield with forage height ($r = 0.77$, $P < 0.01$), plant height ($r = 0.72$, $P < 0.01$) and tiller diameter ($r = 0.72$, $P < 0.01$) (Table 3).

Cuadro 3. Correlación de variables con componentes principales en 91 ecotipos del pasto punta blanca

Table 3. Correlation of variables with principal components in 91 ecotypes of Arizona cottontop

	FH	PH	TD	TT	LW	LH	LL	TD
FY	0.77($P < 0.001$)	0.72($P < 0.001$)	0.94($P < 0.001$)	0.34NS	0.32NS	0.5($P < 0.001$)	0.48($P < 0.001$)	0.72($P < 0.001$)
CP1	0.89($P < 0.001$)	0.88($P < 0.001$)	0.89($P < 0.001$)	0.47($P < 0.001$)	0.50($P < 0.001$)	0.67($P < 0.001$)	0.70($P < 0.001$)	0.78($P < 0.001$)
CP2	- 0.10NS	-0.14NS	-0.17NS	0.67($P < 0.001$)	0.71($P < 0.001$)	0.21NS	-0.20NS	-0.21NS
CP3	0.13NS	0.13NS	-0.29NS	-0.17NS	0.14NS	0.13NS	0.58($P < 0.001$)	-0.23NS

CP1= one principal component; CP2= two principal component; CP3= three principal component; FH= forage height; PH= plant height; TD= tiller density; TT= tiller thickness; LW= leaf width; LH= leaf height; LL= leaf length; TD= tiller diameter; FY= forage yield.

con altura de forraje ($r = 0.77$; $P < 0.01$), altura de planta ($r = 0.72$; $P < 0.01$) y diámetro de macollo ($r = 0.72$; $P < 0.01$) (Cuadro 3).

La dispersión observada en la Figura 2, refleja la amplitud de la variación morfológica existente en esta especie. Al mismo tiempo, se observa que la dispersión no es aleatoria, ya que es posible establecer grupos con base en sus áreas de adaptación climática o entidades de origen. Con la variación encontrada, se puede establecer un banco de germoplasma en el cual se conserve y evalúe dicha variación, y permita la creación de programas de mejoramiento genético para generar ecotipos mejorados con alto potencial productivo.

Al efectuar el análisis de conglomerados jerárquicos, se obtuvieron cinco grupos basados en el método de ligamiento WARD (dendrograma). A una distancia euclidiana de 10, el grupo I y II integraron a 11 y 11 ecotipos, respectivamente; sin embargo, el grupo III y IV agruparon 19 y 21 ecotipos, respectivamente. Además, el grupo V integró a 29 ecotipos (Figura 3). La variación morfológica observada en los

The dispersion observed in Figure 2 reflects the extent of morphological variation that exists in this species. Also, the dispersion is not random, since it is possible to establish groups based on their weather adaptation areas or place of origin. With the detected variability, a gene bank can be established to preserve and evaluate such variation, and allows the creation of breeding programs to produce improved ecotypes with high productive potential.

When performing hierarchical cluster analysis based on the linkage WARD method (dendrogram), five groups were obtained. To a Euclidean distance of 10, the group I and II integrated into 11 and 11 ecotypes, respectively, but the group III and IV grouped ecotypes 19 and 21, respectively. In addition, the group V joined 29 ecotypes (Figure 3). The morphological variation observed in the ecotypes of the grass, probably is the result of adaptation of the diversity of environmental factors in the area sampled, such as precipitation, temperature and altitude⁽²⁹⁾.

Figura 2. Distribución de la diversidad de 91 ecotipos del pasto punta blanca en función de los dos primeros componentes principales, obtenidos con la matriz de correlación de las nueve variables

Figure 2. Diversity distribution of 91 ecotypes of Arizona cottontop grass according to the first two principal components, obtained from the correlation matrix of nine variables

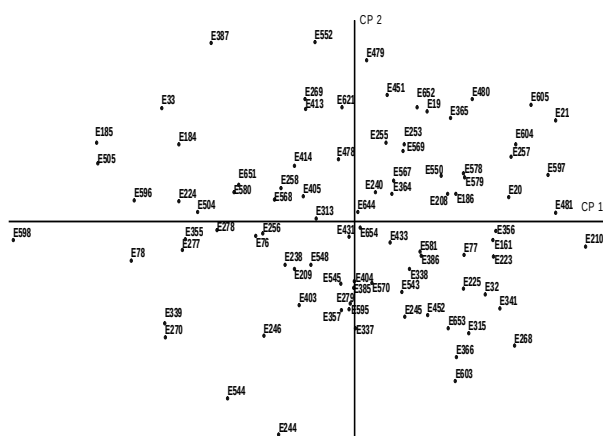
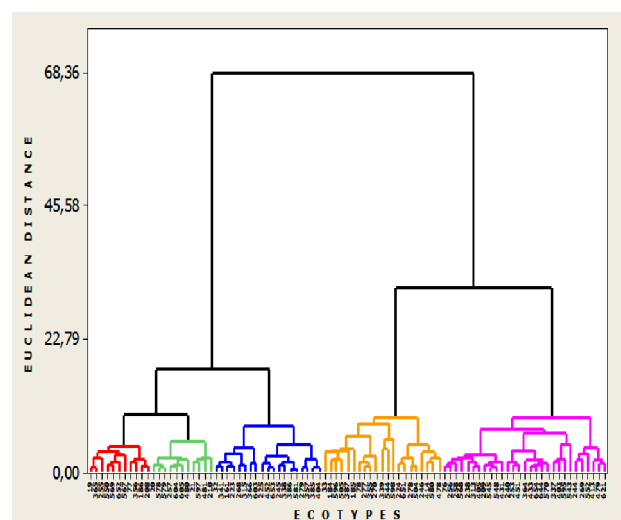


Figura 3. Dendrograma del análisis de nueve variables morfológicas cuantitativas para los 91 ecotipos del pasto punta blanca con base en el método de ligamiento Ward

Figure 3. Dendrogram analysis of nine quantitative morphological variables for the 91 Arizona cottontop grass ecotypes, based on Ward linkage method



ecotipos del pasto, probablemente es el resultado de la adaptación de la diversidad de factores ambientales en el área muestreada, tales como precipitación, temperatura y altitud⁽²⁹⁾.

Caracterización genética

Al aplicar los cuatro pares de iniciadores AFLP, se presentaron 179 bandas totales, de las cuales el 86.3 % (154 bandas) presenta polimorfismo y el 13.7 % (25 bandas) monomorfismo (Cuadro 4). Dichos resultados son respaldados por otras investigaciones, principalmente con relación a la eficiencia del uso de esta técnica para generar gran número de polimorfismo⁽³⁰⁾.

Por otra parte, el número de bandas polimórficas fue de 38, 38, 38 y 40 para las combinaciones de iniciadores *EcoRI*-AAG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-ACT + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CAG y *EcoRI*-AAC + *MseI*-CAG, respectivamente. Los fragmentos variaron de 38 a 40 bandas polimórficas. También, los fragmentos monomórficos en estas combinaciones fueron de 11, 5, 5 y 4, respectivamente. El mayor porcentaje de polimorfismo (90.9 %) y bandas polimórficas (40), se obtuvo con la combinación de iniciadores *EcoRI*-AAC + *MseI*-CAG (Cuadro 4). Además, el número total de patrones de bandas identificados (38, 38, 38 y 40), fueron muy parecidas en todas las combinaciones utilizadas, lo cual sugiere que dichas combinaciones pudieran ser empleadas para estudios de variabilidad genética en poblaciones del pasto punta blanca, utilizando marcadores de AFLP, debido a su eficiencia para detectar polimorfismos. Lo anterior refleja el potencial que representan los

Genetic characterization

By applying the four AFLP primer pairs, 179 total bands were presented, of which 86.3 % (154 bands) presents polymorphisms and 13.7 % (25 bands) monomorphism (Table 4). These results are supported by other research, particularly with regard to the efficiency of using this technique to generate large number of polymorphism⁽³⁰⁾.

The number of polymorphic bands was 38, 38, 38 and 40 for primer combinations *EcoRI*-AAG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-ACT + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CAG and *EcoRI*-AAC + *MseI*-CAG, respectively. The fragments ranged from 38 to 40 polymorphic bands. Also, in these combinations monomorphic fragments were 11, 5, 5 and 4, respectively. The highest percentage of polymorphism (90.9 %) and polymorphic bands (40) was obtained with the combination of primers *EcoRI*-AAC + *MseI*-CAG (Table 4). In addition, the total number of banding patterns identified (38, 38, 38 and 40) were very similar in all the combinations used, suggesting that such combinations could be used for studies of genetic variability in populations of Arizona cottontop grass, using AFLP markers, because of its efficiency to detect polymorphisms. This reflects the potential represented by AFLP to study and reveals polymorphism in this species. These results agree with those obtained with *Agrostis stolonifera* ecotypes, as fragments were ranging from 100 to 150 bands, with polymorphic bands from 22 to 94⁽³¹⁾. Also, in *Schizachyrium scoparium* was reported in 854 and 653 stem fragments and seeds, but only 158 polymorphic bands, which represent

Cuadro 4. Nivel de polimorfismo detectado entre ecotipos del pasto punta blanca para cada combinación de iniciadores, empleados en el análisis de AFLP

Table 4. Level of polymorphism detected among ecotypes of Arizona cottontop grass for each primer combination, used in AFLP analysis

Primer combination	Total bands	Total polymorphic bands	Polymorphism (%)	Total monomorphic bands
<i>EcoRI</i> -AAG+ <i>MseI</i> -CTG,	49	38	77.55	11
<i>EcoRI</i> -ACT+ <i>MseI</i> -CTG,	43	38	88.37	5
<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CAG	43	38	88.37	5
<i>EcoRI</i> -AAC+ <i>MseI</i> -CAG	44	40	90.90	4

AFLP para realizar estudios y revelar polimorfismo en esta especie. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos con ecotipos de *Agrostis stolonifera*, ya que obtuvieron fragmentos que variaron de 100 a 150 bandas, con 22 a 94 bandas polimórficas⁽³¹⁾. También, en *Schizachyrium scoparium* reportan 854 y 653 fragmentos en tallo y semilla, pero sólo 158 bandas polimórficas, que representan 18.5 y 24.2 % para tallo y semilla y 22 a 34 bandas polimórficas⁽³²⁾. Lo anterior indica que existe amplia variabilidad en polimorfismo en los diferentes pastos de acuerdo a los marcadores AFLP utilizados.

La Figura 4 muestra las relaciones genéticas entre las 30 poblaciones evaluadas del pasto punta blanca, y se observa que el marcador AFLP permitió la discriminación de todas las poblaciones. Además, se encontró que los valores de similitud, obtenidos de la aplicación del coeficiente de Dice en las comparaciones pareadas de las 30 poblaciones del pasto, variaron entre 0.14 y 0.55, con un promedio global de 0.345. Estas escalas fueron muy similares a las obtenidas en *Festuca* spp. (0.05 a 0.54)⁽³³⁾ y por Wu et al⁽¹⁵⁾ en *Cynodon transvaalensis* (0.01 a 0.51).

También, el dendrograma presenta cuatro grupos bien definidos (Figura 4). El grupo I incluye poblaciones recolectadas en los municipios de Buenaventura, Chihuahua y Aldama ~ el grupo II incluye poblaciones que fueron recolectadas en los municipios de Ojinaga y Delicias; el Grupo III fue el más grande, ya que incluyó 18 poblaciones que se encuentran en los municipios de Janos, Sueco y Villa Ahumada; por último el grupo IV incluyo poblaciones recolectadas en los municipios de Parral, Chihuahua y Ojinaga (Cuadro 1).

Los valores de similitud obtenidos muestran a los ecotipos PB-270 y PB-277 por un lado y PB-313 y PB-337 como los de mayor heterogeneidad genética, al presentar el valor más bajo de similitud (0.14). Estas poblaciones heterogéneas con distancias genéticas bajas, son originarias de Janos y Casas Grandes por un lado y San Buenaventura, Chihuahua, respectivamente. Estas poblaciones

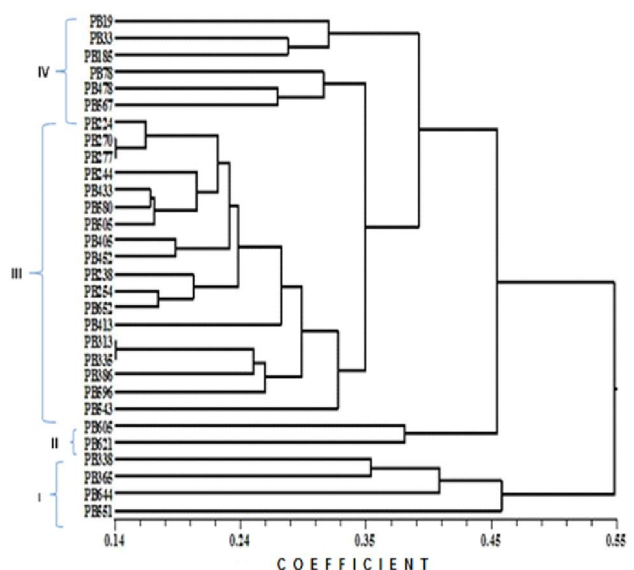
18.5 and 24.2 % for stem and seeds and 22 to 34 polymorphic bands⁽³²⁾. This indicates that there is wide variability in polymorphism in different grasses according to the AFLP markers used.

Figure 4 shows the genetic relationships among the 30 populations assessed, and the AFLP marker allowed discrimination of all populations. Furthermore, it was found that the similarity values obtained from the application of the Dice coefficient of paired comparisons of the 30 populations of the grass, varied between 0.14 and 0.55, with an overall average of 0.345. These scales were very similar to those obtained in *Festuca* spp (0.05 to 0.54)⁽³³⁾ and in *Cynodon transvaalensis* (0.01 to 0.51)⁽¹⁵⁾.

Also, the dendrogram has four distinct groups (Figure 4). Group I includes populations collected in the municipalities of Buenaventura, Chihuahua and Aldama, and group II includes populations that were collected in the municipalities of Ojinaga and

Figura 4. Análisis de agrupamiento de 30 poblaciones del pasto punta blanca mediante el coeficiente de Dice

Figure 4. Cluster analysis of 30 populations of Arizona cottontop grass by the Dice coefficient



Using UPGMA clustering method, on the basis of 179 AFLP markers, generated with four primer combinations (EcoRI-AAG + *Mse*I-CTG; EcoRI-ACT + *Mse*I-CTG; EcoRI-AAG + *Mse*I-CAG; EcoRI-AAC + *Mse*I-CAG).

fueron recolectadas a una altitud de 1,550 y 1,590 m, respectivamente. Estos resultados coinciden con otros estudios respecto al uso efectivo de la técnica AFLP para estudios de diversidad⁽³⁴⁾. Además, se demostró la facilidad para realizar una valoración rápida y eficiente de la diversidad genética en estas poblaciones nativas⁽³⁵⁾.

Considerando las variables morfológicas y genéticas evaluadas, los ecotipos 505 y 596, procedentes del Rancho Los Ojos (municipio de Chihuahua) y km 111 Carretera Chihuahua-Ojinaga (municipio de Aldama), respectivamente, fueron los más sobresalientes de acuerdo a su potencial para producción de forraje.

Los resultados demuestran que entre las poblaciones del pasto punta blanca, presentes en el estado de Chihuahua, existe amplia diversidad genética en las variables altura de forraje, densidad de tallos, grosor de tallos, tamaño de hoja, longitud de inflorescencia, diámetro del macollo y rendimiento de forraje.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

El pasto punta blanca presenta amplia diversidad genética en el estado de Chihuahua, dado el alto polimorfismo detectado con la combinación de iniciadores *EcoRI*-AAG + *MseI*-CTG; *EcoRI*-ACT + *MseI*-CTG; *EcoRI*-AAG + *MseI*-CAG; *EcoRI*-AAC + *MseI*-CAG. Los ecotipos 505 y 596 son una opción para incrementar la producción animal, dado su alto potencial forrajero de acuerdo a las variables altura de forraje, densidad de tallos, grosor de tallos, tamaño de hoja, longitud de inflorescencia, diámetro del macollo y rendimiento de forraje; por lo que se dispone de riqueza genética de esta especie. Lo anterior, representa una oportunidad para iniciar programas de mejoramiento genético de estas poblaciones y establecer programas de rehabilitación de pastizales. El análisis de AFLP permitió estructurar la variabilidad genética del pasto, dado el alto polimorfismo detectado con la combinación de iniciadores *EcoRI*-AAC + *MseI*-CAG. Además, de que estos elevados niveles de variación genética, representan un recurso genético valioso para su aprovechamiento en conservación y restauración.

Delicias. Group III was the largest, including 18 populations that are in Janos, Sueco and Villa Ahumada, and finally the group IV included populations collected in Parral, Chihuahua and Ojinaga (Table 1).

The similarity values obtained show the ecotypes PB-270 and PB-277 on one side, and PB-313 and PB-337 as the most genetically heterogeneous presenting the lowest value of similarity (0.14). These heterogeneous populations with low genetic distances are native to Janos and Casas Grandes on one side and San Buenaventura, Chihuahua, respectively. These populations were collected at an altitude of 1,550 and 1,590 m, respectively. These results are consistent with other studies regarding the effective use of the AFLP technique for diversity studies⁽³⁴⁾. Furthermore, it demonstrated the ease for a quick and efficient assessment of genetic diversity in these native populations⁽³⁵⁾.

Considering the morphological and genetic variables evaluated, the ecotypes 505 and 596 from Rancho Los Ojos (municipality of Chihuahua), and from km 111 Chihuahua-Ojinaga highway (Aldama municipality), respectively, showed an outstanding potential for forage production.

The results show that there is an ample genetic diversity of forage variables as height, stem density, thickness of stems, leaf size, inflorescence length, diameter and tiller forage yield among the Arizona cottontop populations present in the State of Chihuahua,

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The Arizona cottontop grass has a wide genetic diversity in the State of Chihuahua, given the high polymorphism detected with primer combination *EcoRI*-AAG-CTG + *MSEL*, *MSEL* + *EcoRI*-ACT-CTG, *EcoRI*-AAG + *MSEL*-CAG, *EcoRI*- *MSEL*-CAG AAC + . Ecotypes 505 and 596 are an option to increase animal production, given its high forage potential variables according to forage height, stem density, stems thickness, leaf size, inflorescence length, diameter and tillering yield forage, so genetic

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Fondo Mixto CONACyT-Gobierno del estado de Chihuahua por el apoyo financiero.

LITERATURA CITADA

1. Gauthier DA, Lafon A, Toombs TP, Hoth J, Wiken E. Grasslands toward a North American conservation strategy. Canadian Plains Research Center. University of Regina. Commission for Environment Cooperation. Montreal, Canadá. 2003.
2. Pellant M, Shaver P, Pyke DA, Herrick JE. Interpreting indicators of rangeland health. Versión 3. Tech. Ref. 1734-6. USDI, Bureau of Land Management. Denver, CO. 2005.
3. Báez AD, Reyes JG, Melgoza A, Royo MH, Carrillo R. Características productivas del sistema vaca-cría en el estado de Chihuahua. *Téc Pecu Méx* 1999;37:11-24.
4. Cox JR, Giner-Mendoza M, Dobrenz AK, Smith MF. Defoliation effects on resource allocation in Arizona cottontop (*Digitaria californica*) and Lehmann lovegrass (*Eragrostis lehmanniana*). *Afr J Range Forestry Sci* 1992;9:53-59.
5. Stubbendieck J, Hatch SL, Butterfield CH. North American range plants. 4th ed. University of Nebraska Press; 1992.
6. Ramírez G, Enríquez A, Lozano F. Valor nutricional y degradabilidad ruminal del pasto buffel y nueve pastos nativos del NE de México. *Ciencia UANL* 2001;4:313-321.
7. Morales NC, Quero AR, Pérez J, Hernández A, Le Blanc O. Caracterización morfológica de poblaciones nativas de pasto Banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.] en México. *Agrociencia* 2008;42:767-775.
8. Zhou Y, Kuster HK, Pettis JS, Danka RG, Gleason JM, Greenfield MD. Reaction norm variants for male calling song in populations of *Achroia grisella* (Lepidoptera: Pyralidae): toward a resolution of the lek paradox. *Int J Org Evol* 2008;62:1317-1334.
9. Damalas CA, Dhima VK, Eleftherohorinos GI. Morphological and physiological variation among species of the genus *Echinochloa* in Northern Greece. *Weed Sci* 2008;56:416-423.
10. Peter-Schmid MK, Kcolliker 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.
11. Morales NC. Caracterización morfológica, citológica y molecular de recursos genéticos de *Bouteloua curtipendula* [tesis doctorado]. Montecillo, Texcoco, Estado de México: Colegio de Posgraduados; 2006.
12. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4407-4414.
13. Puecher DI, Robredo CG, Ríos R, Rimieri P. Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. Populations and cultivars with RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 2001;121(3):229-236.
14. Renganayaki K, Read JC, Fritz AK. Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by

wealth is available for this species. This also represents an opportunity to start plant breeding programs for these populations and provide rehabilitation programs in rangelands. AFLP analysis allowed the structure of genetic variability in this forage, given the high polymorphism detected with primer combination EcoRI-AAC + MseI-CAG. Moreover, these high levels of genetic variation represent a valuable genetic resource for use in conservation and restoration of rangelands.

ACKNOWLEDGMENTS

To National Council of Science and Technology (CONACyT) and the Joint Fund CONACyT-Chihuahua state government for financial support.

End of english version

-
- AFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 2001;102:1037-1045.
 15. Wu YQ, Taliaferro CM, Bai GH, Anderson MP. Genetic diversity of *Cynodon transvaalensis* Burt-Davy and its relatedness to hexaploid *C. dactylon* (L.) Pers. as indicated by AFLP markers. *Crop Sci* 2005;45:848-853.
 16. Kim MS, Moore PH, Zee F, Fitch M, Steiger DL, Manshardt RM, Paull RE, Drew RA, Sekioka T, Ming R. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome* 2002;45:503-512.
 17. Rafalski JA, Vogel M, Morgante M, Powell W, André C, Tingey SV. Generating and using DNA markers in plants. In: Birren B, Lai E. editors. Non mammalian genomic analysis: A practical guide London: Academic Press; 1996:75-134.
 18. Cox JR, Dobrez AK, McGuire B. Evaluation of some alkali sacaton ecotypes collected in Mexico. *Applied Agric Res* 1990;5:164-168.
 19. Rivero HO. Diversidad morfológica del *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr. y *Leptochloa dubia* (Kunth) Ness. en el estado de Chihuahua [tesis maestría]. Chihuahua, Chih: Universidad Autónoma de Chihuahua; 2009.
 20. Morales NCR. Metodología para la recolecta y conservación de germoplasma de plantas forrajeras en la zonas áridas y semiáridas de México. Folleto Técnico No. 21. S.E. Campana-Madera. INIFAP-SAGARPA. 2009.
 21. Royo MM, Lafón A. Descripción fisiográfica, diversidad vegetal y vertebrados del rancho experimental La Campana. En: Chávez A, Carrillo R. editores. Rancho Experimental La Campana 50 Años de Investigación y Tráferencia de Tecnología en Pastizales y Producción Animal. INIFAP. Chihuahua, Chih. 2008.

22. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 1990;12:13-15.
23. Statistical Analysis System (SAS). Institute Inc. User's guide. Statistics. Version 8. Sixth edition. SAS Inc. Cary, North Carolina, USA. 1999.
24. Ayana A, Bekele E. Multivariate analysis of morphological variation in Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] germplasm from Ethiopia and Eritrea. *Gen Res Crop Evol* 1999;46:273-284.
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. Grenier C, Bramel PJ, Dahlberg JA, Ahmadi AE, Mahmoud M, Peterson GC, Rosenow DT, Ejeta G. Sorghums of the Sudan: analysis of regional diversity and distribution. *Gen Res Crop Evol* 2004;51:489-500.
27. Casler MD. Ecotypic variation among switchgrass populations from the Northern USA. *Crop Sci* 2005;45:388-398.
28. Fernandez YSN, Coulman BE. Genetic relationships among smooth brome grass cultivars of different ecotypes detected by AFLP markers. *Crop Sci* 2004;44:241-247.
29. Morales NC, Quero AR, Melgoza A, Martínez M, Jurado P. Diversidad forrajera del pasto banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], en poblaciones de zonas áridas y semiáridas de México. *Téc Pecu Méx* 2009;47(3):231-244.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Mian MA, Hopkins A, Zwonitzer J. Determination of genetic diversity in Tall Fescue with AFLP markers. *Crop Sci* 2002;42:944-950.
34. Roldán-Ruiz I, Dendauw 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.
35. Hammer K. A paradigm shift in the discipline of plant genetic resources. *Gen Res Crop Evol* 2003;43:337-341.