



Universidad Autónoma de Aguascalientes

Departamento de Posgrado

Centro de Ciencias Básicas

Maestría en Ciencias

Área de Biotecnología Vegetal

“Variación genética de *Bouteloua trifida* en base a datos moleculares”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
AREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

PRESENTA

GUILLERMO ALEJANDRO CABRAL GARCÍA

TUTORA

MARÍA ELENA SIQUEIROS DELGADO

ASESORAS

ALEJANDRA PALOMEQUE CARLÍN

MARCELA AVENDAÑO GONZÁLEZ

AGUASCALIENTES, AGS.

Noviembre, 2018



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO
Centro de ciencias Básicas
Departamento de Biología

JOSE DE JESUS RUIZ GALLEGOS
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS

PRESENTE

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **GUILLERMO ALEJANDRO CABRAL GARCÍA** con ID 64215 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **VARIACIÓN GENÉTICA DE BOUTELOUA TRIFIDA EN BASE A DATOS MOLECULARES**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 22 de Noviembre de 2018.

María Elena Siqueiros Delgado
Tutor de tesis

Marcela Avendaño González
Asesora

Alejandra Palomeque Carlin
Asesora

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de _____
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

GUILLERMO ALEJANDRO CABRAL GARCIA
MAESTRIA EN CIENCIAS, AREA BIOTECNOLOGIA VEGETAL
P R E S E N T E.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"VARIACION GENETICA DE BOUTELOUA TRIFIDA EN BASE A DATOS MOLECULARES"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 23 de noviembre de 2018

"Se lumen proferre"

EL DECANO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'José de Jesús Ruíz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo.

Agradecimiento

A mi familia: mis padres, la palabra gracias no expresa ni remotamente lo que han hecho, ustedes son para mí la máxima muestra de afecto. Por ustedes he logrado avanzar en otra etapa más de mi vida. Espero poder seguir aprendiendo con ustedes sobre la vida. Gaby, Luis y Lía: Verlos y escuchar sus palabras de aliento me ayudaron durante todo el proyecto de mi tesis, gracias por compartir sus experiencias y sus mejores deseos.

A María Elena Siqueiros Delgado: por tener fe en mí y aceptarme en un proyecto sobre el cual no tenía suficiente formación académica, por tener la paciencia para enseñarme por primera vez a identificar plantas y por su apoyo brindado.

A Marcela Avendaño González: Al inicio del proyecto tuve la oportunidad de elegir a mi comité, ahora al terminar sé que mejor elección no pude haber hecho, fuiste durante todo el proyecto la persona que me escuchó, apoyó e incluso regañó cuando fue necesario. Siempre te agradeceré por todo lo que hiciste por mí, he aprendido mucho gracias a ti, no solo académicamente, sino también como persona, gracias a personas como tú los demás podemos crecer. Eres la onda.

A Alejandra Palomeque Carlín: gracias a ti, tuve el valor de enfrentarme a un área que se salía de mis conocimientos, todas las cosas buenas que obtuve en esta etapa son por ti. Por escucharme todos esos días en los que me sentía frustrado y compartir esos momentos de alegría y tristeza.

A Mariana Muñoz Carrillo: por acompañarme durante todo el proceso, fuiste una persona que sin tu apoyo no estaría hoy escribiendo esta hoja, las desveladas, las risas, las frustraciones, todo lo compartimos. Esos momentos fueron muy valiosos para mí.

A Higinio Sandoval: porque me enseñaste a ver las cosas de otra forma, el apoyo que me brindaste en muchos momentos fue una motivación para seguir trabajando. Por ser mi primer maestro de Botánica y compartirme un poco de tu pasión por el trabajo, pero sobre todo por todos los momentos divertidos que compartiste conmigo.

A Mónica Miguel Vázquez: me enseñaste que lo importante es no rendirse, y seguir intentando. Todo tu apoyo brindado logró que mi trabajo mejorara. Gracias por los momentos divertidos que pasamos.

A Martha, Adilene y Rocío del laboratorio: por todos sus consejos, experiencias y tiempo que me brindaron.

Vivian y Fernando: les agradezco por escucharme y aconsejarme.

Gracias a todos ustedes por formar parte de mi vida, estas palabras no logran transmitir la gratitud que siento por ustedes, les deseo a todos, que lo que hicieron por mí, les sea devuelto.

“El éxito tiene muchos padres, pero el fracaso es huérfano”. **John F. Kennedy**

Dedicatoria

Le dedico este trabajo a mi familia, quienes me han acompañado durante toda mi vida. Agradezco su paciencia.

A las personas que me ayudaron durante el proyecto compartieron su tiempo conmigo. Muchas gracias.

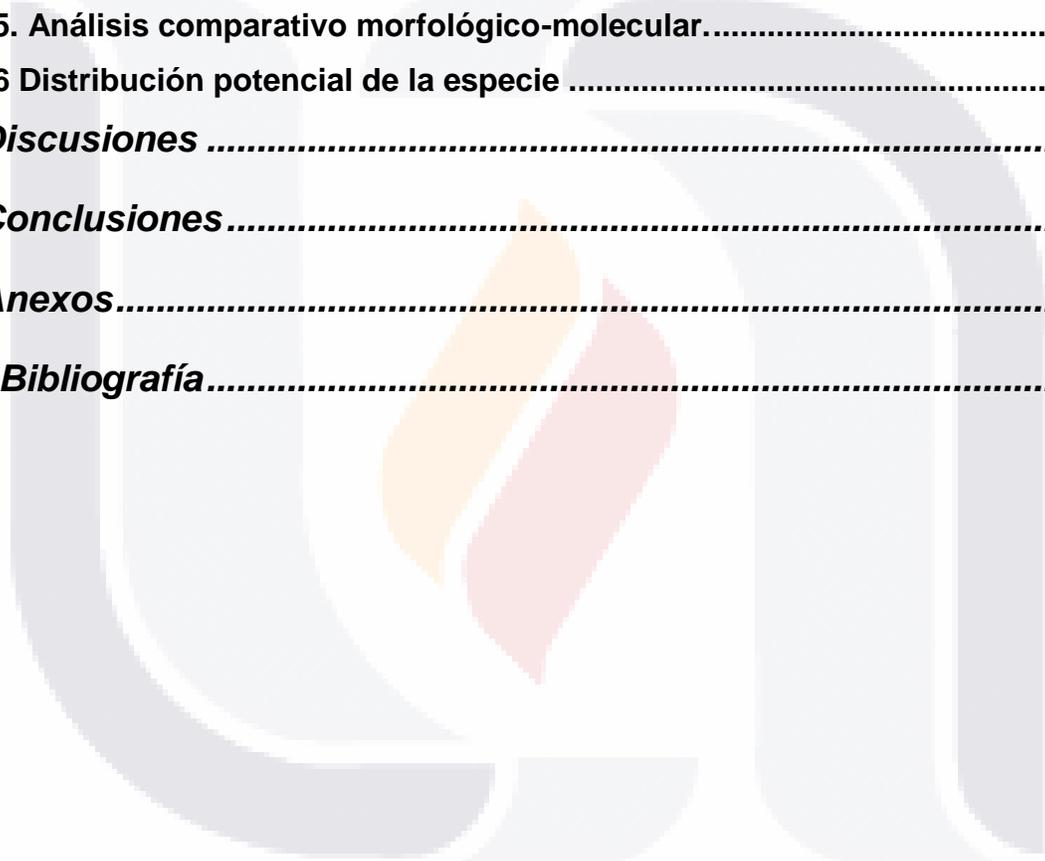


Índice General

Contenido

Índice General	1
Índice de figuras	3
Resumen	6
Abstract	7
1. Introducción	8
1.1 Relevancia e historia del género <i>Bouteloua</i>	8
1.2 Clado <i>Bouteloua trifida</i> - <i>Bouteloua kayi</i>	10
1.2.1 <i>Bouteloua trifida</i> Thurb. ex S. Watson / <i>Bouteloua trifida</i> Thurb. ex S. Watson var. <i>trifida</i>	12
1.2.2 <i>Bouteloua trifida</i> var. <i>burkii</i> (Scribn. ex S. Watson) Vasey ex L.H. Dewey.....	15
1.3 Análisis morfométrico	16
1.4 Marcadores moleculares	17
1.4.1. Marcadores de Cloroplasto	18
1.4.2 Marcador de núcleo.....	19
1.5 Distribución potencial de la especie	19
2. Justificación	21
3. Objetivos	21
4. Hipótesis	22
5. Metodología	23
5.1 Colectas de muestras	23
5.2 Análisis morfométrico	24
5.3 Extracción, Amplificación y Secuenciación.....	27
5.4 Análisis filogenético	31
5.5 Distribución potencial de la especie.	32

6. Resultados	34
6.1 Análisis morfométrico	34
6.1.1 Agrupación con base en la pubescencia de la lema	35
6.2.2 Análisis de componentes principales en base a las inferencias filogenéticas.....	37
6.2.3 Análisis de correlación entre variables ambientales y caracteres morfométricos..	37
6.3 Amplificación y Secuenciación.....	42
6.4. Inferencias basadas en datos moleculares.....	42
6.4.1. Cloroplasto: rpl32-trnL.....	42
6.4.2 ADN nuclear: ITS.	46
6.4.3 Matriz concatenada (<i>rpl32 – trnL – ITS</i>).....	49
6.5. Análisis comparativo morfológico-molecular.....	52
6.6 Distribución potencial de la especie	53
7. Discusiones	55
8. Conclusiones.....	64
9. Anexos.....	65
10. Bibliografía.....	71



Índice de figuras

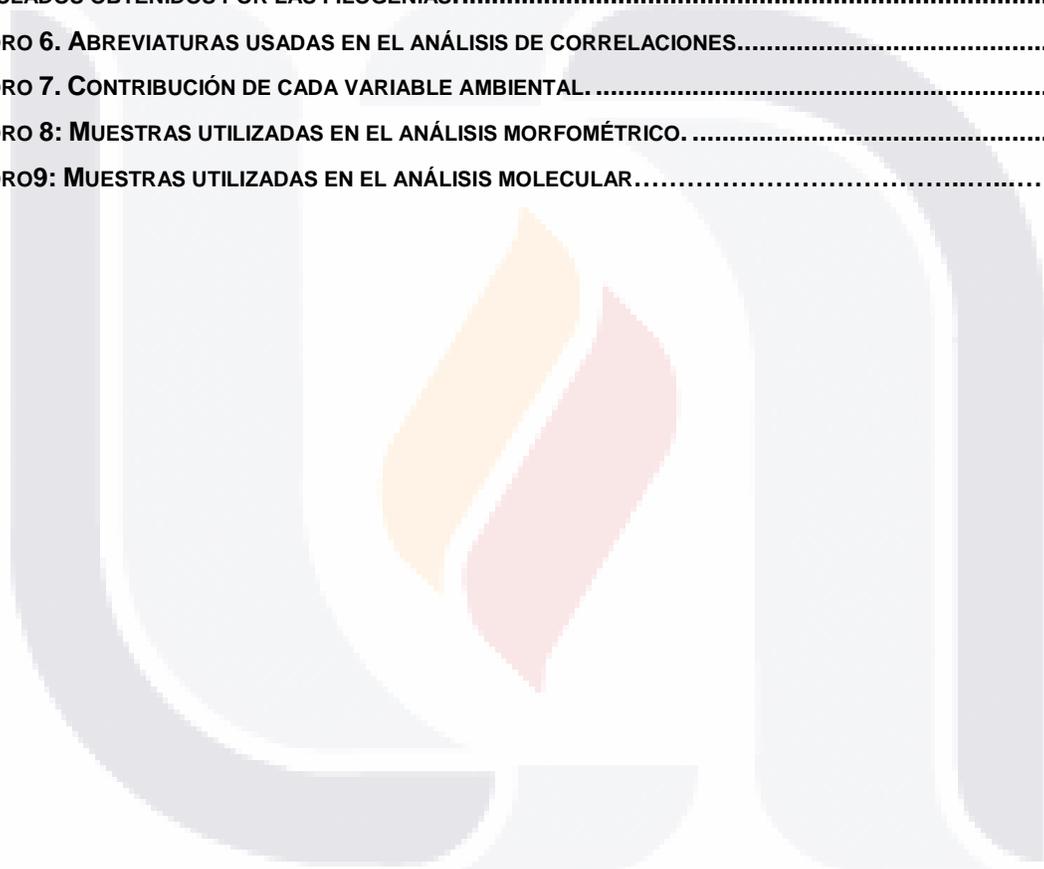
FIGURA 1. FILOGENIA PARCIAL DEL GÉNERO <i>BOUTELOUA</i>).....	11
FIGURA 2. CLADO <i>BOUTELOUA TRIFIDA-BOUTELOUA KAYI</i> ,.....	12
FIGURA 3. FOTOGRAFÍA DE LA INFLORESCENCIA DE <i>BOUTELOUA TRIFIDA</i> THURB. EX S. WATSON.	13
FIGURA 4. DISTRIBUCIÓN CONOCIDA DE <i>BOUTELOUA TRIFIDA</i> / <i>BOUTELOUA TRIFIDA</i> THURB. EX S. WATSON VAR. <i>TRIFIDA</i>	14
FIGURA 5. FOTOGRAFÍA DE <i>BOUTELOUA TRIFIDA</i> VAR. <i>BURKII</i> (SCRIBN. EX S. WATSON) VASEY EX L.H. DEWEY.	15
FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN DE <i>BOUTELOUA TRIFIDA</i> VAR. <i>BURKII</i>	16
FIGURA 7. DISTRIBUCIÓN Y SITIOS DE COLECTA DE <i>B. TRIFIDA</i>	24
FIGURA 8. ELECTROFORESIS DEL FRAGMENTO <i>RPL32-TRNL</i>	30
FIGURA 9. IMÁGENES DE LOS DOS TIPOS DE PUBESCENCIA OBSERVADOS EN LA LEMA DE <i>B. TRIFIDA</i>	34
FIGURA 10. GRÁFICO DE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS CARACTERES DE LA INFLORESCENCIA.	36
FIGURA 11. GRÁFICO DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES CON CARACTERES DE LA INFLORESCENCIA.	39
FIGURA 12. GRÁFICO MOSTRANDO LAS CORRELACIONES ENTRE LOS DATOS MORFOLÓGICOS Y LAS VARIABLES AMBIENTALES.	40
FIGURA 13. INFERENCIA OBTENIDA MEDIANTE PARSIMONIA CON SECUENCIAS DE <i>B. TRIFIDA</i> DEL MARCADO MOLECULAR <i>RPL32-TRNL</i>	43
FIGURA 14. INFERENCIA OBTENIDA MEDIANTE MÁXIMA VEROSIMILITUD CON SECUENCIAS DEL MARCADO MOLECULAR <i>RPL32-TRNL</i>	44
FIGURA 15. INFERENCIA OBTENIDA MEDIANTE EL MÉTODO BAYESIANO CON SECUENCIAS DEL MARCADOR MOLECULAR <i>RPL32-TRNL</i> . DE <i>B. TRIFIDA</i>	45
FIGURA 16. INFERENCIA OBTENIDA MEDIANTE PARSIMONIA CON SECUENCIAS DEL MARCADO MOLECULAR ITS DE <i>B. TRIFIDA</i>	46
FIGURA 17. INFERENCIA OBTENIDA MEDIANTE MÁXIMA VEROSIMILITUD CON SECUENCIAS DE <i>B. TRIFIDA</i> DEL MARCADO MOLECULAR ITS.	47
FIGURA 18. INFERENCIA OBTENIDA MEDIANTE EL MÉTODO BAYESIANO CON SECUENCIAS DE <i>B. TRIFIDA</i> DEL MARCADO MOLECULAR ITS.....	48
FIGURA 19. INFERENCIA OBTENIDA MEDIANTE MÁXIMA PARSIMONIA CON SECUENCIAS DE <i>B. TRIFIDA</i> DEL MARCADO MOLECULAR ITS- <i>RPL32- TRNL</i>	49
FIGURA 20. INFERENCIA OBTENIDA MEDIANTE MÁXIMA VEROSIMILITUD CON SECUENCIAS DE <i>B. TRIFIDA</i> DEL MARCADO MOLECULAR ITS- <i>RPL32- TRNL</i>	50
FIGURA 21. INFERENCIA OBTENIDA MEDIANTE EL MÉTODO BAYESIANO CON SECUENCIAS DE <i>B. TRIFIDA</i> DEL MARCADO MOLECULAR ITS Y <i>RPL32-TRNL</i>	51

FIGURA 22. **PROYECCIÓN DE LA PROBABILIDAD DE ENCONTRAR *BOUTELOUA TRIFIDA***.....54
FIGURA 23. **CURVA ROC DEL MODELADO DE *B. TRIFIDA***.....66
FIGURA 24. **TEMPERATURA MEDIA DEL CUARTO MÁS FRÍO EN LAS COLECTAS DE *B. TRIFIDA***.....67
FIGURA 25. **ESTACIONALIDAD DE LA PRECIPITACIÓN EN LAS COLECTAS DE *B. TRIFIDA***.....67
FIGURA 26. **INDIVIDUOS CON UNA MAYOR PUBESCENCIA Y MENOR PUBESCENCIA EN LA INFERENCIA DE MÁXIMA VEROSIMILITUD DEL MARCADOR *RPL32-TRNL***.....52



Índice de cuadros

CUADRO 1: CARACTERES MEDIDOS EN PLANTAS COLECTADAS DE <i>B. TRIFIDA</i>	25
CUADRO 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DE LA REGIÓN <i>RPL32- TRNL</i>	29
CUADRO 3:CAPA AMBIENTAL USADA.	33
CUADRO 4. VALORES DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES EN LOS GRUPOS FORMADOS EN BASE DE LA PUBESCENCIA DE LA LEMA.	35
CUADRO 5. VALORES DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES EN LOS GRUPOS FORMADOS EN BASE A LOS CLADOS OBTENIDOS POR LAS FILOGENIAS.....	37
CUADRO 6. ABREVIATURAS USADAS EN EL ANÁLISIS DE CORRELACIONES.....	41
CUADRO 7. CONTRIBUCIÓN DE CADA VARIABLE AMBIENTAL.	65
CUADRO 8: MUESTRAS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.	70
CUADRO9: MUESTRAS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS MOLECULAR.....	71



Resumen

El clado *Bouteloua trifida* está formada por dos taxas (*B. trifida* y *B. kayi*). *B. trifida* se distribuye en el centro y norte de México y al sur de Estados Unidos de América habitando planicies secas, laderas con pastizales y bosques de encino-pino. Hasta el momento se han propuesto dos hipótesis filogenéticas de *Bouteloua* que incluyen el clado *B. trifida*, realizadas por Columbus et al., (1998) y Peterson et al., (2015) mostrándolo como el clado más basal del género.

Vasey (1894) reporta que *B. trifida* presenta diferencias en la pubescencia de la lema. Dicha característica fue utilizada para designar dos variedades (*B. trifida* var. *burkii* y *B. trifida* var. *trifida*). Sin embargo, hasta el momento esta variación morfológica no ha sido sometida a análisis moleculares y ninguna de las inferencias realizadas previamente ha distinguido entre ellas.

En este trabajo se realizó un análisis morfológico comparativo entre muestras de diferentes localidades de *B. trifida*, prestando atención a la pubescencia de la lema. Así mismo, se realizaron inferencias moleculares para conocer si dicha diferencia morfológica está relacionada a diferencias genéticas y si es suficiente para validar las variedades. Para los análisis moleculares se emplearon los marcadores ITS de núcleo y *rpl32-trnL* de cloroplasto.

Morfológicamente *B. trifida* mostró diferencias en la pubescencia de la lema agrupando a muestras pubescentes y no pubescentes en el análisis morfométrico, sin embargo, dicha agrupación no coincide con las agrupaciones obtenidas en las inferencias moleculares.

Abstract

The *Bouteloua trifida* clade is formed by two taxa (*B. trifida* and *B. kayi*). *B. trifida* is distributed in central and northern Mexico and the southern United States of America in dry plains, hillsides with grasslands and forests of oak-pine. So far, two phylogenetic inferences include this clade by Columbus et al., (1998) and Peterson et al., (2015) this inference show it as the most basal of the genera.

Vasey (1894) reports that *B. trifida* has differences in the pubescence of the lemma. This characteristic was used to designate two varieties (*B. trifida* var. *burkii* and *B. trifida* var. *trifida*). However, until now this morphological variation has not been subjected to molecular analysis and none of the inferences made previously has distinguished between them.

In this work, a comparative morphological analysis was performed among samples of *B. trifida* from different locations, paying attention to the pubescence of the lemma. Likewise, molecular inferences were made to know if the lemma morphological difference is related to genetic differences and if it is enough to validate the varieties. For the molecular analyzes, we use ITS nuclear and *rpl32-trnL* chloroplast markers.

Morphologically, *B. trifida* showed differences in the pubescence of the lemma grouping pubescent and non-pubescent samples in the morphometric analysis, however, this grouping does not coincide with the groupings obtained in the molecular inferences.

1. Introducción

1.1 Relevancia e historia del género *Bouteloua*

Los pastizales son ecosistemas caracterizados por presentar una vegetación abierta dominada por especies herbáceas y cuya producción primaria es aprovechada directamente por los herbívoros (Márquez et al., 2009). En México las tierras consideradas como pastizal representan el 40.1% de la superficie del país y cumplen un papel fundamental en la conservación de los recursos naturales y del hábitat (Gutiérrez et al., 2009). Un género relevante en los pastizales del norte del México (Gutiérrez et al., 2009; Márquez et al., 2009) es el género *Bouteloua* cuya distribución abarca desde el Norte hasta el Sur de América, considerado principalmente útil por su alto valor forrajero y su abundancia (Gould, 1980; Mejía-Saules, 1992; Peterson, 2015).

El género *Bouteloua* pertenece a la familia *Poaceae* y es un miembro característico de la subfamilia *Chloridoideae*; fue descrito por primera vez por Lagasca en 1805, siendo *B. curtipendula* la especie tipo e incluyendo cinco especies: *B. racemosa*, (= *B. curtipendula*), *B. hirsuta*, *B. barbata*, *B. simplex* y *B. prostrata* (= *B. scorpioides*), posteriormente, en 1816, añadió a *B. ovata*, *B. juncifolia*, y *B. litigiosa* (= *B. americana*). En 1979, Gould describió 39 especies para el género basándose en caracteres morfológicos, citológicos y la ploidia. Herrera et al (2004), en una revisión del género *Bouteloua* escribe: “pertenece a las regiones semiáridas del nuevo mundo, incluye 42 especies y 14 variedades, 37 y 14 se encuentran en México respectivamente”.

Más tarde, Columbus (1999) amplía el número a 57 especies basado en secuencias de núcleo y cloroplasto, al incluir los géneros satélites (*Buchloe*, *Bucholomimus*, *Cathestecum*, *Cyclostachya*, *Griffthsochloa*, *Opizia*, *Pringleochloa*, *Soderstromia*) dentro de *Bouteloua*. Recientemente, Peterson et al., (2015) propone que *Bouteloua* está formado por 60 especies, incluidas en 10 secciones (*Trifida*, *Cyclostachya*, *Chondrosum*, *Barbata*, *Hirsuta*, *Opizia*, *Triplathera*, *Buchloe*, *Trathera* y *Bouteloua*), empleando genes de cloroplasto (*rpl32-trnL* y *rps16-trnk*) y de núcleo

(ITS 1 e ITS 2), y que corresponden a los diferentes clados formados en la filogenia, los cuales han sido llamados complejos, el clado más divergente de todo el género de acuerdo a Peterson et al. (2015), es el clado *B. kayi* Warnock – *B. trifida* Thurb.

A nivel de complejos se han realizado diversos estudios del género *Boueloua* a niveles moleculares y morfométricos entre los que destacan: *B. curtipendula* (Siqueiros, 2001), *B. scorpiodes* – *B. simplex* (Ortiz, 2017), *B. curtiplendula* (Palomeque, 2011), *B. annua* – *B. aristidoides* (Cuellar, 2016), *B. repens* (Murillo, 2017), *B. barbata* (Pacheco, 2018).



1.2 Clado *Bouteloua trifida* - *Bouteloua kayi*

El clado *B. trifida* – *B. kayi* ha sido descrito por Columbus et al. (1998) y Peterson et al. (2015) (Figura 1 y Figura 2). En ambas inferencias, el clado es monofilético y aparece como el más basal del género. El clado se caracteriza porque las especies incluidas presentan una base subrizomatosa, con la lema de la flor perfecta glabra y aristas no mayores a 5 mm. *Bouteloua kayi* es una especie endémica de Texas, poco común, conocida únicamente por el ejemplar tipo y unas cuantas colectas adicionales, en laderas calcáreas en Brewster County, Texas. De acuerdo a Correll & Johnston (1970) *B. kayi* es probablemente solo una forma de *B. trifida*. Coincidentemente, Gould (1975, 1979) menciona que *B. kayi* probablemente esté relacionada con *B. trifida* debido a su gran similitud morfológica, diferenciándose solamente en las lemas acuminadas-lobadas en *B. kayi*. Sin embargo, Columbus (1996) encontró suficiente variación en la epidermis de la lema para considerarlas especies diferentes. Dado que su área de distribución es muy estrecha y a que se ha colectado muy poco, Herrera et al. (2004) la consideran como en peligro de extinción.

Bouteloua trifida muestra variación morfológica, por lo que se describieron dos variedades: *B. trifida*, var. *trifida* y var. *burkii* (Vasey, 1894), ambas están distribuidas en las zonas áridas del sur de Estados Unidos y norte de México, *B. trifida* es basónimo de *Chondrosum trifidum* Clayton (1982): *B. trifida* var. *burkii* (Scribn. ex S. Watson) Vasey ex L.H. Dewey: originalmente fue descrita como *B. burkii* por Frank Lamson Scribner y Watson en 1883, pudiéndola diferenciar por una mayor pubescencia de la lema. En ese mismo año Vasey George Scribner designó a la especie *B. burkii* como variedad de *B. trifida* quedando como *B. trifida* var. *burkii*. *B. trifida* Thurb. ex S. Watson var. *trifida* es el autónimo.

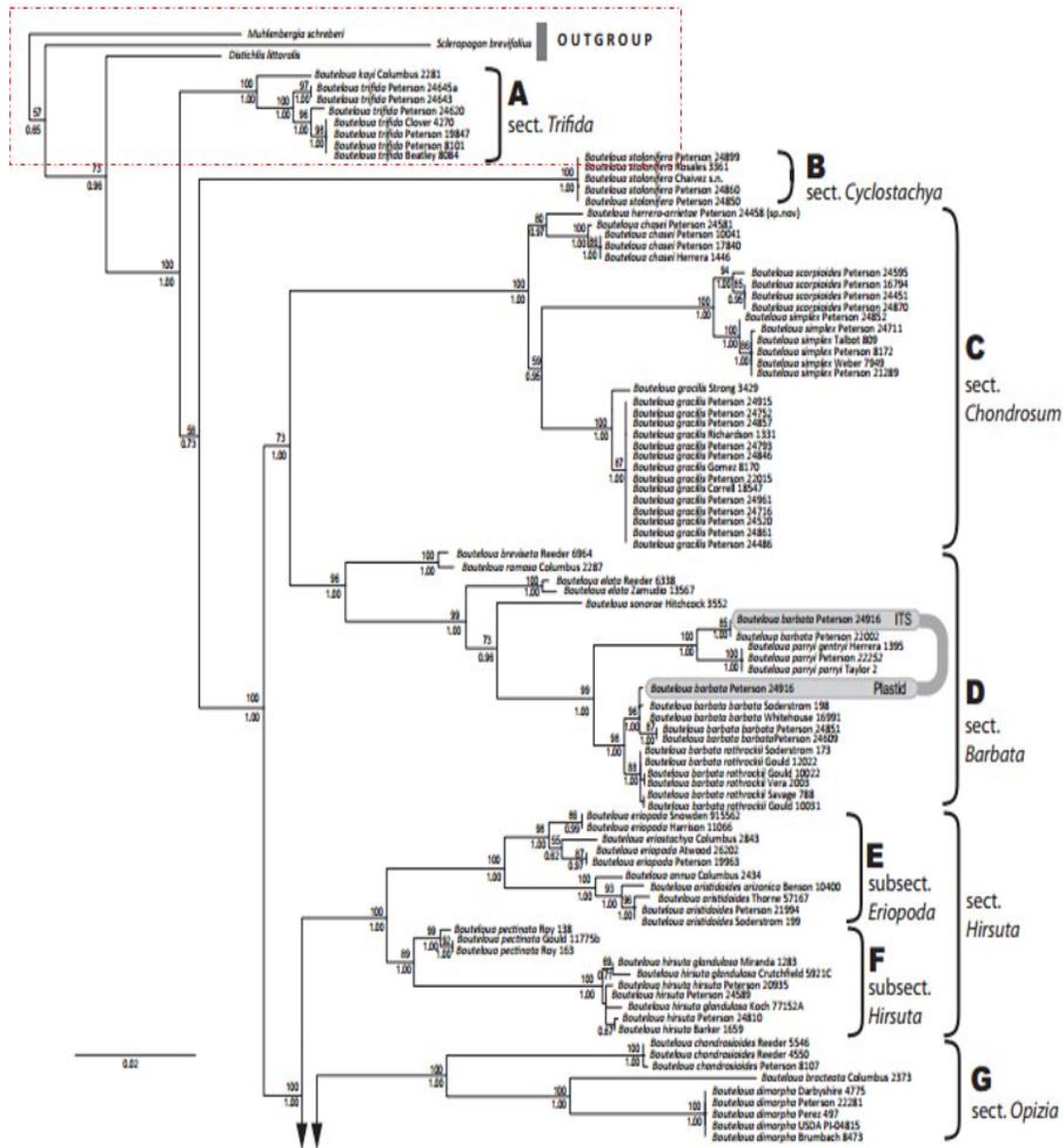


Figura 1. Filogenia parcial del género *Bouteloua* obtenida mediante máxima verosimilitud, basada en los marcadores de cloroplasto (*rpl32-trnL* y *rpl16-trnK*) y de núcleo (ITS), sect. trifida (resaltada con un recuadro punteado en rojo) (Peterson et al., 2015).

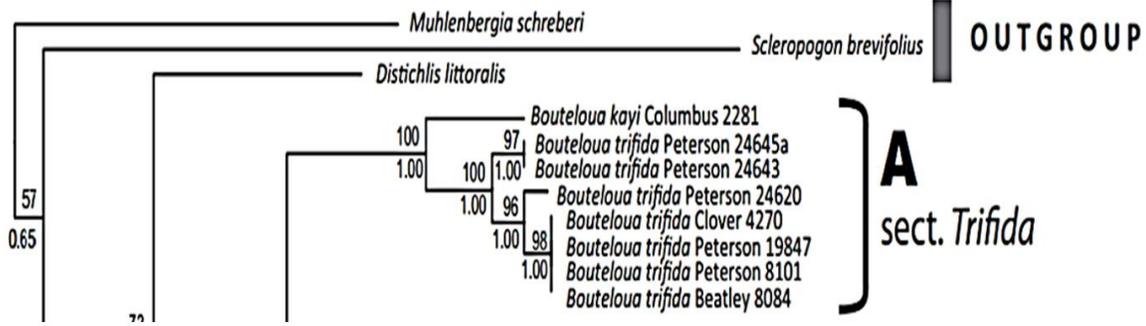


Figura 2. Clado *Bouteloua trifida*-*Bouteloua kayi*, acercamiento de la figura 1 (recuadro rojo) (Peterson et al., 2015).

1.2.1 *Bouteloua trifida* Thurb. ex S. Watson / *Bouteloua trifida* Thurb. ex S. Watson var. *trifida*.

Descripción. Planta perenne delgada, inervada con altura de 10 a 30 cm, a menudo con base subrizomatosa. Los tallos crecen de manera agrupada, pueden ser glabros, escabrosos o pubescentes, lígula pubescente en forma de cilios. Láminas planas o levemente dobladas, de 4 a 8 cm de largo y 1.5 mm de ancho. Inflorescencia de 3 a 9 cm desde la arista central. Con 8 a 24 espiguillas. Flor rudimentaria por debajo de la flor perfecta. Glumas ligeramente diferentes, glabras, acuminadas con ápice bífido, glumas inferiores de 2.2 a 3.4 mm, nervaduras medias excurrentes de 0.1 a 0.6 mm; glumas superiores 2.7 a 4 mm, nervaduras medias excurrentes para 0.2 a 1 mm. Lema de 2 mm de largo, glabra o con vellosidades no mayores a 0.05 mm desde la base, aristas de la flor perfecta dos veces más largas que el cuerpo (4 - 6.6 mm), anteras 0.3 a 0.4 mm, cariopsis de 1.3-1.5 mm de largo, 0.4-0.5 mm de ancho. La flor rudimentaria tiene aristas de 3.5 a 6mm (Figura 3).

Hábitat. planicies secas y rocosas. Crece en altitudes de 300 a 1500 metros.

Se distribuye desde el sur de Utah, Texas, Nuevo México, Arizona, Nevada, Sur de California y México (Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Guanajuato) (Herrera et al., 2004), (SEINet), (CONABIO), (GBIF) (Figura 4Figura 3).



Figura 3. Fotografía de la inflorescencia de *Bouteloua trifida* Thurb. ex S. Watson (Max Lincher, SEINet, 2017).

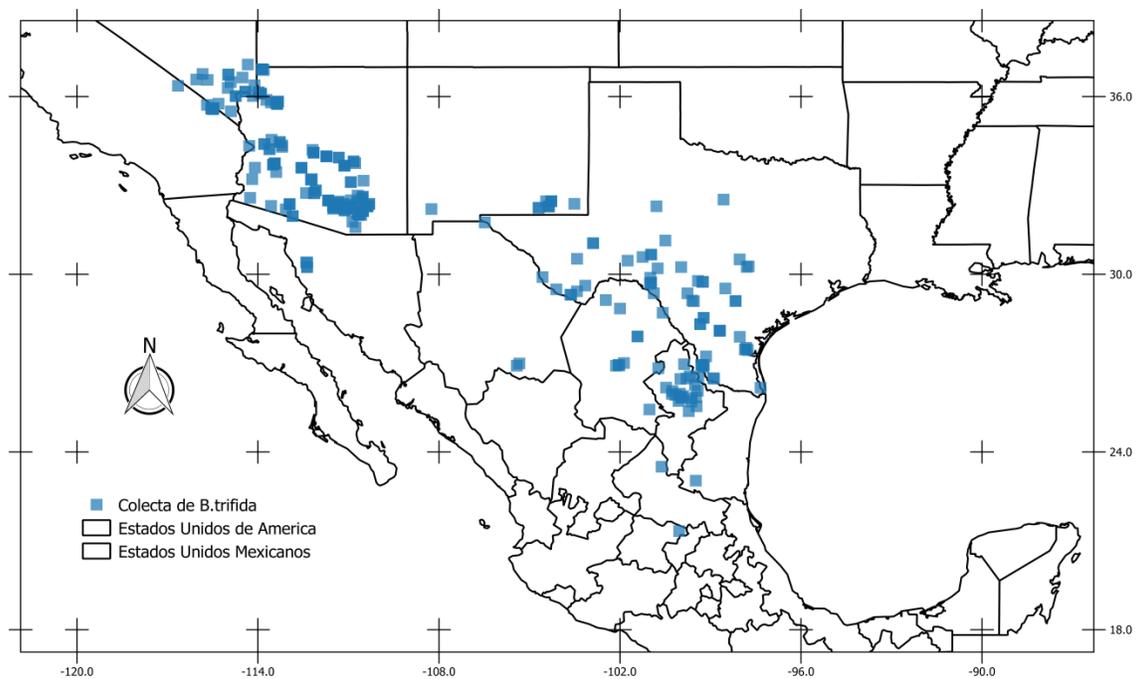


Figura 4. Distribución conocida de *Bouteloua trifida* / *Bouteloua trifida* Thurb. ex S. Watson var. *trifida*. Puntos obtenidos de las bases de datos (CONABIO), (Gbif) y SEINet. Mapa realizado con QGIS 2.18.9

1.2.2 *Bouteloua trifida* var. *burkii* (Scribn. ex S. Watson) Vasey ex L.H. Dewey

Descripción: Ramas con panícula ascendente a divergente, gluma inferior de 1.7 - 3.1 mm, venas excurrentes de 0.05 - 0.2 mm, generalmente no exceden los lóbulos apicales; gluma superior de 1.9 - 3.2 mm, venas excurrentes de 0.05 - 0.2 mm usualmente no superando los dientes apicales, la lema se constriñe a la palea, pubescentes a lo largo de 2/3- 4/5 a lo largo del margen, las aristas de 2.2 – 4.5 mm, anteras de 0.2 – 0.3 mm, cariósipide de 0.8 - 1.2 mm de largo, 0.5 - 0.6 mm de ancho, planas o ligeramente cóncavas adaxialmente. Es diploide con 20 cromosomas (2n) (Figura 5).

Bouteloua trifida var. *burkii* crece en el sur de Texas y adyacente a la frontera de México y Estados Unidos (Flora de Norteamérica) (Figura 6).



Figura 5. Fotografía de *Bouteloua trifida* var. *burkii* (Scribn. ex S. Watson) Vasey ex L.H. Dewey (GC Nealley, SEINet, 2017).

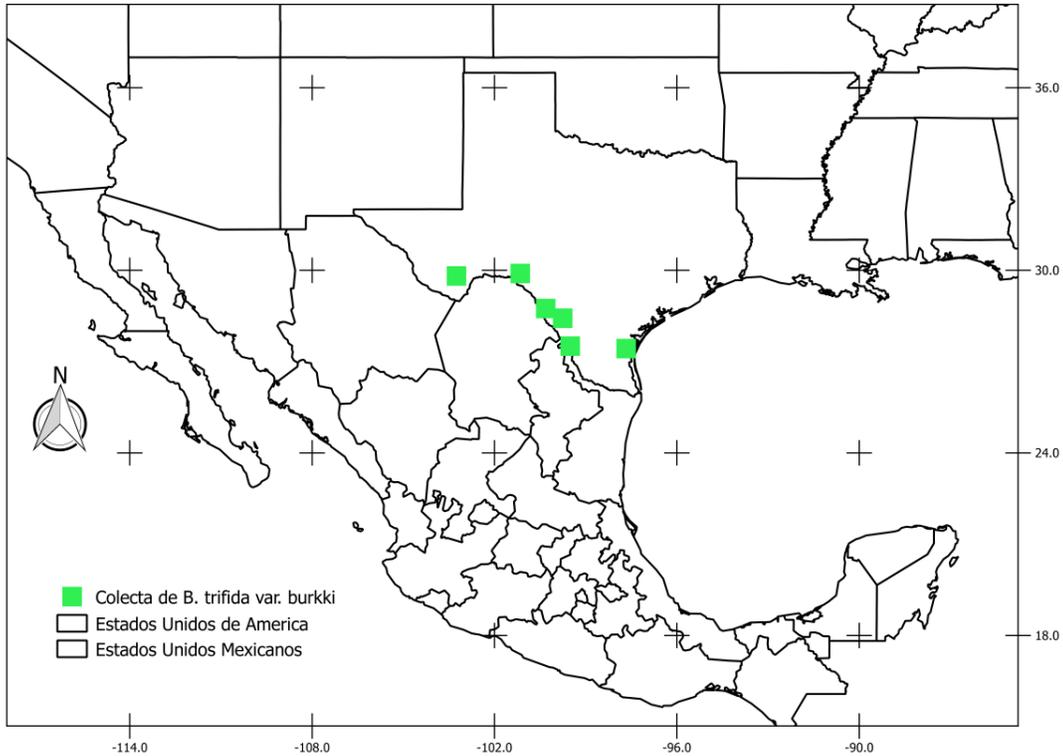


Figura 6. Distribución de *Bouteloua trifida* var. *burkii*. Realizado en el programa QGIS Desktop 2.18.9, los puntos representados de color azul son los sitios de colecta reportadas en SEINet.

1.3 Análisis morfométrico

Desde hace ya un tiempo los estudios de caracteres morfológicos y ecológicos de pastos han sido usados para clasificar a las especies con base en la determinación de sus características de vida, así como para entender su tolerancia al ambiente y entender de cómo dichas variables ambientales afectan la distribución de las especies. El uso de caracteres morfológicos tiene sus limitaciones, las cuales pueden surgir desde el procesamiento de las muestras (prensado y secado), que pueden afectar a los caracteres llevando a resultados erróneos (Baker et al., 2010)

Los estudios de las formas son necesarias en cualquier estudio sistemático (Rohlf, 1990), la morfología que presenten las plantas puede permitir realizar agrupaciones basadas en características, tanto de las plantas como de las zonas donde se desarrollan (Kindscher et al., 1995)

El género *Bouteloua* completo ha sido estudiado morfológicamente por Clayton et al. (1986), Gould (1979), Columbus et al., (1996) y Peterson et al. (2015); y a nivel de complejos *B. curtipendula* (Siqueiros, 2001), *B. scorpiodes* - *B. simplex* (Ortiz, 2017), *B. curtipendula* (Palomeque, 2011), *B. annua* - *B. aristoides* (Cuéllar, 2016), *B. repens* (Murillo, 2017), *B. barbata* (Pacheco, 2018).

1.4 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares pueden contener particularidades deseables que nos permitan tener una mejor resolución de la relación ancestro-descendiente y así poder organizar a las especies de acuerdo a sus grupos naturales (monofilia). Entre estas características, es más útil que el gen esté presente en una sola copia para poder resolver las inferencias de manera correcta, ya que al tener múltiples copias se hace difícil rastrear su origen, no obstante, el tener múltiples copias facilita su amplificación mediante técnicas de PCR. Además, el marcador debe ser lo suficientemente variable, es decir contener caracteres potencialmente informativos (Patwardhan et al., 2014). El método de secuenciación de Sanger es la principal herramienta usada para el estudio de la diversidad biológica. El último gran avance en metodologías de secuenciación es la llamada nueva generación, la cual obtiene inferencias usando una mayor cantidad de información del genoma, produciendo resultados más seguros (López, 2016)

Hasta el momento, los fragmentos de ADN nuclear más usados en animales y plantas son los espaciadores intergénicos de los genes *16S rARN*, *5S rARN* y *28S rARN* (EIG1 y EIG2). Los fragmentos de mitocondria (animales) son Citocromo oxidasa, *12S* mitocondrial, Citocromo b y región de control, y los fragmentos de cloroplasto (plantas) más empleados son *rbcL*, *matK* y *rpl16* (Zhang W., 2000; Patwardhan et al., 2014; Friendlander et al., 1994).

Existen dos distintos orígenes de la información genética, la primera son los genes que provienen únicamente de uno de los progenitores (marcador de origen uniparental), ellos no sufren el proceso de recombinación, lo que evita la distorsión de los patrones de evolución, además que muestran una distribución geográfica

más específica que los marcadores autosómicos, los que provienen de origen biparental, estos muestran son productos de la reticulación que ocurre durante la evolución (Cárdenas, 2014). El utilizar ambos tipos de marcadores permite comprender mejor los procesos evolutivos y de dispersión.

1.4.1. Marcadores de Cloroplasto

Uno de los fragmentos de ADN de cloroplasto (cpADN) más utilizados para realizar inferencias filogenéticas supragenéricas en plantas es el *rbcL*, éste se encuentra en una sola copia, codifica para una subunidad de la RUBISCO. Otro fragmento muy usado es *ndhF* el cual se encuentra en una sola copia, codifica para la enzima NADP deshidrogenasa, y ha permitido resolver relaciones en 78 familias de monocotiledóneas (Parwardhan et al., 2014). Shawn y colaboradores (2004) hicieron una comparación de las regiones no codificantes del genoma completo del cloroplasto buscando cuáles contienen caracteres potencialmente informativos y obtuvieron que los espaciadores intergénicos de cloroplasto (cpADN) *trnT-trnL-trnL-trnF*, *atpβ-rbcL*, son informativos en la mayoría de los grupos de estudio. Un estudio posterior realizado en angiospermas (Shaw et al. 2007), mostró que el segmento *rp132-trnL* tiene potencialmente la mayor cantidad de caracteres informativos de fragmentos de tamaño pequeño de una sola copia. Este fragmento de ADN de cloroplasto ha sido utilizado para resolver relaciones en la familia Begoniaceae (Hughes et al., 2018) y el género *Philodendron* (Vasconcelos et al., 2018), además ha sido utilizado en inferencias previas de *Bouteloua* (Peterson et al., 2015).

1.4.2 Marcador de núcleo

Se ha demostrado que los fragmentos de origen biparental poseen una propiedad valiosa para revelar eventos pasados de reticulación, procesos de especiación y parentesco de poliploides (Álvares et al 2003). En consecuencia, uno de los marcadores biparentales más populares para realizar inferencias filogenéticas a niveles genérico e infragenérico en plantas es el espaciador interno transcrito (ITS, por sus siglas en inglés) del citrón ribosomal nuclear 18S-5.8S-26S. Estos espaciadores son universales, es decir, están presentes en todos los organismos, siendo empleados ampliamente en plantas y hongos. Simultáneamente, los ITS presentan la suficiente variabilidad para realizar inferencias filogenéticas a nivel especie, género y familia, esto se debe a los polimorfismos (inserciones y deleciones) acumulados por ser una región no codificante (Álvares et al., 2003). Una desventaja de los marcadores de núcleo es que tienden a presentarse en múltiples copias en mismos o diferentes loci, lo que hace que sea difícil reconocer el origen de la copia, aumentando la probabilidad de estar trabajando con genes parálogos en las inferencias filogenéticas. Actualmente existe una técnica para reconocer el origen de estos fragmentos de ADN mediante la hibridación de fragmentos para los distintos casos, ya que de usarse estas secuencias repetidas sin conocer su origen nos pueden mostrar inferencias erróneas (Randall et al., 2004).

1.5 Distribución potencial de la especie

Los factores climáticos y físicos son las principales limitantes en la distribución de especies, esto se ha conocido por mucho tiempo. En los últimos años se empezaron a usar algoritmos matemáticos para estimar la extensión geográfica de los nichos ecológicos (NE), los NE se pueden estimar de dos maneras, la primera es usando los datos directos con los que interactúan directamente la especie, la segunda forma está enfocada a analizar las regiones idóneas donde se puede desarrollar, para este método se ocupa conocer ubicaciones de la especie, dichas condiciones son comparadas para buscar condiciones similares. Es importante

reconocer que este análisis está influenciado en su totalidad por los datos que se introduzcan, ya que, hablando de manera estricta, esas son las condiciones en base a las colectas realizadas.

Existen cuatro factores que determinan el área donde las especies pueden encontrarse.

- Abióticos: incluye factores como el clima, condiciones ambientales y edáficas.
- Bióticos: son las interacciones que se tiene con otros organismos pueden ser positivos (mutualismo) o negativos (depredadores o competidores).
- Regiones donde la especie puede diseminarse.
- La capacidad de adaptación que tenga la especie. (Soberón, 2005).

La distribución de *B. trifida* está reportada en Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas (Herrera et al., 2009), sin embargo, actualmente no se sabe cuáles son los principales factores abióticos que influyen en la distribución de la especie. Como todos los pastos del centro y norte de México y sur de Estados Unidos, se cree que *B. trifida* puede estar distribuyéndose en sitios vulnerables al cambio de uso de suelo. En Chihuahua existen reportes de que se están presentando cambios significativos en los pastizales cambiando los ecosistemas dominados por pastos a ser dominados por arbustos convirtiéndose en zonas predominantemente conformadas por arbustos debido a la dispersión de las semillas provocada por el ganado (Desmond, 2006).

2. Justificación

Los primeros trabajos de sistemáticos estaban únicamente basados en caracteres morfológicos, es decir en buscar similitudes fenotípicas en los organismos para dilucidar sus parentescos. Sin embargo, en la actualidad herramientas como la filogenia molecular apoyan o refutan resultados basados estrictamente en morfología. Columbus et al. (1999) y Peterson et al. (2015), basados en evidencias moleculares aumentaron el número de taxa del género *Bouteloua*, dando como resultado la inclusión de géneros que se habían clasificado mediante caracteres morfológicos únicamente. Esto demuestra la relevancia de realizar inferencias filogenéticas con base en datos moleculares para complementar los datos morfológicos y poder inferir el origen de las especies y su evolución de una manera más cercana a la realidad.

Las hipótesis filogenéticas existentes de la especie *B. trifida* (Columbus et al., 1998 y Peterson et al., 2015) han buscado resolver relaciones dentro del género *Bouteloua*, por lo que han incluido pocas muestras por especie. Es así que nunca se ha realizado un estudio de la especie, a nivel poblacional, y ni se ha corroborado si las variedades de *B. trifida* son entidades reales o son artificiales. Respecto a las variedades, Peterson et al. (2015), hace mención y considera que no deben ser tomadas en cuenta, sin embargo, no muestra ni justifica esta conclusión y cabe destacar que el objetivo de su trabajo no era poner a prueba esta variación.

Resulta entonces necesario analizar estas variedades mediante el uso de caracteres moleculares y morfométricos al mismo tiempo para establecer si las variaciones son plásticas o si hay un fundamento genético. Además, es necesario conocer la distribución real de la especie y los factores abióticos que más influyen en ésta para conocer el estado de vulnerabilidad actual de la especie en su hábitat natural.

3. Objetivos

General

- Determinar la variación de *B. trifida* mediante datos morfométricos y moleculares.

Específicos

- Determinar si existen diferencias morfométricas que soporten la separación de las variedades *B. trifida* var. *burkii* y *B. trifida* var. *trifida*.
- Determinar si existen diferencias empleando secuencias de ADN de cloroplasto y núcleo que soporten la separación de las variedades *B. trifida* var. *burkii* y *B. trifida* var. *trifida*.
- Determinar la distribución de las variedades *B. trifida* en México, de existir.

4. Hipótesis

- La pubescencia de la lema dará soporte a la separación en dos variedades de *B. trifida*.
- Las inferencias obtenidas de los fragmentos de ADN de cloroplasto y núcleo darán soporte a las dos variedades de *B. trifida*.
- La distribución de la variedad *B. trifida* var. *burkii* se extenderá hasta México.

5. Metodología

5.1 Colectas de muestras

Se realizó una revisión de los reportes de la especie en las bases de datos de Regional Networks of North American Herbaria (SEINet), Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), Red Mundial de información sobre la biodiversidad (REMI) Global Biodiversity Information Facility (GBIF). Con los registros obtenidos se realizaron tres salidas de campo a los estados de: Coahuila, Chihuahua, Tamaulipas, Nuevo León, Guanajuato y Baja California; (Herrera *et al.*, 2004; Gould, 1980; Figura 7. En cada sitio de colecta se recolectaron de 2 a 5 plantas completas, se anotaron las coordenadas del punto, altitud, vegetación aledaña y si se encontraba en zona de disturbio. De cada planta colectada se tomó una muestra de hojas frescas que se almacenaron en perlas de sílica gel para su secado, conservación y posterior extracción de ADN. Las plantas completas colectadas, fueron sometidas al método de preservación de especímenes botánicos de Engelmann (1986). Así mismo, algunas muestras fueron obtenidas de ejemplares de herbario, los cuales están resguardadas en el Herbario de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (HUAA) bajo los siguientes números de colecta: 29738, 9323, 13135, 13101 y 13111; y en el herbario de INEGI: 15 (Maldonado y Col), s/n (Garrido), 9 (Coronado) y V16.1 (Huerta).

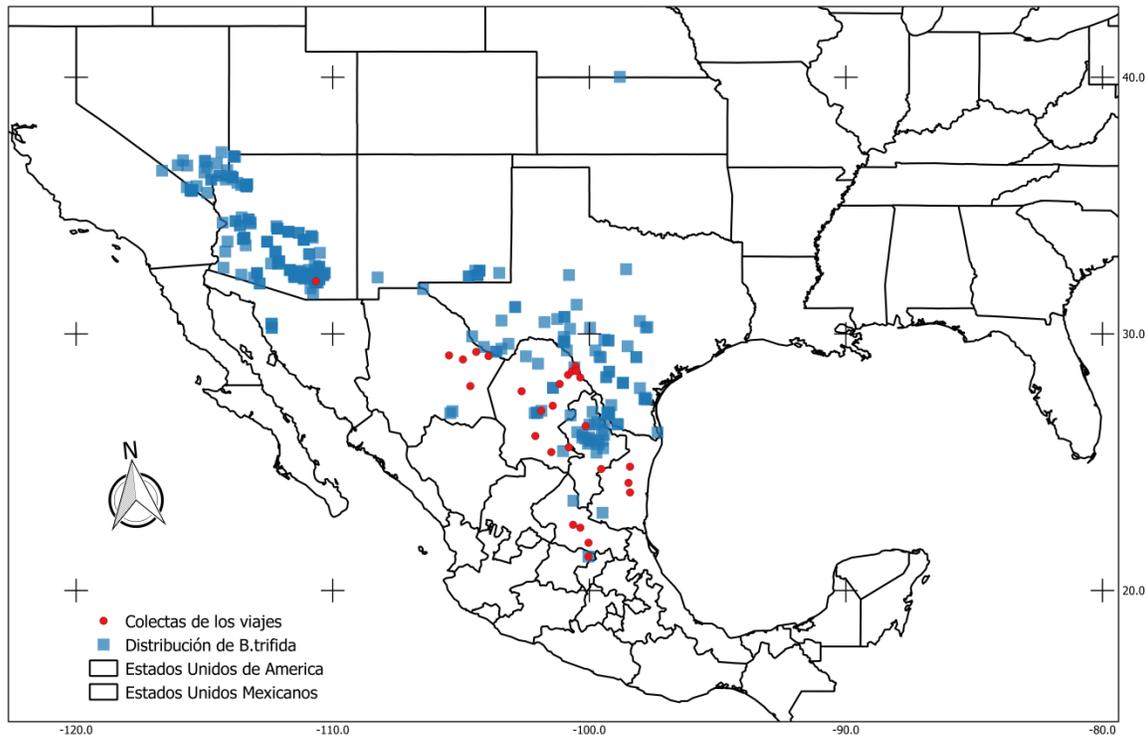


Figura 7. Distribución y sitios de colecta de *B. trifida*. Representado con cuadros (azul) registros de la especie y con círculos (rojos) las colectas realizadas, realizado en el programa QGIS 2.18.9.

5.2 Análisis morfométrico

En total se revisaron 67 individuos de ambas variedades de *B. trifida*, la selección de caracteres morfológicos a medir fue hecha de acuerdo a las descripciones de Herrera et al. (2004) y de J.P.Wipff (sin fecha). En total se evaluaron 43 caracteres de los cuales 24 fueron cualitativos y 19 cuantitativos, a su vez, 18 fueron vegetativos y 25 reproductivos (Cuadro 1: Caracteres medidos en plantas colectadas de *B. trifida*.Cuadro 1).

Las mediciones se realizaron con una regla de 30 cm para los caracteres vegetativos, los reproductivos con ayuda de un papel milimétrico y microscopio estereoscopio. Las mediciones fueron específicas y homogéneas para todos los individuos, por ejemplo, siempre se midió el tallo de mayor longitud, solo la espiguilla central seleccionada después de medir el número total de espiguillas y dividirlo entre dos, en caso de que el número resultante no fuera entero se redondeó al entero superior, el conteo siempre se realizó desde la espiguilla apical. La captura de los datos se realizó en el programa de Excel 2016. Cuando se completó la base de

datos para las 67 muestras, se realizó un depurado de datos, eliminando aquellos caracteres que no fueron variables y por lo tanto no informativos. Con la matriz de datos final, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) en el programa PAST3 (Hammer et al., 2001). Primero, para observar el comportamiento de los datos se realizaron análisis preliminares con diferentes conjuntos de datos por ejemplo solo vegetativos, solo reproductivos, solo cualitativos de espiguilla, entre otros. Debido a que la principal diferencia entre las variedades es la pubescencia de la lema, los análisis se realizaron sólo con los datos de la espiguilla.

Así mismo se realizó un análisis de correlación entre caracteres morfológicos y factores ambientales en el programa PAST 3. Las capas de los factores ambientales fueron descargadas de la base de datos World Clim (Fick, S.E, 2017) y analizadas en el programa Q.gis 2.18.24, donde se extrajo la información ambiental de cada uno de los puntos de colecta con la herramienta sampling point tool. Para comprobar la normalidad se usaron los valores obtenidos en el PCA mediante la prueba de Mardia. Para comprobar la homocedasticidad se utilizó la prueba de cajas (prueba de varianza) y para comprobar si existía diferencia significativa entre los grupos formados se utilizó la prueba de MANOVA (de ser datos con distribución y varianza normal), o PERMANOVA de una vía si los datos resultaban no paramétricos.

Cuadro 1: Caracteres medidos en plantas colectadas de *B. trifida*.

	Estructura	Caracter	Tipo
Vegetativo	Planta	Nudos escabrosos.	Cualitativo
		Base subrizomatoza.	
	Tallo	Geniculado en los nudos inferiores.	
		Longitud.	
		Pubescencia.	
		Ramificación.	
	Vaina	Pubescencia de los entrenudos inferiores.	
		Pubescencia.	
		Pubescencia de la base.	
	Lígula	Longitud.	Cuantitativo
		Longitud.	
Forma de la Lígula.			

Cuadro 1: Caracteres medidos en plantas colectadas de *B. trifida*.

Reproductivo	Lámina foliar	Posición de las hojas.	Cualitativo	
		Forma de la hoja.		
		Presencia de pelos papilosos.		
			Longitud de los pelos papilosos.	Cuantitativo
			Longitud de la lámina foliar.	
			Ancho de la lámina foliar.	
			Pubescencia de la base y del haz	Cualitativo
	Inflorescencia	Número de espiguillas.	Cuantitativo	
		Longitud de la inflorescencia.		
		Espacio entre inflorescencias		
		Longitud de las ramas de inflorescencia.		
	Espiguillas	Lugar de desarticulación de las glumas.	Cualitativo	
		Forma glumas.		
		Forma del ápice de la palea.		
		Pubescencia de la gluma superior.		
		Presencia de pelos papilosos en la gluma superior		
		Forma de la espiguilla.		
		Forma de la lema.		
		Forma del margen de la lema		
		Arista central.		
		Forma de la lema.		
		Pubescencia de la lema en la base y en el ápice.		
			Longitud de la espiguilla.	Cuantitativo
			Longitud de la gluma inferior	
			Longitud de la gluma superior.	
			Forma de la palea.	
			Longitud de la palea.	
Longitud de la lema.				
Longitud de la arista central.				
Longitud de las anteras.				
Longitud de la cariopsis				
Antera	Color.	Cualitativo		
Flor rudimentaria	Tipo de rudimento.	Cuantitativo		
	Longitud del rudimento.			
	Longitud de las aristas.			
Flor hermafrodita	Presencia.	Cualitativo		

5.3 Extracción, Amplificación y Secuenciación

Las muestras de hoja almacenadas en sílica gel se maceraron en un disruptor celular (Tissue Lyser II- QIAGEN) con perlas de acero a una frecuencia de 30 1/S durante 3 minutos, en caso que el tejido no estuviera macerado por completo se dejó reposar 10 minutos para continuar macerando las veces que fueran necesarias (2-4), todas con la misma frecuencia y mismo tiempo. Una vez pulverizadas se procedió a extraer el ADN por el método de cloroformo- alcohol isoamílico / 2X CTAB (Doyle and Doyle 1987), con las siguientes modificaciones realizadas por Columbus et al (1998), con una modificación extra:

- un lavado con 600 μL de Fenol- Cloroformo (1:1), antes del lavado con Cloroformo- alcohol Isoamílico.

El ADN extraído se cuantificó mediante el uso del espectrómetro Colibrí microvolume spectrometer marca Titertek Berthold, registrando las relaciones de absorbancia 260/280, 230/260 y la concentración (ng/ μL). Posteriormente, todas las muestras se ajustaron a una concentración de 40 - 100 ng/ μL .

Para la amplificación del ITS1 y 2 se utilizó el Kit Promega Go-taq en las siguientes cantidades 2.5 μL de Buffer (5X), 0.5 μL de DNTP´ s (10 mM), 0.5 μL de cada oligo (10 mM) (Forward y Reverse), 1 μL de ADN (40 ng), 0.062 μL de enzima Go-taq (1u/ μL), 1 μL de BSA (8 μM / μL), 1 μL de DMSO (95%), 1.25 μL de Mg^{+2} y 4.19 μL de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 12.5 μL .

Algunas muestras no amplificaron con los reactivos descritos anteriormente por lo que se amplificaron usando el kit Phusion High-Fidelity ADN Polymerase ® de Thermo Fisher, con las siguientes cantidades: 4 μL de Phusion GC buffer (5x), 0.4 μL de DNTP´ s (10 mM), 1 μL de oligo (10 mM) (Forward y Reverse), 1 μL de ADN (40 ng), 0.6 μL de DMSO, 0.2 taq (2 u/ μL) y 11.8 μL de agua libre de nucleasas.

Las condiciones de amplificación que se emplearon para todas las muestras fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 segundos, alineamiento a 54°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto, una vez terminado los ciclos se programó una extensión final a 72°C por 10 minutos, finalizando con un almacenamiento a 4°C.

Los oligonucleótidos de ITS son los reportados por Columbus (sin publicar) específicos para *Poaceae*,

F_ITS_18S_G: 5´ -ATTGAATGGTCCGGTGAAG- 3´

R_ITS_26S_G: 5´ -GACGCCTCTCCAGACTACAA- 3´

Para la región *rpl32-trnL* se diseñaron oligos específicos para la especie partiendo de las secuencias de *Bouteloua trifida* de Peterson et al. (2015) KR185144.1, KR185143.1 y con el genoma completo del cloroplasto de *Bouteloua gracilis* KT168392.1 obtenidas de la plataforma GenBank de la NCBI. Para el alineamiento múltiple de las tres secuencias se empleó la plataforma MUSCLE que utiliza el método Clustal W en EMBL- EBI en donde se ubicaron los oligonucleótidos utilizados por Peterson et al (2015). El interés de diseñar nuevos oligos se originó después analizar los oligonucleótidos empleados por Peterson et al (2015) y observar que presentaban una diferencia de Tm mayor a 5°C lo que podría representar un problema de unión de los fragmentos al ADN molde y también que el oligonucleotido (5´-CAGTTCCAAAAAACGTACTION- 3´) tiene un porcentaje de GC menor al 40 %. Los oligos fueron diseñados en el programa ADNStar con la plataforma Primer Select 5.0 de ADNSTAR, Inc. (ADNSTAR Inc., Madison, WI, USA).

Cuadro 2. Características de los Oligonucleótidos de la región *rpl32- trnL*

Peterson et al., 2015		Oligonucleótidos Propuestos	
<u>Secuencia:</u> 5´- CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT- 3´		<u>Secuencia:</u> 5´-GAGCAGCGTGTCTACCATT- 3´	
Porcentaje de GC	A=4 T=5 C=6 G=5 CG=55.00%	Porcentaje de GC	A=4 T=5 C=5 G=5 CG=52.63%
Temperatura de Alineamiento (°C)	63.2	Temperatura de Alineamiento(°C)	60.6
Longitud del Oligonucleótido (pb)	20	Longitud del Oligonucleótido (pb)	19
<u>Secuencia:</u> 5´- CAGTTCCAAAAAACGTA CTTTC- 3´		<u>Secuencia:</u> 5´- CATTTTTGAGCGGGGAACGA- 3´	
Porcentaje de GC	A=9 T=5 C=6 G=2 CG=36.36%	Porcentaje de GC	A=5 T=5 C=3 G=7 CG=50.00%
Temperatura de Alineamiento (°C)	54.9	Temperatura de Alineamiento (°C)	61.9
Longitud del Oligonucleótido (pb)	22	Longitud del Oligonucleótido (pb)	20
Diferencia de Tm(°C)	8.3	Diferencia de Tm (°C)	1.3

Para la amplificación de este fragmento de ADN de cloroplasto se empleó el Kit Jenna Bioscience: 2.5 µL de Buffer (10X), 0.5 µL de DNTP´ s (10 mM), 0.5 µL de cada oligo (10 mM) (Foward y Reverse), 1 µL de ADN (40 ng), 0.25 µL de enzima Taq polimerasa (1u/ µL) , 1 µL de BSA (8 µM/ µL) y 18.75 µL de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 25 µL.

Algunas muestras que no amplificaron con los reactivos descritos se amplificaron usando el kit Phusion High-Fidelity ADN Polymerase ® de Thermo Fisher, con las siguientes cantidades: 4 µL de Phusion HF buffer (5x), 0.4 µL de DNTP´ s (10 mM), 1 µL de oligo (10 mM) (Foward y Reverse), 1 µL de ADN (40 ng), 0.6 µL de DMSO, 0.2 taq (2 u/ µL) y 11.8 µL de agua libre de nucleasas.

Todas las muestras se amplificaron de acuerdo a las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto,

una vez terminado los ciclos siguió una extensión final a 72°C por 10 minutos seguida de una temperatura de almacenaje a 4°C hasta que se sacara del equipo.

Después de las amplificaciones se realizaron electroforesis en agarosa al 1.2%, con una corriente eléctrica 80 volts durante 45 minutos, después se tiñeron con bromuro de etidio al 1% durante 25 a 40 segundos, se destiñeron durante 20 minutos en agua destilada y se observaron las bandas en un transiluminador (Figura 8).

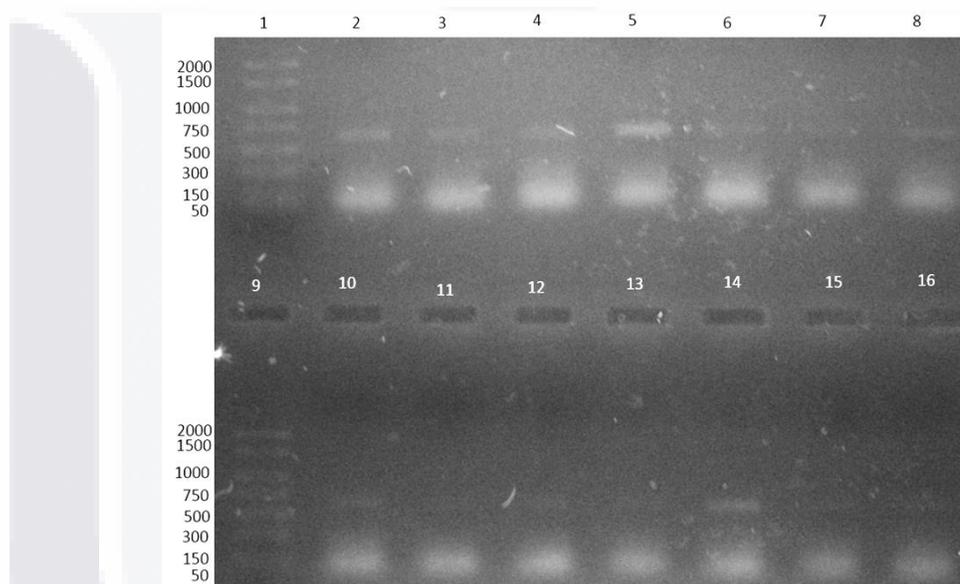


Figura 8. Electroforesis del fragmento *rpl32-trnL* (670 pb). **1:** Marcador de peso molecular; **2:** 5614; **3:** 5616; **4:** 5585; **5:** 5585; **6:** 5577; **7:** 5565; **8:** 5562; **9:** Marcador de peso molecular; **10:** 5558; **11:** 5554; **12:** 5525; **13:** 49:5516; **14:** 10; **15:** 5509; **16:** 5508.*Número del carril: Número colecta.

Antes de enviar a secuenciar los fragmentos amplificados, se purificaron empleando dos métodos, el primero fue usando el kit de Roche “High Pure PCR Product Purification Kit Versión 16®” para el cual se siguió el protocolo especificado por el producto. El segundo método fue por polietilenglicol (PEG), el cual consiste en procesar 25 µL del producto de PCR, 75 µL de TE + 100 µL de PEG (20% PEG en 2.5 M de NaCl), para dar un volumen final de 200 µL en un tubo eppendorf ® de 1.5 ml. El tubo con la mezcla se puso a incubar en baño maría a 37°C por 15 minutos, después, se centrifugó por 20 minutos a 14,000 rpm (o el máximo), en este punto, normalmente no se observó la pastilla por lo que se pipeteó con mucho

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cuidado 185 μ L del sobrenadante, se añadió 500 μ L etanol al 75-80% frío (-4°C) y agitó por inversión dos veces (no agitar fuerte). Se dejó el tubo durante 1 hora a una temperatura de -20°C , pasada la hora, se añadió 500 μ L de isopropanol frío (-4°C), y se dejó toda la noche precipitando con ambos alcoholes. Al día siguiente se centrifugó a 14,000 rpm (o el máximo) por 20 minutos (en este paso se observa la pastilla, si no se observa, aun así, continuar el protocolo), eliminar el sobrenadante dejando un poco de los alcoholes y dejar secar la pastilla por completo, después, añadir el mismo volumen inicial del producto de PCR de agua libre de nucleasas.

La comprobación de la purificación de ambos métodos se realizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%. Una vez purificados, se obtuvieron las concentraciones de los productos usando el Colibrí microvolume spectrometer marca Titertek Berthold y se realizaron preparaciones de 5 μ L del producto purificado y 5 μ L del oligonucleótido (10 mM) para enviar a secuenciar a la empresa MACROGEN [®] Corp (Maryland, EUA).

5.4 Análisis filogenético

Una vez obtenidas las secuencias fueron ingresadas a la plataforma de Blastn en la base de datos de la NCBI (National Center of Biotechnology Information), para comprobar que coincidieran con secuencias de la especie *B. trifida*. Después, se analizaron los cromatogramas de las secuencias con el programa Geneious [®] 10, eliminando las bases con múltiples picos (sucias).

Las secuencias del grupo externo se obtuvieron de la base de datos NCBI, para el fragmento *rpL32-trnL* se usaron secuencias de *B. barbata*, *B. gracilis* y *B. stolonifera*, para el fragmento de ITS se usaron secuencias de *B. gracilis*, *B. barbata*, *B. stolonifera* y *B rigidiseta*. También se añadieron secuencias de estos fragmentos de *B. trifida* encontrados de la misma plataforma (Anexos, Cuadro 9) con la finalidad de tener una mayor cantidad de datos, así como para realizar una comparación de los resultados con los obtenidos por Peterson et al. (2015).

Se generaron tres matrices de secuencias, una de *rpL32-trnL*, otra de ITS y una con los dos marcadores concatenados, cada una de las cuales se alineó

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

primero usando el algoritmo MUSCLE en el programa Mega 7 para después corroborar y de ser necesario realizar modificaciones manuales usando el programa PHYDE (Phylogenetics Data Editor). Para obtener los modelos de evolución empleados, las matrices se analizaron en el programa JModel Test 2.1.6 en la plataforma CIPRES.

Las inferencias filogenéticas se realizaron empleando los métodos de máxima parsimonia en el programa PAUP 4.0 con 1000 réplicas de Bootstrap almacenando 100,000 árboles; máxima verosimilitud en RaxML bajo el modelo de GTR (general de tiempo reversible) con una distribución gamma con 5000 réplicas de Bootstrap; inferencia bayesiana en la plataforma CIPRES usando el programa Mr bayes 3.2.6 con 2 bloques de búsqueda y 4 bloques de cadenas de búsqueda bajo el modelo Jukes-Cantor.

5.5 Distribución potencial de la especie.

Los datos empleados para realizar la predicción de nicho de la especie *B. trifida* se obtuvieron de las bases de datos. Regional Networks of North American Herbaria (SEINet), Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), Red Mundial de información sobre la biodiversidad (REMIB) Global Biodiversity information Facility (GBIF) así como de los puntos reportados por Herrera *et al.*, (2004) y Gould (1980). Además, se incluyeron los datos de los puntos de colectas de las plantas durante este proyecto. Todos los datos obtenidos se corroboraron y revisaron para obtener la distribución conocida más actualizada y confiable. La manipulación de los datos y capas se realizó en el programa QGIS 2.18.24.

Para delimitar el área de distribución a analizar, se empleó el mapa de ecorregiones (nivel 2). de la Comisión para la Cooperación Ambiental. Las diecinueve capas ambientales usadas se obtuvieron de WoldClim (Cuadro 3) y el análisis se realizó en el programa de MAXent (Phillips, 2017)

Cuadro 3:Capa Ambiental Usada.

Temperatura media anual
Temperatura máxima del mes más cálido
Temperatura mínima del mes más frío
Temperatura media del cuarto más húmedo
Temperatura media del cuarto más seco
Temperatura media del cuarto más frío
Precipitación anual
Precipitación del mes más húmedo
Precipitación del mes más seco
Estacionalidad de precipitación (coeficiente de variación)
Precipitación del cuarto más húmedo
Precipitación del cuarto más seco
Precipitación del cuarto más cálido
Precipitación del trimestre más frío
Rango Diurno medio
Isoterma
Temperatura estacional
Rango anual de temperatura
Temperatura media del cuarto más cálido

6. Resultados

6.1 Análisis morfométrico

Durante la identificación y medición de caracteres morfológicos de los ejemplares colectados se observaron diferencias en la pubescencia de la lema, específicamente nueve (14%) mostraban una menor pubescencia en la lema y la base la lema (Figura 9. C y D), mientras que 55 (86%) mostraban mayor pubescencia. (Figura 9; Error! No se encuentra el origen de la referencia. A y B).



Figura 9. Imágenes de los dos tipos de pubescencia observados en la lema de *B. trifida*. **A.** mayor pubescencia en el margen de la lema, **B.** mayor pubescencia en la base de la lema, **C.** menor pubescencia en el margen de la lema y **D.** Menor pubescencia en la base de la lema.

6.1.1 Agrupación con base en la pubescencia de la lema

El ACP mostró que los datos son variables pues se requieren 8 componentes principales para explicar el 95% de su variación (Cuadro 4. Valores de los componentes principales en los grupos formados en base de la pubescencia de la lema.). En el gráfico los dos grupos se separan quedando las muestras con lema menos pubescente en la parte inferior (Figura 10). Al realizar la prueba estadística de Mardia se comprobó que los grupos son significativamente diferentes ($P 0.0042 < 0.05$).

Los caracteres que más influyeron en el CP1 (componente principal) fueron la longitud de la flor perfecta, imperfecta, espiga, espiguilla, las glumas y las aristas de la flor perfecta, mientras que los que más determinaron el acomodo en el CP2 fueron la pubescencia de la lema y de la base de la lema, el color rojo en la segunda gluma, la longitud de las glumas y de la espiguilla.

Cuadro 4. Valores de los componentes principales en los grupos formados en base de la pubescencia de la lema.

Componente principal	Valor Característico	Proporción de varianza	
		Explica (%)	Acumulada (%)
1	2.69422	55.864	55.864
2	0.571885	11.858	67.722
3	0.417963	8.6664	76.3884
4	0.274129	5.684	82.0724
5	0.249309	5.1694	87.2418
6	0.187911	3.8963	91.1381
7	0.127116	2.6357	93.7738
8	0.0905599	1.8777	95.6515

6.2.2 Agrupación con base a las inferencias filogenéticas

Los datos morfológicos se agruparon acorde a los clados obtenidos en las inferencias filogenéticas de *rpl32-trnL*. Para explicar más del 98% de la variación se necesitaron dos componentes, indicando poca variación en los datos (Figura 11). Los caracteres más influyentes en el CP1 y CP2 fueron el número de espiguillas y la longitud de la espiga, aunque esta última de manera negativa en el CP2. Debido a que los datos obtenidos del ACP mostraron una distribución normal ($0.99 < 0.05$) y covarianza diferente ($P = 0.192 > 0.05$) se realizó un análisis de PERMANOVA en el cual se obtuvo que no existía una diferencia significativa entre los dos grupos analizados ($P = 0.06 > 0.05$)

Cuadro 5. Valores de los componentes principales en los grupos formados en base a los clados obtenidos por las filogenias.

Componente principal	Valor Característico	Proporción de varianza	
		Explica	Acumulada
1	55.196	78.744	78.744
2	13.6416	19.461	98.205
3	0.748157	1.0673	99.2723
4	0.325052	0.46373	99.73603
5	0.134554	0.19196	99.92799
6	0.0336568	0.048016	99.976006
7	0.016568	0.023636	99.999642

6.2.3 Análisis de correlación entre variables ambientales y caracteres morfométricos

El análisis de correlación (Figura 12) mostró que la coloración rojiza en la segunda gluma está relacionada positivamente con la presencia de una mayor pubescencia en la lema y la base de la lema. Además, las plantas de menor tamaño presentan una menor diferencia en la longitud entre las glumas, mientras que las plantas de mayor tamaño tienen una mayor diferencia entre las glumas. El tamaño de las plantas está correlacionado positivamente al color rojo de la segunda gluma

y por lo tanto también de la pubescencia. También se obtuvo una correlación positiva entre el tamaño de la inflorescencia y el tamaño de la espiguilla.

En cuanto a las relaciones entre los caracteres morfológicos y las variables ambientales existe una correlación positiva entre el color rojo de la segunda gluma con temperaturas extremas máximas (0.82) y mínimas (0.87), así mismo la pubescencia de la lema también mostró estas correlaciones (0.85). El tamaño de la primera gluma es menor en temperaturas frías (0.92) y las aristas tienen un mayor tamaño cuando las temperaturas cálidas son mayores (0.80). El tipo de suelo no mostró correlación significativa con los caracteres morfológicos de la especie.



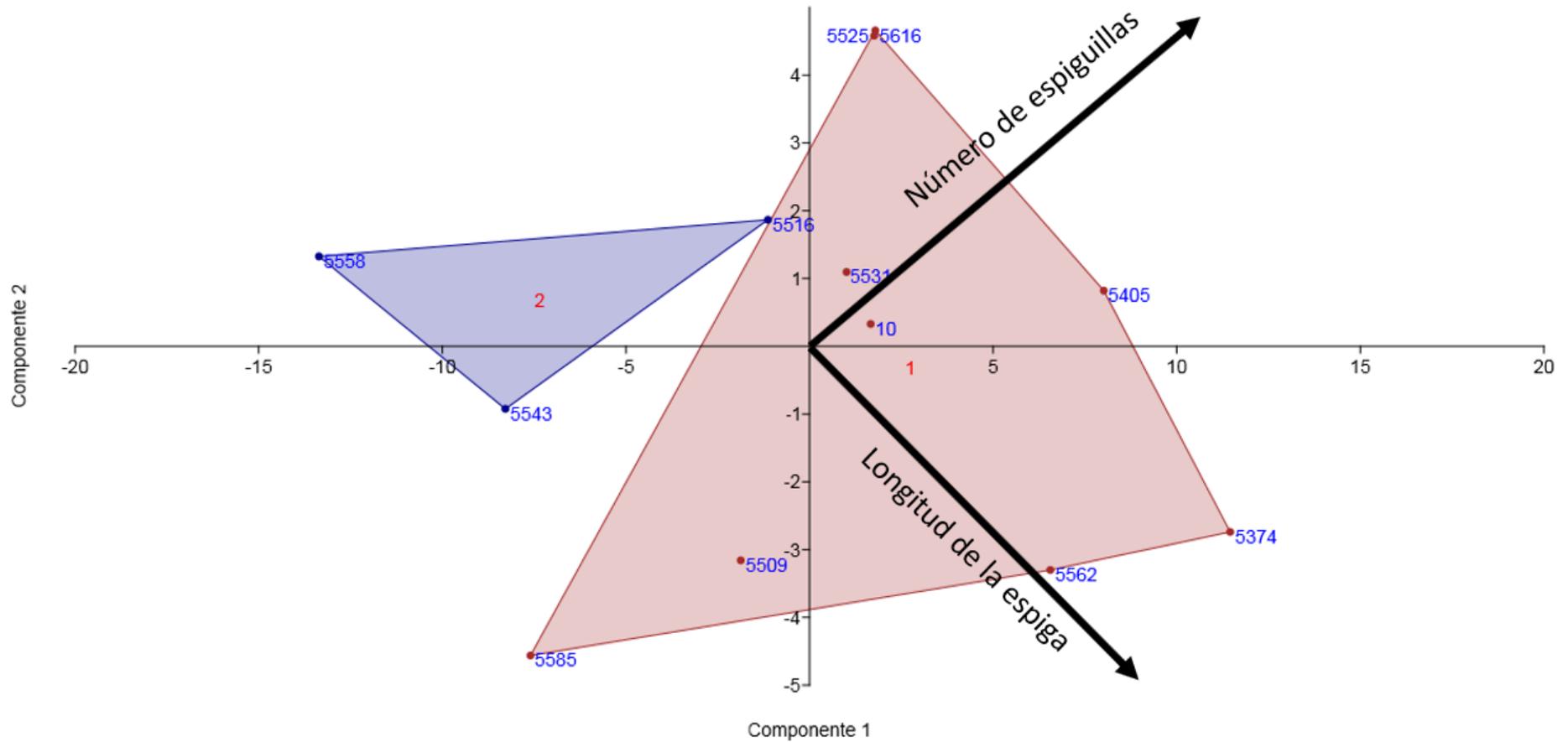


Figura 11. Gráfico del análisis de componentes principales con caracteres de la inflorescencia. Los grupos representan los clados obtenidos en la inferencia filogenética: el polígono rojo, clados 3,4 y 5; color azul corresponde al clado 2 de la matriz concatenada obtenida por método de inferencia bayesiana.

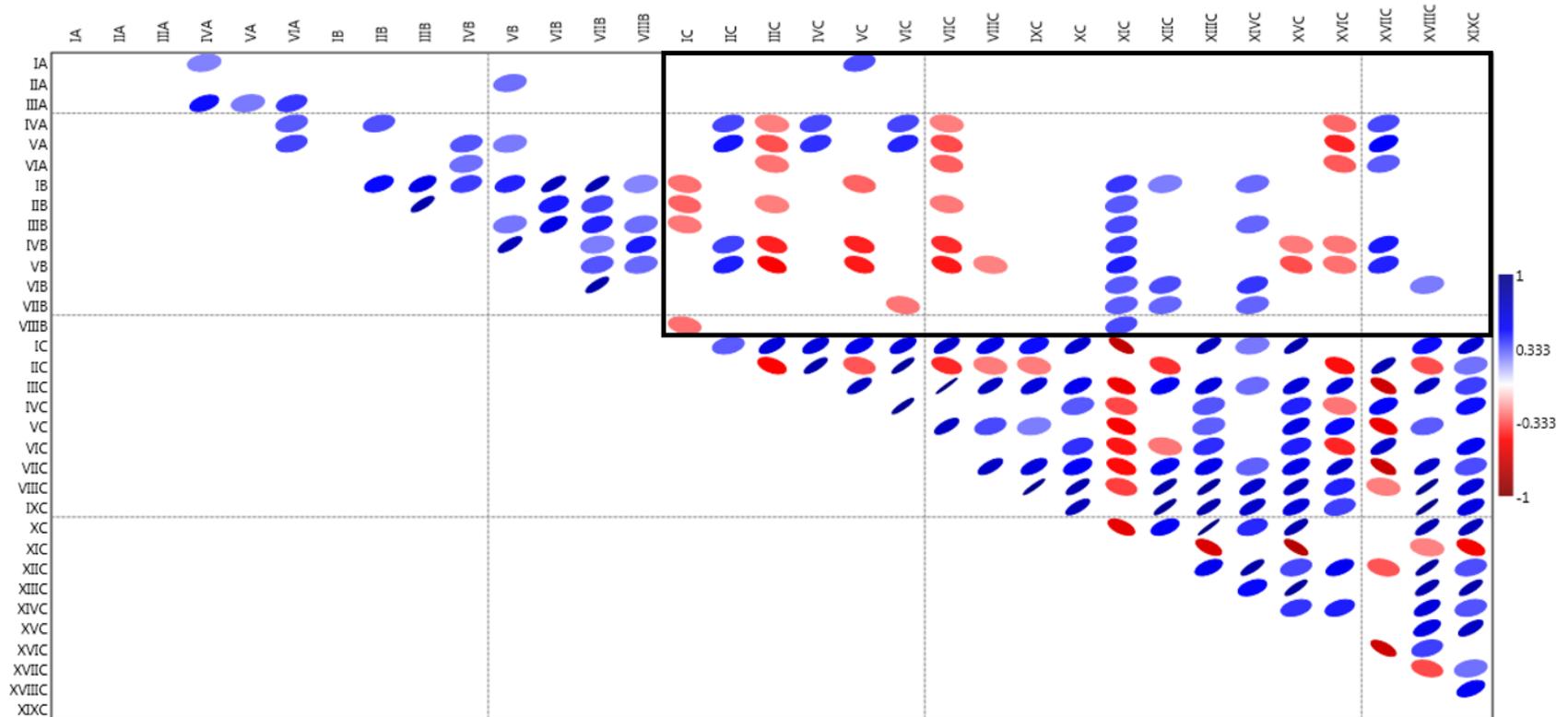


Figura 12. Gráfico mostrando las correlaciones entre los datos morfológicos y las variables ambientales. El recuadro de color negro señala la correlación entre los datos morfológicos y factores ambientales (Cuadro 6). Se muestran únicamente aquellos que son estadísticamente significativos con un $\alpha= 0.05$.

Cuadro 6. Abreviaturas usadas en el análisis de correlaciones.

A "Cualitativos"	I	Forma de la base.
	II	Diferencia en la longitud de las glumas.
	III	Color de la segunda gluma.
	IV	Forma de la lema.
	V	Pubescencia de la lema de la flor perfecta.
	VI	Pubescencia de la base de la lema de la flor perfecta.
B "Cuantitativos"	I	Longitud de la espiguilla.
	II	Longitud de la primera gluma.
	III	Longitud de la segunda gluma.
	IV	Longitud de la palea.
	V	Longitud de la lema de la flor perfecta.
	VI	Longitud de la arista central de la flor perfecta.
	VII	Longitud de la arista central de la flor imperfecta.
	VIII	Longitud de rudimento.
C "Ambientales"	I	Temperatura media anual.
	II	Temperatura máxima del mes más cálido.
	III	Temperatura mínima del mes más frío.
	IV	Temperatura media del cuarto más húmedo.
	V	Temperatura media del cuarto más seco.
	VI	Temperatura media del cuarto más cálido.
	VII	Temperatura media del cuarto más frío.
	VIII	Precipitación anual.
	IX	Precipitación del mes más húmedo.
	X	Precipitación del mes más seco.
	XI	Estacionalidad de precipitación (Coeficiente de variación).
	XII	Precipitación del cuarto más húmedo.
	XIII	Precipitación del cuarto más seco.
	XIV	Precipitación del cuarto más cálido.
	XV	Precipitación del trimestre más frío.
	XVI	Ecorregiones.
	XVII	Radiación.
	XVIII	Horas insolación.
	XIX	Unidad Suelo.

6.3 Amplificación y Secuenciación

Las matrices alineadas incluyen 18 secuencias de ITS de 412 pares de bases (pb) de longitud más 4 de grupo externo, 25 secuencias de *rpl32-trnL* con 460 pb más tres de grupo externo, y 12 secuencias en la matriz concatenada con longitud final de 872 pb.

6.4. Inferencias basadas en datos moleculares.

6.4.1. Cloroplasto: rpl32-trnL.

6.4.1.1. Máxima Parsimonia.

La hipótesis obtenida por parsimonia mediante la búsqueda heurística retuvo 100000 árboles de 57 pasos, 16 caracteres fueron parsimoniosamente informativos, 444 parsimoniosamente no informativos y con un índice de consistencia de 0.982.

La inferencia recobra dos cladogramas principales, el clado A (SN, 5543, 15, 5558 y 5516, 87% BS) que incluye a muestras de Chihuahua, Tamaulipas y Coahuila y el clado B1 (62% BS), forma una politomía e incluye las secuencias de Peterson et al. (2015), y contiene un subclado formado por muestras de México y Estado Unidos (100% Bs).

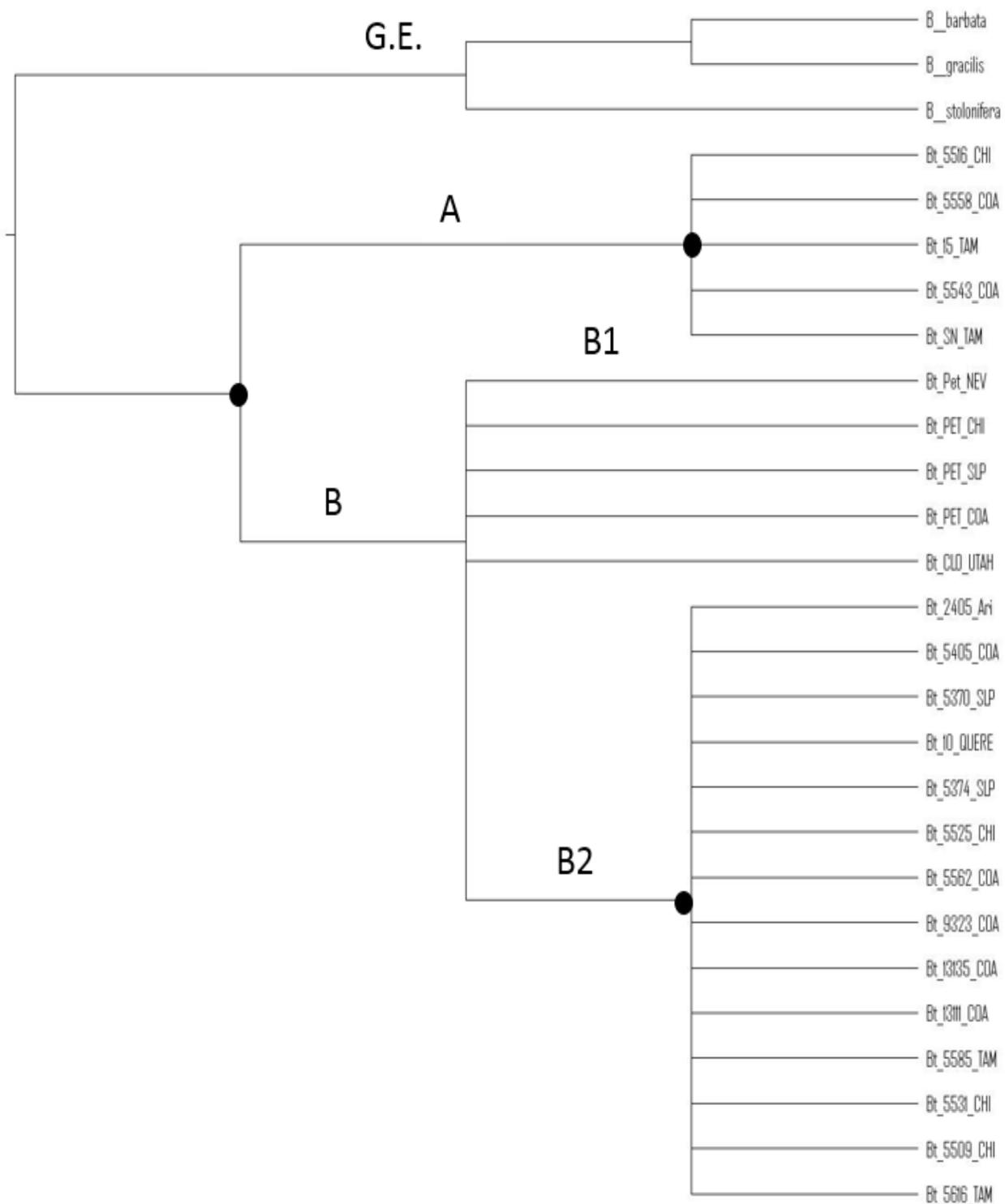


Figura 13. Inferencia obtenida mediante Parsimonia con secuencias de *B. trifida* del mercado molecular *rp132-trnL*. Los círculos sobre las ramificaciones indican el soporte de bootstrap mayor al 80%. G.E. corresponde a secuencias del grupo externo.

6.4.1.2. Máxima Verosimilitud

La hipótesis de MV muestra la formación de dos clados (A y B) bien soportados (100% BS), el clado A es el más tempranamente divergente y es grupo hermano del resto de las secuencias (90% BS). El clado B incluye dos subclados bien soportados (92% BS), B1 con las muestras de Peterson (62%BS) y B2 con el resto de las secuencias(100% BS), las cuales incluyen muestras del norte y centro de México, y sur de Estados Unidos (Figura 14) .

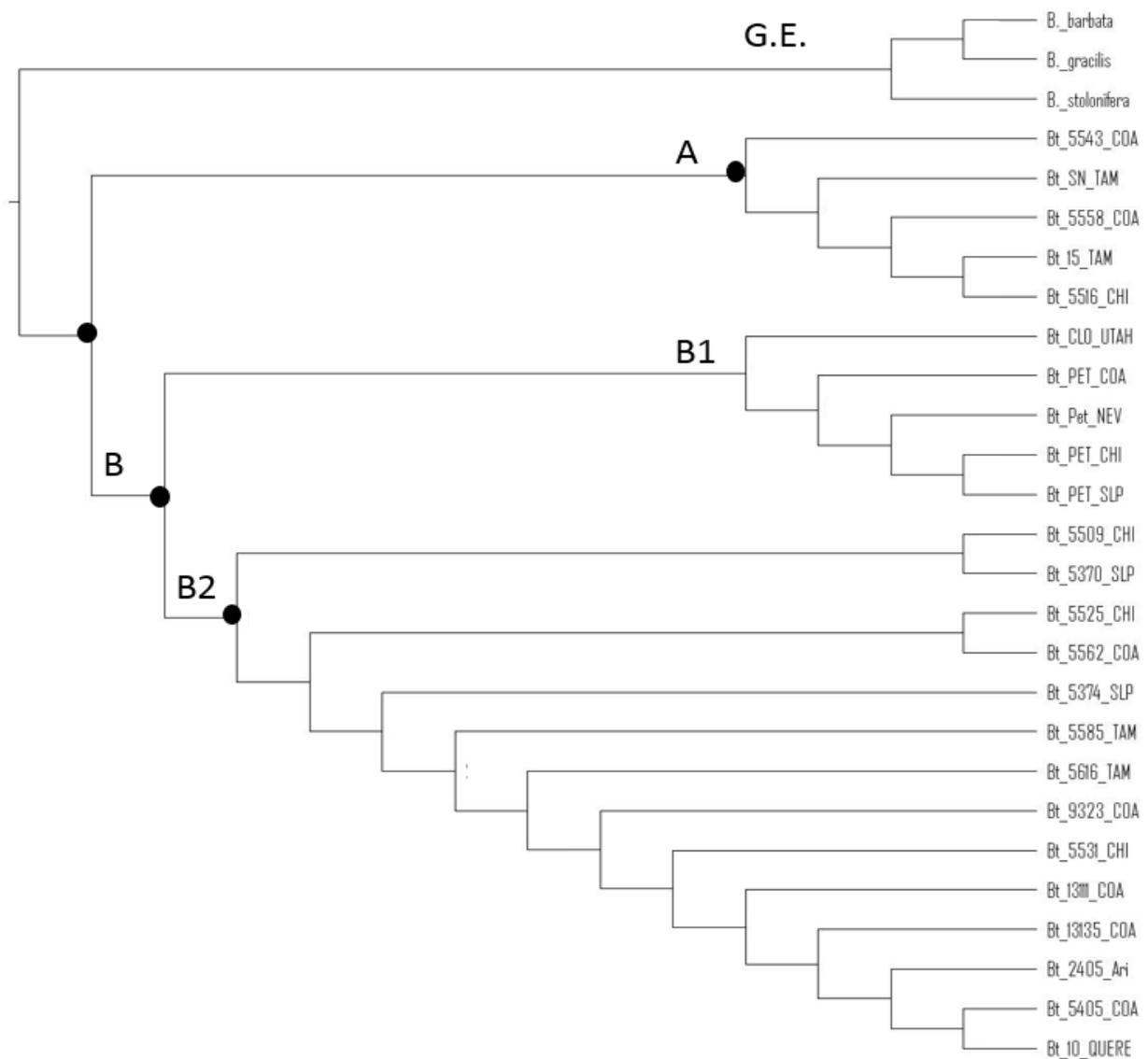


Figura 14. Inferencia obtenida mediante Máxima Verosimilitud con secuencias del marcador molecular *rpl32-trnL* de *B. trifida*. Los círculos sobre las ramificaciones indican valores mayores a 80% de bootstrap. El clado G.E. son secuencias del grupo externo.

6.3.1.3 Inferencia filogenética: Bayesiana

El resultado muestra dos cladogramas principales bien soportado (100%), el clado A, incluye a las muestras del norte de México (SN, 5543, 15, 5558 y 5516) (100% BS), y es hermano del clado B, formado por una politomía con las secuencias de Peterson et al (2015) (100% BS) y el grupo (B2) que incluye muestras de México y Estado Unidos (100% BS) quien forma otra politomía.

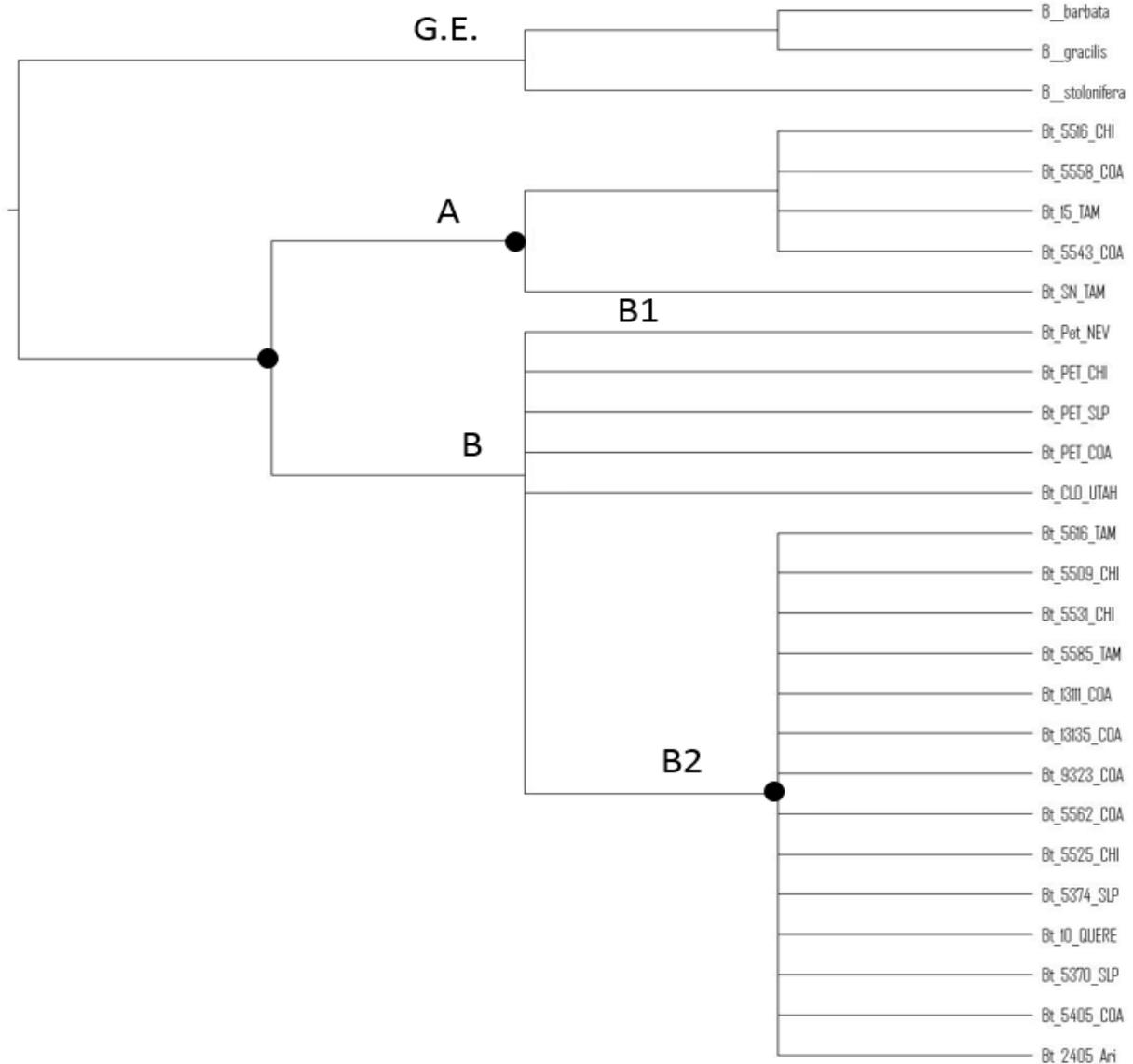


Figura 15. Inferencia obtenida mediante el método bayesiano con secuencias del marcador molecular *rpl32-trnL* de *B. trifida*. Los círculos sobre las ramificaciones indican un valor de Bootstrap mayor al 80%. El clado G.E. corresponde a secuencias del grupo externo.

6.4.2 ADN nuclear: ITS.

6.4.2.1. Máxima Parsimonia

La hipótesis obtenida de ITS mediante la búsqueda heurística retuvo 100000 árboles de 179, con 71 caracteres parsimoniosamente informativos, 341 parsimoniosamente no informativos y un índice de consistencia de 0.899. Presenta poca resolución, con el individuo 5616 de Chihuahua como el más divergente y grupo hermano del resto de las secuencias con un BS de 100%, y un clado no soportado, integrado por una politomía formada por las muestras de Peterson et al., (2015), más dos subclados, uno incluye a las muestras del norte de México (15, 5558, 5516) y el otro con las muestras del norte y centro de México, así como del sur de EUA, el cual cuenta con 95% BS (Figura 16).

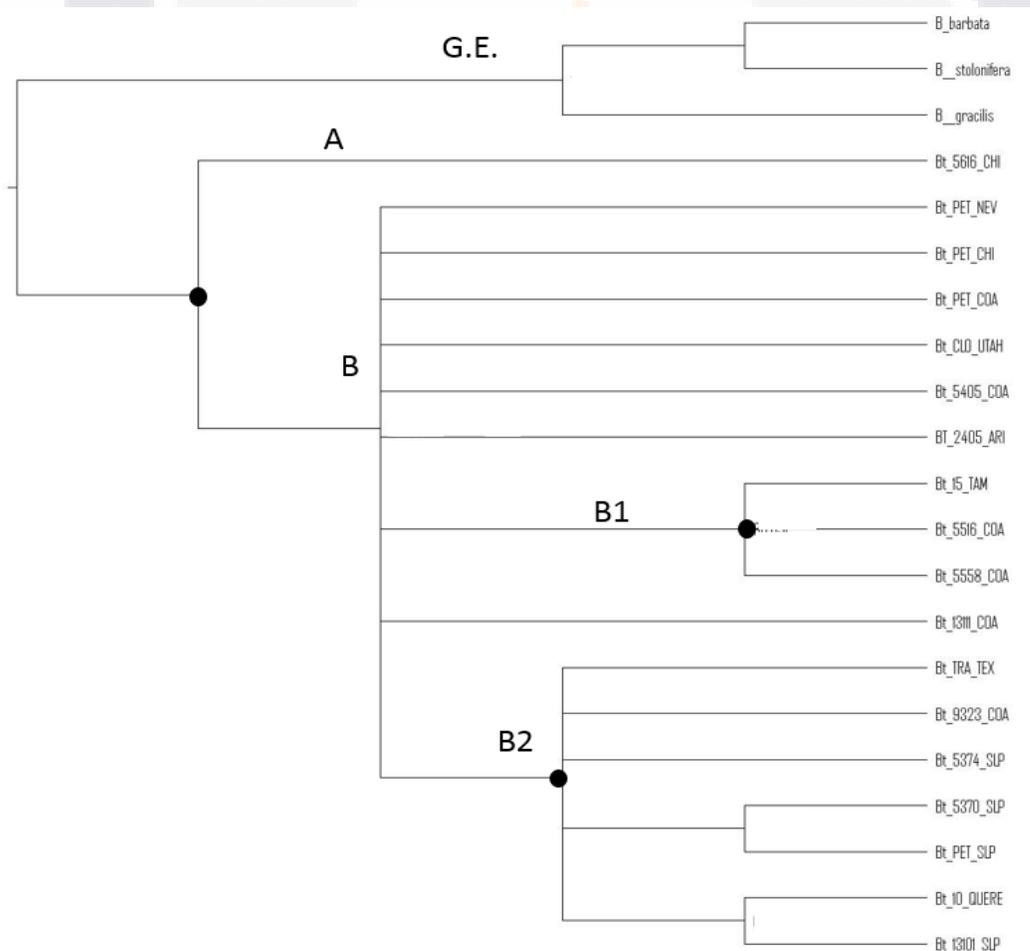


Figura 16. Inferencia obtenida mediante parsimonia con secuencias del marcado molecular ITS de *B. trifida*. Los círculos en las ramificaciones indican un valor de bootstrap mayor a 75 %. El clado G.E corresponde al grupo externo. Se muestra el árbol consenso (50%).

6.4.2.2 Máxima Verosimilitud

La hipótesis resuelve dos clados bien soportados (100% BS), el clado A como el más tempranamente divergente (91% BS) contiene muestras del norte de México, y el clado B (57% BS) conformado por dos subclados, el B1 (60% BS) integrado por muestras del norte de México, el sur de Estados Unidos y las secuencias reportadas por Peterson et al., (2015), y el B2 (BS 97 %) que incluye individuos del centro de México y sur de Estados Unidos (Figura 17).

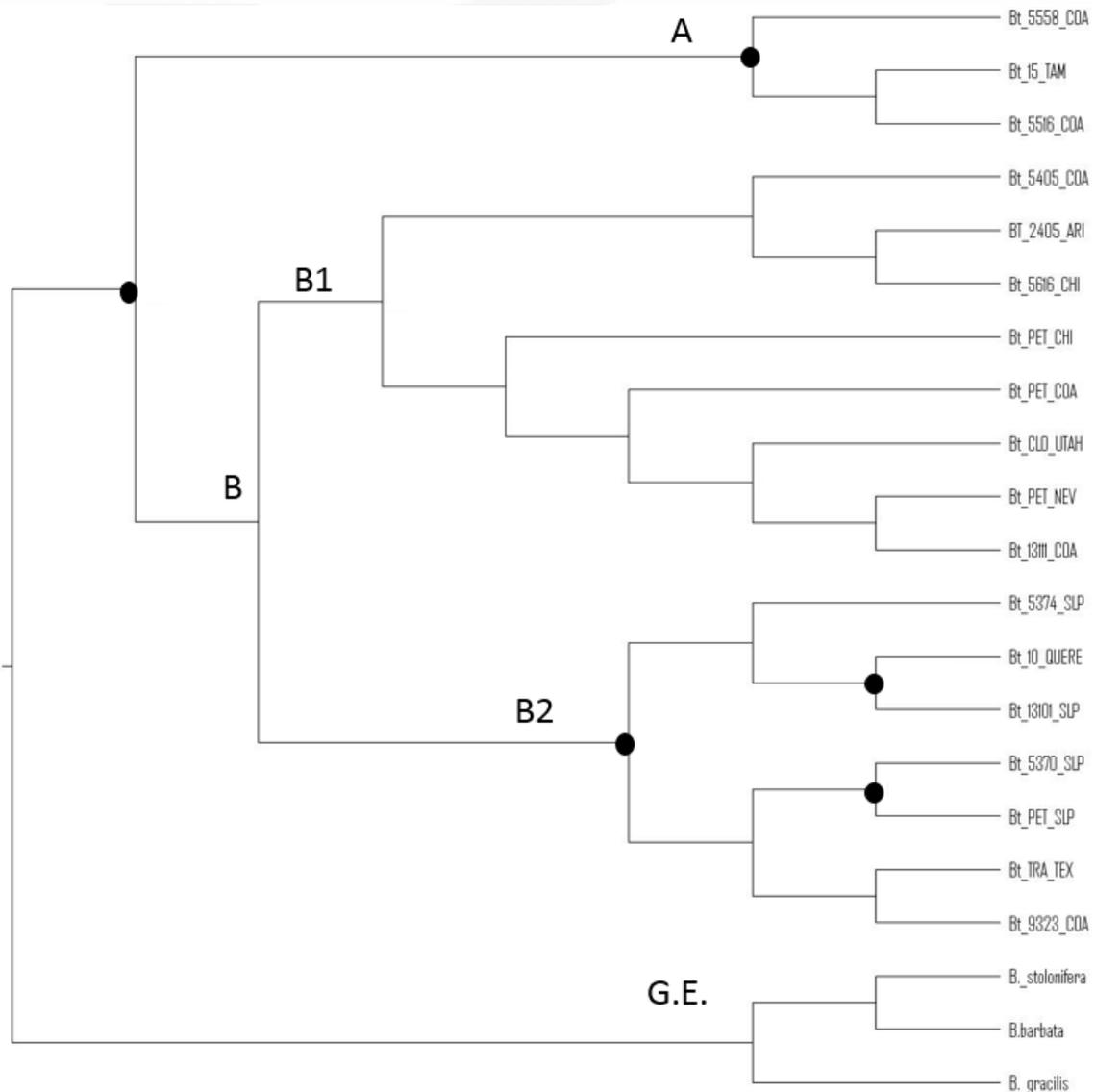


Figura 17. Inferencia obtenida mediante Máxima Verosimilitud con secuencias de *B. trífida* del marcado molecular ITS. Los círculos en las ramificaciones indican un valor de bootstrap mayor a 75 %. El clado G.E corresponde al grupo externo .

6.4.2.3. Inferencia bayesiana

La hipótesis resuelve en una politomía, clado A, formado por muestras del norte de México (15, 5546,5558) (70% BS), el clado B1 (50% BS) está formado por las secuencias de Peterson et al., (2015) y del norte de México y estados Unidos (5405, 2405,5616 y 13111) el clado B2 (100% BS) está formado por individuos del sur de Estados Unidos, norte y centro de México (Figura 18).

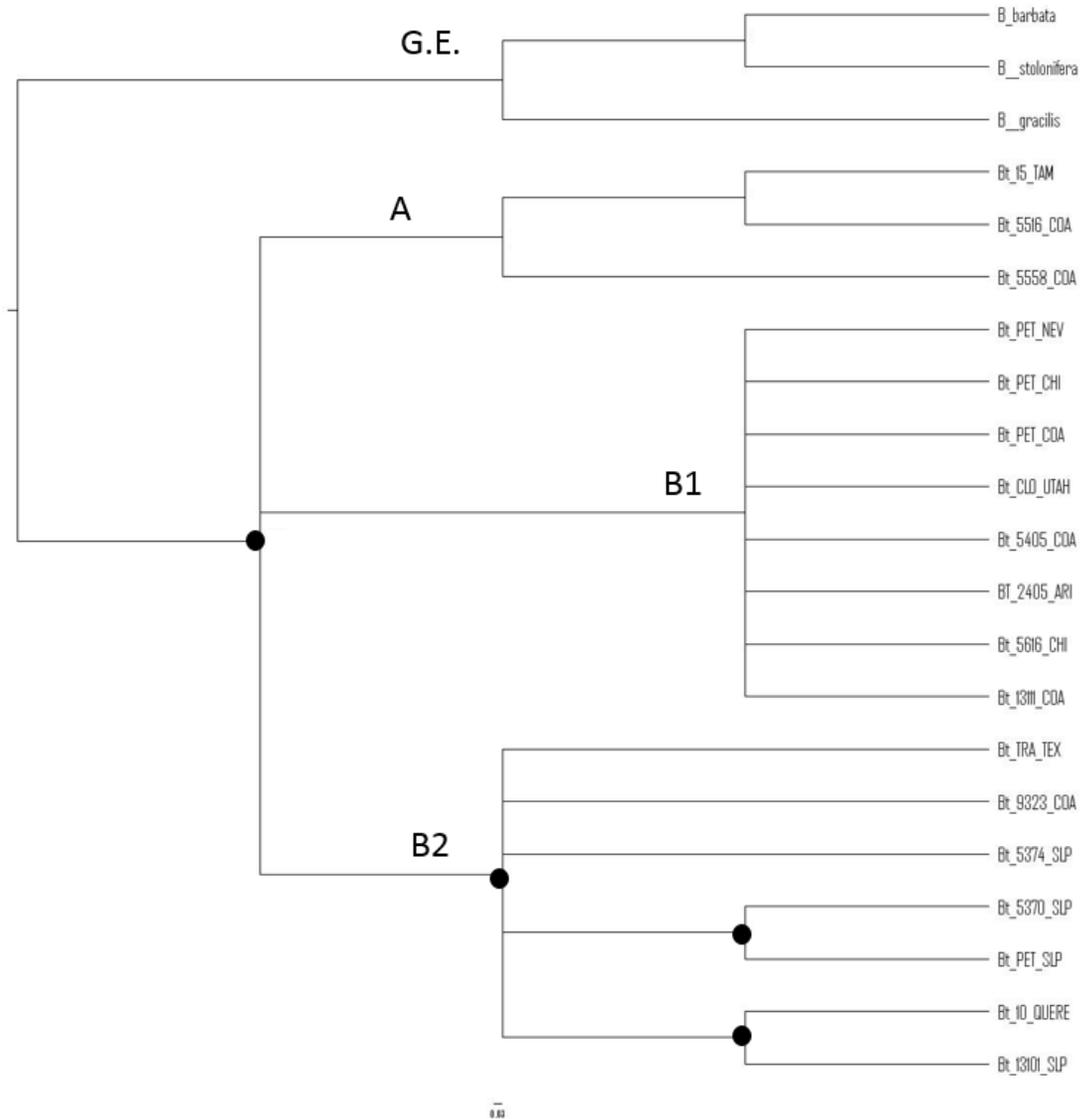


Figura 18. Inferencia obtenida mediante el método bayesiano con secuencias de *B. trifida* del marcado molecular ITS. Los círculos en las ramificaciones indican un valor de bootstrap mayor a 75 %. El clado G.E corresponde al grupo externo.

6.4.3 Matriz concatenada (*rpl32* – *trnL* – ITS).

6.4.3.1. Máxima Parsimonia.

La hipótesis obtenida del árbol consenso estricto del 50% de la matriz concatenada retuvo 100,000 árboles con una longitud de 192 pasos, con 813 caracteres parsimoniosamente no informativos, 59 caracteres parsimoniosamente informativos y con un índice de consistencia de 0.922, resuelve dos cladogramas bien soportados. El clado A (97% BS) contiene muestras del norte de México (15, 5558, 5516), este comparte ancestría con el clado B (100% BS) el cual está formado por dos subclados, B1 (50% BS) formado por muestras de Peterson et al., (2015) y B2 (53 %), y conteniendo individuos del norte de México y sur de EUA (13111, 2405, 5405, 5616), y del norte y centro de México (10, 5370, 9323, 5374) (Figura 19).

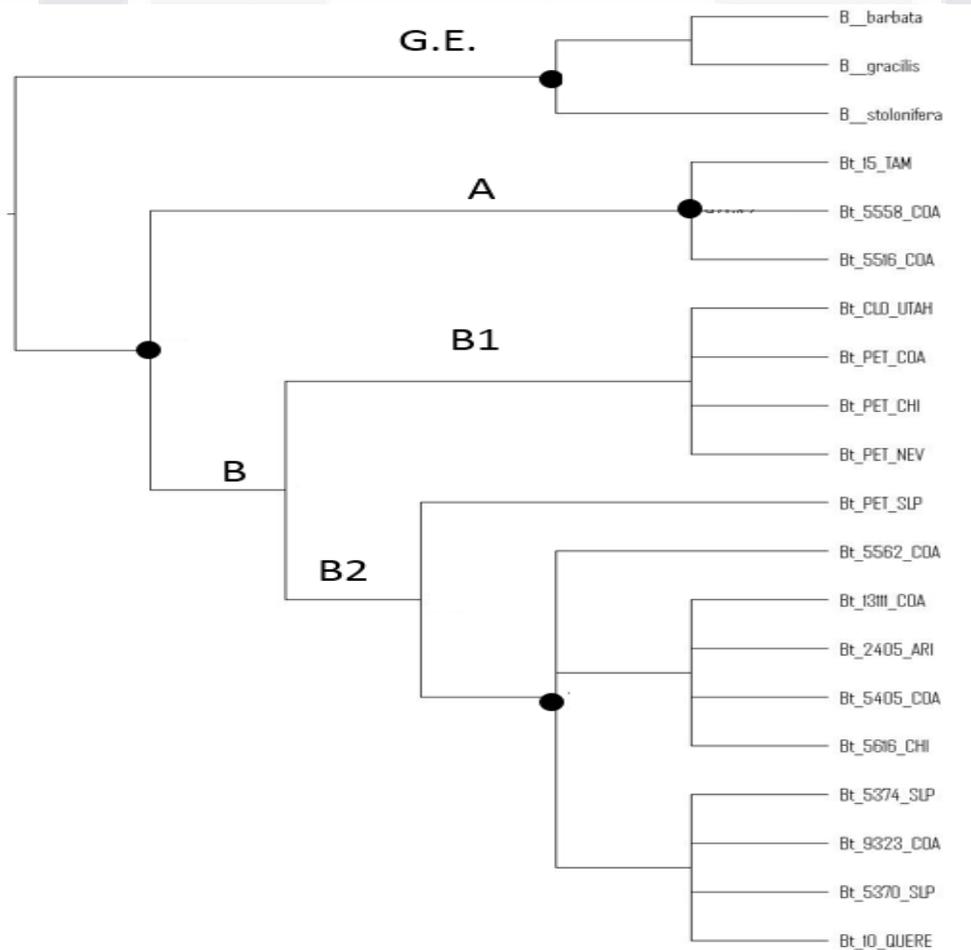


Figura 19. Inferencia obtenida mediante Máxima parsimonia con secuencias de *B. trifida* del marcado molecular ITS-*rpl32*- *trnL*. Los círculos en las ramificaciones indican un valor de bootstrap mayor a 80 %. El clado G.E corresponde al grupo externo.

6.4.3.2. Máxima Verosimilitud.

La hipótesis resuelve en 2 clados bien soportados, el clado A (99% BS) contiene muestras del norte de México (15, 5558, 5516), este clado comparte ancestro con el resto de las secuencias (100% BS), el clado B formado por un individuo de San Luis potosí de Peterson et al., (2015) (94% BS) y dos subclados (61%BS), B1 (66% BS) que está formado por las muestras de Peterson et al., (2015) y B2 (90% BS) que contiene subclado B3 (84% de BS) con las muestras del norte y centro de México.(Figura 20).

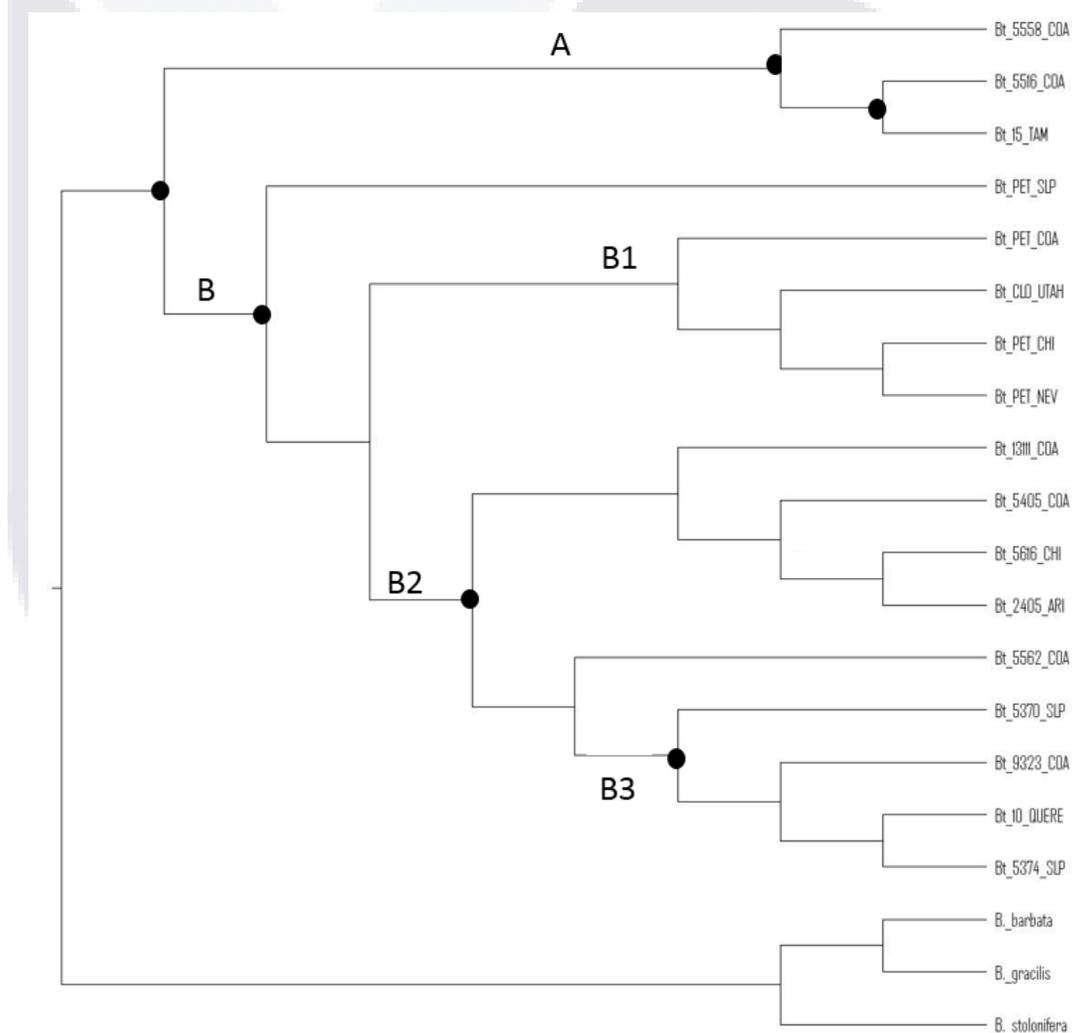


Figura 20.Inferencia obtenida mediante Máxima Verosimilitud con secuencias de *B. trifida* del marcado molecular ITS-*rpl32- trnL*.. Los círculos en las ramificaciones indican un valor de bootstrap mayor a 80 %. El clado G.E corresponde al grupo externo.

6.4.3.3 Inferencia filogenética: inferencia bayesiana.

La hipótesis resuelve 2 clados bien soportados, el clado A (100% BS) contiene muestras del norte de México (15, 5558, 5516), este clado comparte ancestro con el resto de las secuencias (100% BS), el clado B formado por un individuo de San Luis Potosí de Peterson et al., (2015) (100% BS) y dos subclados (100% BS), B1 que está formado por las muestras de Peterson et al., (2015) y B2 (100% BS) con las muestras del norte, centro de México y sur de Estados Unidos (Figura 21).

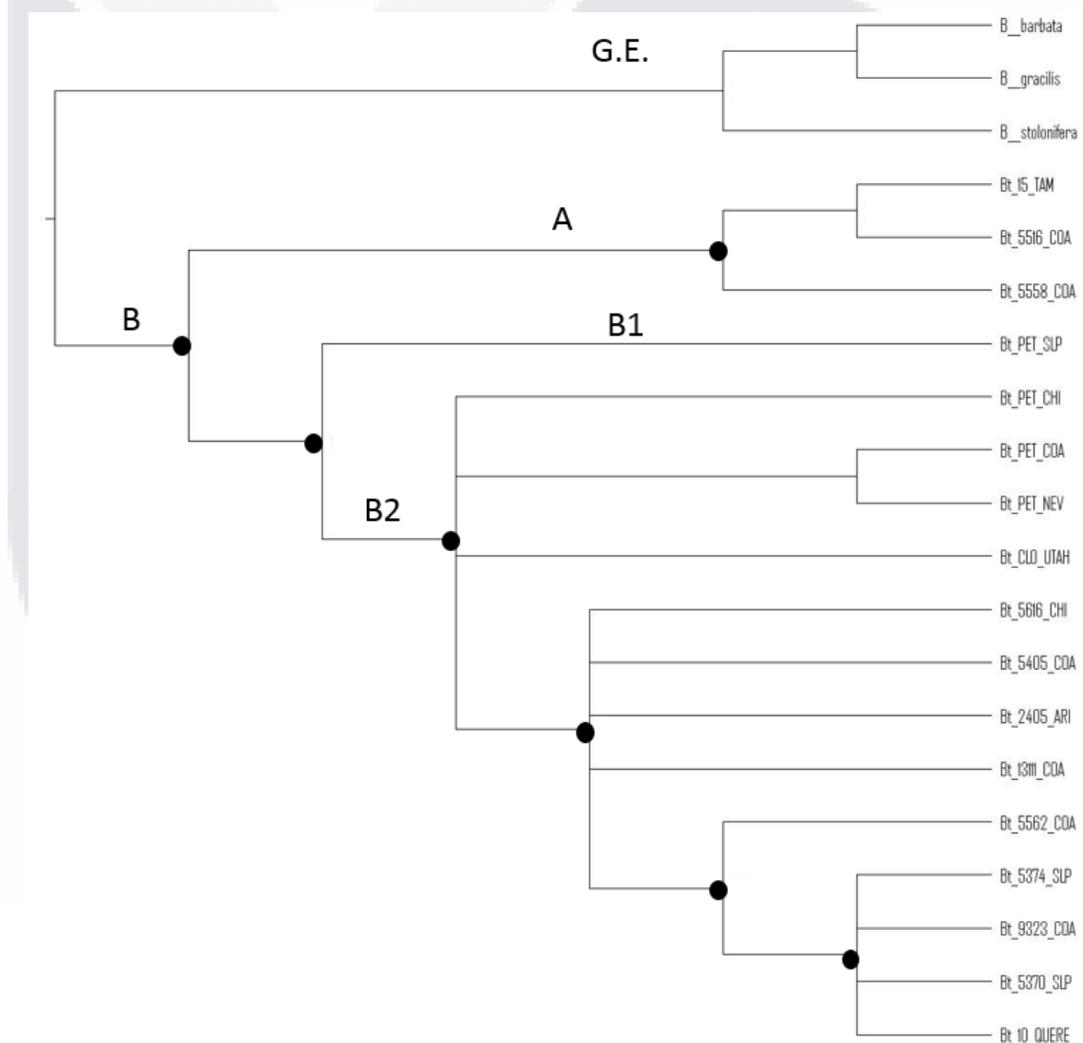


Figura 21. Inferencia obtenida mediante el método bayesiano con secuencias de *B. trifida* del marcado molecular ITS y *rp132-trnL*. Los círculos en las ramificaciones indican un valor de Bootstrap mayor a 80 %. El clado G.E corresponde al grupo externo.

6.5. Análisis comparativo morfológico-molecular.

Los grupos formado por ACP y la inferencia molecular no coinciden.

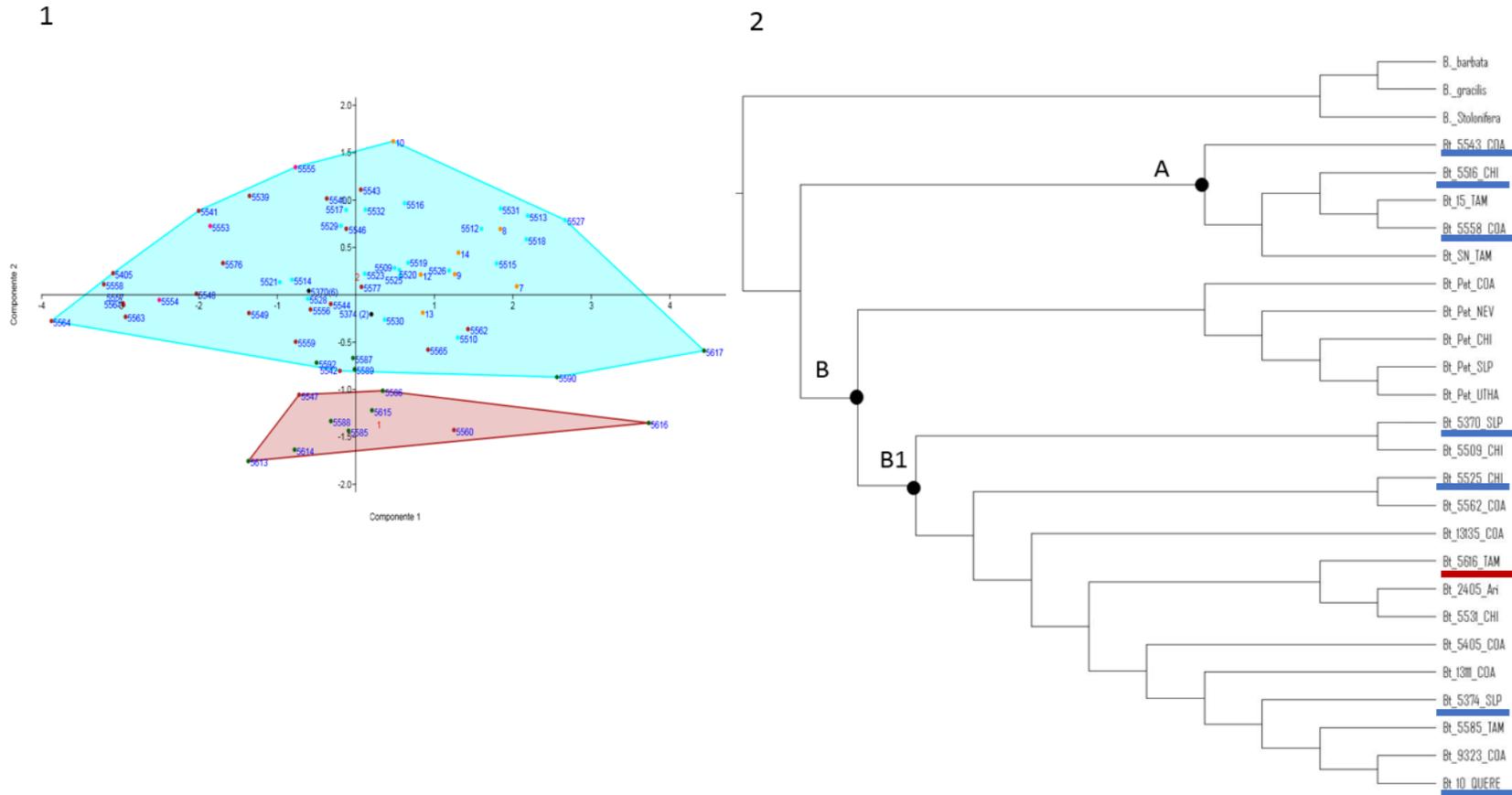


Figura 22. Individuos con una mayor pubescencia y menor pubescencia en la inferencia de Máxima verosimilitud del marcador *rpl32-trnL*. El punto en el clado indica un valor de bootstrap mayor al 80%.

6.6 Distribución potencial de la especie

El modelado de nicho ecológico arrojó que los estados de México que poseen las características ambientales para el crecimiento de *B. trifida* fueron Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila pues se obtuvo una alta probabilidad de encontrar a la especie en todo su territorio. Por otro lado, Sonora, Chihuahua, Guanajuato, San Luis Potosí, Veracruz y Zacatecas presentan algunas zonas con alta probabilidad de que la especie esté presente. En el caso de Estados Unidos de América seis estados presentan características aptas para la presencia de *B. trifida*: Texas, Arizona, California, Nevada, Utah y Nuevo México (Figura 23).

Los factores que más influyen en la proyección de la distribución de la especie fueron la estacionalidad de la precipitación y la precipitación del trimestre más frío ambos aportando el 51.5 % de la contribución del resultado (Cuadro 7). La curva ROC nos muestra que el área de la prueba realizada al 20% de los datos es de 0.940.

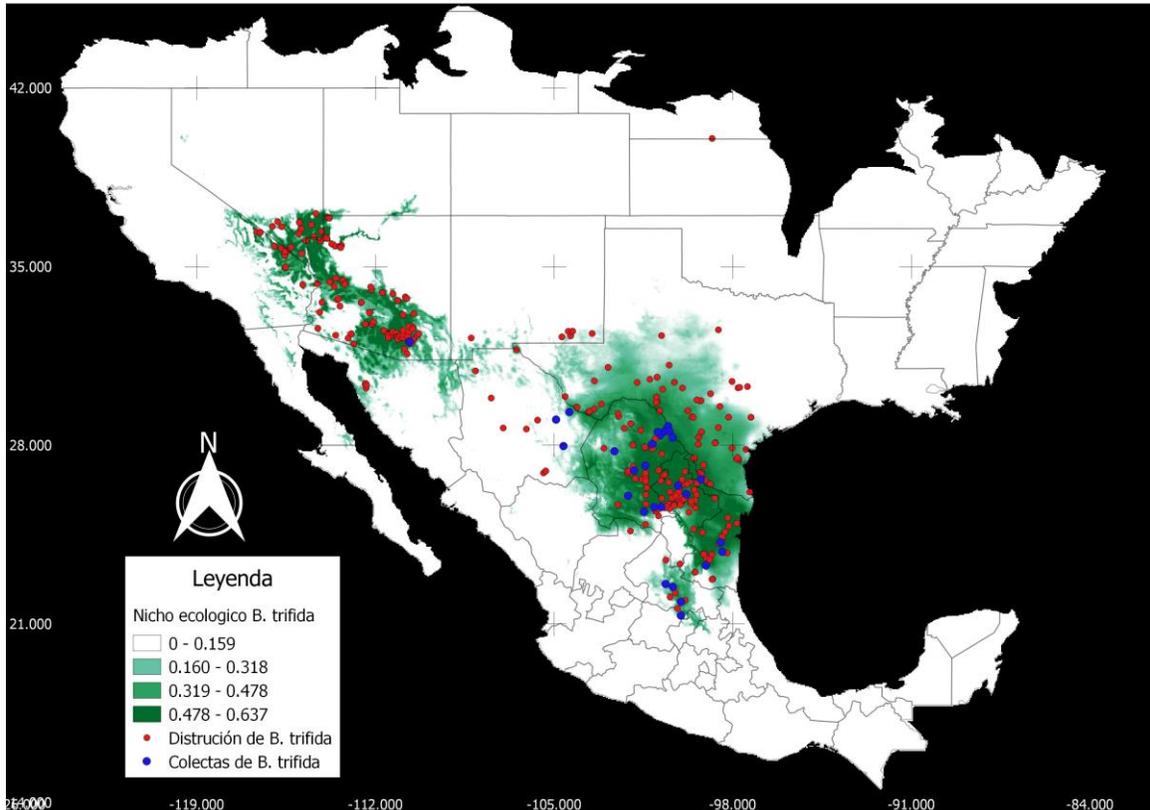


Figura 23. Proyección de la probabilidad de encontrar *Bouteloua trifida*. La mayor probabilidad está indicada con el color verde más intenso.

Las variables ambientales que más influyeron fueron la temperatura media del cuarto más frío (27%) la cual de acuerdo con los registros empleados, va de 3.64 a 19.49 °C, estacionalidad de la precipitación (24.5%) la cual de acuerdo con los registros empleados, va de 31.35 a 108.28 mm, temperatura estacional (7.7%) y la temperatura media del cuarto más húmedo (7%); estos cuatro factores ambientales explican el 66.2% de la contribución de la predicción de la distribución de *B. trifida*.

Las ecorregiones donde se distribuye la especie y el porcentaje que ocupa en cada una son: 21% del total de los reportes de *B. trifida* se encontraron en el Desierto de Sonora, en la Planicie del sur de Texas (20%), Desierto de Chihuahua (19%), la Cuenca de Mojave (13%), y las Montañas de Arizona y Nuevo México (4%). El archipiélago Madrense, las planicies de piedemonte con pastizales, la Sierra Madre Oriental, la planicie costera caducifolia tropical, la montaña y sierra caducifolia tropical, las planicies centrales del este de Texas, las grandes planicies

centrales y la planicie costera del golfo, representan el 23 % faltante del territorio donde se distribuye la especie.

7. Discusión

La primera colecta de *B. trifida* fue en el estado de Coahuila, Monclova, (México) en 1880 por Thurb, después fue colectada por Gould (1979) en Texas (1960), Nuevo León (1965) y Coahuila (1966). En Arizona y Texas por Columbus et al. (1998). De acuerdo con Herrera et al. (2010) hay colectas varias en tres estados de México: Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, todos ellos con varios registros en el estado. En las colectas realizadas para este proyecto se pudo corroborar la presencia de la especie en estos sitios, sin embargo, uno de los registros de *B. trifida* reportado por J. Agundez 6-4 (sin año) para Baja California Sur no pudo ser localizado a pesar de la exploración de campo realizada en el área. Además, se observó que el hábitat del área citada con coordenadas geográficas, no correspondía al hábitat típico de *B. trifida*, por lo que suponemos es un error de identificación.

Para esta especie resultaba muy importante analizar la morfología de las espiguillas dado que Vasey (1894) propone la existencia de dos variedades, las cuales se separan en base a la pubescencia de la lema, siendo únicamente posible su visualización mediante el uso de estereoscopios, haciendo difícil su identificación. Después de la revisión de los 67 ejemplares, se observó una diferencia en la pubescencia de toda la lema así como en su base, siendo este el carácter que separa las dos variedades, de acuerdo a Vasey (1894). No obstante, aunque la variedad *burkii* es la más pubescente, Vasey (1894) nunca especifica si la pubescencia de toda la lema o la pubescencia de la base es lo que separa las dos variedades.

Lo que se pudo observar durante el análisis morfométrico fue que determinar las diferencias en la cantidad de pubescencia puede resultar muy subjetiva pues no se reconocieron patrones claros, observando que algunos ejemplares presentan una mayor pubescencia en la base, otros en la lema o incluso se podía observar

una pubescencia muy parecida entre ambas. Estos problemas para definir variedades ya han sido reportados en otros grupos (Wallhousen, et al., 1951). Este es el caso de las variedades del maíz, donde se utilizan caracteres cuantitativos y cualitativos, uno de ellos es la presencia de estrías en la cara superior de los granos, conservado principalmente en los linajes más ancestrales, y en las más derivadas no suele presentarse en todas, debido al uso de estos caracteres reporta 7 distintas variedades que no están bien definidas. En el género *Bouteloua* se han reportados resultados similares, donde las variedades, basadas en caracteres morfológicos, descritas para el complejo *B. barbata* o *curtipendula*, no forman grupos naturales (Pacheco, 2018; Siqueiros 2013). Por otro lado, el uso de caracteres cualitativos para generar agrupaciones se ve sometida a errores principalmente proporcionado por el muestro de los individuos, al coleccionar (Henderson, 2006).

El análisis de componentes principales permite buscar relaciones entre una gran cantidad de datos morfométricos, obteniendo resultados sintetizados donde se pierde la menor cantidad de datos posible (Fuentes, 2011). Los resultados del ACP y las pruebas estadísticas permiten validar que existe variación en el carácter que usó Vasey (1894) para designar a las dos variedades.

El análisis de componentes principales nos permitió distinguir la separación de los grupos congruentes con las variedades. En la examinación morfológica de las muestras analizadas, se observó una diferencia en la pubescencia en la lema y de su base, así como en la coloración rojiza de la segunda gluma. Los resultados del ACP muestran dos polígonos completamente separados uno del otro, estadísticamente comprobables. El grupo A presenta pubescencia más abundante en la lema, y correspondería a la variedad *burkii*, mientras el grupo B presenta menor pubescencia y correspondería a la variedad *trifida* (Figura 10). Esto apoya la separación de las variedades sugerida por Vasey (1894). Así mismo, el análisis de correlación mostró que la coloración rojiza de la segunda gluma está asociada a una mayor pubescencia de la base de la lema y la lema en general y al tamaño de las plantas. También se obtuvo una correlación positiva entre el tamaño de la inflorescencia y el tamaño de la espiguilla. En cuanto a los factores ambientales

relacionados a los caracteres morfológicos, encontramos que existe una correlación positiva entre el color rojo de la segunda gluma con temperaturas extremas máximas (0.82) y mínimas (0.87), lo que sugiere que la coloración rojiza de alguna manera protege contra los extremos de temperatura. Así mismo la pubescencia de la lema también mostró estas correlaciones (0.85). El tamaño de la primera gluma es menor en temperaturas frías (0.92) y las aristas tienen un mayor tamaño cuando las temperaturas cálidas (0.80) son mayores. El tipo de suelo no mostró correlación con los caracteres morfológicos de la especie. A altitud por otro lado esta correlacionada con la pubescencia de la lema, Las muestras que presentaban una menor cantidad de pubescencia se encontraron en Tamaulipas, a alturas de 100 a 160 msnm, mientras que las que presentaron mayor pubescencia fueron muestras de Guanajuato y de Coahuila en donde la altitud es de 1121 y 1426 msnm respectivamente (Figura 10), la cantidad de radiación está relacionada con la altitud (Rivas et al., 2002; Korner, 2007), siendo mayor la radiación a mayor altitud, es así que en *B. trifida* la pubescencia de la lema, cuya función de la lema junto con la pálea es proteger a la flor y fruto de las gramíneas, y evitar la incidencia alta de luz ultravioleta para evitar que se produzcan mutaciones (Carrasco, 2009) que amenacen la reproducción.

Por otro lado, otro factor a tomar en cuenta en la variación intraespecífica de *B. trifida* es la plasticidad. Se sabe que las plantas modifican sus morfologías como estrategias para mitigar los factores ambientales que limitan su crecimiento, como los son las bajas temperaturas, alta radiación, corta estación de crecimiento o combinaciones de ellas. Una de las estrategias es desarrollar pubescencia, la cual evita la alteración de la actividad del fotosistema II gracias a su protección contra altas tasas de UV (Molina, 2008). Existe un reporte de que esto ocurre en las gramíneas (Lauter et al., 2004), el cual menciona que observo este fenómeno en dos sub especies de *Zea mays* (*Zea mays* ssp. *mexicana* y *Zea mays* ssp. *paraglumis*). *Zea mays* ssp. *mexicana* crece en altas elevaciones, tiene pubescencia y pigmentación roja en sus laminas foliares, crece en el centro de México, mientras que *Z. paraglumis* tiene laminas foliares verdes y glabras, crece en el noroeste de México. *Zea mexicana*, tiene adaptaciones para climas extremos, ya que los colores

obscuros favorecen la absorción de energía en climas fríos, el cual favorece el metabolismo de las plantas en la traslocación de energía (movimiento de electrones), y la pubescencia tiene dos posibles funciones, el evitar la pérdida de color y las pubescencias de color claro el reflejar la radiación UV (Molina, 2008). En el caso de *B. trifida* individuos colectados a la misma altitud tienen diferente cantidad de pubescencia de la lema, por ello es de suponer que otro factor ambiental está influyendo en el desarrollo de pubescencia y de color rojo en la lema, el cual podría ser la cantidad de radiación y el calor entre ellos.

La otra agrupación en base a las inferencias obtenidas (a excepción de Parsimonia de ITS) en ACP indicó que los componentes se vieron influenciados por la longitud de la espiga y el número de espiguillas, uniendo a los individuos con espigas más apesadas el clado B en un solo grupo, mientras que los individuos con espigas menos apesadas quedaron en el otro grupo (clado A) (Figura 11). Esto nos indica que morfológicamente los clados tienen caracteres en común, sin embargo, estadísticamente estos caracteres no son lo suficientemente diferentes como para soportar la agrupación

Durante el proceso experimental se presentaron varias dificultades en la amplificación de los marcadores. Con la enzima del Kit Jenna Bioscience se obtuvo un porcentaje de amplificación de 0% para el marcador ITS y de 80% para el *rpL32-trnL*. Con la enzima de Promega GO-taq no se obtuvo amplificación del marcador de *rpL32-trnL* y de ITS se logró amplificar 35% de las muestras. El mejor rendimiento se obtuvo con la enzima Phusion High-Fidelity ADN Polymerase® de Thermo Fisher con 90% de eficiencia de amplificación para ambos marcadores.

Las inferencias filogenéticas son una representación que muestra la relación ancestro descendiente con modificaciones. Los estudios sistemáticos normalmente incluyen uno o tres distintos métodos para realizar inferencias filogenéticas, quedando a decisión propia del investigador el usar los tres o uno (Peña, 2011), y si los tres resultados coinciden son considerados resultados más robustos (Martin et al., 2002). En este estudio se realizaron inferencias empleando tres métodos distintos con resultados parecidos, pero también contrastantes.

Los análisis filogenéticos demostraron que la especie es monofilética. Aunque esto ya había sido sugerido por otros análisis moleculares (Peterson 2015, Columbus et al. 1998, 2000), el número de taxa incluidos era muy reducido. En este estudio, con un mayor número de muestras (18 de ITS, 24 de *rpl32-trnL* y 17 de ITS-*rpl32-trnL*), pudimos comprobar la monofilia de la especie, sin embargo la separación de las variedades no es apoyada por ninguno de los análisis moleculares.

La inferencia presentada por Peterson et al (2015) incluyó siete secuencias de *B. trifida* empleando el método de máxima verosimilitud usando del marcador *rpl32-trnL* con el *rps16-trnK*, las muestras de San Luis Potosí (24645 y 24643) son las más tempranamente divergentes y son grupo hermano de otra muestra de San Luis Potosí; estas a su vez comparten ancestría con muestras del sur de EUA y el norte de México, estas últimas son el último clado en divergir de las demás. Mediante esta inferencia se puede suponer que el ancestro primitivo de *B. trifida* estuvo en San Luis Potosí y que de ahí empezó la diversificación hacia el norte de México y a EUA. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro análisis con el marcador *rpl-32-trnL* muestran que el primer grupo en divergir contiene muestras del norte de México (Chihuahua, 2 de Coahuila y 1 de Tamaulipas). En el siguiente clado se agrupan las muestras de Peterson y en el último clado en divergir se agrupan las muestras de todo el sur de EUA, norte y centro de México, este agrupamiento se repite en las inferencias obtenidas por los tres métodos de reconstrucción utilizados en los dos marcadores analizados (Figura 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20 y 21). Es así que nuestros resultados muestran que el origen de *B. trifida* se encuentra en el norte de México y que de ahí se desplazó hacia el sur de Estados Unidos y al centro de México.

Es bien conocida la creencia de que el centro de origen y diversificación de las especies de *Bouteloua* ocurrió en los pastizales abiertos del norte de México (Beard, 2012; Rzedowski, 1975) y en este caso, los resultados coinciden. Además, algunos estudios han mencionado que, durante el pleistoceno, debido a las bajas temperaturas se perdieron grandes extensiones de pastizales en el norte del continente americano (Canadá y norte de EUA) desplazando al sur de su

distribución, a las especies que ahí se encontraban, lo que podría explicar la distribución de *B. trifida* en el sur de EUA y en el norte de México.

Las inferencias obtenidas mediante ITS nos muestran que el centro de origen es en el norte de México, lo mismo que nos mostró las inferencias del fragmento *rpl32 - trnL*. Los resultados obtenidos con ITS con el método de MP no muestra resolución, sin embargo, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana recobran dos clados bien soportados, al igual que en los demás análisis. La diferencia entre las dos inferencias radica en el soporte de los clados, siendo mayor en la inferencia de máxima verosimilitud.

En la inferencia obtenida por parsimonia se obtuvo una topología diferente y menos soportada, aunque la mayor diferencia se encuentra en la muestra 5616 de Chihuahua que comparte ancestro con todas las demás muestras del clado, mientras que, en las otras inferencias, esta muestra se encuentra en clados de más reciente diversificación. Esta variación en topología se puede atribuir a que el método de máxima parsimonia, la cual se encuentra sometida a un error llamado atracción de las ramas largas. Felsenstein (1978) menciona que estos errores hacen que el árbol refleje relaciones falsas cuando la cantidad de caracteres homoplásicos abruma a los caracteres homólogos. Bergsten (2005), realiza un largo listado en inferencias donde se presume ha ocurrido este tipo de error, el cual se ha observado en inferencias de semillas de plantas (Sanderson et al., 2000), de angiospermas (Qui et al., 2001; Soltis et al., 2004), en ARN ribosomal de eucariotes (Philippe et al., 2000), acariformes (Dabert et al., 2000). –

Los resultados obtenidos del fragmento de *rpl32- trnL*, ITS e ITS-*rpl32-trnL* coinciden con los resultados de la matriz concatenada de Peterson et al (2015), ya que los resultados moleculares no soportan la separación de las variedades tomando como caracter la pubescencia en la lema.

La inferencia de ITS, de *rpl-32- trnL* y ITS-*rpl32-trnL* (sin incluir máxima parsimonia de ITS), el clado A parte del norte de México (Tamaulipas, Coahuila y Chihuahua), el clado B incluye individuos del norte de México también y el sur de Estados Unidos, y el ultimo subclado contiene individuos del centro y del norte de

México (Coahuila, San Luis Potosí, y Guanajuato). Peterson et al., (2015) menciona que no existe soporte molecular para las variedades propuestas por Vasey (1894) empleando los marcadores *rpl32-trnL* concatenado con *rps16-trnK*. En este estudio los resultados del marcador *rpl32-trnL*, ITS e ITS-*rpl32-trnL* muestran el mismo resultado que Peterson et al, (2015) al no dar soporte a las variedades propuestas por Vasey (1894) (Figura 22), coincidiendo también con el ACP, lo anterior puede deberse a que los caracteres morfométricos se encuentran sometidos a homoplasias (Martínez, et al., 2007).

Tajima et al (1984) menciona que los cambios evolutivos en el DNA ocurren mediante la sustitución, delección o inserción de nucleótidos. El fenómeno de duplicación ha sido ampliamente observado en organismos eucariotas, cuya función final está asociada a la producción de nuevos fragmentos, los cuales dan ventajas a los organismos ante factores diversos de estrés (Kaesman et al., 2010). Un posible origen de la duplicación de genes son los transposones, los cuales están muy relacionados con los procesos de especiación (Malone et al., 2009), este fenómeno ha sido observado principalmente en pequeñas regiones no codificantes (Kaesman et al., 2010). Todo lo anterior se observó en algunos fragmentos de los marcadores empleados. La matriz concatenada (ITS-*rpl32-trnL*) muestra una duplicación del motivo AATATG en la posición 463-468 (correspondiente al fragmento de *rpl32-trnL*), lo que podría indicar que el clado B y sus respectivos sub clados (B1 y B2) están en proceso de especiación, del clado A en la inferencia de MV, Parsimonia (sin ITS) y Bayesiano. También en el fragmento de *rpl32-trnL* se presentaron dos transversiones en posición 694 de G (clado A) a C (clado B, B1 y B2). En cuanto al fragmento de ITS se detectaron transiciones en la posición 44 de C (clado A) a T (clado B, B1 y B2). Actualmente se sabe que las transversiones ocurren con menor frecuencia que las transiciones (Sidall et al., 1999), y que la tasa evolutiva en secuencias de núcleo es mayor que la de cloroplasto (Eguiarte, 2003).

Predecir la distribución potencial de una especie presenta varios retos, ya que muchos factores determinan dicha distribución, siendo los factores limitantes más importantes los abióticos, especies que influyen directamente en su distribución

(mutualismos y depredación) (Narayani et al., 2011), otros autores incluyen factores como la capacidad evolutiva que tienen las especies y la posibilidad de dispersarse a zonas cercanas (Peterson T., 2003). Para el modelado de *B. trifida* se utilizaron solo datos climatológicos, específicamente solo se consideraron datos de temperatura y precipitación. Los valores del área bajo la curva supera el 0.9, este valor nos indica que el desempeño del modelo para clasificar la presencia fue muy preciso.

La distribución potencial de la especie se encontró fraccionada (el estado de Chihuahua no se encuentra en la distribución potencial), quedando en el sur este de Estados Unidos y noreste de México y parte de Texas sur (Figura 23) como la zona donde existe una mayor probabilidad de encontrar a *B. trifida*.

Una de las variables ambientales que más influye en la distribución de *B. trifida* es la precipitación interanual estable (24.5%). Granado et al. (2010) menciona que la “precipitación media anual varía de 175 mm en los valles de Coahuila, hasta 300-400 mm en las montañas localizadas en los límites occidental y sur, entre el 65 al 80% de lluvia cae entre junio y septiembre, con una ligera precipitación en octubre a diciembre, en los meses de enero a mayo el área es muy seca”. Debido a estas épocas prolongadas de poca precipitación, esta zona no representa un buen hábitat para la especie y las probabilidades de encontrarla son bajas. La necesidad de la planta por recibir agua de manera constante puede explicarse debido a que el género *Bouteloua* posee metabolismo C4 (Gould, 1979; Hattersley et al., 1981), el cual a diferencia del metabolismo CAM mantiene sus estomas abiertos durante el día, lo que favorece la pérdida de agua, sin embargo, este tipo de metabolismo permite una menor pérdida a diferencia del metabolismo C3, permitiéndole crecer en zonas áridas (Olmedilla et al., 2010). A pesar de que la distribución potencial no predice que la especie se distribuya en Chihuahua, se encontraron reportes en el estado (Herrera et al., 2004). Esto se puede deber tal vez a la sobre-representación de puntos en las zonas con mayores registros de presencia real de la especie, que contribuyo, aunque el modelo no predijera la presencia en chihuahua por tener pocos registros, o a que realmente este estado cuenta con características que no

favorecen la distribución de la especie. Aunque en el modelo no se incluyeron aspectos como el sobre pastoreo y la invasión de los arbustos en el estado (Desmond et al., 2006).



8. Conclusiones

- La variación morfológica de la especie es poca, las diferencias se encuentran principalmente en la pubescencia de la lema, y también se observaron diferencias en el tamaño de espigas en relación con el número de espiguillas.
- La diferencia de pubescencia de la lema entre las muestras analizadas morfológicamente fue soportada estadísticamente, sin embargo no se relacionan con los grupos obtenidos en la filogenia molecular.
- Las variedades de *B. trifida* en México, no tienen soporte molecular.
- Las inferencias filogenéticas sugieren que las muestras más ancestrales se encuentran en el norte de México.
- El hábitat de *B. trifida* está determinado por la temperatura media del cuarto más frío y por la estacionalidad de la precipitación.
- Existe la duda si la distribución potencial se ve únicamente afectada por factores climáticos, o también por los factores bióticos tales como el sobrepastoreo. Quedando para futuras investigaciones examinar el papel de *B trifida*. en esta región.

9. Anexos

Cuadro 7. Contribución de cada variable ambiental.

	Variable	Porcentaje de contribución	Importancia de permutación
C "Ambientales"	Temperatura media del cuarto más frío.	27	17.4
	Estacionalidad de la precipitación (Coeficiente de variación).	24.5	8.3
	Temperatura estacional.	7.7	1.3
	Temperatura media del cuarto más húmedo.	7	1
	Precipitación del mes más seco	6.6	5.5
	Temperatura media del cuarto más seco	5.8	2.4
	Precipitación del cuarto más húmedo	4.5	0.7
	Rango diurno medio	3.4	2.9
	Temperatura media anual	2.9	1.6
	Rango anual de temperatura	2.5	0.2
	Precipitación del cuarto más frío	2.1	2.3
	Temperatura mínima del mes más frío	1.9	7
	Precipitación del cuarto más cálido	1	1.2
	Precipitación del cuarto más seco	0.7	39.3
	Temperatura media del cuarto más cálido	0.7	1.1
	Isotermia	0.6	5.2
	Precipitación anual	0.6	0
	Precipitación del mes húmedo	0.5	2.5
	Temperatura máxima del mes más cálido	0	0.1

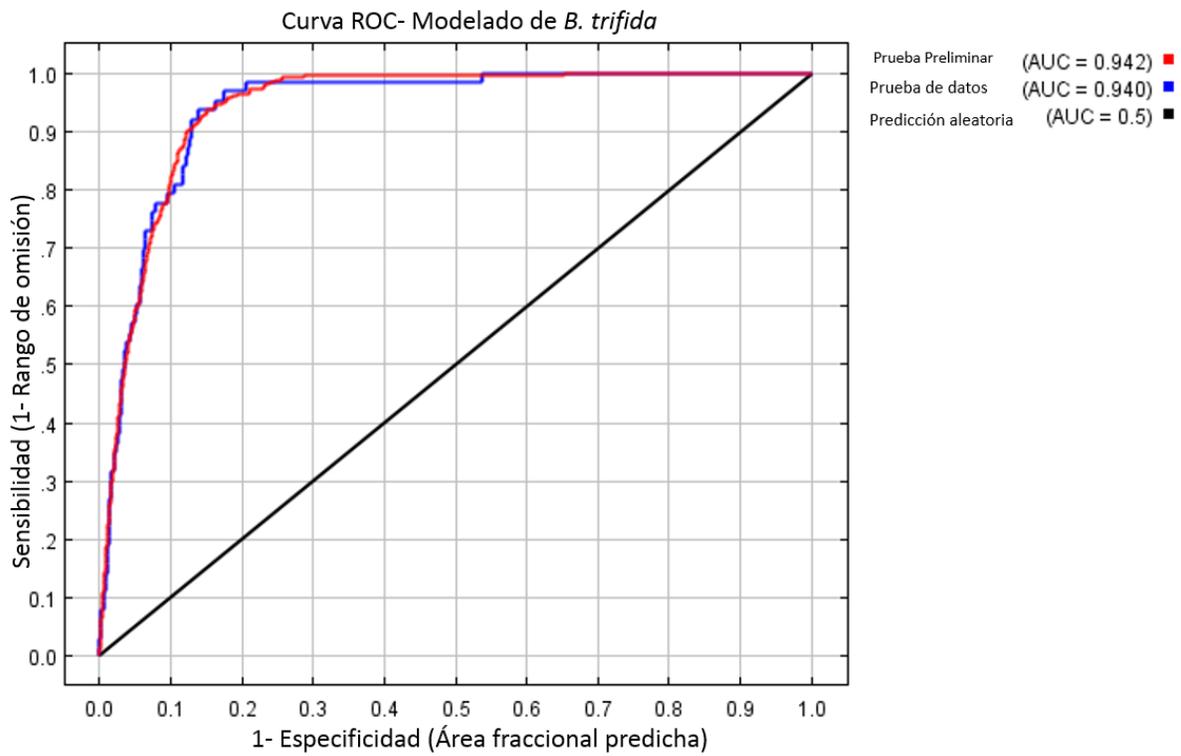


Figura 24. Curva ROC del modelado de *B. trifida*.



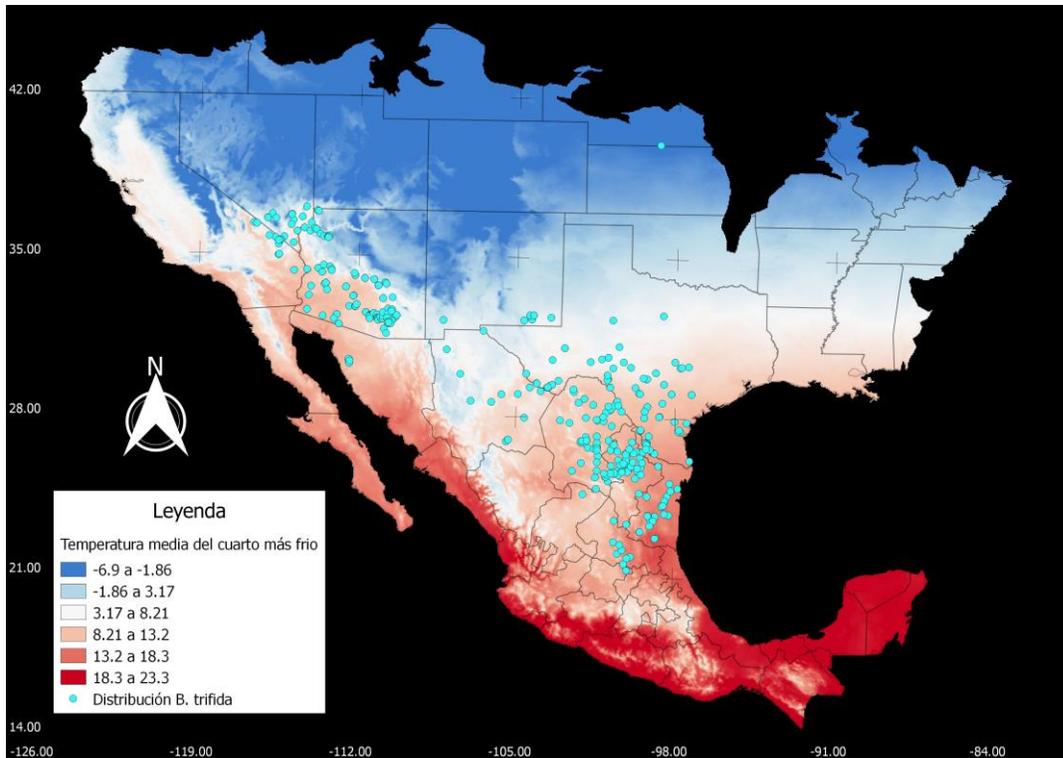


Figura 25. Temperatura media del cuarto más frío en las colectas de *B. trifida*.

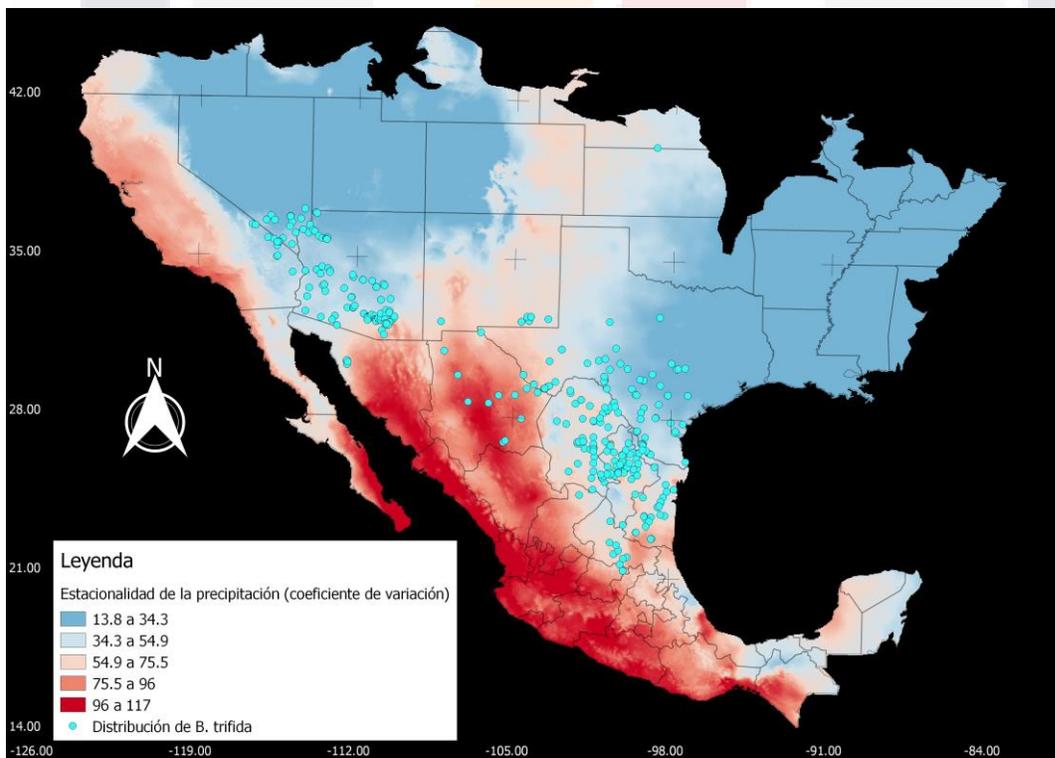
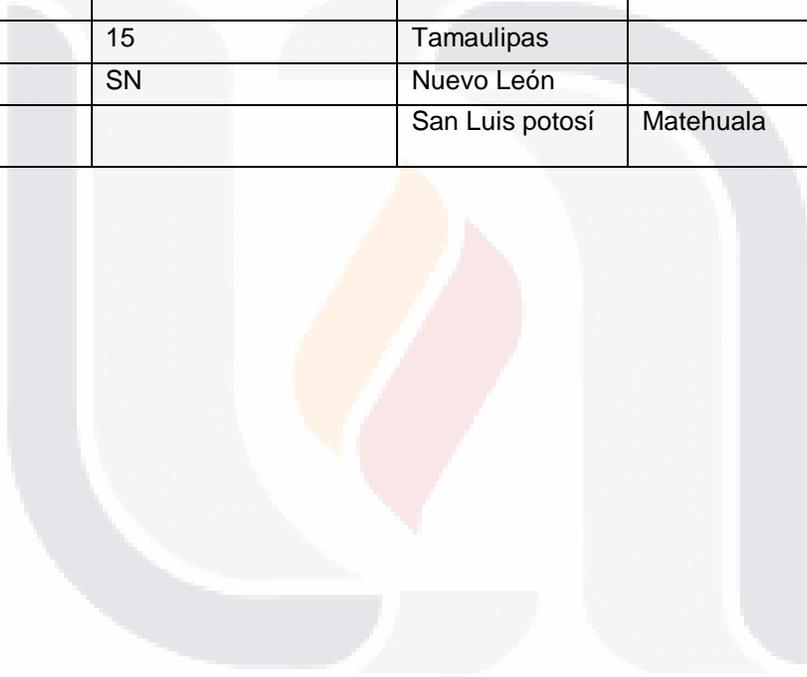


Figura 26. Estacionalidad de la precipitación en las colectas de *B. trifida*.

Cuadro 8. Muestras usadas en inferencias moleculares

Autor	Numero de acceso Gen bank ITS	Numero de acceso Gen bank <i>rpl32-trnL</i>	Estado	Localidad	Longitud	Latitud
Columbus, J.T.	EF153027		Texas			
Peterson,P.M	KR184964	KR185139	Utah			
Peterson,P.M	KR184963	KR185138	Nevada			
Peterson,P.M	KR184969	KR185144	Chihuahua			
Peterson,P.M	KR184968	KR185143	San Luis potosí			
Peterson,P.M	KR184965	KR185140	Coahuila			
	X	5516	Chihuahua	Potreros del llano	29° 18' 01."6 N	104° 24' 28.4" O
	X	5558	Coahuila	Sabinas Piedras Negras	28° 03' 04.2" N	101° 09' 16.3" O
	-	5543	Coahuila	Cuatro Ciénegas	27° 0' 24.3" N	101° 52' 24.8" O
	X	2405	Arizona		32° 03' 17" N	110° 39' 23" O
	X	5405	Coahuila	General Cepeda	23° 52' 40.1"N	103° 05' 31.6" O
	X	5370	San Luis potosí	El paradero	21° 51' 45.1"N	100° 1' 48.8" O
	X	10	Guanajuato	Xichu	21 ° 19 ' 34" N	100° 2' 5" O
	X	5374	San Luis potosí	El cerrito	22° 26' 57"N	100° 20' 52.2" O
		5525	Chihuahua	Manuel Benavides	27° 58' 05.1" N	104° 38' 10.1" O
		5562	Coahuila	Rancho el Fenix	28° 32' 34.1" N	100° 40' 39.5" O
		5585	Tamaulipas	Montecarlos	26° 24' 43.7" N	100° 08' 37 " O
		5531	Coahuila	Allende	27° 58' 05.1" N	104° 38' 10.1" O

		5509	Chihuahua	Placer de Guadalupe	29° 00' 18.5" N	104° 55' 31.9" O
X		5616	Tamaulipas	Soto la marina Cd victoria	23° 49' 32.2" N	98° 24' 44.9" O
X		9323	Coahuila	El cedral		
		13135	Coahuila	Monclova		
X		13111	Coahuila	Ramos Arizpe	22° 35' 0" N	100° 47' 49" O
X		15	Tamaulipas			
		SN	Nuevo León			
	13101		San Luis potosí	Matehuala	22° 33' 48" N	100° 37' 56" O



Cuadro9: Muestras utilizadas en el análisis morfométrico.

Colector	Numero de colecta	País	Estado	Localidad	Longitud	Latitud
María Elena Siqueiros	5513-5509	México	Chihuahua	Placer de Guadalupe	29° 00' 18.5" N	104° 55' 31.9" O
	5518-5514			Potreros del llano	29° 18' 01.6" N	104° 24' 28.4" O
	5528-5519			Lajitas	29° 08' 18.8" N	103° 55' 39.2" O
	5532-5529			Manuel Benavides	27° 58' 05.1" N	104° 38' 10.1" O
	5549-5539		Coahuila	Cuatro Ciénegas	27° 0' 24.3" N	101° 52' 24.8" O
	5558-5556			Sabinas Piedras Negras	28° 03' 04.2" N	101° 09' 16.3" O
	5560-5559			Allende Piedras Negras	28° 24' 20.11" N	100° 49' 43.2" O
	5563-5561			Rancho el Fénix	28° 32' 34.1" N	100° 40' 39.5" O
	5565-5564			Piedras negras	28° 44' 42.8" N	100° 32' 10.8" O
	5577-5576			Rancho Cinegético	28° 18' 16.5" N	100° 21' 14.8" O
	5555-5553			Nuevo León	Escobedo Abasolo	27° 12' 05.2" N
	5592-5585		Tamaulipas	Montecarlos	26° 24' 43.7" N	100° 08' 37 " O
	5614-5613			Santander Jiménez	24° 11' 46.8" N	98° 28' 22.6" O
	5617-5616			Soto la marina Cd victoria	23° 49' 32.2" N	98° 24' 44.9" O
	Guillermo Cabral/ Mariana Muñoz		7 a 14		Guanajuato	Xichu
María Elena Siqueiros	5370(6)		San Luis potosí	El paradero	21° 51' 45.1"N	100° 1' 48.8" O
	5374 (2)			El cerrito	22° 26' 57"N	100° 20' 52.2" O
	5405		Coahuila	General Cepeda	23° 52' 40.1"N	103° 05' 31.6" O

10. Bibliografía

1. Aguilar Bultet L., Falquet L. (2015). Secuenciación y ensamblaje de *novu* de genomas bacterianos para el estudio de nuevos patógenos. Salud animal. Volumen 32 No. 2. Pag 125-132.
2. Álvarez I., Wendel J.F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. ELSEVIER. Molecular Phylogenetics and evolution. Vol 29. Pág. 417- 434
3. Anderson M.J. (2001). A new method for non parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecology. 26:32-46.
4. Anderson R. (2006). Evolution and origin of the central grassland of north America: climate fire and mammalian grazers. The journal of the torrey botanic society. 133 (4): 626-647.
5. Baldauf S. (2013). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. Department of biology, University of York. 19,6:345- 351.
6. Barkworth, M.E., K.M. Capels, S. Long & M.B. Piep. (2003). Magnoliophyta: Commelinidae (in part): Poaceae, part 2. Fl. N. Amer. 25: i–xxv, 1–783.
7. Barve, N., Barve, V., Jiménez-Valverde, A., Lira-Noriega, A., Maher, S. P., Peterson, A. T., ... & Villalobos, F. (2011). The crucial role of the accessible area in ecological niche modeling and species distribution modeling. Ecological Modelling, 222(11), 1810-1819.
8. Behjati S., Tarpey P. (2013). What is next generation sequencing?. Department of paediatrics. University of Cambridge. Cambridge, UK. Vol 98. Pág. 236-238.
9. Berga A. (1988). Escuelas actuales de taxonomía biológica. UIB. Taula. Núm. 9. Pag 132.
10. Bergsten, J. (2005). A review of long-branch attraction. Cladistics, 21(2), 163-193.
11. Bergsten, J. (2005). A review of long-branch attraction. Cladistics, 21(2), 163-193.
12. Bermeo-Antury E, Quimbaya M. (2016). Secuenciación de próxima generación y su contexto eugenésico en el embrión humano. pers.bioét.;20(2): pp. 205-231.
13. Brian K. Hall. (2005). Homoplasy and homology: Dichtomy or continuum. Science Direct. Journal of human evolution 52:473-479.
14. Cárdenas Paredes, J. M. (2015). Análisis de linajes uniparentales en población Boliviana.
15. Carrasco-Ríos, Libertad. (2009). EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA-B EN PLANTAS. Idesia (Arica), 27(3), 59-76.
16. Collada, C., Jimenez, P., & Gil, L. (2001). Análisis de la variabilidad de ADN de cloroplastos en. Quercus ilex, 257-262.
17. Colombo, N. (2008). Caracterización molecular de mutantes derivadas del genotipo mutador de cloroplastos de cebada (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).
18. Columbus T. (1999). An expander circumscription of *Bouteloua* (Gramineae : Chloridoideae): New combinations and names. Aliso. The rancho Santa Ana Botanic Garden. Claremont. 18(1), pp. 61- 65.
19. Columbus T. Kinney M., Siqueiros M., Porter M. (2000). Phylogenetics of *Bouteloua* and relatives (gramineae: Chloridoideae): cladistics Parsimony Analysis of internal Transcribed Spacer (*nrADN*) and TRN L-F (*cpADN* sequences). Grasses systematics and evolution. Rancho Santa Ana Botanic Garden. Claremont. pp.189-195.
20. Columbus T., Cerros-Tlatilpa R., Kinney M., Siqueiros-Delgado M., Hester L., Bell M., Griffith P., Refulio-Rodríguez N. (2007). Phylogenetics of chloridoideae (Gramineae): Preliminary study based on nuclear ribosomal internal transcriber spacer and chloroplast *trn* L-F sequences. Aliso. Rancho Santa Ana Botanic Garden. Claremont. 23, pp.565 - 579.
21. Columbus T., Kinney M., Pant R., Siqueiros M. (1998). Cladistic parsimony analysis of internal transcribed spacer region (*nrADN*) sequences of *Bouteloua* and relative (Gramineae: Chloridoideae). The rancho Santa Ana Botanic Garden. Claremont. 17(2), pp.99-130.

22. Columbus T., Peterson P., Refulio N., Cerros R., Kinney M. (2010). Phylogenetics of Muhlenbergiinae (Poaceae: Chloridoideae, Cynodonteae) Based on ITS and trn L-F ADN sequences. Diversity, phylogeny, and evolutions in the monocotyledons. Aarhus university press. Rancho Santa Ana Botanic Garden. Claremont. pp. 477-495
23. Cuéllar Garrido, L. F. (2016). Filogenia del complejo *Bouteloua annua*-*Bouteloua Aristoides* basado en datos moleculares y micromorfología de hoja (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes
24. Dabert, M., Witalinski, W., Kazmierski, A., Olszanowski, Z., & Dabert, J. (2010). Molecular phylogeny of acariform mites (Acari, Arachnida): strong conflict between phylogenetic signal and long-branch attraction artifacts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 222-241.
25. De la Maza Elvira, R., De la Maza Hernández R. y R Pedraza Ruíz. (2001). Inventario de los ropaloceros (Lepidoptera) de la Sierra Gorda, estado de Querétaro, México. Grupo Ecológico Sierra Gorda IAP. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. Q030. México, D.F.
26. Desert, C. (2006). Status and Distribution of Chihuahuan Desert Grasslands in the United States and Mexico. In *Grasslands Ecosystems, Endangered Species, and Sustainable Ranching in the Mexico-US Borderlands: Conference Proceedings Ecosistemas de Pastizales, Especies en* (p. 17)
27. Desmond, M., Montoya, J. A., Basurto, X., & Hadley, D. (2006). Status and distribution of Chihuahuan Desert grasslands in the United States and Mexico. In *Grasslands Ecosystems, Endangered Species, and Sustainable Ranching in the Mexico-US borderlands. Conference Proceedings, RMRS-P-40*. In U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fort Collins, CO (pp. 17-25).
28. Dinerstein, E., Olson, D., Atchley, J., Loucks, C., Contreras-Balderas, S., Abell, R., ... & Castilleja, G. (2000). Ecoregion-based conservation in the Chihuahuan Desert: A biological assessment. World Wildlife Fund and others.
29. Eguiarte, L. E., Castillo, A., & Souza, V. (2003). Evolución molecular y genómica en angiospermas. *Interciencia*, 28(3), 141-147
30. Felsenstein, J., & Felsenstein, J. (2004). *Inferring phylogenies* (Vol. 2). Sunderland, MA: Sinauer associates.
31. Fick, S.E. and R.J. Hijmans, 2017. Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*.
32. Fitch W. (2000). Homology a personal view on some of the problems. *Reviews EISevier. Department of ecology and evolutionary biology, university of California*. Vol 16, numero 5. 227- 231.
33. Friendlander T.P., Regier J.C., Mitter C. (1994). Phylogenetic information content of five gene sequence in animals: initial assessment of character sets from concordance and divergence studies. *Syst Biol* 43: 511-525.
34. Fuente F. (2011). Componentes principales. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de ciencias económicas y empresariales (UAM). Pag 1.
35. García Martínez, G. C., Ciari, G., Gaitan, J., Caruso, C., Nagahama, N., Opazo, W., ... & Escobar, J. (2017). Análisis de la evolución del clima y los pastizales naturales en el noroeste de la provincia de Chubut, Argentina, durante el período 2000-2014: identificación de variables asociadas a la disminución de las existencias ganaderas en la región. *Agriscientia*, 34(1), 59-69.
36. Goldman, N. (1990). Maximum likelihood inference of phylogenetic trees, with special reference to a Poisson process model of DNA substitution and to parsimony analyses. *Systematic Zoology*, 39(4), 345-361.
37. Gould W. F. (1979). The genus *Bouteloua* (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 66, pp. 333-416.
38. Granados-Sánchez, D., Sánchez-González, A., Victorino, G., Linnx, R., & Borja de la Rosa, A. (2011). Ecología de la vegetación del Desierto Chihuahuense. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 17(SPE), 111-130.

39. Grass Manual on the web. <http://herbarium.usu.edu/webmanual/>. Visitado por ultima vez 05/05/2017.
40. Gutiérrez L., Amador R., Velásquez V., Flores O. (2009). Determinación de la carga animal en el pastizal mediano abierto de zacatecas, México. VI simposio internacional de pastizales. Universidad Autónoma de Nuevo León. Instituto tecnológico de estudios superiores de Monterrey.
41. Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
42. Hattersley, P. W. and A. J. Browning. 1981. Occurrence of the suberized lamella in leaves of grasses of different photosynthetic types. I. In parenchymatous bundle sheaths and PCR ("Kranz") sheaths. *Protoplasma* 109: 371-401.
43. Hernandez, X., & Alanis, F. (1970). Morphological study of five new races of maize from the Sierra Madre Occidental in Mexico; phylogenetic and phytogeographical implications. *Agrociencia*, 5(1), 3-30.
44. Herrera Arrieta Y., P.M. Peterson, M.E. de la Cerda Lemus. (2004). Revisión de *Bouteloua* (Poaceae). IPN-CONABIO.
45. Herrera Cedano F., Villanueva J., Gonzales A., Silva M. y Rubio V. (2009). Distribución de recursos genéticos forrajeros nativos del pacifico centro de México. VI Simposio internacional de Pastizales. Universidad Autónoma de Nuevo León.
46. Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66(4), 411–453. doi:10.1086/417338
47. Hug A., Baker B., Anantharaman K., Brown C., Probst A., Castelle C., Butterfield C., Hemsdorf A., Amano Y., Ise., K., Suzuki Y., Dudek N., Relman D., Finstad K., Amudson R., Thomas B., Banfield J. (2016). A new view of tree of life. *Nature microbiology*. Vol 1.
48. Hughes M., Peng Cl. Lin CW., Rubite RR., Blanc P. Chung KF. (2018). Chloroplasto an nuclear ADN exchanges among *Begonia* sect. *Baryandra* species (Begoniaceae) from palawan Island, Philippines, and descriptions of five new species. *PLoS ONE* 13(5): e0194877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194877>.
49. Instituto Nacional de Estadística y Geografía "INEGI" (2015). Estadística de sacrificio de ganado en rastros municipales por entidad federativa. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/boletines/2015/especiales/especiales2015_03_9.pdf. Visitado por última vez en 04/05/2017.
50. Kaessmann, H. (2010). Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes. *Genome research*, 20(10), 1313-1326.
51. Kapadia, Z. J. and F. W. Gould. 1964a. Biosystematic studies in the *Bouteloua curtipendula* complex. IV. Dynamics of variation in *B. curtipendula* var. *caespitosa*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 91: 465–478.
52. Kindscher, K., & Wells, P. V. (1995). Prairie plant guilds: a multivariate analysis of prairie species based on ecological and morphological traits. *Vegetatio*, 117(1), 29-50.
53. Kinney M., Columbus T. Friar E. (2007). Cicliny in *Bouteloua* (Poace: Chloridoideae): implications for the evolution of dioecy. *Aliso*. Rancho Santa Ana Botanic Garden. Claremont. 23, pp. 605-614.
54. Körner, C. (2007). The use of 'altitude' in ecological research. *Trends in ecology & evolution*, 22(11), 569-574.
55. Lauter, N., Gustus, C., Westerbergh, A., & Doebley, J. (2004). The inheritance and evolution of leaf pigmentation and pubescence in teosinte. *Genetics*, 167(4), 1949-1959.
56. López De Heredia Larrea, U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*, 64, 7-31.
57. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. (2013) *Molecular biology and evolution* 30 (4) :772-780.

58. Malone, C. D., & Hannon, G. J. (2009). Small RNAs as guardians of the genome. *Cell*, 136(4), 656-668.
59. Márquez M., Ruiz G., Valdez C., Blanco M., Pérez P. (2009). Tasa de cambio de la superficie del pastizal en la cuenca del río Juchipila para el periodo 1978 – 2000. VI simposio internacional de pastizales. Universidad Autónoma de Chapingo.
60. Márquez Valdemar L., Serrato Díaz A., Cerritos Flores R. (2014). Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología. Secuenciación de Fragmentos de ADN. SEMARNAT. 231- 246
61. Mejía-Saulés T., Dávila A. (1992). Gramíneas Útiles de México. Instituto de biología UNAM. México. pp. 55-62.
62. Miller, M.A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8.
63. Molina M.A. (2008). Variación de la pubescencia foliar en plantas y su implicación funcional a lo largo de gradientes altitudinales. *Ecobiosis*, Departamento de botánica, universidad de concepción de chile, Casilla 160C. Instituto de ecología y biodiversidad. Santiago de Chile. *Ecosistemas*. 17(1):146-154.
64. Müller, J., Müller, K., Neinhuis, C., & Quandt, D. (2005). PhyDE-Phylogenetic data editor. Program Distrib Authors [Httpbackslashbackslash www Phyde De](http://backslashbackslashwww.Phyde.De).
65. Munguía, S., Saborío, J. C., & Cárdenas, H. (2002). Evaluación de variedades de maíz blanco en la región Brunca de Costa Rica: experimentación campesina. *Agronomía Mesoamericana*, 13(1).
66. Murillo Pérez, G. (2017). Filogenia del complejo *bouteloua repens* (poaceae: chloridoideae) basada en datos moleculares (Tesis de maestría).Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes
67. Olmedilla, A., Alché Ramírez, J. D. D., & Rodríguez García, M. I. (2010). Identificación histológica y ultraestructural de plantas C4 y CAM
68. Olson, D. M., Dinerstein, E., Wikramanayake, E. D., Burgess, N. D., Powell, G. V., Underwood, E. C., ... & Loucks, C. J. (2001). Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on EarthA new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity. *BioScience*, 51(11), 933-938.
69. Ortiz Flores, I. (2017). Análisis morfométrico del complejo *Bouteloua simplex*-*Bouteloua scorpioides* (Poaceae: chloridoidea) (Tesis de maestría).Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes
70. Pacheco Jiménez, M. (2018). Filogenia del complejo *Bouteloua barbata* basada en datos moleculares(Tesis de maestría).Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes
71. Palomeque Carlín, A. (2011). Diversidad genética de las poblaciones de *bouteloua curtipendula* (Gramineae: chloridoideae) (Tesis de maestría).Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes
72. Patwardhan A., Ray S., Roy A. (2014). Molecular Markers in phylogenetic Studies- A Review. *J. phylogeny Evolution Biol* 2: 131.
73. Peña del Río Ma., Martínez J., Fuente H. (2009). Biofertilización de praderas de pasto Buffel (*Cenchrus ciliaris*), cultivadas en Anáhuac, Nuevo León. VI Simposio internacional de Pastizales.
74. Peña, Carlos. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 265-267.
75. Peña, Carlos. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 265-267. Recuperado en 24 de noviembre de 2018, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332011000200023&lng=es&tlng=es.

76. Peterson P., Romaschenko K., Herrera Y. (2015). Phylogeny and subgeneric classification of *Bouteloua* with a new species, *B. herrera-arrietae* (Poaceae: Chloridoideae: Cynodonteae: Bouteluinae). *Journal of systematics and evolution*. 53(4), pp. 351-366.
77. Philippe* and, H., & Germot, A. (2000). Phylogeny of eukaryotes based on ribosomal RNA: long-branch attraction and models of sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 17(5), 830-834.
78. Prendergast, H. D. V., P. W. Hattersley and N. E. Sotne. 1987. New structural/Biochemical associations in leaf blades of C4 grasses (Poaceae). *Australian J. Plant Physiol.* 14: 403-420.
79. QGIS Development Team (2018). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.
80. Randall L., Richard C., Wendell J. (2004). Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. University of Tennessee, Department of biology. *Australian Systematic Botany* 17, 145- 170.
81. Rivas, M., Rojas, E., Cortés, J., & Santander, E. (2002). Efecto de la altura en la radiación solar ultravioleta en Arica norte de Chile. *Revista Facultad de Ingeniería-Universidad de Tarapacá*, 10, 59-62.
82. Rohlf, F. J. (1990). Morphometrics. *Annual Review of ecology and Systematics*, 21(1), 299-316.
83. Sanderson, M. J., Wojciechowski, M. F., Hu, J. M., Khan, T. S., & Brady, S. G. (2000). Error, bias, and long-branch attraction in data for two chloroplast photosystem genes in seed plants. *Molecular Biology and Evolution*, 17(5), 782-797.
84. Sanger, F., Nicklen S., Coulson R. (1977). ADN secuencing with chain terminating. *FEBS Lett* 87 (1): 107-110.
85. Scott V. Edwards. (2008). Is a new and general theory of molecular systematics emerging?. *Museum of comparative Zoology and department of organismic & Evolutionary Biology, Harvard University*. 63-1:1-19.
86. Secretaria de agricultura y ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación "SAGARPA"(2015). <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B782.aspx>. Consultado por última vez 04/05/2017.
87. Secretaria de agricultura y ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación "SAGARPA"(2009). Diseño de estrategias de mercado, logística y de adecuación de productos de integración de la alfalfa mexicana en el comercio global de forrajes. http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/ALFALFA.pdf. Visitado por ultima vez 04/05/2017.
88. Shaw J., Lickey E., Berck J., Farmer S., Liu W., Miller J., Siripun K., Winder c., Schilling E., Small R. (2004). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast ADN sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of botany*. Vol 92. Pag. 142- 166.
89. Siddall, M. E., & Whiting, M. F. (1999). Long-branch abstractions. *Cladistics*, 15(1), 9-24.
90. Siqueiros-Delgado M., Ainouche M. Columbus T., Ainouche A. (2013). Phylogeny of the *Bouteloua curtipendula* complex (Poaceae: Chloridoideae) Based on nuclear Ribosomal and Plastid ADN sequences from diploid taxa. *Systematic Botany*. 38 (2), pp. 379-389.
91. Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados "SNIIM". (2017). <http://www.economia-sniim.gob.mx/2010prueba/IngredientesMes.asp?Cons=D&prod=817&ori=T&dqMesMes=4&dqAnioMes=2017&Formato=Nor&submit=Ver+Consulta>. Visitado por última vez 05/05/2017.
92. Soreng, R. J., G. Davidse, P. M. Peterson, F. O. Zuloaga, E. J. Judziewicz, T. S. Filgueiras & O. Morrone. (2003). Doubtful or dubious names and names whose status is not known or uncertain in the on-line Catalog of New World Grasses.

93. Steven J. Phillips. 2017. A Brief Tutorial on Maxent. Available from url: http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/. Accessed on 2018-10-31.
94. Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
95. Tajima, F., & Nei, M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular biology and evolution*, 1(3), 269-285.
96. Vasconcelos S., Benko-Iseppon A. (2018). New insights on phylogenetic relationships among the traditional *Philodendron* subgenera and the other groups of the *Homalomena* clade (Araceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*.
97. Wellhausen, E. J. Razas de maíz en México: su origen, características y distribución/por EJ Wellhausen, et. al (No. PA 633.15 R39.). México. Secretaria de Agricultura y Ganadería. Oficina de Estudios Especiales/Fundación Rockefeller.
98. Wiens Jonh. (2004). The role of morphological data in phylogeny reconstruction. *Department of ecology an evolution, Stony Brook University, Stony. New York.* 53 (4): 653- 661.
99. Williams T., Foster P., Cox C., Emberly M. (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Macmillan Publishers Limited, NATURE Review. Institute for cell and molecular biosciences.* Vol 504. 231- 236.
100. Yi, S. (2013) Neutrality and Molecular Clocks. *Nature Education Knowledge* 4(2):3
101. Zhang W. (2000). Phylogeny of the grass family (*Poace*) from rpl16 intron sequence data. *Mol phylogenet Evol.* 15:135-146.
102. Zou Zhengting, Jianzhi Zhang. (2016). Morphological and molecular convergences in mammalian phylogenetics. *Nature Communications.* University of Michigan.
103. Zwickl, D. J., & Hillis, D. M. (2002). Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Systematic Biology*, 51(4), 588-598.