



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

TESIS

**Diversidad genética, morfológica, y nivel de ploidía de las poblaciones de
Bouteloua media (E. fourn) Gould et Kapadia (Poaceae: Chloridoideae).**

PRESENTA

Biol. María Alejandra Ruiz Esparza Méndez

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

TUTORAS

Dra. María Elena Siqueiros Delgado

Dra. Marcela Avendaño González

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. J. Francisco Morales Domínguez

Aguascalientes, Ags. 15 de junio de 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **MARÍA ALEJANDRA RUIZ ESPARZA MÉNDEZ** con ID 152905 quien realizó la tesis titulado: **DIVERSIDAD GENÉTICA, MORFOLÓGICA, Y NIVEL DE PLOIDÍA DE LAS POBLACIONES DE *BOUTELOUA MEDIA* (E. FOURN) GOULD ET KAPADIA (POACEAE: CHLORIDOIDEAE)**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“Se Lumen Proferre” Aguascalientes, Ags., a 16 de Junio de
2021.

Handwritten signature of Dra. María Elena Siqueiros Delgado.

Dra. María Elena Siqueiros Delgado
Tutor de tesis

Handwritten signature of Dra. Marcela Avendaño González.

Dra. Marcela Avendaño González
Co-Tutor de tesis

Handwritten signature of Dr. J. Francisco Morales Domínguez.

Dr. J. Francisco Morales Domínguez
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.

Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.

Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16

Actualización: 00

Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 17/06/21

NOMBRE: MARIA ALEJANDRA RUIZ ESPARZA MÉNDEZ **ID** 128091

PROGRAMA: Maestría en Ciencias, área Biotecnología Vegetal o Toxicología **LGAC (del posgrado):** Biotecnología Vegetal

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo Práctico

TITULO: Diversidad genética, morfológica, y nivel de ploidía de las poblaciones de Bouteloua media (E. fourn) Gould et Kapadia (Poaceae: Chloridoideae).

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Se ampliaron los conocimientos sobre los procesos de especiación de Bouteloua media, ya que pertenece a uno de los géneros de pastos con mayor importancia forrajera en México.

INDICAR	SI	NO	N.A.	(NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>					
<i>SI</i>					El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
<i>SI</i>					La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
<i>SI</i>					Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
<i>SI</i>					Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
<i>SI</i>					Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
<i>SI</i>					El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
<i>SI</i>					Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
<i>N.A.</i>					Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
<i>SI</i>					Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>					
<i>SI</i>					Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
<i>SI</i>					Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
<i>SI</i>					Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutoral, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
<i>N.A.</i>					Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
<i>SI</i>					Coincide con el título y objetivo registrado
<i>SI</i>					Tiene congruencia con cuerpos académicos
<i>SI</i>					Tiene el CVU del Conacyt actualizado
<i>N.A.</i>					Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>					
					Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
					El estudiante es el primer autor
					El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
					En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
					Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
					La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: SI No

FIRMAS

Elaboró:
 * NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCION: Yenny Adriana Gómez A
 Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: Dra. Raquel Guerrero Alba

* En caso de conflicto de Intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutoral, asignado por el Decano

Revisó:
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Dra. Haydee Martínez Ruvalcaba

Autorizó:
 NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO: M. en C. Jorge Martín Alferez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado
 En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al programa de Maestría en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal, por la admisión que amplió mi formación para lograr un mejor desempeño profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención No. 906087 en el transcurso de mis estudios de la maestría.

A la Doctora María Elena Siqueiros Delgado por su confianza al aceptarme como su alumna, con gran aprecio agradezco el conocimiento y las experiencias compartidas.

A la Doctora Marcela Avendaño González por ser una gran tutora, por su cordialidad al solucionar mis dudas e inquietudes y su gran apoyo para superar los retos presentados.

Al Doctor J. Francisco Morales Domínguez por su participación en el proyecto, y sus consejos para mejorar la investigación.

Al Doctor Eugenio Pérez Molphe Bach, y al equipo de técnicos de la Unidad de Biotecnología Vegetal a Martita, Isaac, y Adilene por permitirme realizar la parte experimental del proyecto en sus instalaciones, y por su cortesía durante mi estancia.

Al equipo de técnicos del laboratorio de Biología, a los biólogos Gustavo, Lula, y Rocío, por proporcionarme el equipo y la ayuda adecuada en mi estancia. A la bióloga Paty por confiarme el microscopio con el cual se obtuvieron tan bellas imágenes de los cromosomas en esta investigación.

Al Doctor Higinio, por su trabajo al enseñarme todas las técnicas para lograr realizar la parte experimental de mi proyecto; siempre dispuesto a aconsejarme en las dificultades que se presentaron.

Al Doctor Jose Carlos, por su servicio y ayuda durante mi estancia en el herbario.

A mis compañeros y al personal del herbario, por hacer el espacio un lugar tranquilo y de confianza en el que pase horas de bonita convivencia.

Dedicatoria

Dedicada a todas las personas que creen en mí, y me ayudaron de muchas formas para continuar en esta etapa de mi formación. Especialmente, a mis padres y hermana que aprecio tanto y que siempre han apoyado mis inquietudes, y han escuchado mis problemas. A mi novio Rodrigo, que me acompañó en esta parte del camino. A mi amiga Bere que hice en la maestría, que al igual que yo sobrevivió a este reto.



Índice general

Contenido

1. Introducción.....	7
1.1 Los pastizales en México.....	7
1.2 El género <i>Bouteloua</i> y el complejo <i>B. curtipendula</i> (CBc).....	8
1.3 Complejo <i>Bouteloua curtipendula</i>	9
1.4 Importancia del análisis filogenético.....	10
1.5 Marcadores moleculares.....	11
2. Antecedentes.....	13
3. Justificación.....	16
4. Objetivo.....	16
4.1 Objetivos específicos.....	16
5. Preguntas de la investigación.....	16
6. Hipótesis.....	17
7. Metodología.....	17
7.1 Colecta de material.....	17
7.2 Extracción de ADN.....	21
7.3 Amplificación y secuenciación.....	21
7.4 Análisis filogenético.....	23
7.5 Estudio morfométrico.....	23
7.6 Conteo de cromosomas.....	25
8. Resultados.....	25
8.1 Análisis filogenético.....	25
8.1.1 Región ITS: Inferencia Bayesiana.....	25
8.1.2 Región ITS: Máxima Verosimilitud.....	28
8.1.3 Región trnT-L-F: Inferencia Bayesiana.....	30
8.1.4 Región trnT-L-F: Máxima verosimilitud.....	30
8.1.5 Combinación de las regiones ITS+ trnT-L-F: Inferencia Bayesiana.....	34
8.1.6 Combinación de las Regiones ITS+ trnT-L-F: Maxima verosimilitud.....	36
8.2 Estudio morfométrico.....	39
8.2.1 Agrupación por clado: Oaxaca, <i>B. cutipendula</i> var. <i>caespitosa</i> , <i>B. curtipendula</i> var. <i>tenuis</i> , <i>B. media</i> del centro de México, <i>B. media</i> de Oaxaca, y <i>B. purpurea</i>	40
8.2.2 Agrupación por tipo de lígula: membranosa, escamosa y ciliada.....	44
8.3 Conteo de cromosomas.....	47
9. Discusión.....	54
10. Conclusiones.....	68

11. Referencias 69
Anexos 81



Índice de cuadros

Cuadro 1. Localidades de colecta de individuos de *B. media* 18

Cuadro 2. Oligonucleótidos para la amplificación de ADN. 22

Cuadro 3. Caracteres analizados en el estudio morfométrico de *B. media*..... 24

Cuadro 4. Matriz de resultados del análisis PERMANOVA de los caracteres vegetativos agrupados por clado..... 42

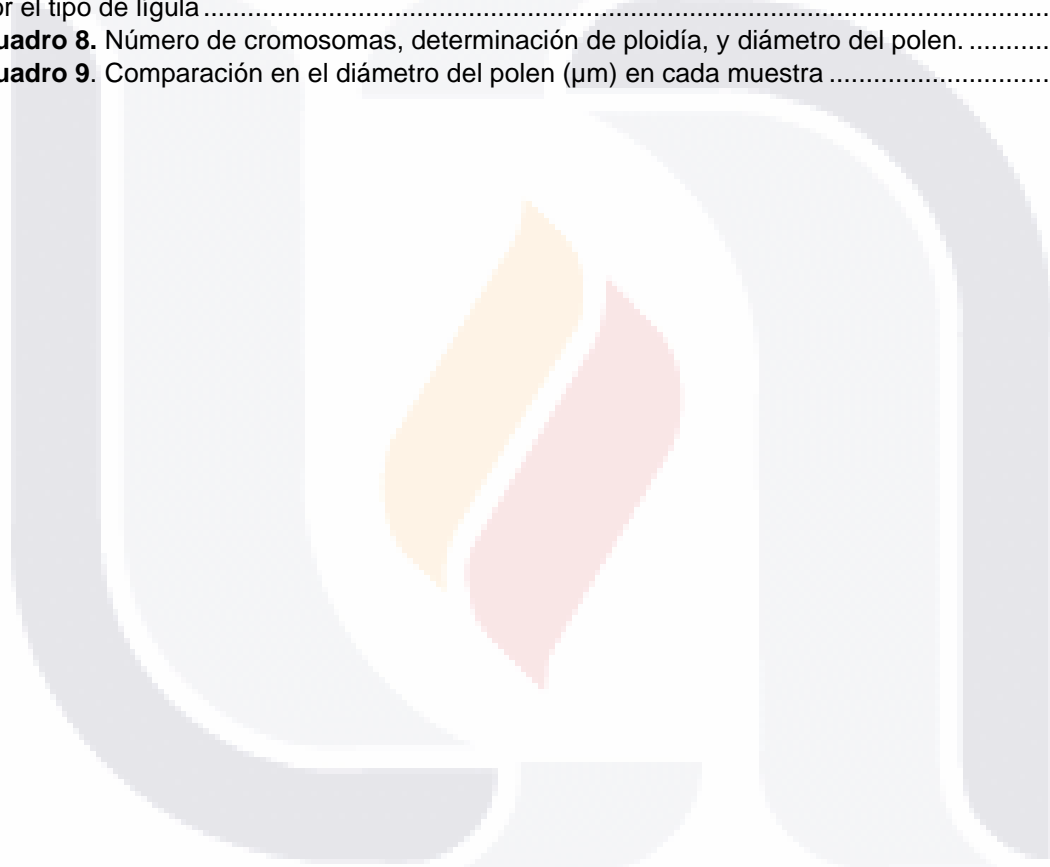
Cuadro 5. Matriz de resultados del análisis PERMANOVA de caracteres reproductivos agrupados por clado..... 44

Cuadro 6. Matriz de resultados del análisis PERMANOVA de caracteres vegetativos por el tipo de lígula..... 45

Cuadro 7. Matriz de resultados del análisis PERMANOVA de caracteres reproductivos agrupados por el tipo de lígula 46

Cuadro 8. Número de cromosomas, determinación de ploidía, y diámetro del polen. 48

Cuadro 9. Comparación en el diámetro del polen (μm) en cada muestra 52



Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de la región del espaciador del transcrito interno (ITS) del ADN ribosómico nuclear (Jobes & Thien, 1997).	13
Figura 2. Árbol filogenético del complejo <i>Bouteloua curtispindula</i> basado en la combinación de secuencias ITS + <i>trnT-L-F</i> ; obtenido por el método de máxima verosimilitud (Siqueiros-Delgado et al., 2013).	15
Figura 3. Localidades de colecta de los ejemplares de esta investigación, y los de Siqueiros et al., (2013,2017) Mapa elaborado en el programa QGIS 3.12.	19
Figura 4. Ejemplares de <i>B. media</i> colectados en el punto A y <i>B. curtispindula</i> en el punto C en el estado de Oaxaca.	20
Figura 5. Ejemplar colectado de <i>B. media</i> del punto I en el estado de Nayarit.	20
Figura 6. Inferencia Bayesiana obtenida a partir de secuencias de la región ITS del Complejo <i>B. curtispindula</i> .	27
Figura 7. Inferencia filogenética obtenida mediante el método de máxima verosimilitud a partir de secuencias de la región ITS del Complejo <i>B. curtispindula</i> .	29
Figura 8. Inferencia Bayesiana obtenida a partir de secuencias de la región <i>trnT-L-F</i> del Complejo <i>B. curtispindula</i> .	32
Figura 9. Inferencia filogenética obtenida mediante el método de máxima verosimilitud a partir de secuencias de la región <i>trnT-L-F</i> del Complejo <i>B. curtispindula</i> .	33
Figura 10. Inferencia bayesiana basado en la combinación de secuencias ITS+ <i>trnT-L-F</i> del Complejo <i>B. curtispindula</i> .	35
Figura 11. Inferencia filogenética obtenida por máxima verosimilitud basado en la combinación de secuencias ITS+ <i>trnT-L-F</i> del Complejo <i>B. curtispindula</i> .	38
Figura 12. Tipo de lígula observada en las muestras de <i>B. media</i> y <i>B. curtispindula</i> .	39
Figura 13. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los caracteres vegetativos agrupados conforme al clado en el que se posicionaron.	41
Figura 14. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los caracteres reproductivos agrupados conforme al clado en el que se posicionaron.	43
Figura 15. Análisis de Componentes Principales de caracteres vegetativos agrupando los datos según el tipo de lígula (Escamosa, Ciliada y Membranosa).	45
Figura 16. Análisis de Componentes Principales de caracteres reproductivos agrupando los datos según el tipo de lígula (Escamosa, Ciliada y Membranosa).	46
Figura 17. Cromosomas en microsporocitos de diferentes muestras de <i>Bouteloua media</i> , <i>B. purpurea</i> y <i>B. curtispindula</i> .	49
Figura 18. Células con anomalías en microsporogénesis	50
Figura 19. Células poliploides con anomalías meióticas y con surtidos cromosómicos desiguales.	51
Figura 20. Proceso de medición del diámetro de los granos de polen de las muestras del C Bc.	53
Figura 21. Relación entre el diámetro del polen y el número de cromosomas en <i>B. media</i> .	54

Resumen

Bouteloua media es una planta cespitosa y perenne, se encuentra en ambientes tropicales, y se distribuye desde el centro de México, América Central hasta América del Sur; es el miembro más voluminoso del complejo *Bouteloua curtipendula* (CBc), que se conforma por tres principales linajes: los linajes del estado de Oaxaca, Centro y Sur América, y el linaje del centro de México. En esta investigación se colectaron ejemplares de México. Basándonos en los análisis filogenéticos realizados se logró relacionar a *B. media* del centro de México solo con las muestras de Jalisco y Nayarit, mientras que el resto se han asociado a las distintas variedades de *B. curtipendula*.

La morfología entre los diferentes linajes que conforman a esta especie es similar, pero existen algunas variaciones, que se han descrito en investigaciones previas como la presencia de inflorescencias laterales, estolones y un mayor número de espiguillas por rama. Además, se sugiere que la altura mayor y la lígula membranosa son características que nos permiten identificar a *B. media* del centro de México.

El nivel de ploidía de *B. media* se ha descrito como diploide, se ha sugerido la poliploidía en las plantas del centro de México por estar cercanamente relacionadas a taxas poliploides del complejo *Bouteloua cutipendula* (CBc). Sin embargo, se confirmó la diploidía en las muestras de Jalisco y Nayarit relacionadas con el linaje del centro de México. Por el contrario, el resto de las muestras han mostrado gran diversidad en la cantidad de cromosomas, la poliploidía predominó, y se sugiere la ploidía mixta en algunas poblaciones. También es destacable en poliploides la recurrencia de anomalías durante la meiosis. Relativo al diámetro del polen, se observó la falta de uniformidad en el tamaño de los poliploides presentando gran variabilidad; se sugiere que esto es consecuencia de las irregularidades en la microsporogénesis.

Abstract

Bouteloua media is a perennial cespitose plant, it is found in tropical environments, and it is distributed from central Mexico, Central America to South America. It is the largest member of the *Bouteloua curtipendula* (*BcC*) complex, which is made up of three main lineages: the lineages from the state of Oaxaca, Central and South America, and the lineage from central Mexico. In this investigation, specimens from Mexico were collected. Based on the phylogenetic analyzes, it was possible to relate *B. media* from central Mexico only with the samples from Jalisco and Nayarit, while the rest have been associated with the different varieties of *B. curtipendula*.

The morphology between the different lineages this species is similar, but there are some variations, which have been described in previous research, such as the presence of lateral inflorescences, stolons and a greater number of spikelets per branch. In addition, it is suggested that the greater height and the membranous ligule are characteristics that allow us to identify *B. media* from central Mexico.

The level of ploidy of *B. media* has been described as diploid, polyploidy has been suggested in plants from central Mexico as they are closely related to polyploid taxa of the *Bouteloua curtipendula* complex (*BcC*). However, diploidy was confirmed in samples from Jalisco and Nayarit related to the central Mexican lineage. On the contrary, the rest of the samples have shown great diversity in the number of chromosomes, polyploidy predominated, and mixed ploidy is suggested in some populations. The recurrence of abnormalities during meiosis is also notable in polyploids. Regarding the diameter of the pollen, the lack of uniformity in the size of the polyploids was observed, presenting great variability; it is suggested that this is a consequence of irregularities in microsporogenesis.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. Introducción

1.1 Los pastizales en México

La flora de México es una de las más diversas del mundo con más de 23 314 especies de plantas vasculares, ocupando el cuarto lugar a nivel mundial (Villaseñor, 2016). La gran riqueza florística se atribuye a la variedad de condiciones fisiográficas y climáticas y su distribución geográfica. Las numerosas sierras y cadenas montañosas aisladas, con las planicies de clima árido y semiárido separadas las unas de las otras por estos sistemas montañosos, contribuyen a la génesis y al mantenimiento de endemismos y por lo tanto a la riqueza de la flora y tipos de vegetación (Rzedowski, 2006).

Uno de los tipos de vegetación más comunes de las planicies mexicanas son los pastizales. Bajo este nombre se incluyen biocenosis diversas, tanto en lo relacionado a su composición florística, como a sus condiciones ecológicas, a su papel en la sucesión, a su dependencia de las actividades humanas y a su fisonomía. Su presencia puede estar determinada claramente por el clima, mientras que muchos otros son favorecidos en parte, por las condiciones del suelo o bien por el disturbio ocasionado por el hombre y sus animales domésticos. Su estructura es sencilla, pues además de un estrato rasante formado principalmente por plantas rastreras, hay un sólo estrato herbáceo, en el cual suelen dominar ampliamente las gramíneas. Las plantas leñosas a menudo están completamente ausentes (Rzedowski, 2006).

Las áreas cuya cubierta vegetal está dominada por gramíneas son de gran importancia para la economía humana, debido a que constituyen el medio natural más propicio para el aprovechamiento pecuario. Los pastizales son adecuados para la alimentación del ganado bovino y equino, la mayor parte de la superficie correspondiente a este tipo de vegetación se dedica a tal propósito. En general, el aprovechamiento de los pastizales naturales en México no es óptimo y en muchos sitios el sobrepastoreo no permite obtener el máximo rendimiento, propiciando el establecimiento de plantas que los animales no comen y que a menudo son

venenosas y con frecuencia reducen también la cobertura del suelo, exponiéndolo a los efectos de la erosión (Rzedowski, 2006). El resultado de esto, son áreas invadidas por plantas indeseables de bajo valor nutritivo o bien, desprovistas de cubierta vegetal, propiciando así el proceso de erosión (Guerra et al., 1990). Otra dificultad que es preocupante es la presencia de especies introducidas que agotan junto con el sobrepastoreo la riqueza genética de las especies nativas de los pastizales (Quero Carrillo et al., 2017)

1.2 El género *Bouteloua* y el complejo *B. curtipendula* (CBc)

Uno de los géneros dominantes o codominantes de los pastizales áridos de América, es el género *Bouteloua* (Poaceae: Chloridoideae: Cynodonteae; Boutelouiane) integrado por alrededor de 60 especies (Peterson *et al.*, 2015). Estas se encuentran principalmente en América, con su centro origen y diversificación en el norte de México (Rzedowsky, 2006). *Bouteolua* es el género de gramíneas nativas más importante por su valor forrajero, con una distribución desde Norteamérica hasta Argentina, las islas Indias Occidentales y el Caribe (Gould, 1980). Este género incluye plantas anuales y perennes, con espiguillas apretadas y sésiles en ramas cortas, pequeñas y ramificadas, en una panícula delgada. Las ramas son solitarias en los nudos. Presentan ramas numerosas y de poca floración, así como pocas ramas, pero numerosas espiguillas (Gould, 1980).

El género *Bouteloua* ha sido estudiado ampliamente desde el punto de vista de sus relaciones filogenéticas (Columbus et al., 2007; Columbus et al., 1998; Gould & Kapadia, 1964; Gould, 1979; Siqueiros-Delgado et al., 2013, 2017). Las hipótesis filogenéticas producidas, agrupan las especies en conjuntos llamados clados los cuales son grupos de especies cercanamente relacionadas por ancestría común, o en complejos de taxa relacionados entre sí. Dentro de los complejos estudiados del género se puede mencionar el complejo *B. curtipendula* (Siqueiros-Delgado 2001, 2013, 2017), *B. aristidoides* (Cuéllar Garrido, 2016), *B. repens* (Murillo , 2017) *B. barbata* (Pacheco, 2018), y *B. gracilis* (Avendaño-González, et al., 2019). No obstante, a pesar de que las relaciones entre especies dentro de los complejos han sido más o menos exploradas, aún quedan relaciones que resolver mientras que la

situación entre las poblaciones de las diferentes especies del género ha sido muy poco estudiada.

1.3 Complejo *Bouteloua curtipendula*

Uno de los complejos de más reciente diversificación es el complejo *Bouteloua curtipendula* (CBc), el cual está formado por 11 especies cercanamente relacionadas (*B. curtipendula*, *B. distans*, *B. disticha*, *B. media*, *B. pedicellata*, *B. purpurea*, *B. reflexa*, *B. triaena*, *B. uniflora*, *B. vaneedenii* y *B. warnockii*; Siqueiros-Delgado et al., 2013). Estas especies se distribuyen en varios entornos ecológicos desde el sur de Canadá hasta Argentina y se considera México como su centro de origen y diversificación (Rzedowsky, 1978). Las especies del CBc se caracterizan por su variabilidad morfológica y cromosómica ($2n=20-103$), exhibiendo especies diploides y poliploides (Siqueiros-Delgado et al., 2017). De acuerdo con Siqueiros-Delgado et al. (2013, 2017), el estado de carácter plesiomórfico de las especies del CBc es el diploide, encontrando las especies diploides en los clados más basales y los poliploides en los taxa de más reciente diversificación siendo la autopoliploidía, alopoliploidía y la diploidización fenómenos que han desempeñado un papel importante en la evolución del complejo (Siqueiros-Delgado et al., 2017).

1.4 *Bouteloua media*

Bouteloua media es el miembro más polimórfico del CBc. Habita comúnmente en laderas y acantilados abiertos o parcialmente sombreados, en suelos fértiles y francos en ambientes tropicales de 300-3000 m de altitud (Gould & Kapadia, 1964). Se distribuye desde el Sur de México (Chiapas, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca), hasta América Central y América del Sur (Brasil, Ecuador, Perú, Paraguay y Uruguay) (Gould, 1980; Siqueiros-Delgado et al., 2013).

Es una planta cespitosa, esbelta o gruesa, perenne, con tallos de aproximadamente 80 cm de altura, la base de la planta presenta de 5-7 nudos firmes de color púrpura que se ramifican produciendo inflorescencias laterales y terminales. Las vainas y las hojas pueden ser glabras o pubescentes, el ancho de las hojas varía entre 4 - 9 mm de ancho y su longitud varía de 20 cm a 30 cm de longitud. La lígula varía de

0.5-0.7 longitud, membranosa o ciliada. Inflorescencias primarias varían en longitud de 20 a 25 cm tienen de 40-60 o más ramas; de 1 a 2cm de longitud, portando de 7 a 15 espiguillas; raquis escabroso, con espiguillas casi hasta el ápice. La espiga más baja se ramifica a menudo hasta los 4-6 cm de largo y tiene 20 o más espiguillas. Las inflorescencias axilares son más cortas se desarrollan debajo del nudo terminal y con un menor número de espiguillas por espiga. Espiguillas de 5 a 6 mm de longitud, glumas desiguales, primera gluma de 3 a 3.8 mm de longitud, estrecha, aguda, atenuada o setácea, la base membranácea, ligeramente ensanchada, escabrosa a pubescente en la quilla, segunda gluma de 3.5 a 5.5 mm de longitud, anchamente lanceolada, aguda a acuminada; lema de la flor perfecta 5 a 5.5 mm de longitud, escabrosa a puberulenta, 3- nervada, nervaduras prolongadas en tres aristas cortas, escabrosas; palea de igual tamaño que la lema, diminuto pubescente; callo glabro. Anteras de 2.8 a 3.5 mm de longitud, color amarillo o anaranjado. Flores rudimentarias 1 o 2, estériles, lema de primera flor rudimentaria de 3 a 3.5 de longitud, constituida por un cuerpo basal membranoso, con 4 aristas laterales de 4 a 5 mm de longitud, escabrosas, y una arista central de 5 a 10 mm de longitud, fuerte y escabrosa; lema de la segunda flor rudimentaria de 2.5 a 3mm de longitud, color amarillo, ovoide a estrechamente elíptica. Florece en los meses de junio a noviembre (Gould, 1980).

1.4 Importancia del análisis filogenético

La sistemática se fundamenta en la evolución; integra y unifica la información de la diversidad biológica facilitando los principios para delimitar y definir taxones (Simpson, 2010); planteando hipótesis resultantes de la comprensión de la historia evolutiva y sus relaciones, siendo base para la clasificación natural y por lo tanto predictiva (Andreas et al. , 2013).

Las investigaciones filogenéticas anteriormente se llevaban a cabo a partir de caracteres observables, los cuales son bastante difíciles de codificar, al ser caracteres fenotípicos representan la expresión de muchos genes diferentes (Andreas et al., 2013). La filogenética clasifica los organismos en grupos o subgrupos basándose en la información biológica compartida con un ancestro,

reconstruye los procesos y patrones evolutivos antiguos, reflejando las posibles relaciones de organismos cercanos con cierto nivel de confiabilidad (Atri & Lichtarge, 2018; Soltis & Soltis, 2000)

En la actualidad el uso de datos moleculares ha dominado el campo de la filogenética, el empleo del ADN se ha destacado por brindar datos inequívocos ya que un nucleótido se puede identificar en una posición específica en una secuencia (Andreas et al., 2013). Para la obtención de la filogenia de un grupo se recurre al análisis de secuencias obtenidas de los genomas de plastidios o núcleo (Davis et al., 2014); para lograr estimaciones acertadas se consideran múltiples datos de diferentes genes, se debe tomar en cuenta que la combinación del conjunto de datos reflejen congruencia en la reconstrucción filogenética. (Soltis & Soltis, 2000). Estas secuencias se alinean, y se determina el mejor modelo probabilístico para obtener el árbol filogenético con la topología mejor soportada y que revele los procesos evolutivos del grupo de estudio (Cooper, 2014). La filogenia molecular ha tenido un importante aporte para a las Angiospermas, proporcionando una topología fuertemente soportada y bien resuelta. (Soltis & Soltis, 2000).

1.5 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias de nucleótidos con la capacidad de detectar polimorfismos entre las secuencias de diferentes individuos (Nadeem et al., 2018); discriminando entre diferentes genotipos (Garrido-Cardenas et al., 2018). Los marcadores moleculares son útiles para estimar la filogenia de los organismos, dado que se obtiene información sobre su evolución. Otro aspecto importante es que indagan en la diversidad genética, lo cual es crucial en el estudio de la evolución de plantas y genómica comparativa, lo que determina la estructura de diferentes poblaciones (Nadeem et al., 2018). Permite la vinculación entre la variación fenotípica y genotípica (Garrido-Cardenas et al., 2018), y facilita la investigación de los factores genéticos que se involucran en los rasgos heredados (Adhikari et al., 2017). Estos polimorfismos se basan en mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, duplicación de mutaciones y translocación; para seleccionar un marcador es debe cumplir con ciertas propiedades: ser codominante, distribuido

uniformemente en todo el genoma, altamente reproducible y con capacidad para detectar niveles más altos de polimorfismo (Nadeem et al., 2018); se recomienda elegir marcadores cercanos y delimitantes al locus de interés (Garrido-Cardenas et al., 2018)

Para el genoma del núcleo se utilizan diferentes marcadores, uno de los más usados es la región del espaciador interno transcrito (ITS; Figura.1) del ADN ribosomal nuclear (ADNr), es un marcador molecular ampliamente usado para estudios filogenéticos en plantas y hongos (Álvarez & Wendel, 2003). Es un importante locus nuclear, posicionado entre las regiones codificantes 18S-5.8S-26S del cistron ribosomal nuclear (Jobes & Thien, 1997). Las secuencias de ITS se pueden aislar fácilmente ya que hay cientos o miles de repeticiones de ADNr nuclear en los genomas de las plantas. Estas secuencias tienen una longitud de aproximadamente de 500-700 pb en angiospermas (Baldwin et al., 1995), y son importantes para análisis sistemáticos moleculares en niveles intergénicos e interespecíficos (Álvarez & Wendel, 2003). Debido al tamaño pequeño del fragmento de ADN objetivo, es fácil la amplificación de las secuencias ITS por medio del PCR, y permite utilizar material vegetal antiguo, sin necesidad de ser fresco o vivo (Álvarez & Wendel, 2003).

La región ITS1 tiene más regiones flanqueantes conservadas para la amplificación por PCR que ITS2, por lo tanto, representa un mejor código de barras de ADN que ITS2 en eucariotas (Wang et al., 2015). La región ITS2 es un locus de rápida evolución con variaciones grandes en sus secuencias, por lo que es ideal para inferencias filogenéticas a nivel de especie y género, es decir a un nivel bajo; por otra parte, su estructura secundaria está bien conservada, por esta razón se aplica a reconstrucciones de árboles a niveles taxonómicos altos (Keller et al., 2009).

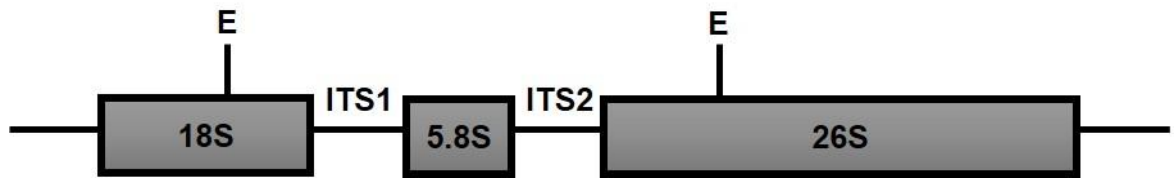


Figura 1. Diagrama de la región del espaciador del transcrito interno (ITS) del ADN ribosómico nuclear. Contiene dos sitios *EcoRI* (GAATTC; representado por E) ubicados fuera de la región ITS (Jobes & Thien, 1997).

El genoma del cloroplasto también es utilizado para estudios de filogenia molecular en plantas, esto se debe a que su estructura genética es simple y estable, es haploide, raramente hay recombinación, y se transmite de forma uniparental (Shaw et al., 2014). En específico, las secuencias no codificantes del ADN del cloroplasto son importantes para estudios filogenéticos en angiospermas y gimnospermas, puesto que los intrones y los espaciadores intergénicos, tienen una mayor variación por sitio que las regiones codificantes, posiblemente se debe a que presentan menos restricciones funcionales (Small et al., 2005).

Entre las diferentes regiones de ADN de cloroplasto, la región *trnT-L-F* es una región grande que contiene una sucesión de genes conservados de cientos de pares de bases y una tasa alta de evolución molecular. Está constituido de tres genes de ARNt: *trnT*^{UGU}, *trnL*^{UAA} y *trnF*^{GAA} (Taberlet et al., 1991). Esta región se ha usado en estudios con Bryophytas, Pteridophytas, Gimnospermas y Angiospermas, y es de las regiones de ADN no codificantes más utilizadas en sistemática de plantas. El espaciador *trnT-trnL* es más variable que el espaciador *trnL-trnF*, y el intrón *trnL* es la región menos variable de las tres (Shaw et al., 2005).

2. Antecedentes

Estudios filogenéticos del *CBc*, destacaron a *Bouteloua media* por ser un grupo polifilético, conformado por varios linajes que no comparten ancestría común más reciente; el linaje de *B. media* de Oaxaca se posiciona como el linaje más tempranamente divergente y hermano del resto de las especies del complejo (Figura. 2, A1). En el subclado hermano se encuentra *B. media* de Perú y Costa

Rica (Figura.2, A2). El resto de las muestras del centro de México se integran en el clado de divergencia más tardía de la filogenia (Figura. 2, B2); (Siqueiros-Delgado et al., 2013, 2017). Los diferentes linajes que la conforman son muy semejantes morfológicamente y es prácticamente imposible distinguir entre ellos, excepto por algunos caracteres distintivos en cada linaje, por ejemplo: la presencia de inflorescencias laterales en individuos del centro de México; otro carácter identificado en los linajes de Oaxaca, Perú y Costa Rica es tener mayor a 16 espiguillas por rama y sus anteras son amarillas, mientras que los linajes del centro de México poseen de 4-10 espiguillas y sus anteras son rojas; los rizomas y estolones también los podemos encontrar en *B. media* en algunos individuos, predominando los estolones en individuos de los estados de Jalisco y Nayarit. Estos caracteres son considerados homoplásicos, puesto que aparecen de forma independiente en los miembros del *CBc* (Siqueiros-Delgado et al., 2013).

Bouteloua media ha sido considerada por varios autores como un taxón diploide ($2n=20$) (Gould & Kapadia,1964; Gould, 1980; Siqueiros-Delgado et al., 2013) a partir de mediciones del tamaño del polen (Gould & Kapadia, 1964). No obstante, Siqueiros-Delgado et al. (2017) cuestionan la diploidía de la especie basados en el hecho de que está conformada por varios linajes independientes, y al menos en una muestra de Nayarit se encontraron 5 copias diferentes de ITS, por lo que se sugiere la poliploidía al poseer dos o más copias de ADN (Van de Peer et al., 2017) en el linaje del centro de México; sugiriendo la posible aloploidía originada por hibridación. Hasta el momento los individuos estudiados se reportan como diploides, aunque para el linaje de *B. media* del centro de México, incluido dentro de los taxa poliploides, no se ha logrado cuantificar sus cromosomas (Siqueiros-Delgado et al. 2017).

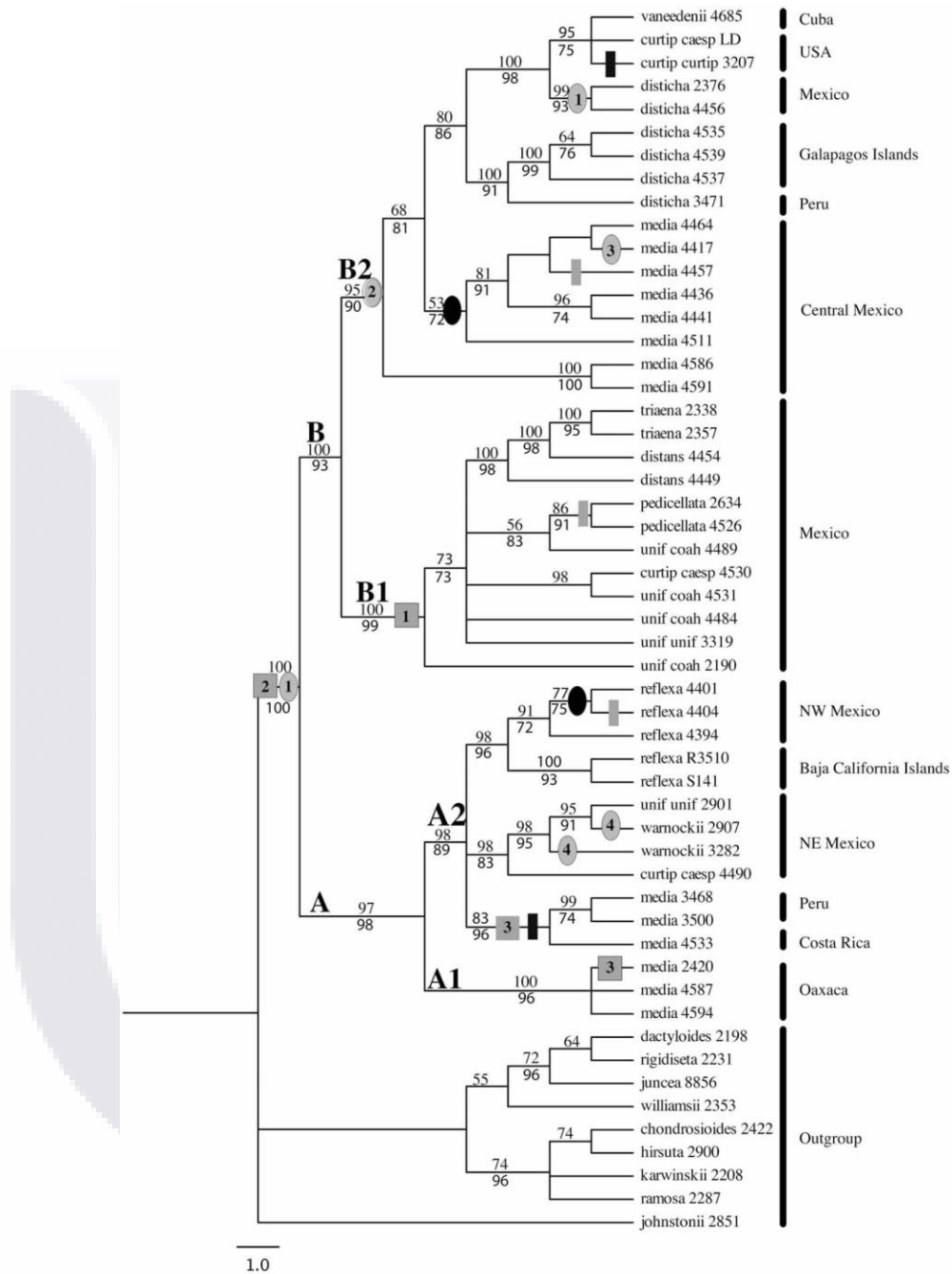


Figura 2. Árbol filogenético del complejo *Bouteloua curtipendula* basado en la combinación de secuencias ITS + *trnT*-L-F; obtenido por el método de máxima verosimilitud. Los caracteres y los estados de los caracteres se asignan al árbol mediante ACCTRAN con los siguientes símbolos: Color de la antera (óvalos grises): amarillo 1, naranja 2, rojo 3, púrpura 4; número promedio de espiguillas por rama (cuadrados grises): (1) 1–2, (2) 3–16, (3) > 16; presencia de rizomas (rectángulos negros); presencia de estolones (rectángulos grises); y presencia de inflorescencias laterales (óvalos negros) (Siqueiros-Delgado et al., 2013).

3. Justificación

Debido a que la clasificación de *Bouteloua media* se apoyó inicialmente en su morfología, sus poblaciones se consideraron como una sola especie por ser muy similares morfológicamente. Sin embargo, se ha demostrado que es un grupo artificial constituido por diferentes linajes; asimismo, a pesar de que se ha propuesto que es una especie diploide, su diploidía está en duda. A pesar de los conocimientos existentes aún falta indagar más aspectos sobre este taxa. Por lo anterior, es relevante analizar las poblaciones mexicanas por medio de caracteres moleculares y morfológicos, así como determinar su nivel de ploidía; además de especificar las diferencias fenotípicas mediante análisis morfométrico. Esto con el propósito de resolver las interrogantes relativas a su filogenia e inferir los procesos que se han implicado en la evolución y diversificación de sus linajes.

4. Objetivo

Estimar la diversidad genética y morfológica de *Bouteloua media*, y establecer sus niveles de ploidía con el fin de determinar sus unidades de evolución (linajes).

4.1 Objetivos específicos

- Determinar la diversidad genética en los linajes de *B. media*.
- Determinar la diversidad morfológica entre los linajes de *B. media*.
- Determinar la ploidía de las poblaciones de *B. media* en México.

5. Preguntas de la investigación

¿La variabilidad genética de los linajes de *B. media* será suficiente para definirlos como grupos monofiléticos?

¿Cuáles son los caracteres morfológicos distintivos para cada linaje de *B. media*?

¿El nivel de ploidía de los individuos colectados se relacionará con su localidad de colecta y las relaciones filogenéticas con otros taxa del *CBC*?

6. Hipótesis

La diversidad genética en las poblaciones de *B. media* será muy amplia, por lo tanto, cada linaje se definirá como un grupo monofilético.

La morfología de *B. media* presentará variaciones medibles que son significativamente diferentes, y distintivos en cada linaje.

Los ejemplares de *B. media* de algunos puntos de Oaxaca pueden ser diploides si son cercanamente relacionados a los linajes más basales de Oaxaca y Centro América por ser un carácter plesiomórfico. Por otro lado, los ejemplares de algunas zonas de Oaxaca y del resto del país serán poliploides por tener más relación con los linajes de diversificación más reciente en el *CBc*.

7. Metodología

7.1 Colecta de material

Se colectaron individuos de *B. media* en floración en los estados de Oaxaca, Hidalgo, Nayarit y Jalisco en los meses de agosto y octubre de 2019. Las localidades de colecta se enlistan en el Cuadro 1, y ubicadas en la figura 3. Los ejemplares colectados se encontraron principalmente en hábitats tropicales, con vegetación de tipo selva baja y en laderas (Fig 4 y 5). Las plantas completas se emplearon para la realización de los análisis morfométricos. De cada individuo colectado, se tomaron muestras de hojas frescas que se almacenaron en sílica gel para posteriormente extraer ADN. También se colectaron anteras de flores jóvenes, y se colocaron en una solución de alcohol absoluto – ácido acético glacial 3:1 para fijar los microsporocitos en la fase de desarrollo en la que se encontraban, posteriormente se transfirieron a alcohol al 70%, para su conservación y posterior conteo de cromosomas.

Las nuevas muestras que se colectaron se añadieron a las matrices previamente elaboradas por Siqueiros (sin publicar) con individuos de cada taxa del *CBc* (Anexo A): *B. curtispindula* var. *curtispindula*, *B. curtispindula* var. *caespitosa*, *B. curtispindula* var. *tenuis*, *B. distans*, *B. disticha*, *B. media*, *B. pedicellata*, *B. purpurea*, *B. reflexa*,

B. triaena, *B. uniflora* var. *coahuilensis*, *B. uniflora* var. *uniflora*, *B. vaneedenii*, y *B. warnokii*.

Cuadro 1. Localidades de colecta de individuos de <i>B. media</i>				
Punto	Coordenadas	Altitud	Localidad	Muestra
A	17°53'45.4"N, 97°50'57.2"W	1818m	Carr. Internacional 190, Km 203; Zapotitlán Palmas, Oaxaca	7, 8, 9, 10, 11, 12
B	17°51'31.4"N 97°48'41.6"W	1907m	Carr. Internacional 190, km 209; Huajuapán de León, Oaxaca	13, 14, 15, 16
C	17°41'34.2"N 97°36'43.4"W	1849m	Carr. Internacional 190, km 3; Villa de Tamazulápam del Progreso, Oax.	17, 18, 19, 20
D	17°40'8"N 97°32'24.9"W	2034m	Carr. Internacional 190, Km 12 Tamazulápam del Progreso, Oaxaca	<i>B. purpurea</i> 21, 22, 23, 24, 25, 26
E	16°46'27.1"N 96°21'1.9"W	1740 m	Carr. Internacional 190, km 62 Guelavía, Oaxaca	27, 28, 29, 30
F	18°12'35.4"N 97°38'24.6"W	2008 m	Carr. Tehuacan – Huajuapán 125, km 58, Santiago Chazumba, Oax.	31, 32, 33, 34
G	19°53'35"N 98°46' 11" W	2423m	Carr. México M40D de Cuota, km 143. Jagüey de Arriba, Hidalgo	35, 36, 37
H	21°05'43.2"N 104°42'46.6"W	848 m	Camino Amado Nervo. San Pedro Lagunillas, Nayarit.	39
I	21°03'40.0"N 104°13'57.0"W	1097m	Carr. Guadalajara - Tepic, Km 119. Los Toriles, Nay. La curva Jalisco	40
J	21°02'20.9"N 104°11'54.6"W	973m	Carr. Guadalajara – Tepic Km 109, Los Toriles, Jal. Plan de Barrancas Jalisco	41

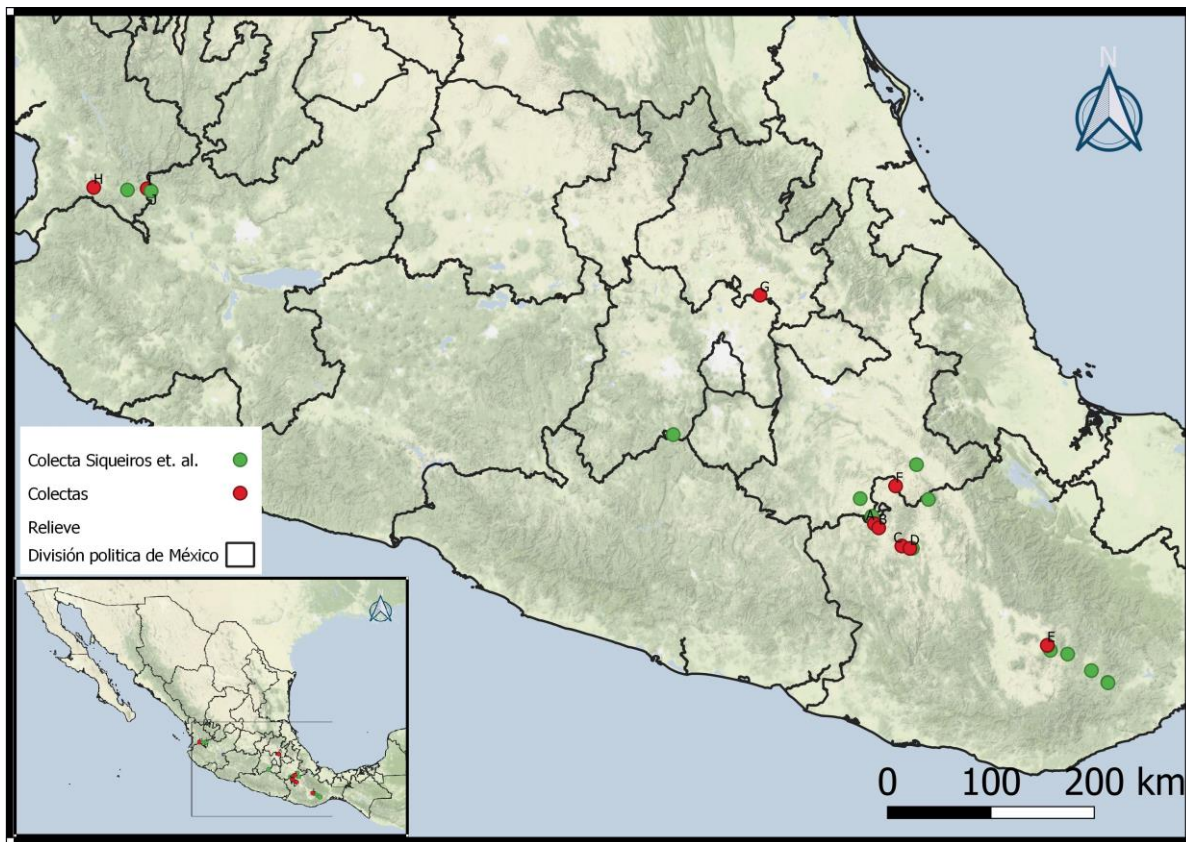


Figura 3. Localidades de colecta de los (círculos rojos) ejemplares de esta investigación, y los de Siqueiros et al., (2013,2017) (círculos verdes). Mapa elaborado en el programa QGIS 3.12.



Figura 4. Ejemplares de *B. media* colectados en el punto A (izquierda) y *B. curtipendula* en el punto C (derecha) en el estado de Oaxaca.



Figura 5. Ejemplar colectado de *B. media* del punto I en el estado de Nayarit.

7.2 Extracción de ADN

A partir de las hojas preservadas en silica gel, alrededor de 0.3 g de tejido se colocaron en microtubos de 2 ml para posteriormente macerar el tejido con perlas de acero en un disruptor celular (Tissue Lyser II- QUIAGEN) a una frecuencia de 30 Hz durante 2 minutos. Al tejido macerado se le extrajo el ADN mediante el método de cloroformo/2X CTAB (Doyle & Doyle, 1987: Anexo B).

Con el fin de corroborar la calidad del ADN obtenido, se realizaron geles de agarosa al 1.2% en TAE 1X. La electroforesis se realizó a 90 volts por 30 a 45 minutos. Posteriormente los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 20 segundos, y se realizó un lavado con agua destilada por 5 minutos para observarlo en un transiluminador UV. La concentración de ADN de cada muestra se cuantificó en el espectrómetro de microvolumen Colibrí a una longitud de onda de 260 nm. La concentración mayor o igual a 100 ng/μl se consideró como óptima, además se registraron las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 230/260 nm para verificar la pureza de la extracción. Después se diluyeron las muestras para ajustar la concentración del ADN a 50 ng/μl.

7.3 Amplificación y secuenciación

Para poder homologar y complementar los resultados de los análisis filogenéticos de este estudio fue necesario incluir las secuencias de las muestras del CBc de las mismas regiones de usadas en investigaciones previas del complejo (Siqueiros-Delgado et al., 2013, 2017) el espaciador transcrito interno 1, la región codificante 5.8S y el espaciador transcrito interno 2 del ADN nuclear ribosomal y la región *trnT-L-F* completa (el espacio intergénico *trnT-trnL*, el exón 5' *trnL* [UAA], el exón 3' *trnL* intron, *trnL* [UAA] y el espacio *trnL-trnF*) del ADN del cloroplasto (Cuadro 2).

La amplificación de los marcadores se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las siguientes cantidades por reacción recomendadas por el fabricante: 11.8 μl de H₂O destilada estéril, 4 μl de Buffer (HF para ITS y GC para *trnT-L-F*), 1 μl de cada primer (forward y reverse), 0.4 μl de dNTPs, 0.6 μl de DMSO, 0.2 μl de Phusion® ADN polimerase, y 1 μl de ADN.

Los marcadores se amplificaron bajo las siguientes condiciones:

ITS

- Desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos,
- 35 ciclos de:
 - Desnaturalización a 94 °C por 40 segundos, alineamiento a 54 °C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto.
- Extensión final a 72°C por 10 minutos.
- Se almacenaron a una temperatura de -20 °C.

trnT-L-F

- Desnaturalización inicial a 94°C por 30 segundos,
- 35 ciclos de:
 - desnaturalización a 94°C por 60 segundos, alineamiento a 60° C o 61° C de acuerdo con la muestra (Anexo C) por 30 segundos, y extensión por 72 °C por 30 segundos.
- Extensión final a 72°C por 10 minutos.
- Se almacenó el producto a una temperatura de -20 °C.

Cuadro 2. Oligonucleótidos para la amplificación de ADN.	
Primers	5' Secuencia 3'
ITS_R	GAC GCC TCT CCA GAC TAC AA
ITS_F	ATT GAA TGG TCC GGT CAA G
trn F	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG
trn BR	GAT ATG GCG AAA TCG GTA GA

Los programas de amplificación se ejecutaron por lo menos tres veces, para obtener 40 - 50 µL del producto de PCR de cada muestra; con el fin de garantizar la pureza y concentración requerida para su secuenciación. Los productos del PCR se purificaron con el Kit High Pure PCR Product Purification Version 17 de Roche®, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Anexo D). Posterior a la cuantificación y electroforesis, los fragmentos amplificados se enviaron a secuenciar a la empresa PSOMAGEN® (New York, EUA).

Las nuevas muestras se añadieron a la matriz del *CBc* previamente elaborada por Siqueiros (sin publicar) por lo que se incluyeron 92 muestras en los análisis. Se generaron tres matrices de secuencias de los marcadores ITS y *trnT-L-F* por separado y una concatenada de ambos obtenidas de las plantas colectadas para la investigación. Dichas matrices se alinearon manualmente en el programa MEGA versión 10.0.5. La matriz combinada de los dos marcadores se concatenó en el software Mesquite versión 3.6.

7.4 Análisis filogenético

El análisis filogenético se aplicó a las tres matrices ITS, *trnT-L-F* y la concatenada las cuales se analizaron por dos métodos: Inferencia Bayesiana con la herramienta de MrBayes, y máxima verosimilitud con la herramienta IQ-TREE en la plataforma de CIPRES (Miller et al., 2010). La inferencia bayesiana de todas las matrices se ejecutó bajo el modelo GTR+G por ser recomendado por el manual del programa, y bajo las siguientes condiciones conforme a cada marcador: la matriz de secuencias de ITS se emplearon 2000000 generaciones, muestreando cada 1000 generaciones, y se descartó el 25%; para el marcador *trnT-L-F* se emplearon 3000000 generaciones, muestreando cada 1000 generaciones, y se descartó el 25%; por último la matriz concatenada se usaron 3000000 generaciones, muestreando cada 1000 generaciones, y se descartó el 25% de las generaciones. Para el método de máxima verosimilitud, se utilizaron para todas las matrices los estándares ya establecidos por el programa IQ-TREE. Se seleccionó la opción automática para el modelo de sustitución. Para el análisis de soporte de rama: se usó el análisis de Bootstrap ultrarapido, 1000 alineaciones de Bootstrap, 1000 para el número máximo de repeticiones, y 0.99 para el coeficiente de correlación mínimo. La búsqueda de parámetros IQ-TREE se usaron los siguientes, 0.5 de resistencia a la perturbación, y 100 para la regla de parada.

7.5 Estudio morfométrico

Se evaluaron 28 muestras colectadas, dos muestras de *B. curtipendula*, y cuatro de *B. media*, haciendo mediciones por triplicado de cada estructura revisada; tomando

medidas con una regla de 30 cm las estructuras más grandes, y las estructuras reproductivas se midieron con papel milimétrico y con ayuda de un microscopio estereoscópico. Se capturaron los datos en el software Microsoft Office Excel 360.

Las pruebas estadísticas se efectuaron en el software PAST 4.02 (Hammer et al., 2001). Con el fin de encontrar posibles sinapomorfías que pudieran definir a los linajes, se realizaron análisis previos de componentes principales (ACP), descartando los datos que no fueron variables y se incluyeron solo los caracteres más informativos de acuerdo a la descripción de la especie y a las claves para su identificación (Herrera et al., 2004; Gould & Kapadia, 1964; Gould, 1979) se evaluaron 9 caracteres vegetativos y 12 reproductivos que se analizaron por separado (Cuadro 3), agrupándolos por clado y el tipo de lígula por ser una estructura que presento diferencias entre las muestras pero que no tuvo una influencia significativa en los análisis ACP. Para verificar la distribución de los datos se usaron los datos de la matriz de puntaje del ACP, por medio de la prueba de normalidad multivariada (MARDIA). Posteriormente se evaluaron por medio de MANOVA, para los caracteres de distribución normal. Para los caracteres con distribución no normal se realizó un análisis PERMANOVA.

Cuadro 3. Caracteres analizados en el estudio morfométrico de <i>B. media</i>	
Estructura	Carácter
Inflorescencia primaria	Longitud de la inflorescencia desde el último nudo Longitud de la inflorescencia desde la rama más basal. Número de ramas Longitud de las ramas (en la base, parte media y superior) Número de espiguillas (en la base, parte media y superior)
Glumas	Longitud de segunda gluma
Palea	Longitud
Hoja	Longitud
Tallo	Longitud
Nudos	Número total Longitud del primer internudo Longitud promedio de los internudos
Rudimento	Longitud de arista central Longitud de arista lateral
Lígula	Membranosa Ciliada Escamosa

7.6 Conteo de cromosomas

Los conteos se realizaron a partir de preparaciones de frotis de anteras jóvenes con células madre de polen, generalmente en la primera división de la meiosis. De acuerdo al protocolo modificado de Yeung et al., (2015), en un microscopio estereoscópico, se diseccionaron las puntas de las anteras de entre 2 y 3 mm para facilitar la liberación de las células madre y se colocaron en un portaobjetos. Posteriormente las anteras disectadas se aplastaron bajo un cubreobjetos y se tiñeron con una gota de aceto-orceína 1.5 %, por presentar mejores resultados en la tinción de cromosomas. Para realizar el conteo de cromosomas, se observaron bajo un objetivo de 100x con aceite de inmersión en un microscopio óptico Primo Star Carl ZEISS, y se cuantificaron los cromosomas de 5 a 10 células según la disponibilidad. Se capturaron imágenes de las células con los cromosomas más nítidos empleando el programa ZEN 3.0 (blue edition). Empleando las herramientas gráficas del programa se midió el diámetro de los granos de polen para posteriormente obtener la relación entre el tamaño del polen y los niveles de ploidía de acuerdo con lo sugerido por Gould (1980). Se realizó el análisis de regresión lineal con el programa estadístico GraphPad Prism 8.0.1. Además, para evaluar la variabilidad en el diámetro de las muestras individualmente, se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación, de acuerdo con De Storme et al., (2015)

8. Resultados

8.1 Análisis filogenético

8.1.1 Región ITS: Inferencia Bayesiana

Para esta inferencia se empleó el modelo GTR+G, se analizó la matriz de la región ITS con un total de 92 secuencias de diferentes taxones del *CBc*, cada una con 640 caracteres. En la topología resultante se obtuvieron dos clados hermanos que se definieron A y B (1 PP). El clado A, se subdivide en dos clados bien soportados con 1 PP cada uno. El A1 es el primero en diversificarse y está formado por *B. media* de Oaxaca como el linaje más basal del complejo. El clado A2, se forma por una

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

politimía con tres subclados fuertemente soportados más una muestra de *B. reflexa* de Sonora. Uno con 1 PP incluye secuencias de *B. curtispindula* var. *caespitosa*, *B. warnokii* y *B. uniflora*; el siguiente (0.89 PP) relaciona secuencias de *B. media* de Peru y Costa Rica, *B. reflexa* y *B. curtispindula* var. *caespitosa*; el otro subclado (1 PP), está formado por *B. reflexa* de las islas de BC. En el clado B (1 PP) se resuelven dos subclados: B1 y B2 (1 PP c/u). El subclado B1 forma una politimia (1 PP) con muestras de *B. uniflora*, *B. pedicellata*, *B. curtispindula* var. *caespitosa*, y el clado de *B. triaena*, y *B. distans* (1 PP). El clado B2 (1 PP), incluye el resto de las muestras analizadas, incluyendo las muestras de *B. media* restantes del norte y centro de México, así como de otras poblaciones de Oaxaca. El clado más basal de B2, incluye a representantes de *B. disticha* (1 PP) de Galápagos y Peru, y su grupo hermano con un 56 % PP resuelve una politimia con varios clados. Uno formado por cuatro muestras poliploides de *B. media* de Oaxaca (0.99 PP) pertenecientes a los puntos de colecta A, B y C (Oax8, Oax10, Oax13, y Oax17; Fig 6, recuadro azul); otro (0.57 PP) incluye las muestras de *B. media* del centro de México (Hgo., Jal., Mex., Mich., Nay., Oax., Pue.) mezcladas con individuos de *B. curtispindula*; uno mas (0.96 PP) esta formado por muestras de *B. curtispindula*, *B. disticha*, y *B. purpurea* y *B. vaneedenii*, mas tres muestras independientes de *B. media* de Pue. y Oax., mas una de *B. curtispindula* de Dgo.

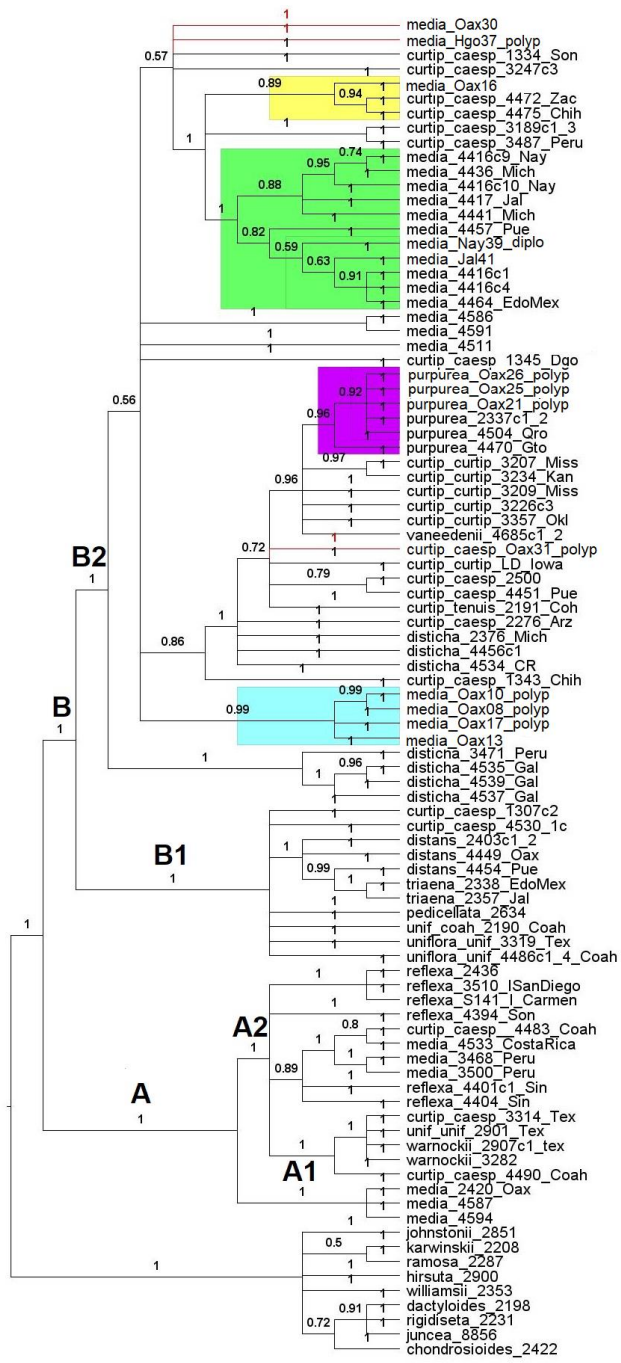
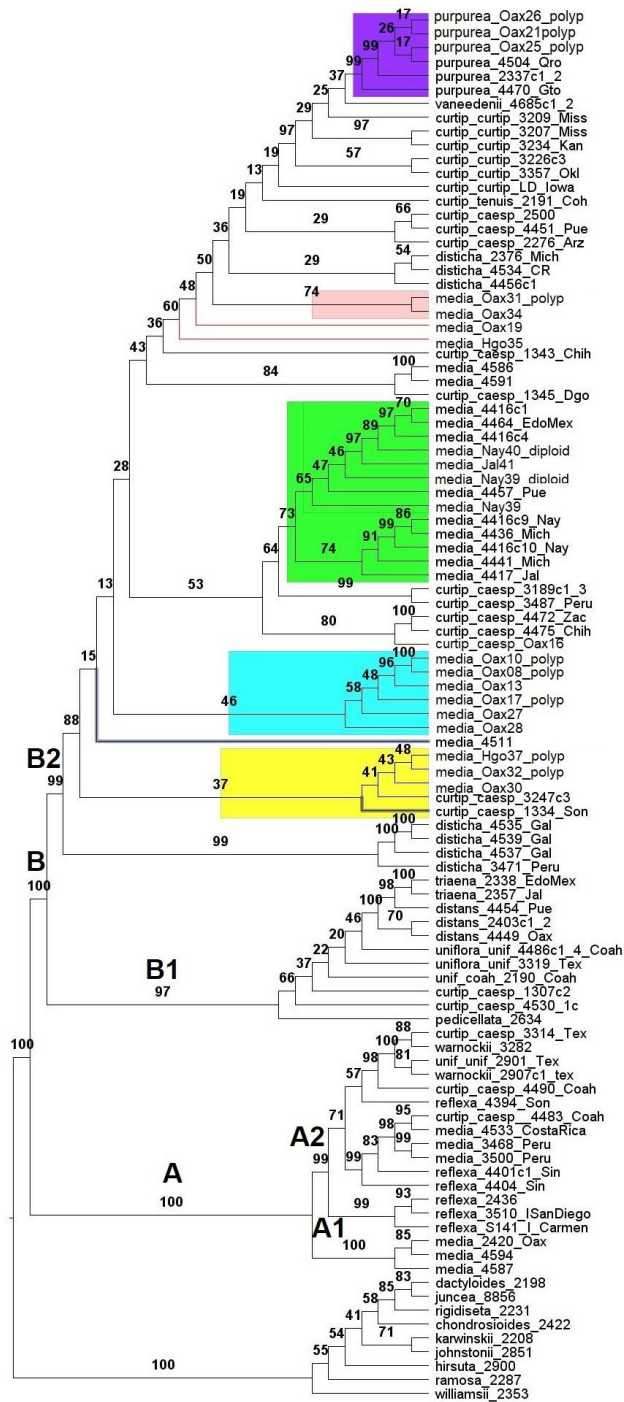


Figura 6. Inferencia Bayesiana obtenida a partir de secuencias de la región ITS del Complejo B. *curtipendula*. Se subdivide en dos cladros principales A y B, en los subclados A1, A2, B1 y B2. Por medio de recuadros se representa por colores la ubicación de las muestras colectadas para la investigación en los diferentes grupos del complejo: azul, ejemplares de Oaxaca; morado, grupo de *B. purpurea*; verde, clado de *B. media* del centro de México, amarillo, *B. curtispidula* var *caespitosa*, y las ramas rojas representan las secuencias involucradas en politomias. Los valores de probabilidad posterior (PP) se encuentran sobre las ramas de cada nodo

8.1.2 Región ITS: Máxima Verosimilitud

Se determinó a TIM3e+G4 como el mejor modelo. Se analizaron secuencias de 100 taxones, con 626 sitios de nucleótidos de los cuales 285 sitios fueron constantes (45.5272% de todos los sitios), 184 sitios resultaron informativos, y el número de sitios distintos fue de 392. El árbol consenso se obtuvo a partir de 1000 repeticiones de Bootstrap. El análisis resolvió la misma topología que IB (Inferencia Bayesiana), con los mismos dos clados principales (A y B) altamente soportados (100 BS). El clado A es prácticamente igual al resuelto en IB, formándose los dos subclados A1 y A2 con 100 y 99 BS, respectivamente. En el clado B, el subclado B1 (97 BS), incluye los mismos taxa que el B1 de IB, pero un poco más resuelto. El clado B2 está mucho más resuelto que en IB, formándose los mismos subclados que en el análisis de IB.



30

Figura 7. Inferencia filogenética obtenida mediante el método de máxima verosimilitud a partir de secuencias de la región ITS del Complejo *B. curtipendula*. Se subdivide en dos cladros principales A y B, y cuatro subclados: A1, A2, B1, y B2. Por medio de recuadros se indica la ubicación de las muestras colectadas para la investigación: azul ejemplares de *B. media* de Oaxaca; morado grupo de *B. purpurea*; verde clado de *B. media* del centro de México, amarillo *B. curtipendula* var *caespitosa*. Los valores de Bootstrap (BS) se encuentran sobre las ramas de cada nodo.

8.1.3 Región trnT-L-F: Inferencia Bayesiana

El modelo GTR+G se usó para obtener la inferencia de región del genoma del cloroplasto, se analizaron 91 secuencias de taxones, con un total de 1167 sitios de nucleótidos. La inferencia bayesiana de la región trnT-L-F, se dividió en dos clados, que se han llamado A y B. El clado A se resuelve solo con secuencias de *B. reflexa* siendo este el más basal con un soporte alto (0.98 PP). Seguido a este se diversifica el clado B (0.78 PP) se subdividió en dos clados hermanos B1 con soporte alto (0.95 PP), en el cual se encuentra una politomia por *B. pedicellata* y *B. uniflora*, esta politomia es hermana al siguiente grupo bien soportado (0.97 PP). formado por *B. uniflora* var. *uniflora*, *B. distans*, *B. triaena*, y *B. curtispindula* var. *caespitosa*. En el clado B2 bien soportado (0.74 PP), se ha observado la presencia de una politomia que ha incluido a la mayoría de las muestras del estudio Oax8, Oax12, Oax14, Oax17, Oax25, Oax26, Oax31, Oax32, Hgo35, Hgo37, y Nay39 y los taxa *B. media*, *B. vaneedenii*, *B. uniflora*, *B. disticha* y las variedades caespitosa, curtispindula, tenuis, de *B. curtispindula*. Se obtuvo la divergencia de cuatro grupos, se observa primero el grupo bien soportado (0.85 PP) de *B. pupurea*, el grupo que ha incluido ha secuencias de *B. media* y *B. curtispindula* (0.92 PP), el grupo de tres secuencias de *B. disticha*. Por último, el grupo más derivado y con un soporte alto (0.98 PP), que ha relacionado por ancestría a cuatro muestras de Oaxaca: Oax7, Oax21, Oax22, y Oax 28 (Figura 8, recuadro verde)

8.1.4 Región trnT-L-F: Máxima verosimilitud.

Se determino a HKY+F+G4 como el mejor modelo, y se analizaron 91 secuencias. Se presentó un total de 1167 sitios de nucleótidos, con 787 sitios constantes (67.4%), 96 sitios fueron informativos, y 454 sitios distintos. El árbol consenso se obtuvo a partir de 1000 repeticiones de Bootstrap. La hipótesis resuelve los mismos dos clados A y B que ITS con un soporte aceptable (78 y 98 BS, respectivamente) con practicamente los mismo taxa, sin embargo el clado B2 no tiene resolución. El clado B (78% BS), subdividido en el clado B1 bien soportado (84 BS) en este comparten ancestro secuencias de *B. triaena*, *B. distans*, *B. uniflora*, *B. curtispindula* var. *caespitosa* y *B. pedicellata*. En el clado B2 (63 BS) se han incluido las muestras

colectadas en esta investigación, se ha observado la presencia de una la politomia con secuencias de *B. media*, en seguida ha divergido un grupo de *B. media* y *B. curtispindula* var. *caespitosa*, y apareció una politomia de *B. uniflora* var. *uniflora* y *B. warnokii*. Después, ha ocurrido la diversificación de un grupo no soportado (15 BS), que ha relaciono a secuencias de *B. media*, *B. curtispindula* var. *caespitosa*, y *B. warnokii*. Posterior a este grupo ha diversificado un grupo que relaciona ha secuencias de *B. media* y *B. curtispindula* var *caespitosa*. Se ha notado que las muestras Oax8, Oax12, Oax14, Oax17, Oax31, Oax32, Hgo35, Hgo37, y secuencias de *B. media*, *B. uniflora* var. *uniflora*, y las variedades tenuis y caespitosa de *B. curtispindula* se relacionan por ancestría en un grupo no soportado (18 Bs) (Figura 9, recuadro rosa). En seguida diverge un grupo bien soportado (75 Bs) de muestras del estado de Oaxaca que ha incluido a las muestras Oax7, Oax21, Oax22 y Oax2 (Figura 9, recuadro azul), y seguido de este el grupo de *B. media* del centro de México (67 Bs). En el grupo más derivado con un soporte débil (49 Bs), divergió primero las muestras Oax25 y Oax26 como hermanas del resto de este grupo, subsecuente a estas, ocurrió la diversificación del grupo de las secuencias de *B. vaneedenii*, *B. disticha*, *B. purpurea*, *B. curtispindula* var. *curtispindula*, y *B. curtispindula* var. *caespitosa*.

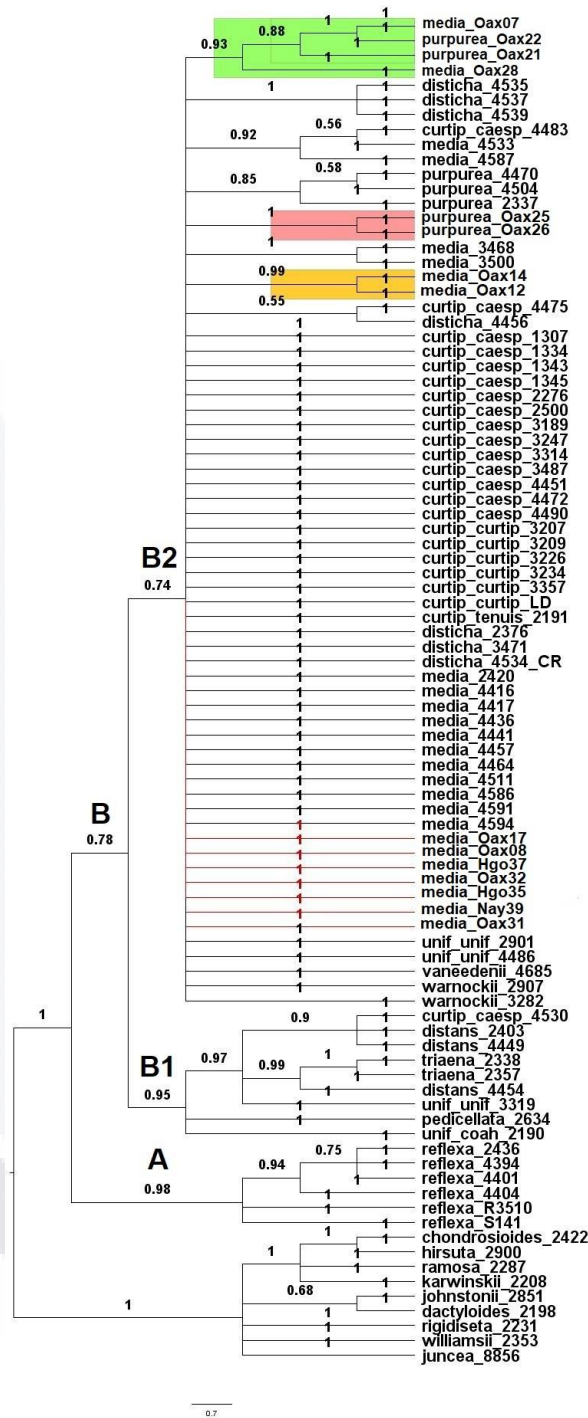
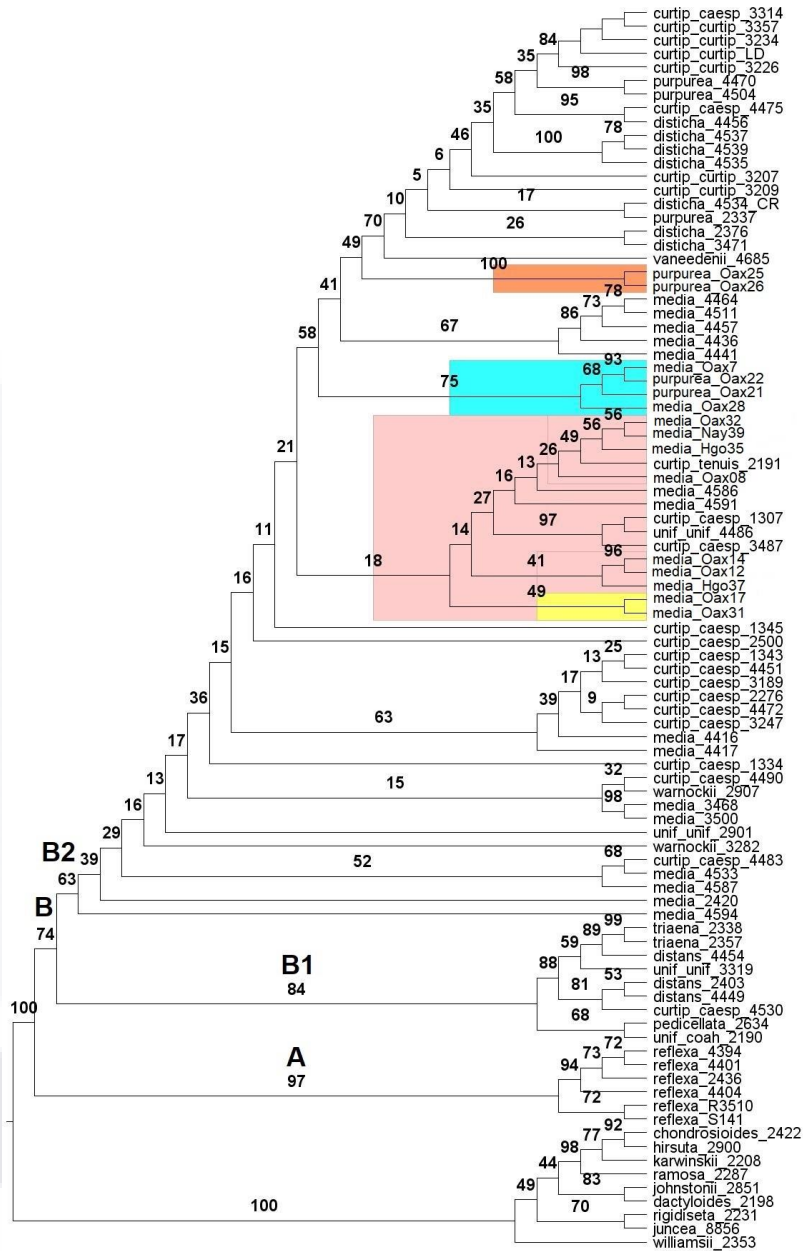


Figura 8. Inferencia Bayesiana obtenida a partir de secuencias de la región trn *T-L-F* del Complejo *B. curtipendula*. Se subdivide los clados principales A, B, B1 y B2. Por medio de recuadros se representa por colores la ubicación de las muestras de la investigación en los diferentes grupos del complejo: Ramas color rojo muestras involucradas en politomias, cuadro naranja ejemplares de Oaxaca del punto de colecta B; recuadro rosa muestras de Oaxaca del punto de colecta D, recuadro verde, ejemplares del estado de Oaxaca del punto de colecta A,D y E. Los valores de probabilidad posterior (PP) se encuentran sobre las ramas de cada nodo



30

Figura 9. Inferencia filogenética obtenida mediante el método de máxima verosimilitud a partir de secuencias de la región *trnT-L-F* del Complejo *B. curtipendula*. Se subdivide los clados principales A, B, B1 y B2. Por medio de recuadros se indica la ubicación de las muestras colectadas para la investigación en los clados del complejo: rosa, ejemplares de Oaxaca, Hgo y Nayarit relacionadas a *B. media*, y las variedades *curtipendula* y *tenuis* de *B. curtipendula*; azul, ejemplares de Oaxaca de los puntos de colecta; A, D y E; naranja, ejemplares de Oaxaca del punto de colecta E. Los valores de Bootstrap (Bs) se muestran sobre las ramas.

8.1.5 Combinación de las regiones ITS+ trnT-L-F: Inferencia Bayesiana.

Se analizaron 84 secuencias de las regiones ITS+ trnT-L-F, con 1813 caracteres. Se empleo el modelo GTR+G. La inferencia bayesiana de la combinación de estas regiones se resolvió en dos clados bien definidos, A (1 PP) y B (1 PP). El clado A se divide en dos clados hermanos (1 PP ambos). A1 forma un grupo de tres secuencias de *B. media* de Oaxaca, y el clado A2 forma una politomía con tres subclados, primero diverge el grupo de secuencias *B. media* de Peru y Costa Rica, y una secuencia de *B. curtispindula* var *caespitosa* con un soporte alto (1PP), en seguida un clado con (1 PP) secuencias de *B. curtispindula* var. *caespitosa*, *B. warnockii* y *B. uniflora* var. *uniflora*; y con *B. reflexa*. El clado B, se divide en el clado B1 (1 PP), el primer grupo que diverge como grupo hermano del resto de los taxa del clado y corresponde a dos muestras de *B. curtispindula* var. *caespitosa*, y *B. uniflora* var. *uniflora*, en el siguiente grupo se presenta una politomia por dos muestras, *B. uniflora*, y *B. pedicelata*, y en el último grupo se forma de (1 PP) muestras de *B. uniflora* var. *uniflora*, *B. curtispindula* var. *caespitosa*, *B. distans*, y *B. triaena*. En el clado B2 primero divergen dos muestras de *B. media* bien soportadas (0.99 PP), después se diversifica, en la rama más basal se presentó una muestra de *B. curtispindula* var. *caespitosa*, en seguida las muestras de *B. disticha* forman parte de una politomia. El siguiente grupo que ha divergido con un soporte débil (0.61 PP), está formado por la muestra Oax31, tres secuencias de *B. curtispindula* var. *caespitosa*, y una muestra de *B. curtispindula* var. *tenuis* (Figura 10, recuadro amarillo). En el siguiente clado (0.71 PP), ha presentado una politomia por seis muestras de *B. curtispindula* var. *curtispindula*, y una muestra de *B. vaneedenii*. Por último, las muestras Oax21, Oax 25 y Oax26 han resultado ser hermanas del *B. purpurea* formando un grupo monofilético (Figura 10, recuadro morado) altamente soportado (0.99 PP). El siguiente clado en diversificarse tiene un buen soporte (0.7 PP), en este se ha observado la presencia de una politomia que se forma por tres muestras de *B. curtispindula* var. *caespitosa*, además que se ha formado el grupo de *B. media* del centro de México altamente soportado (1 PP), y se ha relacionado por ancestro a la muestra Nay 39 (Figura 10, recuadro verde); seguido de este clado se encuentra un grupo formado por tres secuencias de *B. disticha*. Por último, se ha

observado la presencia de una politomia en la que se involucran las secuencias de *B. media* Oax8, Oax17, Hgo37, una de *B. media* y cuatro de *B. curtispindula* var. *caespitosa*.

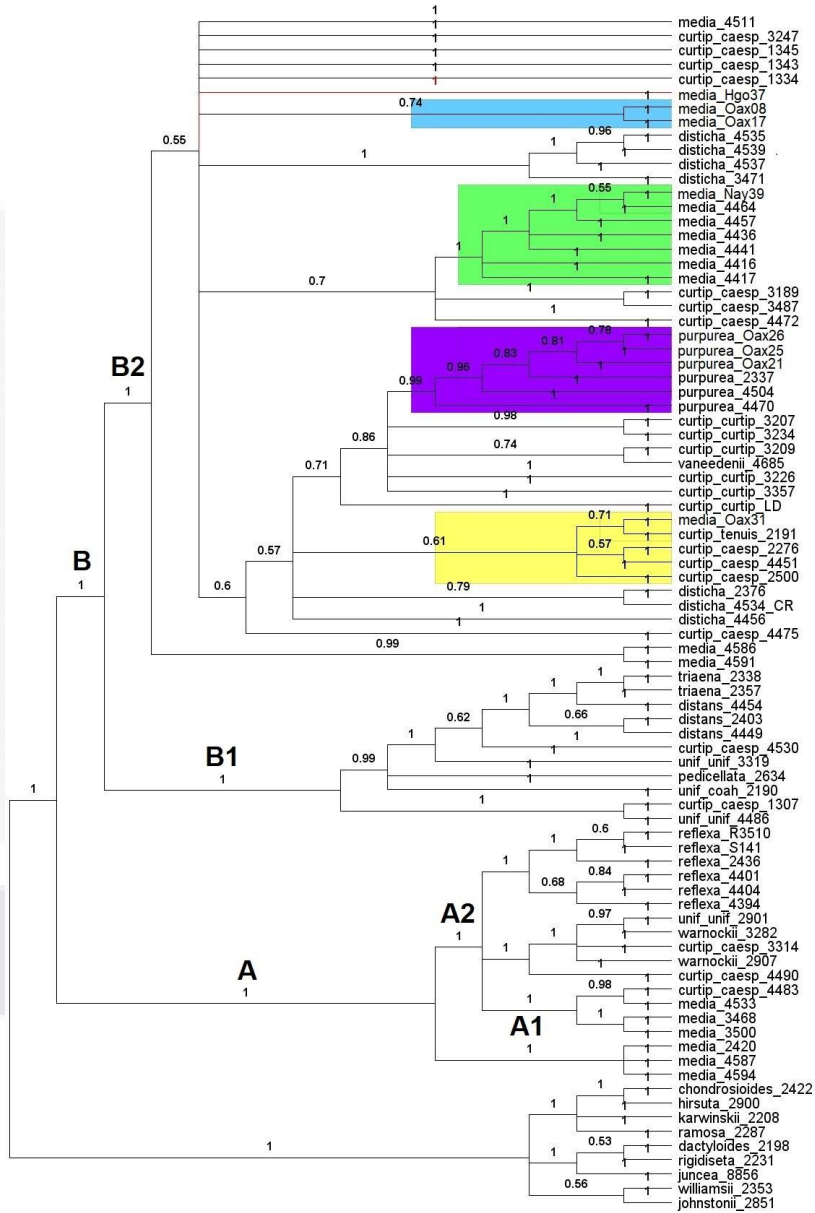


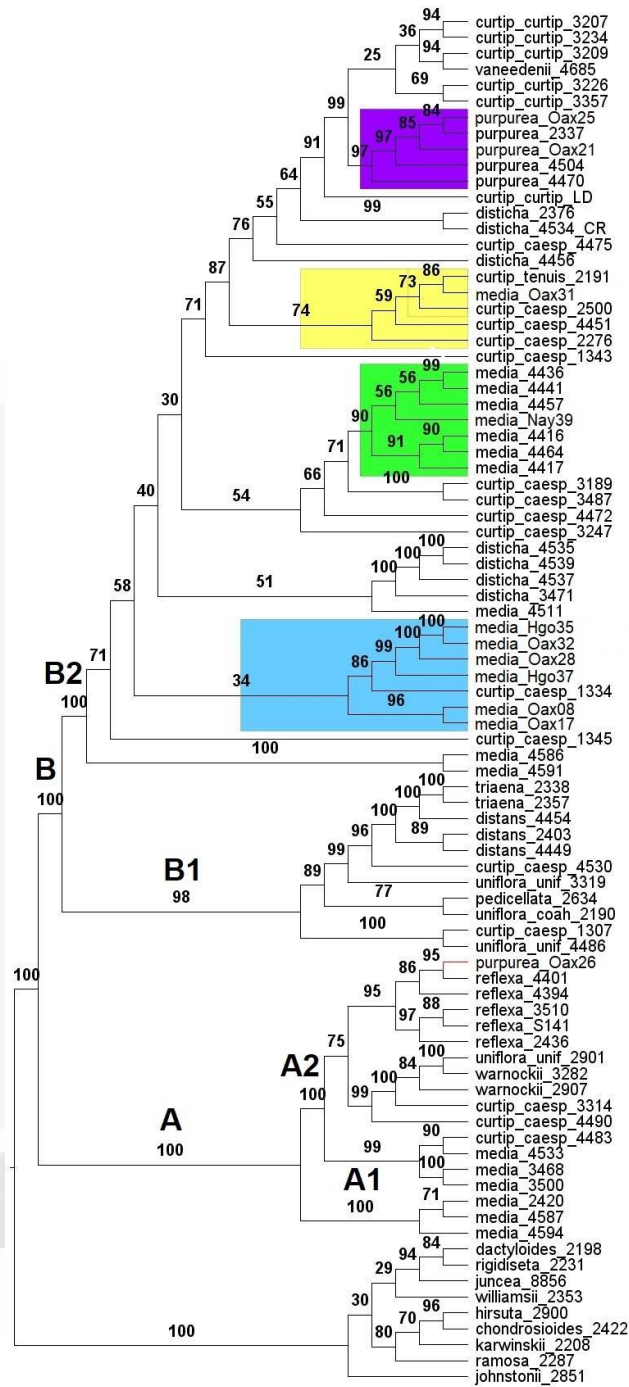
Figura 10. Inferencia bayesiana basado en la combinación de secuencias ITS+ trnT-L-F del Complejo *B. curtispindula*. Dividido en dos clados principales A y B, y en cuatro subclados A1, A2, B1 y B2. Por medio de recuadros se indica la ubicación de las muestras colectadas para la investigación en los clados del complejo: amarillo, grupo de las variedades *curtispindula* y *tenuis* de *B. curtispindula*; morado, grupo de *B. purpurea*; Verde, grupo de *B. media* del centro de México; Azul, ejemplares de Oaxaca de los puntos de colecta A y B; las ramificaciones involucradas en politomias se muestran de color rojo. Los valores de probabilidad posterior (PP) se muestran sobre las ramas.

8.1.6 Combinación de las Regiones ITS+ trnT-L-F: Maxima verosimilitud

En la matriz concatenada, TN+F+G4 se determinó como el mejor modelo. Se analizaron 86 taxones, con 1758 sitios de nucleótidos, 837 sitios constantes (= 47.6109%), 602 sitios informativos, 874 sitios distintos y 27 sitios son ambiguos. El árbol consenso se construyó a partir de 1000 repeticiones. La inferencia ha definido a dos clados A y B con soporte alto (100 BS): El clado A, que se ha dividido en A1 este solo ha incluido a tres secuencias de *B. media* de Oaxaca; el clado A2, se diversifica en el clado (99 Bs) de *B. media* de Perú y Costa Rica, y una secuencia de *B. curtipendula* var. *caespitosa*, el siguiente grupo ha relacionado a *B. uniflora*, *B. warnockii* y *B. curtipendula caespitosa*, y se ha obtenido el clado de *B. reflexa* y en este se ha incluido a la muestra Oax26 de *B. purpurea*. El clado B se divide en el clado B1, presentando un buen soporte (98 Bs), en este se pudo observar que el primer grupo en divergir está formado por *B. curtipendula* var. *caespitosa* y *B. uniflora* var. *uniflora* (100 Bs) y se ha posicionado como el grupo hermano de este clado; posteriormente ha divergido el grupo con un buen soporte (89 Bs) de las secuencias de los siguientes taxa: *B. uniflora*, *B. pedicellata*, *B. uniflora* var. *uniflora*, *B. curtipendula* var. *caespitosa*, *B. distans* y *B. triaena*. En el subclado B2 altamente soportado (100 Bs), divergen primero *B. media* y *B. curtipendula* var. *caespitosa*, y ha ocurrido la divergencia posterior (34 Bs) de unos de los grupos más basales de este clado, en el cual se han incluido como secuencias hermanas las muestras Oax8, Oax17, Oax28, Oax32, Hgo35, Hgo37 y una secuencia de *B. curtipendula* var. *caespitosa* (Figura 11, recuadro azul). El siguiente grupo ha presentado un soporte débil (51 Bs) incluyendo las secuencias de *B. disticha* y *B. media*; la siguiente agrupación incluye a una politomía de *B. curtipendula* var. *caespitosa*, y ha agrupado dos muestras de esta. Se han relacionado las secuencias de *B. media* del centro de México con las secuencias de *B. media* de Nay 39 formando un grupo bien soportado (90 Bs) (Figura 11. recuadro verde). El clado más derivado del CBc, ha presentado una accesión de *B. curtipendula* var. *caespitosa* en su primera rama, y ha relacionado la secuencia Oax31 con tres secuencias de *B. curtipendula* var. *caespitosa* y una de *B. curtipendula* var. *tenuis* (Figura 11, recuadro amarillo). Así mismo en las subsecuentes ramificaciones se ha observado la presencia de una

politomia formada por una secuencia de *B. curtipendula* var. *cespitosa* y se han agrupado a dos secuencias de *B. disticha*. También se ha obtenido un grupo monofilético (97 Bs) en el que las secuencias Oax21 y Oax25 se han relacionado por un ancestro reciente con tres accesiones de *B. purpurea* (Figura 11, recuadro morado). Por último, se obtuvo el grupo más derivado ha incluido a cinco secuencias de *B. curtipendula* var. *curtipendula* y a una de *B. vaneedenii*.





20

Figura 11. Inferencia filogenética obtenida por máxima verosimilitud basado en la combinación de secuencias ITS+ trn *T-L-F* del Complejo *B. curtipendula*. Dividido en dos clados principales A y B, y en cuatro subclados A1, A2, B1 y B2. Por medio de recuadros se indica la ubicación de las muestras colectadas para la investigación en los clados del complejo: Azul, ejemplares de Oaxaca e Hidalgo, y *B. curtipendula* var. *caespitosa*; verde, grupo de *B. media*. Amarillo, grupo de las variedades *caespitosa* y *tenuis* de *B. curtipendula*; morado, grupo de *B. purpurea*. Los valores de Bootstrap (BS) se encuentran sobre las ramas de cada nodo.

8.2 Estudio morfométrico

De manera general, las diferencias más sobresalientes que se observaron fue la presencia de inflorescencias laterales y estolones en los ejemplares colectados en el estado de Nayarit, Jalisco y en *B. media* del centro de México. Otros ejemplares que presentaron estolones son Oax21, Oax22, Oax23, Oax24, Oax 25, Oax26, sin embargo, estos se han incluido en el clado de *B. purpurea*. Igualmente, se han observado tres tipos de lígulas: membranosa, escamosa y ciliada en los ejemplares revisados (Figura 12).

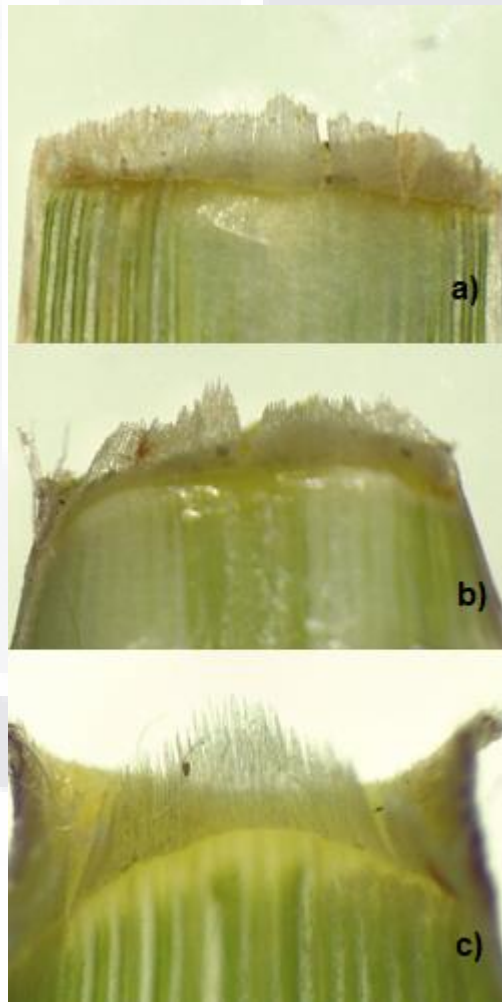


Figura 12. Tipo de lígula observada en las muestras de *B. media* y *B. curtispindula*: a) membranosa (ej. Nay40), escamosa (ej. Oax30), y ciliada (ej. Oax18).

Para el análisis de los datos morfométricos se realizaron dos agrupaciones según el clado al que se relacionaron muestras y por el tipo de lígula, al mismo tiempo que se han evaluado los datos separándolos en caracteres vegetativos y reproductivos. Los resultados obtenidos en los análisis se presentan a continuación:

8.2.1 Agrupación por clado: Oaxaca, *B. curtipendula* var. *caespitosa*, *B. curtipendula* var. *tenuis*, *B. media* del centro de México, *B. media* de Oaxaca, y *B. purpurea*

- Caracteres Vegetativos

De acuerdo con el análisis de componentes principales (ACP), se han requerido solo tres componentes para representar el 97.07% (C1=78.82, C2=12.67, C3=5.58) de la variación, indicando que los datos son poco variables. El carácter que representa al componente 1 es la longitud del tallo, y el número de ramas lo fue para el componente 2. En la figura 13 se ha podido observar por medio de las elipses la interacción entre las agrupaciones, mostrando que los grupos Oaxaca, *B. curtipendula* var. *caespitosa*, *B. curtipendula* var. *tenuis*, y *B. media* de Oaxaca, *B. purpurea* se encuentran superpuestos, igualmente la elipse de *B. media* del centro de México abarco todos los grupos mencionados.

Se observo que la longitud del tallo y el número de ramas presentaron una influencia mayor sobre otros caracteres en el ACP de acuerdo con el clado. A continuación, se presentan los datos registrados en cada agrupación, la longitud del tallo obtenida los ejemplares fue la siguiente: Oaxaca, 39-74 cm; *B. curtipendula* var. *caespitosa*, 22-65 cm; *B. curtipendula* var. *tenuis*, 39-43 cm; *B. media* del centro de México 75-150 cm, *B. media* de Oaxaca, 95-120 cm; *B. purpurea*, 20-65 cm. También, se cuantificaron los siguientes números de ramas: Oaxaca, 30-86; *B. curtipendula* var. *caespitosa*, 30-80; *B. curtipendula* var. *tenuis*, 24-30; *B. media* del centro de México 75-150; *B. media* de Oaxaca, 54-96; *B. purpurea*, 40-72.

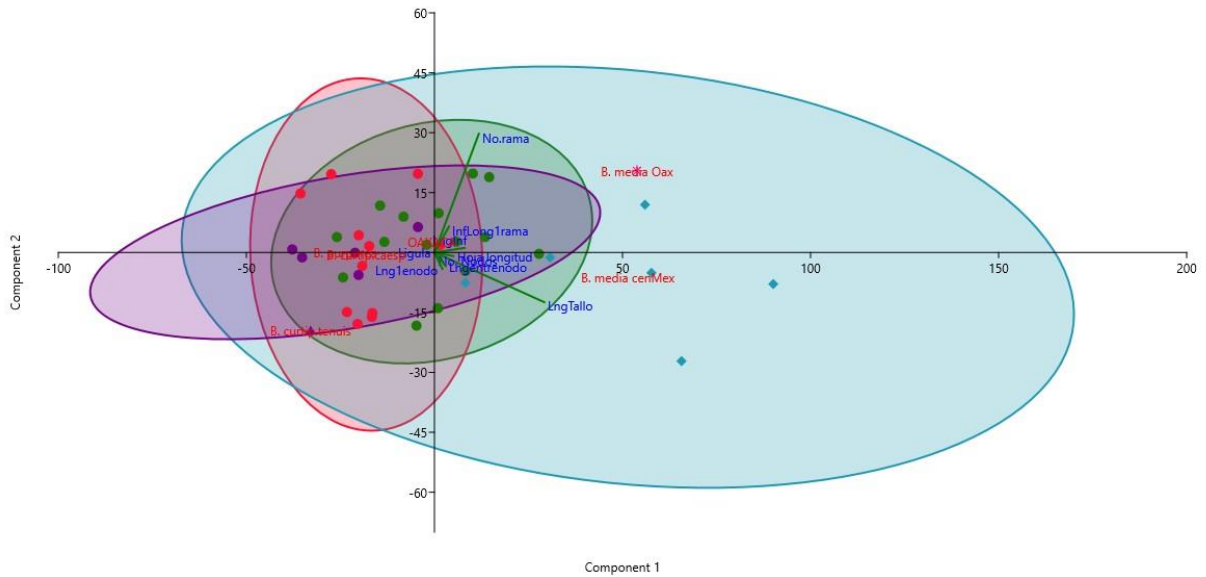


Figura 13. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los caracteres vegetativos agrupados conforme al clado en el que se posicionaron. Las elipses representan el 95% de los datos y cada elipse corresponde a un grupo: el color verde a Oaxaca, el rojo a *B. curtipendula* var. *caespitosa*, el color azul a *B. media* del centro de México, y el color morado a *B. purpurea*.

La prueba MARDIA obtuvo un valor de $P = 0.015 < 0.05$, reveló que los datos de los caracteres morfológicos vegetativos son significativamente diferentes; además ha reflejado que presentan una distribución no normal. Por lo anterior se realizó la prueba PERMANOVA (cuadro 4); los resultados obtenidos de la prueba según el valor de $P < 0.05$, demostró que los ejemplares del clado de Oaxaca son diferentes a los ejemplares de *B. curtipendula* var. *caespitosa*, *B. media* del centro de México, y *B. purpurea*. También presentaron diferencias significativas los ejemplares de *B. media* con el grupo de *B. purpurea* y *B. curtipendula* var. *caespitosa*.

Cuadro 4. Matriz de resultados del análisis PERMANOVA de los caracteres vegetativos agrupados por clado.

	Oaxaca	<i>B. curtipendula</i> var. <i>caespitosa</i>	<i>B. media</i> del centro de México	<i>B. curtipendula</i> a var. <i>tenuis</i>	<i>B. media</i> de Oaxaca	<i>B. purpurea</i>
Oaxaca		0.0053	0.0001	0.0613	0.0676	0.0048
<i>B. curtipendula</i> a var. <i>caespitosa</i>	0.0053		0.0001	0.3299	0.0852	0.446
<i>B. media</i> del centro de México	0.0001	0.0001		0.1431	0.419	0.0044
<i>B. curtipendula</i> a var. <i>tenuis</i>	0.0613	0.3299	0.1431		1	0.3383
<i>B. media</i> de Oaxaca	0.0676	0.0852	0.419	1		0.1689
<i>B. purpurea</i>	0.0048	0.446	0.0044	0.3383	0.1689	

- Caracteres Reproductivos

Se necesitaron de dos componentes para explicar el del 96.54% de variación (C1=83.46, C2=13.08) de los datos, por lo tanto, estos valores obtenidos han indicado que los datos de las agrupaciones no son muy variables. El número de espiguillas en la parte media y superior de la inflorescencia ha definido el acomodo del componente 1, mientras que en el componente 2 fue el número de espiguillas en la rama basal de la inflorescencia. También podemos observar por las elipses (Figura 14), las relaciones de las agrupaciones, el grupo *B. media* del centro de México encerró a todos los grupos, además los grupos Oaxaca, y *B. curtipendula* var. *caespitosa* se han sobrepuesto uno con otro, mientras que *B. purpurea* se excluyó de estas dos elipses. En seguida, se muestran los rangos en el número de espiguillas conforme a la agrupación correspondiente:

- Rama superior Rama. Oaxaca 2-4, *B. curtispindula* var *caespitosa* 2-3, *B. curtispindula* var. *tenuis* 2-3 y *B. media* del centro de México 2-4, *B. media* de Oaxaca 2-4, y *B. pupurea* 1-3.
- Rama en parte media. Oaxaca 3-6, *B. curtispindula* var. *caespitosa* 3-7, *B. curtispindula* var. *tenuis* 5-6 y *B. media* del centro de México 5-9, *B. media* de Oaxaca 5-8, y *B. pupurea* 2-5
- Rama en la base. Oaxaca 3-10, *B. curtispindula* var *caespitosa* 4-10, *B. curtispindula* var. *tenuis* 6 y *B. media* del centro de México 5-13, *B. media* de Oaxaca 9- 13, y *B. pupurea* 3-6.

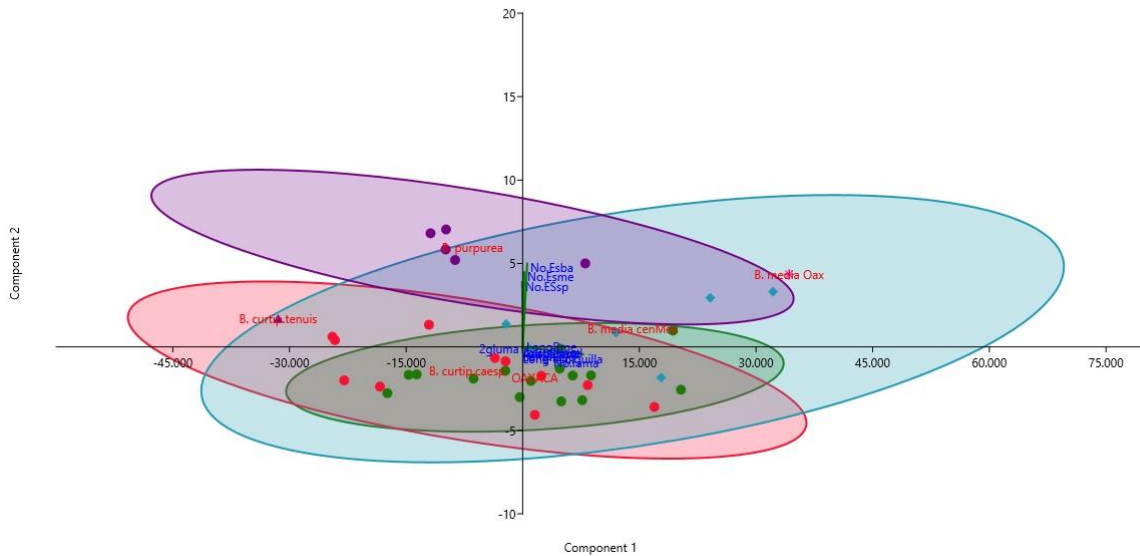


Figura 14. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los caracteres reproductivos agrupados conforme al clado en el que se posicionaron. Las elipses representan el 95% de los datos y cada elipse corresponde a uno grupo: el color verde a Oaxaca, el rojo a *B. curtispindula* var. *caespitosa*, el color azul a *B. media* del centro de México, y el color morado a *B. pupurea*.

El resultado obtenido de la prueba MARDIA fue del $P = 0.0000034 < 0.05$, este valor ha sugerido, que los datos son significativamente diferentes y que la distribución de los datos no es normal. Por lo expuesto anteriormente se realizó la prueba estadística PERMANOVA, se ha obtenido la matriz de valores y se consideró que el valor de $P < 0.05$ entre agrupaciones ha demostrado las diferencias (Cuadro 5). Los caracteres reproductivos de la agrupación de *B. media* del centro de México se

han presentado como diferentes a Oaxaca, *B. curtipendula* var. *caespitosa* y *B. purpurea*. Igualmente, el grupo de *B. purpurea* es significativamente diferente a *B. curtipendula* var. *caespitosa*.

Cuadro 5. Matriz de resultados del análisis PERMANOVA de caracteres reproductivos agrupados por clado.

	Oaxaca	<i>B. curtipendula</i> var. <i>caespitosa</i>	<i>B. media</i> del centro de México	<i>B. curtipendula</i> var. <i>tenuis</i>	<i>B. media</i> de Oaxaca	<i>B. purpurea</i>
Oaxaca		0.6302	0.0011	0.1871	0.0673	0.0002
<i>B. curtipendula</i> var. <i>caespitosa</i>	0.6302		0.001	0.4232	0.0837	0.0002
<i>B. media</i> del centro de México	0.0011	0.001		0.5581	0.1503	0.0031
<i>B. curtipendula</i> var. <i>tenuis</i>	0.1871	0.4232	0.5581		1	0.1691
<i>B. media</i> de Oaxaca	0.0673	0.0837	0.1503	1		0.1708
<i>B. purpurea</i>	0.0002	0.0002	0.0031	0.1691	0.1708	

8.2.2 Agrupación por tipo de lígula: membranosa, escamosa y ciliada.

- Caracteres Vegetativos.

Se necesitaron solamente de tres componentes de para expresar el 97.11 % (C1= 78.85, C2= 12.67, C3=5.58) de variación en los datos, esto resultados han indicado que no existe una variación significativa en los datos. La longitud del tallo ha determinado la disposición del componente 1, mientras que el número de ramas lo fue para el componente dos. En la figura 15, se observa que las elipses se superpusieron entre ellas.

8.3 Conteo de cromosomas

Se cuantifico el contenido de cromosomas en las anteras de por lo menos una muestra en las localidades de colecta A, B, C, D, F, G, H, y I. Para las localidades E, y J, no se logró observar los cromosomas en ninguna de las muestras. Como resultado de las observaciones, se detectó que los ejemplares con relación a *B. curtipendula* presentan una gran diversidad del número cromosómico (Cuadro 8), se determinó la diploidía en ejemplares, (Oax21, Oax24, Nay39, Nay40; Figura 17. a, b, c, y d), y la poliploidía en las plantas con cromosomas >20 (Oax7, Oax8, Oax9, Oax10, Oax11, Oax12, Oax15, Oax17, Oax22, Oax23, Oax25, Oax26, Oax31, Oax32, Hgo35, Hgo36, y Hgo37; Figura 17. e, f, g, h, i, j, k, l, m, y n). En las localidades A, D y F, se cuantificó distinto número de cromosomas en cada individuo (Cuadro 8), lo que significa que coexisten plantas diploides y poliploides.

Las muestras poliploides Oax7, Oax8, Oax11, Oax12, Oax15, Oax17, y Oax32, se caracterizaron por la recurrencia de irregularidades en la meiosis; las anteras observadas presentaron diferentes surtidos cromosómicos en sus células, puesto que se cuantificaron 2, 8, 14, 26, 32, 36, 50, 92 y 112 cromosomas, de igual forma el tamaño de las células hipoploides con un número de cromosomas < 20 fue menor en comparación con las muestras hiperploides con número de cromosomas > 20 el diámetro de las células fue más extenso (Figuras 18, y 19), y en las muestras Oax15 y Oax31 se encontraron células sin cromosomas visibles. También se observaron otras irregularidades: las muestras Oax12 y Oax32 presentaron células con dos planos metafásicos (Figura 19. d, y g) mientras que en la muestra Oax7 se observó la interconexión de tres células por medio de canales (Figura 18. a). En la muestra Oax17 se observó la segregación desequilibrada de los cromosomas en anafase, de modo que los cromosomas se concentraron en mayor cantidad en un polo en comparación del otro con menor cantidad de cromosomas (Figura 19. e).

También se observaron las diferencias del emparejamiento de los cromosomas durante la meiosis en los diploides y poliploides: en las muestras poliploides se

encontraron cromosomas univalentes, bivalentes, trivalentes y tetravalentes; en las muestras diploides, se presentaron con mayor regularidad los cromosomas bivalentes, aunque en la muestra Oax21 también se observaron cromosomas trivalentes (Figuras 17, 18, y 19).

Cuadro 8. Número de cromosomas, determinación de ploidía, y diámetro del polen.

Localidad	Muestra	Núm. Cromosomas	Ploidía	Rango μm
A Carr. Internacional 190, Km 203; Zapotitlán Palmas, Oaxaca.	Oax7	2-112	Mixoploide	---
	Oax8	10-60	Mixoploide	88 – 114
	Oax9	60	Hexaploide	110 – 134
	Oax10	40	Tetraploide	---
	Oax11	8-62	Mixoploide	---
	Oax12	8-94	Mixoploide	---
B Carr. Internacional 190, Km 209; Huajuapán de León, Oaxaca	Oax15	8-50	Mixoploide	33 – 125
C Carr. Internacional 190, Km 3; Villa de Tamazulápam del Progreso, Oax.	Oax17	14-60	Mixoploide	---
D <i>B. purpurea</i> Carr. Internacional 190, Km 12 Tamazulápam del Progreso, Oaxaca	Oax21	40	Tetraiploide	---
	Oax22	36	Aneuploide	---
	Oax23	40	Tetraploide	48 - 105
	Oax24	26	Diploide	82 - 89
	Oax25	26	Aneuploide	---
	Oax26	26	Aneuploide	---
F Carr. Tehuacán – Huajuapán 125, Km 58, Santiago Chazumba, Oax.	Oax31	56	Aneuploide	18 - 77
	Oax32	10- 68	Mixoploide	26 – 66
G Carr. México M40D de Cuota, Km 143. Jagüey de Arriba, Hidalgo	Hgo35	40	Tetraploide	26 - 104
	Hgo36	40	Tetraploide	---
	Hgo37	40	Tetraploide	100 – 105
H Camino Amado Nervo. San Pedro Lagunillas, Nayarit.	Nay39	20	Diploide	59 - 66
I Carr. Guadalajara - Tepic, Km 119. Los Toriles, Nay. La curva Jalisco	Nay40	20	Diploide	80 - 98

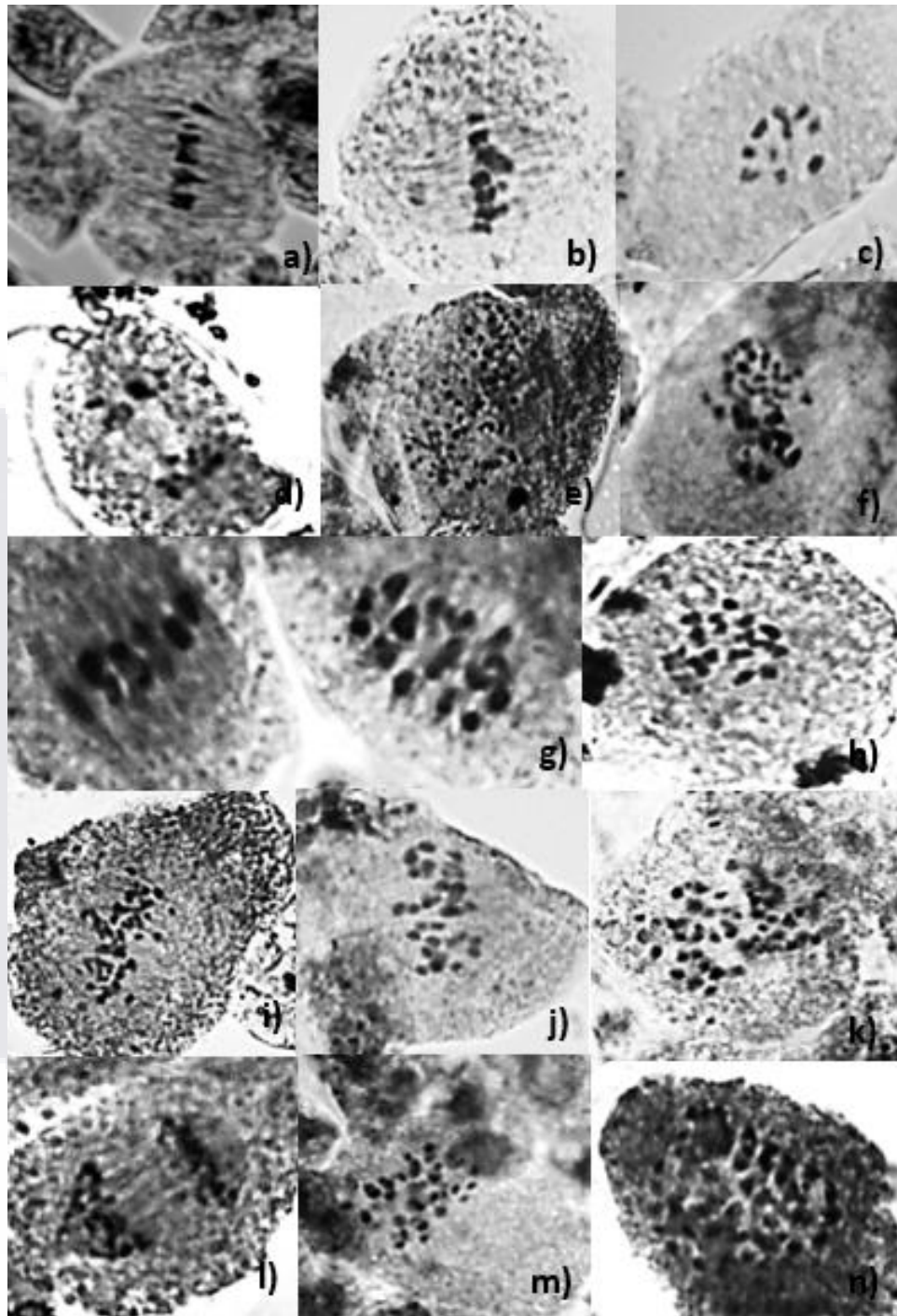


Figura 17. Cromosomas en microsporocitos de diferentes muestras de *Bouteloua media*, *B. purpurea* y *B. curtipendula*

Diploides ($2n = 20$): *B. purpurea* a) Oax21; b) Oax24; *B. media* c) Nay39; y d) Nay40. Poliploides: *B. curtipendula* e) Oax9 ($2n = 60$); f) Oax10 ($2n=40$); Oax31 ($2n=56$); l) Hgo35 ($2n=40$); m) Hgo36: ($2n=40$); n) Hgo37 ($2n=40$). *B. purpurea* g) Oax22 ($2n=26$); h) Oax23 ($2n=36$); i) Oax25 ($2n= 40$); j) Oax26 ($2n=26$); k)

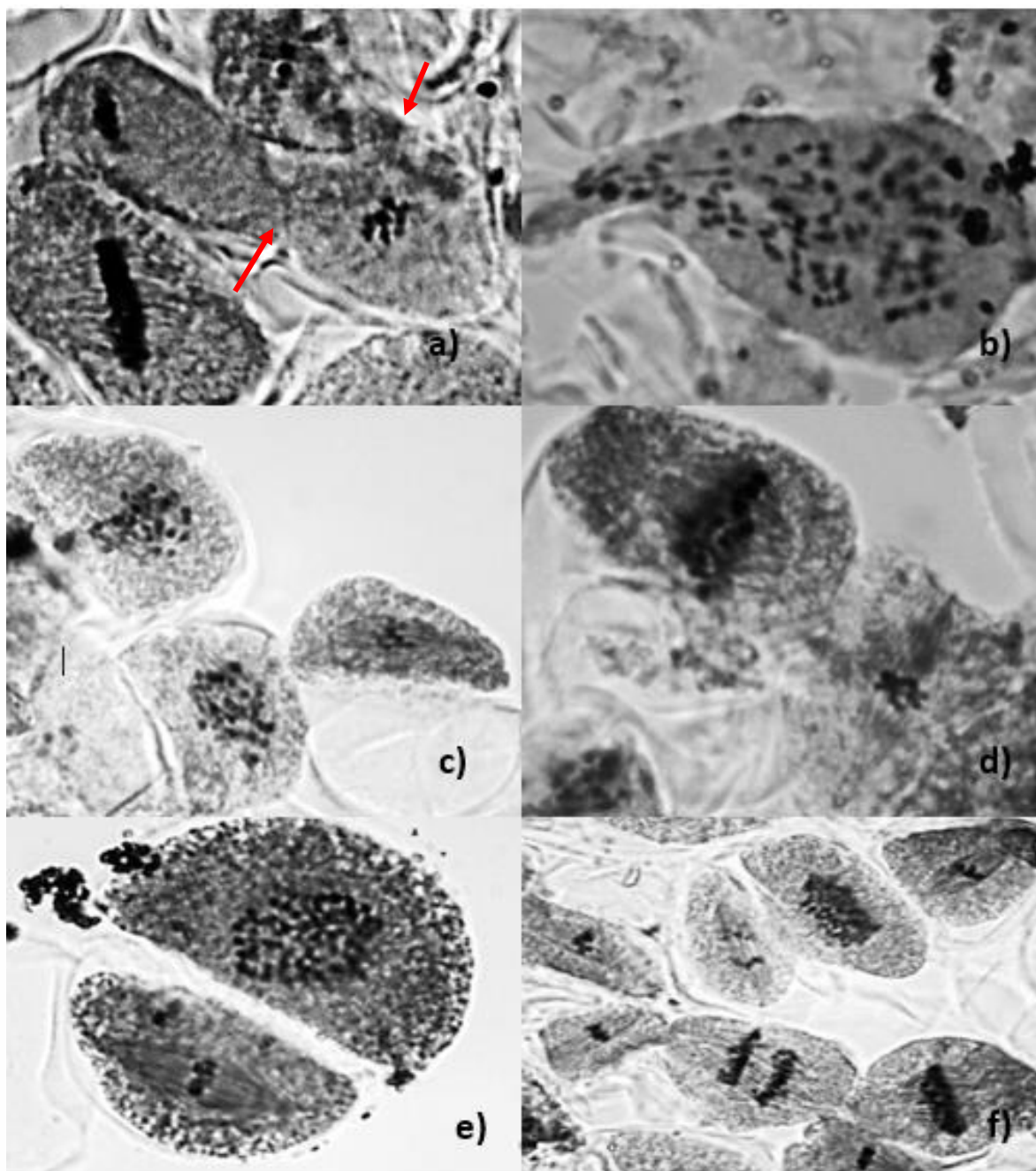


Figura 18. Células con anomalías en microsporogénesis. Oax7: a) interconexión de tres células, las flechas en rojo señalan lo que podría ser canales citomíticos y b) célula hiperploide, $2n=92$. Células con diferentes números cromosómicos: Oax8: c) $2n=36$, y d) $2n=10$; Oax11: e) $2n=12, 62$, f) $2n=10, 12, 22, 28$.

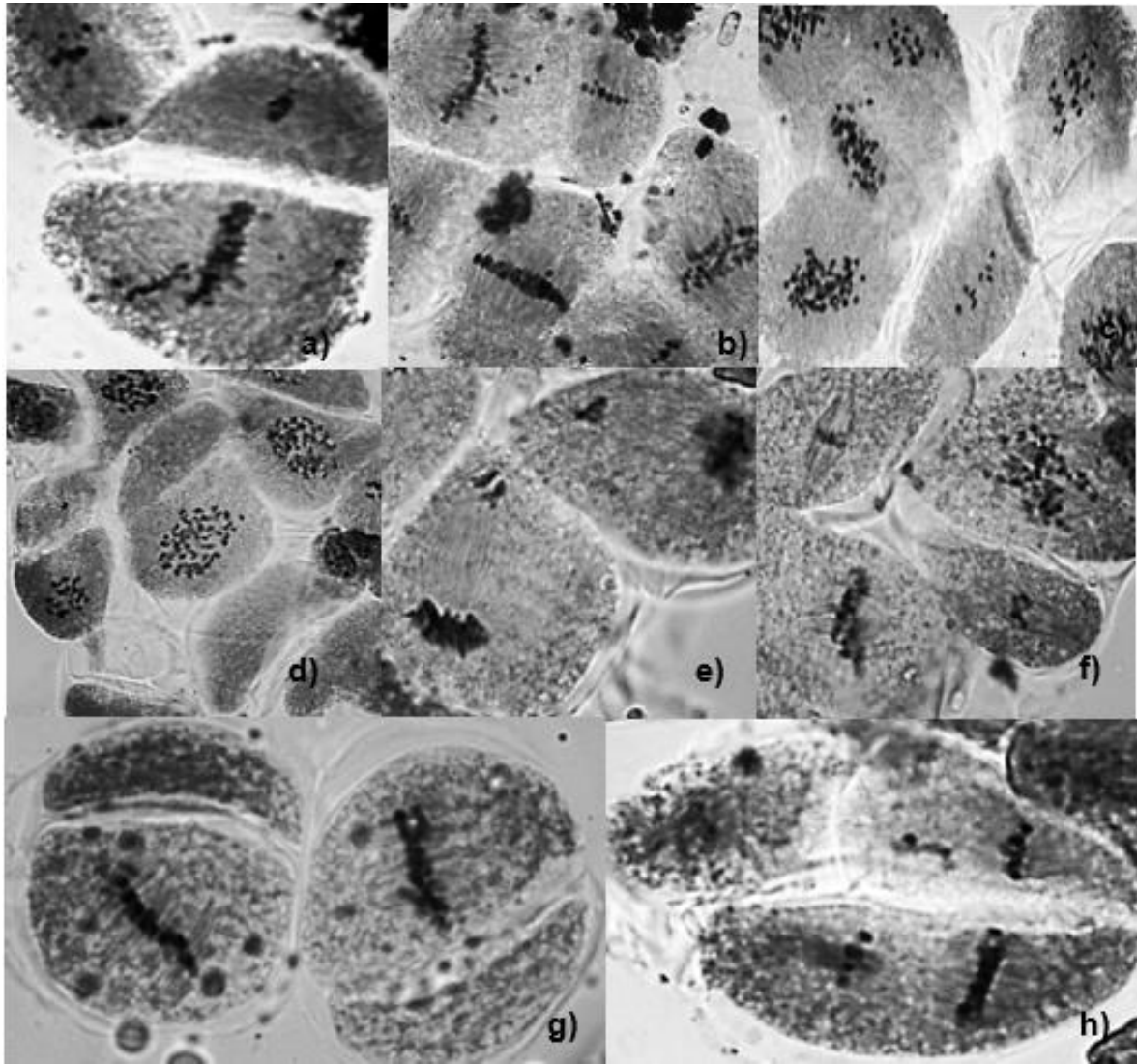


Figura 19. Células poliploides con anomalías meióticas y con surtidos cromosómicos desiguales. Oax12: a) célula con dos planos metafásicos b) Cuelulas hiperploides e hipoploides. Oax15: c) y d) células hiperploides e hipoploides ($2n= 16, 28, 52, 64, 72, \text{ y } 100$). Oax17: e) anafase desequilibrada y f) Diversos números cromosómicos en las células ($2n= 8, 10, 20, \text{ y } 40$). Oax32: g) Citocinesis precoz durante la metafase; h) Célula con dos planos metafásicos paralelos.

Se tomaron las mediciones del diámetro de polen, únicamente en las muestras Oax8, Oax9, Oax15, Oax23, Oax24, Oax31, Oax 32, Hgo35, Hgo37, Nay39, y Jal40; en el resto de las muestras no se obtuvo polen maduro. Para las muestras poliploides el diámetro del polen presento una variación de 18 – 134 μm ; y en los diploides fue de 59-98 μm . En especial, se detectó diferente tamaño de polen en las

muestras poliploides Oax8, Oax15, Oax23, Oax31, Oax32, y Hgo35 variando desde los 18 μm hasta los 125 μm (Cuadro 8). En las muestras poliploides se utilizó la media de las mediciones del polen y el número de cromosomas en el análisis de regresión lineal, y se obtuvo que el valor de $R^2= 0.0508$, mostrando que prácticamente no existe relación entre las variables (Figura 21). Se calculó en cada muestra la media, desviación estándar, y coeficiente de variación (Cuadro 9); las muestras Oax15, Oax31, Oax32, y Hgo35 se consideró la heterogeneidad del tamaño de polen de acuerdo con el coeficiente de variación mayor a 25%. En los poliploides los granos de polen se observaron constreñidos y aparentemente sin contenido en su interior (Figura 20).

Cuadro 9. Comparación en el diámetro del polen (μm) en cada muestra

Muestras	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Oax8	95.98	11.01	11.48%
Oax9	125.9	9.102	7.23%
Oax15	73.46	30.4	41.39%
Oax23	82.73	19.75	23.88%
Oax24	86.99	3.077	3.54%
Oax31	48.26	20.22	41.90%
Oax32	53.02	15.51	29.26%
Hgo35	83.07	23.96	28.84%
Hgo37	102.3	2.76	2.70%
Nay39	64.07	1.78	2.78%
Jal41	87.88	5.029	5.72%

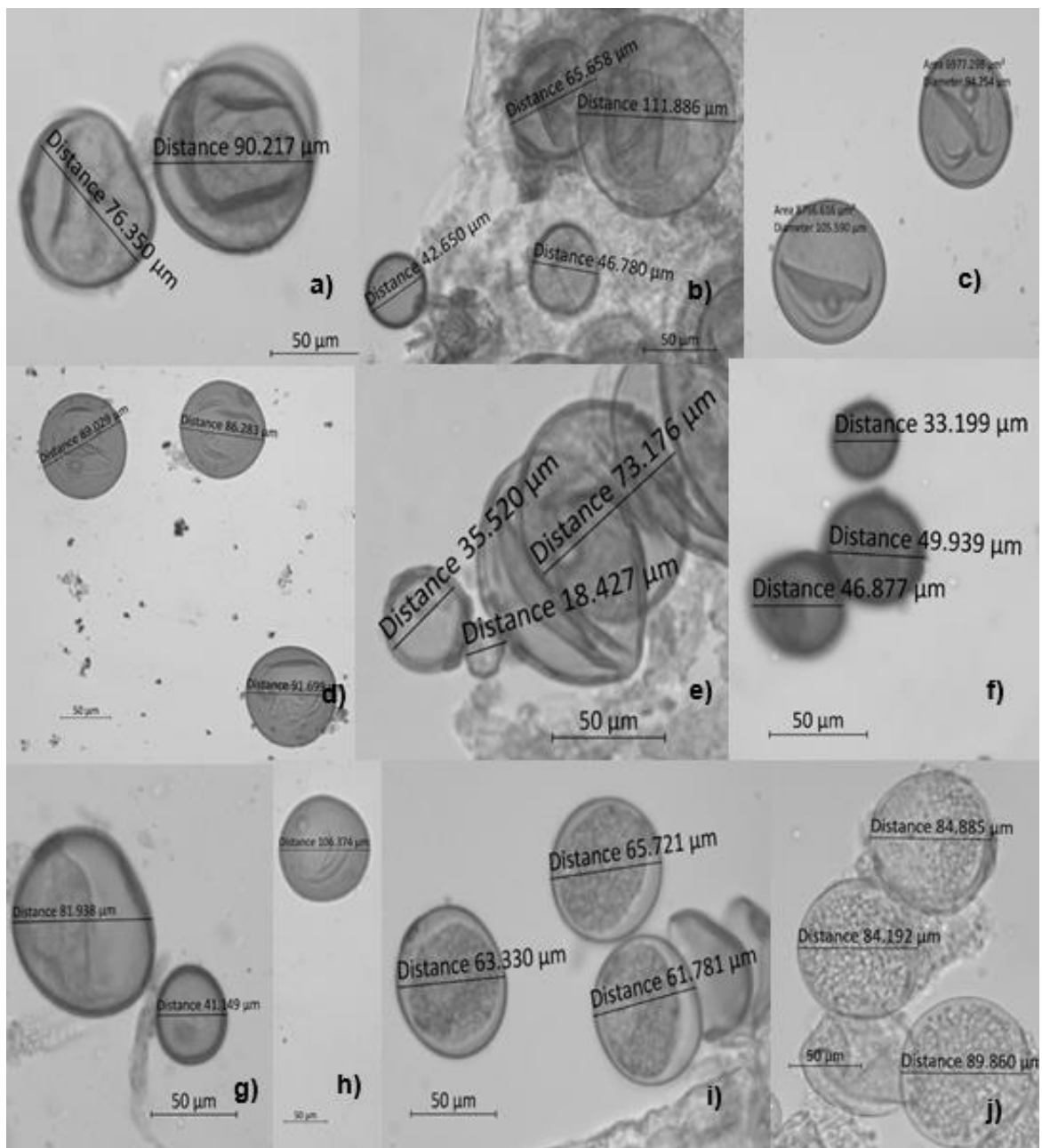


Figura 20. Proceso de medición del diámetro de los granos de polen de las muestras del CBC, a) Oax8; b) Oax15; c) Oax23; d) Oax24; e) Oax; f) Oax31; g) Oax15; h) Oax32; i) Oax33; j) Hgo35; k) Nay39 y; l) Jal41.

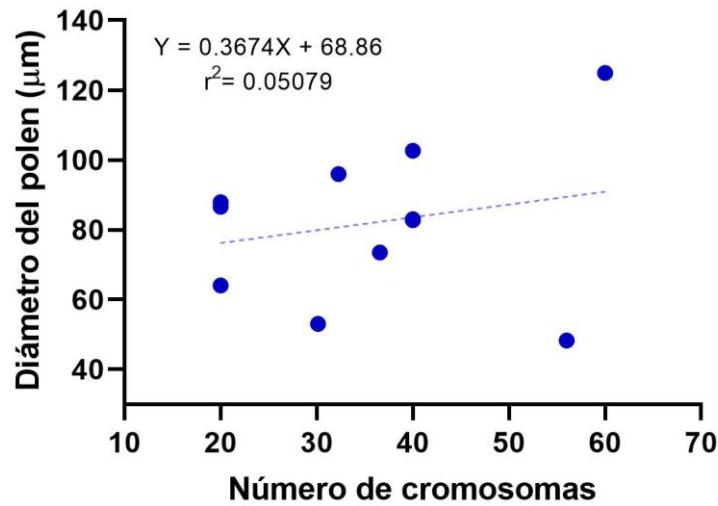


Figura 21. Relación entre el diámetro del polen y el número de cromosomas en *B. media*.

9. Discusión

Al momento de la colecta de los ejemplares, distinguir a *B. media* del centro de México, con *B. curtispindula* y sus variedades no ha sido fácil pues los caracteres indicados en las claves para su identificación (Herrera et al., 2004), son difíciles de observar a simple vista en campo. Además que su distribución es muy amplia (Herrera et al., 2004; Gould & Kapadia, 1964; Gould, 1979), por lo que es posible que se les encuentre compartiendo localidades del estado de Oaxaca.

Uno de los aspectos que se deben señalar en esta investigación son las dificultades para el análisis de las secuencias de la región ITS. De acuerdo con lo demostrado por Siqueiros-Delgado et al., (2013, 2017) la poliploidía de la especie *B. media* puede representar un reto para su estudio filogenético. Al analizar múltiples copias de genes que se traslapan entre ellas esto puede limitar su secuenciación (Wang et al., 2019; Zhang et al., 2019), por ejemplo en nuestras secuencias se observó la pérdida de información, puesto que las secuencias no presentaron la suficiente precisión y claridad para incluirlas en el estudio. No obstante, las muestras que exponen la poliploidía, y que se lograron analizar, se incluyeron en el clado B, esto

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

concuerta con lo mencionado por Siqueiros-Delgado et al., 2017. Para dicho clado se ha sugerido que los taxa que se han incluido en este son poliploides; por el contrario, los ejemplares de *B. media* de Jalisco, y Nayarit se han definido como diploides, pese que estas muestras forman parte del clado B en el cual predominan los taxa poliploides.

La región ITS del genoma de núcleo es comúnmente usado para reconstruir e inferir árboles filogenéticos del género *Bouteloua* y del *CBC*, en nuestra investigación esto se llevó a cabo por el método de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud. Las inferencias resultantes han demostrado la monofilía del complejo, y es formado por dos clados principales, estos resultados han concordado con lo descrito en investigaciones previas de varios autores (Columbus et al., 1998; Peterson et al., 2015; Siqueiros-Delgado et al., 2013, 2017). Es de importancia mencionar que no se demostró la monofilia de las secuencias de *B. media*, pues se han posicionado sus secuencias en los dos clados principales de las inferencias filogenéticas. Esto se observó de igual manera en las inferencias de Siqueiros-Delgado y colaboradores (2013, 2017); pues se ha determinado que es polifilética, y que se pueden encontrar tres grupos: en el clado A1 se ubica a *B. media* e de Oaxaca como el grupo hermano del resto de los taxa del complejo y más tempranamente divergente, y el clado A2 a *B. media* de Perú y Costa Rica, y en el clado derivado B2 se encuentra a *B. media* del centro de México.

Nuestras muestras se han posicionado solo en el clado B2, con base a las inferencias de ITS, solo tres muestras de los estados de Nayarit y Jalisco se lograron relacionar por ancestría a *B. media* del centro de México, mientras que algunas muestras de Oaxaca se han relacionado con *B. purpurea* formando un grupo monofilético. Por igual, se ha observado en nuestros resultados que *B. curtipendula* var. *caespitosa* se encontró en casi todos los clados del complejo, definido como un taxa polifilético, y se evidenció que algunas de nuestras secuencias de Oaxaca e Hidalgo (Oax16, Oax30, Oax32, Hgo35) se relacionan a algunas muestras de *B. curtipendula* var. *caespitosa*. Al mismo tiempo, se formó un grupo monofilético por muestras de Oaxaca (Oax8, Oax10, Oax13, Oax17, Oax27, Oax28), con este

marcador no se logró identificar a estas muestras, dado que no comparten un ancestro reciente que demuestre afinidades con los linajes de *B. media* de Oaxaca o del centro de México, o bien con los otros miembros del complejo. No obstante, este clado de Oaxaca es uno de los primeros en divergir en el subclado B2, por lo que se puede sugerir que el estado de Oaxaca es un estado importante para las relaciones evolutivas y diversificación del *CBc*, ya que los estudios de Siqueiros-Delgado et al., (2013, 2017) proponen que el linaje de *B. media* de Oaxaca es el más tempranamente divergente y ancestral de todo el complejo.

Por otra parte, la inferencia realizada con el marcador *trnT-L-F* de cloroplasto realizada con el método de máxima verosimilitud y la inferencia bayesiana demostró la monofilia del complejo. Sin embargo, la topología obtenida difiere de la obtenida con el marcador ITS, este resultado corresponde y es muy similar a lo indicado por Siqueiros-Delgado et al., (2013), debido a que en este estudio no se presentó el clado A bien resuelto, lo cual si ocurrió con ITS. En dicho clado, solo se ha incluido a *B. reflexa*, determinándose como el más tempranamente divergente en el *CBc*, sin reflejar los clados de *B. media*. Con base a la topología resultante de máxima verosimilitud, se observó que nueve secuencias de Oaxaca, Hidalgo, Nayarit (Oax8, Oax12, Oax14, Oax17, Oax31, Oax32, Hgo35, Hgo37, Nay39), y secuencias de *B. media*, *B. curtipendula* var. *caespitosa*, y *B. uniflora* var. *uniflora* comparten ancestría formando un grupo sin soporte en el clado B2; y, diverge un grupo, de muestras de Oaxaca (Oax21, Oax22, Oax7 y Oax28). Respecto a estas relaciones de nuestras muestras en el complejo, se puede sugerir que esta inferencia no demostró de forma confiable la divergencia y las relaciones de ancestro descendiente de nuestras muestras con los linajes de *B. media* y los otros taxa del complejo.

En referencia a los resultados de los análisis filogenéticos del marcador *trnT-L-F* según la inferencia bayesiana, ha presentado menos resolución de los clados y dificultades mayores en la topología. En el clado B se ha formado una politomía en la que se pudo observar que incluye secuencias de gran parte de los taxa, y entre estas secuencias se tienen a las nuestras muestras de *B. media*: Oax8, Oax17, Oax31, Oax32, Hgo35, Hgo37, y Nay39. Por último se obtuvo el grupo más derivado

del complejo formado por muestras de Oaxaca (Oax7, Oax21, Oax22, y Oax28). La politomia observada, representó un problema para nuestra inferencia, puesto que obstaculizó la reconstrucción del árbol filogenético, pues se sabe que los nodos no binarios no proporcionan la suficiente información para visualizar los eventos de divergencia y no produce un historial de evolución genética correcta (Lewis et al., 2005). Por lo anterior, se ha conseguido deducir que este marcador del cloroplasto no aportó la suficiente información para inferir como se ha desarrollado el complejo, ya que no se obtuvo la eficiente reconstrucción de los clados, y la mayoría de las secuencias del *Cbc* formaron parte del clado B. Igualmente, no se logró emparentar adecuadamente a alguna de nuestras secuencias con los linajes de *B. media*.

Los resultados obtenidos con la concatenación de los marcadores ITS y *trn-TRF* empleando ambos métodos de reconstrucción filogenética, nos aportaron datos más completos de como se ha desarrollado el complejo, es bien conocido que el empleo de más de dos marcadores proporciona mayor información por lo que es aconsejable para obtener una reconstrucción filogenética confiable (Forcina et al., 2021). Así que se identificaron de forma más precisa nuestras muestras, y se solucionaron las relaciones. En general, los resultados obtenidos en cuanto a la topología son similares a los indicados por el marcador ITS, al igual que Siqueiros et al., (2013, 2017). Esta combinación de marcadores demostró que la muestra Nay39 es hermana del *B. media* del centro de México, de igual forma la muestra Oax31 se ha incluido en el grupo de las variedades caespitosa y tenuis de *B. curtispindula*, y las muestras Oax21, Oax25 y Oax26 se incluyeron con el grupo de *B. purpurea*. A excepción de que, en la inferencia bayesiana, las muestras de Oaxaca e Hidalgo (Oax8, Oax17, e Hgo37) se involucraron en una politomia con secuencias *B. curtispindula* var. *caespitosa*, y *B. media* como se determinó con el marcador ITS. Igualmente, en la inferencia por máxima verosimilitud, se resolvieron débilmente las relaciones de estas muestras de Hidalgo y Oaxaca, pues se indicó que comparten un ancestro reciente con una secuencia de *B. curtispindula* var. *caespitosa* formando el grupo más tempranamente divergente en el clado B2.

Según las inferencias obtenidas en este estudio se puede sugerir que únicamente las muestras de Nayarit, y Jalisco tienen relación con el grupo de *B. media* del centro de México; por lo anterior se sugiere que las muestras colectadas en Oaxaca e Hidalgo están más cercanamente relacionadas con *B. curtispindula*. Las variedades de *B. curtispindula* tienen una amplia distribución en el árbol y al igual que *B. media* es también un grupo polifilético que tiene representantes en ambos clados A y B del *CBC* (Siqueiros-Delgado et al., 2013). Al momento de revisar estas muestras por medio de las claves para separar las especies (Herrera et al., 2004), morfológicamente contiene caracteres de ambas especies *B. media* y *B. curtispindula* especialmente caracteres diagnóstico como: el número de nudos, el número de ramas y espiguillas. Se conoce que estas dos especies son las más polimórficas del complejo, lo cual ha ocasionado equivocaciones y limitaciones en su identificación, debido a que se han clasificado basándose en la morfología, igualmente se ha sugerido que las similitudes morfológicas producto de la su adaptación son causadas por homoplasias (Palomeque, 2011; Siqueiros-Delgado, 2001; Siqueiros-Delgado et al., 2013)

Debido a que previamente se ha sugerido la semejanza morfológica entre especies del *CBC* (Gould & Kapadia, 1964; Gould, 1979; Siqueiros-Delgado et al., 2013), es evidente la necesidad de definir características que permitieran circunscribir los clados de *B. media* principalmente a los que se encuentran en México. Desafortunadamente, las similitudes entre las especies del complejo condicionaron a que en campo no se lograra diferenciar una especie de otra, por lo que se colectaron muestras que no resultaron tener relación con *B. media*. Como las muestras Oax21, Oax 25, y Oax26 que, de acuerdo con las inferencias, se identifican como afines a *B. purpurea*.

Según nuestros resultados previos obtenidos al realizar análisis de componentes principales, se descartaron aquellos caracteres poco influyentes, y solo se contemplaron aquellos caracteres más informativos que evidenciaron diferencias entre muestras, asimismo se incluyeron los utilizados para la identificación de las especies de *CBC* en especial para *B. media* como son: el número de nudos, la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

longitud de la segunda gluma, longitud de la arista central y aristas laterales (Herrera et. al, 2004). A pesar de que se evaluaron los caracteres más informativos, los resultados obtenidos del ACP sugieren que los caracteres morfológicos no son variables. Sin embargo, se obtuvo que los caracteres más influyentes coincidieron en las dos agrupaciones realizadas según el lugar de colecta y tipo de lígula, estos son: la longitud del tallo y, el número de ramas por inflorescencia para caracteres vegetativos y en los caracteres reproductivos el número de espiguillas en las ramas de la parte superior, media, y la parte más baja de la inflorescencia. Aunque las diferencias entre especies no se detectaron en campo, el análisis PERMANOVA demostró que, estadísticamente la morfología de las especies es diferente. Pues los caracteres vegetativos y reproductivos de *B. media* del Centro de México, son diferentes a los ejemplares de los clados Oaxaca, *B. purpurea* y *B. curtispindula* var. *caespitosa*. Por el contrario *B. media* de Oaxaca no presentó diferencias con el resto de las agrupaciones.

La lígula se encuentra en la unión de la lámina y la vaina, cuya función principal es la de mantener la vaina de la hoja cerrada protegiéndola de la entrada de agua, polvo y patógenos (Chaffey, 2000). Se ha propuesto que en las poblaciones *B. media* por Siqueiros- Delgado (sin publicar), se pueden presentar diferencias en la lígula, esta puede ser: membranosa, ciliada, y escamosa. Las diferencias en las lígulas se ha usado como carácter diagnóstico en investigaciones taxonómicas de gramíneas evaluando el tipo, la longitud o la ausencia de esta (Gonzalo et al., 2012; Nagahama et al., 2012; Newmaster et al., 2008; Shuaib et al., 2020). En los ejemplares agrupados con *B. media* del centro de México y el grupo emparentado a *B. purpurea*, se observó que la lígula es membranosa. Mientras que los ejemplares que se agruparon en *B. curtispindula* var. *caespitosa* y en *B. media* de Oaxaca se presentó la lígula ciliada; y en los ejemplares de la agrupación del clado de Oaxaca se observaron los tipos escamosa y ciliada. El tipo de lígula en cada grupo, corresponde a las descripciones de cada especie a las que se ha relacionado (Herrera et al., 2004; Gould & Kapadia, 1964; Gould, 1979). Por su parte, el tipo de lígula, reveló que los caracteres vegetativos y reproductivos, de las muestras de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

lígula membranosa son diferentes a las de lígula ciliada y escamosa. Aunque se observó que el linaje del centro de México y la muestra del linaje de Oaxaca de *B. media* presentó disparidades en el tipo de lígula, esta agrupación basada en tipo de lígula no puede brindarnos el suficiente apoyo estadístico esperado para comparar la morfología de los linajes de *B. media*, ya que se colectaron ejemplares de diferentes taxa, y se combinaron en cada agrupación.

Los caracteres que pueden ayudarnos a identificar a *B. media* del centro de México, propuestas por Siqueiros-Delgado et al. (2013), son los siguientes: un mayor número de espiguilla por rama, la presencia de inflorescencias laterales, rizomas o estolones. Dichas características, se observaron en los ejemplares colectados en Nayarit y Jalisco, que se relacionaron filogenéticamente a *B. media* del centro de México. A su vez, en los ejemplares del estado de Nayarit y Jalisco contaron con el mayor número de ramas en la inflorescencia, y lígula membranosa. De acuerdo las mediciones en el tallo, se puede sugerir que, la longitud del tallo en conjunto con las anteriormente mencionadas puede emplearse para definir a *B. media*, ya que se ha descrito como el taxa más robusto del CBc (Gould & Kapadia, 1964; Gould, 1979). Igualmente, la longitud del tallo ha sido de utilidad en el complejo *B. barbata*, y se ha tomado en cuenta para diferenciar individuos entre variedades como, *B. barbata* var. *rothrockii* la cual presenta tallos más largos que la variedad *barbata*, y de igual forma la longitud del tallo se ha aplicado para la circunscripción de *B. elata*, debido a que es una de las especies más altas del género *Bouteloua* (Gould, 1979; Pacheco et al., 2018).

Los resultados obtenidos sobre la ploidía de los ejemplares del complejo *Bouteloua curtispindula* colectados en México evidencian que ésta puede ser polimorfa. Se encontraron muestras diploides (Nay39 y Nay40) lo cual coincide con lo descrito por algunos autores para *B. media* (Gould & Kapadia, 1964; Gould, 1980). No se logró confirmar la poliploidía esperada para el linaje de *B. media* del centro de México, debido a que se propuso por la relación cercana que existe con los taxa poliploides del CBc, y la presencia de 5 copias de la región ITS en un ejemplar muestreado en Nayarit (Siqueiros-Delgado et al., 2013, 2017). Sin embargo, la mayoría de las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

muestras resultaron poliploides (Oax7, Oax8, Oax10, Oax11, Oax12, Oax15, Oax17, Oax21, Oax22, Oax23, Oax24, Oax25, Oax26 Oax31, Hgo35, Hgo36, y Hgo37). De igual modo como se encontró en los ejemplares colectados, otros taxa del complejo han exhibido diferentes niveles de ploidía: *B. curtispindula*, *B. uniflora*, (Morales et al., 2007; Siqueiros-Delgado et al., 2017) y *B. warnockii* (Gould, & Kapadia, 1964). La poliploidía es muy frecuente en las plantas (Kolář, et al., 2017; Wang et al., 2019). Siqueiros-Delgado et al., (2017) ha sugerido, que en los taxa del *CBc* se origina por la autoploidía mediante la duplicación del genoma y por la alopoliploidía derivada de la hibridación, y para *B. media* es posible la alopoliploidía por ser un taxa parafilético constituido por distintos linajes.

En las localidades A, D, y F del estado de Oaxaca, se presentaron ejemplares diploides y poliploides exhibiendo gran variedad en el número de cromosomas; es por ello que se sugiere que estas poblaciones tienen ploidía mixta, como se ha reportado para otras especies de plantas (Čertner et al., 2017; Gross & Schiestl, 2015; Kolář et al., 2017; McAllister et al., 2015). Esta variedad de citotipos encontrados, sugiere la posibilidad de que estas poblaciones estén en estado transitorio e inestable hasta que un citotipo logre establecerse sobre los otros. Es posible que la poliploidía se establezca debido a que gran parte de las muestras tiene un número de cromosomas mayor a 20 , este tipo de evento se ha registrado en un estudio de poblaciones mixtas de la asterácea *Tripleurospermum inodorum*, en el cual la ploidía de un citotipo dominante logró establecerse (Čertner et al., 2017). En otra investigación de la orquídea *Gymnadenia conopsea* se documentó la coexistencia de diploides y tetraploides los cuales presentaron diferencias fenotípicas entre ellos; y en algunas poblaciones los tetraploides se establecieron desplazando a los diploides (Gross & Schiestl, 2015). Una posible explicación a la diversidad de citotipos son las perturbaciones antropogénicas, estas crean una variación en el ambiente favoreciendo el establecimiento de neopoliploides (Kim et al., 2012); y que en una sola población coexistan de diferentes citotipos (Kolář et al., 2017). Se sugiere que los poliploides de estas poblaciones de *B. media* se han originado de ancestros diploides, pues se conoce que la diploidia es un carácter

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

plesiomorfo del *CBC* (Siqueiros-Delgado et al., 2017), al igual esto se ha mencionado en la aparición de neopoliploides en las poblaciones de plantas (Gross & Schiestl, 2015; Husband, 2004). Esta diversidad de ploidía en las poblaciones ha dado como resultado ventajas adaptativas en la gramínea *Andropogon gerardii*, por permitir que los poliploides 9x se distribuyan en ambientes mayormente secos (McAllister et al., 2015); además la poliploidización ha influido en modificaciones fenotípicas en algunas especies de plantas; por esta razón se considera como una forma de especiación que favorece la evolución y ecología en plantas (Gross & Schiestl, 2015; Van de Peer et al., 2017). Por lo expuesto anteriormente; la diversidad de ploidía en las poblaciones podrían ser ventajosa para dominar nuevos ambientes, y del mismo modo podría contribuir a la divergencia y especiación de los linajes de *B. media*, y los taxa del *CBC*

En referencia a los diversos niveles de ploidía que se pueden encontrar en una sola localidad; también se detectó en siete muestras poliploides, desigualdad en el surtido cromosómico de sus microesporocitos (Figura 7 y 8), por lo que se definieron como mixoploides, pues no se logró determinar el nivel de ploidía exacto. También se observaron otras irregularidades meióticas que no se habían observado anteriormente en el género *Bouteloua*. Aunque éstas son similares a las descritas en otras gramíneas; por ejemplo *Brachiaria*, el comportamiento anormal de la meiosis en poliploides es común (Calisto et al., 2008; Felismino et al., 2012; C. Risso-Pascotto et al., 2003; Risso-Pascotto & 2006; Szadkowski et al., 2010), en trigo y en maíz se han observado irregularidades durante la división celular como: las alteraciones en la disposición de los microtúbulos, citocinesis defectuosas, fragmentación cromosómica, y fallas en la segregación de los cromosomas; la meiosis puede ser afectada por factores abióticos por ejemplo: bajas temperaturas, estrés hídrico, y pH bajo en el suelo (Barton et al., 2014; Burbano Erazo & Caetano, 2019; Silkova et al., 2011; Simanovsky & Bogdanov, 2018). En gran medida los desórdenes meióticos se involucran en la formación de poliploides naturales; los gametos no reducidos en angiospermas se originan a partir de la duplicación premeiótica, la pérdida de las divisiones meióticas, o defectos en la orientación del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

uso o en la citocinesis; en conjunto, el estrés ambiental favorece la producción de gametos no reducidos, por ejemplo: las fluctuaciones en la temperaturas, estrés hídrico, nutrición, y enfermedades (Mason & Pires, 2015).

En relación a cuáles son las causas de las aberraciones observadas en las muestras *B. media*, se puede sugerir que la discrepancia en el número cromosómico es resultado de la citomixis en la células vegetales por medio de la transferencia de su núcleo o parte de este a otras células mediante canales citomíticos (Malallah & Attia, 2003) o defectos en la formación de paredes intercelulares (Kravets, 2013). Como se reporta en los resultados, en la muestra Oax7 se encontraron canales de interconexión entre tres células (Figura 18. a), éstos pueden ser los canales citomíticos, semejantes a los observados en *Brachiaria humidicola*, en donde dichos canales modificaron la cantidad de cromosomas en las células (Boldrini et al., 2006; Risso-Pascotto et al., 2006). La citomixis ocurre con frecuencia en las células madre de las microsporas (Sidorchuk et al., 2016) durante la microsporogénesis (Mursalimov & Deineko, 2018) y puede modificar el cariotipo y producir polen no reducido que contiene en su totalidad los cromosomas somáticos (Mursalimov et al., 2015). Otra característica de consideración asociada a la citomixis fue el tamaño de las células y su relación con el contenido de cromosomas (Figuras 18 y 19), observando que a más cantidad de cromosomas mayor tamaño, en relación a las que presentaron menor cantidad de cromosomas; estas variaciones en tamaño es distintivo de citomixis en las monocotiledóneas, pues se modifica el tamaño de la célula receptora convirtiéndose en hiperploide, y la célula donadora pierde cromosomas transformándose en hipoploide, esto se deriva de la migración unidireccional de núcleo y citoplasma durante la meiosis (Barton et al., 2014).

En las muestras revisadas, se asume que son poliploides por mixoploidía y se sospecha de citomixis. Lo anterior debido a que el incremento en la tasa de citomixis se ha asociado al aumento en el número de cromosomas y a genomas desequilibrados (Sidorchuk et al., 2016) por ejemplo: el genoma de individuos aneuploides que perdieron parte de sus cromosomas, y el genoma de poliploides híbridos y apomíticos (Kravets, 2013). Las implicaciones que tiene la citomixis en

las plantas son muy amplias, se ha considerado como un evento espontáneo y usual (Kravets et al., 2016), o como una irregularidad que se relaciona al estrés ambiental (Barton et al., 2014) acarreado distintos daños o beneficios, tales como: aumento de la diversidad genética (Singhal et al., 2019), eliminación del material defectuoso y dañino (Mursalimov & Deineko, 2018); o puede alterar la viabilidad del polen (Kravets, 2013), y producir polen no reducido (Mursalimov, 2019).

Generalmente la citomixis no es un evento aislado durante la meiosis; dado que se acompaña de otras irregularidades (Mursalimov & Deineko, 2018; Singhal et al., 2019; Singhal et al., 2010) esto se debe a que ocurre el transporte de factores que regulan la segregación cromosómica y el ciclo celular (Kravets, 2013), además se ha descrito que en los auto y alopoliploides las irregularidades son más notorias durante la profase y metafase (Grandont et al., 2013). Por lo tanto, las singularidades en la microsporogénesis de los ejemplares revisados, también podrían estar influenciadas por otros fenómenos que podrían explicar la mixoploidía en las muestras.

El número desigual y ausencia de cromosomas (Figuras 18, y 19), observados en células de Oax15 y Oax32, pueden ser explicados por la citocinesis precoz que como en los poliploides de *Brachiaria humidicola*. Esta alteración, ocurre en la metafase I alterando el tamaño de los microsporocitos y la cantidad de cromosomas al dividirse, si es de forma perpendicular se separan los cromosomas en números iguales o desiguales; y cuando la citocinesis es paralela a la metafase se obtienen dos células hijas una con todos los cromosomas y la otra sin cromosomas (Calisto et al., 2008). Entonces se puede inferir que en la muestra Oax32 ocurrió la citocinesis precoz paralela a la metafase dejando a una de las células resultantes sin cromosomas (Figura 19 d, g).

En las Oax7, Oax9, Oax10, Oax11, y Oax12 (Figura 18), se encontraron células en las que se observó que el emparejamiento de los cromosomas durante la metafase fue extenso ocupando casi en su totalidad el diámetro de la célula. En el mismo estudio de *Brachiaria humidicola* anteriormente mencionado se detectó que la

desinapsis afectaba la citocinesis celular; dicho evento se caracterizó por presentar un plano metafásico amplio con numerosos cromosomas, y ocurre el emparejamiento en la profase, y se agrupan incorrectamente en las siguientes etapas de la meiosis (Bhat & Wani, 2017; Calisto et al., 2008);

También fue notoria la segregación no balanceada de los cromosomas en anafase de la muestra Oax17, destacando la aglomeración de los cromosomas en mayor cantidad en un polo, en comparación con el otro (Figura 19 e); este comportamiento se ha reportado en híbridos de trigo, en la primera división de la meiosis, y la segunda división se da normalmente formando diadas (Silkova et al., 2011). De igual forma en los tetraploides de la gramínea *Lolium multiflorum* se observó la segregación desigual durante las distintas fases de la meiosis (Rocha et al., 2018). Asimismo, en las muestras poliploides Oax12 y Oax32 (Figura 19 a, h) sobresalió la presencia de células con dos planos metafásicos, con variación de tamaño y contenido de cromosomas entre planos, igualmente este comportamiento ocurrió en el estudio mencionado de *Lolium multiflorum*, presentando desigualdades del número de cromosomas o planos paralelos con números similares en los dos planos metafásicos; en esta especie se sugirió la fusión celular por el uso de colchicina al sintetizar artificialmente poliploides. Pese a que, en nuestros resultados son similares, no es totalmente semejante debido a que la poliploidización de estas muestras ocurrió de forma natural, sin embargo esto se ha visto en la citomixis debido a que la cromatina recibida puede integrarse al material original de la célula, o mantenerse como un núcleo independiente obteniendo así dos núcleos visibles hasta metafase I (Mursalimov & Deineko, 2018).

En las observaciones realizadas, se considerarán el emparejamiento de los cromosomas en diploides y poliploides las muestras diploides usualmente se agruparon en divalentes, se considera óptimo. Pero en los poliploides se presentaron cromosomas univalentes, bivalentes, trivalentes y tetravalentes, los emparejamientos distintos a los bivalentes: como univalentes y multivalentes son característicos de los poliploides (Krycki et al., 2016). Los emparejamientos tetravalentes en tetraploides de *Cynodon*, (Chloridoideae), favoreció la segregación

irregular de cromosomas y la producción de gametos con números de cromosomas imbalanceados (Silva et al., 2018), y los cromosomas en estado univalente desencadenan la esterilidad de la planta (Silkova et al., 2011). Asimismo, los emparejamientos univalentes, y multivalentes denotan la probable alopoliploidía segmentaria; esto significa que se originaron de especies cercanamente relacionadas con genomas parcialmente diferenciados (Sattler, et al., 2016). Los emparejamientos cromosómicos nos pueden indicar alteraciones en la reproducción y revelar la causa de la poliploidía en las muestras de *B. media*.

Las particularidades detectadas en la meiosis de los ejemplares revisados como la mixoploidía, la citomixis, las variaciones en el emparejamiento cromosómico, defectos en la citocinesis y segregación irregular de los cromosomas son reportadas por primera vez para el género *Bouteloua*. Los estudios citogenéticos y de microsporogénesis existentes para gramíneas se han enfocado principalmente a especies de interés económico; esto con el fin de mejorar el rendimiento, o bien para conocer cómo estas mutaciones participan en su reproducción (Morais et al., 2018). Los resultados obtenidos en esta investigación nos revelan la importancia de ampliar las investigaciones respecto a la reproducción y ploidización de *B. media*, *B. curtipendula*, el *CBc*, y el resto del género. Se sugiere que es un factor que podría afectar su adaptación, establecimiento, y distribución en México, puesto que estas alteraciones en la meiosis puede contribuir a formación de poliploides naturales, favoreciendo la diversidad del genotipo y la especiación, siendo esto ventajoso sobre las platas diploides (Mason & Pires, 2015; Rocha et al., 2018; Sattler et al., 2016; Singhal et al., 2019; Zielinski & Mittelsten Scheid, 2012) debido a que son más resistentes, y tienen mayor capacidad de sobrellevar el estrés ambiental debido a la altos niveles de heterocigosidad (Hardion et al., 2015). Por ello favorece la comprensión de los procesos que ocurren durante la diversificación de los taxa del *CBc*.

En esta investigación resultaba fundamental conocer el tamaño de polen por su relación con el nivel de ploidía en el género *Bouteloua*. Sin embargo, el análisis de regresión lineal no demostró que el tamaño del polen tenga relación con el nivel del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ploidía las muestras revisadas (Figura 21). El rango del diámetro de diploides es de 59 – 98 μm y, esto es contrario al diámetro de 60 μm descrito con un para *B. media*, solo se registro un valor aproximado a lo esperado en Nay (Gould & Kapadia, 1964; Gould, 1979; Siqueiros-Delgado et al., 2017). No obstante los diploides presentaron mayor uniformidad en el tamaño de polen, se debe principalmente a la estabilidad genética y la segregación balanceada de cromosomas (De Storme et al., 2013). Por otro lado, el tamaño del polen fue variable en las muestras poliploides, de acuerdo con el índice de variación solo se consideró como heterogéneas las muestras Oax15, Oax31, Oax32, y Hgo35. El diámetro de polen disparejo que se apreció en los poliploides, puede indicar que se produce de polen poliploide y polen haploide como se registró en tetraploides de sorgo (Tsvetova & Elkonin, 2002), además los poliploides tienen la capacidad de la reversión a la diploidía (Sankoff & Zheng, 2018), es por ello que se sugiere que los granos de menor tamaño pueden ser haploides.

Otro aspecto a considerar es que se observó con frecuencia que los granos de polen en los poliploides estaban constreñidos, esto puede ser un indicio de inviabilidad pues, se observó que los granos de polen inviables no tenían contenido en su interior en *Paspalum notatum* (Krycki et al., 2016), además se puede deducir que las diversas irregularidades en la meiosis presentadas se relacionan directamente a defectos como: las variaciones en tamaño, y la inviabilidad del polen (Aguilar-García et al., 2012; Khan et al., 2018; Kumar et al., 2010; Leofanti & Camadro, 2017; Singhal & Kumar, 2008; Singhal et al., 2019)

10. Conclusiones

- Morfológicamente *B. media* y *B. curtispindula* son muy similares, pero estadísticamente se demostró que si existen variaciones en los caracteres morfológicos.
- La altura mayor, lígula membranosa, la presencia de inflorescencias laterales y estolones son caracteres que pueden ser usados para identificar a *B. media* del centro de México.
- Los datos moleculares revelaron la identidad de las muestras colectadas. Solo se logró comprobar la relación de las muestras de Jalisco y Nayarit con *B. media* del centro de México; las localidades F de Oaxaca y la G de Hidalgo se han asociado a la variedad caespitosa de *B. curtispindula*.
- Se cuestiona la identidad exacta del clado de Oaxaca, debido a que en la inferencia del genoma del núcleo es independiente a los taxa ya determinados en el *CBC*, y sus relaciones en las inferencias del genoma del cloroplasto y la combinación de ambas, no presentaron buena resolución y soporte.
- Según las inferencias basadas en el genoma del núcleo y el cloroplasto no se corroboró la monofilia de *B. media* en los linajes mexicanos
- Se propone que las poblaciones de ploidía mixta, juegan un papel importante en la especiación del *CBC*.
- La ploidía de *B. media* del centro de México es independiente a la relación con los taxa poliploides del *CBC*, pues se confirma como diploide.
- La poliploidía es común en ejemplares de *B. media* de Oaxaca.
- Las irregularidades en la meiosis de la microporogénesis, pueden ser las causantes de la poliploidía
- No existe correlación del tamaño de polen con el nivel de ploidía, puesto que en poliploides el diámetro del polen no es uniforme.

11. Referencias

- Adhikari, S., Saha, S., Biswas, A., Rana, T. S., Bandyopadhyay, T. K., & Ghosh, P. (2017). Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *Nucleus (India)*, 60(3), 283–297. <https://doi.org/10.1007/s13237-017-0214-7>
- Aguilar-García, S., Figueroa-Castro, D., & Castañeda-Posadas, C. (2012). Pollen morphology of *Pachycereus weberi* (Cactaceae): an evaluation of variation in pollen size. *Plant Systematics & Evolution*, 298(10), 1845–1850. Retrieved from <http://10.0.3.239/s00606-012-0685-6>
- Álvarez, I., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 417–434. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2)
- Andreas, B., James, D., Peter, E., & Joachim, K. (2013). Systematics and Phylogeny. *Strasburger's Plant Sciences*. Retrieved from https://search.credoreference.com/content/entry/sprsp/systematics_and_phylogeny/0
- Antonio, J., Cardenas, G., Mesa, C., Francisco, V., & Agugliaro, M. (2018). Trends in plant research using molecular markers. *Planta*, 247(3), 543–557. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2829-y>
- Arrieta, Y., Peterson, P., & Lemus, M. (2004). *Revisión de Bouteloua Lag. (Poaceae)*.
- Atri, B., & Lichtarge, O. (2018). *Computational Approaches to Studying Molecular Phylogenetics BT - Bioinformatics: Sequences, Structures, Phylogeny* (A. Shanker, Ed.). https://doi.org/10.1007/978-981-13-1562-6_9
- Avendaño-González, M. Morales-Domínguez, J. F. & Siqueiros-Delgado, M. E. (2019). Genetic structure, phylogeography, and migration routes of *Bouteloua gracilis* (Kunth) Lag. ex Griffiths (Poaceae:Chloridoideae). *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 134, 50–60.

- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S., & Donoghue, M. J. (1995). The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(2), 247–277. <https://doi.org/10.2307/2399880>
- Barton, D. A., Cantrill, L. C., Law, A. M. K., Phillips, C. G., Sutton, B. G., & Overall, R. L. (2014). Chilling to zero degrees disrupts pollen formation but not meiotic microtubule arrays in *Triticum aestivum* L. *Plant, Cell & Environment*, 37(12), 2781–2794. <https://doi.org/10.1111/pce.12358>
- Bhat, T. A., & Wani, A. A. (2017). Chromosome structure and aberrations. *Chromosome Structure and Aberrations*, 1–367. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3673-3>
- Boldrini, K. R., Pagliarini, M. S., & do Valle, C. B. (2006). Cell fusion and cytotoxicity during microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *South African Journal of Botany*, 72(3), 478–481. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2005.11.004>
- Burbano Erazo, E., & Caetano, C. M. (2019). Maize plants grown on low pH soil incur plural meiotic abnormalities during microsporogenesis. *Nucleus (India)*, 62(1), 51–55. <https://doi.org/10.1007/s13237-018-0247-6>
- Calisto, V., Fuzinato, V. A., Message, H. J., Mendes-Bonato, A. B., Boldrini, K. R., Pagliarini, M. S., & Do Valle, C. B. (2008). Desynapsis and precocious cytokinesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae) compromise meiotic division. *Journal of Genetics*, 87(1), 27–31. <https://doi.org/10.1007/s12041-008-0004-8>
- Čertner, M., Fenclova, E., Kúr, P., Kolář, F., Koutecký, P., Krahulcová, A., & Suda, J. (2017). Evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations in an annual herb: Dispersal, local persistence and recurrent origins of polyploids. *Annals of Botany*, 120(2), 303–315. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx032>
- Chaffey, N. (2000). Physiological anatomy and function of the membranous grass ligule. *New Phytologist*, 146(1), 5–21. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00618.x>

- Columbus, J. T., Cerros-Tlatilpa, R., Kinney, M. S., Siqueiros-Delgado, M. E., Bell, H. L., Griffith, M. P., & Refulio-Rodriguez, 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(1), 565–579.
- Columbus, T., Kinney, M., Pant, R., & Siqueros Delgado, M. (1998). Cladistic Parsimony Analysis of Internal Transcribed Spacer Region (nrDNA) Sequences of *Bouteloua* and Relatives (Gramineae: Chloridoideae). *Aliso*, 17(2), 99–130. <https://doi.org/10.5642/aliso.19981702.03>
- Cooper, E. D. (2014). Overly simplistic substitution models obscure green plant phylogeny. *Trends in Plant Science*, 19(9), 576–582. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.006>
- Cuéllar Garrido, L. F. (2016). *Filogenia del complejo Bouteloua annua - Bouteloua Aristidoides basado en datos moleculares y micromorfología de hoja*. Retrieved from <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/123456789/910>
- Davis, C. C., Xi, Z., & Mathews, S. (2014). Plastid phylogenomics and green plant phylogeny: Almost full circle but not quite there. *BMC Biology*, 12, 2–5. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-11>
- De Storme, N., Zamariola, L., Mau, M., Sharbel, T. F., & Geelen, D. (2013). Volume-based pollen size analysis: An advanced method to assess somatic and gametophytic ploidy in flowering plants. *Plant Reproduction*, 26(2), 65–81. <https://doi.org/10.1007/s00497-012-0209-0>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*.
- Felismino, M. F., Pagliarini, M. S., Do Valle, C. B., & Resende, R. M. S. (2012). Meiotic stability in two valuable interspecific hybrids of *Brachiaria* (Poaceae). *Plant Breeding*, 131(3), 402–408. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01942.x>

- Forcina, G., Camacho-Sanchez, M., Tuh, F. Y. Y., Moreno, S., & Leonard, J. A. (2021). Markers for genetic change. *Heliyon*, 7(1), e05583.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05583>
- Gonzalo, R., Aedo, C., Nickrent, D. L., & García, M. A. (2012). A numerical taxonomic investigation of *Stipa* sect. *Smirnovia* and *S. Sect. Subsmirnovia* (Poaceae). *Systematic Botany*, 37(3), 655–670.
<https://doi.org/10.1600/036364412X648607>
- Gould, F., & Kapadia, Z. (1964). Biosystematic studies in the *Bouteloua curtipendula* complex II. *Taxonomy. Brittonia*, 16(2), 182–207.
- Gould, F W, & Kapadia, Z. J. (1964). Biosystematic studies in the *Bouteloua curtipendula* complex II. *Taxonomy. Brittonia*, 16(2), 182–207.
<https://doi.org/10.2307/2805095>
- Gould, Frank W. (1979). The Genus *Bouteloua*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 66(3), 348–416. <https://doi.org/10.3417/2007065>
- Grandont, L., Jenczewski, E., & Lloyd, A. (2013). *Meiosis and Its Deviations in Polyploid Plants*. Retrieved from
<http://dibpxy.uaa.mx/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsbas&AN=edsbas.38517967&lang=es&site=eds-live&scope=site>
- Gross, K., & Schiestl, F. P. (2015). Are tetraploids more successful? Floral signals, reproductive success and floral isolation in mixed-ploidy populations of a terrestrial orchid. *Annals of Botany*, 115(2), 263–273.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcu244>
- Guerra, P. J., Ramos, L. F. N., J. Tulio Arrendondo M., & Garcia, M. R. (1990). Evaluación De Especies Forrajeras Nativas E Introducidas Bajo Condiciones Del Altiplano Central Mexicano. *Técnica Pecuaria En México*, 28(1), 40–44.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*,

4(1), 1–9.

Hardion, L., Verlaque, R., Rosato, M., Rosselló, J. A., & Vila, B. (2015). Impact of polyploidy on fertility variation of Mediterranean *Arundo L.* (Poaceae).

Comptes Rendus - Biologies, 338(5), 298–306.

<https://doi.org/10.1016/j.crvi.2015.03.013>

Husband, B. C. (2004). The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4),

537–546. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00339.x>

Jobes, D. V., & Thien, L. B. (1997). *A Conserved Motif in the 5 . 8S Ribosomal RNA (rRNA) Gene is a Useful Diagnostic Marker for Plant Internal Transcribed*

Spacer (ITS) Sequences Conserved motif in the 5 . 8S ribosomal RNA. 326–334.

Keller, A., Schleicher, T., Schultz, J., Müller, T., Dandekar, T., & Wolf, M. (2009).

5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene*, Vol. 430, pp. 50–57. Retrieved from

<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=&AN=edselc.2-52.0-58049115079&site=eds-live>

Khan, N. A., Singhal, V. K., & Gupta, R. C. (2018). *A Case of Cytomixis , Cell fusion , Syncyte and Dimorphic pollen grains in Angelica glauca from the cold deserts of North-West Himalayas.* 63(2), 143–148.

<https://doi.org/10.6165/tai.2018.63.143>

Kim, S., Rayburn, A. L., Boe, A., & Lee, D. K. (2012). Neopolyploidy in *Spartina*

pectinata Link: 1. Morphological analysis of tetraploid and hexaploid plants in a mixed natural population. *Plant Systematics and Evolution*, 298(6), 1073–

1083. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0617-5>

Kolář, F., Čertner, M., Suda, J., Schönswetter, P., & Husband, B. C. (2017). Mixed-Ploidy Species: Progress and Opportunities in Polyploid Research. *Trends in*

Plant Science, 22(12), 1041–1055.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.011>

Kravets, E. A. (2013). Cytomixis and its role in the regulation of plant fertility.

Russian Journal of Developmental Biology, 44(3), 113–128.

<https://doi.org/10.1134/S1062360413030028>

Kravets, E. A., Sidorchuk, Y. V., Horyunova, I. I., Plohovskaya, S. H., Mursalimov, S. R., Deineko, E. V., ... Blume, Y. B. (2016). Intra- and intertissular cytomictic interactions in the microsporogenesis of mono- and dicotyledonous plants.

Cytology and Genetics, 50(5), 267–277.

<https://doi.org/10.3103/S0095452716050054>

Krycki, K. C., Simioni, C., & Agnol, M. D. (2016). *Cytoembryological evaluation , meiotic behavior and pollen viability of Paspalum notatum tetraploidized plants*. 282–288.

Kumar, P., Kaur, S., & Singhal, V. K. (2010). Aberrant Male Meiosis, Pollen Sterility and Variable Sized Pollen Grains in *Clematis montana* Buch.-Ham. ex DC.

from Dalhousie hills, Himachal Pradesh. *CYTOLOGIA*, 75(1), 31.

<https://doi.org/10.1508/cytologia.75.31>

Leofanti, G. A., & Camadro, E. L. (2017). Pollen viability and meiotic abnormalities in brome grasses (*Bromus* L., section *Ceratochloa*) from Argentina.

Turkish Journal of Botany, 41(2), 127–133. <https://doi.org/10.3906/bot-1607-46>

Lewis, P. O., Holder, M. T., & Holsinger, K. E. (2005). Polytomies and bayesian phylogenetic inference. *Systematic Biology*, 54(2), 241–253.

<https://doi.org/10.1080/10635150590924208>

Malallah, Ghanima Attia, T. A. (2003). Cytomixis and its possible evolutionary role in a Kuwaiti population of *Diplotaxis harra* (Brassicaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 143(2), 169–175. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.00218.x>

Mason, A. S., & Pires, J. C. (2015). Unreduced gametes: Meiotic mishap or

evolutionary mechanism? *Trends in Genetics*, 31(1), 5–10.

<https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.09.011>

McAllister, C., Blaine, R., Kron, P., Bennett, B., Garrett, H., Kidson, J., ... Miller, A. J. (2015). Environmental correlates of cytotype distribution in *Andropogon gerardii* (Poaceae). *American Journal of Botany*, 102(1), 92–102.
<https://doi.org/10.3732/ajb.1400296>

Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*.
<https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>

Morais, L. C., Souza Sobrinho, F., & Techio, V. H. (2018). Comparative microsporogenesis between diploid and tetraploid plants of *Brachiaria ruzizensis* and their progenies. *South African Journal of Botany*, 119, 258–264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.018>

Murillo Pérez, G. (2017). *Filogenia del complejo bouteloua repens (poaceae: chloridoideae) basada en datos moleculares*. Retrieved from <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/handle/123456789/1322>

Mursalimov, S., & Deineko, E. (2018). *Cytomixis in plants : facts and doubts*. 719–731.

Mursalimov, S. R. (2019). *Analysis of cytoskeleton in the cells involved in cytomixis : the migrated chromatin displays an MT-organizing activity and can interact with the spindle*.

Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Qasim, M., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., ... Ahmad, F. (2018). *DNA molecular markers in plant breeding : current status and recent advancements in genomic selection and genome editing*. 2818.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>

Nagahama, N., Anton, A. M., Hidalgo, M. I., & Norrmann, G. A. (2012). Naming

hybrids in the andropogon lateralis complex (Poaceae, Andropogoneae) after multivariate analyses. *Darwiniana*, 50(1), 114–123.

<https://doi.org/10.14522/darwiniana.2014.501.436>

Newmaster, S. G., Balasubramaniam, V., Murugesan, M., & Ragupathy, S. (2008).

Tripogon cope (Poaceae: Chloridoideae), a New Species Supported by Morphometric Analysis and a Synopsis of *Tripogon* in India.

Systematic Botany, 33(4), 695–701.

<https://doi.org/10.1600/036364408786500253>

Pacheco Jiménez, M., Siqueiros Delgado, M. E., Fisher, A., Cerros Tlatilpa, R., & Flores Ancira, E. (2018). *Filogenia del complejo Bouteloua barbata basada en datos moleculares. [recurso electrónico]*. Retrieved from

<https://dibpxy.uaa.mx/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat04898a&AN=ua.000208150&lang=es&site=eds-live&scope=site>

Palomeque Carlín, A. (2011). *Diversidad genética de las poblaciones de bouteloua curtispindula (Gramineae: chloridoideae)*. Retrieved from

<https://dibpxy.uaa.mx/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ir01218a&AN=riuua.123456789.869&lang=es&site=eds-live&scope=site>

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 & Evolution*, 53(4), 351–366. Retrieved from

<http://10.0.4.87/jse.12159>

Pohl, R. W., & Davidse, G. (1971). Chromosome numbers of Costa Rican grasses. *Brittonia*, 23(3), 293–324. <https://doi.org/10.2307/2805632>

Quero Carrillo, A. R., Miranda Jimenez, L., & Villanueva-Avalos, J. F. (2017).

Recursos genéticos de gramíneas para el pastoreo extensivo. Condición

actual y urgencia de su conservación ante el cambio climático. *Avances En Investigación Agropecuaria*, (3)(63).

- Raúl, C., Nieto, M., Raymundo, A., & Carrillo, Q. (2007). *Caracterización de la diversidad nativa del zacate banderita [Bouteloua curtipendula (Michx .) Torr .], mediante su nivel de ploidía Characterization of native diversity in sideoats grama [Bouteloua curtipendula (Michx .) torr .] by means of the ploid.* 45(3744), 263–278.
- Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M. S., Do Valle, C. B., & Mendes-Bonato, A. B. (2003). Chromosome number and microsporogenesis in a pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Plant Breeding*, 122(2), 136–140. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00825.x>
- Risso-Pascotto, Claudicéia, Pagliarini, M. S., & Valle, C. B. (2006). Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura*. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 5(February 2006), 837–845.
- Rocha, L. C., Lopes, L. S., Vitoriano, M. B. Z., Mittelman, A., & Techio, V. H. (2018). *Meiotic irregularities in diploid and tetraploid plants of Lolium.*
- S. Mursalinov, N. Permyakovza, E. Deineko, A. Houben, D. D. (2015). *Cytomixis doesn ' t induce obvious changes in chromatin modifications and programmed cell death in tobacco male meiocytes.* 6(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00846>
- Sankoff, D., & Zheng, C. (2018). *Chapter 10 for Evolutionary Analysis.* 1704.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243(2), 281–296. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2450-x>
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., ... Small, R. L. (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92(1),

142–166. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.1.142>

- Shaw, J., Shafer, H. L., Leonard, O. R., Kovach, M. J., Schorr, M., & Morris, A. B. (2014). Chloroplast DNA sequence utility for the lowest phylogenetic and phylogeographic inferences in angiosperms: The tortoise and the hare IV. *American Journal of Botany*, *101*(11), 1987–2004. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400398>
- Shuaib, M., Bahadur, S., & Hussain, F. (2020). Enumeration of genetic diversity of wild rice through phenotypic trait analysis. *Gene Reports*, *21*, 100797. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100797>
- Sidorchuk, Y. V., Novikovskaya, A. A., & Deineko, E. V. (2016). Cytomixis in the cereal (Gramineae) microsporogenesis. *Protoplasma*, *253*(2), 291–298. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0807-4>
- Silkova, O. G., Shchapova, A. I., & Shumny, V. K. (2011). Meiotic restitution in amphihaploids in the tribe Triticeae. *Russian Journal of Genetics*, *47*(4), 383–393. <https://doi.org/10.1134/S1022795411040120>
- Silva, D. M., Santos, Y. D., Benites, F. R. G., & Techio, V. H. (2018). Microsporogenesis, viability and morphology of pollen grain in accessions of *Cynodon L. C. Rich.* (Poaceae). *South African Journal of Botany*, *118*, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.026>
- Simanovsky, S. A., & Bogdanov, Y. F. (2018). Genetic Control of Meiosis in Plants. *Russian Journal of Genetics*, *54*(4), 389–402. <https://doi.org/10.1134/S1022795418030122>
- Simpson, M. G. (2010). *1 - Plant Systematics: An Overview* (M. G. B. T.-P. S. (Second E. Simpson, Ed.)). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374380-0.50001-4>
- Singhal, V K, & Kumar, P. (2008). Impact of cytomixis on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of Himalayan poppy (*Meconopsis aculeata*

- Royle). *Journal of Biosciences*, 33(3), 371–380. Retrieved from <http://10.0.3.239/s12038-008-0057-0>
- Singhal, V K, Kumar, R., & Kumar, P. (2019). *Mini Review A new perception about cytotoxicity: Causes, mechanisms and role*. 61–66.
- Singhal, Vijay Kumar, Kaur, S., & Kumar, P. (2010). *Aberrant Male Meiosis, Pollen Sterility and Variable*. 75(1), 31–36.
- Siqueiros-Delgado, M. E. (2001). *Phylogenetics of the Bouteloua curtipendula complex (Gramineae: Chloridoideae)*. Claremont: Claremont Graduate University. .
- Siqueiros-Delgado, Maria Elena, 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(2), 379–389. <https://doi.org/10.1600/036364413x666660>
- Siqueiros-Delgado, Maria Elena, Fisher, A. E., & Columbus, J. T. (2017). Polyploidy as a Factor in the Evolution of the *Bouteloua curtipendula* Complex (Poaceae: Chloridoideae) . *Systematic Botany*, 42(3), 432–448. <https://doi.org/10.1600/036364417x696159>
- Small, R. L., Lickey, E. B., Shaw, J., & Hauk, W. D. (2005). Amplification of noncoding chloroplast DNA for phylogenetic studies in lycophytes and monilophytes with a comparative example of relative phylogenetic utility from Ophioglossaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36(3), 509–522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.04.018>
- Soltis, E. D., & Soltis, P. S. (2000). Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant Molecular Biology*, 42(1), 45–75. <https://doi.org/10.1023/A:1006371803911>
- Szadkowski, E., Eber, F., Huteau, V., Lodé, M., Huneau, C., Belcram, H., ...

Chèvre, A.-M. (2010). The first meiosis of resynthesized *Brassica napus*, a genome blender. *New Phytologist*, 186(1), 102–112.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03182.x>

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., & Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, Vol. 17, pp. 1105–1109. Retrieved from

<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=&AN=71460300&site=eds-live>

Tsvetova, M. I., & Elkonin, L. A. (2002). *Instability of the Ploidy Level in Autotetraploid Sorghum Plants from a Line with Variable Male Fertility*. 38(5), 526–530.

Van de Peer, Y., Mizrachi, E., & Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics*, 18, 411. Retrieved from

<https://doi.org/10.1038/nrg.2017.26>

Villaseñor, J. L. (2016). Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559–902.

<https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>

Wang, J., Qin, J., Sun, P., Ma, X., Yu, J., Li, Y., ... Wang, J. (2019). Polyploidy Index and Its Implications for the Evolution of Polyploids. *Frontiers in Genetics*, 1. Retrieved from

<http://dibpxy.uaa.mx/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edb&AN=138550838&lang=es&site=eds-live&scope=site>

Wang, X.-C. (1), Liu, C. (1), Huang, L. (1), Chen, H. (1), Zhang, J.-H. (1), Cai, D. (1), ... Bengtsson-Palme, J. (2). (2015). ITS1: A DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 573–586.

<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12325>

Yeung, E. C. T., Stasolla, C., Sumner, M. J., & Huang, B. Q. (2015). Plant microtechniques and protocols. In *Plant Microtechniques and Protocols*.

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3>

Zhang, K., Wang, X., & Cheng, F. (2019). Plant Polyploidy: Origin, Evolution, and Its Influence on Crop Domestication. *Horticultural Plant Journal*, 5(6), 231–239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hpj.2019.11.003>

Zielinski, M.-L., & Mittelsten Scheid, O. (2012). *Meiosis in Polyploid Plants BT - Polyploidy and Genome Evolution* (P. S. Soltis & D. E. Soltis, Eds.). https://doi.org/10.1007/978-3-642-31442-1_3

Anexos

Anexo A. Matrices de secuencias para reconstrucción filogenética del *Cbc* tomadas de Siqueiros (Sin publicar).

Especie	Muestra	País-estado
<i>Bouteloua curtipendula</i> (Michx.) Torr. var. <i>curtipendula</i> .	Columbus 3207	U. S. A. Missouri
	Columbus 3209	U. S. A. Missouri
	Columbus 3234	U. S. A. Kansas
	Columbus 3226	U. S. A. Wyoming
	Columbus 3357	U. S. A. Oklahoma
	LD	U. S. A. Iowa
<i>B. curtipendula</i> (Michx.) Torr. var. <i>caespitosa</i> Gould and Kapadia.	Herrera 1307	MEXICO. Aguascalientes
	Herrera 1334 (HUAA)	MEXICO. Sonora
	Herrera 1343	MEXICO. Chihuahua
	Herrera 1345	MEXICO. Durango
	Columbus 2276	U.S.A. Arizona
	Columbus 2500	U.S.A. Arizona
	Columbus 3189	Argentina
	Columbus 3247	U.S.A. Arizona
	Columbus 3314	U.S.A. Texas
	3487	PERU
	Siqueiros 4451	MEXICO. Puebla
	Siqueiros 4472	MEXICO. Zacatecas
	Siqueiros 4490	MEXICO. Coahuila
Siqueiros 4530	MEXICO. Puebla	

<i>B. curtispindula</i> (Michx.) Torr. var. <i>tenuis</i> Gould and Kapadia.	2191	MEXICO. Coahuila
<i>B. distans</i> Swallen.	Siqueiros 4449	MEXICO. Oaxaca
	Siqueiros 4454	MEXICO. Puebla
	Siqueiros 2403c1_2	
<i>B. disticha</i> (Kunth) Benth.	Columbus 2376	MEXICO. Michoacán
	Columbus 3471	PERU. Cajamarca
	Siqueiros 4449	MEXICO. Oaxaca
	Siqueiros 4454	MEXICO. Puebla
	Siqueiros 4456	MEXICO. Jalisco
	Siqueiros 4534	COSTA RICA
	Siqueiros 4535	GALAPAGOS. Baltra
	Siqueiros 4537	GALAPAGOS. Santiago
	Siqueiros 4539	GALAPAGOS. New Seymour
<i>B. media</i> (E. Fourn.) Gould & Kapadia	Columbus 2420	MEXICO. Oaxaca
	Columbus 3468	PERU. Cajamarca
	Columbus 3500	PERU. Chachapayas
	Siqueiros 4416	MEXICO. Nayarit
	Siqueiros 4417	MEXICO. Jalisco
	Siqueiros 4436	MEXICO. Michoacan
	Siqueiros 4441	MEXICO. Michoacan
	Siqueiros 4457	MEXICO. Puebla
	Siqueiros 4464	MEXICO. México
	Siqueiros 4511	MEXICO. Puebla
	Siqueiros 4533	COSTA RICA. Guanacaste
	Siqueiros 4586 (HUAA)	MEXICO. Puebla
	Siqueiros 4587 (HUAA)	MEXICO. Oaxaca
	Siqueiros 4591 (HUAA)	MEXICO. Oaxaca
	Siqueiros 4591 (HUAA)	MEXICO. Oaxaca
	Siqueiros 4594 (HUAA)	MEXICO. Oaxaca
	Oax08	MEXICO. Oaxaca
	Oax10	MEXICO. Oaxaca
	Oax13	MEXICO. Oaxaca
	Oax16	MEXICO. Oaxaca
	Oax17	MEXICO. Oaxaca
	Oax19	MEXICO. Oaxaca
	Oax27	MEXICO. Oaxaca
Oax28	MEXICO. Oaxaca	
Oax30	MEXICO. Oaxaca	
Oax31	MEXICO. Oaxaca	
Oax32	MEXICO. Oaxaca	

	Oax34	MEXICO. Oaxaca
	Hgo35	MEXICO. Hidalgo
	Hgo37	MEXICO. Hidalgo
	Nay39	MEXICO. Nayarit
	Nay40	MEXICO. Nayarit
	Jal41	MEXICO. Jalisco
<i>B. pedicellata</i> Swallen	Columbus 2634	MEXICO. Puebla
<i>B. purpurea</i> Gould & Kapadia	2337	
	Siqueiros 4470	MEXICO. Guanajuato
	Siqueiros 4504	MEXICO. Queretaro
	Oax21	MEXICO. Oaxaca
	Oax25	MEXICO. Oaxaca
	Oax26	MEXICO. Oaxaca
<i>B. reflexa</i> Swallen	2436	
	Rebman 3510	MEXICO. San Diego Island
	Siqueiros 4394	MEXICO. Sonora
	Siqueiros 4401	MEXICO. Sinaloa
<i>B. triaena</i> (Trin.) Scribn.	Columbus 2338	MEXICO. Mexico
	Columbus 2357	MEXICO. Jalisco
<i>B. uniflora</i> Vasey var. <i>coahuilensis</i> Gould and Kapadia	Columbus 2190	MEXICO. Coahuila
<i>B. uniflora</i> Vasey var. <i>uniflora</i>	Columbus 2901	U. S. A. Texas
	Columbus 3319	U. S. A. Texas
	Siqueiros 4486	MEXICO. Coahuila
<i>B. vaneedenii</i> Pilg	Siqueiros 4685 (HUAA)	CUBA. Camaguey
<i>B. warnockii</i> Gould and Kapadia	Columbus 2907	U. S. A. Texas
	Columbus 3282	U. S. A. New Mexico
<i>B. chondrosioides</i> (Kunth) Benth. ex S. Watson	Columbus 2422	MEXICO. Oaxaca
<i>B. dactyloides</i> (Nutt.) Columbus, published in 1999	Columbus 2198	MEXICO. Nuevo Leon
<i>B. hirsuta</i> Lag	Columbus 2900	U. S. A. Texas
<i>B. johnstonii</i> Swallen	Columbus 2851	MEXICO. Coahuila
<i>B. juncea</i> (Desv. ex P. Beauv.) Hitc.	Axelrod 8856	PUERTO RICO. Guanica
<i>B. karwinskii</i> (E. Fourn.) Griffiths.	Columbus 2208	MEXICO. Zacatecas
<i>B. ramosa</i> Scribn. ex Vasey	Columbus 2287	MEXICO. Coahuila
<i>B. rigidiseta</i> (Steud.) Hitchc	Columbus 2231	U. S. A. Texas
<i>B. williamsii</i> Swallen.	Columbus 2353	MEXICO.

		Jalisco
--	--	---------

Anexo B

Protocolo de extracción de ADN (Doyle & Doyle, 1987)

1. En un tubo de 2 ml macerar alrededor de .02 g de material vegetal (hojas). Conservar el material a -20 grados si es necesario.
2. Preparar la mezcla de extracción, preparar dos mezclas extras por el error de pipeteo. La mezcla contiene 500 µl de 2X CTAB al (2%) y 2 µl de β-mercaptoetanol por muestra.
3. Cerrar los tubos, y poner en el vortex hasta que estén bien mezclados.
4. Una vez mezclados colocar las muestras a baño maría a 50°C durante 20-30 min e invertir el contenido cada 5 min.
5. Remover las muestras del agua y dejar enfriar ligeramente.
6. Añadir a cada muestra muestra 500 ml de cloroformo frío y agitar vigorosamente para mezclar.
7. Después agitar suavemente por 15 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar durante 10 min a 12500rpm.
9. Transferir el sobrenadante (400 µl si es posible) aun nuevo tubo de 1.5 ml con mucho cuidado de no tomar el material de la capa inferior. Descartar el sobre nadante.

Precipitado.

1. Agregar de 800 a 1000 µl de etanol al 95% frío o (400 µl de isopropanol frío), invierte el tubo suavemente para mezclar y deje precipitar 1 hora a -20 C y de 2 a 3 semanas para material de herbario.
2. Centrifugar por 10 min a 12500 rpm para obtener la pastilla de ADN. Desechar el sobre nadante.
3. Para limpiar la pastilla se agrega 500 µl de etanol al 80%, se mezcla suavemente por 10 min.

4. Centrifugar a 12500 rpm para obtener la pastilla nuevamente y se descarta el sobrenadante.
5. Dejar secar la pastilla por 20 a 30 min a 65° C.
6. Resuspender el ADN en 100 µl de buffer TE, dejar calentar a 37 °C con el tubo cerrado y después mezclar suavemente.

Anexo C.

Temperatura de extensión para la amplificación de *trnT-L-F*.

Temperatura	Muestra
60 °C	Oax8, Oax17, Oax18, Oax19, Oax25, Oax26, Oax27, Oax28, Oax30, Oax31, Oax32, Hgo35, Hgo37, Nay39, Nay40, Nay 41
61 °C	Oax7, Oax9, Oax10, Oax11, Oax12, Oax13, Oax14, Oax15, Oax16, Oax20, Oax21, Oax22, Oax23, Oax33, Oax34.

Anexo D.

Protocolo para purificación (High Pure PCR Product Purification Kit).

1. Ajustar el producto de PCR a 100 µl añadiendo agua destilada estéril. Añadir 500 µl de buffer de unión y mezclar.
2. Insertar tubo con filtro y tapa, a un tubo colector. Transferir la muestra mezclada al tubo con filtro, centrifugar por 30-60 s a velocidad máxima.
3. Desconectar el tubo y desechar la solución, volver a conectar.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
4. Añadir 500 μ l de buffer de lavado. Centrifugar durante un minuto a velocidad máxima.
 5. Descartar la solución. Reconectar el tubo. Añadir 200 μ l de buffer de lavado, y centrifugar por 1 min a velocidad máxima.
 6. Desechar la solución y el tubo colector. Conectar el tubo de filtro a un tubo nuevo de 1.5 ml.
 7. Añadir 50-100 μ l de buffer de elución, y centrifugar 1 min a velocidad máxima.
 8. Desechar el tubo con filtro, y conservar el tubo de 1.5 ml el cual contiene el ADN purificado.
 9. Para comprobar pureza y concentración, se usó una alícuota del sobrenadante. Almacenar de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 