

Caracterización de la diversidad nativa del zacate banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], mediante su nivel de ploidía

Characterization of native diversity in sideoats grama [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) torr.] by means of the ploidy level

Carlos Raúl Morales Nieto^a, Adrián Raymundo Quero Carrillo^b,
Carlos Hugo Avendaño Arrazate^c

RESUMEN

Los objetivos fueron determinar el número de cromosomas y contenido de ADN, identificar individuos diploides sexuales y poliploides apomicticos y definir la relación entre el nivel de ploidía y diversos atributos informativos del potencial productivo del pasto Banderita. Se evaluaron 188 ecotipos de pasto Banderita, procedentes de 13 Estados de la República. Para estimar el contenido de ADN nuclear, se utilizó un citómetro de flujo. Los conteos cromosómicos se realizaron en ápices radicales. Se estimó la relación entre altitud, temperatura media, precipitación media, contenido de ADN, número cromosómico y potencial productivo. La diversidad mostró un rango entre 2.04 a 4.31 pg ADN/2C para contenido de ADN, que refleja variación significativa entre ecotipos. El número cromosómico mostró una variación de 19 hasta 107 cromosomas. Con los tres primeros componentes, se explicó el 82.7 % de la variación total observada. Las variables de mayor importancia en el CP1 fueron el contenido de ADN y el número de cromosomas; en el CP2 altitud y temperatura y en el CP3 rendimiento de forraje y precipitación. Se determinaron cinco grupos basados en el coeficiente de correlación. El análisis de varianza detectó diferencias significativas en todas las variables ($P < 0.05$). Al correlacionar las variables, se encontró asociación, altamente significativa ($P = 0.87, < 0.001$), entre contenido de ADN y número cromosómico, con los niveles diploide y poliploide, para los 188 ecotipos. Se obtuvo la ecuación de predicción ($y = 50.21 x - 75.29$) con el contenido de ADN y número de cromosomas.

PALABRAS CLAVE: *Bouteloua curtipendula*, Componentes principales, Contenido de ADN, Nivel de ploidía.

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine the number of chromosomes and DNA content, to identify sexual diploids and apomictic polyploids and to define the relationship between ploidy level and diverse revealing attributes of sideoats grama's productive potential. One hundred and eighty eight ecotypes of sideoats grama from 13 States of Mexico were evaluated. In order to estimate nuclear DNA content, a flow cytometer was used. Chromosome counts were carried out in root tips. The relationships between altitude, mean temperature, mean rainfall, DNA content, chromosome numbers as well as productive potential, were evaluated also. Recorded diversity ranged from 2.04 to 4.31 pg DNA/2C for DNA content, reflecting significant variation among ecotypes. Chromosome numbers ranged from 19 to 107. The first three components explained 82.7 % of the observed total variation. The most important variables for CP1 were DNA content and chromosome number; for CP2 altitude and mean temperature, and for CP3, forage yield and rainfall. Five groups were defined, based on the correlation coefficient. Variance analysis spotted significant differences ($P < 0.05$) between variables. When correlated, variables showed a highly significant association ($P = 0.87, < 0.001$), between DNA content and chromosome numbers, within the diploid and polyploidy levels, for the 188 ecotypes. The prediction equation obtained was $y = 50.21 x - 75.29$ with chromosome numbers as the dependent variable and DNA content as the independent.

KEY WORDS: *Bouteloua curtipendula*, Principal components, DNA content, Ploidy level.

Recibido el 15 de enero de 2007 y aceptado para su publicación el 18 de abril de 2007.

^a INIFAP-CIRNOC. Campo Experimental La Campana. Avenida Homero No. 3744 Colonia El Vergel. 31100. Chihuahua, Chih., México. (morales_nieto_c_r_@hotmail.com). Correspondencia al primer autor.

^b Ganadería. Campus Montecillos. Colegio de Postgraduados.

^c Genética. Campus Montecillos. Colegio de Postgraduados.

INTRODUCCIÓN

El género *Bouteloua* Lag., ampliamente distribuido en el continente Americano, está conformado por 57 especies, muchas de ellas, poliploides y de gran importancia para el equilibrio ecológico de los pastizales de América del Norte^(1,2) y con mayor diversidad en el norte-centro de México^(3,4). El género *Bouteloua* está dividido en dos secciones: *Chondrosium* y *Bouteloua*⁽²⁾, esta última con 25 especies reconocidas, entre las que se encuentran 11 que comprenden lo que se denomina complejo *Bouteloua curtispindula* o CBC⁽⁵⁾.

Basados en el hábito de crecimiento, el pasto banderita fue artificialmente dividido en tres subespecies: *B. curtispindula* var. *curtispindula*, var. *tenuis* y var. *caespitosa*⁽⁶⁾, sin embargo, esto no fue confirmado por la evaluación con marcadores moleculares para ADN del cloroplasto⁽⁵⁾. Existen razones para creer que el CBC se ha conformado mediante hibridaciones entre especies de la sección *Bouteloua* del género *Bouteloua*⁽⁷⁾. La distribución del CBC es desde Canadá hasta Argentina⁽⁵⁾.

En un complejo apomictico, como CBC, las especies que hibridan naturalmente, se dividen en dos grupos: diploides (sexuales) y poliploides de reproducción apomictica⁽⁸⁾. En este complejo, se han realizado conteos cromosómicos para ocho especies y se han identificado taxones diploides y poliploides⁽⁶⁾. Banderita es una especie forrajera de alta variabilidad citológica, ya que se han reportado conteos de $2n=4x=40$; $2n=2x=20$ y $2n=28, 35, 49, 42, 70$ y 103 , identificándose tanto euploides como aneuploides^(7,9).

La definición del nivel de ploidía en ecotipos nativos, representativos de la riqueza natural de pasto banderita, producirá información básica para la selección y mejoramiento genético de esta especie tales como: establecimiento de la dinámica reproductiva entre individuos con diferente nivel de ploidía (sexualidad y apomixis), identificación de ecotipos con valor forrajero y su relación con el nivel de ploidía⁽¹⁰⁾. En algunos taxones vegetales, el contenido de ADN nuclear se ha utilizado para medir el nivel de ploidía⁽¹¹⁾. También, se tienen los primeros reportes sobre su número de

INTRODUCTION

The genus *Bouteloua* Lag., widely dispersed in the American continent, is made up by 57 species, many of them polyploids, and of great importance for the ecological balance in North America's grasslands^(1,2). *Bouteloua* shows higher within diversity in North Central Mexico^(3,4). This genus is divided in two sections, *Chondrosium* and *Bouteloua*⁽²⁾, the last one including 25 identified species, of which 11 which make up the *Bouteloua curtispindula* complex (CBC)⁽⁵⁾.

Based on growth habit, sideoats grama was artificially divided in three subspecies: *Bouteloua curtispindula* var. *curtispindula*, *Bouteloua curtispindula* var. *tenuis* and *Bouteloua curtispindula* var. *caespitosa*⁽⁶⁾. However, this was not confirmed through assays of chloroplast DNA molecular markers⁽⁵⁾. Several reasons allow to believe that CBC has evolved from hybridization between species of the *Bouteloua* section of the genus *Bouteloua*⁽⁷⁾. CBC can be found from Canada to Argentina⁽⁵⁾.

In an apomictic complex, such as CBC, species which hybridize naturally, are divided into two groups: diploids (sexual) and polyploids (apomictic reproduction)⁽⁸⁾. In the complex being studied, chromosome counts for eight species have been carried out and both diploids and polyploids have been identified⁽⁶⁾. This species shows a high cytological variability, with counts of $2n=4x=40$; $2n=2x=20$ and $2n=28, 35, 42, 49, 70$ and 103 , with both euploids and aneuploids being present^(7,9).

Ploidy levels in native ecotypes, representatives of the natural wealth of *Bouteloua curtispindula*, could provide basic information for selection and genetic improvement, especially data on reproductive dynamics between individuals having different ploidy levels (sexual and apomictic), and on identification of ecotypes showing high forage value and their relationship to ploidy levels⁽¹⁰⁾. In some taxa, nuclear DNA has been used to measure ploidy level⁽¹¹⁾. Besides, the first reports on sideoats grama chromosome numbers are available⁽¹²⁾, and the presence of apomixis in a variety of *Bouteloua curtispindula* showing a chromosome numbers⁽¹³⁾ which varies between $2n=85$ and $2n=101$. Also,

cromosomas⁽¹²⁾, además se señala la presencia de apomixis en una variedad, cuyo número cromosómico varió de $2n=85$ a $2n=101$ ⁽¹³⁾. Asimismo, se reportaron tipos sexuales con $2n=40$ y 52 cromosomas, y tipos apomícticos con $2n=74-96$ cromosomas⁽¹⁴⁾. Muy probablemente, el pasto banderita conforma, similarmente a otras especies apomícticas y poliploides, un complejo agámico⁽¹⁵⁾.

El pasto banderita está integrado por al menos 10 taxa diploides⁽⁶⁾; aunque también se señala que incluye 11 especies: *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., *B. disticha* (Kunth) Benth, *B. distans* Swallen, *B. media* E. Fourn, *B. pedicellata* Swallen, *B. purpurea* Gould & Kapadia, *B. reflexa* Swallen, *B. triaena* (Trin.) Scribn, *B. uniflora* Vasey, *B. vaneedenii* Pilg. Ex Urb. y *B. warnockii* Gould & Kapadia⁽⁵⁾.

En un complejo agámico, los cruzamientos entre grupos diploides y poliploides son posibles, cuando se superan las barreras de ploidía⁽¹⁶⁾. En estos complejos, en el que la apomixis, hibridación, poliploidización, haploidización y sexualidad ocurren, la variación morfológica observada es continua y, por tanto, la separación botánica tácita, entre especies dentro del complejo es difícil y ha sido artificial⁽¹⁷⁾, habiendo necesidad de definir tipos intermedios, como en el género *Tripsacum*, para organizar la morfología⁽¹⁵⁾.

En muchas especies vegetales, el contenido de ADN nuclear y el nivel de ploidía están relacionados⁽¹⁸⁾. En poblaciones numerosas, resulta difícil cuantificar el número cromosómico⁽¹⁹⁾; varios autores han propuesto determinar el contenido de ADN mediante citometría de flujo⁽¹⁵⁾, como herramienta para incrementar la eficiencia y velocidad de evaluación. El empleo del citómetro de flujo, permite estudios detallados en poblaciones numerosas, tanto en la variación existente, como en las cruces generadas^(20,21).

Los objetivos de la presente investigación fueron: caracterizar poblaciones nativas de pasto banderita con base en el número de cromosomas y cantidad de ADN e identificar individuos diploides sexuales y poliploides apomícticos en poblaciones nativas y

sexual types with $2n=40$ and 52 chromosomes and apomictic with $2n=74-96$ chromosomes were reported⁽¹⁴⁾. Most probably, sideoats grama constitutes, as happens in other apomictic and polyploid species, an agamic complex⁽¹⁵⁾.

Sideoats grama is made up by at least ten diploid taxa⁽⁶⁾, although it has been pointed out that it includes eleven species: *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., *B. disticha* (Kunth) Benth, *B. distans* Swallen, *B. media* E. Fourn, *B. pedicellata* Swallen, *B. purpurea* Gould & Kapadia, *B. reflexa* Swallen, *B. triaena* (Trin.) Scribn, *B. uniflora* Vasey, *B. vaneedenii* Pilg. Ex Urb. and *B. warnockii* Gould & Kapadia⁽⁵⁾.

In an apomictic complex, crosses between diploids and polyploids are possible if ploidy barriers are surmounted⁽¹⁶⁾. In these complexes, in which apomixis, hybridization, polyploidization, haploidization and sexuality are present, observed morphological variation is constant and therefore, tacit botanical division between species within the complex is difficult and artificial⁽¹⁷⁾. Intermediate types, such as the genus *Tripsacum*, have been necessary to devise, in order to organize morphology⁽¹⁵⁾. In many plant species, nuclear DNA content and ploidy level are related⁽¹⁸⁾. In large populations, determining the chromosome numbers is difficult⁽¹⁹⁾; and several authors have suggested using flow cytometry to determine nuclear DNA contents⁽¹⁵⁾, in order to increase the efficiency and speed of evaluations. The use of a flow cytometer allows for thorough studies in large populations, both in existing variation and in crosses^(20,21).

The objectives of the present study were: characterization of sideoats grama native populations based on their chromosome numbers and DNA content, identification of sexual diploid and apomictic polyploid individuals in native populations and the relationship between ploidy level and geographical location of each ecotype.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

During the years 2000 and 2003, a total of 577 ecotypes were collected in 13 States of Mexico

relacionar el nivel de ploidía con el origen geográfico de cada ecotipo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetativo

En junio y julio de los años 2000 a 2003, se recolectaron 577 ecotipos procedentes de 13 Estados de la República Mexicana: Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, México, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas, mantenidos *ex situ*, en crecimiento activo, en el Colegio de Postgraduados, Campus Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. La población total consistió de 188 ecotipos establecidos, los cuales fueron evaluados para número cromosómico en el Laboratorio de Citogenética del Colegio de Postgraduados durante tres meses. El trabajo de citometría de flujo se realizó durante cuatro meses en el Laboratorio de Apomixis del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), en Texcoco, México.

Para identificar la recolecta en el recorrido de campo, se obtuvieron los siguientes datos: número de ecotipo, correspondiente al número de recolecta (001), coordenadas, sitio de recolecta (precipitación, temperatura, altitud, etc), tipo de asociación con otras especies y observaciones específicas. El potencial forrajero de cada ecotipo, se obtuvo realizando cortes cada 35 días durante un período de crecimiento de 210 días.

Citometría de flujo

El contenido de ADN nuclear se estimó con un citómetro de flujo (PARTEC CCA-II, Cell Counter Analyser), con combinación de filtros para detectar tinción con fluorocromo o reactivo (HOESCHT 33342); calibrado y utilizando el programa DPAC v2 para análisis de datos⁽²²⁾. Hojas jóvenes de cada uno de los 188 ecotipos, se recolectaron en campo, colocadas en bolsas de glacin, se conservaron a 4 °C, protegidas de la humedad, transportadas y conservadas en cuarto frío a 4 °C, hasta su procesamiento, antes de 72 h post-muestreo de corte.

(Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Mexico, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora and Zacatecas), and kept *ex situ* in active growth at the Colegio de Postgraduados, Campus Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, Mexico. The experimental material consisted of 188 established ecotypes, which were evaluated for chromosome numbers in the Cytogenetics Laboratory of the Colegio de Postgraduados. Flow cytometry was carried out at the CIMMYT's Apomixis Laboratory, Texcoco, Mexico.

In order to classify the collected material in the field, the following data were identified: ecotype number corresponding to the collection number (001), coordinates, collection site (rainfall, temperature, altitude, etc.), association with other species, and specific comments. Forage potential of each ecotype was determined through cuts every 35 d during a 210 d growing period.

Flow cytometry

Nuclear DNA content was determined with the aid of a flow cytometer (PARTEC CCA-II, Cell Counter Analyser), provided with filters to detect staining with fluorochrome or reactant (Hoechst 33342), calibrated and using the DPAC v2 software for data analysis⁽²²⁾. Young leaves of each ecotype were collected in the field, placed in glacin bags, kept at 4 °C, protected from moisture, transported, and kept in a cold room at 4 °C till processing less than 72 h after cutting.

Maize leaf sheaf fragments (as reference) and sideoats grama leaf sections (0.25 to 0.50 sq cm), imbedded in 5 ml buffer solution⁽²⁰⁾ were set in Petri dishes, for nuclei staining. The tissue combination was finely chopped with a straight razor, thus promoting suspended nuclei. 1.5 ml of buffer solution was added and then filtered through a 40 µm nylon sieve and allowed to rest for 3 min before determining nuclear DNA in a cytometer.

The data obtained were as follows: average position, index and the variation coefficient. Fluorescence emitted by nuclei stained with fluorochrome was recorded in a Cartesian chart. In the X-axis, DNA

En cajas Petri plásticas se colocaron fragmentos del haz foliar de maíz como referencia, y secciones de hoja (0.25-0.50 cm²) embebidas en 5 ml de solución amortiguadora⁽²⁰⁾, para la tinción de núcleos. El combinado de tejidos se fraccionó finamente con navaja de afeitar, promoviendo núcleos en suspensión. Se adicionaron 1.5 ml de solución amortiguadora, y la solución resultante se filtró (nylon 40 µm), dejándola reposar por 3 min previamente a la determinación del contenido de ADN de los núcleos de la muestra, en el citómetro.

Los datos que se obtuvieron incluyeron: posición media, índice y coeficiente de variación. La fluorescencia que emitieron los núcleos teñidos con fluorocromo, se registró en un plano cartesiano. En el eje de las abscisas (X) aparece el contenido de ADN de núcleos teñidos y en el de las ordenadas (Y), la frecuencia de células con la misma intensidad de fluorescencia⁽²²⁾. Para cada muestra se construyó un histograma y se estimó el contenido relativo de ADN (fluorescencia de núcleos) con estadísticos básicos: media, moda, coeficiente de variación y valor índice, el cual corresponde al contenido relativo de ADN nuclear, cociente entre la media de intensidad de fluorescencia de la muestra (divisor) y la media del estándar interno (dividendo), multiplicado por la cantidad de ADN conocida del estándar utilizado (maíz). Para definir el contenido de ADN en valores absolutos, los índices se transformaron a picogramos (pg), utilizando como referencia al maíz, con valores absolutos de 4.75 a 5.63 pg (5 pg), mediante la siguiente fórmula⁽¹¹⁾:

$$m_{pg} = \left(\frac{m_i}{s_i} \right) M_{pg}$$

donde: m_{pg} = contenido absoluto de ADN de la muestra en pg; m_i = contenido relativo de ADN de la muestra; s_i = contenido relativo de ADN del estándar interno; M_{pg} = contenido absoluto de ADN de maíz.

Conteo cromosómico

Los conteos de cromosomas se realizaron en microscopio compuesto óptico en campos de 100x. En invernadero se sembró semilla de cada uno de

of the stained nuclei was recorded and frequency of cells with the same fluorescence intensity in the Y-axis⁽²²⁾. An histogram was created for each sample and DNA content was estimated (nuclei fluorescence) through basic statistics: averages, modes, variation coefficient and index value, which corresponds to relative nuclear DNA, being the quotient between average fluorescence intensity of the sample (divisor) and the average internal standard (dividend) multiplied by the known DNA content of the control used (maize in this case). To determine absolute DNA content, indices were transformed into picograms (pg) using maize as reference, with absolute values between 4.75 and 5.63 (5 pg), by means of the following equation⁽¹¹⁾:

$$m_{pg} = \left(\frac{m_i}{s_i} \right) M_{pg}$$

Where: m_{pg} = absolute DNA content of the sample in pg; m_i = relative DNA content of the sample; s_i = relative DNA content of the internal standard; M_{pg} = absolute DNA content of maize.

Chromosome counting

Chromosomes were counted in an optical microscope in 100x fields. Seed of each ecotype was sown under greenhouse conditions, in 20 cm diameter by 25 cm high pots, watered once a week till survival of at least one individual in each ecotype tagged for chromosome assessment. Four months after emergence, 1 cm root tips were sampled, cut and treated with an 8-hydroxyquinoline aqueous solution (0.002 M) at room temperature (18 to 24 °C) for 4 h. Afterwards, they were set in Farmer's solution (3:1 ethanol 96%:glacial ethanoic acid) and kept at 4°C till evaluation. Root tips were washed with distilled water and hydrolyzed with HCL 1N at 60 °C for 10 min, washed again, dipped in Schiff's (Feulgen) reactant and placed for 6 min at 60 °C to foster chromosome staining.

The stained fraction was separated by means of a scalpel. Cell walls were digested by means of an enzyme solution (pectinase 0.1 g, cellulase 0.5 g, citrate buffer 10 ml) for 10 or 15 min for thin or broad roots, respectively. To increase cell wall

los 188 ecotipos en macetas de 20 cm de diámetro y 25 cm de altura. Se aplicaron riegos cada semana hasta lograr la sobrevivencia, al menos, de un individuo de cada ecotipo seleccionado para la evaluación cromosómica. Cuatro meses después de la emergencia, se muestrearon ápices radicales de 1 cm; éstos se cortaron y trataron con solución acuosa de 8-hidroxiquinolina (0.002 M), a temperatura ambiente (18 a 24 °C) por 4 h. Posteriormente, se fijaron en solución Farmer (3:1 v/v, alcohol etílico 96%: ácido acético glacial) y se conservaron a 4 °C, hasta la evaluación al microscopio. Las puntas de raíz se lavaron con agua destilada e hidrolizaron con ácido clorhídrico 1 N, a 60 °C, durante 10 min, fueron nuevamente lavadas, sumergidas en reactivo de Schiff (Feulgen) y se colocaron, durante 6 min, a 60 °C, para promover la tinción de cromosomas.

La porción teñida se aisló con bisturí. La pared celular de raíces se digirió utilizando una solución enzimática (pectolasa 0.1 g, celulasa 0.5 g, citrato buffer 10 ml), durante 10 y 15 min para raíces delgadas y gruesas, respectivamente. Para incrementar la digestión de las paredes de la raíz, se utilizó citasa durante 30 y 45 min para raíces delgadas y gruesas, respectivamente. Posteriormente, se realizaron observaciones de células al microscopio con la técnica de carmín-ácido (carmín 2% en ácido acético 45%)⁽²³⁾, con dos ápices por ecotipo y se contaron, al menos, cinco células en metafase por ápice.

Análisis estadístico

Para establecer la relación entre el contenido de ADN y el número cromosómico con atributos inherentes al sitio de origen, así como del potencial forrajero de los ecotipos evaluados, se estimó la relación entre: altitud (m), temperatura media anual (°C), precipitación media anual (mm), contenido de ADN (pg), número de cromosomas y potencial forrajero (g). Los datos se sometieron a un análisis de componentes principales (ACP)⁽²⁴⁾.

La matriz de correlación del ACP se utilizó para determinar los atributos relevantes en los ecotipos; se estimó el coeficiente de determinación (R^2) de las variables originales en cada componente

digestion, cytase was used for 30 or 45 min in thin or broad roots, respectively. Afterwards, cells were observed under microscope, using the carmine-acid technique (carmine 2 % in 45 % ethanoic acid), at the rate of two root tips for each ecotype and at least five cells in metaphase per root tip.

Statistical analysis

To establish a relationship between DNA content and chromosome numbers with attributes inherent to the site of origin and also of forage potential of the assessed ecotypes, the relationship between altitude (m), average annual temperature (°C), annual average rainfall (mm), DNA content (pg), chromosome numbers and forage potential was estimated. Data was subjected to multivariate analysis of principal component (ACP)⁽²⁴⁾.

A ACP correlation matrix was used to determine relevant ecotype attributes; the determination coefficient (R^2) was estimated for the original variables for each principal component and the explained variability for each component was estimated. After identifying those variables with higher descriptive value, a hierarchical conglomerate analysis was performed (ACJ), through the average linkage method (UPGMA), from the correlation matrix to generate the corresponding dendrogram. Afterwards, taking into account the obtained grouping, a variance analysis was performed to establish the difference between groups fashioned through MCA and ACJ. Chromosome numbers and DNA content were correlated for each tested ecotype through simple regression.

RESULTS AND DISCUSSION

DNA contents

The *Bouteloua curtipendula* complex (CBC) diversity showed DNA content between 2.04 and 4.31 pg DNA/2C (cells in mitosis), with an average of 3.08 ± 0.34 pg. Diploid ecotypes ranged from 2.04 to 2.07 pg DNA/2C, tetraploids between 2.27 and 2.63 pg DNA/2C and higher ploidy levels up to 3.40 pg DNA/2C (Table 1). This reflects a significant variation between ecotypes due to a high phenotype and collection sites variations in the

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD NATIVA DE BANDERITA

Cuadro 1. Citología de 188 ecotipos de pasto banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], evaluados para contenido de ADN y número cromosómico

Table 1. Cytology of sideoats grama [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.]188 ecotypes, assessed through DNA content and chromosome numbers

No. of ecotypes ¹	Percentage ²	DNA content (pg)	Chromosome numbers	Ploidy level	Location
2	1.06	2.04 – 2.07	19-20	2n=2x=20	Zacatecas (Zac.), Coahuila
20	10.6	2.27 – 2.63	39-41	2n=4x=40	Coahuila, SLP, Zacatecas
12	6.4	2.69 – 2.78	60-61	2n=6x=60	Zacatecas, Coahuila
25	13.5	2.80 – 2.95	70-71	2n=7x=70	Zacatecas, Coahuila
51	27.1	2.95 – 3.09	79-84	2n=8x=80	Zac., Durango, Aguascalientes, SLP
42	22.3	3.10 – 3.40	87-91	2n=9x=90	Durango, Zac., SLP, Coahuila
19	10.1	3.40 – 3.59	98-99	2n=10x=100	Chihuahua (Chih.), Durango, Sonora
17	9.04	3.61 – 4.31	100-107	2n=10x=107	SLP, Jalisco, Guanajuato, Chih.

SLP = San Luis Potosí.

1 = No of ecotypes inside range; 2 = Of assessed ecotypes.

principal, y se estimó la proporción de la variabilidad explicada para cada componente. Después de conocer las variables de mayor valor descriptivo, se realizó un análisis de conglomerados jerárquico (ACJ), mediante el método de ligamiento promedio (UPGMA), a partir de la matriz de correlación y se generó el dendograma correspondiente. Posteriormente, al considerar la agrupación obtenida, se realizó un análisis de varianza para establecer la diferencia entre los grupos formados mediante el ACP y ACJ. El número de cromosomas y el contenido de ADN se relacionaron para cada uno de los ecotipos muestreados, mediante regresión simple.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de ADN

La diversidad del complejo *Bouteloua cutipendula* (CBC) mostró un rango entre 2.04 a 4.31 pg ADN/

center of origin of the species. Similar results were observed in *Tripsacum*⁽²⁵⁾, *Brachiaria*⁽¹⁷⁾ and *Paspalum*⁽²⁶⁾. For example, in *Panicum virgatum* L. (switchgrass), DNA contents ranging from 2.5 to 3.2 pg for tetraploids, from 3.9 to 4.0 pg for hexaploids and from 4.3 to 5.9 pg for octaploids, have been reported⁽²⁷⁾. Besides, in *Poa pratensis* L. (Kentucky bluegrass), a higher DNA content was found, averaging from 5.39 ± 0.03 pg to 17.69 ± 0.65 pg DNA/2C in genotypes representing this specie's diversity⁽²⁸⁾.

Determining DNA content in sideoats grama ecotypes with desirable morphological characteristics should be useful to identify apomictic materials with a high forage potential. Owing to the fact that DNA content influences characteristics which could reflect a high forage potential, it should be necessary and desirable to determine the DNA range content when selecting a characteristic, before starting a

2C (células mitóticas) en contenido de ADN; con promedio de 3.08 ± 0.34 . Ecotipos diploides tuvieron un rango de 2.04 a 2.07 pg ADN/2C, los tetraploides de 2.27 a 2.63 pg ADN/2C y mayores niveles de ploidía hasta 3.40 pg ADN/2C (Cuadro 1), lo que reflejó variación significativa entre ecotipos, principalmente debido a la gran variabilidad fenotípica y lugares de recolecta de la especie en el centro de origen. Resultados similares han sido señalados en *Tripsacum*⁽²⁵⁾, *Brachiaria*⁽¹⁷⁾ y *Paspalum*⁽²⁶⁾. En *Panicum virgatum* L. se han registrado rangos de 2.5 a 3.2 pg para tetraploides, 3.9 a 4.0 pg para hexaploides y 4.3 a 5.9 pg para octoploides⁽²⁷⁾. Además, en *Poa pratensis* L., encontraron mayores contenidos de ADN, los cuales promediaron 5.39 ± 0.03 hasta 17.69 ± 0.65 pg ADN/2C, en genotipos representativos de la diversidad natural de esta especie⁽²⁸⁾.

Determinar el contenido de ADN en ecotipos de pasto banderita, con características de morfología forrajera deseables, será útil para identificar materiales apomícticos con elevado potencial forrajero. Debido a que el contenido de ADN tiene influencia en características que pueden reflejar un alto potencial forrajero, es importante considerar el rango en el contenido de ADN, cuando se seleccione alguna característica, antes de iniciar un programa de selección⁽²⁸⁾. La variabilidad en contenido de ADN del CBC, es resultado de la hibridación entre especies de la sección *Bouteloua*, ya que se ha demostrado que las cruza han involucrado plantas diploides, tetraploides y aneuploides en especies apomícticas, presentándose apomixis, sexualidad, hibridación, poliploidización y polihaploidización⁽¹⁷⁾.

Conteo cromosómico

El número cromosómico mostró una amplia variación, de 19 hasta 107 cromosomas, con un promedio de 79.2 ± 18.7 . Ecotipos diploides presentaron 19 y 20 cromosomas; los tetraploides se mantuvieron en un rango de 39 a 41 cromosomas y, mayores niveles, tuvieron hasta 107 cromosomas (Cuadro 1). Los rangos en el número de cromosomas, obtenidos en pasto banderita, son similares a seis cultivares obtenidos en *Poa pratensis*⁽²⁸⁾, donde estimaron promedios de 37 a

selección program⁽²⁸⁾. DNA content variability for CBC is the result of hybridization among species of the *Bouteloua* section of the *Bouteloua* genus, because crosses involved diploid, tetraploids and aneuploids plants in apomictic species, showing apomixis, sexuality, hybridization, polyploidization and polyhaploidization⁽¹⁷⁾.

Chromosome counting

Chromosome numbers showed great variation, between 19 and 109 chromosomes, being the average 79.2 ± 18.7 . Diploid ecotypes presented 19 and 20 chromosomes, tetraploids between 39 and 41 and higher ploidy levels, up to 107 chromosomes (Table 1). These ranges for sideoats grama chromosome numbers are similar to those reported for six Kentucky bluegrass cultivars⁽²⁸⁾, which presented estimated averages from 37 to 155 chromosomes. Besides, similar ranges between 28 and 140 chromosomes are reported⁽²⁹⁾. Due to this, studies on chromosome numbers are important to confirm polyploidy and hybridization influence in CBC.

Diploid and polyploid levels in these ecotypes, determined through flow cytometry, were in coincidence with the chromosome count. The $2n=20$ diploidy or sexual, was present in only two of the 188 ecotypes studied, the rest can be classified as apomictic polyploids. The speed that can be attained with the flow cytometer to determine the ploidy level in sideoats grama, allows to increase the size of the sample, and to include more sites and environments in studies on evolution and taxonomy.

Nuclear DNA content in diploid (2.05 pg), tetraploid (2.45 pg) and polyploid (3.50 pg) ecotypes, suggest possible genome sizes to be expected in other species of this genus and in addition, encourage studies on the biological significance of the differences in DNA content within this specie. In general, DNA content found in sideoats grama (2.04-4.31 pg) lies within the expected range for some taxa of the Poaceae family, 2 - 21 pg^(30,31).

Changes in DNA content involve gain or loss of repetitive DNA sequences, modify the nucleotype, and are usually referred as the effect of nuclear

155 cromosomas. También, rangos similares de 28 a 140 cromosomas, son reportados⁽²⁹⁾. Por lo anterior, son importantes los estudios del número de cromosomas para confirmar la poliploidía y la influencia de la hibridación en el CBC.

Los niveles diploides y poliploides en estos ecotipos, determinados por citómetro de flujo, coincidieron con el recuento cromosómico efectuado. La ploidía $2x=20$ o diploides sexuales, sólo se observaron en dos ecotipos de los 188 contemplados, el resto son considerados como poliploides apomícticos. La rapidez con que se mide el nivel de ploidía en pasto banderita, mediante citometría de flujo, facilita ampliar el tamaño de la muestra por recolección, incluir mayor número de localidades y ambientes en estudios de evolución y taxonomía.

El contenido promedio de ADN nuclear en ecotipos diploides (2.05 pg), tetraploide (2.45 pg) y poliploides (3.50 pg), sugieren posibles tamaños de genoma que se podrían esperar para otras especies del género y, por otra parte, estimulan el estudio del significado biológico de la variación del contenido de ADN en esta especie. En general, el tamaño del genoma (2.04 a 4.31 pg) en pasto banderita, se encuentra dentro de la amplitud estimada para algunos taxa de la familia Poaceae, de 2 a 21 pg^(30,31).

Los cambios en el contenido de ADN involucran pérdida o ganancia de secuencias de ADN

(either functional or non functional) on phenotype, chromosome size, mitosis cycle, meiosis length and lifespan, among others⁽¹⁸⁾. Besides, gains or losses of repetitive DNA are usually related also to adaptation to changing environmental conditions. The greater variation in DNA content between diploid and polyploid ecotypes in *B. curtipendula* can be related to changing environmental characteristics. Use of the flow cytometer facilitates analyzing the ploidy level, and is of great help in hybridization programs.

Principal components analysis

The principal components analysis (PCA) was based on a correlation matrix which took into account the following six variables: altitude (m), average annual temperature (°C), average annual rainfall (mm), DNA content (pg), chromosome numbers and forage yield (g/plant/210 d). The first three explained 87.5 % of total variability. The first contributed 36.1 %, the second 29.4 % and the third 17.1 % (Table 2). Again, from the first three components, the first contributed to explain 2.17 individual variations, the second 1.76, and the third 1.02.

To understand the relative weight of each variable on the total variation, typical vectors and correlation among variables in each PC were analyzed, as well as the determining coefficient for each variable, regarding each PC (Table 3). The most important variables for PCI were DNA content and

Cuadro 2. Valores característicos y proporción de la varianza total explicada con base en seis variables cuantitativas en 188 ecotipos de pasto Banderita

Table 2. Characteristic values and variance proportion described through six quantitative variables in 188 ecotypes of sideoats grama

Principal component	Characteristic value	Difference	Proportion of described global variance(%)	Accumulated variance proportion (%)
1	2.16	0.39	0.36	36
2	1.76	0.74	0.29	65
3	1.02	0.45	0.17	82
4	0.57	0.17	0.09	92
5	0.39	0.33	0.06	98
6	0.06	-	0.01	100

Cuadro 3. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo y coeficientes de determinación (R²) para cada variable original, en la diversidad genética de pasto banderita

Table 3. Characteristic vectors of the more significant variables and determination coefficients (R²) for each original variable, within sideoats grama's genetic diversity

Variable	Characteristic vectors			Determination coefficient (R ²)		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
Altitude, m	0.21	-0.61	-0.01	0.31*	-0.81**	-0.01ns
Temperature, °C	-0.27	0.55	0.16	-.41*	0.73**	0.17*
Rainfall, mm	0.44	-0.27	0.23	0.65*	-0.36*	0.24**
DNA content	0.57	0.34	-0.16	0.84**	0.45*	-0.16*
No. Chromosomes	0.57	0.34	-0.14	0.84**	0.45*	-0.14*
Forage yield ¹	0.12	0.07	0.93	0.18ns	0.09ns	0.94**

** y * = Significant at 1 and 5%, respectively; 1. Dry matter yield in 210 days (g/plant); ns = non significant.

repetitivo, modifican al nucleotipo y son referidos como el efecto de la cantidad de ADN nuclear (funcional o no), sobre el fenotipo como tamaño de cromosomas, ciclo mitótico, duración de la meiosis, duración del ciclo de vida, entre otros⁽¹⁸⁾. Además, se considera que las pérdidas o incrementos en ADN repetitivo, se asocian con procesos de adaptación a condiciones ambientales cambiantes. La mayor variación en el contenido de ADN entre ecotipos diploides y poliploides de *B. curtipendula*, puede relacionarse con las características ambientales diversas en las que se reproducen. El empleo del citómetro de flujo,

chromosome numbers; for the PCII, altitude and temperature; and for PC III, forage yield and rainfall. The six variables contributed significantly to explain total variation ($P < 0.01$). Once the phenotype variation among *P. virgatum* (switchgrass) ecotypes was characterized, similar results were obtained, and the first three PC explained 81 % of total variation, and three important variables were obtained for PC I, two for PC II and two for PC III, which contributed 37, 26 and 18 % to total variability, respectively⁽³²⁾.

Cuadro 4. Estadísticos de seis características utilizadas para describir 188 ecotipos de pasto banderita

Table 4. Statistics of six characteristics used to describe 188 ecotypes of sideoats grama

Variable	Average	Intervals min-max	Standard Deviation
Altitude, masl	1,805	800 – 2,680	371.4
Temperature, °C	17.7	13.5 – 21.0	1.52
Rainfall, mm	413.2	146 – 1,030	110.9
DNA content, PS	3.08	2.04 – 4.31	0.348
Chromosome numbers	79.2	19 – 107	18.7
Forage yield ¹	44.6	8.1 – 162	25.3

1. Dry matter yield in 210 days (g/plant).

Ecotype distribution based on PC I and PC II (Figure 1), shows those coming from Zacatecas and San Luis Potosí placed themselves in group I, which included quadrants 1 and 2. These ecotypes were characterized by a great variation in altitude (1,300 to 2,540 m), rainfall (335 to 729 mm), DNA content (2.69 to 4.31 pg), chromosome numbers (61 to 107) and forage yield (12 to 107 g). These ecotypes showed the greater rainfall and DNA content span.

The averages, spans (maximum and minimum) and standard deviation of each of the studied variables evaluated in the 188 collected ecotypes are shown in Table 4.

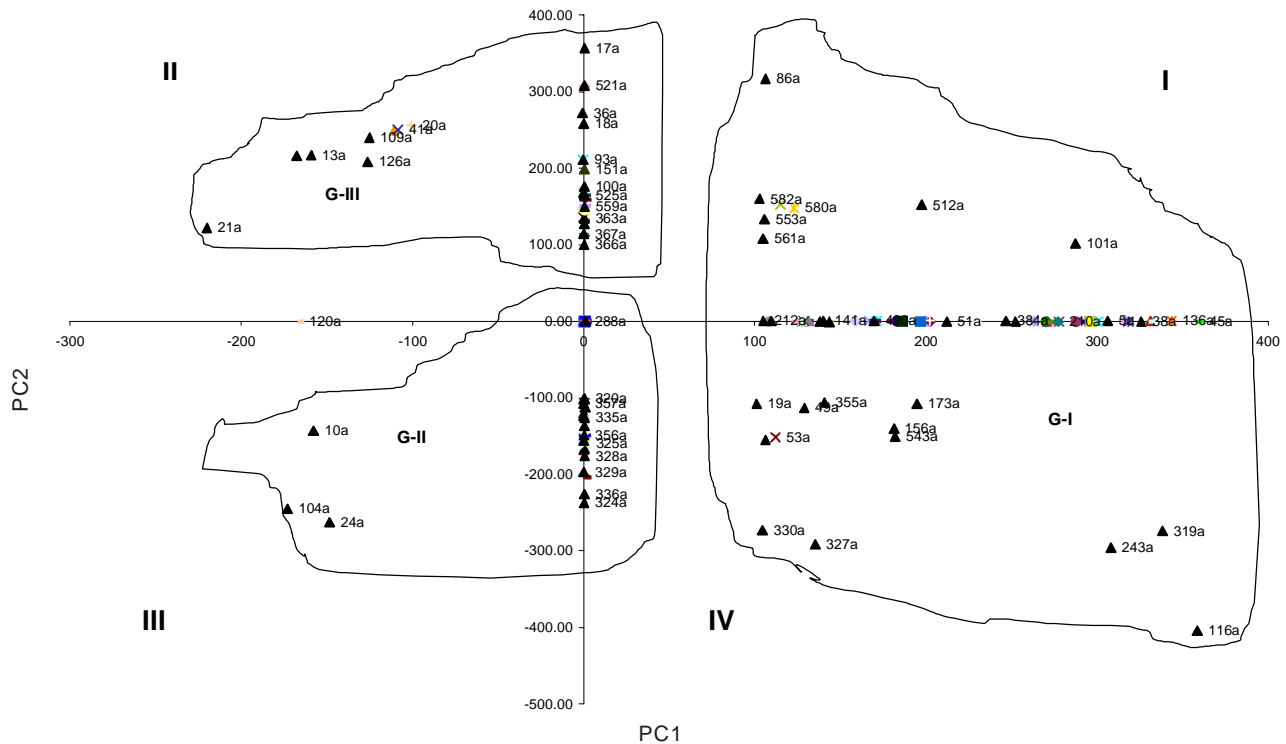
Hierarchical clusters analysis

When a hierarchical clusters analysis was

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD NATIVA DE BANDERITA

Figura 1. Distribución de la diversidad de 188 ecotipos de pasto bandera en función de los dos primeros componentes principales y obtenidos con la matriz de correlación de seis variables

Figure 1. Diversity distribution of sideoats grama's 188 ecotypes, collected in Mexico, according to the two first principal components obtained from a six variables correlation matrix



facilita el análisis del nivel de ploidía, en estudios citológicos, de gran valía para programas de hibridación.

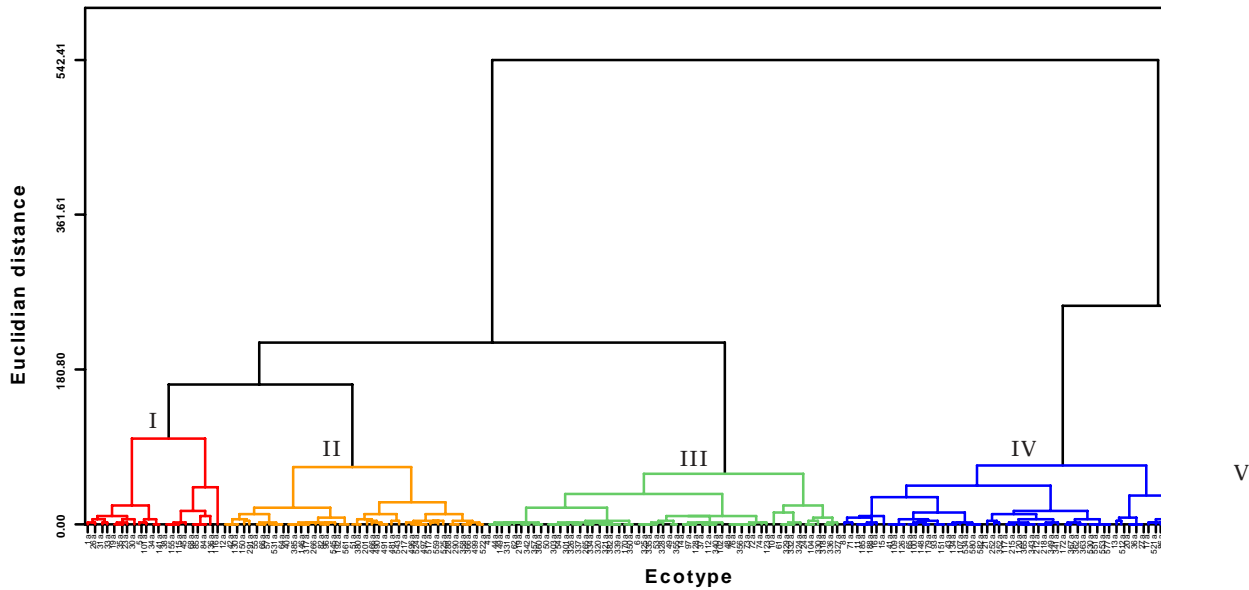
Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) se realizó con base en la matriz de correlación de las seis variables siguientes: altitud (m), temperatura media anual (°C), precipitación media anual (mm), contenido de ADN (pg), número de cromosomas y rendimiento de forraje (g/planta/210 d). Con los tres primeros componentes, se explicó el 82.7 % de la variación total observada. El primer componente contribuyó con 36.1 %, el segundo con 29.4 % y el tercero con 17.1 % de la varianza total (Cuadro 2). De los tres componentes, el primero contribuyó para explicar 2.17 variables individuales, el segundo 1.76 y el tercero 1.02.

performed, five groups were established based on the correlation coefficient (Figure 2), this group includes 21 ecotypes, from the States of San Luis Potosí (6), Aguascalientes (3), Durango (3), Guanajuato (3), Jalisco (3), Chihuahua (2), and Mexico (1) found at higher altitudes (2,034 m above sea level), with a 568 mm average rainfall, 3.42 pg DNA content, 95.3 chromosomes and 70.2 g average forage yield. Group II includes 41 ecotypes from the States of Chihuahua (13), Durango (8), Zacatecas (6), San Luis Potosí (5), Aguascalientes (4), Coahuila (3) and Sonora (2). This group showed intermediate values for the variables. Group III includes 55 ecotypes, being the more numerous, from the States of Zacatecas (40), San Luis Potosí (9), Coahuila (4), Durango (1) and Guanajuato (1), showing the lower temperature values (16.5 °C) and forage yield (39.4 g). Group

Figura 2. Dendrograma del análisis de seis variables cuantitativas para 188 ecotipos de pasto banderita con base en el método de ligamiento promedio (UPGMA)

Figure 2. Dendrogram of a six quantitative variables analysis for each of sideoats grama's 188 ecotypes based on the average linkage method (UPGMA)



Para conocer la importancia relativa de cada variable en la explicación de la variación total, se analizaron los vectores propios y las correlaciones entre las variables en cada componente principal (CP), así como el coeficiente de determinación de cada variable, respecto a cada CP (Cuadro 3). Las variables de mayor importancia en el CP1 fueron contenido de ADN y número de cromosomas; en el CP2 altitud y temperatura y en el CP3 rendimiento de forraje y precipitación. Las seis variables contribuyeron

IV includes 52 ecotypes from the States of Durango (19), Coahuila (17), Chihuahua (8), San Luis Potosí (6) and Sonora (2), showing the lower altitude values (1,447 asl), and the higher temperatures (19.4 °C). Finally, group V, the smaller, includes only 19 ecotypes from the States of Coahuila (10), San Luis Potosí (6), Zacatecas (2) and Durango (1), found at the lower rainfall (331 mm), with lower DNA content (2.5 pg) and chromosome numbers (40.5) (Table 5).

Cuadro 5. Promedio y error estándar de características de grupo y número de ecotipos de pasto banderita

Table 5. Average and standard error for grouped characteristics and its number of *ecotypes of sideoats grama*

Variable	I (21)	II (41)	III (51)	IV (52)	V (19)
Altitude, m	2,034.7±212.6	1,754.6±208.4	2,120.4±242.2	1,447.7±319.1	1,725.0±216.6
Temperature, °C	17.1±0.8	17.1±1.1	16.5±0.4	19.4±1.1	18.4±1.2
Rainfall, mm	568.0±155.2	442.5±95.9	428.9±30.9	339.5±55.1	331.5±101.9
DNA content, PS	3.4±0.3	3.3±0.2	2.9±0.1	3.1±0.02	2.5±0.1
Chromosome numbers	95.2±10.4	92.3±7.2	74.5±13.6	82.2±10.9	40.5±11.1
Forage yield, DM	70.2±25.1	40.2±32.0	39.4±18.7	46.2±25.2	41.5±25.4

significativamente ($P < 0.01$) para explicar la variación total observada. Al caracterizar la variabilidad fenotípica entre ecotipos de *P. virgatum* se obtuvieron resultados similares, donde los primeros tres componentes principales, explicaron el 81 % de la varianza total y obtuvieron tres variables de importancia en el CP1, dos en el CP2 y dos en el CP3, que contribuyeron con 37, 26 y 18 % de la variabilidad total, respectivamente⁽³²⁾.

La distribución de los ecotipos con base en el CP1 y CP2 (Figura 1), muestra que los provenientes de Zacatecas y San Luis Potosí, se integraron en el grupo I, el cual abarcó los cuadrantes I y II. Estos ecotipos se caracterizan por una amplia variación en altitud (1300 a 2540 m), precipitación (335 a 729 mm), contenido de ADN (2.69 a 4.31 pg), número de cromosomas (61 a 107) y rendimiento de forraje (12 a 107 g). Estos ecotipos presentaron el mayor rango de precipitación y contenido de ADN.

El grupo II mostró un tamaño intermedio e integró ecotipos provenientes, principalmente, de San Luis Potosí, Coahuila y Zacatecas. Para este caso, las variables estudiadas mantuvieron rangos intermedios. Sin embargo, a pesar de que el rango en el número de cromosomas fue de 19 a 87, agrupó a la mayoría de los ecotipos con 40 a 41 cromosomas. La mayor cantidad de ecotipos del grupo II, se observó en el cuadrante II. El grupo III fue el más pequeño y ubicó ecotipos procedentes de Durango, Coahuila y Chihuahua en el cuadrante II, este grupo se caracterizó por presentar los rangos más amplios en altitud (800-2400 m) y rendimiento de forraje (16 a 118 g). Además, presentó rangos similares (61 a 107) al grupo I, con relación al número de cromosomas.

Los promedios, rangos (máximos y mínimos) y desviación estándar de cada una de las variables evaluadas en los 188 ecotipos recolectados, se presentan en el Cuadro 4.

Análisis de conglomerados jerárquicos

Al efectuar el análisis de conglomerados jerárquicos se determinaron cinco grupos basados en el coeficiente de correlación (Figura 2). El grupo I integró a 21 ecotipos, procedentes de San Luis Potosí (6), Aguascalientes (3), Durango (3), Guanajuato (3),

In Table 6 the results for significance obtained through the clusters analysis in sideoats grama ecotypes' groups can be seen. Significant differences ($P < 0.05$) were found for all variables.

When characterizing sideoats grama ecotypes, several aspects become apparent: first, the number of assessed ecotypes was adequate, because ecotypes which survived under adverse conditions in arid and semiarid areas in Mexico were included. When ecotypes characteristics were analyzed, a great variation among them was seen, not only in phenotypes, but also in their altitude distribution (800 to 2,680 m asl), temperature span (13.5 to 21.0 °C), rainfall span (146 to 1,030 mm), DNA content (2.04 to 4.31 pg), chromosome numbers (19 to 107) and forage yield (8.1 to 162 g).

The variation found between collected ecotypes is wide, because phenotypical variations found are of great usefulness, which represent an important base to start genetic improvement programs using native populations. Lastly, this variation potential shown by ecotypes which allows establishing themselves in diverse environments with different production potential, represents a big advantage to select ecotypes for different purposes (rehabilitation, erosion control, intensive forage production, seed production, etc.).

Cuadro 6. Significancia entre los grupos formados en el análisis de conglomerados de poblaciones nativas de pasto banderita

Table 6. Significance between groups in the native populations of sideoats grama

Variable	Mean squares between groups	Variation coefficient (%)
Altitude	3360636.54 **	14.09
Temperature	65.54 **	5.44
Rainfall	240428.55 **	19.96
DNA content	3.17 **	7.50
Chromosome numbers	10629.99 **	13.99
Forage yield	3990.65 *	76.22

** y * = Significant differences at 1 and 5%, respectively.

Jalisco (3), Chihuahua (2) y México (1), y se localizaron a mayor altitud (2034 m), precipitación de 568 mm, contenido de ADN de 3.42 pg, número de cromosomas de 95.3 y rendimiento de forraje de 70.2 g. En el grupo II se agruparon 41 ecotipos originarios de Chihuahua (13), Durango (8), Zacatecas (6), San Luis Potosí (5), Aguascalientes (4), Coahuila (3) y Sonora (2), con valores intermedios de las variables. El grupo III fue el que agrupó al mayor número de ecotipos (55), con procedencias de Zacatecas (40), San Luis Potosí (9), Coahuila (4), Durango (1) y Guanajuato (1), caracterizándose por presentar los menores rangos de temperatura (16.5 °C) y rendimiento de forraje (39.4 g). El grupo IV integró 52 ecotipos procedentes de Durango (19), Coahuila (17), Chihuahua (8), San Luis Potosí (6) y Sonora (2), con los valores más bajos de altitud (1447 m), pero con el mayor promedio de temperatura (19.4 °C). Finalmente, el grupo V fue el más pequeño, ya que solo reunió a 19 ecotipos procedentes de Coahuila (10), San Luis Potosí (6) Zacatecas (2) y Durango (1), con los valores más bajos de precipitación (331 mm), contenido de ADN (2.5 pg) y número de cromosomas (40.5) (Cuadro 5).

En el Cuadro 6 se presentan las significancias obtenidas en los grupos de ecotipos al utilizar el análisis de conglomerados, el cual detectó diferencias significativas ($P < 0.05$) en todas las variables.

En la caracterización de los ecotipos, resaltan varios aspectos: primero el número de ecotipos evaluados fue suficiente, ya que se incluyeron los ecotipos que lograron sobrevivir y establecerse a las condiciones adversas de las zonas áridas y semiáridas de México. Al analizar las características de los ecotipos, se observó una amplia variación, no sólo fenotípica, sino también su distribución altitudinal (800 a 2680 m), rango de temperatura (13.5 a 21.0 °C), rango de precipitación (146 a 1030 mm), contenido de ADN (2.04 a 4.31 pg), número de cromosomas (19 a 107) y rendimiento de forraje por ecotipo (8.1 a 162 g).

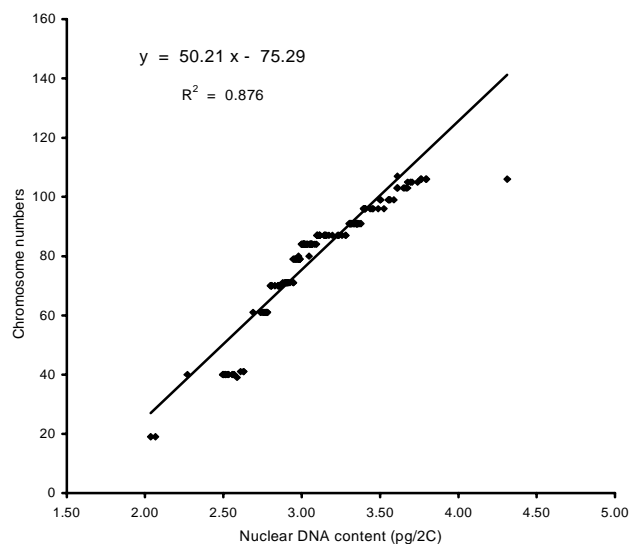
La variación observada entre los ecotipos recolectados es amplia, ya que existen variantes fenotípicas con características de gran utilidad, las cuales representan una base importante para iniciar programas de mejoramiento, utilizando estas

Correlation between DNA content and chromosome numbers

A significant association ($P = 87$, < 0.001) was found in all ecotypes between these two subjects, at the diploid and polyploid levels. The prediction equation was obtained through simple linear regression (y (chromosome numbers) = $50.21 x$ (nuclear DNA content pg/2C) - 75.29), for the DNA content values (2.04 - 4.31 pg) and different ploidy levels (Figure 3). This equation allows the analyzing of a big number of ecotypes, and also to reduce costs and time for each sample. Similarly, correlating DNA content in *P. pratensis* genotypes a high linear correlation between DNA content and chromosome numbers has been reported⁽²⁸⁾. The correlation obtained in *B. curtipendula* ecotypes for the same issues is validated by studies carried out in other polyploid grass complex, including *Andropogon gerardii* Vitman⁽³³⁾ and *P. virgatum*⁽³⁴⁾. The high variation in DNA content and chromosome numbers is a favorable

Figura 3. Análisis de regresión del contenido de ADN nuclear, con el citómetro de flujo y número de cromosomas de cada ecotipo de pasto banderita

Figure 3. Regression analysis for nuclear DNA content, performed with a flow cytometer and chromosome numbers for each of 188 sideoats grama ecotypes



poblaciones nativas. Por último, este potencial de variación que presentan los ecotipos para establecerse en las diferentes condiciones ambientales y con distinto potencial productivo, representa una gran ventaja para seleccionar ecotipos que puedan utilizarse con diferentes propósitos (rehabilitación, control de erosión, producción intensiva de forraje, producción de semilla, etc.).

Correlación entre contenido de ADN y número de cromosomas

Se encontró una asociación significativa ($P= 0.87$, < 0.001) entre contenido de ADN y número de cromosomas, con los niveles diploide y poliploide, para todos los ecotipos. Mediante regresión lineal simple, se obtuvo la ecuación de predicción ($Y = 50.21 X - 75.29$) con los valores del contenido de ADN /2C (2.04 a 4.31 pg), para los diferentes niveles de ploidía (Figura 3). La ecuación de regresión lineal para hacer las estimaciones es: Y (número de cromosomas) = $50.21 X$ (contenido de ADN nuclear, pg/2C) - 75.29. Esto permite analizar una gran cantidad de ecotipos y reducir el tiempo y costo de análisis por muestra. Sin embargo, al correlacionar contenidos de ADN de genotipos de *P. pratensis*, obtuvieron una alta correlación lineal entre el contenido de ADN y el número de cromosomas⁽²⁸⁾. La correlación obtenida en ecotipos de *B. curtipendula*, para contenido de ADN y número de cromosomas, es validada, y coincide con otros estudios realizados en otros complejos de pastos poliploides, incluyendo *Andropogon gerardii* Vitman⁽³³⁾ y *P. virgatum*⁽³⁴⁾. La amplia variación en el contenido de ADN y número de cromosomas, es característica favorable durante etapas evolutivas para que ecotipos poliploides se establezcan en ecosistemas climax⁽³⁵⁾.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

El grado de variación observada en los ecotipos evaluados fue amplio, con poblaciones de utilidad para usarse en programas de mejoramiento de pastos. La recolecta presentó una amplia variabilidad citológica, cuyo número cromosómico varió de 20 a 107, por lo que se identificaron taxas diploides y poliploides en poblaciones nativas. Se encontró una amplia variación en el contenido de ADN, lo

characteristic in the evolutive stages for establishment of polyploid ecotypes in climax ecosystems⁽³⁵⁾.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

A wide variation was detected within the assessed ecotypes, including populations useful for genetic improvement programs. The collected material presented an wide cytological variability, with chromosome numbers between 20 and 107, identifying diploid and polyploid taxa in sideoats grama populations. A wide variation was found also for DNA content in these populations which allows identifying ecotypes with high forage potential. Ploidy level, geographical location of ecotypes, altitude, and temperature range were identified as the most important variables.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Consejo Nacional de Ciencia y Técnica (CONACYT) for its funding during the graduate studies of the lead author. To CIMMYT, to Dr. Tarsicio Corona Torres and to the Cytogenetics Laboratory of the Colegio de Postgraduados staff. And, most especially to the technical staff of INIFAP's La Campana Experiment Station.

End of english version

cual permite identificar ecotipos con alto potencial forrajero. Al relacionar el nivel de ploidía con el origen geográfico de cada ecotipo, la distribución altitudinal y el rango de temperatura fueron las variables de mayor importancia.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero otorgado

durante los estudios de postgrado del primer autor. Al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Al Dr. Tarsicio Corona Torres. Al equipo del laboratorio de Citogenética del Colegio de Postgraduados. A Rocío Lara y Oscar Lázaro por su apoyo en campo y laboratorio. Al personal técnico del Campo Experimental La Campana del INIFAP.

LITERATURA CITADA

- Gould FW. The genus *Bouteloua* (Poaceae). *Ann Missouri Bot Gard* 1980;66:343-428.
- Columbus JT, Kinney MS, Pant R, Siqueiros DME. Cladistic parsimony analysis of internal transcribed spacer region (nrDNA) sequences of *Bouteloua* and relatives (Gramineae:Chloridoideae). *Aliso* 1998;17(2):99-130.
- Hitchcock, AS. Manual of the grasses of the United States (revised by A. Chase). U.S. Government Printing Office, Washington, D.C 1950:1051.
- Hernández XE, Ramos SA. Mejoramiento de las plantas forrajeras en México. Memoria del Tercer Congreso Nacional de Citogenética. I Simposio. Chapingo, México. CENEINEA 1968:224-254.
- Siqueiros ME. *Bouteloua curtispindula* Michx. Torr. Systematics [Ph. D. Dissertation]. Claremont, California: Claremont Graduate University; 2001.
- Gould GW, Kapadia ZJ. Biosystematic studies in the *Bouteloua curtispindula* complex. II. Taxonomy. *Brittonia* 1964;16:182-207.
- Gould GW. Notes on apomixis in sideoats grama. *J Range Manage* 1959;12:25-28.
- Berthaud J. Apomixis and the management of genetic diversity. In: Savidan Y, Carman J, Dresselhaus T editors. The flowering of apomixis from mechanisms to genetic engineering. CIMMYT-IRD 2001:8-23.
- Fultz JL Somatic chromosome complements in *Bouteloua*. *Amer J Botany* 1942;29:45-53.
- Quero CAR, Miranda JL, Talavera MD. Diversidad genética y estudios básicos en recursos forrajeros del complejo agámico de *Bouteloua curtispindula* (Michx.) Torr. [resumen]. Memorias de la 5a Reunión Científica y Tecnológica. San Luis Potosí. Produce 2001:4.
- Arumuganathan K, Earle ED. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 1991;9(3):208-218.
- Nielsen EL, Humphrey LM. Grass studies. I. Chromosome numbers in certain members of the tribes Festuceae, Hordeae, Aveneae, Agrostideae, Chlorideae, Phalarideae and Tripsaceae. *Am J Botany* 1937;24:276-279.
- Harlan JR. Apomixis in sideoats grama. *Amer J Bot* 1949;36:495-499.
- Freter LE, Brown WV. A cytotaxonomic study of *Bouteloua curtispindula* and *B. uniflora*. *Bull Torrey Bot. Club* 1955;82:176-181.
- Berthaud J. Apomixis and management of diversity. In: Savidan Y, Carman J editors. *Apomixis Handbook*. CIMMYT-IRD. México 2000:243.
- Bashaw EC, Hanna WW. Apomictic reproduction. In: Chapman GP editor. *Reproductive versatility in the grasses*. Cambridge, UK: Cambridge Univ Press; 1990:100-130.
- Do Valle C, Savidan YH. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*. CIAT-EMBRAPA 1996:147-163.
- Bennett MD. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytol* 1987;106:177-200.
- Ollitrault-Sammarcelli E, Legave JM, Michaux-Ferriere N, Hirsch AM. Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actmidu*. *Sci Hort* 1994;57:303-313.
- Galbraith DW, Harkis KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DR, Firoozabady E. Rapid flow cytometry analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 1983;220:1049-1051.
- De Laat AMA, Göhde W, Vogelzang MD. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breed* 1987;99:303-307.
- Leblanc O, Dueñas M, Hernández M, Bello S, García V, Berthaud J, Savidan Y. Chromosome doubling in *Tripsacum*. The production of artificial sexual tetraploid plants. *Plant Breed* 1995;114:224-230.
- García VA. Técnicas y procedimientos de citogenética vegetal. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 1990:144.
- Statistical Analysis System (SAS). SAS/STAT Users Guide. Ver. 6. 4th ed. SAS Institute Inc. NC, USA 1993:1686.
- Quero CAR, Savidan YH, Berthaud J, Pérez PJ, Espinoza VJ. Estudio citogenético en el género *Tripsacum*. *Agrociencia* 1997;31(3):331-334.
- Espinoza F, Urbani MH, Martínez EJ, Quarin CL. The breeding system of three *Paspalum* species with forage potential. *Trop Grassl* 2001;35:211-217.
- Hopkins AA, Taliaferro CM, Christian CD. Chromosome number and nuclear DNA content of several switchgrass populations. *Crop Sci* 1996;36:1192-1195.
- Eaton TD, Curley RJ, Williamson C, Jung G. Determination of the level of variation in polyploidy among Kentucky bluegrass cultivars by means of flow cytometry. *Crop Sci* 2004;44:2168-2174.
- Löve A, Löve D. Cytotaxonomical atlas of the arctic flora. Vol. 2 Strauss and Cramer, Leutershausen, Germany 1975.
- Johnson PG, Riordan TP, Arumuganathan K. Ploidy level determinations in buffalograss clones and populations. *Crop Sci* 1998;38:478-482.
- Arumuganathan K, Tallury SP, Fraser ML, Bruneau AH, Qu R. Nuclear DNA content of thirteen turfgrass species by flow cytometry. *Crop Sci* 1999;39:1518-1521.
- Casler MD. Ecotypic variation among switchgrass populations from the northern USA. *Crop Sci* 2005;45:388-398.
- Keeler KH, Kwankin B, Galbraith PW. Polyploid polymorphism in *Andropogon gerardii*. *Genome* 1987;29:374-379.
- Hultquist S, Vogel KP, Lee DE, Arumuganathan K, Kaeppler S. DNA content and chloroplast DNA polymorphisms among accessions of switchgrass from remnant Midwestern prairies. *Crop Sci* 1997;37:595-598.
- Stebbins GL. Polyploidy in plants: unsolved problems and prospects. In: Lewis WH editor. *Polyploidy*. New York and London: Plenum Press; 1979:495-520.