

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *LEPTOCHLOA DUBIA* (POACEAE) EN CHIHUAHUA, MÉXICOMORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *LEPTOCHLOA DUBIA* (POACEAE) IN CHIHUAHUA, MEXICO

Carlos R. Morales-Nieto¹, Otilia Rivero-Hernández², Alicia Melgoza-Castillo², Pedro Jurado-Guerra¹ y Martín Martínez-Salvador¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Km 33.3 Carretera Chihuahua-Ojinaga. ²Facultad de Zootecnia y Ecología, UACH, Km 1 Perif. Francisco R. Aldama CP 3103 Chihuahua Chih. Correo electrónico: amelgoza@uach.mx

RESUMEN

El gigante [*Leptochloa dubia* (Kunth) Nees.] es una importante gramínea forrajera nativa de México, cuyas poblaciones naturales se han reducido debido a malas prácticas de pastoreo. En este trabajo se analizó la variabilidad morfológica y genética de 32 poblaciones del gigante en el estado de Chihuahua, México. Nueve características morfológicas fueron evaluadas en estas poblaciones, después de dos años de trasplantadas y establecidos en un jardín de observación y bajo condiciones de temporal. La variabilidad genética se determinó utilizando los perfiles de amplificación de cuatro pares de iniciadores u oligonucleótidos. El análisis de componentes principales mostró que los tres primeros componentes explicaron el 75.3% de la variación morfológica. Los cuatro pares de iniciadores produjeron un total de 186 bandas, de las cuales el 56.45% presentó polimorfismo. La combinación de iniciadores EcoRI-AAC+MseI-CAG detectó el mayor porcentaje de polimorfismo (69.57%) y 32 bandas polimórficas. El coeficiente de Dice y análisis de agrupamiento generaron cinco grupos. La variabilidad

genética y morfológica encontrada en las diferentes poblaciones, podrían servir de base para la selección de ecotipos de gigante para diversos propósitos como producción de semilla, retención de suelo, restauración de ecosistemas y forraje para libre pastoreo o de corte, entre otros. Así también, los resultados de este trabajo son la base para iniciar programas de mejoramiento genético en esta especie.

Palabras clave: *Leptochloa dubia*, marcadores moleculares, variación morfológica.

ABSTRACT

Green sprangletop [*Leptochloa dubia* (Kunth) Nees.] is a native grass with forage value in Mexico; however, due to wrong grazing practices its populations have been decreased. In this study the morphologic and molecular variability of 32 green sprangletop populations from Chihuahua State, Mexico were evaluated. Nine morphological characteristics were measured on those populations, two years later after transplanted in a common garden under natural conditions. Genetic variability was evaluated using am-

plified fragment of four combination primers or oligonucleotides. Principal component analysis showed that the first tree explained 75.3% of the whole morphological diversity. A total of 186 bands were amplified accounted, 56.45% were polymorphic. The combination EcoRI-AAC+MseI-CAG detected the highest polymorphism (69.57%) and 32 polymorphic bands. Cluster analysis, using Dice coefficient, distinguished five groups. The morphological and genetic variability detected on green sprangletop are basic in a selection of ecotypes with diverse purposes such as seed production, soil stabilization, ecosystem restoration, and forage among others. Also, those results are the foundation in order to start genetic programs on this important forage plant.

Key words: *Leptochloa dubia*, molecular markers, morphological diversity.

INTRODUCCIÓN

El gigante [*Leptochloa dubia* (Kunth) Nees.] es una planta nativa de México, recurso importante para el ganado y con amplia distribución en el estado de Chihuahua (Melgoza *et al.*, 2008). El valor forrajero de esta especie ha sido reportado por diversos autores (Valdéz *et al.*, 1975; Lebgue, 2002; Melgoza *et al.*, 2008). Chávez y González (2008) reportaron que esa especie contiene hasta un 14% de proteína cruda y presenta 55% de digestibilidad. Entre otros factores, y debido al valor forrajero, el sobrepastoreo ha provocado la reducción de sus poblaciones naturales (Holecheck *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 2000). La pérdida de poblaciones reduce la biodiversidad, desde el nivel genético hasta el nivel de paisaje (Gauthier *et al.*, 2003). Para el caso de especies de importancia económica, la reducción en la variabilidad

genética reviste mayor relevancia debido a que están asociadas a cadenas productivas (Báez *et al.*, 1999); además, tiene un impacto en la funcionalidad del ecosistema (Pellant *et al.*, 2005).

La amplia distribución de *Leptochloa dubia* en zonas de matorrales xerófitos, valles centrales de pastizales y en la zona boscosa, refleja una adaptación a diversos ambientes que puede dar lugar a diferentes ecotipos. A simple vista los ecotipos tienen diferencias morfológicas, por lo que es importante realizar evaluaciones *ex situ*, donde todos se establecen en un ambiente uniforme para detectar características de importancia dentro de la especie, ligadas a la información genética (Erickson *et al.*, 2004; Morales, 2006).

La caracterización morfológica y fisiológica en gramíneas como *Festuca pratensis* reveló una correlación significativa entre la variabilidad de características morfológicas y la localidad de los sitios muestreados (Peter-Schmid *et al.*, 2008). Sin embargo, en el mismo trabajo, no se detectó una correlación significativa entre la variabilidad de características morfológicas y la localidad de los sitios muestreados para *Lolium multiflorum*. Dados esos resultados contradictorios, resulta importante no sólo evaluar la variabilidad morfológica, sino también la variabilidad genética de especies de gramíneas de importancia económica para proponer acciones, dentro de proyectos de conservación, que lleven a mantener la mayor diversidad.

La variabilidad morfológica dentro de una especie es el resultado de adaptaciones a las condiciones ambientales donde crece cada población (Valladares *et al.*, 2007). Ésta puede ser evaluada utilizando colecciones

ex situ, en donde todas las poblaciones son colocadas bajo las mismas condiciones naturales (Morales *et al.*, 2009). Por otro lado, el uso de marcadores moleculares para la evaluación de recursos genéticos, es una herramienta útil, ya que se puede estudiar y detectar la variabilidad genética (Fjellheim y Rognli, 2005; Jungmann *et al.*, 2010) para elaborar programas de mejoramiento y desarrollo de líneas comerciales de especies nativas para la rehabilitación de ecosistemas. Marcadores moleculares como el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) han sido empleados con éxito en gramíneas (Puecher *et al.*, 2001; Renganayaki *et al.*, 2001) para conocer su variabilidad genética (Meudt y Clarke, 2006). El objetivo del presente trabajo fue determinar la variabilidad morfológica y molecular de 32 poblaciones de gigante del estado de Chihuahua, México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Trabajo de campo

En el año 2006 se recolectaron ejemplares de 32 poblaciones de gigante en 24 municipios del estado de Chihuahua, México (fig. 1). En el cuadro 1 se indican los municipios y algunas características ambientales de los sitios de recolecta. En cada uno se extrajeron cuatro plantas con un diámetro de 2.5 cm y provistas de raíz. De acuerdo a la metodología de Morales (2009), la parte aérea de cada planta se cortó a una altura de 15 a 20 cm y cada una fue identificada con un número de colecta; cada población se consideró como un ecotipo diferente.

Las plantas fueron colocadas en cajas con suelo húmedo para su transporte y establecimiento en el Campo Experimental La

Campana (INIFAP-Chihuahua). El sitio donde se trasplantó el material es de topografía plana, con suelo de origen aluvial, textura franco arenosa y pH de 6.5. El clima es seco templado con veranos cálidos BWk, temperatura media anual de 15 a 18°C y precipitación promedio de 355 mm anuales (Royo y Lafón, 2008). Al momento del trasplante se aplicó un riego de auxilio para asegurar su establecimiento. Posteriormente, las plantas se dejaron bajo condiciones de temporal. Debido al manejo en el traslado, al momento del trasplante u otras condiciones adversas en el establecimiento, no en todas las poblaciones sobrevivieron los cuatro individuos, por lo que los muestreos se realizaron sólo en un individuo de cada población recolectada.

Caracterización morfológica

Dos años después del establecimiento y durante la etapa fenológica de floración, en el mes de agosto se realizó la caracterización. Las variables morfológicas evaluadas en cada ecotipo fueron: altura total de la planta (AP), altura del follaje (AF), densidad de tallos (DT), grosor de tallos (GT), ancho de la hoja (AH), largo de la hoja (LH), longitud de la inflorescencia (LI), diámetro del macollo (DM) y producción de materia seca (MS). La AP se midió desde el nivel del suelo hasta la punta de la inflorescencia más alta. La AF se midió desde el suelo hasta la altura de las hojas. El GT se midió tomando un tallo al azar de la parte central de la planta. Para medir LH y AH se tomó una hoja al azar de la parte central de la planta. La LI se midió tomando una inflorescencia al azar y midiendo de la base hasta la punta de la misma. El DM se midió en la base, a nivel del suelo. Durante la época del crecimiento del segundo año de establecidas las plantas,



Fig. 1. Ubicación de los sitios de recolecta de 32 poblaciones de gigante [*Leptochloa dubia* (Kunth) Nees.] en Chihuahua, México.

Cuadro 1. Características ambientales de los municipios donde se recolectaron 32 poblaciones de pasto gigante [*Leptochloa dubia* (Kunth) Nees.] en Chihuahua, México.

ECOTIPO	PRECI	TEMP	ALTITUD	MUNICIPIO	ECOTIPO	PRECI	TEMP	ALTITUD	MUNICIPIO
2	415	18.0	1679	CHIHUAHUA	329	346	16.4	1545	N. CASAS GRANDES
12	498	16.7	1547	B. DOMÍNGUEZ	343	319	16.2	1543	BUENAVENTURA
28	462	18.3	1484	SATEVO	362	319	16.2	1522	BUENAVENTURA
45	452	18.9	1733	V. ZARAGOZA	376	319	16.2	1651	BUENAVENTURA
66	471	16.0	1752	PARRAL	402	415	18.0	1553	CHIHUAHUA
80	454	17.3	1665	V. ALLENDE	410	415	18.0	1584	CHIHUAHUA
92	471	16.0	1811	PARRAL	429	415	18.0	1350	CHIHUAHUA
133	478	14.2	2114	CUAUHTÉMOC	462	290	19.1	1567	ROSALES
149	420	13.7	1892	BACHINIVA	488	415	18.0	1602	CHIHUAHUA
173	478	14.2	1873	SANTA ISABEL	503	415	18.0	1555	CHIHUAHUA
198	415	18.0	1617	CHIHUAHUA	526	306	18.4	1309	ALDAMA
207	415	18.0	1589	CHIHUAHUA	560	346	19.4	1180	CAMARGO
226	415	18.0	1422	CHIHUAHUA	610	265	21.9	1282	OJINAGA
285	372	16	1384	JANOS	632	415	18.0	1327	CHIHUAHUA
294	372	16	1399	JANOS	639	415	18.0	1761	CHIHUAHUA
312	346	16.4	1594	CASAS GRANDES	669	415	18.0	1653	CHIHUAHUA

POB = población; PRECI = precipitación; TEMP = temperatura

se realizaron cortes individuales de plantas para determinar materia seca (MS). Los cortes se realizaron cada 35 días durante la época de crecimiento. Este material fue depositado en bolsas de papel y secado en una estufa de aire forzado a 70°C por 48 horas.

Caracterización molecular

La caracterización molecular se realizó siguiendo el método de Doyle y Doyle (1990), para extracción de ADN y el protocolo de Vos *et al.* (1995) para el análisis de AFLP. Los marcadores de AFLP utilizados fueron del tipo quimioluminiscentes (Hoisington *et al.*, 1998). Con base en el polimorfismo expresado se utilizaron cuatro pares de combinación de iniciadores EcoRI y MseI (cuadro 4). Para la digestión se añadió 1.5 µL de solución amortiguadora de reacción (RL) 10X, 2 µL de DNA molde (50 ng/µL), 0.5 µL de enzima Eco RI (10 U/µL), 0.5 µL de enzima Mse I (10 U/µL) y de agua deionizada estéril para complementar un volumen de reacción de 12.5 µL. La mezcla se centrifugó e incubó a 37°C durante dos h y después por 15 min a 70°C para inactivar las enzimas de restricción. La digestión se corroboró en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. A la reacción de digestión se añadió 0.3 µL de adaptador Eco RI (50 pmol), 0.3 µL de adaptador Mse I (50 pmol), 1.2 µL de ATP (10 mM, pH 7.0), 1.0 µL de solución amortiguadora de reacción (RL) 10X, 1.0 µL de T4 DNA ligasa (5U/µL) y 6.2 µL de agua desionizada estéril, se mezcló, centrifugó e incubó por dos h a 16°C. Para la preamplificación se añadió 2.5 µL de DNA digerido, ligado y diluido (1:10), 1.15 µL de Oligo Eco RI + A (50 ng/µL), 1.15 µL de OligoMse I + A (50 ng/µL), 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 2.5 µL de solución amortiguadora de reacción de la enzima Taq

DNA polimerasa, para PCR (10X), 0.65 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.2 µL de enzima Taq DNA polimerasa (5U/µL) y 16.85 µL de agua deionizada estéril. Se mezcló, centrifugó y se puso en un termociclador con el siguiente programa de amplificación: 20 ciclos a 94°C por 30 s, un min a 56°C y un min a 72°C y mantenimiento final a 4°C. En seguida se añadieron 2.0 µL de DNA preamplificado y diluido (1:40), 4.9 µL de agua deionizada estéril, 1.1 µL de solución amortiguadora de reacción de la enzima Taq DNA polimerasa, para PCR (10X), 0.3 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.5 µL de enzima Taq DNA polimerasa (5 U/µL), 1.0 µL de OligoMse I + 4 bases selectivas (30 ng/µL), 0.2 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL de Oligo Eco RI + 3 bases selectivas marcado a 700 nm, 0.5 µL de Oligo Eco RI + 3 bases selectivas marcado a 800 nm. Se programó el termociclador con un ciclo a 94°C por 30 s, 30 s a 65°C, y un min a 72°C; 12 ciclos en donde subsecuentemente, se disminuye la temperatura de hibridación (65°C) 0.7°C por ciclo, mientras las otras temperaturas se mantienen igual; seguido de 23 ciclos a 94°C por 30 s, 30 s a 56°C, y un min a 72°C; al final, se mantuvo la reacción a 4°C. La electroforesis se realizó en gel de acrilamida al 6.5%, con urea 8 M y TBE 1X (Tris 1 M, ácido bórico 1 M, EDTA 20 mM, pH 7.0). La separación de los fragmentos amplificados se hizo en el analizador de DNA LI-COR, cargando 0.8 µL de muestra en un pozo y utilizando el marcador de peso molecular de 50 a 700 pb.

Análisis de datos

Los datos morfológicos se sometieron a un análisis de componentes principales y conglomerados, con el método de Ward (SAS, 1999). Para el análisis de agrupamiento se

utilizó el programa MINITAB v15. Con el patrón de bandedo de los marcadores moleculares se realizó una matriz binaria de presencia y ausencia de bandas y se analizó con el paquete estadístico NTSYSpc (v 2.1). La similitud genética entre los ecotipos se estimó con el coeficiente de Dice, utilizando el programa SimQualen NTSYS y como método de agrupamiento, se utilizó el de Medias Aritméticas por Grupo No Ponderadas (UPGMA). Considerando que no en todas las especies se ha detectado correlación entre variables morfológicas y ambientales (Vahabi *et al.*, 2008; Jungmann *et al.*, 2010) y la falta de información específica de los sitios de recolecta de clima y suelo, no se correlacionaron estas variables.

RESULTADOS

Diversidad morfológica

La altura total de los ecotipos analizados varió de 56 hasta 143 cm y el follaje de 32 hasta 65 cm. La densidad y el grosor de los tallos variaron dentro de los intervalos de 9 a 68 cm y de 0.2 a 0.5 cm, respectivamente. El ancho de hoja varió de 0.4 a 0.9 cm y la longitud de 11 a 34 cm. La longitud de la inflorescencia alcanzó valores de 10.5 a 28.5 cm. El diámetro del macollo fluctuó de 7 a 21 cm. Los valores de materia seca cayeron en un intervalo muy amplio, de 6 a 174 g. El análisis de componentes principales mostró que los tres primeros componentes explican el 75.3% de la variación (cuadro 2). Al correlacionar materia seca con las otras variables morfológicas (cuadro 3), se presentaron correlaciones positivas y significativas con la altura de follaje ($r=0.58$; $P\leq 0.0005$), altura de la planta ($r=0.58$; $P\leq 0.0005$) y la densidad de los tallos ($r=0.55$; $P\leq 0.0009$).

El rango de las variables morfológicas evaluadas se muestra en la figura 2. Las variables que más contribuyeron fueron el diámetro de los tallos, el diámetro del macollo, producción de materia seca, altura del follaje, longitud de la inflorescencia y la altura total de la planta.

El análisis de conglomerados jerárquicos está formado por cinco grupos basados en el método de ligamiento Ward (fig. 3). El grupo rojo se integra por 12 ecotipos con valores intermedios de materia seca. Los grupos verde y naranja comprenden 11 ecotipos con bajos valores de producción de materia seca. Los grupos rosa y azul agrupan un total de nueve ecotipos con los más altos valores de materia seca y sólo diferencias entre ellos debido a altura de planta.

Caracterización molecular

Los cuatro pares de iniciadores del análisis de AFLP generaron un total de 186 bandas; de ellas, el 56.45% (105 bandas) presenta polimorfismo (cuadro 4). El número de bandas polimórficas fue de 23, 31, 19 y 32 para las combinaciones de iniciadores EcoRI-AAG+MseI-CTG, EcoRI-ACT+MseI-CTG, EcoRI-AGG+MseI-CAG y EcoRI-AAC+MseI-CAG, respectivamente. Los fragmentos monomórficos para estas mismas combinaciones fueron de 26 para EcoRI-AAG+MseI-CTG, 17 para EcoRI-ACT+MseI-CTG, 24 para EcoRI-AGG+MseI-CAG y 14 para EcoRI-AAC+MseI-CAG. El mayor porcentaje de polimorfismo (69.57%) y de bandas polimórficas (32) se obtuvo con la combinación de iniciadores EcoRI-AAC+MseI-CAG.

Los valores de similitud obtenidos al utilizar el coeficiente de Dice en las comparaciones

Cuadro 2. Vectores característicos de las variables de mayor valor descriptivo, respecto a su componente principal en 32 poblaciones de gigante [*Leptochloa dubia* (Kunth) Nees.] en Chihuahua, México

Variable	Vector característico		
	CP1	CP2	CP3
altura de follaje (cm)	0.453	-0.082	0.231
altura total de planta (cm)	0.414	0.127	-0.475
densidad de tallos	0.215	-0.519	0.126
grosor de tallo (mm)	0.249	0.441	0.269
ancho de hoja(mm)	0.022	0.434	0.498
largo de hoja (cm)	0.209	0.227	0.289
longitud de inflorescencia (cm)	0.451	0.180	-0.262
diámetro de macollo (cm)	0.133	-0.452	0.478
materia seca (g/planta) ∞	0.497	-0.185	-0.040
valor característico	3.01	2.31	1.45
proporción de la varianza (%)	33.5	25.7	16.1
proporción de la varianza acumulada (%)	33.5	59.2	75.3

∞ Rendimiento de materia seca (g/planta/35 días).

Cuadro 3. Correlación de variables con componentes principales en 32 poblaciones de gigante [*Leptochloa dubia* (Kunth) Nees.] en Chihuahua, México.

	AF	AP	DT	GT	AH	LH	LI	DM	MS
MS	0.58 (P \leq 0.0005)	0.58 (P \leq 0.0005)	0.55 (P \leq 0.0009)	0.14 (P \leq 0.4187)	-0.16 (P \leq 0.3774)	0.29 (P \leq 0.1008)	0.54 (P \leq 0.0014)	0.30 (P \leq 0.0846)	1.00
CP1	0.79 (P \leq 0.0001)	0.72 (P \leq 0.0001)	0.37 (P \leq 0.0354)	0.43 (P \leq 0.0132)	0.04 (P \leq 0.8297)	0.36 (P \leq 0.0403)	0.78 (P \leq 0.0001)	0.23 (P \leq 0.2034)	0.86 (P \leq 0.0001)
CP2	-0.13 (P \leq 0.4916)	0.19 (P \leq 0.2875)	-0.79 (P \leq 0.0001)	0.67 (P \leq 0.0001)	0.66 (P \leq 0.0001)	0.34 (P \leq 0.0521)	0.27 (P \leq 0.1289)	-0.69 (P \leq 0.0001)	-0.28 (P \leq 0.1168)
CP3	0.27 (P \leq 0.1217)	-0.57 (P \leq 0.0006)	0.15 (P \leq 0.4034)	0.32 (P \leq 0.0696)	0.60 (P \leq 0.0003)	0.34 (P \leq 0.0501)	-0.31 (P \leq 0.0782)	0.57 (P \leq 0.0006)	-0.05 (P \leq 0.7889)

CP1 = componente principal uno; CP2 = componente principal dos; CP3 = componente principal tres. AF = altura del follaje; AP = altura de planta; DT = densidad de tallos; GT = grosor de tallos; AH = ancho de hoja; LH = largo de hoja; LI = longitud de inflorescencia; DM = diámetro del macollo; MS = materia seca.

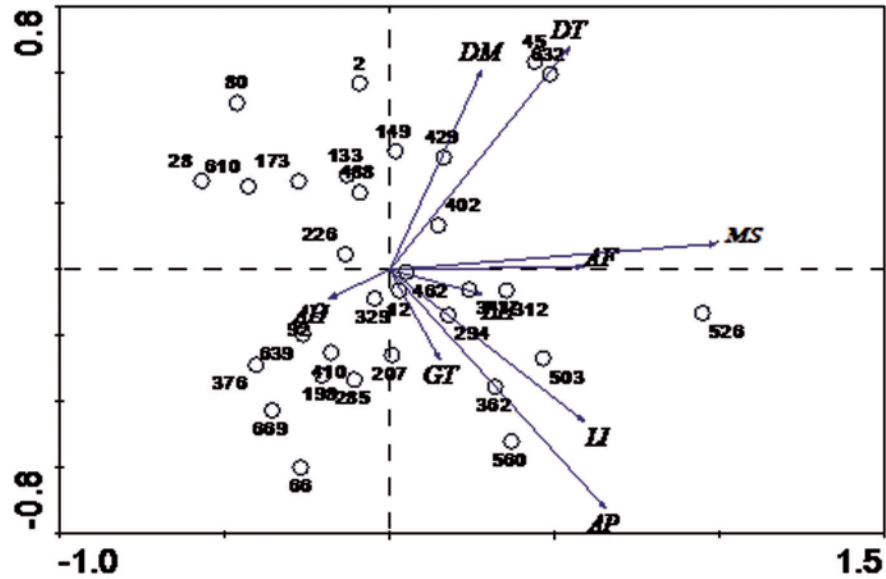


Fig. 2. Distribución de la variabilidad morfológica, basada en nueve características de 32 poblaciones de gigante [*Leptochloa dubia* (Kunth) Nees.], en función de los dos primeros componentes principales, obtenidos con la matriz de correlación (DT = diámetro de los tallos, DM = diámetro del macollo, MS = producción de materia seca, AF = altura del follaje, LI = longitud de la inflorescencia y AP = altura total de la planta).

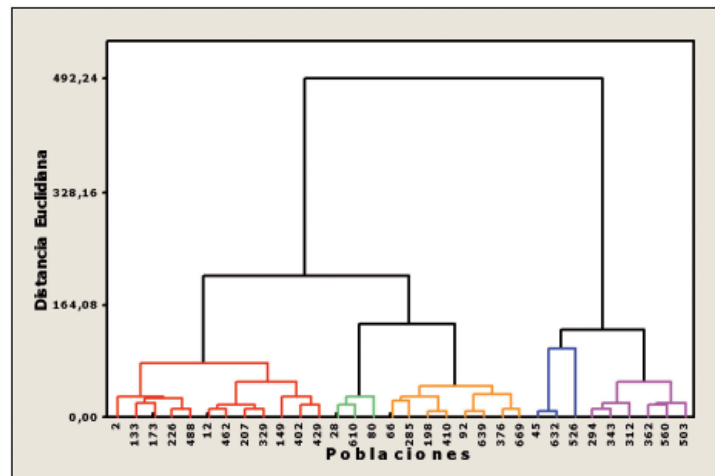


Fig. 3. Dendrograma del análisis de nueve variables morfológicas cuantitativas en 32 poblaciones de gigante [*Leptochloa dubia* (Kunth) Nees.], con base en el método de Ward.

Cuadro 4. Nivel de polimorfismo detectado en ecotipos del gigante [*Leptochloa dubia* (Kunth) Nees.] para cada combinación de iniciadores, empleados en el análisis de AFLP.

Combinación de iniciadores	Total de bandas	Total de bandas polimórficas	Total de bandas monomórficas
<i>EcoRI</i> -AAG+ <i>MseI</i> -CTG	49	23	26
<i>EcoRI</i> -ACT+ <i>MseI</i> -CTG	48	31	17
<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CAG	43	19	24
<i>EcoRI</i> -AAC+ <i>MseI</i> -CAG	46	32	14

pareadas de las 32 poblaciones de gigante, variaron entre 0.73 y 0.98 (fig. 4). El análisis de agrupamiento generó cinco grupos. El grupo I incluyó sólo una población (294) recolectada en el municipio de Janos; el grupo II incluyó también sólo la población 80, que fue recolectada en el municipio de Valle de Allende. El grupo III integró a seis poblaciones procedentes de los municipios de Cuauhtémoc y Parral. El grupo IV incluyó a seis poblaciones las cuales fueron recolectadas principalmente en el municipio de Chihuahua. Por último, el grupo V fue el más grande, ya que incluyó a 20 poblaciones recolectadas en los municipios de Chihuahua, Casas Grandes, Camargo y Ojinaga.

DISCUSIÓN

La colección *ex situ* de los diferentes ecotipos de gigante ha demostrado la amplia variabilidad morfológica de esta especie, con base en las nueve variables evaluadas (fig. 2). Esta diversidad probablemente es debida a las condiciones ambientales de los sitios de origen (Morales *et al.*, 2009), a pesar de que en algunas especies no existe correlación (Vahabi *et al.*, 2008; Jungmann *et al.*, 2010).

Al analizar el coeficiente de correlación del CP1 de los valores observados con las variables morfológicas, se encontró que las variables con mayor contribución fueron: materia seca ($r=0.86$; $P<0.0001$) y altura de follaje ($r=0.79$; $P<0.0001$) (cuadro 3). Por lo que los ecotipos 45 y 635 presentan altas producciones de forraje, característica importante para ser seleccionados para su propagación en tierras de pastoreo. Cuando se analizó la correlación del CP2 con las variables morfológicas, se encontró que las de mayor contribución fueron: densidad de tallos ($r=-0.79$; $P<0.0001$), diámetro de macollo ($r=-0.69$; $P<0.0001$) y grosor de tallo ($r=0.67$; $P<0.0001$). Con base en estas características, los ecotipos 45, 635, 429, 402 y 149, pueden ser seleccionados para protección y estabilidad de suelo. A pesar de que no se cuantificó la producción de semilla, las variables morfológicas densidad de tallos y altura de planta han sido reportadas que se relacionan con mayores producciones (Nadjafi *et al.*, 2006; Vahabi *et al.*, 2008). Por lo que el ecotipo 503 pudiera ser seleccionado para el establecimiento de lotes de producción de semilla; además presentó la mayor longitud de inflorescencia.

Algunas de estas correlaciones y porcentajes de la varianza observada, coinciden con los resultados de Ayana y Bekele (1999) sobre caracteres cuantitativos de 415 accesiones de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench); en este trabajo se reportan que los primeros cinco CP explicaron el 79% de la varianza total. Estudios similares se han llevado a cabo en *Lolium* (Bennett *et al.*, 2000), *Sorghum* (Grenier *et al.*, 2004), *Panicum* (Casler, 2005), *Bromus* (Ferdinández y Coulman, 2004) y *Bouteloua* (Morales *et al.*, 2009). En general, estos estudios concluyen que la evaluación de la variabilidad morfológica es la base para seleccionar material para diversos objetivos, como: restauración ecológica, producción forrajera, retención al suelo, resistencia a la sequía, entre otros.

Los resultados del análisis molecular con marcadores AFLP son congruentes con los obtenidos por otras investigaciones, principalmente en lo referente a la eficiencia de esos marcadores para detectar polimorfismo (Valdés-Infante, 2009). La combinación EcoRI-AAC+MseI-CAG es la recomendada para ser utilizada en futuros estudios de variabilidad genética en poblaciones del gigante, ya que fue la que detectó la mayor variabilidad. Estos resultados son congruentes con estudios realizados con ecotipos de *Agrostis stolonifera*, donde reportan fragmentos que variaron de 100 a 150 bandas, con 22 a 94 bandas polimórficas (Vergara y Bughrara, 2004). También, en *Schizachyrium scoparium* se obtuvieron 854 y 653 fragmentos en tallo y semilla, pero sólo 158 bandas polimórficas, que representan 18.5 y 24.2% para tallo y semilla y 22 a 34 bandas polimórficas (Fu *et al.*, 2004).

Por lo anterior, las poblaciones de gigante presentan una amplia variabilidad en poli-

morfismo al utilizar los marcadores AFLP. Además, los valores de similitud obtenidos para gigante, están en los intervalos reportados con AFLP para *Festuca* spp. y *Cynodon transvaalensis* (Mian *et al.*, 2002). Los valores de similitud calculados con base en datos moleculares, muestran a los ecotipos 402 y 410 (grupo IV), por un lado y a los ecotipos 149 y 66 (grupo III) como los de mayor homogeneidad genética, al presentar el valor más alto de similitud (0.98). Estas poblaciones homogéneas con distancias genéticas altas, son originarias de los municipios de Chihuahua y Parral, respectivamente. Los resultados anteriores coinciden con otros estudios respecto a la efectividad del uso de la técnica AFLP para realizar estudios de diversidad (Roldán-Ruiz *et al.*, 2000). También, esta técnica es útil para hacer una valoración rápida y eficiente de la diversidad genética en estas poblaciones nativas (Hammer, 2003).

CONCLUSIONES

Con base en la variabilidad morfológica en la colección *ex situ* del gigante, se detectaron ecotipos con alto potencial de producción de forraje, para retención de suelo y producción de semilla. Los ecotipos 45 y 635 fueron los que presentaron mejor potencial para producción de forraje. El ecotipo 503 puede ser utilizado para producción de semilla. El ecotipo 429 mostró características de amacollamiento que pueden ser aprovechadas para retención de suelo y control de erosión.

Los AFLP son marcadores eficientes para detectar variabilidad molecular en gigante, específicamente la combinación EcoRI-AAC+MseI-CAG, puede ser utilizada en futuros estudios de variabilidad genética en poblaciones de esta especie. Esto representa

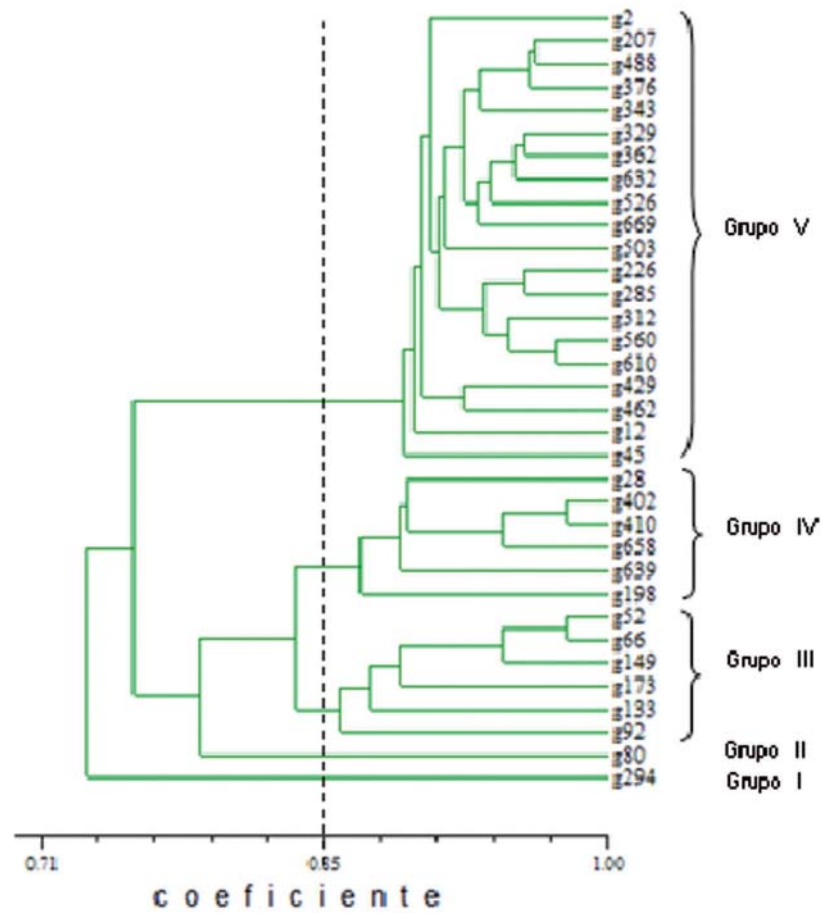


Fig. 4. Análisis de agrupamiento de 32 poblaciones del gigante [*Leptochloa dubia* (Kunth) Nees.], mediante el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento-UPGMA.

la base para iniciar programas de mejoramiento genético que generen variedades nacionales y cubrir deficiencias de semilla en la demanda actual para su uso en la rehabilitación de tierras de pastoreo.

Los resultados de este trabajo son el inicio de un programa de selección de ecotipos de gigante con diversos enfoques: incremento de forraje, retención de suelo y producción de semilla, con base en las variables morfológicas evaluadas. Por otra parte, la variabilidad genética detectada representa material básico para iniciar programas de mejoramiento genético del gigante.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Fondo Mixto CONACyT-Gobierno del estado de Chihuahua por el apoyo financiero (clave del proyecto: CHIH-2005-C01-23250).

LITERATURA CITADA

Ayana, A., y E. Bekele, 1999. "Multivariate analysis of morphological variation in *Sorghum* [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] germplasm from Ethiopia and Eritrea". *Gen. Res. Crop Evol.*, **46**: 273-284.

Báez, A.D.; J. G. Reyes, A. Melgoza, M.H. Royo y R. Carrillo, 1999. "Características productivas del sistema vaca-cría en el estado de Chihuahua". *Téc. Pec. Méx.*, **37**: 11-24.

Bennett, S.J.; M.D. Hayward, y D.F. Marshall, 2000. "Morphological differentiation in four species of the genus *Lolium*". *Gen. Res. Crop Evol.*, **47**: 247-255.

Casler, M.D., 2005. "Ecotypic variation among switchgrass populations from the Northern USA". *Crop Sci.*, **45**: 388-398.

Chávez, A., y F. González, 2008. "Estudios zootécnicos I (animales en pastoreo)". A. Chávez (ed.). *Rancho Experimental la Campana 50 años de investigación y transferencia de tecnología en pastizales y producción animal*. Libro Técnico núm. 2. Sitio Experimental La Campana-Madera. Centro de Investigación Regional Norte-Centro. INIFAP-Chihuahua, Chih. 213 pp.

Doyle, J.J., y J.L. Doyle, 1990. "A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue". *Focus*, **12**: 13-15.

Erickson, V.J.; N.L. Mandel y F.C. Sorensen, 2004. "Landscape patterns of phenotypic variation and population structuring in a selfing grass, *Elymus glaucus* (blue wildrye)". *Can. J. Bot.*, **82**: 1776-1790.

Ferdinández, Y.S.N., y B.E. Coulman, 2004. "Genetic relationships among smooth brome grass cultivars of different ecotypes detected by AFLP markers". *Crop Sci.*, **44**: 241-247.

Fjellheim S., y O.A. Rognli, 2005. "Genetic diversity within and among Nordic Meadow Fescue (*Festuca pratensis* Huds.) Cultivars Determined on the basis of AFLP Markers". *Crop Sci.*, **45**: 2081-2086.

Fu, Y.B.; Y.S.N. Ferdinández, A.T. Phan, B.E. Coulman y K.W. Richards, 2004. "Genetic diversity in natural populatio-

- ns and corresponding seed collections of little bluestem as revealed by AFLP markers". *Crop Sci.*, **44**: 2254-2260.
- Gauthier, D.A.; A. Lafon, T.P. Toombs, J. Hoth y E. Wiken, 2003. *Grasslands toward a North American conservation strategy*. Canadian Plains Research Center. University of Regina. Commission for Environment Cooperation. Montreal, Canadá. 99 pp.
- Grenier, C.; P.J. Bramel, J.A. Dahlberg, A.E. Ahmadi, M. Mahmoud, G.C. Peterson, D.T. Rosenow, y G. Ejeta, 2004. "Sorghums of the Sudan: analysis of regional diversity and distribution". *Gen. Res. Crop Evol.*, **51**: 489-500.
- Jungmann, L.; B.B.Z. Vigna, K.R. Boldrini, A.C.B. Sousa, C.B. do Valle, R.M.S. Resendale, M.S. Pagliarini, M.I. Zucchi, y A.P. de Souza, 2010. "Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological, and geographical origin". *Genome*, **53**: 698-709.
- Hammer, K., 2003. "A paradigm shift in the discipline of plant genetic resources". *Gen. Res. Crop Evol.*, **43**: 337-341.
- Holecheck, J.L.; R.D. Pieper, y C.H. Herbel, 1989. *Range management principles and practices*. Regents Prentice-Hall, Inc. New Jerzy, EU. 501 pp.
- Jungmann, L.; B.B.Z. Vigna, K.R. Boldrini, A.C.B. Sousa, C.B. do Valle, R.M.S. Resende, M.S. Pagliarini, M.I. Zucchi, y A.P. de Souza, 2010. "Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin". *Genome*, **53**: 698-709.
- Lebgue, K.T., 2002. "Gramíneas de Chihuahua". *Manual de identificación*. 3ª ed. Textos Universitarios. Universidad Autónoma de Chihuahua, 336 pp.
- Melgoza, A.; C.R. Morales, J.S. Sierra, M.H. Royo, G. Quintana, y T. Lebgue, 2008. *Manual práctico para la identificación de las principales plantas en los agostaderos de Chihuahua*. 2da. ed. Unión Ganadera Regional de Chihuahua-Fundación PRODUCE Chihuahua. 214 pp.
- Meudt, H.M., y A.C. Clarke, 2006. "Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances". *Trends Plant Sci.*, **12**: 1360-1385.
- Mian, M.A.; A. Hopkins, y J. Zwonitzer, 2002. "Determination of genetic diversity in Tall Fescue with AFLP markers". *Crop Sci.*, **42**: 944-950.
- Morales, N.C., 2006. "Caracterización morfológica, citológica y molecular de recursos genéticos de *Bouteloua cutipendula*". Tesis de doctorado en Ciencias. Colegio de Posgraduados, Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, Estado de México.

- Morales, N.C.R., 2009. *Metodología para la recolección y conservación de germoplasma de plantas forrajeras en las zonas áridas y semiáridas de México*. Folleto Técnico núm. 21. S.E. Campana-Madera. INIFAP-SAGARPA. 21 pp.
- Morales, N.C.; A.R. Quero, A. Melgoza, M. Martínez, y P. Jurado, 2009. "Diversidad forrajera del pasto banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], en poblaciones de zonas áridas y semiáridas de México". *Téc. Pec. Méx.*, **47**: 231-244.
- Nadjafi, F.; M. Bannyan, M. Rastgoo, y L. Tabrizi, 2006. "Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*". *J. Arid. Environ.*, **64**: 542-547.
- Pellant, M.; P. Shaver, D.A. Pyke, y J.E. Herrick, 2005. *Interpreting indicators of rangeland health*. Versión 3. Tech. Ref. 1734-6. USDI, Bureau of Land Management. Denver, CO. 122 pp.
- Peter-Schmid, M.K.; R. Kèolliker, y B. Boller, 2008. "Value of permanent grassland habitats as reservoirs of *Festuca pratensis* Huds. and *Lolium multiflorum* Lam. populations for breeding and conservation". *Euphytica*, **164**: 239-253.
- Puecher, D.I.; C.G. Robredo, R. Ríos, y P. Rimieri, 2001. "Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. Populations and cultivars with RAPD and AFLP markers". *Euphytica*, **121**: 229-236.
- Renganayaki, K.; J.C. Read, y A.K. Fritz, 2001. "Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers". *Theor. Appl. Genet.*, **102**: 1037-1045.
- Roldán-Ruiz I.; J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker, y M. De Loose, 2000. "AFLP markers reveal high polymorphism rates in ryegrass (*Lolium spp.*)". *Mol. Breed.*, **6**: 125-134.
- Royo, M.M., y A. Lafón, 2008. "Descripción fisiográfica, diversidad vegetal y vertebrados del rancho experimental La Campana". A. Chávez, y R. Carrillo (eds.). *Rancho Experimental La Campana 50 Años de Investigación y Tránsito de Tecnología en Pastizales y Producción Animal*. INIFAP-Chihuahua, Chih. 213 pp.
- Statistical Analysis System (SAS), 1999. Institute Inc. *User's guide. Statistics*. Version 8., 6th ed. SAS Inc. Cary, North Carolina, US.
- Vahabi, A.A.; A. Lotfi, M. Solouki, y S. Bahrami, 2008. "Molecular and morphological markers for the evaluation of diversity between *Plantago ovate* in Iran. *Biotech.*, **7**: 702-709.
- Valdéz, J.A.; A. Beetle, y M.H. González, 1975. "Gramíneas de Chihuahua". *Bol. Pastizales*, **6**: 1-60.
- Valdés-Infante, J., 2009. "Utilización de caracteres morfoagronómicos y de marcadores de ADN para el desarrollo de una metodología que contribuya al mejoramiento genético del guayabo

- (*Psidium guajava* L.) en Cuba”. Tesis de doctor en ciencias biológicas. Universidad de la Habana. La Habana, Cuba. 120 pp.
- Valladares, F.; E. Gianoli, y J.M. Gómez, 2007. “Ecological limits to plant phenotypic plasticity”. *New Phytol.*, **176**: 749-763.
- Vergara, G.V., y S. Bughrara, 2004. “Genetic differentiation of tetraploid creeping bentgrass and hexaploid redtop bentgrass genotypes by AFLP and their use in turfgrass breeding”. *Crop Sci.*, **44**: 884-890.
- Vos, P.; R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, y M. Zabeau, 1995. “AFLP: a new technique for DNA fingerprinting”. *Nucleic Acids Res.*, **23**: 4407-4414.
- Weber, G.E.; K. Moloney, y F. Jeltsch, 2000. “Simulated long-term vegetation response to alternative stocking strategies in savanna rangelands”. *Plant Ecol.*, **150**: 77-96.

Recibido: 28 marzo 2012. Aceptado: 28 febrero 2013.