



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

TESIS

FILOGENIA DEL CLADO *Bouteloua gracilis* (POACEAE)

PRESENTA

Marcela Avendaño González

PARA OBTENER POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORA

Dra. María Elena Siqueiros Delgado

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Francisco Morales Domínguez

Dr. Travis Columbus

Aguascalientes, Ags., 7 de Marzo de 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, tengo a bien informarle que la **M. en C. MARCELA AVENDAÑO GONZÁLEZ** con ID 30230, estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada **FILOGENIA DEL CLADO *Bouteloua gracilis* (POACEAE)**.

Por lo anteriormente mencionado y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

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

ATENTAMENTE

"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 4 de Marzo de 2019



María Elena Siqueiros Delgado Ph. D
Directora de tesis

c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, tengo a bien informarle que la **M. en C. MARCELA AVENDAÑO GONZÁLEZ** con ID 30230, estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada **FILOGENIA DEL CLADO *Bouteloua gracilis* (POACEAE)**.

Por lo anteriormente mencionado y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

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

ATENTAMENTE

"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 4 de marzo de 2019


Dr. Francisco Morales Domínguez
Asesor de tesis

c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, tengo a bien informarle que la **M. en C. MARCELA AVENDAÑO GONZÁLEZ** con ID 30230, estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada **FILOGENIA DEL CLADO *Bouteloua gracilis* (POACEAE)**.

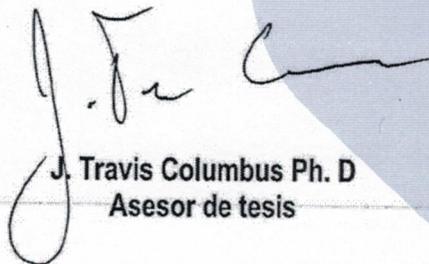
Por lo anteriormente mencionado y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

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

ATENTAMENTE

"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 26 de Febrero de 2019



J. Travis Columbus Ph. D
Asesor de tesis

c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

MARCELA AVENDAÑO GONZÁLEZ
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTE.

Estimada alumna:

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: **"FILOGENIA DEL CLADO *Bouteloua gracilis* (POACEAE)** 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 07 Marzo de 2019

"Se lumen proferre"

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

From: Rachel Jabaily
To: Maria Elena Siqueiros
Subject: Your manuscript MPE_2018_513_R1 has been accepted

Ref: MPE_2018_513_R1

Title: Genetic structure, phylogeography, and migration routes of *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths (Poaceae:Chloridoideae)

Journal: Molecular Phylogenetics and Evolution

Dear Dr. Siqueiros,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. Your accepted manuscript will now be transferred to our production department. We will create a proof which you will be asked to check. You can read more about this [here](#). Meanwhile, you will be asked to complete a number of online forms required for publication. If we need additional information from you during the production process, we will contact.

Thank you for submitting your work to Molecular Phylogenetics and Evolution. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Rachel Jabaily
Associate Editor
Molecular Phylogenetics and Evolution

Comments from the editors and reviewers:

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.



Genetic structure, phylogeography, and migration routes of *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths (Poaceae:Chloridoideae)

Marcela Avendaño-González, José Francisco Morales-Domínguez,
María Elena Siqueiros-Delgado*

Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Aguascalientes 20130, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Phylogeography
Population genetics
Bouteloua gracilis
North American grasslands
SNPs
Genetic diversity

ABSTRACT

Blue grama grass (*Bouteloua gracilis*) populations are found in widely variable environments, tolerating drought, alkaline soils and different levels of grazing. Many ploidy levels have been reported for this species that is also considered to be phenotypically plastic and morphologically variable. Recently a decline in its cover and frequency in the North American shortgrass steppe and central Mexico has been reported although much about the biology of the species is unknown, including genetic diversity throughout its distribution. Genetic and phylogeographic structure and phylogenetic relationships among *B. gracilis* were estimated employing next generation sequencing of a high number of SNPs and loci. Population genetics and Structure analyses were performed. We compared the marginal likelihoods of different migration models using MIGRATE and obtained the best population model of migration for our data. Demographic expansion of *B. gracilis* was observed graphically with a mismatch distribution obtained in DNAsp. Bayesian and Maximum Likelihood methods were used to resolve phylogenetic relationships among *B. gracilis* and its closely related species as well as within *B. gracilis* populations. *B. gracilis* is sister to the *B. chasei* and *B. herrera arrietae* clade. Among the populations of the species two highly supported clades were resolved, grouping samples from Mexico and USA respectively. Allele frequencies determined three population clusters: CUSA from the Great Plains, MEX from central and southern Mexico, and WUSA-NMEX from northern Mexico and the western mountainous region of USA, the latter of which contains an allele admixture of the other two clusters. The haplotype network revealed an ancestral haplotype originating in Mexico, from which the rest of the haplotypes diversified to the north. Both evidence of gene flow and isolation among populations was observed. Genetic clusters are not genetically structured and variation is higher among populations. The genetic and morphological data do not support recognition of ecotypes or infra-specific taxa. However, the Great Plains populations are least diverse, making them most vulnerable to environmental change.

1. Introduction

The North America grassland vegetation extends from central Saskatchewan and Alberta to the highlands of central Mexico and from Illinois-Indiana to California (Anderson, 2006; Lauenroth et al., 1999; Rzedowski, 2006). The evolutionary and phylogeographic processes of many North American taxa have been associated with historical orogenic and climate events (Angulo et al., 2017; Gugger et al., 2013; Loera et al., 2017). While the expanse of the Rocky Mountain cordillera running south of the Pleistocene continental ice sheets has been a major influence on the evolution of plants in North America, harboring high levels of genetic variation (DeChaine and Martin, 2005), during the Pleistocene demographic expansions and strong phylogeographical

structuring of taxa occurred in the Chihuahuan Desert (Vásquez-Cruz and Sosa, 2016). In this context, the glacial-interglacial cycles of the Pleistocene suggest that areas possessing greater habitat stability would be characterized by high levels of genetic diversity; in contrast, areas with low habitat stability are expected to represent recently colonized areas and exhibit low levels of genetic diversity (Loera et al., 2017).

Bouteloua is a grass genus thought to be one of the youngest elements in the North American desert grassland formation (Gould, 1980) although population genetics, demographic expansion or phylogeographic patterns have never been studied in any *Bouteloua* species. One of the most common species of the North American grasslands is blue grama grass *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths which is dominant or co-dominant in the northern semiarid grasslands of Mexico and

* Corresponding author at: Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Aguascalientes 20130, Mexico.

E-mail addresses: mavendag@correo.uaa.mx (M. Avendaño-González), jfmoral@correo.uaa.mx (J.F. Morales-Domínguez), masiquei@correo.uaa.mx (M.E. Siqueiros-Delgado).

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.01.005>

Received 11 October 2018; Received in revised form 19 December 2018; Accepted 2 January 2019

Available online 09 January 2019

1055-7903/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y su programa de Doctorado en Ciencias Biológicas por haber proporcionado las instalaciones, equipos y materiales para la realización de algunas etapas de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado la beca de manutención 490397 y la beca mixta para realizar la estancia de investigación en el Rancho Santa Ana Botanic Garden (RSABG) en Claremont, CA, EUA.

Al RSABG por haber facilitado el uso de sus instalaciones y por contribuir con el financiamiento para la elaboración y secuenciación de la biblioteca genómica. A Lucinda McDade, Mark Porter y Lorain Washburn por el apoyo proporcionado durante mi estancia. A mis compañeros Manuel Luján, Fernando Cuellar, Nicolas Medina y Dylan Cohen por haberme ayudado en las coletas, trabajo de laboratorio y análisis de datos.

A la Dra. María Elena Siqueiros Delgado por haberme acompañado y guiado. Por siempre estar ahí para resolver mis dudas y crear un ambiente libre para trabajar y crear. Gracias por confiar plenamente en mí.

Al Dr. Travis Columbus por haber guiado por buen camino esta investigación desde el inicio y haber contribuido de todas las maneras que le fueron posibles. Por haberme llevado a conocer plantas y paisajes nuevos para mí y haber facilitado todo lo relacionado con mi estancia de investigación.

Al Dr. Francisco Morales Domínguez por haberme asesorado en cuestiones de laboratorio y haber contribuido valiosamente a la elaboración de este manuscrito final, por siempre compartir su tiempo en bien de esta investigación y mi formación.

Al Dr. Gilberto Ocampo por apoyarme en la colecta de muestras y además por siempre estar dispuesto a compartirme su conocimiento y orientarme. A Julio Martínez Ramírez por su apoyo y ayuda durante las colectas y la revisión de herbario. A Martha E. Pérez Reyes, Issac Reyes Silva y Rocío A. González Moreno por siempre recibirme amablemente en sus laboratorios y estar dispuestos a ayudarme.

A mis compañeros y amigos del posgrado especialmente a Mónica I. Miguel Vázquez por ser mi joven compañera durante este ratito de vida en el que nos tocó coincidir, aprendí mucho de ti, me motivaste a trabajar más duro e hiciste todo más divertido; a Higinio Sandoval por compartirme tu conocimiento y contagiarme de tu buena vibra y Emmanuel Cabañas por el tiempo y las experiencias compartidas. A Guillermo Cabral por haberme dado la oportunidad de aprender juntos. A mis compañeros del herbario durante estos tres años: Hugo Araiza, Diana Hernández, Maria Elena Mendoza, Geraldine Murillo, Iraís Oríz, Marisol Pacheco y José Carlos Sierra.

A mi familia, especialmente a Lidia y Paulina, por siempre estar presentes y darme su apoyo incondicional.

A mi mamá, Lidia González Juárez por ser mi mejor ejemplo de valentía, compromiso,
dedicación y responsabilidad.



Índice General

Introducción	8
Justificación	13
Hipótesis	14
Objetivos	15
Capítulo I. Filogenia del clado <i>Bouteloua gracilis</i>	16
I.1. Introducción.....	16
I.2. Métodos.....	22
I.3. Resultados.....	28
I.4. Discusión.....	33
Capítulo II. Diversidad genética y estructura poblacional de <i>Bouteloua gracilis</i>	38
II.1. Introducción.....	38
II.2. Métodos.....	40
II.3. Resultados.....	46
II.4. Discusión.....	64
Capítulo III. Variación morfológica de <i>Bouteloua gracilis</i>	72
III.1. Introducción.....	72
III.2. Métodos.....	74
III.3. Resultados.....	76
III.4. Discusión.....	80
Conclusiones	83
Bibliografía	85
Anexos	92

Índice de Cuadros

Cuadro I.1.	Muestras incluidas en la biblioteca genómica. Abreviaciones de los colectores= JM: Julio Martínez, JTC: J. Travis Columbus, MAG: Marcela Avendaño-González, MES: María Elena Siqueiros-Delgado.	24
Cuadro I.2.	Valores de los parámetros para alineamiento en ipyrad (v.0.7.11).....	27
Cuadro II.1.	Poblaciones de <i>B. gracilis</i> muestreadas. Ho es el valor de heterocigosidad observada.....	41
Cuadro II.2.	Variables ambientales empleadas para el modelado de nicho y sus correlaciones.	46
Cuadro II.3.	Haplotipo de cada muestra de <i>B. gracilis</i> y agrupación a la que corresponden de acuerdo a los resultados de Structure.	50
Cuadro II.4.	Expansión espacial estimada con parámetros del supuesto de tamaño de deme constante (ARLEQUIN).	51
Cuadro II.5.	Comparaciones pareadas de estadísticos poblacionales.	53
Cuadro II.6.	Estadísticos de genética de poblacionales para cada uno de los grupos genéticos. N=tamaño de muestra; Nh= no. de haplotipos; Hd= diversidad haplotípica; S=sitios polimórficos; Pi=diversidad nucleotídica; Nm=tasa de migración.....	53
Cuadro II.7.	Resultados de un AMOVA para las poblaciones sin agrupar . Significancia estadística (p<0.01*).	54
Cuadro II.8.	Resultados de un AMOVA evaluando la partición de la variación genética genetic entre los tres grupos genéticos . Significancia estadística (p<0.01*).....	54
Cuadro II.9.	Resultados de un AMOVA evaluando la partición de la variación genética genetic entre los cuatro grupos filogenéticos . Significancia estadística (p<0.01*).....	54
Cuadro II.10.	Variables que influyen en el modelado de distribución de <i>B. gracilis</i> en cuatro tiempos diferentes.	57
Cuadro III.1	Caracteres morfológicos medidos en las muestras <i>B. gracilis</i>	75

Índice de Gráficas y Figuras

Figura 1. Pastizales y las ecorregiones terrestres de Norte América. Mapa elaborado empleando información de la Comisión para la Cooperación Ambiental y el programa QGIS 2.18.4.....	9
Figura I. 1. Inferencia filogenética de <i>Bouteloua</i> y géneros relacionados, obtenida de Columbus et al. (1998): Árbol consenso estricto de 4747 árboles más parsimoniosos (PAUP) obtenidos del análisis de secuencias de la región ITS. Los números sobre las ramas son los valores de soporte bootstrap (Columbus et al., 1998). El corchete rojo indica el complejo <i>Bouteloua gracilis</i>	17
Figura I. 2. Inferencia filogenética del género <i>Bouteloua</i> obtenida por Peterson et. al. (2016), obtenida con el método de Máxima Verosimilitud a partir de secuencias de plastidio (rpl32-trnL y rps16-trnK) e ITS. Los números sobre las ramas son los valores de bootstrap y los números debajo de las ramas son probabilidades posteriores.	18
Figura I. 3. Hábito y espigas de <i>Bouteloua gracilis</i> en un pastizal natural en Montana, Estados Unidos. ..	19
Figura I. 4. <i>Bouteloua chasei</i> en pastizal gipsófilo de Matehuala, San Luis Potosí, México.	20
Figura I. 5. Hábito y espigas de <i>Bouteloua herrera-arrietae</i> en su localidad tipo en Galeana Nuevo León, México.	20
Figura I. 6. Hábito y espiga de <i>Bouteloua scorpioides</i> creciendo en un matorral abierto del centro de México.	21
Figura I. 7. Hábito y espiga de <i>Bouteloua simplex</i> en Asientos, Aguascalientes.....	21
Figura I. 8. Árbol de Máxima Verosimilitud empleando 7126 loci de especies del clado <i>B. gracilis</i> y especies hermanas como grupo externo. Los números en cada nodo indican el soporte obtenido con 1000 replicas de bootstrap.	29
Figura I. 9. Árbol de Inferencia Bayesiana empleando 7126 loci de especies del clado <i>B. gracilis</i> y especies hermanas como grupo externo. Los números en cada nodo indican la probabilidad posterior (PP)...	30
Figura I. 10. Vegetación y hábitat de la localidad tipo de <i>Bouteloua herrera-arrietae</i> en Galeana, Nuevo León.	31
Figura I. 11. Inferencia filogenética molecular de máxima verosimilitud empleando 33807 loci y 164045 SNPs de <i>B. gracilis</i> y sus especies hermanas (grupo externo). Generado empleando IQTREE con 1000 réplicas de bootstrap ultrarrápido, los valores de soporte se muestran en los nodos; Log-likelihood: -7270163.539, longitud total del árbol: 0.296	32
Figura I. 12. Mapa de la ubicación geográfica de los clados filogenéticos de <i>B. gracilis</i> . Los clados de México delimitados con líneas azules (A1 y A2) y los clados de EUA delimitados con líneas rojas (B1 y B2). En amarillo se muestra el Desierto Chihuahuense.....	33
Figura II. 1. Ploidía de poblaciones de <i>B. gracilis</i> en todo su rango de distribución de acuerdo a los estudios realizados hasta el momento (Fulfs, 1942; Gould, 1966; Reeder, 1977; Snyder and Harlan, 1953; Tsuchiya et al., 1992).	39
Figura II. 2. Izquierda: gráfico del análisis Bayesiano de agrupamiento con Structure, se muestra la probabilidad (barras) de cada muestra de ser asignada a uno de los tres grupos genéticos (K=3) de acuerdo a sus frecuencias alélicas. Centro: localización geográfica de los grupos: MEX- gris oscuro, CUSA- gris, WUSA-NMEX- gris claro. Los límites de los grupos se establecieron con base en las regiones ecoterrestres (L2 y L3); además se muestran los gráficos de pastel con la distribución de haplotipos para cada grupo	

genético, los colores corresponden a los observados en la red de haplotipos. Derecha: Red de haplotipos donde el tamaño del círculo corresponde a el número de muestras con el haplotipo.49

Figura II. 3. Gráficos de distribución no coincidente (Mismatch Distribution), la línea gris representa las diferencias pareadas esperadas y la línea negra representa las observadas.52

Figura II. 4. Prueba de Mantel, correlación entre las matrices geográficas y genéticas de 42 poblaciones (círculos vacíos) de *B. gracilis* ($r= 0.1044317$, $p=0.045$).....55

Figura II. 5. Mapas mostrando las barreras geográficas según el análisis de Barrier basado en los valores pareados de FST de las poblaciones de *B. gracilis*. **A.** En negro se resaltan las regiones terrestres que coinciden geográficamente con las barreras resultantes del análisis: Sierra Madre Oriental en México, Montañas Rocallosas del sur en Wyoming, Colorado y Nuevo México, y las Montañas Altas de Gila en Arizona y Nuevo México. **B.** Líneas representando barreras al flujo génico entre las poblaciones (puntos). **C.** Mapeo de las cinco barreras resultantes del análisis en Barrier.56

Figura II. 6. Modelado de Distribución de *Bouteloua gracilis* en cuatro tiempos diferentes: Último Máximo Glaciar (~20,000), Mitad del Holoceno (~ hace 6000), Presente (1960-1990) y Futuro (2041-2060; RCP8.5). La probabilidad de presencia de la especie mayor a 0.5 se muestra en azul y >0.8 se muestra en negro.59

Figura II. 7. Comparación de áreas con >80% de probabilidad de distribución de la especie. **Izquierda:** Último Máximo Glaciar en rojo comparado con Mitad del Holoceno en negro (con transparencia). **Derecha:** Mitad del Holoceno en verde comparado con el Presente en negro (con transparencia).60

Figura II. 8. Comparación de áreas con >80% de probabilidad de distribución de la especie en el Presente (1960-1999) en negro con transparencia, contra el Futuro (2041-2060, rcp85) en naranja.61

Figura II. 9. Análisis de Componentes Principales de las variables climáticas para cada punto empleado para realizar los modelos en los cuatro tiempos: Último máximo glacial (LGM, ~22000), Holoceno medio (Mid-Holocene, ~6000), Presente (1960-1999) y el Futuro (2041-2060, rcp85). Cuadro con los resultados del PERMANOVA ($p 0.05$) y las comparaciones pareadas.....62

Figura II. 10. ACP de las características climáticas en cada punto para cada tiempo: Último máximo glacial (LGM, ~22000), Mitad del Holoceno (Mid-Holocene, ~6000), Presente (1960-1999) y el Futuro (2041-2060). En los gráficos los CP 1 y 2, así como la ubicación de las muestras: México (elipse verde), EEUU (elipse negra) y Canadá (elipse azul), las elipses representan la concentración del 95% de los datos. En el texto se muestra el porcentaje de variación para cada PC.63

Figura III. 1. Gráfico del análisis de componentes principales de 35 caracteres morfológicos de *B. gracilis*. Los grupos se asignaron con base en la *K* verdadera obtenida en el análisis Structure correspondiendo a: MEX (verde), CUSA (azul) y WUSA-NMEX (amarillo). Los círculos representan elipses de confianza de 95%. ... 77

Figura III. 2. Gráfico del análisis de componentes principales de 35 caracteres morfológicos de *B. gracilis*. Los grupos se asignaron de acuerdo a los cuatro clados filogenéticos obtenidos correspondiendo a: CUSA (azul), NMEX (morado), SCMEX (verde) and WUSA (amarillo).78

Figura III. 3. Gráficos de correlación entre caracteres morfológicos y variables ambientales, mostrando solo las correlaciones más altas.79

Acrónimos

ACP. Análisis de Componentes Principales; Principal Component Analyzes (PCA)

BS. Soporte Bootstrap

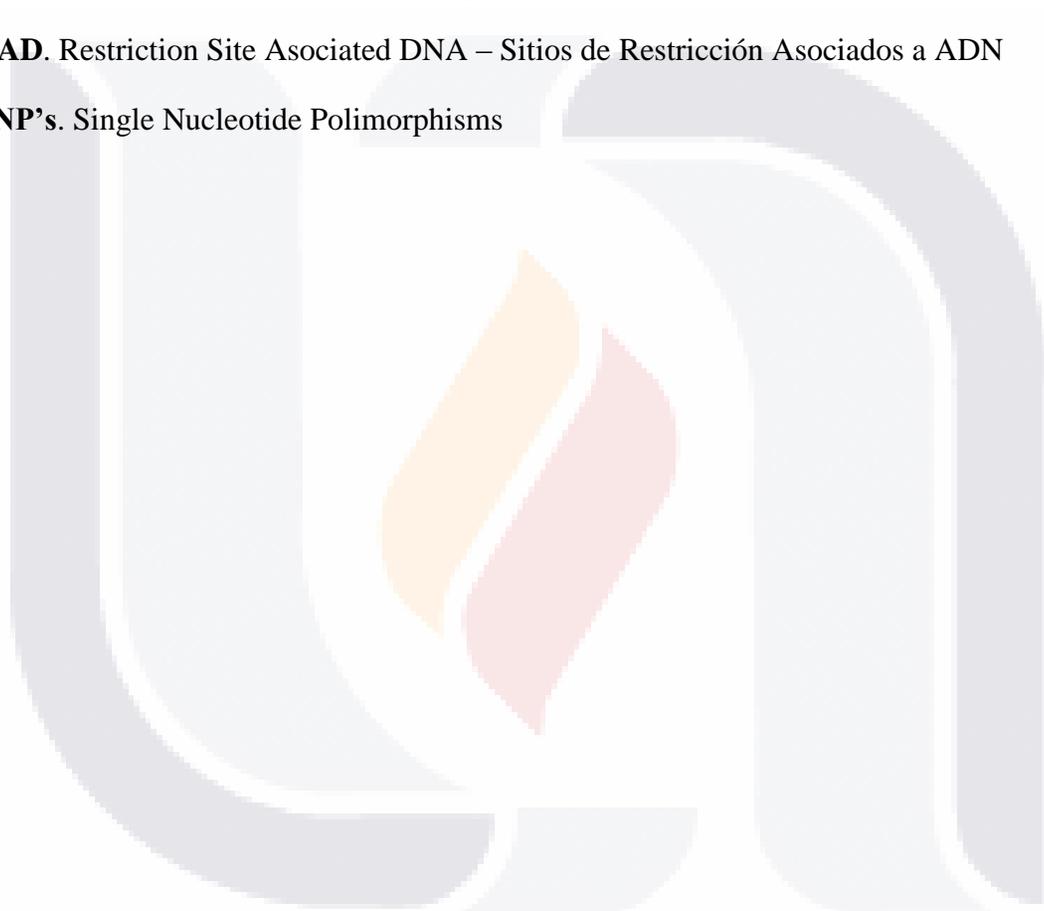
MP. Máxima Parsimonia

MV. Máxima Verosimilitud

PP. Probabilidad Posterior (análisis bayesiano)

RAD. Restriction Site Asociated DNA – Sitios de Restricción Asociados a ADN

SNP's. Single Nucleotide Polimorphisms



Resumen

El pasto navajita azul (*Bouteloua gracilis*) se encuentra en ambientes muy variables, tolerando sequías, suelos alcalinos y diferentes niveles de pastoreo; es una especie poliploide, plástica y morfológicamente variable. Recientemente se reportó reducción de la cobertura y frecuencia de esta especie en los pastizales cortos de Norteamérica y en el centro de México, lo que resalta la importancia de evaluar la diversidad genética, entre otros aspectos, dentro de las poblaciones de *B. gracilis* en todo su rango para así poder determinar la vulnerabilidad de las comunidades donde esta especie es clave. Para este trabajo se muestrearon poblaciones de *B. gracilis* desde Dakota del Sur-EUA hasta Puebla-México para estimar las relaciones filogenéticas, la diversidad genética y la genética de poblaciones mediante secuenciación de nueva generación de un alto número de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) y loci. Las inferencias filogenéticas resolvieron que 1) *B. gracilis* es hermana del clado *B. herrera-arrietae*-*B. chasei* y 2) las poblaciones de México y EUA se agrupan en dos clados respectivos. Las frecuencias alélicas resolvieron tres agrupaciones: 1) CUSA incluye muestras de la planicie central de EUA, 2) MEX del centro y sur de México, y 3) WUSA-NMEX de la región montañosa el oeste de EUA y el norte de México; esta última agrupación presentó mezcla de alelos con las otras dos agrupaciones. Los grupos no tienen estructura genética y la variación genética es más alta entre las poblaciones que entre los grupos. La red de haplotipos reveló un haplotipo ancestral con origen en México, del cual se diversificaron el resto de los haplotipos hacia el norte por dos rutas de migración. Se observó evidencia tanto de flujo génico como de aislamiento poblacional y no se encontró correlación entre la distancia genética y geográfica de las poblaciones. Las poblaciones de la planicie central de Norteamérica son menos diversas por lo que se sugiere que son más vulnerables. No se encontró fundamento genético para la variación morfológica ni tampoco evidencia para determinar la existencia de diferentes ecotipos o subespecies de *B. gracilis*.

Palabras clave: *Filogeografía, Genética de poblaciones, Bouteloua gracilis, Pastizales de Norteamérica, SNPs, Diversidad genética*

Abstract

Blue grama grass (*Bouteloua gracilis*) is found in very variable environments, tolerating droughts, alkaline soils and different levels of grazing; it is a polyploid, plastic and morphologically variable species. A reduction in the coverage and frequency of this species has recently been reported in the short grasslands of North America and central Mexico, which highlights the importance of evaluating genetic diversity, among other aspects, within *B. gracilis* populations throughout its range in order to determine the vulnerability of the communities where this is a key species. For this work, populations of *B. gracilis* were sampled from South Dakota-USA to Puebla-México to estimate phylogenetic relationships, genetic diversity and population genetics by next generation sequencing of a high number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and loci. Phylogenetic inferences resolved that 1) *B. gracilis* is sister to the *B. herrera-arrieta*-*B. chasei* clade and 2) *B. gracilis* populations from Mexico and USA are grouped in two respective clades. The allele frequencies resolved three groups: 1) CUSA includes samples from the central plain of USA, 2) MEX with samples from central and southern Mexico and 3) WUSA-NMEX with samples from the mountainous region of western USA and northern Mexico, this last group exhibited allele admixture with the other two groups. The groups are not structured genetically and the genetic variation is higher among populations than between groups. The haplotype network revealed an ancestral haplotype originating in Mexico, from which the rest of the haplotypes diversified to the north by two migration routes. Evidence of both gene flow and isolation among populations was observed and no correlation was found between genetic and geographic distance of the populations. The populations of the central plain of North America are less diverse, which suggests that they are more vulnerable. No genetic basis was found for morphological variation nor was there evidence to determine the existence of different ecotypes or subspecies of *B. gracilis*.

Keywords: *Phylogeography, Population genetics, Bouteloua gracilis, North American grassland, SNPs, genetic diversity*

Introducción

En la actualidad las transformaciones antropogénicas, principalmente el cambio de uso del suelo para la obtención de bienes y servicios representa la principal causa de la pérdida de biodiversidad a nivel mundial (Vitousek et al., 1997). El uso de los pastizales naturales y los matorrales para el pastoreo de ganado representa actualmente la modificación más extensiva de los ecosistemas naturales, amenazando la estabilidad, servicios, biodiversidad y conservación de estos ecosistemas (Chapin III et al., 2011). Desde el punto de vista biológico, los pastizales poseen comunidades muy productivas, sin embargo son altamente vulnerables a disturbios antropogénicos y a pesar de que muchas gramíneas, por su importancia económica están bien preservadas, los ecosistemas naturales que habitan están cada vez más restringidos (Yanoff and Muldavin, 2008) y bajo amenaza global (Jones, 1997).

La mayoría de las comunidades de pastizales nativas del continente Americano se encuentran en América del Norte, ocupando 15% del territorio de Estados Unidos (Mac et al., 1998) e históricamente 10-12% del territorio de México (Rzedowski, 1975). Estas comunidades se pueden encontrar desde el centro de Saskatchewan y Alberta en Canadá, hasta las zonas altas del centro de México, y desde Illinois-Indiana hasta California en Estados Unidos (Anderson, 2006). Las ecorregiones terrestres que las delimitan son La Gran Planicie (EUA/MX), Los Desiertos de Norte América (Sonora y Chihuahuense-MX/EUA), Las tierras altas semiáridas sureñas (MX), Las Montañas Boscosas del Noroeste (Montañas Rocallosas-EUA) y Las Sierras Templadas (Sierras Madre Oriental y Occidental-MX; **Figura 1**; (EPA, 2017; Olson and Dinerstein, 1998).



Figura 1. Pastizales y las ecorregiones terrestres de Norte América. Mapa elaborado empleando información de la Comisión para la Cooperación Ambiental y el programa QGIS 2.18.4.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A lo largo de este gradiente, los pastizales se conforman de acuerdo a una gran variación de ambientes que influyen significativamente la composición y distribución de las comunidades de pastos (Steinauer and Collins, 1996; Weaver et al., 1996). Por ejemplo, en la gran planicie de Estados Unidos se pueden encontrar tres grandes regiones, una de ellas dominada por pastos bajos de 0.3-0.5 m albergando especies como *Bouteloua dactyloides*, *Bouteloua gracilis*, *B. curtipendula* y *B. hirsuta*. La pradera alta en cambio, se encuentra dominada por *Andropogon gerardii*, *Sorghastrum nutans*, *Panicum virgatum* y *Schizachyrium scoparium*, todas con alturas de 1.8–2.4 m y la pradera mixta está dominada por especies de 0.8–1.2 m de altura, incluyendo *Pascopyrum smithii* y *Nassella viridula* (Anderson, 2006). Por otro lado, en México (Altiplano Mexicano) los pastos de las comunidades del Desierto Chihuahuense son bajos o de tamaño mediano, generalmente asociados con arbustos bajos y algunas veces con árboles bajos del género *Prosopis*, *Acacia*, *Opuntia*, *Juniperus*, *Quercus*, y algunos otros. Algunos pastos comunes son del género *Muhlenbergia*, *Andropogon*, *Aristida*, *Erioneuron* así como las especies *Lycurus phleoides*, *Hilaria cenchroides*, entre otras. Los pastos más característicos son del género *Bouteloua* y frecuentemente sus especies son dominantes en las comunidades (Rzedowski, 1975).

El género *Bouteloua* Lagasca (Gramineae: Chloridoideae) ha sido desde hace tiempo reconocido como uno de los géneros de pastos más importantes de las planicies y praderas centrales y sureñas de Norte América (Gould, 1980). En México, es uno de los géneros de gramíneas nativas más importantes de los pastizales por su alto valor forrajero y su amplia distribución (Rzedowski, 2006; Rzedowski, 1975). *Bouteloua* es un grupo monofilético que comprende 57 especies sensu Columbus (1999), distribuidas en el continente Americano. Su centro de origen estuvo en lo que ahora es el suroeste de Estados Unidos y México, de donde se dispersó de forma natural hacia todo América (Gould, 1980; Rzedowski, 1975). Actualmente, la mayoría de las especies se distribuyen exclusivamente en México y el resto se extiende al suroeste de los Estados Unidos, seis especies se extienden a América del Sur y tres a las Indias Occidentales. Las cuatro especies más ampliamente distribuidas *B. curtipendula*, *B. gracilis*, *B. hirsuta*, *B. repens* y *B. barbata* se encuentran en América del

Norte y América del Sur en tierras de pastoreo; sólo *B. megapotamica* limita su distribución a América del Sur; dos especies, *B. juncea* y *B. vaneedenii* sólo se distribuyen en las Indias Occidentales; y *B. kayi* y *B. pectinata* se conocen sólo en Texas (Arrieta et al., 2008; Gould, 1980; Herrera Arrieta et al., 2004). Las especies de *Bouteloua* aunque son más frecuentes en pastizales áridos, se encuentran también en otros tipos de vegetación como selvas tropicales, matorrales, bosques templados, pastizales gypsófilos y áreas agrícolas, como también formando parte de la vegetación introducida (Herrera Arrieta et al., 2004), incluso algunas especies como *B. aristidoides*, *B. barbata* o *B. simplex* pueden comportarse como malezas estrictas (Gould, 1980).

Los pastizales del norte de México así como del centro de EUA, específicamente la pradera de pastos bajos, están codominados por especies del género *Bouteloua*, siendo *B. gracilis* la especie más común (Rzedowski 1978, Gould, 1980). La mayoría de los pastizales de Norteamérica han reducido sustancialmente su productividad a lo largo de las últimas décadas por el desarrollo agrícola, el establecimiento y dispersión de especies no nativas y el desplazamiento de las especies nativas (Masters et al., 1996; Samson et al., 2004) así como los cambios climáticos regionales y la fragmentación del paisaje de la pradera (DeKeyser et al., 2013). La reducción en abundancia de una de las especies clave como *B. gracilis* puede generar que estos sistemas sean más vulnerables a la invasión por especies exóticas y menos tolerantes a la sequía y el pastoreo (Alward et al., 1999). Así mismo, se sabe que *B. gracilis* constituye una importante reserva de carbón en el suelo (Derner and Schuman, 2007) por lo que la pérdida de cobertura del pasto navajita azul podría impactar en la secuestro de carbono, así como reducir la capacidad de pastoreo de las áreas donde se distribuye (Balleza Gallardo, 2017; Rondeau et al., 2018).

Predecir el futuro de los ecosistemas y los servicios que proveen requiere conocimiento acerca de sus especies clave. Un mejor entendimiento de la variación genética y fenotípica a través del rango de dichas especies es necesario para investigar sus tasas de adaptación ya que si las poblaciones de las especies de plantas dominantes no pueden mantener el ritmo del cambio antropogénico la vulnerabilidad de los ecosistemas aumenta (Eckert et al., 2008; Moser and Dilling, 2011).

Por otro lado, un aspecto fundamental para el conocimiento de *B. gracilis*, es el entendimiento de sus relaciones filogenéticas. El uso de datos moleculares para reconstrucciones filogenéticas ha sido muy importante por permitir generar hipótesis detalladas y comprobables de las relaciones entre las especies (Doyle, 1992). Dentro de la filogenia molecular, es común el uso de múltiples marcadores para reconstruir la historia evolutiva de un grupo. Primordialmente el genoma del cloroplasto se comenzó a usar para sistemática molecular de plantas, posteriormente se fue cambiando el enfoque hacia genes nucleares (ej. 18S rDNA), con el objetivo de realizar comparaciones entre topologías basadas en marcadores nucleares y de cloroplasto (Soltis and Soltis, 1998).

Para el estudio de la filogenia de *Bouteloua* y otros Chloridoideae, los espaciadores transcritos internos (ITS1-ITS2) del ADN ribosomal del genoma nuclear se han empleado consistentemente (Columbus et al., 1998; Columbus et al., 2007; Columbus et al., 2000; Columbus et al., 2010; Peterson et al., 2015; Peterson et al., 2010; Siqueiros-Delgado et al., 2013; Siqueiros-Delgado et al., 2017). En cuanto a los genes o regiones del genoma de cloroplasto, en específico para *Bouteloua* y otros Chloridoideae se han empleado, con varios resultados, la región trnL-trnF (Columbus, 1999), el intrón trnL, exón trnL3', ITS trnL-trnF (Columbus et al., 2000, Columbus et al., 2007, Columbus et al., 2010), intrón ndhA, ndhF, rps16-trnK, intrón rps16, rps3, rpl32-trnL (Peterson et al., 2010), trnT-L-F (Siqueiros-Delgado et al., 2013) y más recientemente los espaciadores del rpl32-trnL y del rps16-trnK (Peterson et al., 2015).

Desde hace algunos años el uso de los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) se propuso como una buena opción para muchas aplicaciones como en ecología de poblaciones, evolución y genética de la conservación, esto por su potencial eficiencia para obtener genotipos, datos de calidad, amplia cobertura del genoma y su simplicidad analítica (Morin et al., 2004). Así mismo, la secuenciación de nueva generación ha logrado incrementar el muestreo de marcadores a lo largo del genoma. En específico la secuenciación RAD (Restriction Site Associated DNA) permite secuenciar simultáneamente de 10 a 100 mil polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) de varios individuos, todo por una mínima inversión de recursos (Etter et al., 2011). Además permite

responde una gran variedad de preguntas ecológicas, evolutivas y de conservación sobre todo tipo de organismos (Andrews et al., 2016).

A pesar de que diversos estudios han permitido la inferencia filogenética del género *Bouteloua* (Chloridoideae) (Columbus et al., 1998; Columbus et al., 2000; Peterson et al., 2015) así como para algunos grupos y especies del género en particular (Gould and Kapadia, 1964; Gould and Kapadia, 1962; Siqueiros-Delgado et al., 2013; Siqueiros-Delgado et al., 2017); desde el punto de vista filogenético es muy poco lo que se conoce acerca de las relaciones entre y dentro de las especies de cada clado y a su vez las relaciones entre clados, por ello, es necesario explorar este campo tan importante, así como algunos otros aspectos que en conjunto nos permitan entender los procesos evolutivos que han conducido a la diversificación y surgimiento de las especies, lo que proporcionaría más herramientas para determinar el valor biológico de cada especie y de sus especies hermanas.

Justificación

Debido a la condición actual de los pastizales de Norteamérica y las recientes reducciones en abundancia de una de sus especies clave, resulta importante conocer la variación genética, tasas de migración, variación fenotípica de *B. gracilis* en todo su rango, así como sus relaciones filogenéticas. El conocimiento de estos aspectos proporcionará las bases para predecir la vulnerabilidad actual de sus poblaciones y su capacidad de mantener el ritmo actual de transformaciones antropogénicas. Así mismo, dicha información sobre *B. gracilis* permitirá predecir si la vulnerabilidad el ecosistema de pastizal de Norteamérica continuará aumentando y con ello la amenaza de pérdida de los servicios que provee. De la evaluación y preservación de estas especies depende la conservación de estas comunidades, lo que representa uno de los mayores retos del hombre en el siglo XXI (Chapin III et al., 2011).

Hipótesis

El empleo de polimorfismos de nucleótido simple proporcionarán suficiente variación a nivel intraespecífico y específico que permitirá resolver que *Bouteloua gracilis* es una especie monofilética que comparte ancestría con las también entidades monofiléticas *B. chasei*, *B. scorpioides*, *B. simplex* y *B. herrera-arrietae*. Las relaciones filogenéticas entre estas especies coincidirán con una de las hipótesis previas reportadas siendo entonces que *B. scorpioides* y *B. simplex* descienden del mismo ancestro común conformando un clado, el más tempranamente divergente, este clado será a su vez hermano del clado conformado por *B. herrera-arrietae*, *B. chasei* y *B. gracilis*. Dentro de éste último, *Bouteloua gracilis* comparte ancestría con *B. chasei* y *B. herrera-arrietae* que son especies hermanas.

Respecto a la especie *Bouteloua gracilis*, el uso de un alto número de polimorfismos de nucleótido simple permitirá resolver que las poblaciones más cercanas geográficamente están más cercanamente emparentadas, que la variación genética dentro de la especie es alta y que además, la tasa de migración entre poblaciones es alta mientras estén cercanas geográficamente. La reconstrucción de haplotipos evidenciará que los haplotipos son compartidos entre poblaciones cercanas, y entonces las poblaciones del norte de Estados Unidos y las del centro de México no comparten haplotipos. Por esto, el flujo genético y la migración dentro de la especie ocurre entre las poblaciones más cercanas.

En cuanto a la morfología dentro de las poblaciones de *B. gracilis*, sí existe variación y esta se correlaciona tanto con características físicas o climáticas del hábitat donde se encuentran como con la variación genética y filogenética. Ni la variación genética, a pesar de ser alta, ni la variación morfológica de las poblaciones son suficiente para determinar subespecies o variedades dentro de *B. gracilis*. Las poblaciones de *B. gracilis* se encuentran en ambientes muy variables a lo largo de su rango y no se encuentran en un estado vulnerable.

Objetivos

General

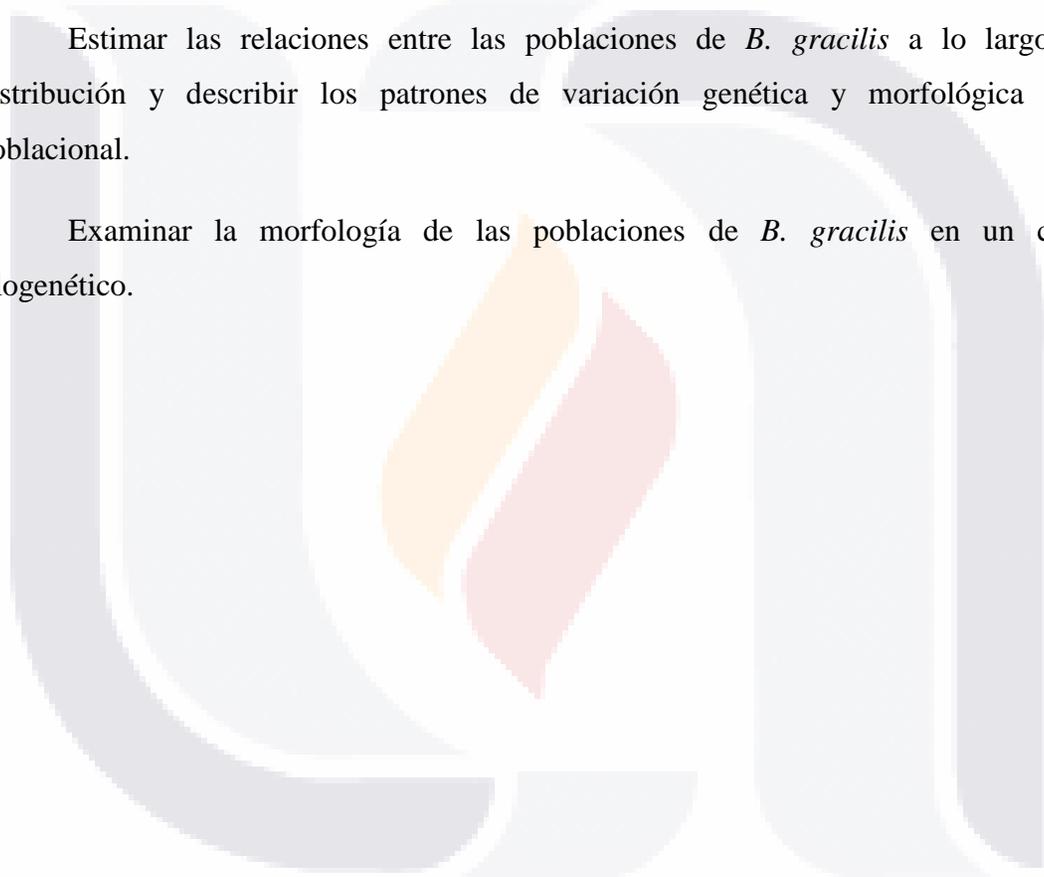
Estimar las relaciones filogenéticas de las especies del clado *Bouteloua gracilis*.

Particulares

Estimar las relaciones filogenéticas entre las especies del clado *Bouteloua gracilis*, así como determinar la monofilia de las especies del clado reconocidas hasta el momento.

Estimar las relaciones entre las poblaciones de *B. gracilis* a lo largo de su distribución y describir los patrones de variación genética y morfológica a nivel poblacional.

Examinar la morfología de las poblaciones de *B. gracilis* en un contexto filogenético.



Capítulo I. Filogenia del clado *Bouteloua gracilis*

I.1. Introducción

El clado *Bouteloua gracilis*, inicialmente descrito por Columbus *et al.* (1998) está formado por las especies *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths, *Bouteloua chasei* Swallen, *Bouteloua scorpioides* Lag., y *Bouteloua simplex* Lag. De acuerdo con la inferencia de Máxima Parsimonia de Columbus *et al.* (1998) basada en secuencias de ITS, *B. chasei* es la especie hermana de *B. gracilis* y *B. simplex* es hermana de *B. scorpioides*. El soporte del clado de *B. chasei*-*B. gracilis* no es tan fuerte como el del clado *B. scorpioides*-*B. simplex* (Fig. I.1; Columbus *et al.*, 1998). Por otro lado, recientemente la clasificación subgenérica de *Bouteloua* presentada por Peterson *et al.* (2015) basada en una inferencia de Máxima Verosimilitud empleando secuencias de cloroplasto (rpl32-trnL y rps16-trnK) e ITS, muestra este clado fuertemente soportado. Sin embargo, la topología difiere a la presentada por Columbus *et al.* (1998) pues en esta inferencia se soporta la existencia de la nueva especie *B. herrera-arrietae* incluida en el clado *B. gracilis* como hermana de *B. chasei*, modificando las relaciones dentro del clado de la siguiente manera: el clado *B. simplex*-*B. scorpioides* es hermano de *B. gracilis* y el clado *B. chasei*-*B. herrera-arrietae*, hermano de las anteriores (Fig. I.2).

Las especies de este clado se caracterizan por tener las lemas fértiles densamente pilosas (de 3.5-5.5mm de largo) con pelos a lo largo de los márgenes y las venas (por lo menos de la mitad para abajo), y 3 ápices aristados (aristas 1-3 mm largo) (Herrera Arrieta *et al.*, 2004). Es destacable que *B. scorpioides* y *B. simplex* son las únicas en *Bouteloua* que desarrollan solo una rama por inflorescencia (Columbus, 1996) aunque se ha reportado que algunos ejemplares de *B. simplex*, principalmente de Sudamérica, pueden llegar a presentar dos espiguillas por rama (Peterson *et al.* 2015) y por otro lado, individuos de *B. gracilis* pueden presentar una sola espiga por rama. *B. chasei* y *B. scorpioides* presentan las láminas foliares cilíndricas enrolladas las cuales de acuerdo con Columbus (1996) difieren poco y comparten una combinación única de características anatómicas.

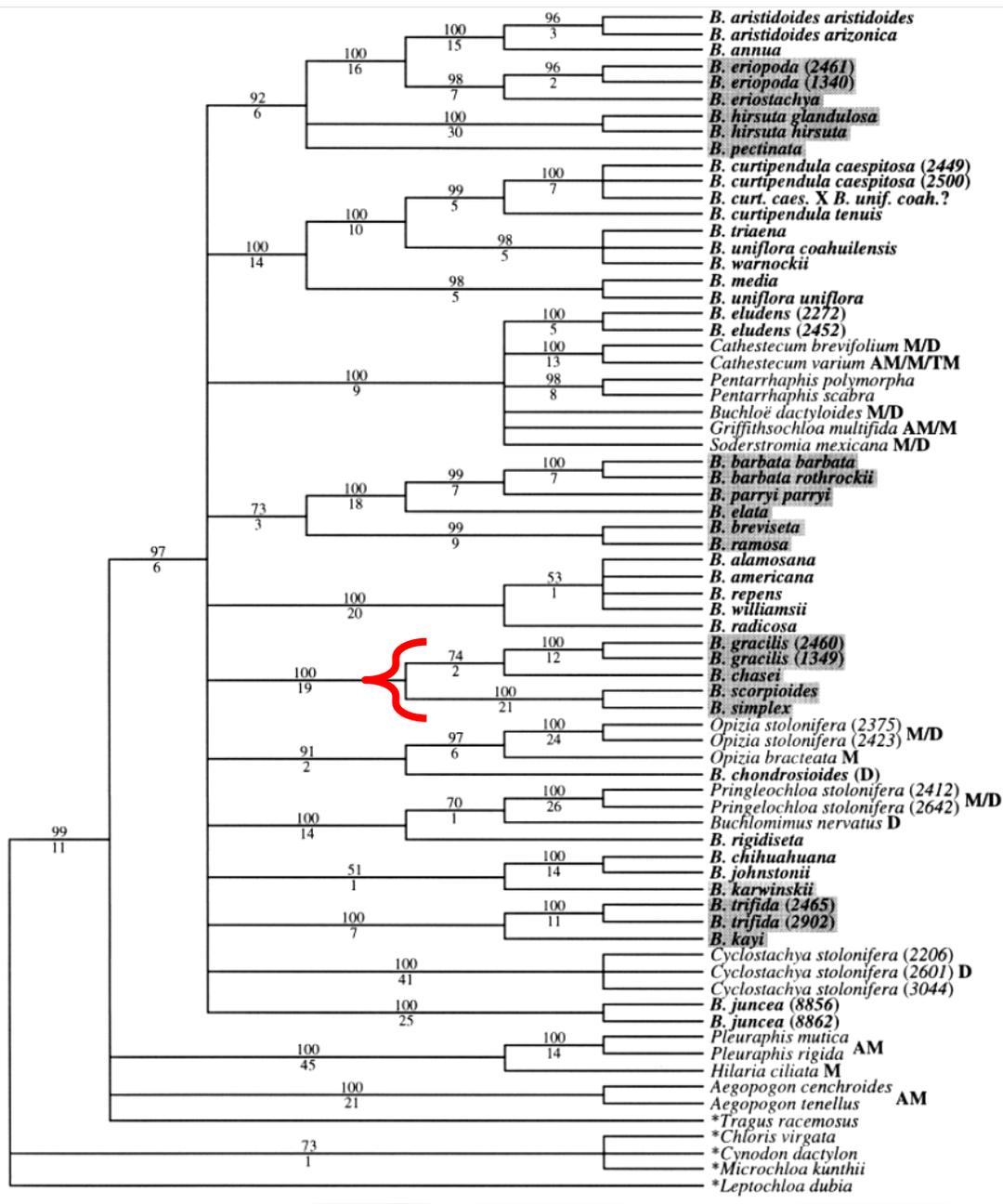


Figura I. 1. Inferencia filogenética de *Bouteloua* y géneros relacionados, obtenida de Columbus et al. (1998): Árbol consenso estricto de 4747 árboles más parsimoniosos (PAUP) obtenidos del análisis de secuencias de la región ITS. Los números sobre las ramas son los valores de soporte bootstrap (Columbus et al., 1998). El corchete rojo indica el complejo *Bouteloua gracilis*.

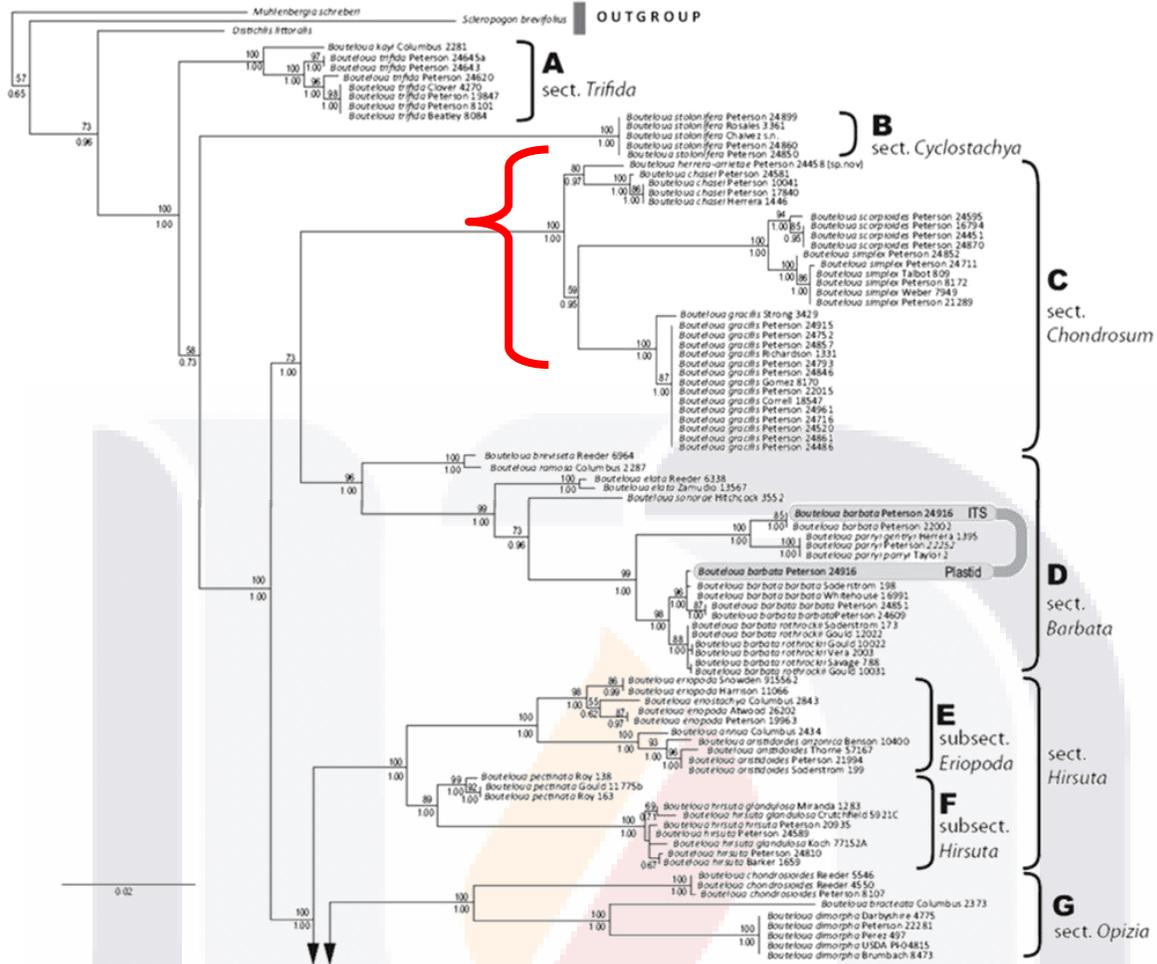


Figura I. 2. Inferencia filogenética del género *Bouteloua* obtenida por Peterson et. al. (2016), obtenida con el método de Máxima Verosimilitud a partir de secuencias de plastidio (rpl32-trnL y rps16-trnK) e ITS. Los números sobre las ramas son los valores de bootstrap y los números debajo de las ramas son probabilidades posteriores.

Bouteloua gracilis es un pasto perenne con distribución amplia en Norteamérica, desde el sur de Canadá hasta el centro de México (Fig. I.3). Es considerada elemento principal de los pastizales naturales de Norteamérica (Gould, 1980). Se ha reportado que presenta variación morfológica en poblaciones del oeste de Estados Unidos y en México y es una especie poliploide con varios niveles de ploidía ($2n$: 20, 21, 28, 35, 40, 42, 60, 61, 77, 84) (Gould, 1980; McGinnies et al., 1988). *Bouteloua chasei* es un pasto perenne con distribución restringida a los suelos yesosos del noreste de México (Fig. I.4). *Bouteloua herrera-arrietae* es un pasto perenne con distribución conocida solo en la localidad tipo en Galeana, Nuevo

León (Fig. I.5). *Bouteloua scorpioides* es un pasto perenne endémico del centro de México y *B. simplex* es el único anual de este grupo y el que presenta la distribución más amplia, encontrándose en Norte y Sudamérica (Gould, 1980; Herrera-Arrieta et al. 2004; Fig. I.6, I.7).

Hasta ahora la metodología que se ha empleado para resolver la filogenia de este clado ha sido la secuenciación simple (Sanger) de marcadores moleculares, ya sea de núcleo (ITS, Columbus et al., 1998) o la combinación de marcadores de cloroplasto y núcleo (Peterson et al. 2015). Sin embargo estas aproximaciones han generado inferencias incongruentes entre sí, por lo que no quedan claras las relaciones dentro del clado. Por otro lado, específicamente para la especie *B. gracilis*, los marcadores empleados no han permitido resolver sus relaciones intraespecíficas (Fig.I.2) Es por ello que en este trabajo se empleó una metodología que permite secuenciar simultáneamente centenas a miles de millones de polimorfismos de nucleótido simple de varios individuos mediante la llamada *secuenciación de fragmentos asociados a sitios de restricción* (restriction site-associated sequencing-RADseq; (Etter et al., 2011) empleando Secuenciación de Nueva Generación (SNG). Esta metodología permite responder una variedad de preguntas ecológicas, evolutivas y de conservación sobre cualquier organismo (Andrews et al., 2016).



Figura I. 3. Hábito y espigas de *Bouteloua gracilis* en un pastizal natural en Montana, Estados Unidos.



Figura I. 4. *Bouteloua chasei* en pastizal gipsófilo de Matehuala, San Luis Potosí, México.



Figura I. 5. Hábito y espigas de *Bouteloua herrera-arrietae* en su localidad tipo en Galeana Nuevo León, México.



Figura I. 6. Hábito y espiga de *Bouteloua scorpioides* creciendo en un matorral abierto del centro de México.



Figura I. 7. Hábito y espiga de *Bouteloua simplex* en Asientos, Aguascalientes.

I.2. Métodos

Colectas en campo. Se colectaron hojas frescas de plantas de *Bouteloua gracilis*, *B. herrera-arrietae*, *B. chasei*, *B. scorpioides*, *B. simplex*, *B. ramosa*, *B. trifida*, *B. dimorpha* y *B. stolonifera* (Cuadro I.1). En cada localidad se colectaron de uno a cinco individuos de cada población, de los cuales se tomaron muestras de hojas en fresco y se colocaron en bolsas con sílica gel para su deshidratación y conservación. De cada colecta se obtuvo un ejemplar para ser depositado en el herbario de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (HUAA), Aguascalientes, México y en el herbario Rancho Santa Ana Botanic Garden (RSA), California, EUA.

Extracción de ADN. Se pesó entre 0.1 y 0.4 g de tejido de hoja deshidratada y se colocó en un tubo de 1.5 ml. El tejido se homogenizó en el Tissue Lyser II- QIAGEN usando perlas de acero inoxidable. Se aplicó un ciclo de disrupción a 30/s por 2 a 3 minutos; en caso de ser necesario se aplicaron dos ciclos. Al tejido homogeneizado se le extrajo el ADN siguiendo el protocolo CTAB 2X (Doyle, 1987) seguido de un paso de purificación que consistió en duplicar el volumen de resuspensión del ADN con agua destilada estéril (vol. total máx. 200 μ L) y agregar 2 μ L de RNasa e incubar a 37°C por una hora. Posterior a la incubación, se realizó una extracción (cloroformo1:24 isoamilalcohol) con el fin de eliminar sales de la enzima y el ADN se resuspendió en un volumen final de 50 μ L con agua destilada estéril. Cada muestra fue cuantificada usando el fluorómetro Qbit (kit dsDNA Assay) de Invitrogen y en caso de ser necesario se realizaron diluciones de las muestras para tener todas las muestras a la misma concentración molar (20 ng/ μ L).

Preparación de la biblioteca genómica y secuenciación

Las bibliotecas genómicas se prepararon siguiendo el protocolo de Etter et al. (2011) con algunas modificaciones (Anexo A). Para cada muestra 300 ng de ADN fueron digeridos con la enzima de alta fidelidad *SbfI* (New England Biolabs). Se procesaron 94 muestras simultáneamente (Cuadro I.1). Los códigos de identificación empleados para cada una de las muestras fueron de 6 a 10 pb de longitud difiriendo por lo menos en dos bases (Anexo B). Después de restringir el ADN de cada muestra, se juntaron para formar la biblioteca genómica la cual se sometió a sonicación en un Covaris S220 para producir fragmentos de aproximadamente 400 pb, posteriormente se seleccionaron los fragmentos de entre 360 y 600

pb empleando cartuchos de agarosa al 1.5% (Pippin Prep; Sage Science, Beverly, MA). La amplificación final para el enriquecimiento de la biblioteca genómica se dividió en reacciones múltiples de 25µl, realizando 18 ciclos para cada amplificación (Anexo F). El tamaño, calidad y cantidad de la biblioteca genómica se evaluó con el Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) empleando el DNA 1000 Kit. La secuenciación de la biblioteca se obtuvo mediante lecturas sencillas de 150 pb de longitud en una línea de la plataforma Illumina NextSeq500 en el IIGB Genomic Core de la Universidad de California, Riverside (California, EUA).

Filtrado de calidad y recuperación de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP).

Las secuencias crudas se procesaron empleando el software ipyrad v.0.7.17 (Eaton, 2014). El alineamiento se realizó *de novo*. A cada lectura se le cortaron 6 pb al inicio para eliminar el remanente del sitio de restricción de la enzima y se estableció que las lecturas quedaran a una longitud máxima de 145 pb. Los parámetros de alineamiento se establecieron según indica el Cuadro I.2. Aunque no todas las especies del clado son diploides, se determinó que **dos** fuera el número máximo de alelos únicos permitidos para generar el consenso de las lecturas ya que la recuperación de loci se realiza bajo el supuesto de diploidía además no se observaron diferencias en la heterocigosidad al variar el número de alelos de 2 (diploide) a 8 (poliploide). Algunas muestras (seis) se eliminaron de los análisis posteriores, debido a que tenían muy pocas o demasiadas lecturas o porque no tenían suficiente cobertura para las mismas.

En total se realizaron dos alineamientos, uno creado para inferir la filogenia del clado *B. gracilis*, el cual incluyó 10 muestras de *B. gracilis*, dos de *B. chasei* y *B. herrera-arrietae*, tres de *B. scorpioides* y *B. simplex*. Así mismo se incluyó una muestra de *B. dimorpha*, *B. ramosa*, *B. stolonifera* y *B. trifida* para formar el grupo externo. El otro alineamiento, llamado **a1** se realizó solo con las 74 muestras de las poblaciones de *B. gracilis* y las muestras de las especies hermanas de *B. gracilis* para formar el grupo externo.

Cuadro I.1. Muestras incluidas en la biblioteca genómica. Abreviaciones de los colectores= JM: Julio Martínez, JTC: J. Travis Columbus, MAG: Marcela Avendaño-González, MES: María Elena Siqueiros-Delgado.

Especie	Latitud	Longitud	Localidad	País	n	ID
<i>B. chasei</i>	24.948	-100.242	Mpio. Galeana, Nuevo León	México	1	70-MAG
<i>B. chasei</i>	23.757	-100.902	Mpio. Villa de Guadalupe, San Luis Potosí	México	1	48-MAG
<i>B. dimorpha</i>	19.186	-104.533	Mpio. Cihuatlán, Jalisco	México	1	3739-JTC
<i>B. gracilis</i>	18.971	-97.795	Mpio. Acticpan de Morelos, Puebla	México	2	8a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	28.922	-105.764	Mpio. Aldama, Chihuahua	México	2	5435, 5436-MES
<i>B. gracilis</i>	22.328	-100.793	Mpio. Armadillo de los Infante, San Luis Potosí	México	2	38, 39-MAG
<i>B. gracilis</i>	36.932	-109.144	Apache Co., Arizona	EUA	2	144a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	28.610	-105.841	Mpio. Aquiles Serdán, Chihuahua	México	2	5423, 5427-MES
<i>B. gracilis</i>	24.298	-100.008	Mpio. Aramberri, Nuevo León	México	2	2946, 2947-JM
<i>B. gracilis</i>	35.317	-99.633	Beckham Co, Oklahoma	EUA	1	3361-JTC
<i>B. gracilis</i>	29.883	-106.927	Mpio. Buenaventura, Chihuahua	México	2	5149, 5150-MES
<i>B. gracilis</i>	44.050	-105.133	Campbell Co., Wyoming	EUA	1	3223-JTC
<i>B. gracilis</i>	33.333	-108.783	Catron Co., New México	EUA	1	3958-JTC
<i>B. gracilis</i>	38.814	-106.270	Chaffee Co., Colorado	EUA	2	147a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	42.274	-100.537	Cherry Co., Nebraska	EUA	2	153a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	32.215	-109.784	Cochise Co., Arizona	EUA	2	160a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	35.950	-112.183	Coconino Co., Arizona	EUA	1	3875-JTC
<i>B. gracilis</i>	36.730	-111.585	Coconino Co., Arizona	EUA	2	143a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	24.765	-103.612	Mpio. Cuencamé, Durango	México	2	91, 92-MAG
<i>B. gracilis</i>	30.943	-104.812	Culberson Co., Texas	EUA	2	157a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	23.935	-105.113	Mpio. Durango, Durango	México	2	5317, 5318-MES
<i>B. gracilis</i>	21.586	-102.262	Mpio. Encarnación de Díaz, Jalisco	México	2	5345, 5346-MES
<i>B. gracilis</i>	23.143	-102.840	Mpio. Fresnillo, Zacatecas	México	2	107, 108-MAG
<i>B. gracilis</i>	30.194	-107.662	Mpio. Galeana, Chihuahua	México	2	5155a, 5157a-MES
<i>B. gracilis</i>	24.690	-100.187	Mpio. Galeana, Nuevo León	México	1	75-MAG

Cuadro I.1. Muestras incluidas en la biblioteca genómica. Abreviaciones de los colectores= JM: Julio Martínez, JTC: J. Travis Columbus, MAG: Marcela Avendaño-González, MES: María Elena Siqueiros-Delgado.

Especie	Latitud	Longitud	Localidad	País	n	ID
<i>B. gracilis</i>	32.842	-108.144	Grant Co., New México	EUA	2	158a, 158b-MAG
<i>B. gracilis</i>	44.455	-100.160	Huges Co., South Dakota	EUA	2	152a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	34.464	-99.308	Jackson Co., Oklahoma	EUA	2	156a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	43.616	-106.559	Johnson Co., Wyoming	EUA	2	149a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	21.761	-101.848	Mpio. Lagos de Moreno, Jalisco	México	2	19, 20-MAG
<i>B. gracilis</i>	41.352	-104.831	Laramie Co., Wyoming	EUA	2	148a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	37.771	-104.414	Las Ánimas Co., Colorado	EUA	2	146a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	37.389	-99.628	Liberty Co., Kansas	EUA	2	155a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	46.816	-100.965	Morton Co., North Dakota	EUA	2	151a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	39.796	-99.923	Norton Co., Kansas	EUA	2	154a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	36.681	-106.118	Rio Arriba Co., New México	EUA	2	145a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	23.879	-103.092	Mpio. Rio Grande, Zacatecas	México	1	5107-MES
<i>B. gracilis</i>	22.616	-101.737	Mpio. Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí	México	2	116, 120-MAG
<i>B. gracilis</i>	25.229	-101.026	Mpio. Saltillo, Coahuila	México	2	79, 81-MAG
<i>B. gracilis</i>	34.157	-116.784	San Bernardino Co., California	EUA	2	162a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	21.555	-101.298	Mpio. San Felipe, Guanajuato	México	2	132, 133-MAG
<i>B. gracilis</i>	35.917	-107.050	Sandoval Co., New México	EUA	1	3886-JTC
<i>B. gracilis</i>	31.418	-110.697	Santa Cruz Co., Arizona	EUA	2	161a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	45.678	-108.900	Stillwater Co., Montana	EUA	2	150a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	37.401	-113.510	Washington Co., Utah	EUA	2	141a, b-MAG
<i>B. gracilis</i>	28.392	-108.733	Mpio. Yécora, Sonora	México	2	5448, 5449-MES
<i>B. herrera-arrietae</i>	24.687	-100.217	Mpio. Galeana, Nuevo León	México	1	55-MAG
<i>B. herrera-arrietae</i>	25.310	-101.070	Mpio. Saltillo, Coahuila	México	1	4818a-MES
<i>B. ramosa</i>	28.922	-105.764	Mpio. Aldama, Chihuahua	México	1	5442-MES
<i>B. scorpioides</i>	25.858	-103.795	Mpio. Cuencamé, Durango	México	1	5114-MES
<i>B. scorpioides</i>	23.688	-103.212	Mpio. Fresnillo, Zacatecas	México	1	96-MAG

Cuadro I.1. Muestras incluidas en la biblioteca genómica. Abreviaciones de los colectores= JM: Julio Martínez, JTC: J. Travis Columbus, MAG: Marcela Avendaño-González, MES: María Elena Siqueiros-Delgado.

Especie	Latitud	Longitud	Localidad	País	n	ID
<i>B. scorpioides</i>	23.540	-101.922	Mpio. Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí	México	1	121-MAG
<i>B. scorpioides</i>	20.968	-100.768	Mpio. San Miguel de Allende, Guanajuato	México	1	136-MAG
<i>B. simplex</i>	35.895	-104.875	Mora Co., Nuevo México	México	1	3893-JTC
<i>B. simplex</i>	22.267	-102.273	Mpio. Ojuelos, Jalisco	México	1	30-MAG
<i>B. simplex</i>	-26.742	-65.758	Dpto. Tafí del Valle, Tucumán	Argentina	1	3178-JTC
<i>B. stolonifera</i>	22.615	-101.736	Mpio. Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí	México	1	4130-JTC
<i>B. trifida</i>	32.055	-110.656	Pima, Arizona	EUA	1	2465-JTC

Cuadro I.2. Valores de los parámetros para alineamiento en ipyrad (v.0.7.11)

Bgr_clade	[0] [<i>assembly_name</i>]: Assembly name. Used to name output directories for assembly steps
~/bigdata	[1] [<i>project_dir</i>]: Project dir (made in current direction if not present)
	[2] [<i>raw_fastq_path</i>]: Location of raw non-demultiplexed fastq files
	[3] [<i>barcodes_path</i>]: Location of barcodes file
~/*.fastq.gz	[4] [<i>sorted_fastq_path</i>]: Loc.ofdemultiplexed/sortedfastq files
denovo	[5] [<i>assembly_method</i>]: Assembly method (denovo, reference, denovo+reference, denovo-reference)
	[6] [<i>reference_sequence</i>]: Location of reference sequence file
rad	[7] [<i>datatype</i>]: Datatype (see docs): rad, gbs, ddrad, etc.
TGCAGG	[8] [<i>restriction_overhang</i>]: Restriction overhang (cut1,) or (cut1, cut2)
5	[9] [<i>max_low_qual_bases</i>]: Max low quality base calls (Q<20) in a read
33	[10] [<i>phred_Qscore_offset</i>]: phred Q score offset (33 is default and very standard)
6	[11] [<i>mindepth_statistical</i>]: Min depth for statistical base calling
6	[12] [<i>mindepth_majrule</i>]: Min depth for majority-rule base calling
15000	[13] [<i>maxdepth</i>]: Max cluster depth within samples
0.90	[14] [<i>clust_threshold</i>]: Clustering threshold for de novo assembly
1	[15] [<i>max_barcode_mismatch</i>]: Max number of allowable mismatches in barcodes
2	[16] [<i>filter_adapters</i>]: Filter for adapters/primers (1 or 2=strict)
50	[17] [<i>filter_min_trim_len</i>]: Min length of reads after adapter trim
2	[18] [<i>max_alleles_consens</i>]: Max alleles per site in consensus sequences
5	[19] [<i>max_Ns_consens</i>]: Max N's (uncalled bases) in consensus (R1, R2)
8	[20] [<i>max_Hs_consens</i>]: Max Hs (heterozygotes) in consensus (R1, R2)
4	[21] [<i>min_samples_locus</i>]: Min # samples per locus for output
20	[22] [<i>max_SNPs_locus</i>]: Max # SNPs per locus (R1, R2)
8	[23] [<i>max_Indels_locus</i>]: Max # of indels per locus (R1, R2)
0.5	[24] [<i>max_shared_Hs_locus</i>]: Max # heterozygous sites per locus (R1, R2)
6, 145, 0, 0	[25] [<i>trim_reads</i>]: Trim raw read edges (R1>, <R1, R2>, <R2) (see docs)
0, 0, 0, 0	[26] [<i>trim_loci</i>]: Trim locus edges (see docs) (R1>, <R1, R2>, <R2)
*all	[27] [<i>output_formats</i>]: Output formats (see docs)
	[28] [<i>pop_assign_file</i>]: Path to population assignment file

Filogenética

Las inferencias de máxima verosimilitud (ML) se obtuvieron empleando la herramienta RAxML (Stamatakis, 2006) desde la plataforma CIPRES (Miller et al., 2015) y con el programa IQTREE (Nguyen et al., 2015). Para todas las inferencias se realizaron 1000 réplicas de bootstrap. Los análisis de inferencia bayesiana se realizaron con el programa MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) empleando 10000000 generaciones y muestreando cada 1000 árboles, el 25% se descartó (burnin). Para todos los análisis se empleó el modelo de evolución molecular GTR+gamma ya que es el modelo predeterminado en RAxML y ha sido empleado para estudios de RAD-seq anteriormente (Eaton et al., 2017). Los árboles resultantes se enraizaron y visualizaron usando el programa FigTree v1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

I.3. Resultados

Calidad de filtrado y recuperación de SNPs

El total de lecturas de 151 pb obtenidas fueron 185,369585 equivalente a 6,952 Mb secuenciadas con más del 85% de buena calidad (Q30 phred quality score) y una calidad promedio de 32.84 lo que significa que la exactitud de secuenciación de cada base fue del 99.9% (Illumina Q-scores). Las secuencias presentaron un porcentaje de GC de 52. El número de lecturas promedio por muestra fue 1,538912 mientras que el mínimo de lecturas en una muestra fue de 263,321 y el máximo de 4,353014. Cada lectura comenzaba con la secuencia de identificación de la muestra (barcode de 10 pb de longitud), el residuo del sitio de restricción de 6 pb (oveghang) y 134 pb de datos de secuenciación del fragmento.

El número de loci retenidos en el alineamiento para la inferencia de la filogenia del clado fue de 7126 con 134360 SNPs mientras que para el alineamiento **a1** (para inferencia genealógica de *B. gracilis*) se retuvieron 33807 loci con 164045 SNPs.

*Filogenia del clado *B. gracilis*, *B. chasei*, *B. herrera arrietae*, *B. scorpioides*, *B. simplex**

Tanto la inferencia obtenida con el Método Bayesiano, como la obtenida con Máxima Verosimilitud coincidieron en las relaciones entre las cinco especies del clado. El clado más tempranamente divergente incluye a las muestras de *B. scorpioides* y *B. simplex*. Este clado

es hermano del clado formado por *B. gracilis* – *B. herrera-arrietae*, *B. chasei* con alto valor de soporte (1.0 PP y 100% BS; Figura I.8). A su vez el clado *B. gracilis* – *B. herrera-arrietae*, *B. chasei* obtuvo 0.84 PP en la inferencia Bayesiana, mientras que en la de máxima verosimilitud el soporte fue de 69% (BS). La monofilia se corroboró para cada una de las entidades evolutivas.

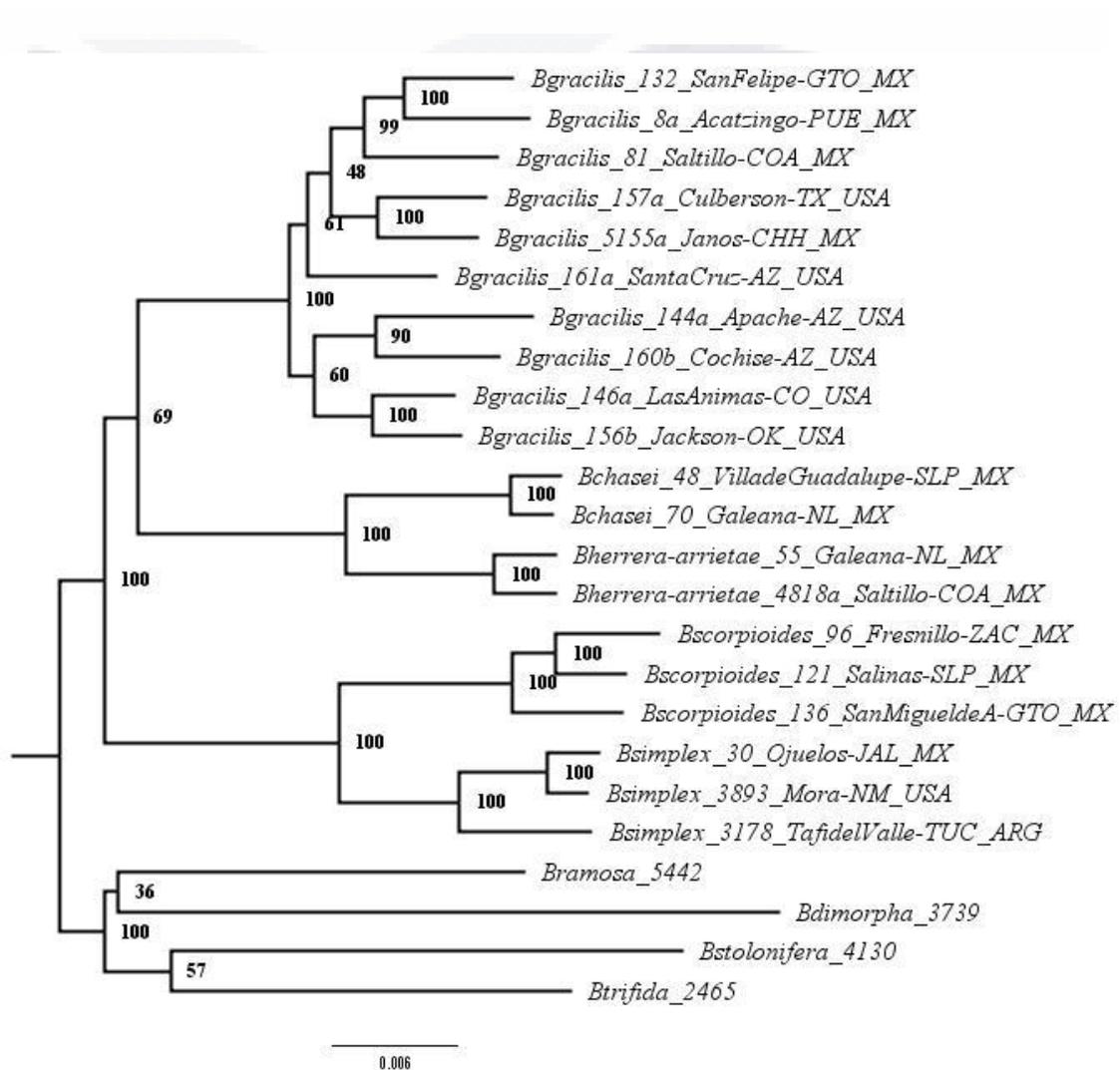


Figura I. 8. Árbol de Máxima Verosimilitud empleando 7126 loci de especies del clado *B. gracilis* y especies hermanas como grupo externo. Los números en cada nodo indican el soporte obtenido con 1000 replicas de bootstrap.

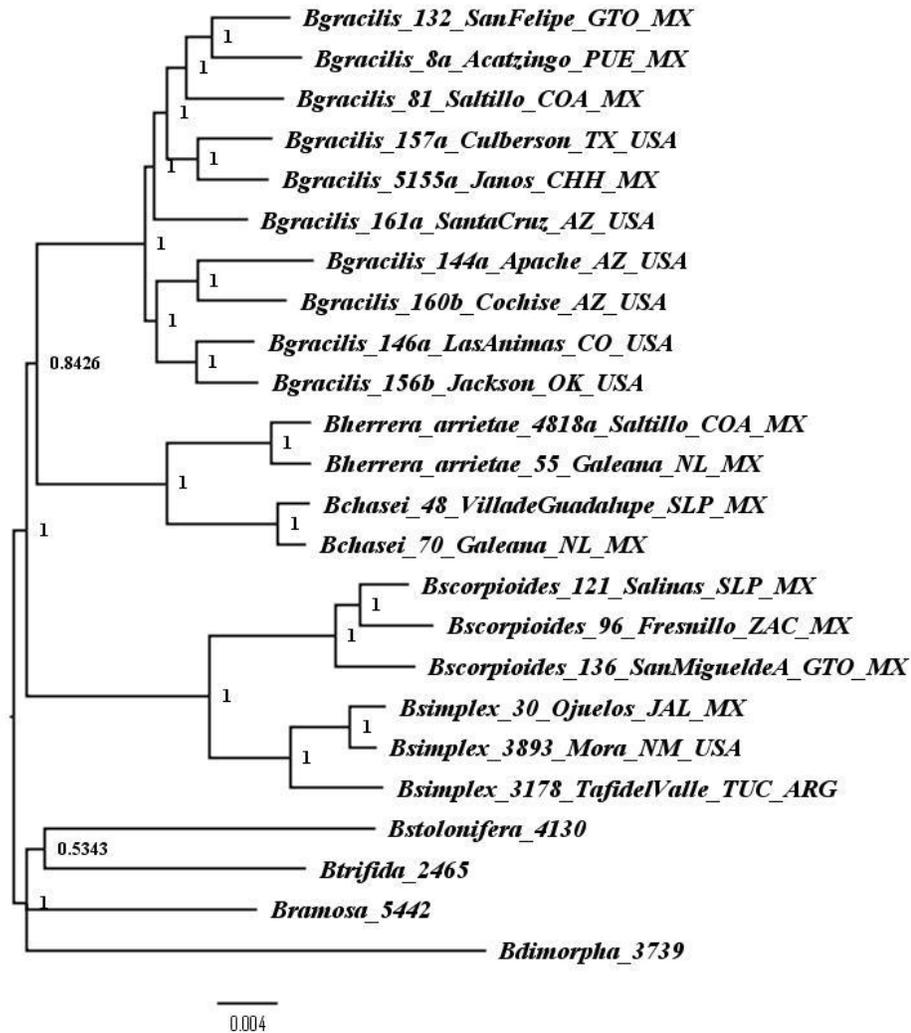


Figura I. 9. Árbol de Inferencia Bayesiana empleando 7126 loci de especies del clado *B. gracilis* y especies hermanas como grupo externo. Los números en cada nodo indican la probabilidad posterior (PP).

Las muestras de *B. herrera-arrietae* se colectaron en la localidad tipo en Galeana, Nuevo León (Fig. I.10), además, en este trabajo se reporta un nuevo registro de la especie en Saltillo, Coahuila, México, donde fue encontrada creciendo en matorral xerófilo con suelo calcáreo-rocoso, asociada a *Mimosa zigophylla* Benth. y *Larrea tridentata* (DC.) Coville.



Figura I. 10. Vegetación y hábitat de la localidad tipo de *Bouteloua herrera-arrietae* en Galeana, Nuevo León.

Genealogía de Bouteloua gracilis

La inferencia de máxima verosimilitud muestra una topología bien resuelta, en la que las muestras de México y EUA comparten ancestría (Fig. I.11). El clado que incluye a todas las muestras de México (A, 99% BS) se divide en dos clados altamente soportados (A1& A2, 93% cada uno); el clado A2 contiene muestras del centro y norte de México incluyendo a la población de Sonora como la población más tempranamente divergente. El clado hermano A1 incluye muestras de Chihuahua y Texas. En la otra rama, el clado de EUA (B, 100% BS) se separa en dos grupos que coinciden con su origen geográfico: la gran planicie (B1) y la región montañosa del oeste (B2, 100% BS).

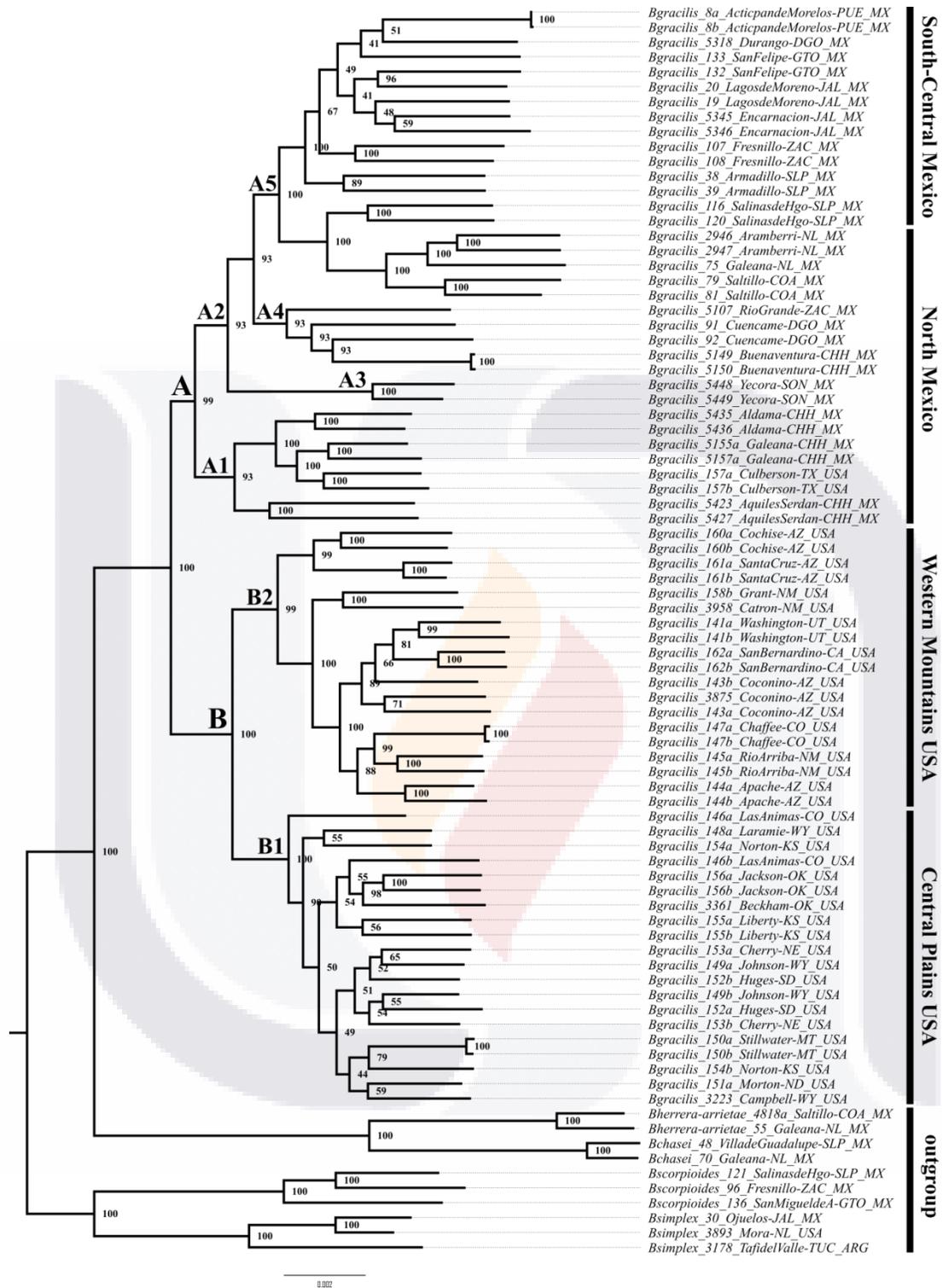


Figura I. 11. Inferencia filogenética molecular de máxima verosimilitud empleando 33807 loci y 164045 SNPs de *B. gracilis* y sus especies hermanas (grupo externo). Generado empleando IQTREE con 1000 réplicas de bootstrap ultrarrápido, los valores de soporte se muestran en los nodos; Log-likelihood: -7270163.539, longitud total del árbol: 0.296

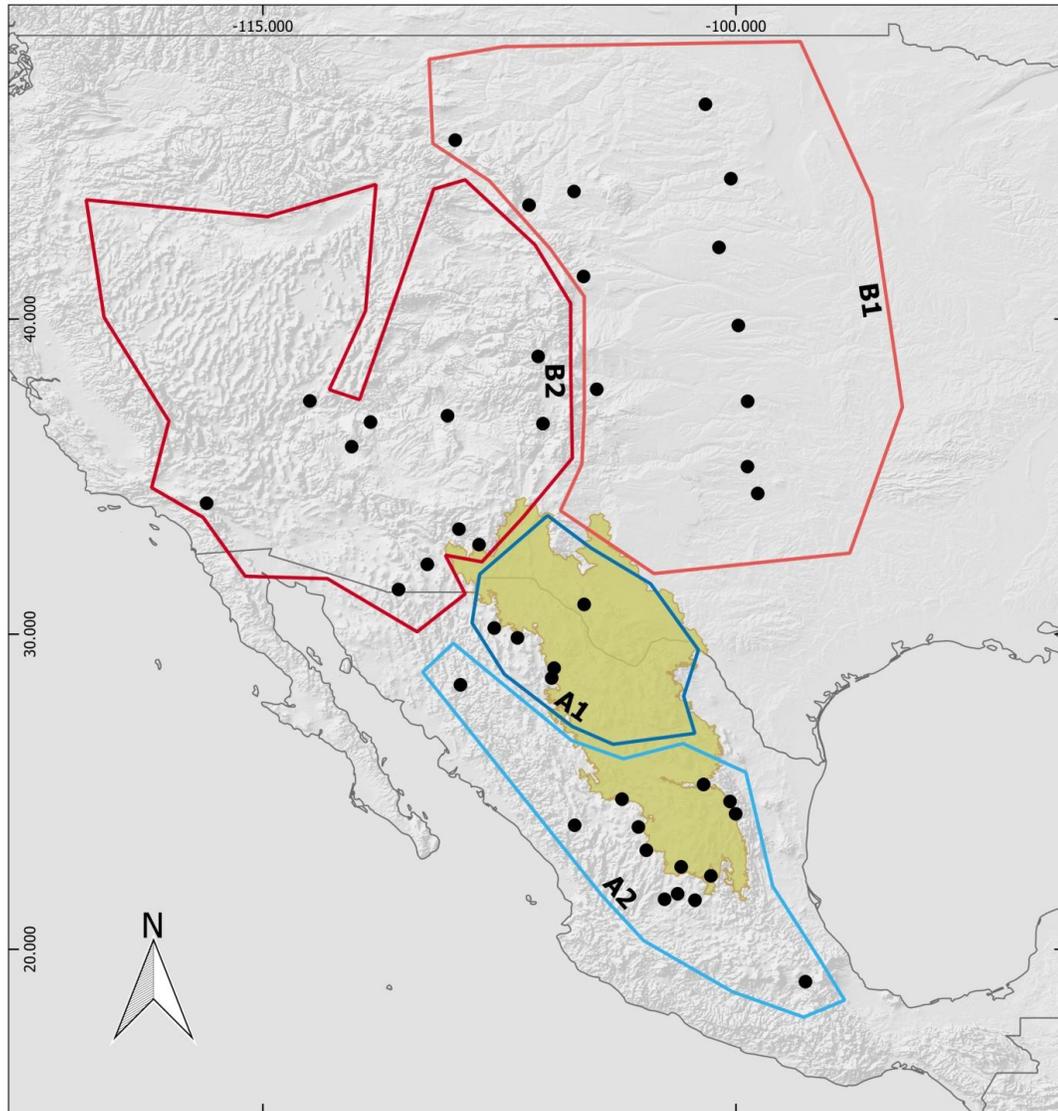


Figura I. 12. Mapa de la ubicación geográfica de los clados filogenéticos de *B. gracilis*. Los clados de México delimitados con líneas azules (A1 y A2) y los clados de EUA delimitados con líneas rojas (B1 y B2). En amarillo se muestra el Desierto Chihuahuense.

I.4. Discusión

Filogenia del clado B. gracilis-B. simplex

La filogenia del clado *B. gracilis-B. simplex* había sido inferida anteriormente dando soporte a la monofilia del clado y dejando claro que el uso de marcadores moleculares proporcionan suficiente variación para inferir relaciones a nivel de especies (Columbus et al., 1998; Peterson et al., 2015). Sin embargo el número limitado de muestras incluidas y las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diferencias en el número de especies consideradas en las dos inferencias filogenéticas anteriores, así como las historias evolutivas contrastantes entre el ADN de núcleo y cloroplasto, son variables que influyeron en generar incertidumbre con respecto a las relaciones dentro del clado *B. gracilis*-*B. simplex*.

En este estudio se empleó un método diferente a los anteriormente empleados para inferir filogenias dentro del género *Bouteloua*, lo que resultó en topologías bien resueltas. La relación entre *B. chasei* y *B. gracilis* fue establecida primero por Columbus et al (1998), sin embargo cuando Peterson et al. (2015) incluyó a *B. herrera-arrietae*, dicha relación no se vio representada en la filogenia. La inferencia presentada en este estudio confirma la relación entre *Bouteloua chasei*-*B. herrera-arrietae* con un alto soporte (100 BS, 1.0 PP), así como la relación de estas con *B. gracilis*. La relación de *Bouteloua scorpioides* y *B. simplex* también fue confirmada así como la relación de hermandad de este clado con *B. gracilis*, *B. herrera-arrietae* y *B. chasei*.

La relación (*B. gracilis* (*B. chasei*-*B. herrera-arrietae*)) se presenta con soportes de 0.84 PP y 69% BS los cuales se consideran bajos y sorprendentemente son más bajos que los obtenidos por Columbus et al. (1998). Es importante mencionar que dicha inferencia empleó solo un marcador molecular de núcleo ITS con una longitud de 705 pb, mientras que la inferencia presentada aquí considera 33807 loci y una matriz final de secuencias con una longitud de 4413111 pb. Aumentar el número de loci incrementa la señal filogenética de las relaciones entre las especies (Eaton et al., 2017; Knowles and Kubatko, 2010), este argumento explica la obtención de valores de 100% de bootstrap para las relaciones entre *B. gracilis* y el grupo externo en la Figura II.11. Sin embargo una desventaja, ya sea de emplear un mayor número de loci o incrementar la longitud de las secuencias en la matriz de datos empleada para realizar las inferencias, es que la cantidad de datos faltantes también aumenta y estos a su vez disminuyen los valores de soporte/robustez del árbol. En este caso el alineamiento **a1** presenta una alta cantidad de datos faltantes por la ausencia de loci completos ya que las 24 muestras solo tuvieron en común 4 de los 7126 loci empleados. Independientemente de la precisión con la que se pueda estimar un árbol genético, la realidad es que los árboles genéticos difieren entre los loci y es posible que no coincidan con el árbol de especies subyacentes, ante esto, se sugiere que las metodologías actuales son insuficientes e ineficaces

en el manejo de las secuencias de ADN que ahora se recopilan de múltiples loci (Knowles and Kubatko, 2010). Por lo anterior, a pesar de que los valores de soporte son bajos para algunas relaciones interespecíficas, éstas fueron constantes en todos los árboles obtenidos lo que nos indica que las relaciones inferidas pueden estar reflejando relaciones verdaderas.

Por otro lado, para todas las inferencias se empleó el modelo de evolución GTR+ Γ por ser el predeterminado en el programa RAxML que se empleó para realizar inferencias de ML. Sin embargo, cada uno de los locus tiene genes con su propia historia y tasa de cambios, por lo que se recomienda sean modelados bajo su propio modelo evolutivo. Dada la gran cantidad de loci empleados en este estudio, esto resultó computacional y analíticamente desafiante. Es por ello que las inferencias presentadas aquí representan hipótesis con cierto grado de error que nos proporcionan una idea general del árbol de las especies.

Las especies hermanas de *B. gracilis* han sido muy poco estudiadas hasta el momento. En este estudio se confirma que *Bouteloua herrera-arrietae* es hermana de *B. chasei* a pesar de su similitud morfológica con *B. gracilis*. Dado que *B. herrera-arrietae* solo ha sido reportada en la localidad tipo, aquí confirmamos su presencia en Saltillo, Coahuila, México (I.1) en donde crece sobre suelos rocosos de matorral xerófilo con *Mimosa zigophylla* y *Larrea tridentata*. Este tipo de hábitat coincide con el de la localidad tipo por lo que revisando la distribución de los tipos de vegetación, se sugiere que el hábitat de esta especie se extiende hacia el límite norte del Desierto Chihuahuense con la Sierra Madre Occidental, donde este tipo de vegetación y tipo de suelo se distribuyen (Anexo G).

Por otro lado, *B. scorpioides* ha sido señalada como una especie codominante en los pastizales del centro de México. Esta especie se caracteriza por presentar una distribución limitada a dicha región del país por lo que se considera endémica del centro de México (Dávila-Aranda et al., 2004). Durante el desarrollo de este proyecto se resaltó el hecho de que *B. scorpioides* no ha sido reportada para Aguascalientes a pesar de encontrarse en los estados circundantes: Jalisco, Zacatecas, Guanajuato y San Luis Potosí (Herrera-Arrieta, et al 2004). Al revisar los ejemplares depositados en el HUAA se localizó un ejemplar de *B. scorpioides* mal identificado como *B. gracilis*, sorprendentemente éste se reportaba como colectado en El Maguey, Calvillo, Aguascalientes con fecha del 16 de octubre de 1980. Por tal motivo se realizaron búsquedas de la planta en dicha localidad, que desafortunadamente no era muy

específica. En el sitio, se buscó el hábitat adecuado donde pudiera encontrarse la planta sin éxito, se les preguntó a algunos locatarios pero no reportaron haberla visto en el área. Cabe resaltar que la localidad el Maguey se caracteriza por presentar un matorral tropical mientras que la especie *B. scorpioides* ha sido reportada en matorral y pastizal xerófilo, estos tipos de vegetación si se encuentran en Aguascalientes, pero en la zona central y este del estado (Siqueiros-Delgado et al., 2016). Se realizaron otras visitas de búsqueda a los municipios de Tepezalá, Asientos y Cosío sin ningún éxito. Los estudios de la flora del estado de Aguascalientes comenzaron hace más de 20 años y hasta ahora esta especie no ha sido encontrada, incluso el estudio más reciente de la familia Poaceae en Aguascalientes no registró su presencia en el estado (Sierra-Muñoz, 2018; tesis en proceso de publicación). Por todo lo anterior, sería interesante investigar los requerimientos ambientales que esta especie presenta pues es posible que algún factor este limitando su distribución hacia el interior del estado.

Genealogía B. gracilis

En relación a la genealogía de la especie *B. gracilis*, la suficiente variación genética obtenida de los múltiples loci empleados permitió la formación de cuatro clados principales que nos permiten conocer un poco más sobre la historia evolutiva de la especie. Se cree que el centro de origen y diversificación de las especies del género *Bouteloua* Lag. ocurrió en las áreas abiertas del norte de México, además existe evidencia de que algunas especies incluyendo a *B. gracilis*, migraron hacia el norte desde México (Beard, 2012; Rzedowski, 1975). De acuerdo con la genealogía aquí presentada, el origen de la especie no es claro dado que las muestras de México y EUA comparten ancestría. Sin embargo al observar dentro del clado de México (A, Fig. 3) las relaciones revelan que las muestras del centro de México son las últimas en divergir (Actipan de Morelos, Puebla in A5) y se originan de ancestros que debieron estar en el Norte de México (clados A1, A3, A4 y el clado tempranamente divergente A5), indicando que el origen de las poblaciones mexicanas ancestrales fue en el desierto Chihuahuense (Fig. I.12).

En contraste, el origen de las muestras de EUA es difícil de declarar (Fig. 3) sin embargo se observa que el clado B2 divergió más tempranamente que el B1. Estos clados se dividen geográficamente por las Montañas Rocallosas del Sur, una posible barrera al flujo génico

entre las poblaciones del clado B1 y B2, lo que puede observarse claramente en las poblaciones de las localidades de Colorado, pues la que se localiza sobre las montañas (Chaffe Co.) pertenece al clado B2 y la que se localiza en la planicie, al este de las montañas (Las Animas), pertenece al clado B1. Evidencia de esta premisa se discute con mayor detalle en el capítulo siguiente.



Capítulo II. Diversidad genética y estructura poblacional de *Bouteloua gracilis*

II.1. Introducción

Bouteloua gracilis (Kunth) Lag. ex Griffiths, comúnmente llamado pasto navajita azul es un pasto perenne con metabolismo C4. Es nativo de los pastizales de Norteamérica, donde se distribuye desde el sur de Canadá, centro y oeste de Estados Unidos hasta México (Gould, 1980). *Bouteloua gracilis* ha sido muy estudiada debido a su amplia distribución, su importancia en el pastoreo histórico y su rol ecológico clave en las comunidades de pastizales de Norteamérica. A lo largo de su distribución ha sido reportado como ecológica, morfológica y genéticamente variable. Se puede encontrar en climas áridos y semiáridos, es tolerante al frío y a la sequía, así como a los suelos alcalinos (Salas-Luévano et al., 2017).

Hasta el momento solo un estudio se ha enfocado en investigar la variación genética poblacional de la especie *B. gracilis*, limitado a cuatro poblaciones de “Los Llanos de Ojuelos” en el centro de México, sitio que representa la distribución sureña de la especie. Este estudio reveló variación genética significativa entre las poblaciones, siendo mayor la variación intrapoblacional que la interpoblacional. A partir de los estudios filogenéticos previos, lo que se puede inferir sobre la variación genética de esta especie es muy poco dado que los marcadores empleados (ITS, *rpL32-trnL* and *rps16-trnK*) en los dos estudios publicados (Columbus et al., 1998; Peterson et al., 2015) resultaron invariantes a nivel infraespecífico.

La variación cromosómica en *B. gracilis* ha sido evidenciada en varios estudios. La especie es poliploide (más de un par de cromosomas), específicamente, autopoliploide (Tsuchiya et al., 1992) lo que significa que posee genomas (homólogos y estructuralmente similares) duplicados (Parisod et al., 2010). Los múltiples conteos de cromosomas que se han realizado en individuos del pasto navajita azul en diferentes localidades (Fults, 1942; Gould, 1968; Gould, 1966, 2016; Nielsen and Humphrey, 1937; Reeder, 1977; Snyder and Harlan, 1953; Tsuchiya et al., 1992), han reportando valores que van de los 20 a los 84 cromosomas (Fig. II.1). En uno de los primeros estudios se propone que las formas poliploides de *B. gracilis* se encuentran en un rango geográfico más amplio y en cambio, las formas diploides ocupan hábitats más severos en Texas y Nuevo México (Snyder and Harlan, 1953).

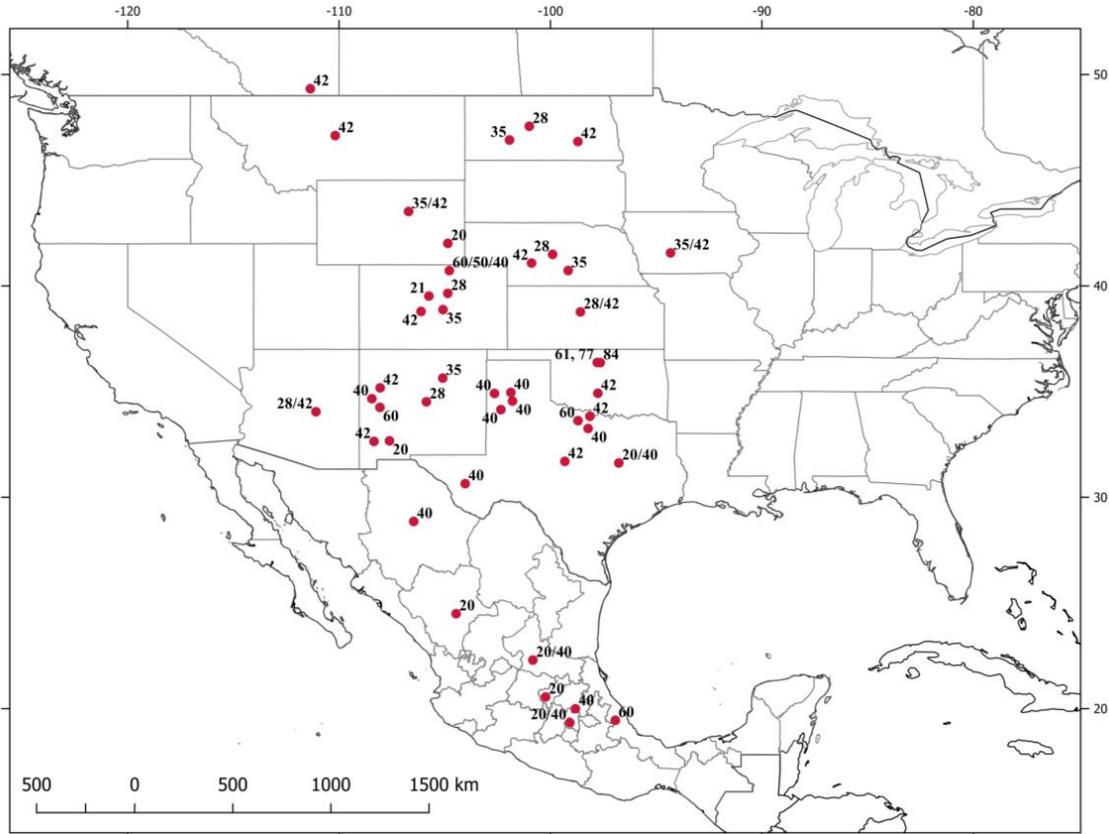


Figura II. 1. Ploidía de poblaciones de *B. gracilis* en todo su rango de distribución de acuerdo a los estudios realizados hasta el momento (Fults, 1942; Gould, 1966; Reeder, 1977; Snyder and Harlan, 1953; Tsuchiya et al., 1992).

El número de cromosomas así como la variación en morfología han sido motivos para sugerir que *B. gracilis* comprende biotipos, variedades o especies (Morales Nieto et al., 2009; Riegel, 1941) diferentes. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que para la especie, la variación de caracteres funcionales no está determinada por la ploidía de sus poblaciones (Butterfield and Wood, 2015). Por otro lado, se ha sugerido que la variación citológica de la especie es menor que la variación genética (Tsuchiya et al., 1992).

En cuanto a la variación morfológica, se han realizado diversos estudios tratando de dilucidar su origen y relación principalmente con los factores ambientales. Después de la sequía ocurrida en los pastizales de Norteamérica a partir de 1933, los esfuerzos se enfocaron en evaluar la ecología de *B. gracilis* (Albertson et al., 1966). Mediante algunos experimentos de jardín común incluyendo muestras tomadas desde Montana hasta Arizona, se reportaron patrones de crecimiento y fenología que sugirieron que las plantas de las poblaciones más

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

norteñas son más pequeñas y con maduración más temprana y en las poblaciones sureñas las plantas son más altas y con mayor profundidad de raíz (Riegel, 1940). Así mismo, existen reportes de que el número de tallos producidos en una temporada va a depender de la cantidad de agua en el suelo (Albertson et al., 1966), al igual que la cantidad de biomasa de una planta de *B. gracilis* depende de la adaptación a la temperatura local y no a la aridez del sitio (Bushey, 2018). Finalmente, el estudio más reciente sobre la plasticidad de *B. gracilis* concluye que las poblaciones están adaptadas localmente, pudiendo ser ésta lo más importante para el éxito de la especie (Bushey, 2018). Hasta el momento no se ha evaluado la correlación entre la variación morfológica y genética de la especie pues es poco lo que se conoce acerca de ésta última.

Es por lo anterior que resulta necesario integrar aspectos como la variación genética y morfológica de cada población de *B. gracilis*, una de las especies más importantes en los pastizales nativos de Norteamérica. Más aún debido a la reciente disminución en cobertura y frecuencia en la pradera de pastos cortos de Norteamérica y en el centro de México (Rondeau et al., 2018), lo que muestra la evidente vulnerabilidad que sus comunidades enfrentan en la actualidad.

II.2. Métodos

Colectas en campo. En cada localidad se colectaron de uno a cinco individuos por población (Cuadro II.1), de los cuales se obtuvieron muestras de hoja en fresco que se colocaron en bolsas con sílica gel para su deshidratación y conservación. De cada colecta se obtuvo un ejemplar para ser depositado en el herbario de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (HUAA), Aguascalientes, México y en el herbario Rancho Santa Ana Botanic Garden (RSA), California, EUA.

Las muestras colectadas se procesaron como se indica en el capítulo anterior, extrayendo el ADN y secuenciando los fragmentos de ADN asociados a sitios de restricción de la enzima *SbfI*.

Cuadro II.1. Poblaciones de *B. gracilis* muestreadas. Ho es el valor de heterocigosidad observada.

ID	Especie	Latitud	Longitud	Localidad	País	Ho
8a	<i>B. gracilis</i>	18.971	-97.795	Acticpan de Morelos, Puebla	México	0.00485
8b	<i>B. gracilis</i>	18.971	-97.795	Acticpan de Morelos, Puebla	México	0.00540
5435	<i>B. gracilis</i>	28.922	-105.764	Aldama, Chihuahua	México	0.00505
5436	<i>B. gracilis</i>	28.922	-105.764	Aldama, Chihuahua	México	0.00463
38	<i>B. gracilis</i>	22.328	-100.793	Armadillo de los Infante, San Luis Potosí	México	0.00642
39	<i>B. gracilis</i>	22.328	-100.793	Armadillo de los Infante, San Luis Potosí	México	0.00761
144a	<i>B. gracilis</i>	36.932	-109.144	Apache, Arizona	EUA	0.00750
144b	<i>B. gracilis</i>	36.932	-109.144	Apache, Arizona	EUA	0.00744
5423	<i>B. gracilis</i>	28.610	-105.841	Aquiles Serdán, Chihuahua	México	0.00794
5427	<i>B. gracilis</i>	28.610	-105.841	Aquiles Serdán, Chihuahua	México	0.00762
2946	<i>B. gracilis</i>	24.298	-100.008	Aramberri, Nuevo León	México	0.00810
2947	<i>B. gracilis</i>	24.298	-100.008	Aramberri, Nuevo León	México	0.00729
3361	<i>B. gracilis</i>	35.317	-99.633	Beckham, Oklahoma	EUA	0.00760
5149	<i>B. gracilis</i>	29.883	-106.927	Buenaventura, Chihuahua	México	0.00541
5150	<i>B. gracilis</i>	29.883	-106.927	Buenaventura, Chihuahua	México	0.00485
3223	<i>B. gracilis</i>	44.050	-105.133	Campbell, Wyoming	EUA	0.00762
3958	<i>B. gracilis</i>	33.333	-108.783	Catron, New México	EUA	0.00785
147a	<i>B. gracilis</i>	38.814	-106.270	Chaffee, Colorado	EUA	0.00511
147b	<i>B. gracilis</i>	38.814	-106.270	Chaffee, Colorado	EUA	0.00480
153a	<i>B. gracilis</i>	42.274	-100.537	Cherry, Nebraska	EUA	0.00733
153b	<i>B. gracilis</i>	42.274	-100.537	Cherry, Nebraska	EUA	0.00630
160a	<i>B. gracilis</i>	32.215	-109.784	Cochise, , Arizona	EUA	0.00726
160b	<i>B. gracilis</i>	32.215	-109.784	Cochise, Arizona	EUA	0.00697
3875	<i>B. gracilis</i>	35.950	-112.183	Coconino, Arizona	EUA	0.00757
143a	<i>B. gracilis</i>	36.730	-111.585	Coconino, Arizona	EUA	0.00703
143b	<i>B. gracilis</i>	36.730	-111.585	Coconino, Arizona	EUA	0.00758
91	<i>B. gracilis</i>	24.765	-103.612	Cuencamé, Durango	México	0.00800
92	<i>B. gracilis</i>	24.765	-103.612	Cuencamé, Durango	México	0.00704
157a	<i>B. gracilis</i>	30.943	-104.812	Culberson, Texas	EUA	0.00457
157b	<i>B. gracilis</i>	30.943	-104.812	Culberson, Texas	EUA	0.00536
5317	<i>B. gracilis</i>	23.935	-105.113	Durango, Durango	México	-
5318	<i>B. gracilis</i>	23.935	-105.113	Durango, Durango	México	0.00490
5345	<i>B. gracilis</i>	21.586	-102.262	Encarnación de Díaz, Jalisco	México	0.00701
5346	<i>B. gracilis</i>	21.586	-102.262	Encarnación de Díaz, Jalisco	México	0.00736
107	<i>B. gracilis</i>	23.143	-102.840	Fresnillo, Zacatecas	México	0.00756
108	<i>B. gracilis</i>	23.143	-102.840	Fresnillo, Zacatecas	México	0.00660
5155a	<i>B. gracilis</i>	30.194	-107.662	Galeana, Chihuahua	México	0.00476
5157b	<i>B. gracilis</i>	30.194	-107.662	Galeana, Chihuahua	México	0.00417

Cuadro II.1. Poblaciones de *B. gracilis* muestreadas. Ho es el valor de heterocigosidad observada.

ID	Especie	Latitud	Longitud	Localidad	País	Ho
75	<i>B. gracilis</i>	24.690	-100.187	Galeana, Nuevo León	México	0.00758
158a	<i>B. gracilis</i>	32.842	-108.144	Grant, New México	EUA	-
158b	<i>B. gracilis</i>	32.842	-108.144	Grant, New México	EUA	0.00734
152a	<i>B. gracilis</i>	44.455	-100.160	Huges, South Dakota	EUA	0.00364
152b	<i>B. gracilis</i>	44.455	-100.160	Huges, South Dakota	EUA	0.00671
156a	<i>B. gracilis</i>	34.464	-99.308	Jackson, Oklahoma	EUA	0.00664
156b	<i>B. gracilis</i>	34.464	-99.308	Jackson, Oklahoma	EUA	0.00667
149a	<i>B. gracilis</i>	43.616	-106.559	Johnson, Wyoming	EUA	0.00754
149b	<i>B. gracilis</i>	43.616	-106.559	Johnson, Wyoming	EUA	0.00757
19	<i>B. gracilis</i>	21.761	-101.848	Lagos de Moreno, Jalisco	México	0.00808
20	<i>B. gracilis</i>	21.761	-101.848	Lagos de Moreno, Jalisco	México	0.00748
148a	<i>B. gracilis</i>	41.352	-104.831	Laramie, Wyoming	EUA	0.00774
148b	<i>B. gracilis</i>	41.352	-104.831	Laramie, Wyoming	EUA	-
146a	<i>B. gracilis</i>	37.771	-104.414	Las Ánimas, Colorado	EUA	0.00737
146b	<i>B. gracilis</i>	37.771	-104.414	Las Ánimas, Colorado	EUA	0.00736
155a	<i>B. gracilis</i>	37.389	-99.628	Liberty, Kansas	EUA	0.00687
155b	<i>B. gracilis</i>	37.389	-99.628	Liberty, Kansas	EUA	0.00695
151a	<i>B. gracilis</i>	46.816	-100.965	Morton, North Dakota	EUA	0.00686
151b	<i>B. gracilis</i>	46.816	-100.965	Morton, North Dakota	EUA	-
154a	<i>B. gracilis</i>	39.796	-99.923	Norton, Kansas	EUA	0.00646
154b	<i>B. gracilis</i>	39.796	-99.923	Norton, Kansas	EUA	0.00619
145a	<i>B. gracilis</i>	36.681	-106.118	Rio Arriba, New México	EUA	0.00493
145b	<i>B. gracilis</i>	36.681	-106.118	Rio Arriba, New México	EUA	0.00495
5107	<i>B. gracilis</i>	23.879	-103.092	Rio Grande, Zacatecas	México	0.00841
116	<i>B. gracilis</i>	22.616	-101.737	Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí	México	0.00817
120	<i>B. gracilis</i>	22.616	-101.737	Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí	México	0.00745
79	<i>B. gracilis</i>	25.229	-101.026	Saltillo, Coahuila	México	0.00819
81	<i>B. gracilis</i>	25.229	-101.026	Saltillo, Coahuila	México	0.00662
162a	<i>B. gracilis</i>	34.157	-116.784	San Bernardino, California	EUA	0.00553
162b	<i>B. gracilis</i>	34.157	-116.784	San Bernardino, California	EUA	0.00527
132	<i>B. gracilis</i>	21.555	-101.298	San Felipe, Guanajuato	México	0.00888
133	<i>B. gracilis</i>	21.555	-101.298	San Felipe, Guanajuato	México	0.00920
3886	<i>B. gracilis</i>	35.917	-107.050	Sandoval, New México	EUA	-
161a	<i>B. gracilis</i>	31.418	-110.697	Santa Cruz, Arizona	EUA	0.00479
161b	<i>B. gracilis</i>	31.418	-110.697	Santa Cruz, Arizona	EUA	0.00496
150a	<i>B. gracilis</i>	45.678	-108.900	Stillwater, Montana	EUA	0.00757
150b	<i>B. gracilis</i>	45.678	-108.900	Stillwater, Montana	EUA	0.00662
141a	<i>B. gracilis</i>	37.401	-113.510	Washington, Utah	EUA	0.00482

Cuadro II.1. Poblaciones de *B. gracilis* muestreadas. Ho es el valor de heterocigosidad observada.

ID	Especie	Latitud	Longitud	Localidad	País	Ho
141b	<i>B. gracilis</i>	37.401	-113.510	Washington, Utah	EUA	0.00520
5448	<i>B. gracilis</i>	28.392	-108.733	Yécora, Sonora	México	0.00336
5449	<i>B. gracilis</i>	28.392	-108.733	Yécora, Sonora	México	0.00432

Recuperación de Polimorfismos de Nucleótido Simple (PNS).

El alineamiento de loci para realizar los análisis de diversidad y estructura genética se realizó solo con las 74 muestras de las poblaciones de *B. gracilis* (Cuadro II.1) y las muestras de las especies hermanas (Cuadro I.1) para formar el grupo externo. Las secuencias se procesaron con los parámetros de alineamiento anteriormente descritos en el Cuadro I.2; sin embargo, se realizaron dos alineamientos que variaron en el número mínimo de las muestras que debían contener un locus. Los alineamientos se nombraron **a1** y **a2**, donde **a1** recuperó todos los loci que estuvieran presentes en por lo menos 4 muestras mientras que **a2** solo recuperó los loci que estuvieran presentes en todas las muestras con el objetivo de disminuir el número de loci y poder manejar los archivos en los software para los análisis poblacionales.

Diversidad y estructura genética

Para obtener la estructura genética, se analizó el alineamiento **a1** con el programa STRUCTURE v 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) empleando un burn-in de 200000, un modelo de mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas, además no se incluyó información previa sobre la identidad de los taxones. El número de grupos (K) que se probaron fue 2 a 6 con 20 réplicas independientes para cada uno. El número de agrupaciones más probable fue estimado mediante el algoritmo natural de verosimilitud (log-likelihood) y el estadístico ΔK fue estimado usando el Structure Harvester (Earl and Vonholdt, 2012).

El alineamiento **a2** se empleó para calcular los estadísticos poblacionales y la red de haplotipos. La red se creó usando el paquete PEGAS (Paradis, 2010) en R. La reconstrucción de haplotipos para los análisis poblacionales posteriores se generó usando DnaSP v5.10 (Librado and Rozas, 2009). La divergencia haplotípica entre poblaciones (FST) y las matrices de diferenciación genética pareada (AMOVA) se calcularon usando Arlequin v3.5 (Excoffier and Lischer, 2010).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los modelos de conectividad poblacional se evaluaron usando el enfoque coalescente de máxima probabilidad implementado en MIGRATE (Beerli and Felsenstein, 2001). Se evaluaron cinco modelos: fuente-sumidero, migración completa, stepping stone, N-isla y considerando los tres grupos como una sola población. Se registraron 10,000 pasos en cadena, el burn-in se estableció en 10,000 y se empleó un esquema de calentamiento con las siguientes temperaturas: 1.0, 1.5, 3.0, 100000. Los resultados de verosimilitud marginal se basaron en la aproximación de Bazier donde se compararon y el modelo con el valor más alto se seleccionó como el mejor modelo de aproximación a nuestros datos.

Con el fin de investigar la relación entre la distancia genética y geográfica, se realizó una prueba de Mantel (Mantel, 1967). La matriz de distancia genética obtenida se importó a Barrier 2.2 (Manni and Guérard, 2004) para identificar las barreras al flujo génico más probables, entre los grupos genéticos y filogenéticos. Este software emplea el algoritmo de Monmonier para identificar las barreras geográficas mediante la prueba de correlación entre distancia geográfica y genética entre las localidades muestreadas.

Modelado de Distribución

Para elaborar los modelos de distribución potencial de *B. gracilis*, se compilaron los registros de presencia de la especie registrados en las bases de datos de colecciones de herbario como: HUAA, IEB, Canada National Herbarium, NYBG, Smithsonian Institute, INEGI; además se incluyeron colectas personales y de M.E. Siqueiros-Delgado (HUAA) así como datos de la Red Mundial de Información de la Biodiversidad (<http://www.conabio.gob.mx/remib>) y del Global Biodiversity Information Facility (<http://www.gbif.org>). La base de datos fue depurada siguiendo los siguientes pasos: se corroboraron y geo-referenciaron las localidades de todos los registros, se eliminaron aquellas localidades ambiguas, muy generales y poco claras, se eliminaron los registros repetidos y por último, para evitar la sobre representación de registros en un área se dejó un solo registro por 1 km². El número final de datos de presencia de la especie empleado para realizar el modelado fueron 275.

Las capas climáticas se obtuvieron del sitio WorldClim (<http://www.worldclim.org>), se emplearon cuatro escalas de tiempo diferentes: pasado –Último Máximo Glacial (hace aprox. 22000 años) y Mitad del Holoceno (hace aprox. 6000 años) –, presente (1960-1990) y futuro (2050, IPCC5-rcp85). Todas las capas se emplearon en resolución de 2.5 minutos, para las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

capas de pasado y futuro se usaron las capas del Modelo de Sistema de Clima Comunitario (CCSM4). El área de interés fue determinado por la intersección de los polígonos de las Ecorregiones Terrestres (Nivel 2; (EPA, 2017) con los registros de presencia de la especie. La manipulación de los datos y las capas se realizó en el programa QGIS2.18.4 y el modelo de distribución geográfica se realizó con el software Maxent (Phillips et al., 2006).

La prueba de multi-colinealidad se realizó con el Coeficiente de Correlación de Pearson (r). Las variables con un valor de correlación mayor a 0.8 se excluyeron de todos los modelos para prevenir el sobreajuste (Cuadro II.2). El modelado de distribución se realizó usando la configuración estándar y 20% de los datos de presencia se emplearon para la prueba del modelo. El modelo se validó calculando el área bajo la curva generada por la curva característica de operación del receptor (AUROCC).

Para la visualización de los modelos, se asignaron en el mapa colores para las áreas con probabilidad de 50 a 80% (azul) y mayor a 80% (negro). Los cambios en la idoneidad del área de distribución prevista para cada uno de los períodos se compararon visualmente entre ellos y además se elaboraron mapas contrastando el área de distribución de los modelos del pasado (último máximo glacial y Mitad del Holoceno), de Mitad del Holoceno contra el área del modelo Presente y el área del Presente contra la del Futuro.

Adicionalmente, se realizó una comparación de variables climáticas con un Análisis de Componentes Principales (APC) excepto la variable de estacionalidad de la temperatura (BIO4) ya que el rango de valores que presenta es muy amplio y tendía a influenciar los APC enmascarando las otras variables. El análisis estadístico (PERMANOVA) se realizó para determinar si las variables ambientales en cada uno de los tiempos de modelado (grupos) eran estadísticamente diferentes.

Cuadro II.2. Variables ambientales empleadas para el modelado de nicho y sus correlaciones.

Variables Climáticas (excluidas en gris)	Correlación > 0.8
BIO1 = Annual Mean Temperature	BIO6, BIO9, BIO11
BIO2 = Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp))	
BIO3 = Isothermality (BIO2/BIO7) (* 100)	BIO6, BIO7, BIO9, BIO11
BIO4 = Temperature Seasonality (standard deviation *100)	BIO6, BIO7, BIO11
BIO5 = Max Temperature of Warmest Month	BIO10
BIO6 = Min Temperature of Coldest Month	BIO7, BIO9, BIO11
BIO7 = Temperature Annual Range (BIO5-BIO6)	BIO10
BIO8 = Mean Temperature of Wettest Quarter	
BIO9 = Mean Temperature of Driest Quarter	BIO11
BIO10 = Mean Temperature of Warmest Quarter	
BIO11 = Mean Temperature of Coldest Quarter	
BIO12 = Annual Precipitation	BIO13, BIO16
BIO13 = Precipitation of Wettest Month	BIO16, BIO18
BIO14 = Precipitation of Driest Month	BIO17
BIO15 = Precipitation Seasonality (Coefficient of Variation)	
BIO16 = Precipitation of Wettest Quarter	BIO18
BIO17 = Precipitation of Driest Quarter	
BIO18 = Precipitation of Warmest Quarter	
BIO19 = Precipitation of Coldest Quarter	

II.3. Resultados

Recuperación de SNPs

El número de loci retenidos en el alineamiento fue de 16 loci con 97933 SNPs. La heterocigosidad de las secuencias consenso varió de 0.00336 a 0.00920, donde los valores más altos de heterocigosidad (>0.008) se encontraron en las muestras de México y los más bajos en las muestras de Yécora, Sonora y de Hugues, Dakota del Sur (Cuadro II.1).

Diversidad genética y estructura poblacional

Empleando la aproximación deltaK (ΔK), se encontró que un modelo con tres agrupaciones ($K=3$) se ajusta mejor a los datos. Al examinar la gráfica de probabilidades posteriores (Fig.

II.2 izquierda), dos grupos están bien definidos e incluyen poblaciones del Centro de EUA (CUSA) y México (MEX) respectivamente. Sin embargo las muestras en el tercer grupo, nombrado WUSA-NMEX muestran una importante mezcla de frecuencias alélicas con los otros dos grupos.

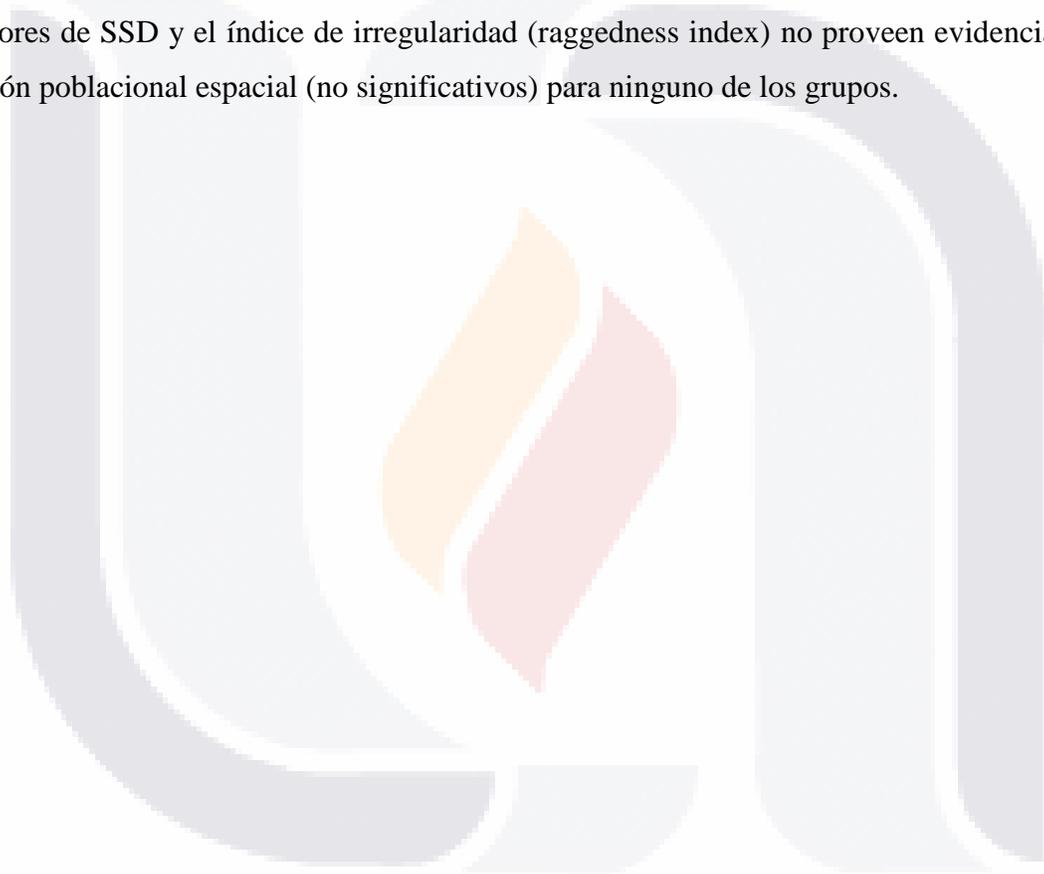
La red de haplotipos recuperó 19 haplotipos para las 74 muestras de *B. gracilis* a partir de la matriz de 16 loci combinados. Nueve de los 19 haplotipos fueron compartidos entre poblaciones y diez fueron privados. Los haplotipos más compartidos fueron el H1, H2 y H3. El haplotipo H1 está presente en los tres grupos genéticos, mientras que el haplotipo H2 y el H3 se comparten exclusivamente entre los grupos CUSA y WUSA (Fig. II.2). El grupo de México (MEX) es el que muestra más haplotipos privados.

Los valores de las comparaciones pareadas de F_{ST} variaron de 0.0495 a 0.0748 y todos fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$; Cuadro II.5), lo que indica una baja diferenciación entre los pares. Aún así, la mayor distancia genética se presentó entre los grupos MEX y WUSA-NMEX. Los valores G_{ST} fueron muy bajos para todos los grupos indicando baja diferenciación genética entre estos, la menor entre CUSA y MEX. Los valores de N_{ST} fueron más altos que los de G_{ST} indicando estructura filogeográfica.

Los estadísticos poblacionales generados con el programa Arlequin se basaron en la reconstrucción haplotípica obtenida en el programa DnaSP (Nh; Cuadro II.5). DnaSP puede leer automáticamente genotipos de individuos y separarlos de acuerdo a los códigos de ambigüedad nucleotídica (IUPAC) para representar los sitios heterocigotos, generando dos secuencias por individuo diploide. Los sitios polimórficos (S) fueron más en el grupo WUSA-NMEX y menos en el CUSA. La diversidad nucleotídica (π) más alta se presentó en el grupo MEX y la más baja en el CUSA.

En cuanto a los estadísticos para evaluar la historia demográfica de las agrupaciones genéticas y de la especie (Cuadro II.5), los valores de la D de Tajima fueron negativos y significativos, lo que indica una desviación de la neutralidad, es decir, que ha ocurrido expansión, contracción o migración en los tres grupos. Por otro lado, los valores negativos de la F_s de F_u muestran evidencia de un exceso de alelos, esto se espera en poblaciones con expansión poblacional reciente o arrastre por ligamiento (genetic hitchhiking, genetic draft).

Cuando las muestras fueron tratadas como una sola población la distribución no coincidente (Mismatch Distribution) fue bimodal, es decir que la población se encuentra en equilibrio demográfico. El mismo resultado se observa, cuando las muestras se agrupan en los tres grupos genéticos, para el grupo WUSA-NMEX y el MEX en el que la distribución tiene ondas (variaciones) más profundas, sin embargo, para el grupo CUSA se muestra una distribución unimodal (Fig. II.3), indicando que la población ha pasado por una expansión demográfica reciente o una expansión de rango con altos niveles de migración entre demes vecinos (Excoffier, 2004; Hudson, 1990; Ray et al., 2003; Rogers and Harpending, 1992). Los valores de SSD y el índice de irregularidad (raggedness index) no proveen evidencia de expansión poblacional espacial (no significativos) para ninguno de los grupos.



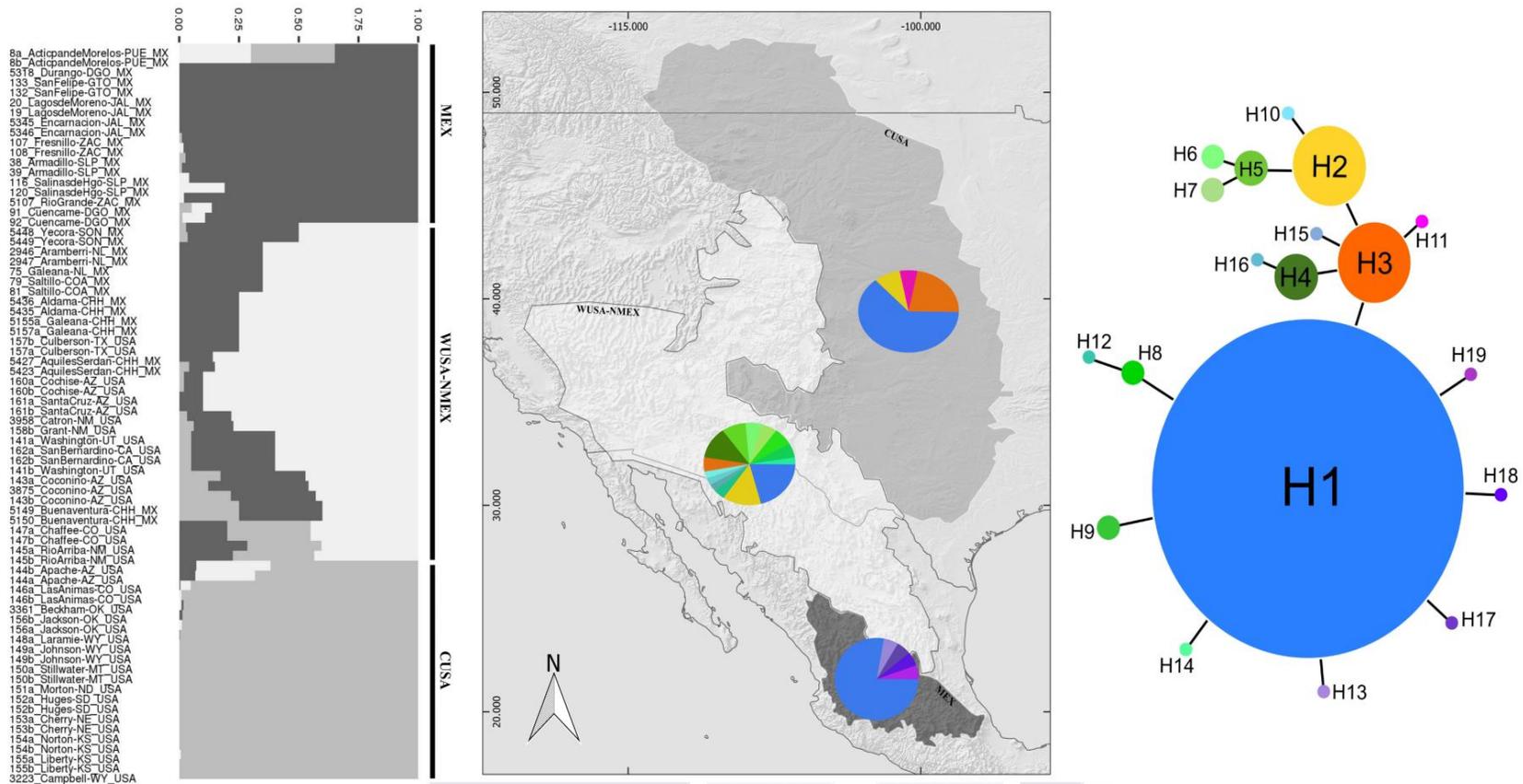


Figura II. 2. Izquierda: gráfico del análisis Bayesiano de agrupamiento con Structure, se muestra la probabilidad (barras) de cada muestra de ser asignada a uno de los tres grupos genéticos ($K=3$) de acuerdo a sus frecuencias alélicas. Centro: localización geográfica de los grupos: MEX- gris oscuro, CUSA- gris, WUSA-NMEX- gris claro. Los límites de los grupos se establecieron con base en las regiones ecoterrestres (L2 y L3); además se muestran los gráficos de pastel con la distribución de haplotipos para cada grupo genético, los colores corresponden a los observados en la red de haplotipos. Derecha: Red de haplotipos donde el tamaño del círculo corresponde a el número de muestras con el haplotipo.

Cuadro II.3. Haplotipo de cada muestra de *B. gracilis* y agrupación a la que corresponden de acuerdo a los resultados de Structure.

Identificador	Grupo	Haplotipo	Identificador	Grupo	Haplotipo
146a_LasAnimas-CO_EUA	CUSA	H1	75_Galeana-NL_MX	MEX	H1
146b_LasAnimas-CO_EUA	CUSA	H11	79_Salttillo-COA_MX	MEX	H8
148a_Laramie-WY_EUA	CUSA	H1	81_Salttillo-COA_MX	MEX	H1
149a_Johnson-WY_EUA	CUSA	H1	8a_Acatzingo-PUE_MX	MEX	H18
149b_Johnson-WY_EUA	CUSA	H1	8b_Acatzingo-PUE_MX	MEX	H19
150a_Stillwater-MT_EUA	CUSA	H1	91_Cuencame-DGO_MX	MEX	H1
150b_Stillwater-MT_EUA	CUSA	H1	92_Cuencame-DGO_MX	MEX	H1
151a_Morton-ND_EUA	CUSA	H3	141a_Washington-UT_EUA	WUSA	H6
152a_Stanley-SD_EUA	CUSA	H3	141b_Washington-UT_EUA	WUSA	H6
152b_Stanley-SD_EUA	CUSA	H1	143a_Coconino-AZ_EUA	WUSA	H2
153a_Cherry-NE_EUA	CUSA	H1	143b_Coconino-AZ_EUA	WUSA	H2
153b_Cherry-NE_EUA	CUSA	H3	144a_Apache-AZ_EUA	WUSA	H2
154a_Norton-KS_EUA	CUSA	H1	144b_Apache-AZ_EUA	WUSA	H2
154b_Norton-KS_EUA	CUSA	H3	145a_RioArriba-NM_EUA	WUSA	H10
155a_Clark-KS_EUA	CUSA	H1	145b_RioArriba-NM_EUA	WUSA	H5
155b_Clarkson-KS_EUA	CUSA	H1	147a_Chaffee-CO_EUA	WUSA	H5
156a_Jackson-OK_EUA	CUSA	H1	147b_Chaffee-CO_EUA	WUSA	H7
156b_Jackson-OK_EUA	CUSA	H3	160a_Cochise-AZ_EUA	WUSA	H1
3223_Campbell-WY_EUA	CUSA	H1	162a_SanBernardino-CA_EUA	WUSA	H5
3361_Beckham-OK_EUA	CUSA	H1	162b_SanBernardino-CA_EUA	WUSA	H7
107_Fresnillo-ZAC_MX	MEX	H1	3875_CoconinoAZ_EUA	WUSA	H2
108_Fresnillo-ZAC_MX	MEX	H1	157a_Culberson-TX_EUA	WUSA	H3
116_Salinas-SLP_MX	MEX	H1	157b_Culberson-TX_EUA	WUSA	H4
120_Salinas-SLP_MX	MEX	H1	158b_Grant-NM_EUA	WUSA	H2
132_SanFelipe-GTO_MX	MEX	H1	160b_Cochise-AZ_EUA	WUSA	H1
133_SanFelipe-GTO_MX	MEX	H1	161a_SantaCruz-AZ_EUA	WUSA	H8
19_LagosdeMoreno-JAL_MX	MEX	H1	161b_SantaCruz-AZ_EUA	WUSA	H12
20_LagosdeMoreno-JAL_MX	MEX	H1	3958_Catron-NM_EUA	WUSA	H2
2946_Aramberri-NL_MX	MEX	H13	5149_Buenaventura-CHH_MX	WUSA	H3
2947_Aramberri-NL_MX	MEX	H14	5150_Buenaventura-CHH_MX	WUSA	H15
38_Amadillo-SLP_MX	MEX	H1	5155a_Janos-CHH_MX	WUSA	H4
39_Amadillo-SLP_MX	MEX	H1	5157a_Janos-CHH_MX	WUSA	H16
5107_RioGrande-ZAC_MX	MEX	H1	5423_AquilesSerdan-CHH_MX	WUSA	H1
5318_Durango-DGO_MX	MEX	H17	5427_AquilesSerdan-CHH_MX	WUSA	H1
5345_Encarnacion-JAL_MX	MEX	H1	5435_Aldama-CHH_MX	WUSA	H4
5346_Encarnacion-JAL_MX	MEX	H1	5436_Aldama-CHH_MX	WUSA	H4
5448_Yecora-SON_MX	MEX	H9			
5449_Yecora-SON_MX	MEX	H9			

Cuadro II.4. Expansión espacial estimada con parámetros del supuesto de tamaño de deme constante (ARLEQUIN).

Parámetros estimados	CUSA	WUSA-NMEX	MEX
Tau (95% IC)	3.705 (1.807~10.543)	7.036 (2.495~29.31)	5.171 (3.027~21.303)
Theta (95% IC)	3.837 (0.01~15.052)	5.881 (0.008~21.952)	4.078 (0.004~15.752)
Tasa de migración	8332.627	167.334	317.288
SSD	0.0021	0.002	0.0043
Valor P	0.68	0.63	0.39
Índice de irregularidad	0.008	0.0016	0.0063
Valor P	0.42	0.99	0.77

Intervalos de confianza (IC), $\alpha = 0.05$.

SSD: sum of squared deviations; suma de los cuadrados de las desviaciones.

Valores obtenidos de mismatch distribution bajo el modelo de expansión espacial.

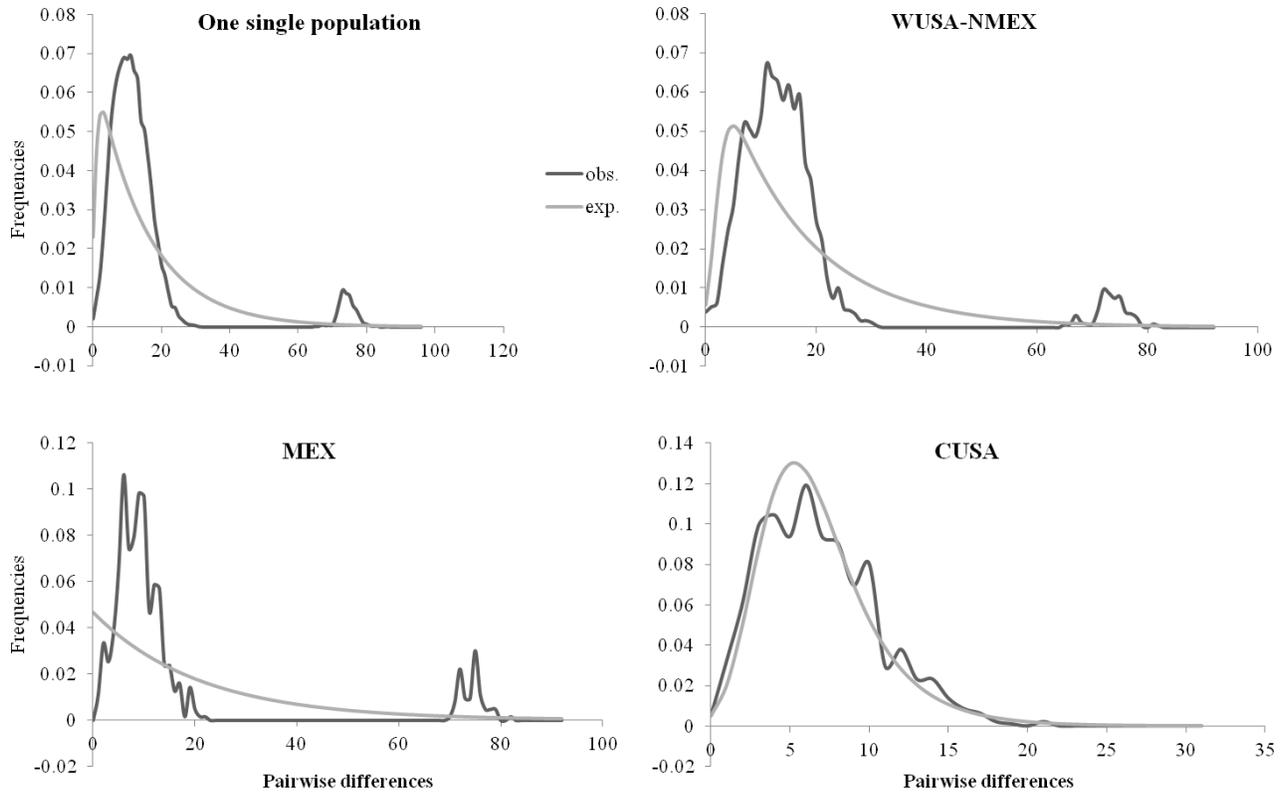


Figura II. 3. Gráficos de distribución no coincidente (Mismatch Distribution), la línea gris representa las diferencias pareadas esperadas y la línea negra representa las observadas.

La diferenciación genética multilocus evaluada mediante AMOVA reveló que la mayor proporción de la variación genética ocurre a nivel intrapoblacional (97.31%), seguida de la observada entre las poblaciones del mismo grupo (2.64%) y entre los grupos (0.04%). Los mismos resultados se observaron al agrupar las muestras según los resultados de agrupación mediante frecuencias alélicas y mediante clados filogenéticos (Cuadro II.5, II.6, II.7). Los índices de fijación también muestran que la mayor diferenciación genética ocurre entre poblaciones y no entre los grupos, los cuales tienen baja estructura genética dada la poca diferenciación entre alelos. A pesar de que todos los índices de fijación son significativos, los valores son muy bajos (<0.2) y entonces las diferencias entre individuos, poblaciones y grupos son mínimas.

Cuadro II.5. Comparaciones pareadas de estadísticos poblacionales.

FST (*nivel de significancia=0.05)		
	WUSA-NMEX	MEX
MEX	0.0748*	
CUSA	0.0495*	0.0585*
GST		
MEX	0.00134	
CUSA	0.00152	0.00018
NST		
MEX	0.08221	
CUSA	0.05964	0.05447

Cuadro II.6. Estadísticos de genética de poblacionales para cada uno de los grupos genéticos.
 N=tamaño de muestra; Nh= no. de haplotipos; Hd= diversidad haplotípica; S=sitios polimórficos;
 Pi=diversidad nucleotídica; Nm=tasa de migración.

Estadístico	MEX	WUSA-NMEX	CUSA
N	18	34	22
No. de alelos	36	68	44
No. de alelos esperado	18.63728	25.76722	14.16303
Nh (haploNet)	36 (5)	60 (14)	40 (4)
Hd ± sd	1.00 ± 0.00004	0.996 ± 0.00001	0.995 ± 0.00004
S	104	129	64
Pi ± sd	0.007119 ± 0.003624	0.007025 ± 0.003529	0.003278 ± 0.001747
Theta_pi	14.84921	14.65364	6.83827
Pruebas de Neutralidad			
D de Tajima	-1.51748	-1.57452	-1.90337
Valor de p	0.04	0.038	0.005
FS de Fu	-24.16611	-24.23665	-25.10042
Valor de p	0	0	0
SSD	0.00394	0.00153	0.0029
Valor de p	0.56	0.76	0.72
Índice de irregularidad	0.00637	0.00161	0.00803
Valor de p	0.78	1	0.27
Nm	3.46		

Cuadro II.7. Resultados de un AMOVA para las poblaciones **sin agrupar**. Significancia estadística ($p < 0.01^*$).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza	Porcentaje de variación
<i>Entre poblaciones</i>	41	21.845	0.01334 Va	2.67
<i>Dentro de las poblaciones</i>	106	51.500	0.48585 Vb	97.33
Total	147	79.345	0.49919	100
Índice de fijación				
FST	0.02673*			

Cuadro II.8. Resultados de un AMOVA evaluando la partición de la variación genética entre los **tres grupos genéticos**. Significancia estadística ($p < 0.01^*$).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza	Porcentaje de variación
<i>Entre grupos</i>	2	1.091	0.00022 Va*	0.04
<i>Entre poblaciones dentro de los grupos</i>	39	20.754	0.01320 Vb*	2.64
<i>Entre poblaciones</i>	106	51.500	0.48585 Vc*	97.31
Total	147	79.345	0.49926	100
Índices de fijación				
FSC (ind):	0.02645*			
FST (pob):	0.02687*			
FCT (gps):	0.00043*			

Cuadro II.9. Resultados de un AMOVA evaluando la partición de la variación genética entre los **cuatro grupos filogenéticos**. Significancia estadística ($p < 0.01^*$).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza	Porcentaje de variación
<i>Entre grupos</i>	3	1.773	0.00168 Va*	0.34
<i>Entre poblaciones dentro de los grupos</i>	38	20.072	0.01211 Vb*	2.42
<i>Entre poblaciones</i>	106	51.500	0.48585 Vc*	97.24
Total	147	73.345	0.49964	100
Índices de fijación				
FSC (ind):	0.02431*			
FST (pop):	0.02760*			
FCT (gps):	0.00337*			

El valor estadístico de correlación entre las matrices de distancia genética y geográfica de las 42 poblaciones de *B. gracilis* fue baja y significativa ($r = 0.1044317$, $p = 0.045$; Fig. II.4). El análisis de barreras geográficas empleando Barrier sugiere que las rupturas genéticas concuerdan con las dos aéreas montañosas más grandes incluidas en el área de distribución de *B. gracilis*: La Sierra Madre Oriental y las Montañas Rocallosas del Sur, es decir las que abarcan: Wyoming, Colorado y Nuevo México (Fig. II.5). El modelo de migración que mejor representó nuestros datos fue el modelo de N-isla (-3235.47 log ML) en el cual todas las poblaciones están conectadas a través de una migración constante. El valor del número efectivo de individuos multiplicado por la tasa de migración (Nm), indica que hay flujo génico entre las poblaciones.

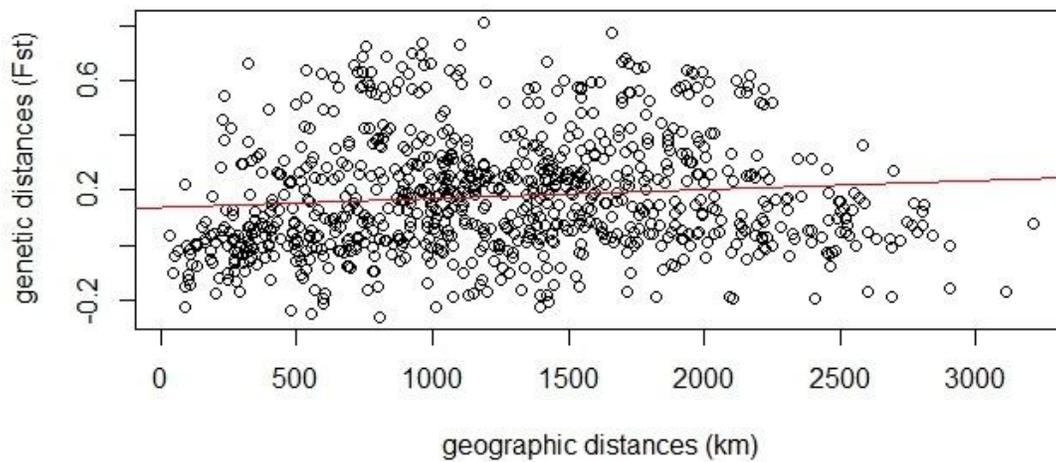


Figura II. 4. Prueba de Mantel, correlación entre las matrices geográficas y genéticas de 42 poblaciones (círculos vacíos) de *B. gracilis* ($r = 0.1044317$, $p = 0.045$).

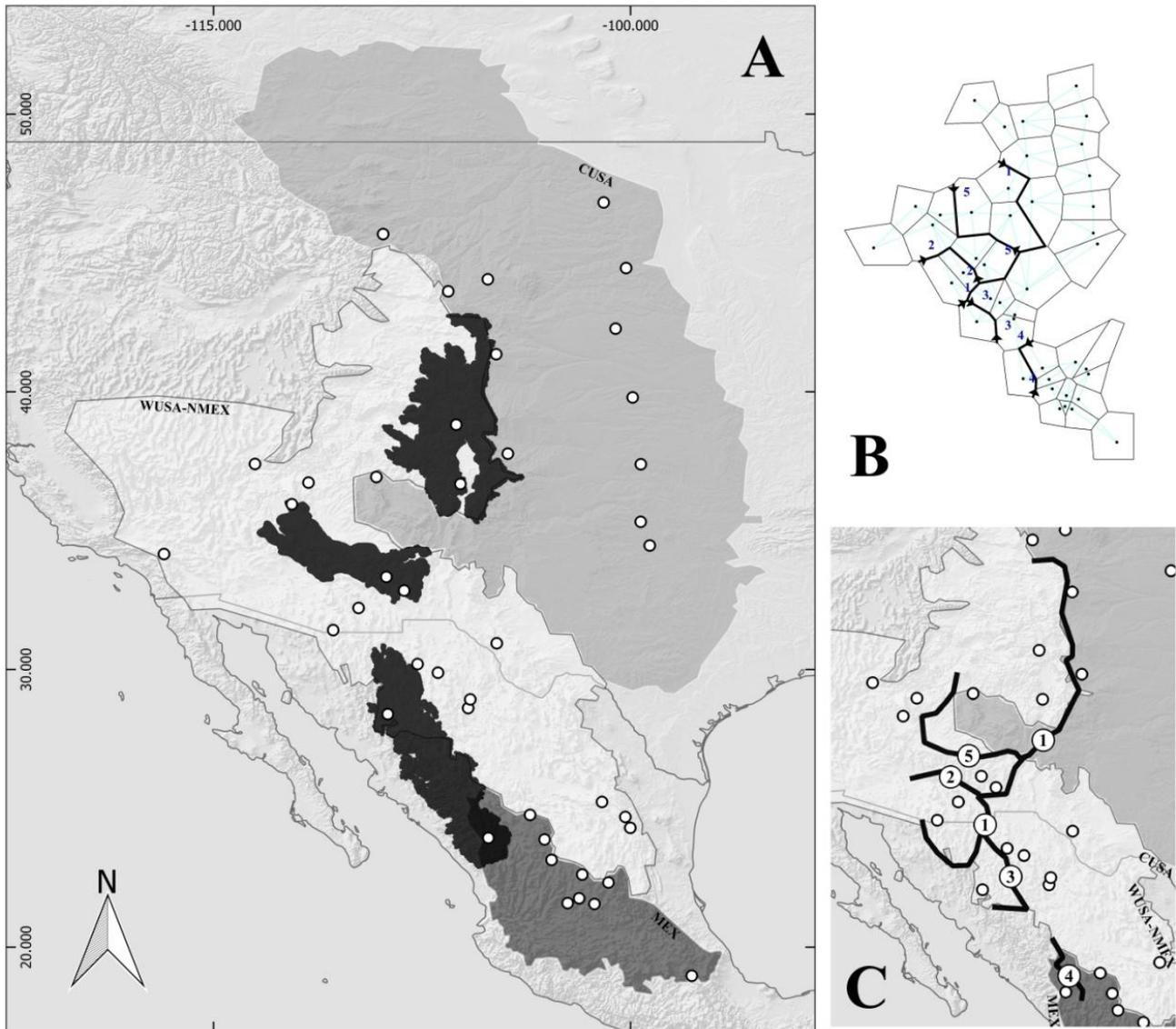


Figura II. 5. Mapas mostrando las barreras geográficas según el análisis de Barrier basado en los valores pareados de FST de las poblaciones de *B. gracilis*. **A.** En negro se resaltan las regiones terrestres que coinciden geográficamente con las barreras resultantes del análisis: Sierra Madre Oriental en México, Montañas Rocallosas del sur en Wyoming, Colorado y Nuevo México, y las Montañas Altas de Gila en Arizona y Nuevo México. **B.** Líneas representando barreras al flujo génico entre las poblaciones (puntos). **C.** Mapeo de las cinco barreras resultantes del análisis en Barrier.

Modelado de Distribución

Los modelos finales mostraron alta precisión con valores de área bajo la curva (AUC) mayores de 0.7 cuando se probó el modelo con los datos de prueba. Los resultados del Jackknife indican que la precipitación del mes más seco (Bio 14) es la variable que más información da por si sola para el modelo la distribución de *B. gracilis* en los cuatro tiempos (Cuadro II.10). Por otro lado, la variable que aporta información única para los modelos del último máximo glacial, holoceno medio y tiempo presente fue la precipitación del mes más seco; mientras que para el modelo del futuro fue la temperatura media del cuarto más húmedo. El porcentaje de contribución se determina heurísticamente y depende del patrón particular que el código de Maxent emplea para obtener la mejor solución.

Cuadro II.10. Variables que influyen en el modelado de distribución de *B. gracilis* en cuatro tiempos diferentes.

Tiempo del modelo	Variable con mayor contribución al modelo	Jackknife		AUC datos de entrenamiento/datos de prueba
		La más útil por si sola	La variable que aporta información que no proporciona en otra variable	
Último Máximo Glaciar	Bio 14 (47.2%)	Bio 14: Precipitación del mes más seco	Bio 14: Precipitación del mes más seco	0.811/0.747
Holoceno medio	Bio 14 (31.4%)	Bio 14: Precipitación del mes más seco	Bio 14: Precipitación del mes más seco	0.826/0.764
Presente (1960-1999)	Bio 14 (36.7%)	Bio 14: Precipitación del mes más seco	Bio 14: Precipitación del mes más seco	0.822/0.0.764
Futuro (2041-2060)	Bio 14 (24.3%)	Bio 14: Precipitación del mes más seco	Bio 8: Temperatura media del cuarto más húmedo	0.829/0.763

La predicción de distribución mayor al 50% varió entre todos los modelos (Fig. II.6). La distribución de la especie durante el último máximo glacial es menor hacia el Norte, donde 50% de la probabilidad de encontrar a la especie apenas cruza el límite entre EUA y Canadá y abarca un área homogénea en el centro de EUA y México. Así mismo, para el modelo del último máximo glacial el 80% de probabilidad se limita exclusivamente a México, específicamente al centro del país y al estado de Chihuahua. El modelo para la el Holoceno medio muestra un aumento del área con probabilidad >80% en el lado este de las Montañas Rocallosas, es decir en la planicie central de EUA y hacia el sur de las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

montañas de Gila en Nuevo México y Arizona. Así mismo, se observa una contracción del área de probabilidad >80% de distribución en el norte y centro de México y de manera general una contracción del área de distribución con probabilidad del 50% en el oeste de EUA contrastando con un aumento hacia el norte y el este (Fig. II.6).

Al comparar la predicción de la distribución actual con la predicción hacia el futuro bajo el escenario RCP8.5 (Representativa Concentración Pathways) se observan cambios mínimos en las áreas con >80% de probabilidad. La mayor expansión de área de distribución de *B. gracilis* se proyectó entre el periodo del último máximo glacial y el holoceno medio (Fig. II.7, Izq.), en donde se aprecia una ligera contracción de área en el centro y norte de México y la expansión de la especie hacia el este de las Montañas Rocallosas y hacia el suroeste de las montañas de Gila en Nuevo México y Arizona. Al comparar la distribución entre el Holoceno medio y el presente, los cambios son mínimos (Fig. II.7, Der.)

El ACP de las variables climáticas de los cuatro tiempos de modelado de distribución requirió dos componentes para explicar más del 90% de la variación (CP1 80.5, CP2 11.52). Los porcentajes de variación del CP1 y CP2 indican que la variación climática entre los puntos de muestreo es baja. Las variables que más información aportaron para el acomodo de los datos en el CP2 -para el LGM- y el CP1 para los tiempos restantes fueron: Precipitación Anual (BIO12), Precipitación del cuarto más húmedo (BIO16), Precipitación del cuarto más cálido (BIO 18), Precipitación del mes más húmedo (BIO13). El análisis estadístico para comparar los grupos (diferentes tiempos) indica que las variables climáticas de los sitios de muestreo de *B. gracilis* no son estadísticamente diferentes entre los tiempos empleados para los modelos de distribución (Fig. II.9). Así mismo, al evaluar por separado cada uno de los tiempos, la variación climática entre México, EUA y Canadá no es suficiente para separar los grupos geográficos (Fig. II: 10).

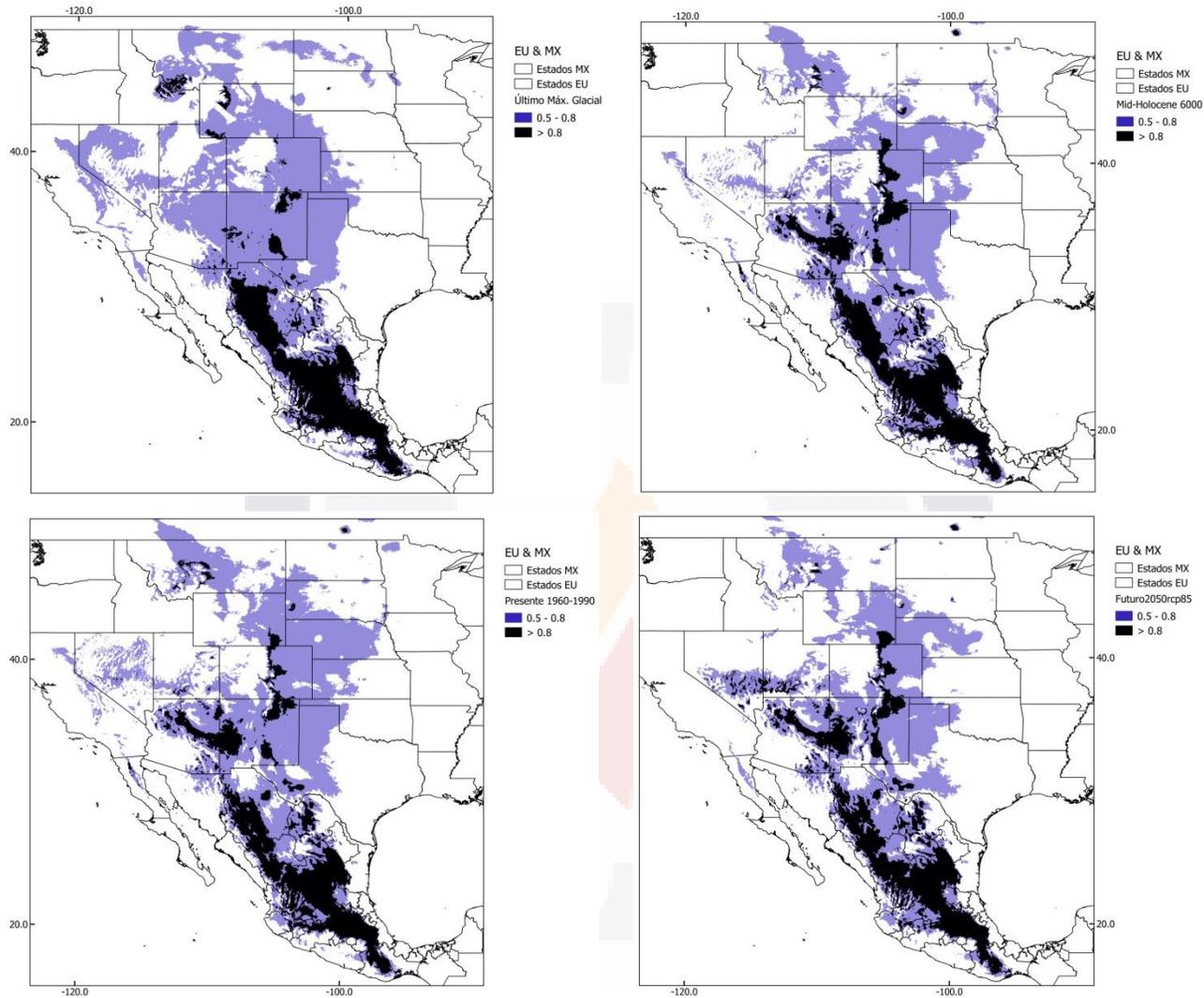


Figura II. 6. Modelado de Distribución de *Bouteloua gracilis* en cuatro tiempos diferentes: Último Máximo Glacial (~20,000), Mitad del Holoceno (~ hace 6000), Presente (1960-1990) y Futuro (2041-2060; RCP8.5). La probabilidad de presencia de la especie mayor a 0.5 se muestra en azul y >0.8 se muestra en negro.

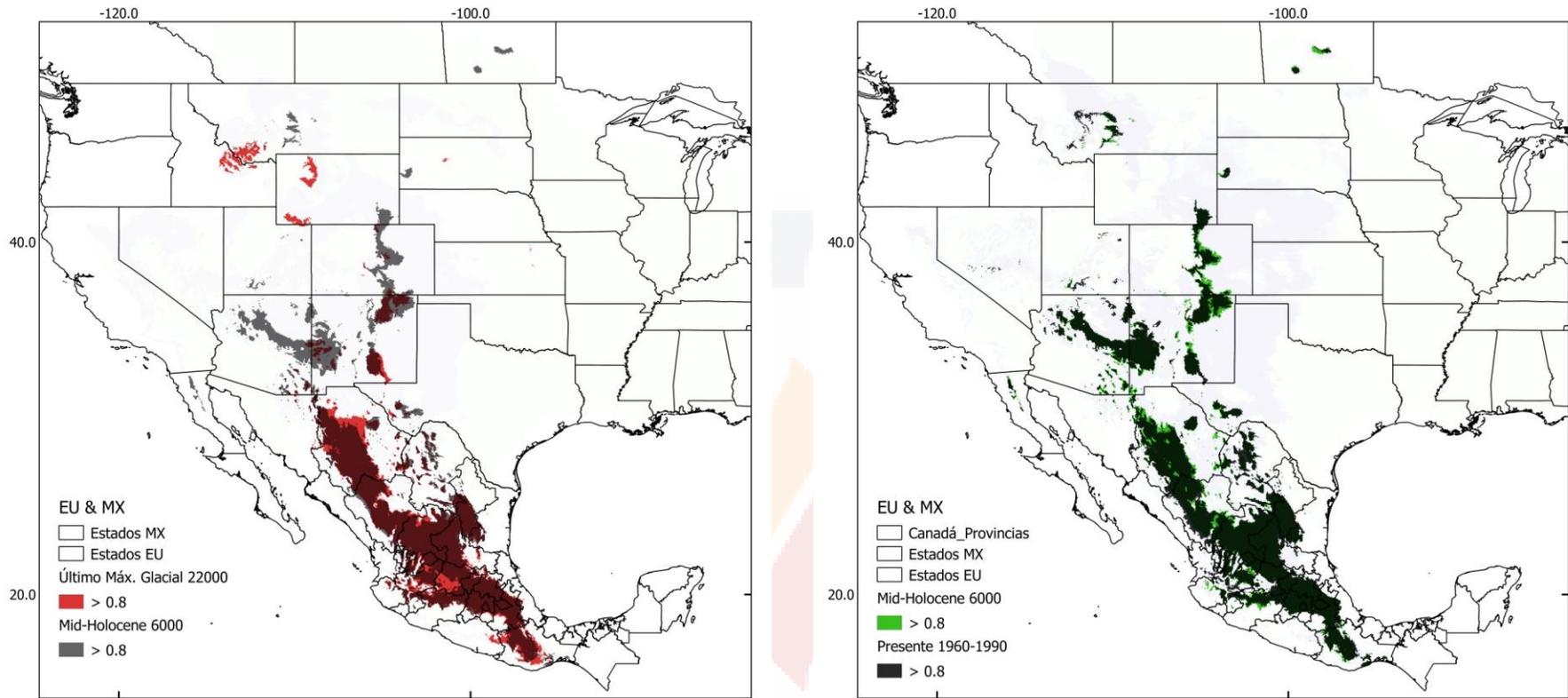


Figura II. 7. Comparación de áreas con >80% de probabilidad de distribución de la especie. **Izquierda:** Último Máximo Glacial en rojo comparado con Mitad del Holoceno en negro (con transparencia). **Derecha:** Mitad del Holoceno en verde comparado con el Presente en negro (con transparencia).

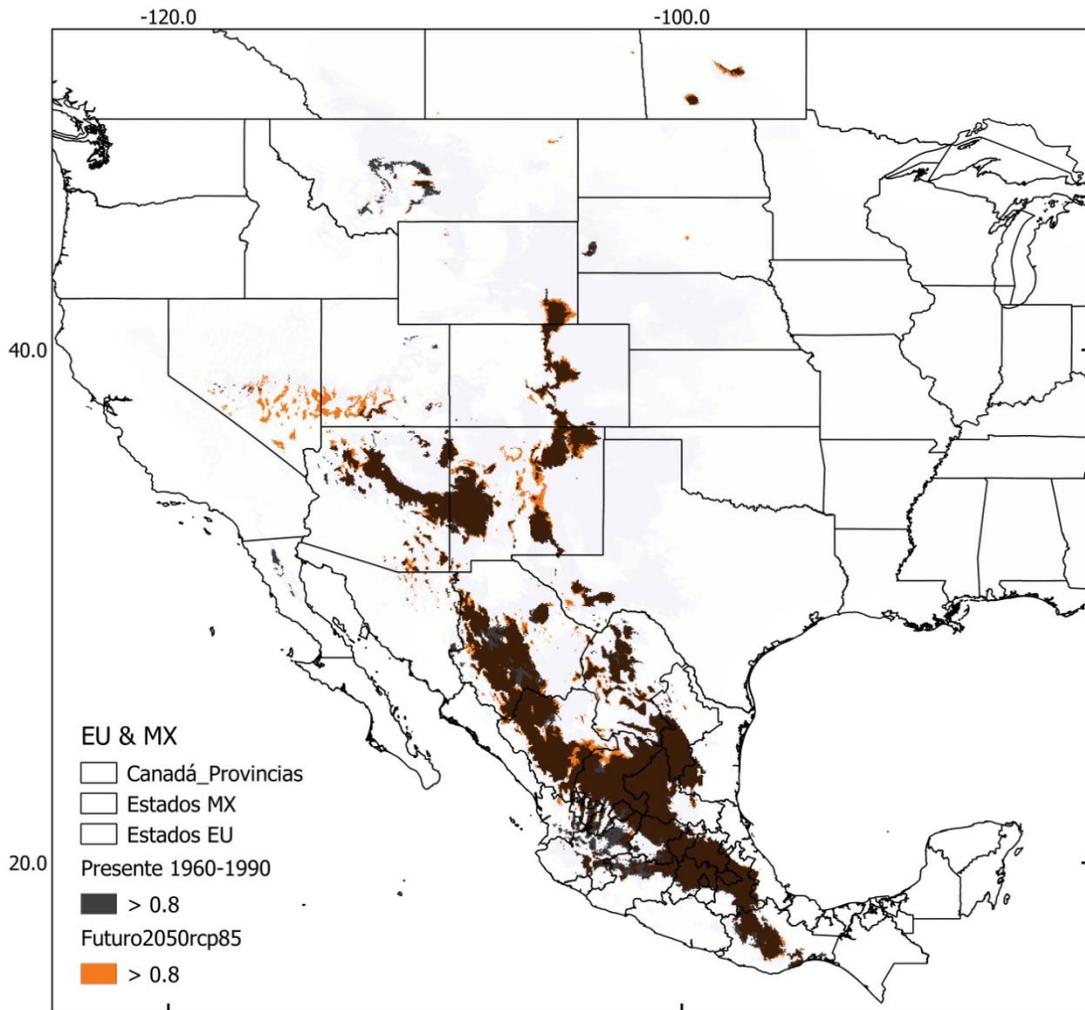


Figura II. 8. Comparación de áreas con >80% de probabilidad de distribución de la especie en el Presente (1960-1999) en negro con transparencia, contra el Futuro (2041-2060, rcp85) en naranja.

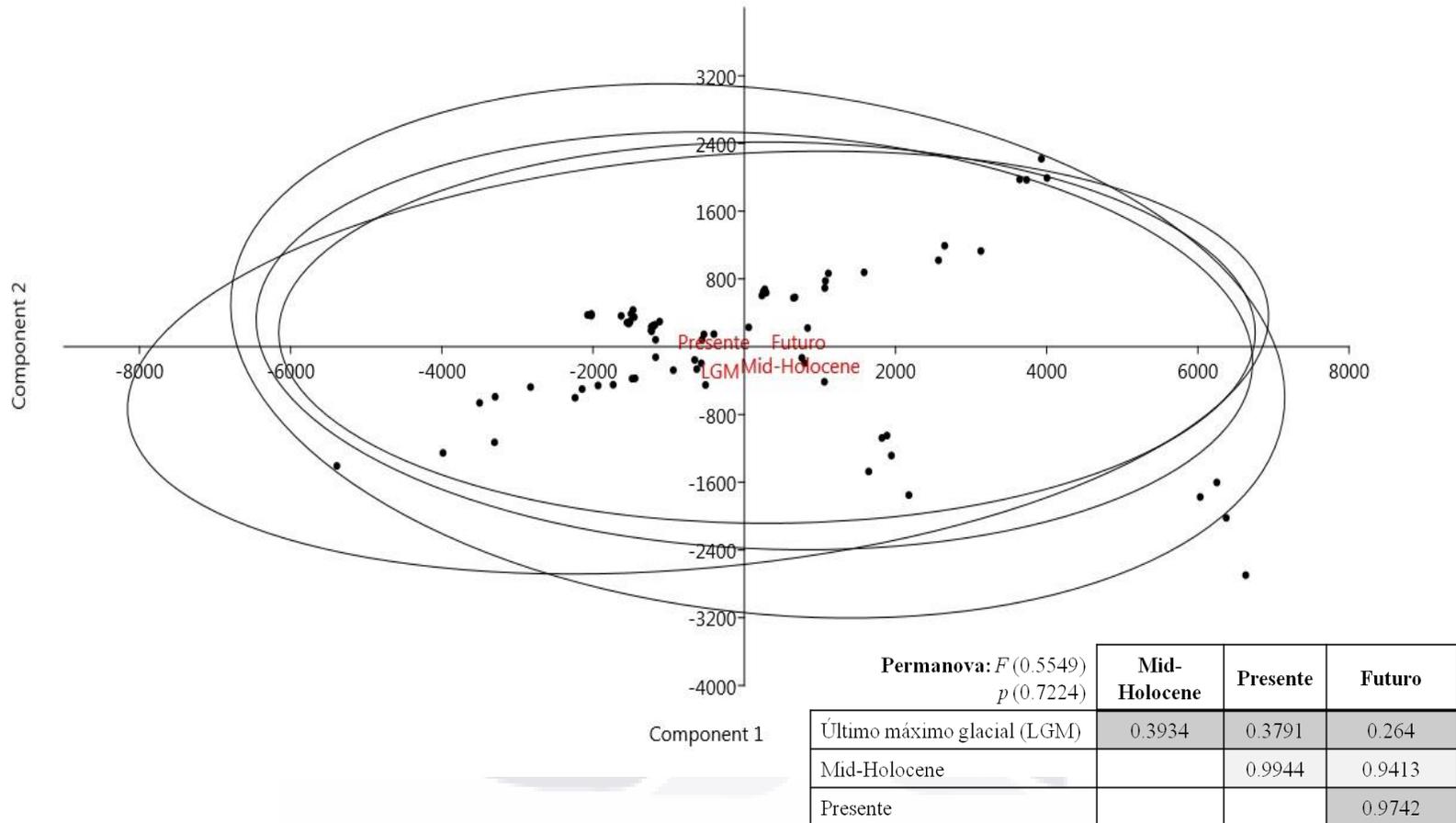


Figura II. 9. Análisis de Componentes Principales de las variables climáticas para cada punto empleado para realizar los modelos en los cuatro tiempos: Último máximo glacial (LGM, ~22000), Holoceno medio (Mid-Holocene, ~6000), Presente (1960-1999) y el Futuro (2041-2060, rcp85). Cuadro con los resultados del PERMANOVA (p 0.05) y las comparaciones pareadas.

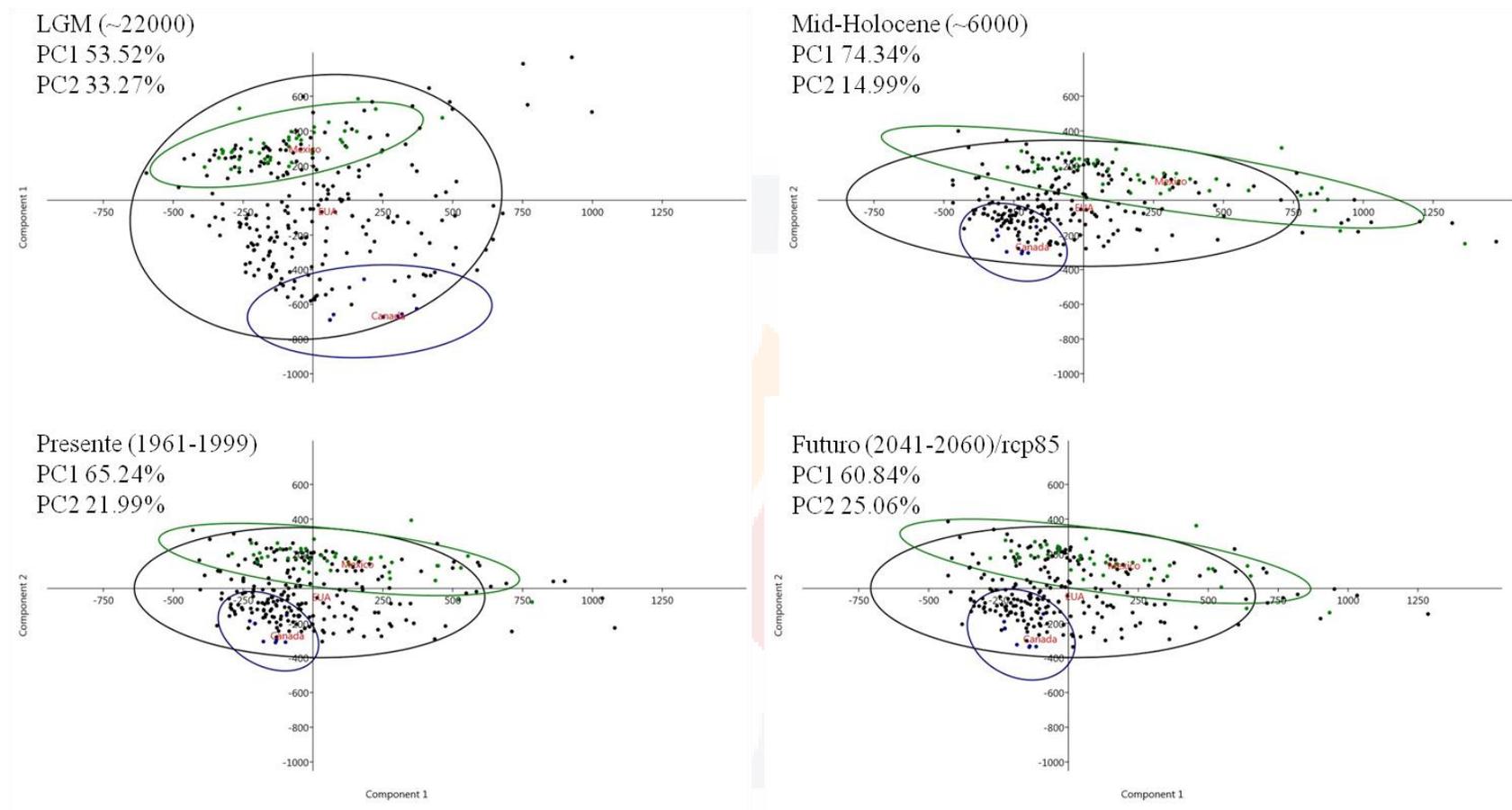


Figura II. 10. ACP de las características climáticas en cada punto para cada tiempo: Último máximo glacial (LGM, ~22000), Mitad del Holoceno (Mid-Holocene, ~6000), Presente (1960-1999) y el Futuro (2041-2060). En los gráficos los CP 1 y 2, así como la ubicación de las muestras: México (elipse verde), EEUU (elipse negra) y Canadá (elipse azul), las elipses representan la concentración del 95% de los datos. En el texto se muestra el porcentaje de variación para cada PC.

II.4. Discusión

Los estudios sobre el pasto navajita azul se volvieron relevantes desde 1941 después de que Andrew Riegel resaltó su importancia como un pasto nativo para resiembra de tierras abandonadas y pastizales sobre pastoreados en la Gran Planicie de Norte América (Riegel, 1941). Además de su importancia y dominancia en el bioma de pastizal, la respuesta de *B. gracilis* a la sequía (Arredondo et al., 2018; Bushey, 2018; Cherwin and Knapp, 2012; Joern and Mole, 2005; Rondeau et al., 2018); y el pastoreo (Augustine et al., 2018; Espinoza et al., 2017) ha atraído la atención de investigadores. Sin embargo, a pesar de que esta especie ha sido ampliamente estudiada, el estado de sus poblaciones en todo su rango se desconocía hasta la realización de este estudio.

Como se presentó en el capítulo I, las relaciones filogenéticas mostraron suficiente resolución debido a la variación genética dentro de la especie *B. gracilis*. En cuanto a la estructura genética, esta variación fue suficiente para determinar grupos genéticos. El número de clados en la inferencia filogenética (Fig. I.11) y los clúster en el análisis de estructura poblacional (Fig. II.2) no fueron completamente concordantes, especialmente por las muestras del norte de México y las del oeste de EUA, las cuales quedaron incluidas en un sólo clúster mientras que en la filogenia estas muestras se dividieron en dos clados que no comparten ancestría inmediata (clado A y B2, Fig. I.11). Todas las muestras pertenecientes al grupo WUSA-NMEX mostraron diferentes proporciones de probabilidad de pertenecer al grupo MEX sin observarse ninguna relación con su cercanía geográfica a las muestras de este grupo; en contraste, las muestras que comparten frecuencias alélicas con el grupo del CUSA están cercanas geográficamente a las muestras de este grupo. Este patrón de mezcla de alelos sugiere que los alelos provenientes del grupo de MEX están conservados en los otros grupos y por lo tanto presentan una amplia distribución, indicando que, bajo la teoría de coalescencia, estos alelos son los más antiguos (Hudson, 1990). Por otro lado, la red haplotípica revela que el haplotipo H1 es el haplotipo más frecuente, estando presente en 47% de las muestras, y el que tiene más haplotipos descendientes sugiriendo que es el haplotipo ancestral (Castelloe and Templeton, 1994) que claramente se originó en México (Fig. II.2).

Los grupos de EUA (Centro y Oeste) incluyen, entre sus haplotipos más abundantes el H3 así como sus derivados H2 y H4, todos estos a su vez son derivados del H1 (red de haplotipos, Fig. II.2). Como se mencionó anteriormente, la distribución de haplotipos muestra evidencia de la migración de *B. gracilis* desde México hacia el norte mediante dos rutas migratorias que probablemente ocurrieron a diferente tiempo: el haplotipo H1 migró desde el norte de México al noroeste a través de Texas, Arizona y Nuevo México y, al norte-centro a través de Nuevo México hacia el pastizal central de Norteamérica en la gran planicie. Reportes previos han confirmado la existencia de afinidades florísticas entre el norte de México y el suroeste de EUA (McLaughlin, 1989; Rzedowski, 1975), lo que apoya la existencia de las rutas geográficas sugeridas para la especie. Así mismo, la flora del Desierto Chihuahuense muestra afinidades con el sureste de Arizona y la parte sur de la Meseta de Colorado (McLaughlin, 1989), y los pastizales semiáridos del Altiplano Mexicano son considerados una extensión de la amplia región continua de pastizales del oeste y suroeste de Norteamérica (Rzedowski, 1975).

A pesar de que la prueba de Evanno resolvió tres grupos genéticos con base en los estadísticos F y las comparaciones pareadas de FST, estos grupos no muestran estructura genética y la proporción de variabilidad genética es mayor entre poblaciones que entre y dentro de los grupos. La falta de estructura genética en los grupos también se confirma con la mezcla de alelos observada en los análisis de Structure y con el sorteo de haplotipos en donde es evidente que las poblaciones del pastizal central de Norteamérica y de la región montañosa del sureste de EUA no están completamente diferenciadas genéticamente.

Por otro lado, valores más altos de NST que de GST son interpretados comúnmente como evidencia de que haplotipos cercanamente relacionados se encuentran en las mismas poblaciones, sin embargo estas diferencias entre estos valores pueden también deberse a artefactos de muestreo o índices de mutación desiguales entre linajes, más que la existencia de estructura filogeográfica (Lowe et al., 2009). En este caso, hemos visto que los haplotipos cercanamente emparentados se encuentran en poblaciones diferentes y distantes y que las distancias genética y geográfica no están correlacionadas lo que apoya la baja estructura filogeográfica entre los grupos de *B. gracilis*.

Los factores que determinan la diferenciación entre las poblaciones naturales incluyen su sistema de reproducción cruzada, el grado de aislamiento (que afecta la tasa de flujo génico inter poblacional), y su tamaño poblacional efectivo. El número de migrantes (N_m) como una medida indirecta de flujo génico, reveló que las poblaciones tienen “alto flujo génico” dado que un valor mayor a uno, indica que el efecto de flujo génico es mayor que el efecto de deriva (Lowe et al., 2009). Aunque las mediciones de N_m no se consideran apropiadas para determinar el movimiento de genes (Bossart and Prowell, 1998; Sork et al., 1999), el tamaño de muestra y el alto número de loci proporcionan estimaciones de N_m más confiables (Whitlock and McCauley, 1999). Además la migración entre las poblaciones de *B. gracilis* se explica mejor con el modelo de N-island que apoya la existencia de diferentes demes que están conectados por una tasa de migración constante (Slatkin and Voelm, 1991). Estudios previos que describen caracteres demográficos de *B. gracilis* han encontrado intercambio de migrantes exitoso y flujo génico así como banco de semillas renovado en poblaciones de *B. gracilis* (Fair et al., 1999; Minnick and Coffin, 1999). Las semillas y el polen de *B. gracilis* se dispersan principalmente por el viento (Coffin and Lauenroth, 1989) y las espiguillas (la unidad de dispersión) puede volar 25 millas (40 km) o más sin caer (Cheplick, 1998). En este contexto, incluso medidas directas de dispersión no necesariamente reflejan al movimiento de genes, pero la presencia de plántulas con diferentes genotipos reemplazando plantas muertas en las poblaciones de *B. gracilis*, sugiere la presencia de variabilidad genética a través del tiempo (Fair et al., 1999). Entonces entre las poblaciones de esta especie, la diferenciación genética puede estarse impidiendo por el intercambio de polen y semillas, facilitando el flujo de genes entre las poblaciones (Loveless and Hamrick, 1984).

Contrastando los resultados obtenidos sobre migración y flujo génico, se observó aislamiento genético en algunas poblaciones. Las poblaciones de Yécora-Sonora, San Bernardino-California, Rio Arriba-Arizona y Chaffe-Colorado fueron genéticamente las más distintas ($F_{ST} > 0.5$) de todas las del rango muestreado. Resulta interesante que todas estas poblaciones se encuentran dentro o en la cima de áreas montañosas, sin embargo la altitud no es el factor que está influyendo en la diferenciación genética de estas poblaciones dado que algunas localidades en el centro de México como Fresnillo-Zacatecas y San Felipe-Guanajuato se encuentran también en altitudes mayores a 2100 m

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y no se encontró aislamiento genético de las mismas. Es así que, la fisiografía de las áreas montañosas parece ser el principal aspecto que interfiere con el intercambio genético entre estas poblaciones. Las cadenas montañosas de Norteamérica corren en dirección norte-sur por largas distancias, sirven como buenas barreras al flujo génico entre poblaciones que se encuentren en ambos lados, especialmente durante periodos de glaciación (Swenson and Howard, 2005), conformando islas ecológicas como se ha señalado para la Sierra Madre Occidental en México (Rzedowski, 1991). El aislamiento de estas poblaciones, principalmente la de Yécora-Sonora, fue confirmada también por los valores de heterocigosidad observada (0.00336 y 0.00432).

La genealogía de *B. gracilis*, las pruebas de neutralidad y la distribución no coincidente son evidencia de expansión demográfica o probablemente, en este caso, expansión de distribución con altos niveles de migración entre grupos vecinos (Rogers and Harpending, 1992). Cuando las muestras se agruparon en los tres grupos genéticos, la distribución no coincidente confirma expansión demográfica de los grupos MEX y WUSA-NMEX, sin embargo en el grupo de MEX las diferencias pareadas muestran fluctuaciones a lo largo de la distribución de campana que pudieran ser interpretados como signos de estabilidad demográfica pasada seguida de una expansión. Resulta interesante que de las dos formaciones geológicas del Desierto Chihuahuense, el altiplano mexicano ha sido geológicamente y climáticamente estable desde la mitad del Mioceno (Morafka, 1977), mientras que las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno en las regiones áridas del norte, ha llevado a cambios en el número de poblaciones, el tamaño y la variación genética de algunas taxa de estas áreas desérticas (Angulo et al., 2017; Loera et al., 2017). En este contexto estos resultados proporcionan evidencia del establecimiento de poblaciones estables en el altiplano mexicano y su expansión hacia la zona montañosa del oeste de de EUA y aparentemente más recientemente a las grandes planicies de Norteamérica dado que, de acuerdo con Anderson (2006) los pastizales centrales de EUA son de origen reciente. Esto coincide también con la edad reciente de expansión obtenida para el grupo de CUSA (menor edad de expansión, $\tau=3.705$) y con los resultados del modelado de distribución.

El pasto navajita azul es considerado muy plástico en respuesta a la sequía, falta de nutrientes y pastoreo (Alward and Joern, 1993; Derner and Briske, 1999; Johnson and Biondini, 2001) además sus poblaciones muestran baja vulnerabilidad a diferentes presiones selectivas por lo que se ha concluido que la presencia de condiciones climáticas extremas son importantes para la dinámica de sus poblaciones (Fair et al., 1999; Kotanen and Bergelson, 2000). El rango geográfico actual de *B. gracilis* es amplio y la especie definitivamente esta adaptada a una gama amplia de condiciones climáticas, sin embargo específicamente los pastizales de Norteamérica se caracterizan por una complejidad topográfica baja y gradientes climáticos suaves (Lauenroth et al., 1999), en particular la pradera de pastos bajos se caracteriza por un bajo índice de perturbaciones (Coffin and Lauenroth, 1989). Estas características pueden estar influenciando la baja diversidad nucleotídica, número de sitios polimórficos y diversidad haplotípica en las poblaciones del grupo CUSA. En general la variación genética observada no es suficiente para pensar que la especie *B. gracilis* presenta diferentes ecotipos o subespecies.

Aunque en este estudio no se realizó cuantificación de cromosomas para conocer los diferentes niveles de ploidía de las poblaciones estudiadas, lo reportado en la literatura hasta el momento para la especie sugiere que en México solo se encuentran poblaciones diploides y tetraploides mientras que en Estados Unidos se localizan poblaciones con niveles superiores de ploidía (Fig. II.1). Lo anterior, así como los resultados del modelado de distribución, coinciden con el antecedente de que la duplicación del genoma está asociada a cambios del ambiente y que los diploides se encuentran típicamente en áreas refugio, mientras que los poliploides son más frecuentes en áreas de glaciación previa (Ehrendorfer, 1980). Esta evidencia sumada a los resultados de este trabajo, coincide con la hipótesis de que las poblaciones de México son las más ancestrales y que climáticamente, han soportado por menos variación en comparación con las poblaciones del norte.

Modelado de Distribución

Los ciclos de glaciación-interglaciación del Pleistoceno sugieren que las áreas que tienen mayor estabilidad estarían caracterizados por altos niveles de diversidad genética; en contraste, se espera que las áreas con poca estabilidad representan áreas recientemente colonizadas y exhiben bajos niveles de diversidad genética (Loera et al., 2017). De acuerdo a lo encontrado con el modelado de distribución las zonas que han mantenido características climáticas aptas y estables para la distribución de la especie en todos los tiempos corresponden al centro de México y Chihuahua, esto coincide perfectamente con la variación genética de las poblaciones, pues estas zonas presentaron los mayores niveles de diversidad genética (π , S; cuadro II.6). Por el contrario, las áreas con mayores cambios de distribución, por lo menos entre el pleistoceno y la mitad del holoceno, fueron el centro y este de Estados Unidos, en donde de acuerdo a lo mencionado por Loera et al (2017), se esperaría encontrar menor diversidad genética y ser las áreas recientemente colonizadas. Como ya se mencionó, efectivamente las poblaciones del centro de Estados Unidos presentaron menor diversidad genética y un tiempo de expansión más reciente en comparación con los otros dos grupos MEX y NMEX-WUSA.

Actualmente el pastizal de Norteamérica se extiende desde el centro de Saskatchewan y Alberta hasta las áreas altas del centro de México y desde Illinois-Indiana a California (Anderson, 2006; Lauenroth et al., 1999; Rzedowski, 2006). El estudio de micro y macro fósiles han evidenciado diversos aspectos del surgimiento de los pastizales en Norteamérica, entre estos, que su aparición no es mayor al periodo postglacial (post-Pleistoceno) es decir menor a 10,000 años o un poco más tarde en el Holoceno (Anexo H). La evidencia sugiere que los pastizales de la Gran Planicie no existían hace 18000 años (Wright, 1981) y en el Pleistoceno temprano y mediano (~12,000 años) la presencia de planicies abiertas se redujeron en área mientras que los bosques y zonas arboladas se extendían gracias a los climas húmedos del periodo fluvio-glacial. Durante el Holoceno temprano y medio, el área actual de pastizales era un gran bosque semiabierto así como zonas boscosas con parches de pasto aislados. El periodo postglacial favoreció el establecimiento de la vegetación actual en Nuevo México, el Desierto Chihuahuense, el centro de Texas (encino-pastizal), mientras que la pradera mixta del sur de Canadá y de Iowa se desarrollo más recientemente (Axelrod, 1985).

De acuerdo con la historia de la formación de los pastizales de la gran planicie, no pudo haber sido si no hasta hace 10000 u 8000 años que los elementos de *Bouteloua* se movieron a la zona central de la Gran Planicie de Estados Unidos (Cain 1951). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esta hipótesis pues de acuerdo con el modelado de distribución, *B. gracilis* encontró las condiciones climáticas adecuadas para expandirse hacia el norte hasta la mitad del Holoceno (Fig. II.6). Por otro lado, de acuerdo a los resultados de la red haplotípica, en párrafos anteriores se sugerían dos rutas de migración que coinciden con lo observado en el mapa del modelado de distribución durante el Holoceno medio (Fig. II.6).

Las condiciones climáticas en México durante el Último Máximo Glacial (LGM) (23,000 a 10,000 años) fueron secas y frías, mientras que la etapa temprana de la mitad del Holoceno (~6000) fue probablemente más caliente y húmeda que en la actualidad y en el Holoceno tardío más caliente y secándose hacia las condiciones actuales. Las condiciones desérticas se presentaron hasta hace 4000 años (Metcalf et al., 2000). Como se ha evidenciado, la cantidad de humedad fue un factor climático variable durante la conformación de los pastizales de México y Estados Unidos, en relación a esto, los resultados del ACP (Fig. II.10) mostraron que son principalmente las variables de precipitación las que difieren entre el último máximo glacial y los subsecuentes tiempos (precipitación anual-BIO12, precipitación del cuarto más húmedo-BIO16, precipitación del cuarto más cálido-BIO 18, precipitación del mes más húmedo-BIO13).

Los procesos evolutivos y filogeográficos de algunos taxa de Norteamérica se han asociado a los eventos climáticos y orogénicos históricos (Angulo et al., 2017; Gugger et al., 2013; Loera et al., 2017). Así mismo durante el Pleistoceno, ocurrieron expansiones demográficas y estructuración filogeográfica de los taxa del Desierto Chihuahuense (Vásquez-Cruz and Sosa, 2016). En este caso, es evidente que los procesos climáticos permitieron la expansión de *B. gracilis* hacia el norte después de la glaciación. Por otro lado, se ha sugerido que la expansión de la cordillera de las Montañas Rocallosas que corre hacia el sur desde las placas continentales de hielo del Pleistoceno ha sido la mayor influencia en la evolución de las plantas que albergan altos niveles de variación en Norteamérica (DeChaine and Martin, 2005). En este estudio se encontró evidencia de que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

las montañas rocallosas del sur pueden estar representando una barrera al flujo genético entre las poblaciones que se encuentran de un lado y del otro. En este punto, resulta importante mencionar que el levantamiento de las Montañas Rocallosas ocurrió en el Mioceno tardío y una de sus consecuencias climáticas importantes fue que interceptó parcialmente la humedad de las tormentas invernales provenientes del pacífico (Axelrod, 1985). Ahora que está claro que durante el Mioceno *B. gracilis* no se encontraba en dicha zona, se corrobora que la variación genética de *B. gracilis* no se vio influenciada directamente por el levantamiento de las Rocallosas del sur si no que la diferencia genética observada entre las poblaciones del este y oeste de las montañas se deriva inicialmente de las dos rutas de expansión que siguió la especie desde el norte de México y posteriormente del aislamiento.

Como menciona Cain (1951), los cambios en el pastizal de Norteamérica desde mediados del Holoceno hasta el presente han sido mínimas, siendo principalmente contracciones y expansiones de área. Esto mismo se observa en los modelos de distribución potencial obtenidos y también en los gráficos de ACP (Fig. II.10), donde la variación climática entre el Holoceno medio, el presente y el futuro son imperceptibles. En cuanto al modelado de distribución hacia el futuro se representan cambios menores de contracción general del área con probabilidad >50% y aumentos de probabilidad de ocurrencia >80%, tanto en el centro como en el oeste de Estados Unidos. De acuerdo a las predicciones de calentamiento continuo y el aumento en cantidades y regímenes de precipitación en la Gran Planicie (Solomon, 2007), autores sugieren que la envoltura climática que define la distribución actual del ecosistema de la pradera de pasto corto (dominada por *B. gracilis*, navajita azul) se puede extender al este (L. Giuliani et al., 2014), sin embargo los resultados aquí presentados no reflejan esta predicción. Lo anterior no significa que las poblaciones de *B. gracilis* y el ecosistema de pastizal estén exentos de sufrir alteraciones como consecuencia del cambio climático pues diversas situaciones de cambio deben seguir atendándose, por ejemplo la disponibilidad y cantidad de agua, los riesgos asociados a las especies invasoras y los impactos en las comunidades rurales y la agricultura (Romsdahl et al., 2013)

Capítulo III. Variación morfológica de *Bouteloua gracilis*

III.1. Introducción

La morfología de *Bouteloua gracilis* ha sido descrita como una planta amacollada perene, frecuentemente con rizomas cortos y fuertes, sus tallos generalmente 25-60 (-70) cm de largo pero ocasionalmente más cortos, erectos o de alguna forma geniculados en la base; nodos glabros o minuciosamente pilosos. Vainas glabras o esparcidamente largo-hirsutas. La lígula es una franja de pelos cortos, a veces con mechones de pelos largos marginales. Las láminas son cortas, planas en la base, 1-2.5 mm de ancho, generalmente escabrosa o corta-pubescente en la superficie axial y con frecuencia esparcido hirsuta. Inflorescencia con 1-3 (-4) ramas; ramas de 1.5-5 (-7) cm de largo, gruesas y densamente floreadas; el raquis escabroso en la espalda, terminado en una espiguilla apical generalmente reducida y en ocasiones semejando una continuación del raquis. Las espiguillas pectinadas comúnmente 40-90 o más por rama, estrechamente colocadas. Glumas glabras o escabrosas a hirsutas en el nervio central con pelos papilosos en la base. Lema de 4-5.5 mm de largo, pubescentes al menos en la base, con tres aristas de las hendiduras apical y lateral, las aristas de 1-3 mm de largo. Raquilla con mechones de pelo en la base de la flor perfecta y en la base del rudimento aristado. Rudimento secundario (sin aristas) presente en ocasiones. Cariópside angostamente obovada, 2.5-3 mm de largo y aprox. 0.5 mm de ancho (Gould, 1980).

Además se reporta que la espiga porta de 40 a 100 espiguillas de color verde, cambiando a púrpura oscuro en la madurez. Las glumas son desiguales, la primera de 2 a 3 mm de longitud, glabra, la segunda gluma de 5 a 6.5 mm de longitud, apiculada, no mucronada usualmente esparcido pilosa o hispida, a menudo papiloso-pubescente, pelos de 2 a 3 mm de longitud en ocasiones no pilosa pero con pubescencia corta y densa en los extremos, ocasionalmente con tubérculos purpúreos en la madurez. Las anteras de 2.2 a 2.5 mm de longitud, color amarillo. Florece de julio a noviembre (Herrera Arrieta et al., 2004).

Como se demuestra en las descripciones de la especie citadas, los ejemplares examinados muestran variación morfológica. Entre los caracteres más variables dentro de la especie resaltan el número de espiguillas en la espiga (de 40 a 100), la variación de color de las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

espiguillas de verde a púrpura, la longitud de las glumas, la presencia de pelos en las glumas, el tipo de pelos en las glumas, la longitud de las anteras, la longitud de los tallos, y la longitud y el número de ramas en la inflorescencia. Una evidencia de la gran variación que se puede llegar a encontrar en las poblaciones de esta especie es un estudio realizado con caracteres morfológicos de poblaciones de Chihuahua, México, en el cual se llegaron a determinar 173 ecotipos (Morales Nieto et al., 2009).

La variación morfológica de *B. gracilis* se ha reportado a lo largo de su área de distribución (Aguado-Santacruz et al., 2004; Gould, 1980; McGinnies et al., 1988), donde está sometida a climas áridos y semiáridos y es tolerante al frío, a la sequía y a los suelos alcalinos (Salas-Luévano et al., 2017). En relación a esto, un estudio reciente encontró que el tamaño de la hoja en *B. gracilis* está correlacionado con aspectos climáticos del hábitat de origen de cada planta, por esto se ha señalado que la variación morfológica substancial que existe entre las poblaciones de *B. gracilis* demuestra que la adaptación local, a diferentes climas, intensidades de pastoreo y ambientes competitivos, es importante para la especie (Butterfield and Wood, 2015). Algunos otros autores han concluido que la variación morfológica entre las poblaciones de *B. gracilis* reflejan y responden a la variación espaciotemporal de factores ambientales como las características del suelo, la cobertura de las plantas y la precipitación, pero no el pastoreo (Kotanen and Bergelson, 2000; McGinnies et al., 1988). Además se ha sugerido que la plasticidad observada en las raíces de algunos pastos, entre ellos *B. gracilis* (*Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash, *Andropogon gerardii* Vitman, *Pascopyrum smithii* (Rydb.) Barkworth & D.R. Dewey), de comunidades mésicas y semiáridas está influenciada por las variables abióticas que prevalecen, además de las respuestas específicas de cada especie (Derner and Briske, 1999).

Algunas investigaciones han abordado el estudio de caracteres de la especie empleando experimentos de jardín común (Butterfield and Wood, 2015; Riegel, 1940) y algunos otros con observaciones directas en campo (Kotanen and Bergelson, 2000). El primer estudio sobre la variación del crecimiento del pasto navajita azul lo realizó Riegel en 1940 con plantas a partir de semillas obtenidas de diferentes estados del centro de EEUU dentro de la Gran Planicie. En este estudio se reporta que las plantas del sur son más altas, presentan

hojas y tallos más largos y en general producen más follaje y raíces más anchas y largas que las del norte. Además en este estudio se encontró que las plantas del sur florecen más tarde que las del norte pero producen un número promedio mayor de espigas y éstas son más largas sin embargo el número de cariósides por espiga es menor que las que se producen en el centro y en el norte. A pesar de que este estudio atribuye a la herencia las variaciones observadas, hasta el momento no existe ningún estudio que haya contrastado la variación en morfología con la variación genética de la especie. En este contexto, el origen (genético y/o ambiental) de las diferencias morfológicas entre las poblaciones de esta especie no está claro.

III.2. Métodos

Análisis morfométrico

Después de identificar las muestras colectadas, a cada individuo de *B. gracilis* se le midieron 55 caracteres elegidos a partir de las descripciones de la especie (Arrieta et al., 2004; Gould, 1980; Herrera Arrieta et al., 2004). De estos, se seleccionaron solo los caracteres informativos, es decir aquellos que presentaban variación, para realizar los análisis morfométricos. De estos 35 caracteres nueve son vegetativos y 26 no vegetativos (inflorescencia; Cuadro II.10). Los caracteres se midieron en cada planta usando papel milimétrico, microscopio estereoscopio y regla. La captura de datos se realizó en el programa Excel 2007. El Análisis de Componentes Principales (ACP) se realizó en el programa PAST (PAleontological STatistics)(Hammer et al., 2009). La agrupación de los datos se basó en los resultados del análisis de los datos genéticos. La evaluación estadística de los puntajes de los componentes principales (CP) se realizó en PAST midiendo la distribución normal y homogeneidad de la varianza para posteriormente realizar el análisis de varianza (PERMANOVA) para probar la igualdad de las medias multivariadas con un valor de significancia del 0.05. A partir de las comparaciones pareadas se definieron las diferencias entre los grupos.

Los análisis de correlación entre caracteres morfológicos y los datos geográficos y ambientales se realizaron en R (Team, 2013). Los datos de latitud, longitud y altitud se obtuvieron de los datos de colecta de muestras mientras que los datos ambientales se

obtuvieron de las 19 capas bioclimáticas del WorldClim (<http://www.worldclim.org>), empleando la herramienta Point Sampling Tool de QGIS 2.18.4.

Cuadro III.1 Caracteres morfológicos medidos en las muestras *B. gracilis*.

<i>Caracteres vegetativos</i>
Altura
Ancho de nodo
Número de nodos
Longitud del internodo
Pelos en el margen de la lígula
Longitud máxima de la hoja
Ancho de la lámina
Número de ramas por inflorescencia
Longitud entre la primer y la segunda espiga de la rama más larga
<i>Caracteres no vegetativos</i>
Longitud de la espiga terminal
Ancho de la espiga
Longitud del raquis
Número de escamas basales de la espiga
Longitud de las escamas basales de la espiga
Longitud de la escama terminal/espiguilla vestigial de la espiga
Número de espiguillas
<i>Caracteres de la espiguilla</i>
Longitud de la primer gluma
Longitud de la segunda gluma
Tipo de pelos en la segunda gluma
Número de pelos en la segunda gluma
Longitud de pelos en la segunda gluma
Número de pelos en la primer gluma
Longitud de pelos en la primer gluma
Longitud de la lema
Ancho de la lema
Longitud de la arista central de la lema
Longitud de las aristas laterales de la lema
Longitud de los pelos de la lema
Longitud de la palea
Ancho de la palea
Longitud de la flor rudimentaria
Longitud de la base de la flor rudimentaria
Longitud de la arista central de la flor rudimentaria
Longitud de la arista lateral de la flor rudimentaria
Longitud de los pelos basales de la flor rudimentaria

III.3. Resultados

La variabilidad morfométrica entre las poblaciones y grupos de *B. gracilis* no es evidente. Cuando todos los caracteres se analizaron, los primeros dos componentes del ACP explicaron 96.3968% de la varianza (CP1 93.121%, CP2 3.2758%). El carácter más informativo para el CP1 fue la altura de la planta y para el CP2 la longitud del primer internodo, la longitud entre la primera y segunda espiguilla, el número de espiguillas y el número de pelos en las glumas. El gráfico del ACP muestra el grupo CUSA delimitado dentro de un grupo mayor donde las muestras de MEX y WUSA-NMEX están incluidas (Fig. III. 1), las diferencias en morfología del grupo CUSA contra los otros fue estadísticamente significativa (MEX: $F=7.048$, $P=0.0075$ y WUSA-NMEX: $F=10.69$, $P=0.0015$). Cuando los datos se agruparon de acuerdo a los clados filogenéticos (Fig. III.2), la prueba estadística PERMANOVA proporcionó soporte estadístico de las diferencias en morfología entre CUSA y NMEX ($F=14.71$, $P=0.0005$) así como WUSA ($F=7.754$, $P=0.0057$), sin embargo los clados CUSA y SCMEX (Sur-Centro de México) no fueron diferentes morfológicamente.

El único carácter floral que exhibió correlaciones significativas y mayores a 0.4 con variables ambientales fue la longitud de la segunda gluma. La longitud de la gluma se correlacionó con las variables de temperatura y con la latitud (Fig. III. 2). Por otro lado, la precipitación parece tener un efecto principalmente en caracteres vegetativos dado que la altura de la planta y la longitud máxima de la hoja mostraron altos valores de correlación (0.34042 y 0.38819 respectivamente) con la temporalidad de la precipitación (Fig. III. 2).

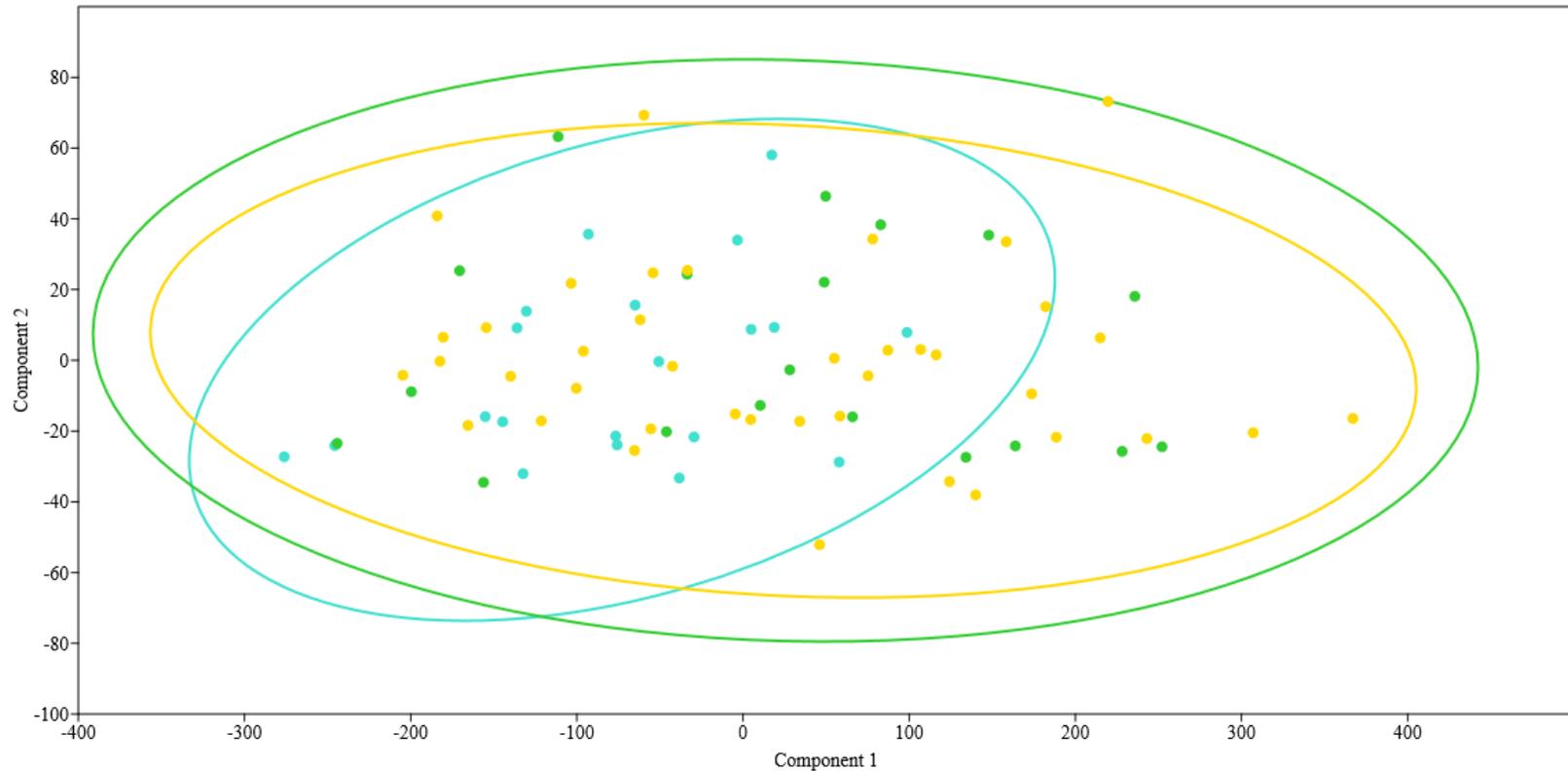


Figura III. 1. Gráfico del análisis de componentes principales de 35 caracteres morfológicos de *B. gracilis*. Los grupos se asignaron con base en la *K* verdadera obtenida en el análisis Structure correspondiendo a: MEX (verde), CUSA (azul) y WUSA-NMEX (amarillo). Los círculos representan elipses de confianza de 95%.

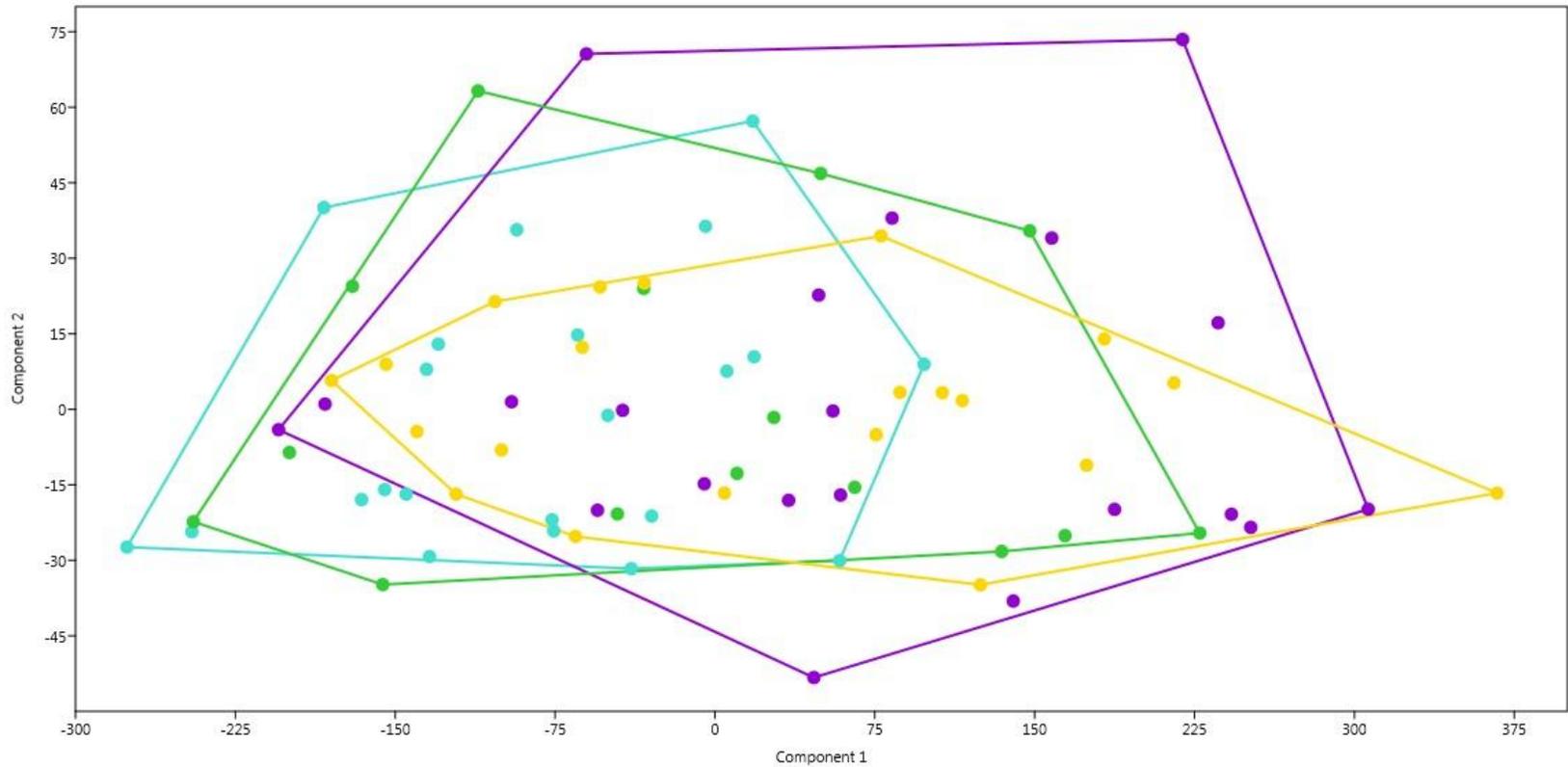


Figura III. 2. Gráfico del análisis de componentes principales de 35 caracteres morfológicos de *B. gracilis*. Los grupos se asignaron de acuerdo a los cuatro clados filogenéticos obtenidos correspondiendo a: CUSA (azul), NMEX (morado), SCMEX (verde) and WUSA (amarillo).

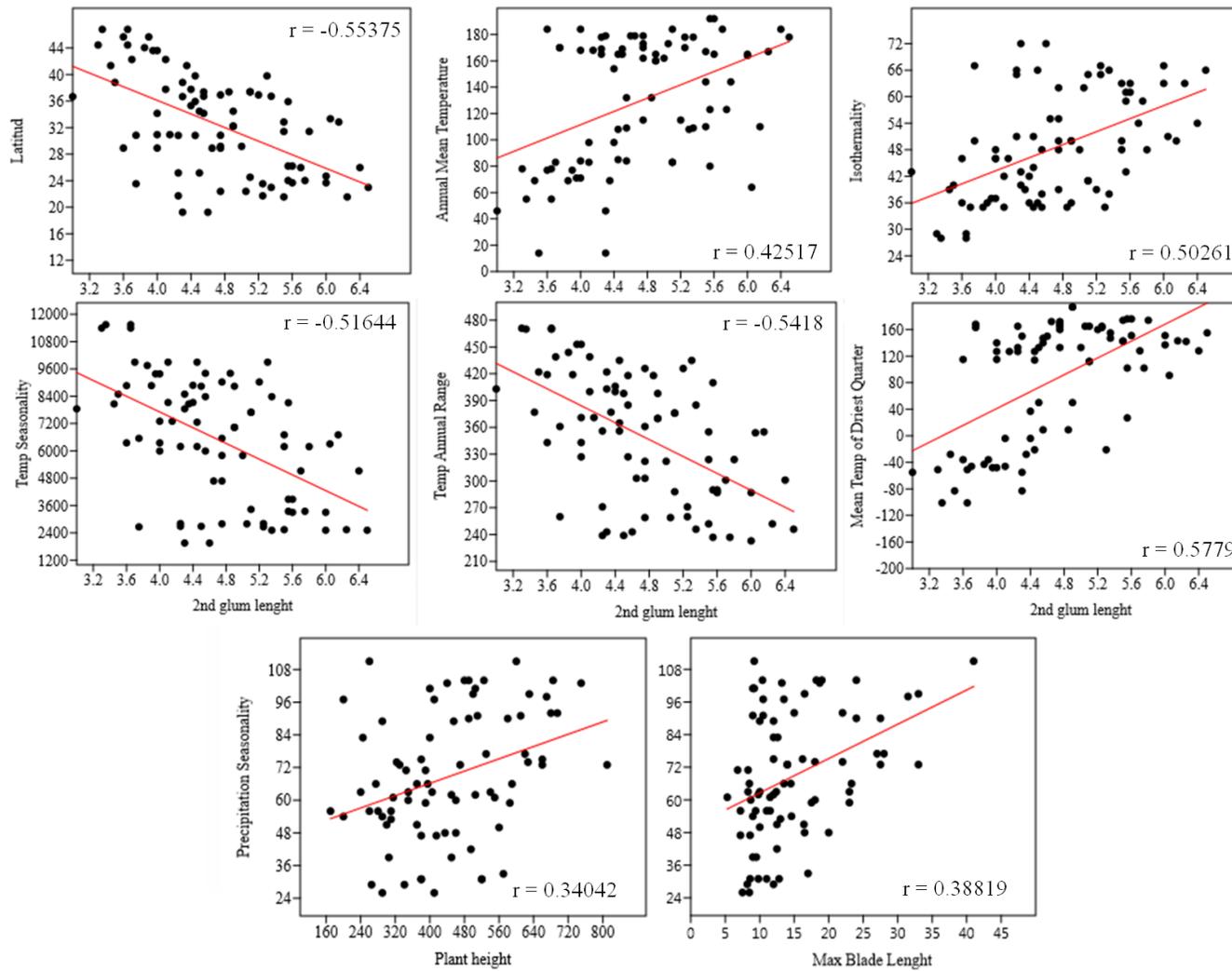


Figura III. 3. Gráficos de correlación entre caracteres morfológicos y variables ambientales, mostrando solo las correlaciones más altas.

III.4. Discusión

La plasticidad de la especie ha sido reportada en múltiples estudios (Alward and Joern, 1993; Derner and Briske, 1999; Johnson and Biondini, 2001), así como la tolerancia que tiene a climas áridos y semiáridos, temporadas de frío extremo, sequías y suelos alcalinos (Salas-Luévano et al., 2017). Las observaciones realizadas durante la colecta nos permitieron corroborar que *B. gracilis* se encuentra en ambientes con características del hábitat muy diferentes (Butterfield and Wood, 2015; Kotanen and Bergelson, 2000; McGinnies et al., 1988; Riegel, 1940), incluidos en 11 ecorregiones y muchos tipos de vegetación diferentes como matorral xerófilo (conservado y degradado), pastizal natural (conservado y degradado), pradera de pastos cortos, áreas abiertas rodeadas de bosque de coníferas, bosque de pino, bosque de junípero, cerros arenosos y orillas de carretera.

En relación a lo anterior y como ya se mencionó en el capítulo anterior, *B. gracilis* es autoploidice característica que permite la diversificación intralínea y la adaptación a la heterogeneidad ambiental local (Levin, 2002). Los linajes autoploides pueden dispersarse de la periferia de la distribución de los diploides, establecerse en sitios donde los progenitores están ausentes y formar fuentes de expansión (Parisod et al., 2010). Por todo lo anterior resulta fácil sugerir que el amplio rango de distribución que presenta *B. gracilis*, así como la plasticidad y tolerancia a diferentes hábitats están relacionados con las duplicaciones de su genoma. Por otro lado, se ha sugerido que la diferenciación ecológica entre diploides y autoploides es común, aunque resulta difícil identificar los mecanismos y los tiempos de divergencia ecológica (Parisod et al., 2010). Sin embargo, ni en este estudio ni en estudios previos (Butterfield and Wood, 2015) se ha encontrado evidencia que sugiera divergencia ecológica en relación a la ploidía para *B. gracilis*, aunque por los resultados obtenidos de la genética de poblaciones, es probable que en el futuro la divergencia intraespecífica sea mayor y resulte en una divergencia ecológica.

Generalmente las evaluaciones de respuesta morfológica ante alguna variable ambiental se realizan con el método de jardín común en el que se controlan todas las variables ambientales excepto la que se está evaluando para obtener la respuesta específica de la planta en estudio. El análisis morfométrico presentado aquí no se basa en mediciones de individuos sometidos a ambientes controlados, la morfología exhibida por las plantas

refleja su respuesta al ambiente en donde se encuentra. Uno de los resultados más destacables fue que todas las muestras que pertenecen al grupo CUSA exhiben alturas menores constantes. El pastoreo ha jugado un rol importante en la evolución de los pastizales nativos de la Gran Planicie de EUA, además se sabe que *B. gracilis* ha evolucionado por milenios en presencia del pastoreo del bisonte, y por más de una centena con el pastoreo de ganado por lo que es altamente resistente a la defoliación por ungulados (Kotanen and Bergelson, 2000). Una de las respuestas de *B. gracilis* a esta presión ambiental ha sido la reducción en altura en poblaciones de *B. gracilis* (Painter et al., 1993) y aunque algunos estudios no han podido demostrar este efecto a nivel local (Kotanen and Bergelson, 2000), nuestros resultados sugieren que es necesario abordarlo desde una perspectiva global.

Los resultados de este estudio pueden estar mostrando evidencia del efecto local que el pastoreo de la Gran Planicie tiene sobre la morfología de la especie, sin embargo los resultados del análisis de correlación sugieren que la variación en altura y longitud de hojas de *B. gracilis* en todo su rango se relacionan con variables climáticas como la estacionalidad de la precipitación. Este resultado coincide con lo encontrado por otros autores que sugieren que especialmente en la pradera de pastos cortos de Norteamérica, la producción de follaje así como el tamaño de las hojas se relacionan significativamente con la precipitación anual y estacional (Butterfield and Wood, 2015; Lauenroth et al., 1994).

De los 35 caracteres evaluados, solo la longitud de la segunda gluma se correlacionó con la latitud y con cinco variables de temperatura. De esas cinco, la mayor correlación se observó para la temperatura media del cuarto más seco (0.5779) es decir, las plantas con glumas más largas se encuentran en sitios con temperaturas medias altas. Esto coincide con lo reportado en uno de los primeros estudios de *B. gracilis* donde se comprueba que esta especie tiene requerimientos de temperaturas altas para su crecimiento y floración (Benedict, 1940). Por otro lado, la correlación entre la latitud y la longitud de la segunda gluma podría estar expresando la ya conocida relación entre latitud y longitud del fotoperiodo. En este caso se encontró que a latitudes menores (México) con fotoperiodos más largos, *B. gracilis* presenta longitudes de la segunda gluma mayores que a latitudes mayores (Norte de EUA) con fotoperiodos más cortos. Respecto a esto, existe un reporte

de que el vigor de las inflorescencias de algunas especies de *Bouteloua*, entre estas *B. gracilis*, se correlaciona positivamente con la longitud del fotoperiodo (Olmsted, 1943). Resulta interesante haber encontrado estos resultados ya que en general dentro de Poaceae, la morfología de las glumas es considerada informativa taxonómicamente porque suelen ser muy variables en tamaño y textura. Las glumas al encontrarse envolviendo las estructuras florales reproductivas tienen la función de protegerlas, además se ha encontrado evidencia de que contribuyen en la asignación de recursos, como el N, durante la formación de los granos (Lopes et al., 2006). Además, una vez formada la carióspside, las glumas junto con la lemma y palea parecen limitar el acceso a agua y luz a la semilla, contribuyendo a la dormancia de la misma (Kellogg, 2015). Es así que, los resultados obtenidos, junto con los reportes previos revelan que las glumas son una estructura sensible a múltiples condiciones ambientales que pudieran afectar tanto la reproducción como la propagación de la especie.

.

Conclusiones

La relación filogenética entre *B. gracilis* y el clado *B. chasei*-*B. herrera-arrietae* fueron confirmadas. Se confirmó la presencia de *B. herrera-arrietae* en dos sitios con vegetación de matorral desértico del Desierto Chihuahuense, en su límite norte con la Sierra Madre Occidental.

Las poblaciones de *Bouteloua gracilis* localizadas en México y en EUA comparten ancestría. Las relaciones filogenéticas dentro del clado de México revelan que las poblaciones de la distribución más sureña de la especie son las últimas en divergir mientras que las primeras en divergir son las localizadas en el norte del país. Las relaciones filogenéticas de las poblaciones de *B. gracilis* en EUA revelan una separación filética que corresponde con la ubicación geográfica de las Montañas Rocallosas.

La diversidad genética de las poblaciones de *B. gracilis* permite separarlas en tres grupos, que comparten haplotipos y no tienen estructura genética. Los alelos y haplotipos ancestrales tienen origen en las poblaciones del norte de México. La distribución de haplotipos y los modelos de distribución potencial sugieren dos rutas de migración de la especie desde el norte de México hacia el noreste y el centro-norte de EUA. La variación genética es mayor entre poblaciones que entre y dentro de los grupos. El flujo genético entre las poblaciones es alto y la migración entre demes conectados ocurre de una manera constante. Las poblaciones localizadas en la Sierra Madre Oriental y las Montañas Rocallosas del Sur presentan bajos niveles de heterocigosidad sugiriendo aislamiento genético. *B. gracilis* presenta signos de expansión demográfica, la más reciente a los pastizales centrales de EUA.

Durante el Último Máximo Glacial no se presentaban condiciones climáticas que potencialmente favorecieran la distribución de *B. gracilis* en el centro y oeste de EUA. Los procesos climáticos permitieron la expansión de *B. gracilis* hacia el norte después de la glaciación. Desde el Holoceno medio las condiciones ambientales del área potencial de distribución de *B. gracilis* han variado poco al igual que su área de distribución. La predicción de distribución potencial de la especie hacia el futuro bajo el modelo menos

optimista de cambio climático no refleja cambios importantes en la distribución de la misma.

La especie *B. gracilis* se encuentra en ambientes muy diferentes. La variación morfológica de *B. gracilis* no está claramente relacionada a la diversidad genética ni a la filogenia de sus poblaciones. No se encontró algún carácter morfológico que sea exclusivo de un grupo filogenético o genético. A su vez, dentro de la especie la variación genética y morfológica no son suficientes para determinar ecotipos o subespecies en *B. gracilis*.

La variación en altura y longitud de hojas de *B. gracilis* en todo su rango se relacionan con variables climáticas como la estacionalidad de la precipitación. La longitud de la segunda gluma se correlaciona con cinco variables de temperatura y con la latitud o probablemente la variación del fotoperiodo a través de la misma.

Lo reportado en este estudio sobre una de las especies clave y dominantes de los pastizales de Norteamérica nos da un panorama general que nos permite predecir que la vulnerabilidad de las poblaciones de *B. gracilis* ante futuros cambios es baja por poseer características como la auto duplicación del genoma, plasticidad fenotípica, diversidad genética, flujo genético y migración constante, así como su adaptación a diferentes tipos de hábitats. Lo anterior no significa que las poblaciones de *B. gracilis* y el ecosistema de pastizal estén exentos de sufrir alteraciones como consecuencia del cambio climático y en general del cambio global de origen antrópico, pues muchos aspectos continúan amenazando este ecosistema y las comunidades de *B. gracilis*, por ejemplo alteraciones en la disponibilidad y calidad de agua, el impacto de las especies invasoras o las transformaciones de las comunidades.

Bibliografía

- Aguado-Santacruz, G.A., Leyva-López, N.E., Pérez-Márquez, K.I., García-Moya, E., Arredondo-Moreno, J.T., Martínez-Soriano, J.P., 2004. Genetic variability of *Bouteloua gracilis* populations differing in forage production at the southernmost part of the North American Graminetum. *Plant Ecology* 170, 287-299.
- Albertson, F.W., Riegel, D.A., Tomanek, G.W., 1966. Ecological studies of blue grama grass (*Bouteloua gracilis*). Fort Hays Kansas State College, Hays,.
- Alward, R.D., Detling, J.K., Milchunas, D.G., 1999. Grassland vegetation changes and nocturnal global warming. *Science* 283, 229-231.
- Alward, R.D., Joern, A., 1993. Plasticity and overcompensation in grass responses to herbivory. *Oecologia* 95, 358-364.
- Anderson, R.C., 2006. Evolution and origin of the Central Grassland of North America: climate, fire, and mammalian grazers 1. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 133, 626-647.
- Andrews, K.R., Good, J.M., Miller, M.R., Luikart, G., Hohenlohe, P.A., 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics* 17, 81-92.
- Angulo, D.F., Amarilla, L.D., Anton, A.M., Sosa, V., 2017. Colonization in North American arid lands: The journey of agarito (*Berberis trifoliolata*) revealed by multilocus molecular data and packrat midden fossil remains. *PloS one* 12, e0168933.
- Arredondo, T., Delgado-Balbuena, J., Huber-Sannwald, E., García-Moya, E., Loescher, H., Aguirre-Gutiérrez, C., Rodríguez-Robles, U., 2018. Does precipitation affects soil respiration of tropical semiarid grasslands with different plant cover types? *Agriculture, Ecosystems & Environment* 251, 218-225.
- Arrieta, Y.H., Peterson, P.M., de la Cerda Lemus, M., 2004. Revisión de *Bouteloua* Lag. (Poaceae). Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango.
- Arrieta, Y.H., Peterson, P.M., Valdés-Reyna, J., 2008. *Bouteloua* (poaceae: chloridoideae: cynodonteae: boutelouinae) del Noreste de México. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 917-981.
- Augustine, D.J., Blumenthal, D.M., Springer, T.L., LeCain, D.R., Gunter, S.A., Derner, J.D., 2018. Elevated CO₂ induces substantial and persistent declines in forage quality irrespective of warming in mixedgrass prairie. *Ecological Applications*.
- Axelrod, D.I., 1985. Rise of the grassland biome, central North America. *The Botanical Review* 51, 163-201.
- Balleza Gallardo, C.S., 2017. Análisis del deterioro ecológico del matorral crasicaule en el valle de San Luis Potosí (México). *Agenda Ambiental*.
- Beard, J.B., 2012. Origin, biogeographical migrations and diversifications of turfgrasses. Michigan State University Press East Lansing, MI, USA.
- Beerli, P., Felsenstein, J., 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 4563-4568.
- Benedict, H., 1940. Effect of day length and temperature on the flowering and growth of four species of grasses. *Journal of Agricultural Research* 61, 661-671.
- Bossart, J., Prowell, D.P., 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends in Ecology & Evolution* 13, 202-206.

- Bushey, J.A., Is it plastic or just fantastic?: understanding the role of plasticity and local adaptation in the drought tolerance of *Bouteloua gracilis*. Colorado State University. Libraries.
- Bushey, J.A., 2018. Is it plastic or just fantastic?: understanding the role of plasticity and local adaptation in the drought tolerance of *Bouteloua gracilis*. Colorado State University. Libraries.
- Butterfield, B.J., Wood, T.E., 2015. Local climate and cultivation, but not ploidy, predict functional trait variation in *Bouteloua gracilis* (Poaceae). *Plant Ecology* 216, 1341-1349.
- Cain, S.A., 1951. *Fundamentos de fitogeografía*. ACME, Buenos Aires.
- Castelloe, J., Templeton, A.R., 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular phylogenetics and evolution* 3, 102-113.
- Chapin III, F.S., Matson, P.A., Vitousek, P., 2011. *Principles of terrestrial ecosystem ecology*. Springer Science & Business Media.
- Cheplick, G.P., 1998. Seed dispersal and seedling establishment in grass populations. *Population biology of grasses*. Cambridge University Press, Cambridge, 84-105.
- Cherwin, K., Knapp, A., 2012. Unexpected patterns of sensitivity to drought in three semi-arid grasslands. *Oecologia* 169, 845-852.
- Coffin, D.P., Lauenroth, W.K., 1989. Disturbances and gap dynamics in a semiarid grassland: a landscape-level approach. *Landscape Ecology* 3, 19-27.
- Columbus, J., Kinney, M., Pant, R., Delgado, M.S., 1998. Cladistic parsimony analysis of internal transcribed spacer region (nrDNA) sequences of *Bouteloua* and relatives (Gramineae: Chloridoideae). *Aliso* 17, 99-130.
- Columbus, J.T., Cerros-Tlatilpa, R., Kinney, M.S., Siqueiros-Delgado, M.E., Bell, H.L., Griffith, M.P., Refulio-Rodríguez, N.F., 2007. Phylogenetics of Chloridoideae (Gramineae): a preliminary study based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast trnL-F sequences. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany* 23, 565-579.
- Columbus, J.T., Kinney, M.S., Siqueiros-Delgado, M., Porter, J.M., 2000. Phylogenetics of *Bouteloua* and relatives (Gramineae: Chloridoideae): cladistic parsimony analysis of internal transcribed spacer (nrDNA) and trnL-F (cpDNA) sequences. *Grasses: systematics and evolution*, 189-194.
- Columbus, J.T., Peterson, P.M., Refulio Rodríguez, N., Cerros Tlatilpa, R., Kinney, M.S., 2010. Phylogenetics of Muhlenbergiinae (Poaceae: Chloridoideae, Cynodonteae) based on ITS and trnL-F DNA sequences. *Diversity, Phylogeny, and evolution in the monocotyledons*.
- DeChaine, E.G., Martin, A.P., 2005. Marked genetic divergence among sky island populations of *Sedum lanceolatum* (Crassulaceae) in the Rocky Mountains. *American Journal of Botany* 92, 477-486.
- DeKeyser, E.S., Meehan, M., Clambey, G., Krabbenhoft, K., 2013. Cool season invasive grasses in northern Great Plains natural areas. *Natural Areas Journal* 33, 81-90.
- Derner, J., Schuman, G., 2007. Carbon sequestration and rangelands: a synthesis of land management and precipitation effects. *Journal of soil and water conservation* 62, 77-85.
- Derner, J.D., Briske, D.D., 1999. Does a tradeoff exist between morphological and physiological root plasticity? A comparison of grass growth forms. *Acta Oecologica* 20, 519-526.
- Doyle, J.J., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull* 19, 11-15.
- Doyle, J.J., 1992. Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Systematic Botany*, 144-163.

- Dávila-Aranda, P., Lira-Saade, R., Valdés-Reyna, J., 2004. Endemic species of grasses in Mexico: a phytogeographic approach. *Biodiversity & Conservation* 13, 1101-1121.
- Earl, D., Vonholdt, B., 2012. Earl DA, VonHoldt BM.. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Cons Genet Res* 4: 359-361.
- Eaton, D.A., 2014. PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, btu121.
- Eaton, D.A., Spriggs, E.L., Park, B., Donoghue, M.J., 2017. Misconceptions on missing data in RAD-seq phylogenetics with a deep-scale example from flowering plants. *Systematic Biology* 66, 399-412.
- Eckert, C., Samis, K., Loughheed, S., 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular ecology* 17, 1170-1188.
- Ehrendorfer, F., 1980. Polyploidy and distribution. *Polyploidy*. Springer, pp. 45-60.
- EPA, 2017. Ecoregions North-America. United States Environmental Protection Agency.
- Espinoza, J.J.O., Ayala, C.C., Castellón, E.E., Saldivar, F.G., Saucedo, J.U., Jurado, E., ChapaVargas, L., Jaramillo, E.M., Hernández, E.O., 2017. Livestock effect on floristic composition and vegetation structure of two desert scrublands in northwest Coahuila, Mexico. *The Southwestern Naturalist* 62, 138-145.
- Etter, P.D., Bassham, S., Hohenlohe, P.A., Johnson, E.A., Cresko, W.A., 2011. SNP discovery and genotyping for evolutionary genetics using RAD sequencing. *Molecular methods for evolutionary genetics*, 157-178.
- Excoffier, L., 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 13, 853-864.
- Excoffier, L., Lischer, H.E., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* 10, 564-567.
- Fair, J., Lauenroth, W., Coffin, D., 1999. Demography of *Bouteloua gracilis* in a mixed prairie: analysis of genets and individuals. *Journal of Ecology* 87, 233-243.
- Fults, J.L., 1942. Somatic chromosome complements in *Bouteloua*. *American Journal of Botany* 29, 45-55.
- Gould, F., 1968. Chromosome numbers of Texas grasses. *Canadian Journal of Botany* 46, 1315-1325.
- Gould, F., Kapadia, Z., 1964. Biosystematic studies in the *Bouteloua curtipendula* complex II. *Taxonomy*. *Brittonia* 16, 182-207.
- Gould, F.W., 1966. Chromosome numbers of some Mexican grasses. *Canadian Journal of Botany* 44, 1683-1696.
- Gould, F.W., 1980. The genus *Bouteloua* (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 348-416.
- Gould, F.W., 2016. Chromosome numbers in some Mexican grasses. *Botanical Sciences*, 49-62.
- Gould, F.W., Kapadia, Z.J., 1962. Biosystematic studies in the *Bouteloua curtipendula* complex. I. The aneuploid rhizomatous *B. curtipendula* of Texas. *American Journal of Botany* 49, 887-891.
- Gugger, P.F., Ikegami, M., Sork, V.L., 2013. Influence of late Quaternary climate change on present patterns of genetic variation in valley oak, *Quercus lobata* Née. *Molecular Ecology* 22, 3598-3612.

- Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P., 2009. PAST-PAlaeontological STatistics, ver. 1.89. University of Oslo, Oslo, 1-31.
- Herrera Arrieta, Y., Peterson, P.M., de la Cerda Lemus, M., 2004. Revisión de *Bouteloua Lag.* (Poaceae). Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango.
- Hudson, R.R., 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford surveys in evolutionary biology* 7, 44.
- Joern, A., Mole, S., 2005. The plant stress hypothesis and variable responses by blue grama grass (*Bouteloua gracilis*) to water, mineral nitrogen, and insect herbivory. *Journal of chemical ecology* 31, 2069-2090.
- Johnson, H.A., Biondini, M.E., 2001. Root morphological plasticity and nitrogen uptake of 59 plant species from the Great Plains grasslands, USA. *Basic and Applied Ecology* 2, 127-143.
- Kellogg, E.A., 2015. Flowering plants. monocots: Poaceae. Springer.
- Knowles, L.L., Kubatko, L.S., 2010. Estimating species trees: an introduction to concepts and models. *Estimating species trees: practical and theoretical aspects*, 1-14.
- Kotanen, P.M., Bergelson, J., 2000. Effects of simulated grazing on different genotypes of *Bouteloua gracilis*: how important is morphology? *Oecologia* 123, 66-74.
- L. Giuliani, A., Kelly, E., Knapp, A., 2014. Geographic variation in growth and phenology of two dominant central US grasses: consequences for climate change.
- Lauenroth, W., Sala, O., Coffin, D., Kirchner, T., 1994. The importance of soil water in the recruitment of *Bouteloua gracilis* in the shortgrass steppe. *Ecological Applications* 4, 741-749.
- Lauenroth, W.K., Burke, I.C., Gutmann, M.P., 1999. The structure and function of ecosystems in the central North American grassland region. *Great Plains Research*, 223-259.
- Levin, D.A., 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Loera, I., Ickert-Bond, S.M., Sosa, V., 2017. Pleistocene refugia in the Chihuahuan Desert: the phylogeographic and demographic history of the gymnosperm *Ephedra compacta*. *Journal of biogeography* 44, 2706-2716.
- Lopes, M.S., Cortadellas, N., Kichey, T., Dubois, F., Habash, D.Z., Araus, J.L., 2006. Wheat nitrogen metabolism during grain filling: comparative role of glumes and the flag leaf. *Planta* 225, 165-181.
- Loveless, M.D., Hamrick, J.L., 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual review of ecology and systematics* 15, 65-95.
- Lowe, A., Harris, S., Ashton, P., 2009. *Ecological genetics: design, analysis, and application*. John Wiley & Sons.
- Mac, M.J., Opler, P.A., Haecker, C.E., Doran, P.D., 1998. *Status and Trends of the Nation's Biological Resources, Volume 2*. DTIC Document.
- Manni, F., Guérard, E., 2004. BARRIER, Version 2.2. Manual of the User. Population Genetics Team, Museum of Mankind (Musée de l'Homme), Paris, France.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research* 27, 209-220.
- Masters, R.A., Nissen, S.J., Gaussoin, R.E., Beran, D.D., Stougaard, R.N., 1996. Imidazolinone herbicides improve restoration of Great Plains grasslands. *Weed Technology* 10, 392-403.

- McGinnies, W., Laycock, W., Tsuchiya, T., Yonker, C., Edmunds, D., 1988. Variability within a native stand of blue grama. *Journal of Range Management*, 391-395.
- McLaughlin, S.P., 1989. Natural floristic areas of the western United States. *Journal of Biogeography*, 239-248.
- Metcalf, S.E., O'Hara, S.L., Caballero, M., Davies, S.J., 2000. Records of Late Pleistocene–Holocene climatic change in Mexico — a review. *Quaternary Science Reviews* 19, 699-721.
- Miller, M.A., Schwartz, T., Pickett, B.E., He, S., Klem, E.B., Scheuermann, R.H., Passarotti, M., Kaufman, S., O'Leary, M.A., 2015. A RESTful API for access to phylogenetic tools via the CIPRES science gateway. *Evolutionary Bioinformatics* 11, EBO. S21501.
- Minnick, T.J., Coffin, D.P., 1999. Geographic patterns of simulated establishment of two *Bouteloua* species: implications for distributions of dominants and ecotones. *Journal of Vegetation Science* 10, 343-356.
- Morafka, D., 1977. A biogeographic analysis of the Chihuahuan Desert through its herptofauna. Dr. W. Junk. BVM Publishers, The Hague, The Netherlands.
- Morales Nieto, C., Madrid Pérez, L., Melgoza Castillo, A., Martínez Salvador, M., Arévalo Gallegos, S., Rascón Cruz, Q., Jurado Guerra, P., 2009. Morphological analysis of blue grama grass [*Bouteloua gracilis* (Willd. ex Kunth) Lag. ex Griffiths] diversity in Chihuahua, Mexico. *Tecnica Pecuaria en Mexico* 47, 245-256.
- Morin, P.A., Luikart, G., Wayne, R.K., 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 208-216.
- Moser, S.C., Dilling, L., 2011. Communicating climate change: closing the science-action gap. *The Oxford handbook of climate change and society*, 161-174.
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32, 268-274.
- Nielsen, E.L., Humphrey, L.M., 1937. Grass studies. I. Chromosome numbers in certain members of the tribes Festuceae, Hordeae, Aveneae, Agrostideae, Chlorideae, Phalarideae and Tripsaceae. *American Journal of Botany* 24, 276-279.
- Olmsted, C.E., 1943. Growth and Development in Range Grasses. III. Photoperiodic Responses in the Genus *Bouteloua*. *Botanical Gazette* 105, 165-181.
- Olson, D.M., Dinerstein, E., 1998. The Global 200: a representation approach to conserving the Earth's most biologically valuable ecoregions. *Conservation Biology* 12, 502-515.
- Painter, E., Detling, J., Steingraeber, D., 1993. Plant morphology and grazing history. *Vegetatio* 106, 37-62.
- Paradis, E., 2010. pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics* 26, 419-420.
- Parisod, C., Holderegger, R., Brochmann, C., 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New phytologist* 186, 5-17.
- Peterson, P.M., Romaschenko, K., Arrieta, Y.H., 2015. Phylogeny and subgeneric classification of *Bouteloua* with a new species, *B. herrera-arrietae* (Poaceae: Chloridoideae: Cynodonteae: Boutelouinae). *Journal of Systematics and Evolution* 53, 351-366.
- Peterson, P.M., Romaschenko, K., Johnson, G., 2010. A classification of the Chloridoideae (Poaceae) based on multi-gene phylogenetic trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55, 580-598.

- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Ray, N., Currat, M., Excoffier, L., 2003. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution* 20, 76-86.
- Reeder, J.R., 1977. Chromosome numbers in western grasses. *American Journal of Botany* 64, 102-110.
- Riegel, A., 1940. A study of the variations in the growth of blue grama grass from seed produced in various sections of the Great Plains region. *Transactions of the Kansas Academy of Science (1903-)* 43, 155-171.
- Riegel, A., 1941. Life history and habits of blue grama. *Transactions of the Kansas Academy of Science (1903-)* 44, 76-85.
- Rogers, A.R., Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution* 9, 552-569.
- Romsdahl, R., Atkinson, L., Schultz, J., 2013. Planning for climate change across the US Great Plains: Concerns and insights from government decision-makers.
- Rondeau, R.J., Decker, K.L., Doyle, G.A., 2018. Potential Consequences of Repeated Severe Drought for Shortgrass Steppe Species. *Rangeland Ecology & Management* 71, 91-97.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61, 539-542.
- Rzedowski, J., 1991. El endemismo en la flora fanerogámica mexicana: una apreciación analítica preliminar. *Acta Botánica Mexicana*, 47-64.
- Rzedowski, J., 2006. Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México 504.
- Rzedowski, J., 1975. An ecological and phytogeographical analysis of the grasslands of Mexico. *Taxon*, 67-80.
- Salas-Luévano, M.A., Mauricio-Castillo, J., González-Rivera, M., Vega-Carrillo, H., Salas-Muñoz, S., 2017. Accumulation and phytostabilization of As, Pb and Cd in plants growing inside mine tailings reforested in Zacatecas, Mexico. *Environmental Earth Sciences* 76, 806.
- Samson, F.B., Knopf, F.L., Ostlie, W.R., 2004. Great Plains ecosystems: past, present, and future. *Wildlife Society Bulletin* 32, 6-15.
- Siqueiros-Delgado, M.E., Ainouche, M., Columbus, J.T., Ainouche, A., 2013. Phylogeny of the *Bouteloua curtipendula* complex (Poaceae: Chloridoideae) based on nuclear ribosomal and plastid DNA sequences from diploid taxa. *Systematic Botany* 38, 379-389.
- Siqueiros-Delgado, M.E., Fisher, A.E., Columbus, J.T., 2017. Polyploidy as a Factor in the Evolution of the *Bouteloua curtipendula* Complex (Poaceae: Chloridoideae). *Systematic botany* 42, 432-448.
- Siqueiros-Delgado, M.E., Rodríguez-Avalos, J.A., Martínez-Ramírez, J., Sierra-Muñoz, J.C., 2016. Situación actual de la vegetación del estado de Aguascalientes, México. *Botanical Sciences* 94, 455-470.
- Slatkin, M., Voelm, L., 1991. FST in a hierarchical island model. *Genetics* 127, 627-629.
- Snyder, L., Harlan, J.R., 1953. A cytological study of *Bouteloua gracilis* from western Texas and eastern New Mexico. *American Journal of Botany* 40, 702-707.

Solomon, S., 2007. IPCC (2007): Climate change the physical science basis. AGU Fall Meeting Abstracts.

Soltis, D.E., Soltis, P.S., 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. *Molecular systematics of plants II*. Springer, pp. 1-42.

Sork, V.L., Nason, J., Campbell, D.R., Fernandez, J.F., 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology & Evolution* 14, 219-224.

Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688-2690.

Steinauer, E.M., Collins, S.L., 1996. *Prairie ecology: The tallgrass prairie*. Prairie Conservation. Island Press, Washington, 39-52.

Swenson, N.G., Howard, D.J., 2005. Clustering of contact zones, hybrid zones, and phylogeographic breaks in North America. *The American Naturalist* 166, 581-591.

Team, R.C., 2013. R: A language and environment for statistical computing.

Tsuchiya, T., McGinnies, W., Shahla, A., 1992. A chromosome study of blue grama (*Bouteloua gracilis*) in Northern Colorado. *Great Plains Research*, 255-262.

Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., Melillo, J.M., 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 277, 494-499.

Vásquez-Cruz, M., Sosa, V., 2016. New insights on the origin of the woody flora of the Chihuahuan Desert: The case of *Lindleya*. *American journal of botany* 103, 1694-1707.

Weaver, T., Payson, E.M., Gustafson, D.L., 1996. *Prairie ecology—the shortgrass prairie*. Prairie Conservation. Island Press, Washington, DC, 67-75.

Whitlock, M.C., McCauley, D.E., 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1/(4Nm + 1)$. *Heredity* 82, 117-125.

Wright, H., 1981. Vegetation East of the Rocky Mountains 18,000 Years Ago 1. *Quaternary Research* 15, 113-125.

Yanoff, S., Muldavin, E., 2008. Grassland–shrubland transformation and grazing: a century-scale view of a northern Chihuahuan Desert grassland. *Journal of Arid Environments* 72, 1594-1605.

Anexos



Anexo A. Protocolo Etter et al. 2011 modificado.

***RADseq* library preparation protocol**

Modified from Etter *et al.* 2011

May 2017; edited LKW Aug. 2017

A detailed list of supplies is available on request.

Do not vortex enzymes, and set all reactions in the thermocycler – even those at ‘room temperature’ – in order to maintain consistent temperature. Most reactions follow the pattern incubate—heat-inactivate—hold at 4° C.

Materials

A. DNA extractions

- a. Normalized DNA concentrations improve multiplexing.
- b. 300 ng of plant DNA (with a minimum concentration 17 ng/μl) and H₂O to 17.5 μl. This is easier if the samples are sorted by concentration.

B. Restriction endonuclease digestion

- a. Restriction enzyme (make sure it can be heat inactivated).
- b. Clean, high-molecular weight genomic DNA: min. 17.5 μl (17 ng/μl).

C. P1 Adapter ligation

- a. NEB Buffer 2
- b. ATP 10 mM (or 100mM) (NEB)
- c. Barcoded adapters* : personal dilution set, diluted to 100 nM
- d. T4 DNA Ligase (2,000,000 U/ml)

D. Purification steps

- a. MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)

E. DNA shearing

- a. Covaris sonicator at UCR

F. Size selection

- a. BluePippin at UCR

G. End repair

- a. Quick Blunting Kit (NEB)

H. 3'-dA overhang addition

- a. NEB Buffer 2
- b. dATP (10 mM) (NEB)
- c. Klenow Fragment (3' to 5' exo-) (5,000 U/ml) (NEB)

I. P2 Adapter ligation

- a. Buffer NEB 2
- b. ATP (10 mM) (NEB)
- c. P2 Adapter (10 μM) (idt)

J. PCR enrichment

- a. Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (NEB)
- b. Amplification primers (10 μM) (idt)

PROTOCOL:

Note need for appropriate handling of hazardous waste using the MinElute kit

1. Restriction endonuclease digestion: Essentially, follow the manufacturer's instructions. If necessary, check digestion product on an agarose gel (0.6% agarose).

i) Load 300 ng of DNA extractions into clearly labeled plate or strip-tubes. **Keep on ice.**

ii.) If all your DNA extractions are the same concentration (20 ng/ μ l), prepare a master mix with the restriction enzyme as shown below, and add 5 μ L of master mix into each digest. Pipette up and down to mix thoroughly and **keep on ice;**

	<u>1x</u>	<u>100x</u>
10X NEB Buffer 3.1	1.5 μ l	250 μ l
<i>SbfI</i>	0.15 μ l	50 μ l
H ₂ O	3.35 μ l	33.5 μ l
DNA	15 μ l @ 20 ng/ μ l (300 ng)	

iii.) If, however, you are adding different volumes of DNA, mix individually. Note: mixing the enzyme and the 10x buffer could lead to enzyme inactivation.

iv.) Flick softly, and spin for 5 seconds.

v.) Incubate in the thermocycler at 37° C for 1 hour, then heat-inactivate the restriction enzyme following manufacturer's instructions**. *SbfI* inactivates at 80° C for 20 minutes.

2. P1 Adapter ligation

i.) To each inactivated digest, add: 2.5 μ l Barcoded P1 Adapter (100 nM). **Keep on ice.**

>> Make sure to add the P1 adapters **before** the T4 ligase to avoid re-ligation of genomic DNA.<<<

Note: T4 DNA Ligase is unstable on ice for long periods. Therefore, Invitrogen recommends the enzyme be kept at -20°C until within 5-10 minutes of use and returned IMMEDIATELY to -20°C after use.

ii.) Prepare a master mix with T4 enzyme as follow. **Keep on ice:**

	<u>1x</u>	<u>100x</u>
10X NEB Buffer 2	0.5 μ l	50 μ l
T4 DNA Ligase (2,000,000 U/ml)	0.25 μ l	25 μ l
ATP (10 mM)*	3 μ l	300 μ l

*If using 100 mM ATP, add 0.3 μ l and H₂O to 30 μ l .

>>> Do not thaw ATP more than necessary or it will degrade quickly.<<<

iii.) To each digest mixed with P1 Adapter, add 3.75 µl of T4 master mix.

iv.) Incubate reaction in the thermocycler set to 23°C for 30 minutes

v.) Heat-inactivate T4 DNA Ligase for 20 minutes at 65° C.

3. Multiplexing

Keep ligation products on ice, while combining the barcoded samples into a single tube. Use 100-300 µl aliquot of the mix containing 4-5 µg DNA to complete the library preparation, and freeze the rest at -20° C.

4. DNA shearing

Shear DNA samples to an average size of 400 bp to create a library of P1/restriction-site-ligated molecules. Use the standard settings on the Covaris sonicator. Load up to 5 µg of DNA into a 130 µl Covaris tube. Two of these should be enough. Consider that before loading the Sonicator it needs to degas a chamber which takes approximately 30 minutes.

5. Size selection

i.) This step removes free un-ligated or concatomerized P1 adapters and restricts the size range of fragments that can be sequenced efficiently on an Illumina flow cell.

ii.) Following the standard protocol, use the BluePippin instrument to select fragments 300-500 bp in size. BluePippin cassettes have five lanes that can contain multiple libraries. Each well can be loaded only with up to 30 µl of sonication product. This run should take around 40 minutes. When it is done, pick up your size-selected library from the elution chambers.

iii.) Clean up the product with a MinElute column. Elute in 20 µl of Solution EB.

HAZ MAT Disposal: Waste of solutions PB and PE are Haz Mat

6. End repair

i.) To the eluate from the previous step, add:

2.5 µl 10X Blunting Buffer (NEB Quick Blunting Kit)
2.5 µl dNTP mix (1mM)
1.0 µl Blunt Enzyme Mix

ii.) Incubate in the thermocycler at room temperature for 30 minutes.

iii.) Purify with a MinElute column. Elute in 43 μ l Solution EB.

HAZ MAT Disposal: Waste of solutions PB and PE are Haz Mat

7. 3'-dA overhang addition

i.) To the eluate from the previous step, add:

5.0 μ l 10X NEB Buffer 2 1.0 μ l dATP (10mM) 3.0 μ l Klenow Fragment (3' \rightarrow 5' exo-)

ii.) Incubate at 37° C for 30 minutes in a thermocycler. Allow reaction to cool slowly to ambient temperature (15 minutes).

iii.) Purify with a MinElute column. Elute in 40 μ l EB.

HAZ MAT Disposal: Waste of solutions PB and PE are Haz Mat

8. P2 Adapter ligation

This step ligates the P2 adapter, a “Y” adapter with divergent ends that contains a 3'-dT overhang, onto the ends of blunt DNA fragments with 3'-dA overhangs.

i.) To the eluate from previous step, add:

5.0 μ l 10X NEB Buffer 2 1.0 μ l P2 Adapter (10 μ M) 5 μ l ATP (10 mM) 0.5 μ l concentrated T4 DNA Ligase.

Note: T4 DNA Ligase is unstable on ice for long periods. Therefore, Invitrogen recommends the enzyme be kept at -20°C until within 5-10 minutes of use and returned IMMEDIATELY to -20°C after use.

ii.) Incubate reaction at room temperature for 30 minutes in a thermocycler.

iii.) Purify with MinElute column. Elute in 52 μ l EB.

HAZ MAT Disposal: Waste of solutions PB and PE are Haz Mat

9. PCR Enrichment

i.) Perform a test amplification to determine library quality. In a PCR tube, combine:

10.5 μ l H ₂ O 12.5 μ l Phusion High-Fidelity Master Mix 0.5 μ l primer P1 (10 μ M) 0.5 μ l primer P2 (10 μ M) 1.0 μ l RAD library template
--

ii.) Perform 18 cycles of amplification in a thermal cycler:

30 sec @ 98° C
18 cycles of 10 sec @ 98° C,
30 sec @ 65° C
30 sec @ 72° C
5 min @ 72° C
hold @ 4° C

iii.) Run 1 µl PCR product on a 1.0% agarose gel next to 1.0 µl RAD library template and 1 µl 100 bp DNA Ladder. If the amplified product is at least twice as bright as the template, perform a larger volume amplification (2 X 50 µl). If, however, the amplification looks poor, try a second test PCR reaction using more library template. The template should be dim, yet visible on the gel.

iv.) Purify the final large volume reaction with a MinElute column. Elute in 30 µl Solution EB.

HAZ MAT Disposal: Waste of solutions PB and PE are Haz Mat

10. Size selection and sequencing

Following the standard protocol, use the BluePippin instrument to select fragments 360-600 bp (targeting longer fragments due to ligation of P2 adapter). Pick up from the elution chamber, and submit for QC and sequencing. Blue pippin buffer should be OK for sequencing. An exemplary Bioanalyzer profile of a library prepared following this method is shown below.

Reference: Etter, P.D., Bassham, S., Hohenlohe, P.A., Johnson, E.A., & Cresko, W.A. (2011). SNP discovery and genotyping for evolutionary genetics using RAD sequencing. *Methods in Molecular Biology* 772, 157–178. http://doi.org/10.1007/978-1-61779-228-1_9

Anexo B. Códigos empleados para cada una de las muestras incluidas en la biblioteca genómica.

P1 Barcode	Well Position	P1 Barcode	Well Position	P1 Barcode	Well Position
ATAGGCG	A1	CGATTGAT	D1	GGTTCCAATG	G1
AGCAAGG	A2	CGATCATG	D2	GGATAAGAGG	G2
AGACCGC	A3	CCTTCCTC	D3	GCGGTTACTG	G3
ACGGTCT	A4	CCTGAAGG	D4	GCCTAGTAAG	G4
ACGAATC	A5	AGAACTAGT	D5	GATGGAATAG	G5
ACCGCAG	A6	ACTGCATCT	D6	GATGCTGACG	G6
AATATAC	A7	ACGAGCGTA	D7	CTTGGCATTG	G7
AAGTAAG	A8	ACCATATAT	D8	CTCCGTTATG	G8
TCAGAAC	A9	ACCAGGCCG	D9	CTTACCATCT	G9
GCATTGC	A10	AACCATGGA	D10	CTCGCGCAGT	G10
CTCGATT	A11	TTCAGGTT	D11	CTCATAGATT	G11
CTATGAT	A12	TTAGGTAC	D12	CATGGCAACT	G12
CCTACGC	B1	CAGTTGACG	E1	ATAAGAAGGT	H1
CAGCTCG	B2	ATGGTCCTA	E2	ACTCCTAGGT	H2
CAAGAGG	B3	ATATAGCAG	E3	AATTGGAATT	H3
ATTAGTT	B4	AGGTAGAGT	E4	TGGCTGAACG	H4
AATACTCT	B5	AGGCTGGCG	E5	TCTCTTCATT	H5
AATAACTC	B6	AGCCGCAGT	E6	TCGCCGTAGT	H6
AAGTTCGG	B7	AGAGAATTG	E7	GTTCATATAT	H7
AAGAGATT	B8	AGACGGTTC	E8	GGCCGGTATT	H8
AACTCGGT	B9	TCCGTCGAA	E9	GGATTGCAGT	H9
AACTAACG	B10	GCGTCCAGG	E10	GCCTGGAAGT	H10
TGATTCT	B11	GCCGTAGGT	E11	GCAGGTCAGT	H11
TCGCTG	B12	CTCGCCGAT	E12	GATCGTAGTT	H12
CAGCTTCG	C1	CTATATGCT	F1		
ATGATGGC	C2	CGCCAAGGC	F2		
ATGAATAG	C3	CCTGGAACG	F3		
ATATCTGC	C4	CCAAGCCGG	F4		
ATAAGCCT	C5	CGTTATAACG	F5		
AGACCAGT	C6	CGCCTGATAG	F6		
ACCGTTAG	C7	CGCAGAGACG	F7		
AATTGCAT	C8	CCGCCTATGG	F8		
TGCGACGT	C9	CAACCTTAAG	F9		
TCGAGCTG	C10	AGACGTTAGG	F10		
CTTCTATG	C11	TTGGACGAG	F11		

Anexo C. Secuencias del Adaptador P1 con código de indentificación.

Name	Sequence 1	Sequence 2
P101	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATAGGCGTGCA	/5Phos/CGCCTATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P102	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGCAAGGTGCA	/5Phos/CCTTGCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P103	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGACCGCTGCA	/5Phos/GCGGTCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P104	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGTCTTGCA	/5Phos/AGACCGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P105	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGAATCTGCA	/5Phos/GATTCGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P106	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACCGCAGTGCA	/5Phos/CTGCGGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P107	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAATACTGCA	/5Phos/GTATATTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P108	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAAGTAAAGTGCA	/5Phos/CTTACTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P109	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCAGAACTGCA	/5Phos/GTTCTGAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P110	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCATTGCTGCA	/5Phos/GCAATGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P111	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTCGATTTGCA	/5Phos/AATCGAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P112	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTATGATTGCA	/5Phos/ATCATAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P113	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCTACGCTGCA	/5Phos/GCGTAGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P114	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCTCGTGCA	/5Phos/CGAGCTGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P115	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAAGAGGTGCA	/5Phos/CCTCTTGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P116	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATTAGTTTGCA	/5Phos/AACTAATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P117	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAATACTCTTGCA	/5Phos/AGAGTATTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P118	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAATAACTCTGCA	/5Phos/GAGTTATTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P119	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAAGTTCGGTGCA	/5Phos/CCGAAGTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P120	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAAGAGATTTGCA	/5Phos/AATCTCTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P121	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACTCGGTTGCA	/5Phos/ACCGAGTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P122	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACTAACGTGCA	/5Phos/CGTTAGTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P123	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGATTCTTGCA	/5Phos/AGAATCAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P124	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCGCCTGTGCA	/5Phos/CAGGCGAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P125	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCTTCGTGCA	/5Phos/CGAAGCTGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

Name	Sequence 1	Sequence 2
P126	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATGATGGCTGCA	/5Phos/GCCATCATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P127	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATGAATAGTGCA	/5Phos/CTATTCATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P128	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATATCTGCTGCA	/5Phos/GCAGATATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P129	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATAAGCCTTGCA	/5Phos/AGGCTTATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P130	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGACCAGTTGCA	/5Phos/ACTGGTCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P131	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACCGTTAGTGCA	/5Phos/CTAACGGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P132	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAATTGCATTGCA	/5Phos/ATGCAATTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P133	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCAGCTTGCA	/5Phos/ACGTCGCAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P134	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCGAGCTGTGCA	/5Phos/CAGCTCGAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P135	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTTCTATGTGCA	/5Phos/CATAGAAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P136	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGCAGGAGTGCA	/5Phos/CTCCTGCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P137	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGATTGATTGCA	/5Phos/ATCAATCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P138	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGATCATGTGCA	/5Phos/CATGATCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P139	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCTCCTCTGCA	/5Phos/GAGGAAGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P140	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCTGAAGGTGCA	/5Phos/CCTTCAGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P141	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGAACTAGTTGCA	/5Phos/ACTAGTTCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P142	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACTGCATCTTGCA	/5Phos/AGATGCAGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P143	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGAGCGTATGCA	/5Phos/TACGCTCGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P144	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACCATATATTGCA	/5Phos/ATATATGGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P145	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACCAGGCCGTGCA	/5Phos/CGGCCTGGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P146	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACCATGGATGCA	/5Phos/TCCATGGTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P147	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTCAGGTTTGCA	/5Phos/AACCTGAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P148	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTAGGTAAGTCA	/5Phos/GTACCTAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P149	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGTTGACGTGCA	/5Phos/CGTCAACTGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P150	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATGGTCTATGCA	/5Phos/TAGGACCATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P151	CTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATATAGCAGTGCA	/5Phos/CTGCTATATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

Name	Sequence 1	Sequence 2
P152	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGGTAGAGTTGCA	/5Phos/ACTCTACCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P153	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGGCTGGCGTGCA	/5Phos/CGCCAGCCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P154	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGCCGAGTTGCA	/5Phos/ACTGCGGCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P155	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGAGAATTGTGCA	/5Phos/CAATTCTCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P156	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGACGGTTCTGCA	/5Phos/GAACCGTCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P157	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCGTCGAATGCA	/5Phos/TTCGACGGAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P158	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGCGTCCAGGTGCA	/5Phos/CCTGGACGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P159	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGCCGTAGGTTGCA	/5Phos/ACCTACGGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P160	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTCGCCGATTGCA	/5Phos/ATCGGCGAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P161	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTATATGCTTGCA	/5Phos/AGCATATAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P162	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCGCCAAGGCTGCA	/5Phos/GCCTTGCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P163	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCTGGAACGTGCA	/5Phos/CGTTCAGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P164	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCAAGCCGGTGCA	/5Phos/CCGGCTTGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P165	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCGTTATAACGTGCA	/5Phos/CGTTATAACGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P166	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCGCCTGATAGTGCA	/5Phos/CTATCAGGCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P167	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCGCAGAGACGTGCA	/5Phos/CGTCTCTGCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P168	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCGCCTATGGTGCA	/5Phos/CCATAGGCGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P169	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCAACCTAAGTGCA	/5Phos/CTTAAGTTGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P170	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGACGTTAGGTGCA	/5Phos/CCTAACGTCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P171	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTGGACGAGTGCA	/5Phos/CTCGTCCAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P172	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTGAACCTTCTGCA	/5Phos/GAAGGTTCAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P173	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGTTCCAATGTGCA	/5Phos/CATTGGAACCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P174	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGATAAGAGGTGCA	/5Phos/CCTCTTATCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P175	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGCGGTTACTGTGCA	/5Phos/CAGTAACCGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P176	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGCCTAGTAAGTGCA	/5Phos/CTTACTAGGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P177	CTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGATGGAATAGTGCA	/5Phos/CTATTCCATCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

Name	Sequence 1	Sequence 2
P178	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGATGCTGACGTGCA	/5Phos/CGTCAGCATCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P179	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTTGGCATTGTGCA	/5Phos/CAATGCCAAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P180	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTCCGTTATGTGCA	/5Phos/CATAACGGAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P181	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTTACCATCTTGCA	/5Phos/AGATGGTAAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P182	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTCGCGCAGTTGCA	/5Phos/ACTGCGCGAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P183	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTCATAGATTGCA	/5Phos/AATCTATGAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P184	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCATGGCAACTTGCA	/5Phos/AGTTGCCATGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P185	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATAAGAAGGTTGCA	/5Phos/ACCTTCTTATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P186	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACTCCTAGGTTGCA	/5Phos/ACCTAGGAGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P187	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAATTGGAATTTGCA	/5Phos/AATTCCAATTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P188	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGGCTGAACGTGCA	/5Phos/CGTTCAGCCAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P189	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCTCTTCATTTGCA	/5Phos/AATGAAGAGAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P190	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCGCCGTAGTTGCA	/5Phos/ACTACGGCGAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P191	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTTTCATATATTGCA	/5Phos/ATATATGAACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P192	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGCCGGTATTTGCA	/5Phos/AATACCGGCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P193	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGATTGCAGTTGCA	/5Phos/ACTGCAATCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P194	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCCTGGAAGTTGCA	/5Phos/ACTTCCAGGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P195	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCAGGTCAGTTGCA	/5Phos/ACTGACCTGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
P196	CTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGATCGTAGTTTGCA	/5Phos/AACTACGATCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

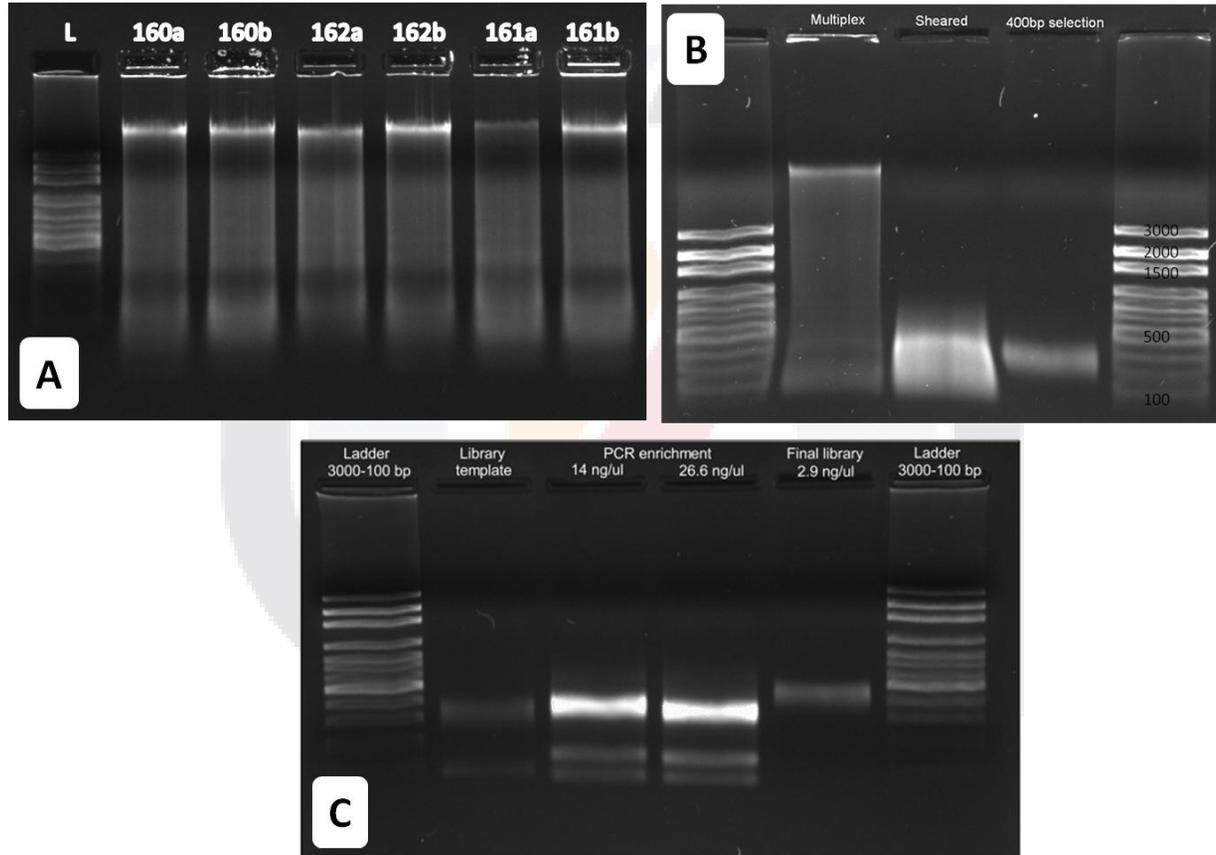
Anexo D. Secuencias del Adaptador P2 "Y-shaped" (duplex oligo).

Sequence	
1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTGATCGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC*T
2	/5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCAGAAGCA

Anexo E. Oligos de PCR de enriquecimiento de la biblioteca genómica.

PCR_primer1	A*A*TGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC*T
PCR_primer2	C*A*AGCAGAAGACGGCATACG*A

Anexo F. Geles de agarosa con: **A.** ADN genómico de seis muestras de *B. gracilis*; **B.** Resultado de los primeros tres pasos de la elaboración de la biblioteca genómica (Multiplexing, Corte y selección de fragmentos de 400 pb) y **C.** Resultado del enriquecimiento de la biblioteca genómica y la biblioteca final que fue secuenciada.



Anexo G. Mapa de ubicación de las muestras de *Bouteloua herrera-arrietae* empleadas para los análisis (▲), mostrando las ecorregiones terrestres con las que colindan: Sierra Madre Occidental (rojo) y Desierto Chihuahuense (naranja) y la distribución de los matorrales desértico micrófilo y rosetófilo. Elaborado con capas vectoriales de uso de suelo y vegetación de INEGI (serie 4) y Ecorregiones Terrestres de Norteamérica, en el programa QGIS 2.18.4.

