



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

TESIS

**FILOGENIA DEL COMPLEJO *BOUTELOUA ANNUA* – *BOUTELOUA
ARISTIDOIDES* BASADO EN DATOS MOLECULARES Y
MICROMORFOLOGÍA DE HOJA**

PRESENTA

I.B.Q. Luis Fernando Cuéllar Garrido

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS: ÁREA
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

TUTOR

Dra. María Elena Siqueiros Delgado

COMITÉ TUTORAL

Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta

Dr. James Travis Columbus

Aguascalientes, Ags., a 26 de mayo de 2016.



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en E. José de Jesús Ruíz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como tutores designados del estudiante **LUIS FERNANDO CUÉLLAR GARRIDO** con ID 107524 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **FILOGENIA DEL COMPLEJO *BOUTELOUA ANNUA* – *BOUTELOUA ARISTOIDES* BASADO EN DATOS MOLECULARES Y MICROMORFOLOGÍA DE HOJA**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirlo, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 1 de julio de 2016.


Dra. María Elena Siqueiros Delgado
Tutora de Tesis


Dr. Gilberto Ocampo Acosta
Asesor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química, Fisiología y Farmacología
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico





UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en E. José de Jesús Ruíz Gallegos
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como tutores designados del estudiante **LUIS FERNANDO CUÉLLAR GARRIDO** con ID 107524 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **FILOGENIA DEL COMPLEJO *BOUTELOUA ANNUA* – *BOUTELOUA ARISTOIDES* BASADO EN DATOS MOLECULARES Y MICROMORFOLOGÍA DE HOJA**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirlo, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 1 de julio de 2016.

Dr. James Travis Columbus
Asesor de Tesis

- c.c.p.- Interesado
- c.c.p.- Secretaria de Investigación y Posgrado
- c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química, Fisiología y Farmacología
- c.c.p.- Consejero Académico
- c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



LUIS FERNANDO CUÉLLAR GARRIDO
MAESTRÍA EN CIENCIAS: ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
PRESENTE.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**Filogenia del complejo *Bouteloua annua* - *Bouteloua aristoides* basado en datos moleculares y micromorfología de hoja**", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

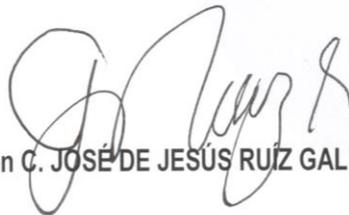
Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 21 de julio de 2016

"Se lumen proferre"

EL DECANO



M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



Dedicatorias y Agradecimientos

A lo largo de este proyecto tuve la fortuna de contar con el apoyo de un gran número de familiares, maestros, amigos y colegas a los cuales quisiera dedicar este logro personal y hacer una breve mención ya que de una u otra forma forjaron mi sendero para lograr concluir con éxito mis estudios de maestría.

A mis padres María Dolores Garrido Estrada y Luis Humberto Cuéllar Pedroza, cuyo apoyo incondicional y enseñanzas me han dado las herramientas y tenacidad necesaria para lograr todo lo que he deseado en mi vida. A mi futura esposa Valeria, quien a pesar de la adversidad, me ha apoyado en todo momento. A mi tutora María Elena Siqueiros, quien siempre me apoyó incondicionalmente con todos los recursos a su alcance desde el primer día de este proyecto, a pesar de venir de formaciones distintas. A mis asesores Gilberto Ocampo Acosta y Travis Columbus, los cuales nunca se limitaron a una mera participación simbólica, si no que por el contrario, me brindaron todas las herramientas y vasto conocimiento a su alcance, escuchando mis ideas y asesorándome en mis dudas. A toda la maravillosa gente que labora en el Rancho Santa Ana Botanic Garden, quienes me acogieron en sus instalaciones como si fuera un miembro más, y me permitieron sacarle el máximo provecho a mi corta estancia.

Muchas gracias a Higinio por ser mi primer profesor de sistemática, a Isaac por ayudarme a establecer los protocolos de extracción de ADN y amplificación, al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch y a todo su cuerpo académico del laboratorio de biotecnología vegetal de la UAA por prestarme sus instalaciones y apoyarme en todo lo que necesité. A mi compañera y amiga Adriana Berúmen por asesorarme en la realización de los estudios morfométricos y a todos mis colegas del herbario de la universidad autónoma de Aguascalientes.

Índice General

	Página
Índice General.....	1.
Índice de Tablas.....	3.
Índice de Figuras.....	4.
Acrónimos.....	7.
Resumen	10.
Abstract.....	12.
Introducción.....	14.
Antecedentes.....	17.
Capítulo 1: Análisis Morfométrico	22.
Material.....	22.
Método.....	23.
Resultados.....	30.
Observaciones Generales.....	30.
Descripciones.....	36.
<i>Bouteloua annua</i>	36.
<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>aristidoides</i>	38.
<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>arizónica</i>	39.
Capítulo 2: Anatomía de Hoja	40.
Material.....	40.
Método.....	42.
Resultados.....	53.
Observaciones Generales.....	53.
Descripciones.....	60.
<i>Bouteloua annua</i>	60.
<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>aristidoides</i>	64.
<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>arizónica</i>	68.
Capítulo 3: Micromorfología de Lámina Foliar	73.
Material.....	73.
Método.....	74.

Resultados	79.
Observaciones Generales	79.
Descripciones	89.
<i>Bouteloua annua</i>	89.
<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>aristidoides</i>	95.
<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>arizónica</i>	101
Capítulo 4: Filogenética Molecular	107.
Material	107.
Método	109.
Resultados	117.
Discusión	123.
Conclusión	138.
Glosario	139.
Bibliografía	147.
Anexos	151.



Índice de Tablas

	Página
Capítulo 1: Análisis Morfométrico	22.
Tabla 1.1	23.
Tabla 1.2.....	24.
Tabla 1.3	27.
Capítulo 2: Anatomía de Hoja	40.
Tabla 2.1	42.
Tabla 2.2.....	45.
Tabla 2.3	48.
Tabla 2.4	49.
Tabla 2.5	51.
Capítulo 3: Micromorfología de Lámina Foliar	73.
Tabla 3.1	74.
Tabla 3.2.....	76.
Tabla 3.3	77.
Capítulo 4: Filogenética Molecular	107.
Tabla 4.1	109.
Tabla 4.2.....	113.
Tabla 4.3	114.
Tabla 4.4	118.

Índice de Figuras

	Página
Capítulo 1: Análisis Morfométrico	22.
Figura 1.1	30.
Figura 1.2.....	31.
Figura 1.3	32.
Figura 1.4.....	33.
Figura 1.5.....	33.
Figura 1.6.....	34.
Figura 1.7.....	34.
Figura 1.8.....	35.
Figura 1.9.....	37.
Figura 1.10.....	38.
Capítulo 2: Anatomía de Hoja	40.
Figura 2.1	53.
Figura 2.2.....	54.
Figura 2.3.....	55.
Figura 2.4.....	56.
Figura 2.5.....	57.
Figura 2.6.....	58.
Figura 2.7.....	59.
Figura 2.8.....	59.
Figura 2.9.....	60.
Figura 2.10.....	61.
Figura 2.11.....	62.
Figura 2.12.....	63.
Figura 2.13.....	63.
Figura 2.14.....	64.

Figura 2.15	65.
Figura 2.16	66.
Figura 2.17	67.
Figura 2.18	68.
Figura 2.19	69.
Figura 2.20	70.
Figura 2.21	71.
Figura 2.22	72.
Capítulo 3: Micromorfología de Lámina Foliar	73.
Figura 3.1	80.
Figura 3.2	81.
Figura 3.3	82.
Figura 3.4	83.
Figura 3.5	84.
Figura 3.6	85.
Figura 3.7	86.
Figura 3.8	87.
Figura 3.9	88.
Figura 3.10	89.
Figura 3.11	90.
Figura 3.12	91.
Figura 3.13	92.
Figura 3.14	93.
Figura 3.15	94.
Figura 3.16	95.
Figura 3.17	96.
Figura 3.18	97.
Figura 3.19	98.
Figura 3.20	98.
Figura 3.21	99.
Figura 3.22	100.

Figura 3.23	101.
Figura 3.24	102.
Figura 3.25	103.
Figura 3.26	104.
Figura 3.27	104.
Figura 3.28	105.
Figura 3.29	106.
Figura 3.30	106.
Capítulo 4: Filogenética Molecular	107.
Figura 4.1	117.
Figura 4.2	120.
Figura 4.3	122.
Discusión	123.
Figura 5.1	124.
Figura 5.2	125.
Figura 5.3	132.

Acrónimos

ADN – Ácido desoxirribonucleico.

AEM – Análisis de escalamiento multidimensional.

An – *Bouteloua annua*.

Ar – *Bouteloua aristidoides* variedad *aristidoides*.

Az – *Bouteloua aristidoides* variedad *arizonica*.

B. – *Bouteloua*.

°C – Grados centígrados.

cm – Centímetros.

CTAB - Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

DEsABr – Distancia entre el punto apical de la rama de espiga media, al lugar de nacimiento de la espiguilla apical.

Dr. – Doctor.

EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético.

Er – *Bouteloua eriopoda*.

Ey – *Bouteloua eriostachya*.

FPA – Solución para fijación de tejidos (Formaldehído - alcohol – ácido propiónico).

GC – Relación de guanina – citosina.

HCl – Ácido clorhídrico.

HUAA – Herbario de la universidad autónoma de Aguascalientes.

H₂O – Agua.

ITS – Marcador molecular de espaciador nuclear ribosomal (internal transcribed spacer).

LonAnA – Longitud de anteras de espiguillas de la espiga apical fértil de la inflorescencia.

LonAnB – Longitud de anteras de espiguillas de la espiga basal fértil de la inflorescencia.

LonBr – Longitud de espiga.

LonCar – Longitud de cariopsis.

LonEsp – Longitud de espiguilla.

LonInf – Longitud de inflorescencia.

LonLem - Longitud de lema.

LonPal – Longitud de palea.
Lon1Gl – Longitud de la primera gluma.
Lon2Gl – Longitud de la segunda gluma.
M – Molaridad.
mA – Miliamperios.
MEB – Microscopio electrónico de barrido.
ml – Mililitros.
mm – Milímetros.
mM – Milimolar.
M.P.M. – Marcador de peso molecular.
NaCl – Cloruro de sodio.
NBrEsp – Número de espiguillas.
ng – Nanogramos.
NH₄Fe(SO₄)₂ – Alumbre de hierro.
NInfBr – Número de espigas.
nm - Nanómetros
OTU – Unidad de taxón operacional.
pb – Pares de bases.
PCA – Análisis de componentes principales.
PCO – Análisis de coordenadas principales.
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa.
pH – Coeficiente del potencial de hidrógeno.
QV – Valor de calidad (quality value).
RNA – Ácido ribonucleico.
rpm – Revoluciones por minuto.
RSABG – Rancho Santa Ana botanic garden.
T.A.E. – Solución tampón de tris – acetato – EDTA.
UAA – Universidad autónoma de Aguascalientes.
USA – Estados Unidos de América.
UV – Ultravioleta.
var. – Variedad.

v/v – Relación volumen – volumen.

ZnCl₂ – Cloruro de zinc.

μl – Microlitros.



Resumen

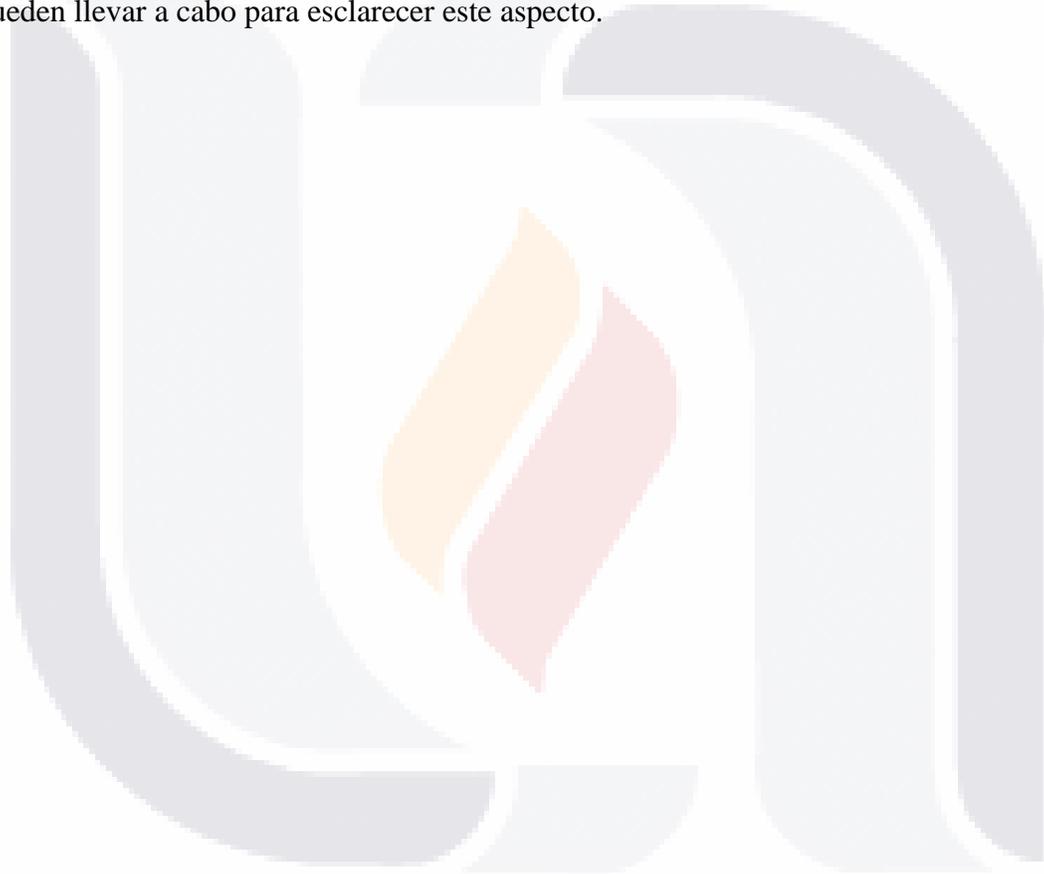
Un total de 63 ejemplares pertenecientes al complejo *B. annua* – *B. aristidoides*, fueron sometidos a una serie de análisis morfométricos (análisis de componentes principales, análisis de coordenadas principales y análisis multidimensional), anatómicos (cortes transversales de hojas maduras), micromorfológicos (epidermis de hojas maduras vistas bajo microscopia electrónica de barrido) y/o moleculares (amplificación y secuenciación del marcador molecular de núcleo ITS) con la finalidad de reconstruir su historia evolutiva, corroborar la monofilia del complejo, comprobar el estado de *B. aristidoides* var. *arizonica* como variedad, establecer la variabilidad molecular y morfológica propia de *B. aristidoides* var. *aristidoides* (para esclarecer si se trata de una o más variedades), así como dilucidar los estados de carácter sinapomórficos y plesiomórficos existentes dentro del complejo que nos den una idea de los patrones evolutivos a los cuales han sido sometidos a lo largo del tiempo.

Los resultados son congruentes a lo largo de todos los análisis y corroboran la monofilia dentro del complejo, sin embargo, ciertos hallazgos moleculares y morfológicos ponen en duda el tratamiento de *B. aristidoides* var. *arizonica* como variedad. Cierta variabilidad morfológica, micromorfológica y molecular en ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides* (sobre todo en ejemplares provenientes de localidades de Baja California Sur) sugiere la presencia de nuevas variedades nunca antes descritas, no obstante, esto puede ser propio de la naturaleza tetraploide de la variedad, o estados muy tempranos de divergencia evolutiva, por lo que los resultados no son concluyentes.

A partir de los estados de carácter sinapomórficos y plesiomórficos obtenidos, se infiere un cambio en el predominio de reproducción sexual llevado en flores (predominancia equitativa de casmogamia y cleistogamia en *B. annua* y mucha mayor predominancia de cleistogamia que de casmogamia en *B. aristidoides*), el cual pudo haber jugado un papel muy importante en el proceso de especiación inicial dentro del complejo. También se establecen las sinapomorfias para las variedades de *B. aristidoides*, siendo una reducción en tamaño de lema y una epidermis foliar conspicuamente papilosa en zona adaxial propias de la variedad

arizonica, mientras que una reducción de espiguillas por espiga (de 6 a 2), una rama de espiga conspicuamente sobresaliente y presencia de macropelos en epidermis foliar son propios de la variedad *aristidoides*.

También se discute de manera breve, la forma en la que las novedades evolutivas (caracteres sinapomórficos) propuestas de cada especie y variedad, pudiesen estar afectando la distribución de sus poblaciones conocidas, así como dar una visión de futuros análisis que se pueden llevar a cabo para esclarecer este aspecto.



Abstract

A total of 63 specimens belonging to the *B. annua* – *B. aristidoides* complex, were evaluated through a series of morphometric (principal component analysis, principal coordinates analysis and multidimensional analysis), anatomical (transverse sectioning of mature leaves), micromorphological (foliar epidermis of mature leaves seen under scanning electron microscopy) and/or molecular analysis (amplification and sequencing of the ITS molecular marker), with the aim of rebuild their evolutionary history, corroborate the monophyly of the complex, proof the treatment of *B. aristidoides* var. *arizonica* as a variety and not as a specie, establish the molecular and morphological variability of *B. aristidoides* var. *aristidoides* (to prove if it's one or more varieties), and finally, to establish the synapomorphic and plesiomorphic character states inside the complex that would help us to understand the evolutionary patterns that have act in their members through ages.

The results are congruent through all the analysis and corroborate the monophyly inside the complex, however, certain molecular and morphological discoveries bring into question if *B. aristidoides* var. *arizonica* should be treated as a specie and not has a variety. Certain morphological, micromorphological and molecular data inside the specimens of *B. aristidoides* var. *aristidoides* (being most notorious in specimens that where collected in Baja California Sur) suggest the presence of new and never before described varieties inside the complex, however, this variability could be due a tetraploid state, or to a very early evolutionary divergence state of the variety, so the results are not conclusive in this aspect.

The synapomorphic and plesiomorphic character states obtained, infer a change in the predominance of the floral sexual reproduction method (equitable predominance of chasmogamy and cleistogamy in *B. annua* and a much more prevalence of cleistogamy and only in few rare cases presence of chasmogamy in *B. aristidoides*), which could have played a huge rol in the initial speciation process inside the complex. Also, the synapomorphies of the varieties of *B. aristidoides* are established, being a reduction in the size of lemma and a foliar epidermis conspicuously papillae in the adaxial zone befitting of the *arizonica* variety,

while a reduction in the number of spikelets per spike (from 6 to 2), a branch spike conspicuously protrusive and the presence of macrohairs in the foliar epidermis, are unique of the *aristidoidea* variety.

Also, a brief discussion about the way in which the evolutionary novelties (the synapomorphic characters) proposed for each specie and variety, could be affecting in their distributions, is stated, as well as giving an insight for future analysis that could be pursued in order to clarify this aspect.



Introducción

Las gramíneas conforman una de las familias de plantas con flores más grandes en el mundo, juegan un rol muy importante tanto en las actividades económicas humanas, como en la composición natural de comunidades de plantas, y se distribuyen a lo largo de todos los continentes y en todo tipo de zonas climáticas (Tzvelev, 1989). Su importancia radica en ser la principal fuente de alimento para el consumo humano basado en la producción de granos, así como ser la base de la industria ganadera utilizando áreas de pastizales silvestres como alimento para el ganado (Lemus, 1996).

El vertiginoso cambio demográfico, económico y tecnológico que ha sufrido la especie humana a lo largo de tan solo un par de siglos, pone en riesgo a un gran número de especies de pastizales. Un aumento del porcentaje de las tierras de cultivo usadas en el planeta, uso de tecnologías de ADN recombinante que podrían comprometer la poza génica natural de muchas especies, cambios climáticos y sobrepastoreo son solo algunos ejemplos de los factores actuales que comprometen su supervivencia (Tzvelev, 1989).

México por su parte, cuenta con una gran biodiversidad y es centro de origen de una gran variedad de especies tanto vegetales como animales. Los pastizales constituyen entre 10% y 12% de la superficie terrestre de México, y también sufren de graves problemas de sobrepastoreo, cambios climatológicos, etc., que ponen en riesgo a varias especies de gramíneas (Rzedowski, 1978). Por todo lo anterior es necesario impulsar proyectos de investigación de carácter científico que nos ayuden a comprender el origen, relación, estado actual de distribución e identificación de las especies que conforman los pastizales mexicanos para así poder idear estrategias que nos ayuden a preservarlos.

Las especies de pastizales de mayor importancia forrajera del sur de Norteamérica y Centroamérica (incluido México) son aquellas que pertenecen al género *Bouteloua* Lagasca (género descrito por primera vez por Mariano Lagasca en 1805) (Gould, 1979). El género es nativo de las regiones semiáridas del Nuevo Mundo y comprende un grupo monofilético

compuesto por 57 especies (Columbus, 1999), de las cuales 37 se encuentran en México. Veinte especies son endémicas o de distribución restringida a México, mientras que el resto se extienden desde el suroeste de Estados Unidos hasta Sudamérica y las Antillas (Herrera et al., 2004).

La mayoría de las especies del género *Bouteloua* son perennes y ocupan áreas con poco disturbio, no obstante, algunas de ellas son anuales y generalmente se comportan como malezas. Ejemplo de ello es *B. aristidoides* (Griseb.) la cual se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta Sudamérica, siendo México el país que cuenta con mayor densidad de poblaciones conocidas de esta especie y del cual se sospecha que es el centro de origen. Se trata de una planta anual de vida corta, amacollada, que florece de julio a diciembre y habita en pastizales deteriorados, matorrales xerófilos, a orilla de cultivos y en lugares pedregosos y secos, a altitudes que van desde los 0 hasta los 2500 m sobre el nivel del mar (Herrera, 2004). Cuenta con dos variedades reconocidas, *Bouteloua aristidoides* var. *aristidoides* y *Bouteloua aristidoides* var. *arizonica*, esta última poco común, de la cual solo tienen poblaciones reportadas en los estados de Arizona, Texas (USA), Durango y Sonora (México) (Herrera, 2004). No obstante, ambas variedades pueden llegar a coexistir en las mismas regiones (intergradación) y presentar diferencias morfológicas escasas, siendo el número de espiguillas el carácter más fácil de diferenciar. Cuentan con inflorescencias de 2.5 a 10 cm de longitud, con 2 a 10 espiguillas (según la variedad de la que se trate), cada espiguilla contiene una flor perfecta y otra rudimentaria, la perfecta tiene una lema de 6 a 7 mm de longitud, con aristas cortas de 0.4 a 0.6 mm de longitud, escaso a abundantemente pubescente sobre la nervadura media, mientras que la rudimentaria tiene una lema de 8 a 10 mm de longitud, fuertemente 3-aristada (Herrera et al, 2004). Sus flores perfectas o rudimentarias, contienen caracteres masculinos y femeninos (son bisexuales o monoclinas) (Kinney et al., 2007). La variedad *aristidoides* es una especie tetraploide ($2n=40$) (Gould F. W., 1979), mientras que para la variedad *arizonica*, hasta la fecha no se tienen registros sobre estudios de conteo cromosómico.

Otra especie anual y hermana de *B. aristidoides* es *B. annua* (Swallen), es una especie endémica de México y tan escasa que podría considerarse en peligro de extinción. Solo se

han reportado poblaciones existentes en Baja California Norte, Baja California Sur y Sonora. Son plantas anuales, amacolladas que florecen en primavera y habitan principalmente en pendientes abiertas, rocosas y/o secas, a altitudes que van desde los 0 a los 600 metros sobre el mar (Herrera, 2004). Sus inflorescencias cuentan con 3 a 7 espigas de 1.5 a 3 cm de longitud y erectas, con 4 a 10 espiguillas por rama, cada espiguilla contiene una flor perfecta y otra rudimentaria, la perfecta tiene una lema de 7 a 9 mm de longitud, densamente pubescente en la base de los nervios y el margen, esparcido escabrosa-hirsuta en el ápice, con tres nervaduras que se extienden en aristas cortas o dientes, mientras que la rudimentaria tiene lema reducida a una arista redondeada, pubescente-hirsuta, que se ramifica en tres aristas aplanadas, escabrosas, de 5 a 8 mm de longitud sin presencia de anteras (Herrera et al, 2004). Sus flores (ya sean perfectas o rudimentarias) contienen caracteres masculinos y femeninos (son bisexuales o monoclinas) (Kinney et al., 2007). Hasta la fecha no se tienen registros sobre estudios de conteo cromosómico en esta especie.

Ambas especies, *B. annua* y *B. aristidoides*, forman un grupo monofilético (Columbus, 1999a), aunque las sinapomorfias morfológicas que las caracterizan no son muy claras. Así mismo, se desconoce la variación genética y micromorfológica entre sus poblaciones que permita probar la monofilia de estas especies y el rango de variación intraespecífica. Este conocimiento aunado a datos moleculares nos permitirán validar la monofilia de ambas especies y de las variedades *B. aristidoides* var. *arizonica* y *B. aristidoides* var. *aristidoides*.

Antecedentes

A lo largo del tiempo el género *Bouteloua* ha recibido diferentes tratamientos en cuanto al número y clasificación de sus especies circunscriptas. En un principio Lagasca en 1805 describió únicamente 5 especies pertenecientes al género, *B. ramosa* (actualmente conocida como *B. curtipendula*), *B. hirsuta*, *B. barbata*, *B. simplex* y *B. prostrata*. Más tarde Griffiths (1912), Hitchcock (1920) y Swallen (1939) nombraron a *B. curtipendula* como la especie tipo del género. No obstante, no fue sino hasta los trabajos de Gould y Kapadia que se empezó a dilucidar la verdadera complejidad, distribución e importancia del género *Bouteloua*, ya que en sus estudios en un principio reconocen y describen a 50 especies divididas en dos subgéneros, *Bouteloua* y *Chondrosium* (Gould F. W. y Kapadia Z. J., 1964). Gould y Kapadia describieron taxonómicamente a *B. aristidoides* y *B. annua*, reconociéndolas por primera vez como parte del subgénero *Bouteloua* (Gould F. W., 1969). Para 1980, Gould reconocía únicamente a 39 especies y sus variedades, como taxa del género *Bouteloua* (Gould F. W., 1979). A partir de este punto la clasificación del género *Bouteloua* ha sido motivo de polémica ya que otros investigadores (Reeder y Reeder 1981; Beetle 1986; Columbus 1996) propusieron la adición y exclusión de diferentes taxa para dar un total de 25 especies en el subgénero *Bouteloua* y 17 en el subgénero *Chondrosium*, incluso Clayton y Renvoize en 1986 propusieron tratar los dos subgéneros como géneros aparte, anexándolos a la subtribu Boutelouinae de la tribu Cynodonteae, basándose en inconsistencias de algunos de los miembros del subgénero *Chondrosium* que no cumplían con el carácter distintivo de pocas ramas de tamaño superior al subgénero *Bouteloua* y gran número de espiguillas por inflorescencia.

En vista a lo anterior, nació la necesidad de desarrollar nuevas técnicas y enfoques que resolvieran la problemática que implicaba la clasificación de las especies del género *Bouteloua*, basándonos en criterios que fueran más allá de los que nos brinda la taxonomía, sin embargo esto no fue posible sino hasta el desarrollo de diversas técnicas informáticas y de biología molecular. A través del aislamiento, amplificación (gracias a la reacción en cadena de la polimerasa o PCR), secuenciación y procesamiento de la información molecular

(en programas computacionales basados en algoritmos de alineamiento de secuencias y búsqueda óptima de árboles binarios de máxima parsimonia) (Neapolitan R. y Naimipour K., 2011) de diferentes secuencias de aminoácidos, de genes de ADN ribosomal nuclear, y/o de cloroplastos, se encontró que el género *Bouteloua* no formaba un grupo monofilético (Columbus, 1996). Columbus et al. (1998), basado en micromorfología de lema y en secuencias de ADN nuclear, argumentaron por primera vez la artificialidad o no monofilia de los dos subgéneros de *Bouteloua*, lo cual llevó a una reclasificación de las especies circunscriptas para recuperar la monofilia del género, en la cual se añaden nuevas especies, dando un total de 57 (Columbus, 1999). A partir de este punto, diversos análisis moleculares en especies de la subfamilia Chloridoideae (la cual incluye al género *Bouteloua*), se han realizado para determinar la filogenia de *Bouteloua* (Columbus et al., 2000, Peterson P. M. et al, 2010, Columbus et al., 2010), tomando como base diversas secuencias de nucleótidos intergénicas, para genomas de cloroplasto y de genoma nuclear ribosomal (Columbus et al., 2007). Se trata de regiones presentes en todos los genomas pero con la suficiente variación para establecer relaciones filogenéticas entre especies, basadas en características compartidas o sinapomorfias. Las secuencias genómicas de nucleótidos denominada ITS, se refiere a una serie de espaciadores internos transcritos genómicos que se encuentran entre una subunidad pequeña 18s - 5.8s, y entre otra subunidad grande 5.8s - 26s (28s) de regiones codificantes de RNA ribosomal (Quijada et al., 1998). Los estudios filogenéticos moleculares basados en estas secuencias también han permitido establecer teorías con alto soporte teórico y taxonómico sobre las relaciones filogenéticas de las especies del género (Siqueiros et al., 2013), así como la evolución de los estados de carácter, como por ejemplo reversiones de sus diversas especies al estado plesiomórfico de caracteres sexuales (Kinney et al., 2007). Dado que no hay hasta la fecha estudios profundos que abarquen estudios moleculares aunados a estudios de micromorfología del complejo *B. aristidoides*-*B. annua*, estas especies han permanecido sin cambios en su clasificación. El presente estudio aporta evidencias para establecer los estados de carácter plesiomórficos y/o sinapomórficos del complejo *B. aristidoides* – *B. annua*, así como para confirmar o descartar la existencia de variedades dentro de la especie *B. aristidoides*. Por lo anterior este trabajo tiene la meta de llegar a presentar datos que ayuden a dilucidar una filogenia con altos valores de apoyo del complejo

B. annua-*B. aristidoides*, así como aportar evidencia que pruebe la monofilia de ambas especies.

Distintos autores han utilizado de forma exitosa caracteres anatómicos de hojas como herramienta para establecer relaciones filogenéticas en estudios sistemáticos de pastos (Breakwell, 1914; Brown, 1958, 1975, 1977; Cerros Tlatilpa, 1999; Columbus, 1996; Ellis, 1987; Fisher, 1939; Morden y Hatch, 1987; Sánchez, 1971). En el caso de *Bouteloua*, Columbus (1999b) basado en micromorfología de hojas, propuso la no monofilia de los subgéneros *Bouteloua* y *Chondrosium*, así como la relación cercana entre *B. eriopoda* y *B. aristidoides*. También dejó en claro de forma indirecta, la utilidad de los caracteres micromorfológicos de hoja para diferenciar a *B. aristidoides* de *B. annua*; entre los caracteres más variables que se mencionan en el artículo, se encuentran el número, disposición y forma de haces vasculares, morfología y tipos de células vasculares, así como grosor y forma general de las hojas (Columbus, 1999b). Otras estructuras muy usadas para obtener información morfológica son la palea y la lema; las especies de la familia Poaceae contienen estas estructuras tipo brácteas (aparte de la primera y segunda gluma), dispuestas una encima de la otra, como si se tratase de un estuche en forma de la letra griega “Y” envolviendo las estructuras reproductivas. El valor de la micromorfología de la lema para caracterizar subfamilias, tribus y géneros de la familia Poaceae ha sido demostrada por varios autores (Thomasson 1978, 1981; Terrell y Wergin 1981; Barkworth y Everett 1987, Valdés-Reyba y Hatch 1991; Snow 1996; Acedo y Llamas 2001; Terrell et al. 2001; Mejía Saulés y Bisby 2003; Pacheco et al. 2003; Finot et al. 2006; Ortúñez y de la Fuente 2010). Los caracteres epidérmicos de lema, visibles incluso a bajas magnificaciones en microscopio, son conocidos como particularmente diagnósticos del complejo estudiado y han sido usados frecuentemente para identificar y estudiar las relaciones taxonómicas entre especies de la familia Poaceae. Entre los caracteres evaluados en lema de este tipo de ensayos se encuentran las vellosidades, presencia de ganchos, la forma o longitud de las células, entre otros (Nobis, 2014), no obstante, en el particular caso del complejo *B. aristidoides* - *B. annua*, estudios de micromorfología de lema no han aportado caracteres significativos para una clara diferenciación entre las especies del complejo (Columbus, 1999b). Por otro lado, algunos autores han explorado también la utilidad de la micromorfología de tallos para estudios

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sistemáticos en el género *Bouteloua*, pero dichos estudios no han demostrado contener suficientes rasgos informativos para establecer la filogenia del género (Siqueiros, 2007).

El número de cromosomas para la mayoría de las especies de *Bouteloua* ha sido establecido como diploide ($2n=20$) y tetraploide ($2n=40$) con un número básico de $x=10$ para el género, aunque también se tienen registros de algunas especies que son aneuploides (Gould, 1979). En cuanto a su sistema de reproducción, se cree que en aneuploides se da por apomixis (Gould y Kapadia, 1964), mientras que en diploides y tetraploides se da por autogamia y/o alogamia (según sea el caso). Estudios recientes muestran evidencia de la historia evolutiva de los sistemas reproductivos en *Bouteloua*, en donde se establece que las especies andromonoicas surgen de especies monoicas, especies ginodioicas surgen de especies con flores monoclinas, especies monoicas evolucionaron de flores monoclinas y dioicas, y dioicas a partir de monoclinas y monoicas; es decir, la unisexualidad en sus flores se trata de una característica que se ha perdido y resurgido varias veces a lo largo de la evolución en *Bouteloua*, donde la poliploidía y los ambientes áridos son posibles factores en la evolución y variabilidad de sus sistemas reproductivos (Kinney et al., 2007). Para el caso de *B. aristidoides* var. *aristidoides*, se trata de una planta monoica con flores monoclinas, su número básico de cromosomas se ha establecido en $x=10$, tratándose de una especie tetraploide (poliploide, $2n=40$) (Gould, 1960 y Reeder, 1971), las especies tetraploides de *Bouteloua* se creen que resultaron de la hibridación de otras especies de *Bouteloua* diploides cercanas que tenían los suficientes cromosomas homólogos (Gould y Kapadia, 1964), mientras que *B. annua* también se trata de una planta monoica con flores monoclinas (Kinney et al., 2007). A la fecha no se tienen registros sobre el número cromosomal de *B. annua* ni de *B. aristidoides* var. *arizonica*.

Otras herramientas contemporáneas que son de gran ayuda para el establecimiento de relaciones filogenéticas, son los análisis estadísticos de información multivariada a través de mediciones morfométricas de caracteres cuantitativos de diversos taxa. Se le llama información multivariada a la base de datos formada a través del registro de los valores cuantitativos (valores morfométricos) de diversas variables de interés (caracteres morfológicos) establecidas por Everitt y Hothorn (2011), las cuales son examinadas y

procesadas estadísticamente a través de diversos programas computacionales de forma simultanea para poder tener una extensa comprensión de éstas. Dentro de los principales análisis estadísticos de información multivariada usados en estudios sistemáticos encontramos los análisis de componentes principales (PCA), los análisis de coordenadas principales (PCO) y los análisis de escalamiento multidimensional (AEM). Los PCA son técnicas para el procesamiento de información multivariada con el principal objetivo de reducir o simplificar la dimensionalidad de las variables tratando de tomar en cuenta la mayor parte de la variabilidad original de éstas, lo anterior lo logra transformando las variables originales en “conjuntos” de nuevas variables simplificadas y acomodadas en orden de importancia con respecto a la variación de las variables originales (Everitt y Hothorn, 2011). Por otro lado, los PCO se rigen por el mismo principio que los PCA pero la diferencia radica en que los PCO pueden utilizar cualquier medida de asociación (pueden ser aplicados a cualquier variable u observación) su objetivo es el de calcular una matriz de distancia y construir una configuración gráfica en un espacio euclidiano de baja dimensionalidad, en el cual las distancias entre los puntos de referencia reflejen las distancias originales entre las observaciones o variables (Zuur et al., 2007). Finalmente, los AEM tienen el objetivo de producir mapas de datos que no operan directamente sobre la matriz original de datos multivariados sino sobre matrices de distancia derivadas de ésta. El AEM se trata esencialmente de una técnica de reducción de datos ya que su objetivo es encontrar una serie de puntos de baja dimensionalidad que se aproximen en lo posible a la proximidad de los datos de la matriz original (Everitt y Hothorn, 2011).

Capítulo 1: Análisis Morfométrico

Material

Las medidas morfométricas se tomaron a partir de ejemplares del herbario de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (HUAA) y herbario del Rancho Santa Ana Botanic Garden (RSABG) con ayuda de papel milimétrico y estereoscopio marca Leica, modelo Zoom 2000. La manipulación de los ejemplares de herbario se llevó a cabo en todo momento con el empleo de pinzas de punta fina y agujas de disección.

Para la creación de las matrices de datos morfométricos se utilizaron los programas Microsoft Office Excel 2007 y NTedit, mientras que para el PCO, PCA y AEM se utilizó el programa estadístico NTSYSpc 2.1. Dichos programas fueron ejecutados en una computadora portátil marca Sony, modelo VAIO, con un procesador Intel Pentium de 2 GHz, 8 GB de RAM y sistema operativo Windows 7 de 64 bits. Los elementos resaltados en las figuras fueron tratados con el programa de edición de imágenes Microsoft Paint.

Método

Caracteres morfológicos evaluados:

Se realizó un estudio preliminar para la búsqueda de los caracteres cuantitativos más representativos dentro del complejo *B. annua* - *B. aristidoides*, lo cual propició la elección de 13 caracteres morfológicos del complejo. El criterio usado para la elección de los caracteres fue en base a las discrepancias morfológicas mas notorias entre los miembros del complejo *B. annua* – *B. aristidoides* descritas por Columbus (1999b) y a aquellos caracteres cuantitativos mas representativos encontrados durante el estudio preliminar. Se eligieron cuatro caracteres de la inflorescencia, tres de la espiga media (posicionada en la parte media de la inflorescencia) y seis de la espiguilla media (posicionada en la parte media de la espiga) (tabla 1.1).

Tabla 1.1 Listado de los caracteres morfológicos medidos en cada ejemplar para la realización del análisis morfométrico.

Caracteres morfológicos	
Estructura	Nombre del carácter evaluado
Inflorescencia.	Longitud de inflorescencia (desde punto apical, hasta el punto de nacimiento de la espiga basal).
	Número de espigas de la inflorescencia.
	Longitud de anteras de espiguillas de la espiga apical fértil de la inflorescencia.
	Longitud de anteras de espiguillas de la espiga basal fértil de la inflorescencia.
Espiga media.	Longitud de espiga.
	Número de espiguillas.
	Distancia entre el punto apical de la rama, y el lugar de nacimiento de la espiguilla apical.

Espiguilla media.	Longitud de espiguilla.
	Longitud de cariopsis.
	Longitud de palea.
	Longitud de lema.
	Longitud de primera gluma.
	Longitud de segunda gluma.

Todos los caracteres evaluados se midieron por triplicado, es decir, se tomaron de forma arbitraria tres inflorescencias maduras de cada ejemplar, a los cuales se les evaluaron cada uno de los caracteres, tomando como el valor definitivo de medida el promedio de las tres mediciones. En los casos que la inflorescencia contara con dos posibles espigas y/o espiguillas medias (debido a un número impar de espigas o espiguillas totales), se tomó como espiga o espiguilla media a la más próxima al ápice de la inflorescencia.

Material vegetal utilizado:

Se evaluaron cada uno de los 13 caracteres a un total de 53 ejemplares, constituidos por 26 ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Ar), 9 ejemplares de *B. aristidoides* var. *arizonica* (Az), 6 ejemplares de *B. annua* (An), 10 ejemplares de *B. eriopoda* (Er) y 2 ejemplares de *B. eriostachya* (Ey) (estas últimas dos especies como grupo hermano de referencia para el complejo *B. annua* - *B. aristidoides*).

Cada uno de los 53 ejemplares es representativo de poblaciones únicas, cuentan con su respectivo voucher de colecta y corresponden a colecciones previamente identificadas y personalmente corroboradas (tabla 1.2).

Tabla 1.2 Listado del material vegetal utilizado en el análisis morfométrico. Cuando existe el registro, se pone entre paréntesis las coordenadas exactas del lugar de colecta.

<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>aristidoides</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher

Columbus 3104	Córdoba, Argentina (32° 00.39' S, 65° 03.56' W).	RSABG
Columbus 3106	San Luis, Argentina (32° 57.40' S, 66° 19.04' W).	RSABG
Columbus 3135	San Juan, Argentina (31° 43.00' S, 68° 8.20' W).	RSABG
Columbus 3141	La Rioja, Argentina (31° 21.47' S, 66° 47.99' W).	RSABG
Columbus 3146	La Rioja, Argentina (30° 14.16' S, 66° 52.10' W).	RSABG
Columbus 3150	Catamarca, Argentina (28° 50.80' S, 66° 14.39' W).	RSABG
Columbus 3160	Santiago del Estero, Argentina (28° 8.27' S, 64° 49.14' W).	RSABG
Columbus 3181	Tucumán, Argentina (26° 34.39' S, 65° 56.81' W).	RSABG
Columbus 3200	Salta, Argentina (26° 10.27' S, 65° 12.70' W).	RSABG
Columbus 3213	California, U.S.A. (34° 57.72' N, 116° 38.77' W).	RSABG
Columbus 3426	Piura, Perú (4° 8' 21'' S, 81° 5' 8'' W).	RSABG
Columbus 3430	Piura, Perú (5° 16' 25'' S, 80° 36' 47'' W).	RSABG
Columbus 3449	Lambayeque, Peru (5° 59' 46'' S, 79° 44' 46'' W).	RSABG
Columbus 3515	Cajamarca, Perú.	RSABG
Columbus 3948	Texas, U.S.A. (29° 40' 48" N, 103° 10' 59" W).	RSABG
Columbus 3969	New México, U.S.A. (32° 50' 30" N, 108° 08' 39" W).	RSABG
Columbus 4074	Nayarit, México (20° 53' 25" N, 105° 08' 04" W).	RSABG
Columbus 4085	Colima, México (19° 07' 00" N, 104° 18' 37" W).	RSABG
Columbus 4514	Chihuahua, México (27° 38' 01" N, 105° 15' 13" W).	RSABG
Columbus 4610	Oaxaca, México (16° 40' 56" N, 96° 19' 03" W).	RSABG
Columbus 4648	B.C.S., México (24° 16' 25" N, 110° 19' 11" W).	RSABG
Columbus 4755	B.C.S., México.	RSABG
Siqueiros 5280	B.C.S., México (24° 48' 2.9" N, 111° 33' 59.7" W).	HUAA
Siqueiros 5281	B.C.S., México (24° 48' 2.9" N, 111° 33' 59.7" W).	HUAA
Siqueiros 5283	B.C.S., México (24° 48' 2.9" N, 111° 33' 59.7" W).	HUAA
Siqueiros 5311	Sinaloa, México.	HUAA
<i>Bouteloua aristidoides var. arizonica</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Palmer 717	Arizona, U.S.A.	RSABG
Vera 1830	Arizona, U.S.A.	RSABG

Columbus 2273	Arizona, U.S.A. (31° 29' 43" N, 110° 51' 19" W).	RSABG
Columbus 2513	Arizona, U.S.A. (31° 35.923' N, 110° 29.078' W).	RSABG
Siqueiros 5216	Sonora, México (30° 57' 12.8" N, 110° 35' 42.2" W).	HUAA
Siqueiros 5217	Sonora, México (30° 57' 12.8" N, 110° 35' 42.2" W).	HUAA
Siqueiros 5218	Sonora, México (30° 57' 12.8" N, 110° 35' 42.2" W).	HUAA
Siqueiros 5219	Sonora, México (30° 57' 12.8" N, 110° 35' 42.2" W).	HUAA
Siqueiros 5220	Sonora, México (30° 57' 12.8" N, 110° 35' 42.2" W).	HUAA
<i>Bouteloua annua</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2433	B.C.S., México (27° 18' 27" N, 112° 56' 16" W).	RSABG
Columbus 2434	B.C.S., México (27° 24' 21" N, 112° 33' 16" W).	RSABG
Columbus 4649	B.C.S., México (24° 12' 52" N, 110° 13' 51" W).	RSABG
Columbus 4659	B.C.S., México (23° 25' 40" N, 110° 12' 04" W).	RSABG
Columbus 4679	B.C.S., México (24° 09' 30" N, 110° 54' 32" W).	RSABG
Columbus 4682	B.C.S., México (27° 17' 24" N, 112° 56' 17" W).	RSABG
<i>Bouteloua eriopoda</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2117	Texas, U.S.A. (31° 12' 48" N, 105° 29' 35" W).	RSABG
Columbus 2127	Texas, U.S.A. (30° 12' 37" N, 103° 10' 56" W).	RSABG
Columbus 2214	New México, U.S.A. (32° 05' N, 108° 59' W).	RSABG
Columbus 2267	California, U.S.A. (35° 12' 31" N, 115° 21' 16" W).	RSABG
Columbus 2806	Chihuahua, México (28° 57' 33" N, 105° 42' 10" W).	RSABG
Columbus 3246	Arizona, U.S.A. (32° 16' 11" N, 110° 38' 26" W).	RSABG
Columbus 3285	New México, U.S.A. (32° 40' 37" N, 106° 33' 38" W).	RSABG
Columbus 3370	Oklahoma, U.S.A. (36° 52' 55" N, 102° 48' 59" W).	RSABG
Columbus 3887	New México, U.S.A. (35° 27' 28" N, 106° 19' 44" W).	RSABG
Columbus 3964	New México, U.S.A. (32° 50' 30" N, 108° 08' 39" W).	RSABG
<i>Bouteloua eriostachya</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher

Columbus 2286	Coahuila, México (26° 14' 36" N, 102° 50' 44" W).	RSABG
Columbus 2843	Coahuila, México (26° 45' 17" N, 102° 09' 08" W).	RSABG

Análisis estadístico:

- **Creación de la matriz morfométrica**

Todas las mediciones fueron registradas y estandarizadas en Excel (esto último se logró restando el valor de la observación mas pequeña encontrada para cada caracter a cada observación y dividiendo el producto de esta resta entre el rango de datos, con la finalidad de obtener valores adimensionales directamente correlacionados, que van en rangos de 0 a 100), para posteriormente ser utilizadas en la elaboración de una matriz de datos morfométricos estandarizados en el programa NTedit. En el caso de valores faltantes, se les dio el valor arbitrario de 9999 para darle un tratamiento de dato atípico en el estudio estadístico (esto último de acuerdo al manual de instrucciones del programa NTedit).

Cada carácter fue evaluado en todos los ejemplares con una misma unidad de medida específica para su medición. Se utilizaron abreviaturas específicas tanto para cada carácter, como para cada ejemplar en la matriz morfométrica estandarizada (dos letras del nombre de la especie o variedad, seguido del número de colecta), esto con la finalidad de tener una buena apreciación de los resultados obtenidos en las figuras generadas (tabla 1.3).

Tabla 1.3 Listado de las unidades de medida empleadas para cada medición de carácter.

Abreviatura.	Significado.	Unidad de medida empleada.
DEsABr	Distancia entre el punto apical de la rama de espiga media, al lugar de nacimiento de la espiguilla apical.	Milímetros (mm).

LonAnA	Longitud de anteras de espiguillas de la espiga apical fértil de la inflorescencia.	Milímetros (mm).
LonAnB	Longitud de anteras de espiguillas de la espiga basal fértil de la inflorescencia.	Milímetros (mm).
LonBr	Longitud de espiga.	Centímetros (cm).
LonCar	Longitud de cariopsis.	Milímetros (mm).
LonEsp	Longitud de espiguilla.	Centímetros (cm).
LonInf	Longitud de inflorescencia.	Centímetros (cm).
LonLem	Longitud de lema.	Milímetros (mm).
LonPal	Longitud de palea.	Milímetros (mm).
Lon1Gl	Longitud 1.ra gluma.	Milímetros (mm).
Lon2Gl	Longitud 2.da gluma	Milímetros (mm).
NBrEsp	Número de espiguillas.	Adimensional.
NInfBr	Número de espigas.	Adimensional.

- **PCA**

Para la elaboración del análisis de componentes principales se llevó a cabo una serie de análisis progresivos previos consistente en la generación del coeficiente de correlación o similitud (a partir de la matriz morfométrica estandarizada), una matriz de correlación entre caracteres (por medio del empleo del coeficiente de correlación o similitud), la realización de los valores y vectores Eigen (usando la matriz de correlación entre caracteres), seguido por la obtención de la matriz de proyección (empleando los vectores Eigen obtenidos) y el graficado de los componentes principales (gracias a los datos obtenidos en la matriz de proyección).

- **PCO**

El análisis de coordenadas principales también requirió una serie de análisis progresivos: la obtención de una matriz de distancia entre los ejemplares y los caracteres evaluados (usando

la matriz morfométrica estandarizada), la realización de un doble centrado para los ejemplares y los caracteres evaluados (por medio del empleo de la matriz de distancia), la generación de valores y vectores Eigen tanto para los ejemplares como los caracteres evaluados (utilizando los respectivos valores centrados) y finalmente el graficado de las coordenadas (a partir de los vectores Eigen).

- **AEM**

El análisis de escalamiento multidimensional se construyó a partir de los valores de la matriz de distancia y vectores Eigen de los ejemplares empleados. También se evaluó el valor STRESS como parámetro estadístico de confiabilidad de los estudios.

- **Fenograma**

Finalmente, para corroborar la validez de los diversos taxa formados en los diagramas de PCA, PCO y AEM, se realizó un fenograma (bajo el criterio de agrupamiento UPGMA) a partir de la generación de la matriz del árbol fenético. También se obtuvo el valor estadístico de coeficiente de correlación cofenético de Pearson (también conocido como valor R, el cual indica el tipo de relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas) a partir de la elaboración de una matriz cofenética, esto último con la finalidad de evaluar el soporte estadístico al fenograma formado.

Resultados

Observaciones Generales:

Todos los ensayos realizados (PCA, PCO, AEM y fenograma) tienen repetitividad, valores estadísticos fuertes (valor STRESS de 0.17760 en el AEM y valor R de 0.8282 para el fenograma) (figura 1.1) y arrojan resultados similares entre sí.

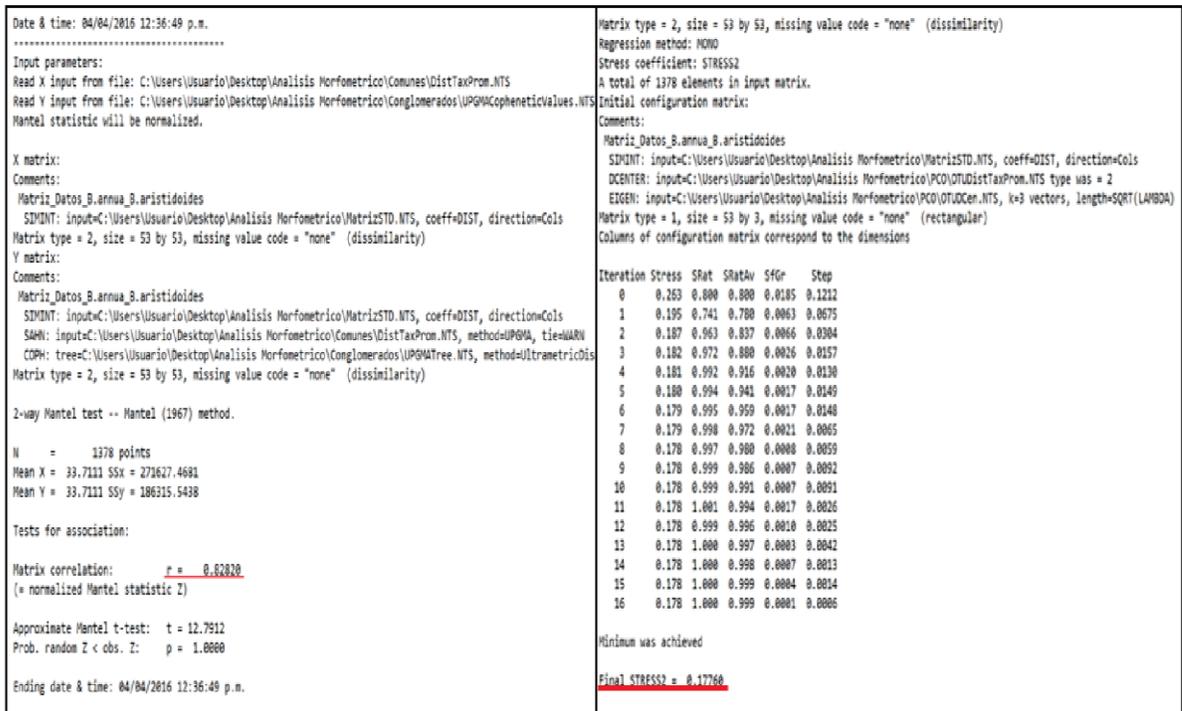


Figura 1.1 Recuadro izquierdo, cálculo del valor estadístico R; recuadro derecho, cálculo del valor estadístico STRESS. Ambos cálculos fueron hechos en el programa estadístico NTSYSpc 2.1.

Se determinaron los valores Eigen para cada uno de los 13 caracteres evaluados, dando la formación de tres componentes principales (a los cuales también se les determinó sus valores Eigen), dando en todos los casos valores ordenados descendentes de mayor a menor (figura 1.2).

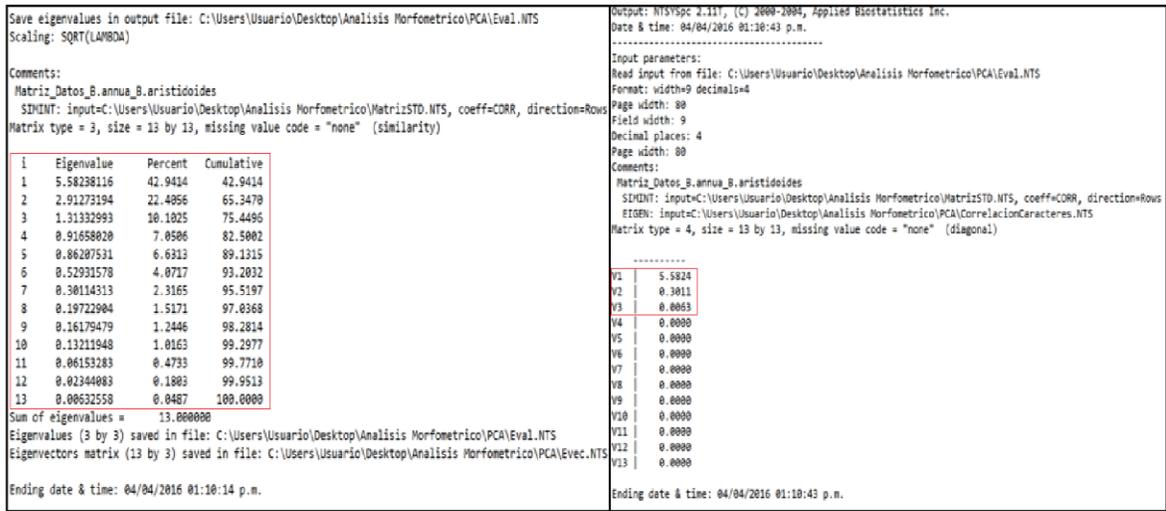


Figura 1.2 Recuadro izquierdo (cuadro rojo), valores Eigen de cada uno de los caracteres evaluados; recuadro derecho (cuadro rojo), formación y cálculo del valor Eigen de cada uno de los tres componentes principales. Ambos ensayos fueron hechos en el programa estadístico NTSYSpc 2.1.

La formación de los vectores Eigen arrojaron los caracteres evaluados que mejor explican la variabilidad de cada uno de los componentes principales formados, siendo (de mayor a menor grado) para el caso del componente 1, la longitud de anteras de espiguillas de la espiga apical fértil de la inflorescencia (LonAnA), longitud de lema de espiguilla media, longitud de anteras de espiguillas de la espiga basal fértil de la inflorescencia (LonAnB) y el número de espiguillas por espiga media (NBrEsp); para el componente 2, únicamente la distancia entre el punto apical de la rama de espiga media al lugar de nacimiento de la espiguilla apical; y ningún carácter para el caso del componente 3 (solo se tomaron en cuenta aquellos caracteres que por sí solos explicaran por lo menos el 80% o más de la variabilidad del componente en cuestión) (figura 1.3).

```

Output: NTSYSpc 2.11T, (C) 2000-2004, Applied Biostatistics Inc.
Date & time: 04/04/2016 01:11:48 p.m.
-----
Input parameters:
Read input from file: C:\Users\Usuario\Desktop\Análisis Morfométrico\PCA\Evec.NTS
Format: width=9 decimals=4
Page width: 80
Field width: 9
Decimal places: 4
Page width: 80
Comments:
Matriz_Datos_B.annua_B.aristidoides
SIMINT: input=C:\Users\Usuario\Desktop\Análisis Morfométrico\MatrizSTD.NTS, coeff=CORR, direction=Rows
EIGEN: input=C:\Users\Usuario\Desktop\Análisis Morfométrico\PCA\CorrelacionCaracteres.NTS, k=3 vectors, length=SQRT(LAMBDA)
Matrix type = 1, size = 13 by 3, missing value code = "none" (rectangular)
    
```

	C1	C2	C3
LonInf	0.3082	0.3700	0.5559
NInfBr	-0.6854	0.4525	-0.1446
LonBr	0.7258	0.4223	0.3014
LonEsp	0.2526	0.3323	0.4800
NBrEsp	<u>0.8030</u>	-0.4862	0.1592
LonCar	-0.5674	0.5612	-0.1422
LonPal	0.6656	0.5063	-0.4599
LonLem	<u>0.8212</u>	0.2992	-0.3823
Lon1G1	0.7200	-0.0187	-0.3964
Lon2G1	0.6405	0.6819	-0.1303
DEsABr	-0.1161	<u>0.9012</u>	0.2354
LonAnA	<u>0.8568</u>	-0.2581	0.0936
LonAnB	<u>0.8164</u>	-0.2030	0.1435

Figura 1.3 Determinación de los vectores Eigen. Subrayados en rojo se encuentran los vectores de los caracteres evaluados que mejor explican la variabilidad de cada uno de los componentes. Ensayo elaborado en el programa estadístico NTSYSpc 2.1.

En las figuras 1.4, 1.5, 1.6 y 1.7 se puede observar con claridad que los ejemplares de *B. annua* y *B. aristidoides* var. *arizonica* conforman dos grupos distintos, bien definidos (todos sus miembros están próximos unos a los otros) y conspicuamente separados entre sí. Lo anterior no aplica para *B. aristidoides* var. *aristidoides*, el cual a pesar de contener en una región pequeña a la mayoría de sus miembros evaluados, cuenta con siete ejemplares (uno de ellos incluido en el grupo formado por *B. arizonica*) que denotan una clara separación del grupo principal e interactúan entre ellos para formar lo que aparenta ser una serie de grupos propios. Con respecto a los vectores de los componentes principales del PCO, se observa en la figura 1.6, que tanto el componente 1 como el 3 se encuentran alejados de los grupos principales, no obstante para el componente 2, vemos que este se encuentra justo en medio de los grupos formados por *B. aristidoides* var. *arizonica* y *B. annua*.

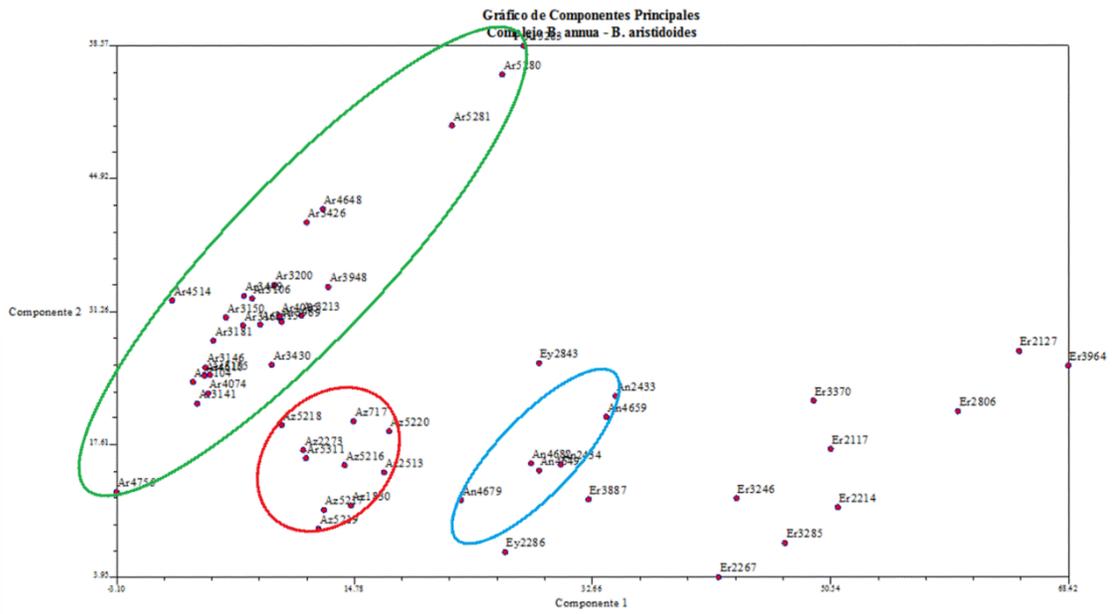


Figura 1.4 Análisis de Componentes principales. Componente 1 (eje X) vs Componente 2 (eje Y). Grupos de taxa de izquierda a derecha; óvalo verde *B. aristoides* var. *aristoides*, óvalo rojo *B. aristoides* var. *arizonica*, óvalo azul *B. annua*.

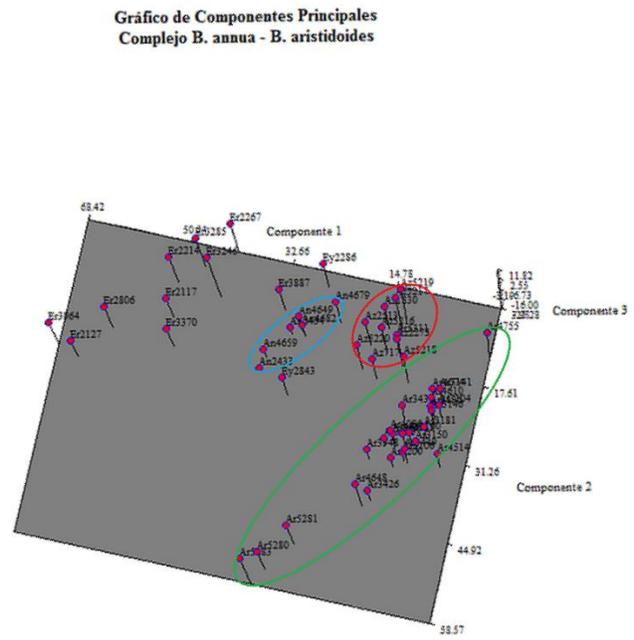


Figura 1.5 Análisis de componentes principales, vista tridimensional. Componente 1 (eje X) vs Componente 2 (eje Y) vs Componente 3 (eje Z). Grupos de taxa; óvalo verde *B. aristoides* var. *aristoides*, óvalo rojo *B. aristoides* var. *arizonica*, óvalo azul *B. annua*.

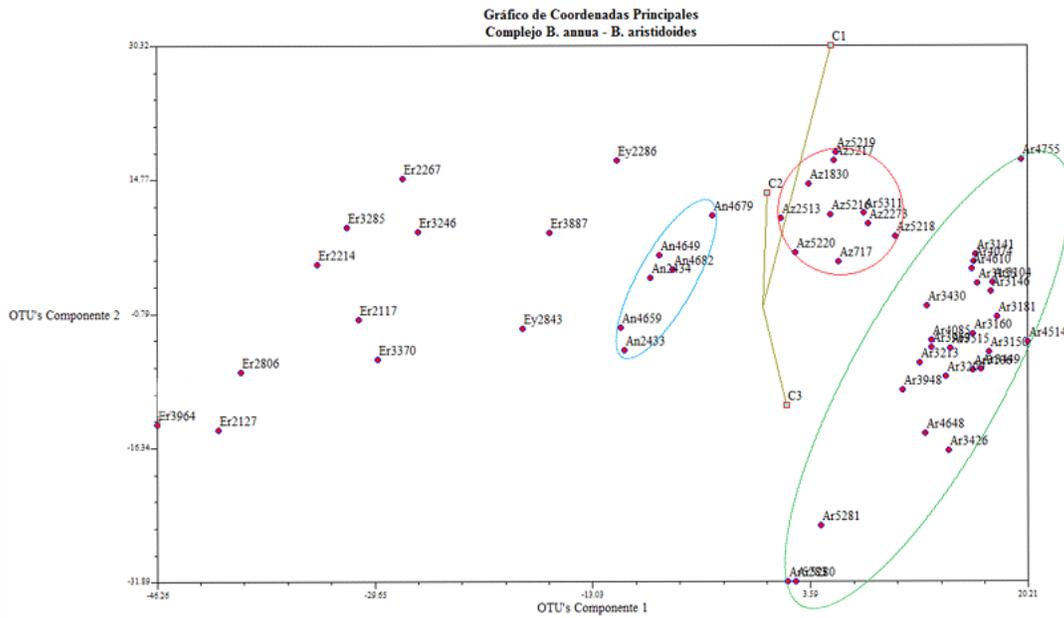


Figura 1.6 Análisis de coordenadas principales. Unidades taxonómicas operacionales (OTU's) Componente 1 (eje X) vs OTU's Componente 2 (eje Y). Grupos de taxa de izquierda a derecha; óvalo azul *B. annua*, óvalo rojo *B. aristoides* var. *arizonica*, óvalo verde *B. aristoides* var. *aristoides*. C1, vector centralizado del componente 1; C2, vector centralizado del componente 2; C3, vector centralizado del componente 3.

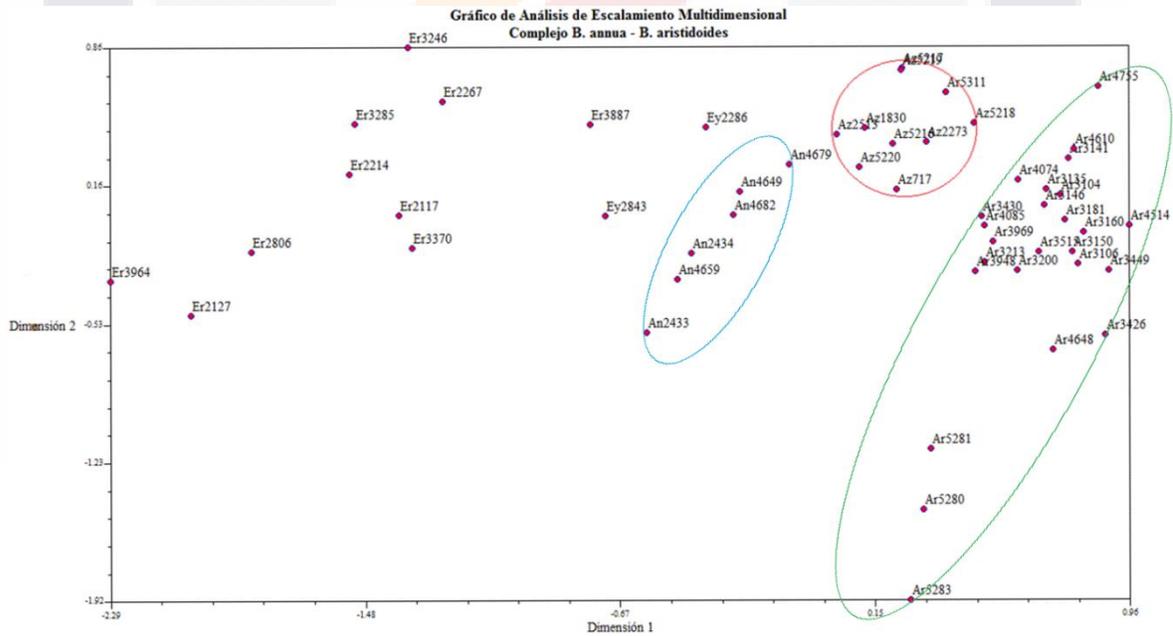


Figura 1.7 Análisis de escalamiento multidimensional. Dimensión 1 (eje X) vs dimensión 2 (eje Y). Grupos de taxa de izquierda a derecha; óvalo azul *B. annua*, óvalo rojo *B. aristoides* var. *arizonica*, óvalo verde *B. aristoides* var. *aristoides*.

El fenograma corrobora casi por completo la agrupación vista en los PCA, PCO y AEM de *B. aristidoides* var. *arizonica* y *B. annua*, a través de la similitud que presentan sus ejemplares entre ellos (salvo los ejemplares Columbus 4679 y Siqueiros 5311). Para el caso de *B. aristidoides* var. *aristidoides* vemos dos grandes agrupaciones, una de ellas más similar a *B. eriopoda* y *B. eriostachya*, mientras que la otra se encuentra más cercana a *B. aristidoides* var. *arizonica* y *B. annua* (ver figura 1.8).

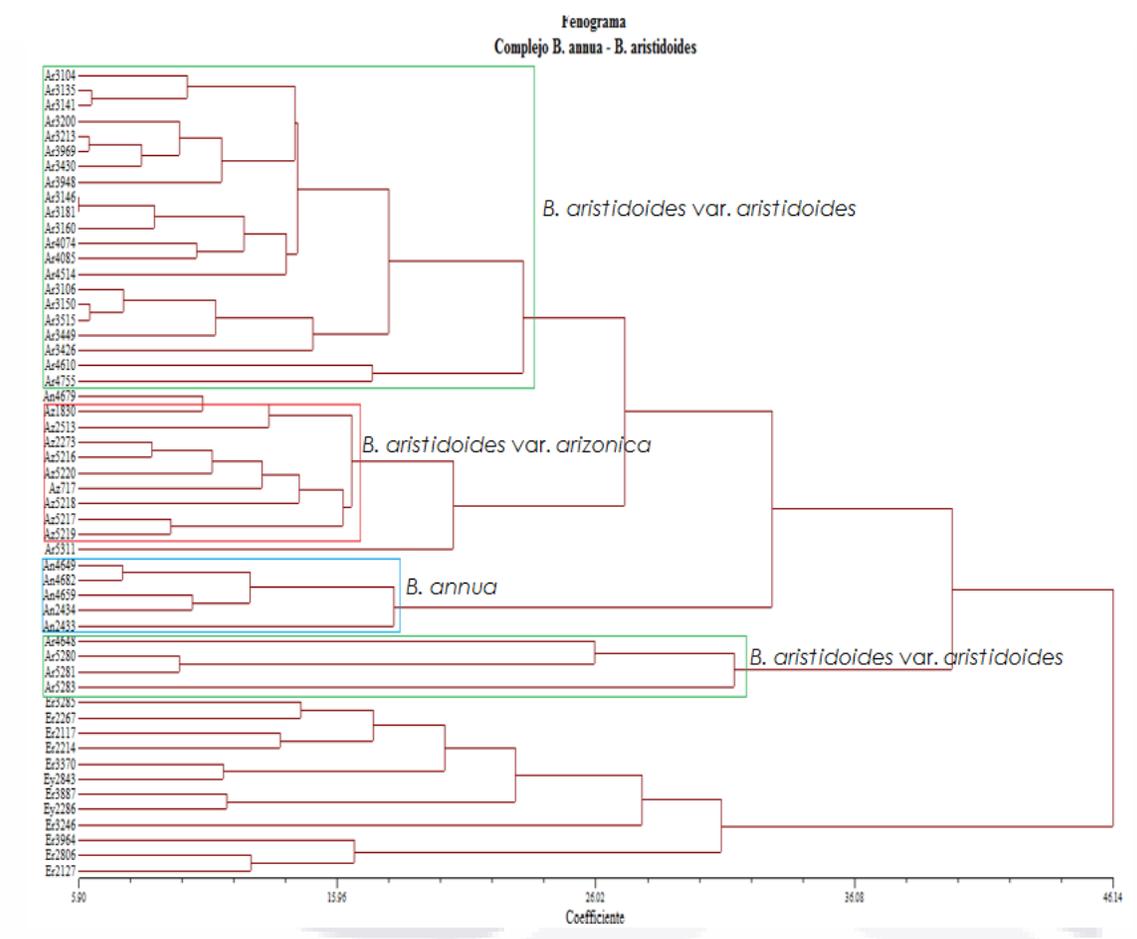


Figura 1.8 Fenograma elaborado a partir de la matriz usada para la construcción de los análisis morfométricos. Recuadro azul, grupo formado por los ejemplares de *B. annua*. Recuadro rojo, grupo formado por ejemplares de *B. aristidoides* var. *arizonica*. Recuadros verdes, grupos formados por ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides*.

Descripciones:

- *Bouteloua annua*

Los análisis morfométricos de PCA, PCO y AEM presentan datos similares entre sí, donde delimitan a los ejemplares evaluados de *B. annua* como un solo grupo.

De los tres componentes principales formados en el estudio, se puede apreciar con facilidad que el componente 2 guarda una relación muy cercana con el grupo formado de *B. annua*, ya que como se aprecia en la figura 1.6 el vector del componente 2 se grafica justo entre los grupos formados por *B. aristidoides* var. *arizonica* y *B. annua*, lo cual nos indica que los caracteres que mejor explican dicho componente (en específico el carácter de distancia entre el punto apical de la rama de espiga media al lugar de nacimiento de la espiguilla apical, el cual obtuvo un valor Eigen muy por encima de los demás caracteres), están fuertemente relacionados con la formación del grupo en cuestión (figura 1.6).

La exclusión del ejemplar 4679 arroja una cohesión más fuerte dentro del grupo formado por ejemplares de *B. annua* (figura 1.9).

Gráfico de Componentes Principales
Complejo B. annua - B. aristoides

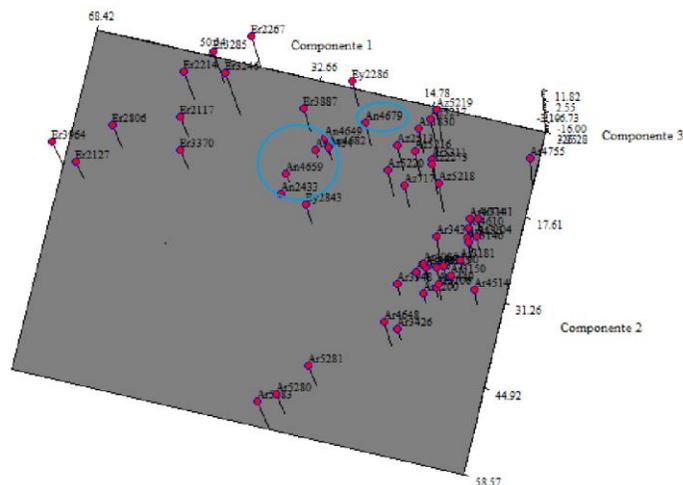


Figura 1.9 PCA, componente 1 (eje X) vs componente 2 (eje Y) vs componente 3 (eje Z). Circulo azul: nuevo grupo de *B. annua* formado al excluir el taxón 4679. Óvalo azul: taxón 4679 conspicuamente separado de los demás taxa de *B. annua*.

- *Bouteloua aristidoides* var. *aristidoides*

Los análisis morfométricos de PCA, PCO y AEM presentan datos similares entre sí, donde delimitan a los ejemplares evaluados de *B. aristidoides* var. *aristidoides* en un área de gran extensión, en la cual se pueden encontrar cuatro grupos de taxa formados e incluso un ejemplar que forma parte del grupo formado por *B. aristidoides* var. *arizonica* (figura 1.10).

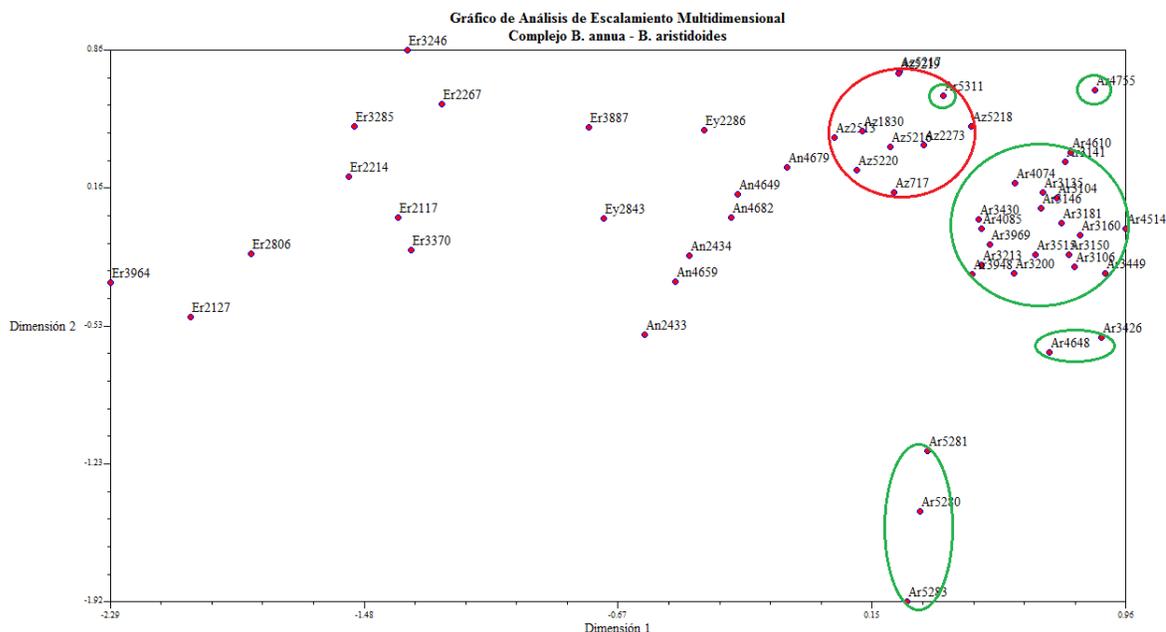


Figura 1.10 AEM, dimensión 1 (eje X) vs dimensión 2 (eje Y). Círculos verdes, grupos de *B. aristidoides* var. *aristidoides* formados. Círculo rojo, grupo de *B. aristidoides* var. *arizonica*.

El grupo principal formado por los ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides*, denota una semejanza morfométrica más cercana con *B. aristidoides* var. *arizonica* que con el grupo formado por *B. annua* (figuras 1.4, 1.5, 1.6 y 1.7).

De los tres componentes principales formados en el estudio, se puede apreciar con facilidad que el componente tres es el que guarda una relación más cercana con el grupo formado de *B. aristidoides* var. *aristidoides*, no obstante, dicho componente explica un mínimo porcentaje de la variabilidad total de la matriz morfométrica (0.10%) y ninguno de los caracteres evaluados en el componente tiene un valor significativo para explicar dicha variabilidad (ver figuras 1.2 y 1.3).

• ***Bouteloua aristidoides* var. *arizonica***

Tanto los análisis morfométricos de PCA, PCO y AEM, como el fenograma, presentan datos similares entre sí, donde delimitan a los ejemplares evaluados de *B. aristidoides* var. *arizonica* como un solo grupo formado, bien delimitado de los demás grupos y con una fuerte cohesión entre los ejemplares evaluados del grupo (figuras 1.4, 1.5, 1.6, 1.7 y 1.8).

El grupo formado por los ejemplares de *B. aristidoides* var. *arizonica*, presenta una relación morfométrica intermedia entre los grupos principales formados por los ejemplares de *B. annua* y *B. aristidoides* var. *aristidoides* (figuras 1.4, 1.5, 1.6 y 1.7).

De los tres componentes principales formados en el estudio, se puede apreciar con facilidad que el componente dos guarda una relación muy cercana con el grupo formado de *B. aristidoides* var. *arizonica* ya que una vez más, como se aprecia en la figura 1.6 el vector del componente 2 se grafica justo entre los grupos formados por *B. aristidoides* var. *arizonica* y *B. annua*, lo cual nos indica que los caracteres que mejor explican dicho componente (en específico el carácter de distancia entre el punto apical de la rama de espiga media, al lugar de nacimiento de la espiguilla apical), están fuertemente relacionados con la formación del grupo en cuestión (figura 1.6).

Capítulo 2: Anatomía de Hoja

Material

Los cortes transversales se realizaron en muestras de hojas de *Bouteloua* colectadas previamente por el Dr. Columbus y preservadas en solución de fijación (FPA), compuesta al 50% v/v por etanol al 95%, 5% v/v por ácido propiónico, 10% v/v por formalina y 35% v/v por agua desionizada. Se utilizaron envases de plástico pequeños para contener al material vegetal fijado en FPA.

Para la remoción de cutícula se utilizó ácido fluorhídrico al 30%, mientras que para el proceso de deshidratación, se emplearon una serie de diferentes soluciones a diversas concentraciones de etanol (al 30%, 50%, 70%, 90%, 95% y 100%), etanol-safranina (99%-1%), etanol-xileno (diluciones 2:1 y 1:2 al 100%) y xileno (100%). Se usaron envases de plástico pequeños (acompañados de pequeñas etiquetas de cartón marcadas con lápiz de grafito) como contenedores de las diversas soluciones y material vegetal.

En la infiltración se usaron diferentes soluciones de xileno-aceite mineral (diluciones 2:1 y 1:2 al 100%), aceite mineral (100%) y parafina (100%). Se utilizaron vasos de precipitado de 2 litros de volumen como contenedores de las soluciones, así como gasas de algodón, papel limpiador de lentes y casetes de plástico (etiquetados con lápiz de grafito) como contenedores de los trozos de hoja tratados.

La incrustación se realizó mediante el empleo de un histoincrustador marca Leica, modelo EG1160, en moldes de plástico embebidos con parafina y cubiertos por casetes de plástico.

Previo a la realización de los cortes histológicos, se emplearon navajas marca Gem para quitar el exceso de parafina de las muestras, así como una solución ablandadora de tejidos vegetales (9.7% v/v surfactante marca Aerosol, 2.9% v/v glicerina y 87.4% v/v agua desionizada) rebajada al 2% de su concentración con agua desionizada.

Los cortes histológicos se llevaron a cabo en un micrótopo rotatorio marca American Optical, modelo 820, utilizando navajas de micrótopo desechables de bajo perfil, marca Accu-Edge, modelo 4689.

En el montaje de los cortes histológicos se usaron laminillas marca Gold Seal de 1.2 milímetros de grosor, solución Sass (1% p/v agarosa, 0.5% p/v de ácido benzoico y 98.5% v/v de agua destilada), agua destilada, cubreobjetos marca Gold Seal, modelo 3423, de 0.16 a 0.19 milímetros de grosor y adhesivo comercial de cubre objetos marca Permount.

Las soluciones de tinción se prepararon acorde al protocolo de series de tinciones Sharman (Sharman et al., 1943), en frascos de vidrio de 500ml de volumen. También se ocupó la ayuda de un porta laminillas para transferir las muestras de una solución a otra.

Finalmente, las laminillas montadas con cortes transversales fueron analizadas en un microscopio marca Leica, modelo DME con objetivos de 4x, 10x, 40x y 100x, las fotografías tomadas se hicieron en una cámara Fujifilm, modelo AV100 de 12 megapíxeles, los registros de los análisis se llevaron a cabo en el programa Microsoft Office Excel 2007.

Cabe mencionar, que para la manipulación del material vegetal y preparación de soluciones, se emplearon diversas herramientas y material de laboratorio, como bisturís, pinzas de punta fina, pinceles, filtros de papel marca Whatman, cajas de Petri, matraces, vasos de precipitado, pipetas, agitadores magnéticos, etc. Para la edición de las fotografías tomadas se utilizó el programa Microsoft Paint.

Método

Material vegetal:

Se realizaron cortes transversales de hoja a 63 ejemplares para su estudio anatómico, 43 pertenecientes a *B. aristidoides* var. *aristidoides*, 5 de *B. annua*, 2 de *B. aristidoides* var. *arizonica*, 2 de *B. eriostachya* y 11 de *B. eriopoda* (estas últimas dos especies como grupo hermano de referencia para el complejo *B. annua* - *B. aristidoides*).

Cada uno de los 63 ejemplares es representativo de poblaciones únicas, cuentan con su respectivo voucher de colecta y corresponden a colecciones previamente identificadas y personalmente corroboradas (tabla 2.1).

Tabla 2.1 Listado del material vegetal utilizado en el análisis anatómico de hoja. Cuando existe el registro, se pone entre paréntesis las coordenadas exactas del lugar de colecta.

<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>aristidoides</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Herrera y Siqueiros 1312	Sinaloa, México.	HUAA
Columbus 2114	Texas, U.S.A. (31° 12' 48" N, 105° 29' 35" W).	RSABG
Columbus 2133	Texas, U.S.A. (29° 21' N, 103° 32' W).	RSABG
Columbus 2217	New México, U.S.A. (32° 05' N, 108° 59' W).	RSABG
Columbus 2359	Jalisco, México (19° 48' 42" N, 104° 04' 25" W).	RSABG
Columbus 2444	Arizona, U.S.A. (32° 39' 48" N, 114° 23' 05" W).	RSABG
Columbus 2644	Oaxaca, México (17° 53' 27" N, 97° 01' 22" W).	RSABG
Columbus 2692	Sonora, México (28° 34' 10" N, 109° 33' 05" W).	RSABG
Columbus 2788	Chihuahua, México (28° 22' 24" N, 106° 41' 35" W).	RSABG
Columbus 2801	Chihuahua, México (28° 54' 41" N, 105° 49' 23" W).	RSABG
Columbus 2816	Chihuahua, México (27° 46' 39" N, 104° 50' 16" W).	RSABG
Columbus 2831	Coahuila, México (25° 36' 37" N, 103° 11' 43" W).	RSABG
Columbus 2942	Sonora, México (27° 56' 04" N, 110° 37' 17" W).	RSABG
Columbus 2955	Sinaloa, México (25° 22' 23" N, 107° 59' 52" W).	RSABG

Columbus 2957	Sinaloa, México (25° 22' 23" N, 107° 59' 52" W).	RSABG
Columbus 2960	Sinaloa, México (23° 53' 33" N, 106° 37' 50" W).	RSABG
Columbus 2986	Jalisco, México (21° 02' 25" N, 104° 11' 57" W).	RSABG
Columbus 3015	Michoacán, México (18° 23' 17" N, 102° 10' 37" W).	RSABG
Columbus 3051	California, U.S.A.	RSABG
Columbus 3104	Córdoba, Argentina (32° 00.39' S, 65° 03.56' W).	RSABG
Columbus 3106	San Luis, Argentina (32° 57.40' S, 66° 19.04' W).	RSABG
Columbus 3135	San Juan, Argentina (31° 43.00' S, 68° 8.20' W).	RSABG
Columbus 3141	La Rioja, Argentina (31° 21.47' S, 66° 47.99' W).	RSABG
Columbus 3146	La Rioja, Argentina (30° 14.16' S, 66° 52.10' W).	RSABG
Columbus 3150	Catamarca, Argentina (28° 50.80' S, 66° 14.39' W).	RSABG
Columbus 3160	Santiago del Estero, Argentina (28° 8.27' S, 64° 49.14' W).	RSABG
Columbus 3181	Tucumán, Argentina (26° 34.39' S, 65° 56.81' W).	RSABG
Columbus 3200	Salta, Argentina (26° 10.27' S, 65° 12.70' W).	RSABG
Columbus 3213	California, U.S.A. (34° 57.72' N, 116° 38.77' W).	RSABG
Columbus 3426	Piura, Perú (4° 8' 21" S, 81° 5' 8" W).	RSABG
Columbus 3430	Piura, Perú (5° 16' 25" S, 80° 36' 47" W).	RSABG
Columbus 3449	Lambayeque, Peru (5° 59' 46" S, 79° 44' 46" W).	RSABG
Columbus 3515	Cajamarca, Perú.	RSABG
Columbus 3948	Texas, U.S.A. (29° 40' 48" N, 103° 10' 59" W).	RSABG
Columbus 3969	New México, U.S.A. (32° 50' 30" N, 108° 08' 39" W).	RSABG
Columbus 4074	Nayarit, México (20° 53' 25" N, 105° 08' 04" W).	RSABG
Columbus 4085	Colima, México (19° 07' 00" N, 104° 18' 37" W).	RSABG
Columbus 4514	Chihuahua, México (27° 38' 01" N, 105° 15' 13" W).	RSABG
Columbus 4610	Oaxaca, México (16° 40' 56" N, 96° 19' 03" W).	RSABG
Columbus 4648	B.C.S., México (24° 16' 25" N, 110° 19' 11" W).	RSABG
Columbus 4755	B.C.S., México.	RSABG
Columbus 4879	Argentina.	RSABG
Siqueiros 5283	B.C.S., México (24° 48' 2.9" N, 111° 33' 59.7" W).	HUAA
<i>Bouteloua aristidoides var. arizonica</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2273	Arizona, U.S.A. (31° 29' 43" N, 110° 51' 19" W).	RSABG
Columbus 2513	Arizona, U.S.A. (31° 35.923' N, 110° 29.078' W).	RSABG

<i>Bouteloua annua</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2433	B.C.S., México (27° 18' 27" N, 112° 56' 16" W).	RSABG
Columbus 2434	B.C.S., México (27° 24' 21" N, 112° 33' 16" W).	RSABG
Columbus 4649	B.C.S., México (24° 12' 52" N, 110° 13' 51" W).	RSABG
Columbus 4659	B.C.S., México (23° 25' 40" N, 110° 12' 04" W).	RSABG
Columbus 4679	B.C.S., México (24° 09' 30" N, 110° 54' 32" W).	RSABG
<i>Bouteloua eriopoda</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Herrera y Siqueiros 1340	Chihuahua, México.	HUAA
Columbus 2117	Texas, U.S.A. (31° 12' 48" N, 105° 29' 35" W).	RSABG
Columbus 2127	Texas, U.S.A. (30° 12' 37" N, 103° 10' 56" W).	RSABG
Columbus 2179	New México (32° 45' 54" N, 108° 08' 46" W).	RSABG
Columbus 2214	New México, U.S.A. (32° 05' N, 108° 59' W).	RSABG
Columbus 2267	California, U.S.A. (35° 12' 31" N, 115° 21' 16" W).	RSABG
Columbus 2461	Arizona, U.S.A. (31° 42' 03" N, 110° 31' 50" W).	RSABG
Columbus 2806	Chihuahua, México (28° 57' 33" N, 105° 42' 10" W).	RSABG
Columbus 3285	New México, U.S.A. (32° 40' 37" N, 106° 33' 38" W).	RSABG
Columbus 3887	New México, U.S.A. (35° 27' 28" N, 106° 19' 44" W).	RSABG
Columbus 3964	New México, U.S.A. (32° 50' 30" N, 108° 08' 39" W).	RSABG
<i>Bouteloua eriostachya</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2286	Coahuila, México (26° 14' 36" N, 102° 50' 44" W).	RSABG
Columbus 2843	Coahuila, México (26° 45' 17" N, 102° 09' 08" W).	RSABG

Fijación:

Se tomaron hojas maduras de la parte media del tallo de los ejemplares evaluados, al momento de su colecta. Las hojas se seccionaron en tres partes de longitud similar y se tomaron los segmentos medios, los cuales se cortaron en fragmentos menores a 5 milímetros de longitud. Posteriormente se introdujeron y etiquetaron en frascos de plástico que contenían FPA.

Todo el material vegetal se dejó en FPA por tiempos mayores a 24 horas antes de ser utilizados para el proceso de cortes transversales anatómicos.

Deshidratación e infiltración:

Para este proceso se hizo un primer paso de remoción de cutícula, dejando las hojas sumergidas en ácido fluorhídrico durante 72 horas, seguido por una serie de etapas de deshidratación paulatina, usando un gradiente de concentraciones (de menor a mayor) de etanol. Después, se sometieron las muestras a una primera tinción con solución de safranina disuelto en etanol al 100%. Finalmente, se logró la infiltración de los tejidos vegetales al someterlos a diferentes etapas de remoción de etanol e infiltración con xileno, aceite mineral y parafina (a través de gradientes de concentración) (tabla 2.2).

Tabla 2.2 Proceso detallado de deshidratación e infiltración del material vegetal de los ejemplares usados para el estudio anatómico de cortes transversales de hoja.

# Paso	Soluciones y concentraciones usadas.	Relación usada.	Exposición (horas)
1	30% Ácido fluorhídrico	n/a	72
2	30% Etanol	n/a	2
3	50% Etanol	n/a	2
4	70% Etanol	n/a	2
5	90% Etanol	n/a	2
6	95% Etanol	n/a	2
7	100% Etanol : Safranina	99:1	12
8	100% Etanol	n/a	2
9	100% Etanol : 100% Xileno	2:1	2
10	100% Etanol : 100% Xileno	1:2	2
11	100% Xileno	n/a	2
12	100% Xileno	n/a	2
13	100% Xileno : 100% Aceite mineral	2:1	2

14	100% Xileno : 100% Aceite mineral	1:2	2
15	Parafina	n/a	6
16	Parafina	n/a	6

A partir de la primera tinción con safranina, todas las muestras fueron puestas dentro de casetes de plástico, envueltas en papel limpiador de lentes (para evitar que salieran de los casetes). Todos los pasos en los que se usó xileno, se hicieron dentro de campana de extracción.

Incrustación:

Se tomaron las muestras infiltradas en parafina y se colocaron verticalmente en ángulo de 90° sobre moldes de plástico, los cuales se llenaron con parafina caliente (mediante el empleo del histoincrustador) y se taparon con casetes de plástico. Se dejó enfriar la parafina para que solidificara, formando así una matriz, la cual se separó fácilmente del molde de plástico.

El exceso de parafina, fue recortado a través de cortes longitudinales rectos, en las zonas radiales y tangenciales de las matrices, hasta llegar a una distancia de separación de 5 milímetros del material vegetal.

Cortes transversales de hoja:

Como paso preventivo, primero se llevó a cabo la calibración y lubricación del micrótopo, así como pruebas preliminares para identificar el ángulo de seccionamiento óptimo, el cual quedó establecido en 4° orientado en sentido contrario de las manecillas del reloj con respecto al eje vertical del micrótopo.

Se realizaron cortes transversales de las matrices de parafina en micrótopo, hasta estar en contacto con el material vegetal contenido en ellas. Después se colocaron las matrices en

contacto con una solución surfactante durante 24 horas, para lograr el reblandecimiento de los tejidos vegetales contenidos en la hoja.

Posterior a estos pasos preventivos, se procedió a la obtención de seccionamientos transversales continuos de 12 centímetros de longitud y 10 micras de grosor, de las hojas incrustadas en la matriz de parafina.

Preparación de laminillas:

Cada conjunto de 12 centímetros de seccionamientos transversales continuos, fue separado en tres fragmentos de cuatro centímetros de longitud cada uno. Posteriormente (y respetando el orden en el cual fue obtenido cada corte), cada uno de los 3 fragmentos, fue montado (con ayuda de la solución Sass y agua como adhesivos) en una misma laminilla de microscopio.

Se quitó con cuidado el exceso de agua de cada laminilla por decantación sobre papel filtro, para después colocar las muestras en un porta laminillas, el cual se introdujo a una estufa de secado a una temperatura de 30° centígrados durante 48 horas.

Tinciones:

Una vez que se tuvieron totalmente secos los cortes adheridos a las laminillas de microscopio, se prosiguió a la tinción de las muestras siguiendo el protocolo de Sharman et al. (1943). Dichas tinciones consisten en sumergir a las laminillas (con ayuda de un transportador), durante tiempos específicos y con agitación manual suave, en recipientes que contienen una serie de soluciones distintas, con el objetivo de lograr un proceso ordenado y específico de infiltración, deshidratación, tinciones, lavados y una segunda etapa deshidratación e infiltración de los tejidos vegetales (tabla 2.3).

Tabla 2.3 Protocolo de tinción establecido por Sharman et al. (1945), usado en los seccionamientos transversales de hoja del material vegetal evaluado para el análisis anatómico.

# Paso	Soluciones usadas.	Relación usada.	Tiempo de exposición (segundos)
1	100% Xileno	n/a	600
2	100% Xileno	n/a	600
3	100% Etanol :100% Xileno	1:1	300
4	100% Etanol	n/a	300
5	95% Etanol	n/a	120
6	90% Etanol	n/a	120
7	70% Etanol	n/a	120
8	50% Etanol	n/a	120
9	30% Etanol	n/a	120
10	H ₂ O	n/a	120
11	ZnCl ₂ : H ₂ O	1:50	60
12	H ₂ O	n/a	5
13	Safranina : H ₂ O	1:25,000	300
14	H ₂ O	n/a	5
15	Orange G : Ácido tánico : HCl : Timol : H ₂ O	50 : 125 : 5 : 1 : 2,500	60
16	H ₂ O	n/a	5
17	Ácido tánico : Timol : H ₂ O	125 : 1 : 2, 500	300
18	H ₂ O	n/a	1-3
19	NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ : H ₂ O	1 : 100	120
20	H ₂ O	n/a	15
21	30% Etanol	n/a	5
22	50% Etanol	n/a	5
23	70% Etanol	n/a	5
24	90% Etanol	n/a	5
25	95% Etanol	n/a	5
26	100% Etanol	n/a	5
27	100% Etanol	n/a	10

28	Xileno : Salicilato de metilo	3 : 1	120
29	100% Xileno	n/a	120
30	100% Xileno	n/a	120

Posterior a la tinción, las laminillas fueron cubiertas con sus respectivos cubreobjetos (usando un adhesivo de montaje comercial) y etiquetadas con la información de especie, variedad, parte seccionada, lugar de colecta, nombre de quien colecto, número de colecta y ubicación actual del ejemplar a cual pertenecen los seccionamientos.

Evaluación de laminillas:

Se analizaron los 63 ejemplares de forma general al microscopio, con la finalidad de identificar los caracteres anatómicos comunes más representativos de cada especie y variedad del complejo *B. annua* – *B. aristidoides*, no obstante, por cuestiones de tiempo, fueron solo 18 ejemplares los que se seleccionaron (7 ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides*, 2 ejemplares de *B. aristidoides* var. *arizonica*, 5 ejemplares de *B. annua* y como grupo externo de referencia, 2 de *B. eriostachya* y 2 de *B. eriopoda*), tratando de cubrir la mayor distribución posible de las poblaciones. Estos ejemplares seleccionados se sometieron a una búsqueda exhaustiva conforme al protocolo de Ellis de 1976 (tabla 2.4).

Tabla 2.4 Ejemplares seleccionados para ser sometidos a la búsqueda exhaustiva de caracteres anatómicos de cortes transversales de hoja, basándose en el protocolo establecido por Ellis R. P. en 1976.

<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>aristidoides</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 3104	Córdoba, Argentina (32° 00.39' S, 65° 03.56' W).	RSABG
Columbus 3426	Piura, Peru (4° 8' 21'' S, 81° 5' 8'' W).	RSABG
Columbus 3948	Texas, U.S.A. (29° 40' 48" N, 103° 10' 59" W).	RSABG
Columbus 4074	Nayarit, México (20° 53' 25" N, 105° 08' 04" W).	RSABG
Columbus 4610	Oaxaca, México (16° 40' 56" N, 96° 19' 03" W).	RSABG
Columbus 4648	B.C.S., México (24° 16' 25" N, 110° 19' 11" W).	RSABG
Siqueiros 5283	B.C.S., México (24° 48' 2.9" N, 111° 33' 59.7" W).	HUAA

<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>arizonica</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2273	Arizona, U.S.A. (31° 29' 43" N, 110° 51' 19" W).	RSABG
Columbus 2513	Arizona, U.S.A. (31° 35.923' N, 110° 29.078' W).	RSABG
<i>Bouteloua annua</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2433	B.C.S., México (27° 18' 27" N, 112° 56' 16" W).	RSABG
Columbus 2434	B.C.S., México (27° 24' 21" N, 112° 33' 16" W).	RSABG
Columbus 4649	B.C.S., México (24° 12' 52" N, 110° 13' 51" W).	RSABG
Columbus 4659	B.C.S., México (23° 25' 40" N, 110° 12' 04" W).	RSABG
Columbus 4679	B.C.S., México (24° 09' 30" N, 110° 54' 32" W).	RSABG
<i>Bouteloua eriopoda</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Herrera y Siqueiros 1340	Chihuahua, México.	HUAA
Columbus 3964	New México, U.S.A. (32° 50' 30" N, 108° 08' 39" W).	RSABG
<i>Bouteloua eriostachya</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2286	Coahuila, México (26° 14' 36" N, 102° 50' 44" W).	RSABG
Columbus 2843	Coahuila, México (26° 45' 17" N, 102° 09' 08" W).	RSABG

El protocolo de Ellis consiste en la evaluación de una serie de atributos anatómicos cualitativos y cuantitativos específicos, vistos en cortes transversales de hojas de miembros de la familia Poaceae. Estos atributos van cambiando su especificidad de acuerdo a la parte generalizada de la hoja que se evalúa. De esta forma, obtenemos evaluaciones de características específicas de los contornos de la lámina foliar, costillas, surcos, haces vasculares, células de la vaina del haz vascular, esclerénquima, mesófilo y elementos de la epidermis (tabla 2.5).

Tabla 2.5 Listado de los caracteres anatómicos evaluados en los 16 ejemplares seleccionados, acorde a lo estipulado en el protocolo de Ellis R. P. de 1976 (A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. I. The leaf-blade as viewed in transverse section).

Caracteres anatómicos evaluados en cortes transversales de ejemplares del complejo <i>B. annua</i> – <i>B. aristidoides</i>.	
Zona evaluada	Carácter evaluado
Contorno de la lámina foliar	Forma
	Anchura
	Grosor
Costillas y surcos	Ausencia
	Presencia en parte abaxial
	Presencia en parte adaxial
Haz vascular medio, costilla media y estructura de quilla	Ausentes
	Haz medio presente
	Costilla media presente
	Quilla desarrollada
Arreglos de haces vasculares	Numero de haces vasculares de 1er orden
	Arreglos y alternaciones
	Posición
Descripción del haz vascular	Haces vasculares de 1er orden
	Haces vasculares de 2do orden
	Haces vasculares de 3er orden
Vainas del haz vascular	Tipo de orden de haces vasculares
	Tipo de vaina rodeando haces vasculares
	Estructura de células de parénquima
	Presencia/Ausencia de Mestoma
Esclerénquima de la hoja	Órdenes de haces vasculares
	Esclerénquima adaxial
	Esclerénquima abaxial
	Estructura de células de esclerénquima

	Esclerenquima presente entre haces
	Esclerenquima de márgenes
Mesófilo de la hoja	Clorénquima
	Células transparentes
Células epidérmicas	Células buliformes en parte adaxial
	Células buliformes en parte abaxial
	Otras células epidérmicas y apéndices

Las descripciones propuestas en el protocolo de Ellis contienen un código numérico, gracias a esto, se elaboró una matriz de datos en Excel, en el cual se fueron llevando el registro de los caracteres evaluados de los 18 ejemplares analizados (en la sección de anexos se pone a manera ilustrativa una parte del protocolo de Ellis de 1976, así como parte de la matriz de datos en Excel, donde queda implícito la dinámica del empleo del código numérico en cuestión).

Todas las mediciones presentadas en este capítulo son aproximaciones tomadas de acuerdo a los criterios establecidos por el protocolo de Ellis de 1976.

Resultados

Observaciones Generales:

En esta sección se describen únicamente todos aquellos caracteres anatómicos que se mantuvieron invariables a lo largo de todos los ejemplares estudiados del complejo. En general, se encontró la mayor variabilidad anatómica para el complejo, en los caracteres de costilla media, esclerénquima, epidermis y en las formas de arreglos vasculares. Por otro lado, los contornos, anchura, grosor y formas generalizadas de la hoja, se mantuvieron prácticamente invariables en todo momento.

Todos los ejemplares presentan hojas abiertas, con el contorno de la lámina foliar extendido, plana, conspicuamente ondulada (corrugada), con una anchura de 1 a 2.5 mm y un grosor menor a 0.112 mm (figura 2.1).

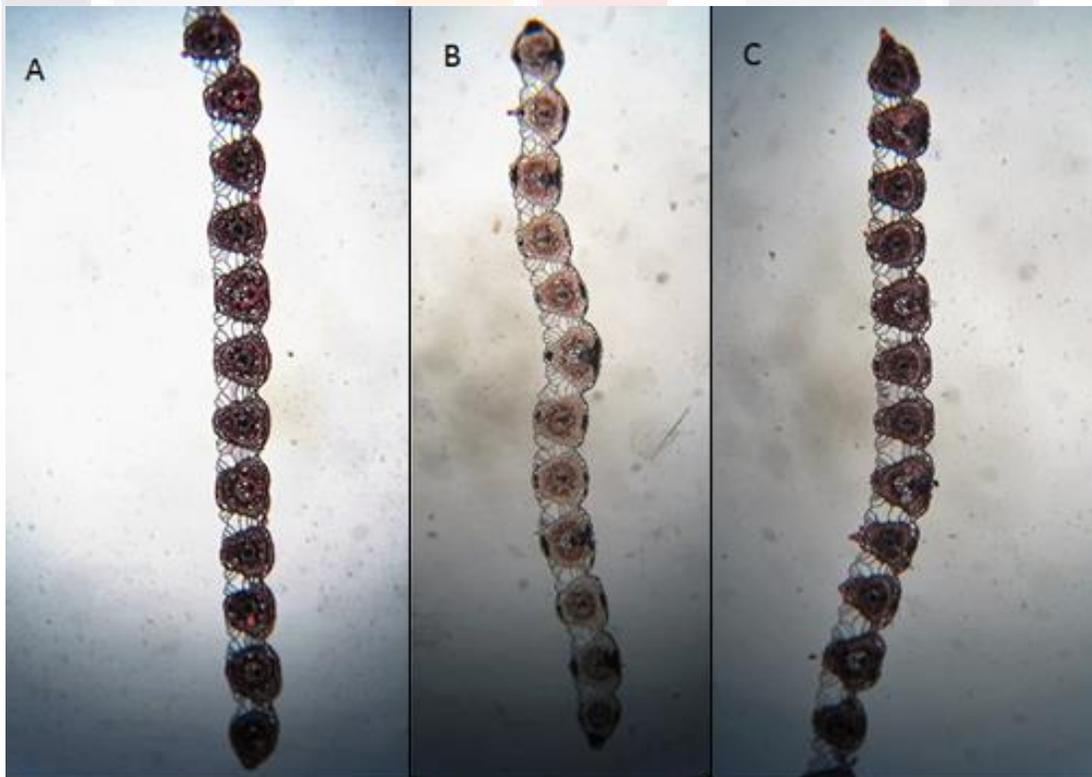


Figura 2.1 Cortes transversales de hojas visto a 10x. A: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 4648). B: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273). C: *B. annua* (Columbus 4649).

Costillas y surcos presentes en todos los haces vasculares, tanto en parte adaxial, como abaxial de todas las hojas. Surcos de zona adaxial de tipo superficial (una profundidad menor a la cuarta parte del grosor de la hoja) y amplios, a diferencia de los surcos de zona abaxial que son cortos y profundos. Costillas de zona abaxial más prominentes que en zona adaxial, con una distribución de tipo opuesta a los haces vasculares en ambas zonas. Todas las costillas están conformadas en la parte abaxial, por una banda o columna compuesta por células de esclerénquima en contacto con la epidermis. Todas las hojas analizadas contaban con una única costilla media conspicua, de proyección variable y sin quilla (figura 2.2).

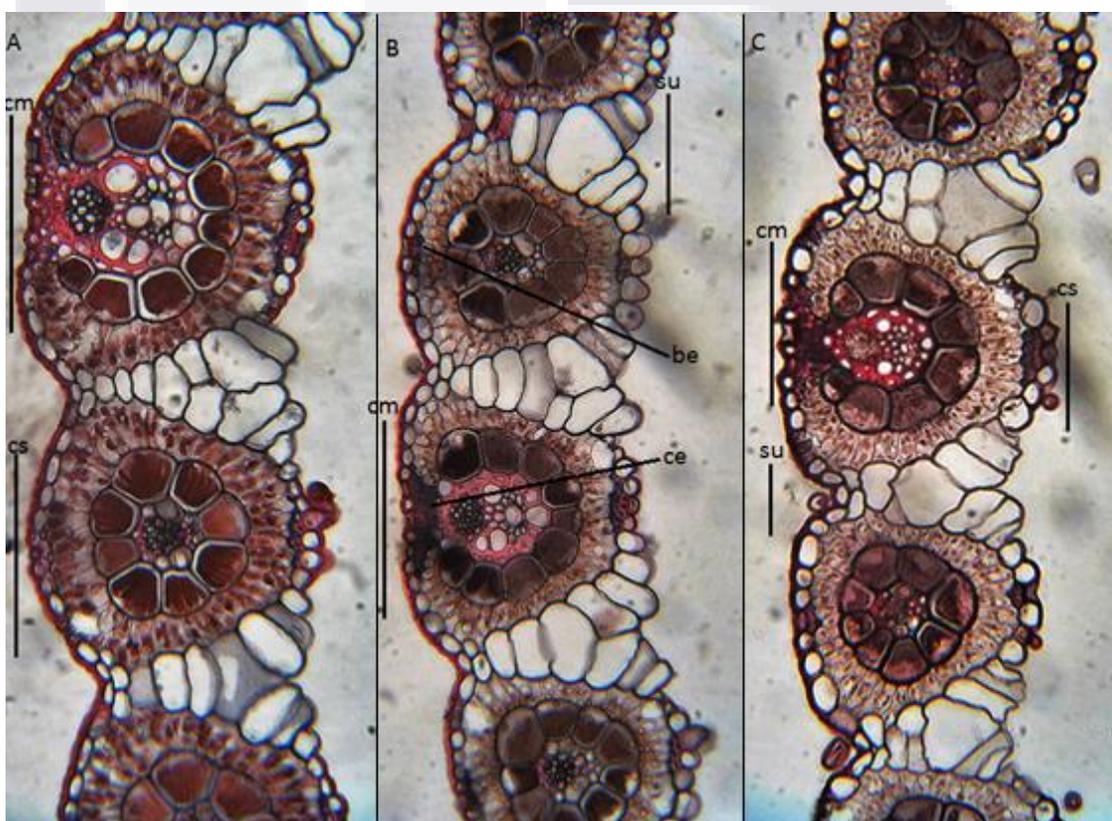


Figura 2.2 Cortes transversales de hojas visto a 40x. A: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 3948); B: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2513); C: *B. annua* (Columbus 2434). be: banda de esclerénquima; ce: columna de esclerénquima; cm: costilla media; cs: costilla; su: surco.

Hojas compuestas en su mayoría, por haces vasculares de primer y tercer orden (solo en ocasiones con haces de segundo orden presentes). Haces vasculares de tercer orden pequeños y formando un contorno circular, típicamente con xilema y floema indistinguibles,

consistentes de tan solo unas cuantas células lignificadas y hebras vasculares. Haces vasculares de primer orden con floema siempre en contacto con mestoma, y con un metaxilema angosto, en forma circular y con paredes celulares conspicuamente engrosadas (pared secundaria interna distinguible) (figura 2.3).

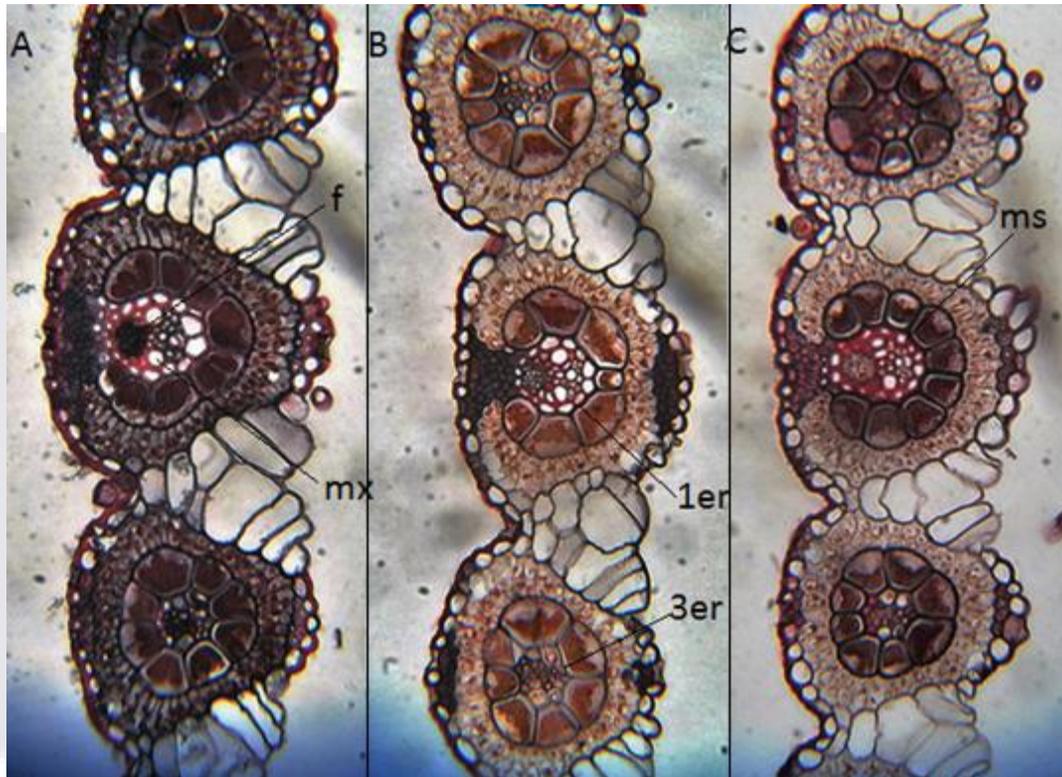


Figura 2.3 Cortes transversales de hojas visto a 40x. A: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 4610); B: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273); C: *B. annua* (Columbus 2434). 1. er: haz vascular de primer orden; 3er: haz vascular de tercer orden; f: floema; ms: mestoma; mx: metaxilema.

Células de la vaina del haz vascular de tipo parenquimatoso en su totalidad, con estructuras celulares individuales variadas, sin un patrón aparente. Células de vaina de haces de primer orden con cloroplastos alargados que cubren todo el lumen, un mestoma rodeando por completo al xilema y floema, sin extensiones de células parenquimatosas asociadas, paredes celulares ligeramente engrosadas (pared secundaria difícil de observar), las tangenciales de tipo infladas y las radiales rectas (como estructura más común). Células de vaina de haces de segundo orden (cuando están presentes), con cloroplastos alargados que cubren todo el lumen, paredes celulares ligeramente engrosadas (pared secundaria difícil de observar), las

tangenciales de tipo infladas y las radiales rectas (como estructura más común presente). Células de vaina de haces de tercer orden compuesto comúnmente por ocho células parenquimatosas que rodean completamente al haz vascular, con cloroplastos alargados que cubren todo el lumen, paredes celulares ligeramente engrosadas (pared secundaria difícil de observar), las tangenciales de tipo infladas y/o rectas y las radiales rectas (estructuras más comunes presentes); cuentan con un mestoma reducido (incompleto) en zona abaxial, compuesto por células colenquimatosas pequeñas, con paredes celulares fuertemente engrosadas y lumen pequeño, posicionadas en regiones adyacentes al floema (figura 2.4).

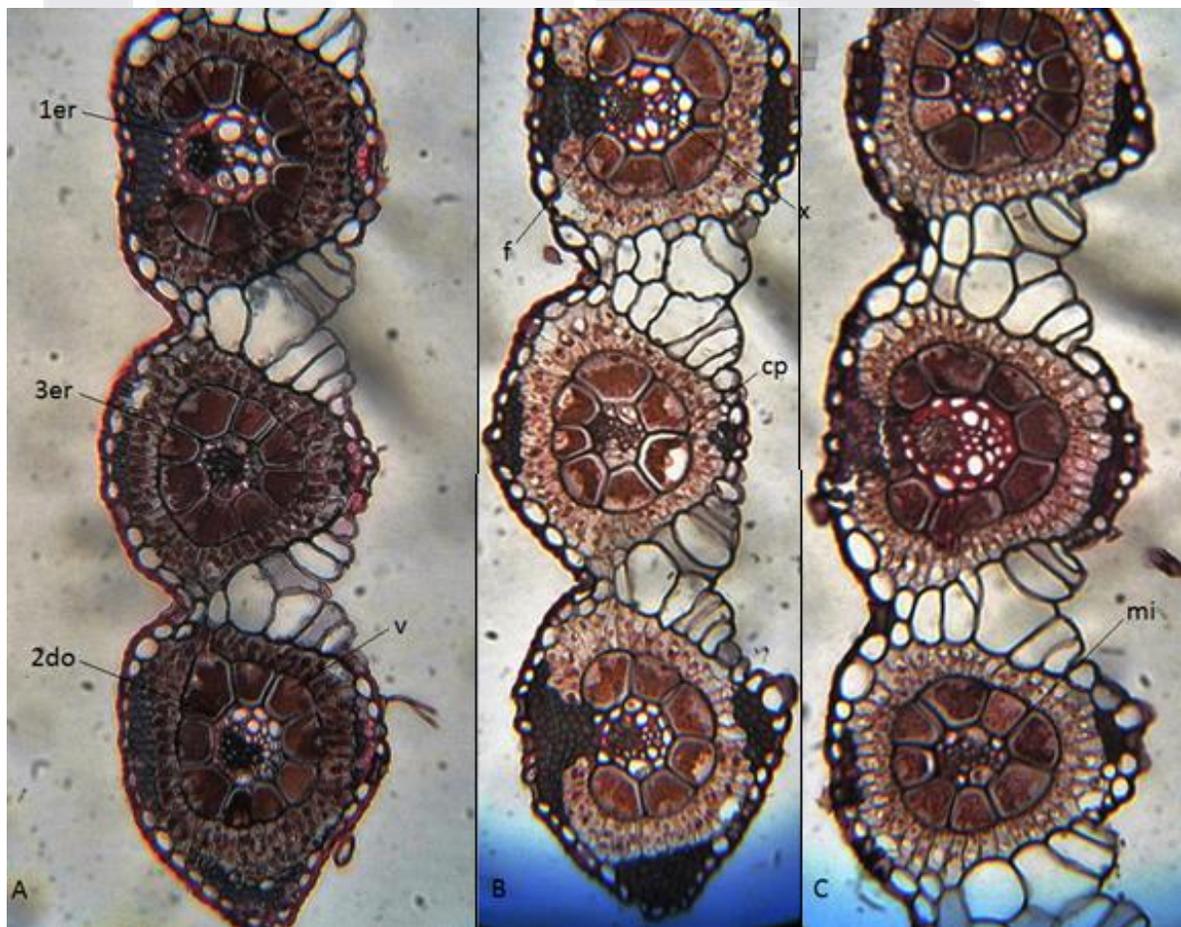


Figura 2.4 Cortes transversales de hojas visto a 40x. A: *B. aristoides* var. *aristoides* (Columbus 4074); B: *B. aristoides* var. *arizonica* (Columbus 2273); C: *B. annua* (Columbus 2433). 1er: haz vascular de primer orden; 2do: haz vascular de segundo orden; 3er: haz vascular de tercer orden; cp: cloroplasto; f: floema; mi: mestoma incompleto; v: células de la vaina del haz vascular (formadas en círculo); x: xilema.

Todas las células de esclerenquima están compuestas por fibras elongadas de gran grosor, con paredes celulares muy gruesas (lumen casi invisible), colindando con células normales del mesófilo, nunca dispuestas entre los haces vasculares y formando protuberancias puntiagudas en márgenes (figura 2.5).

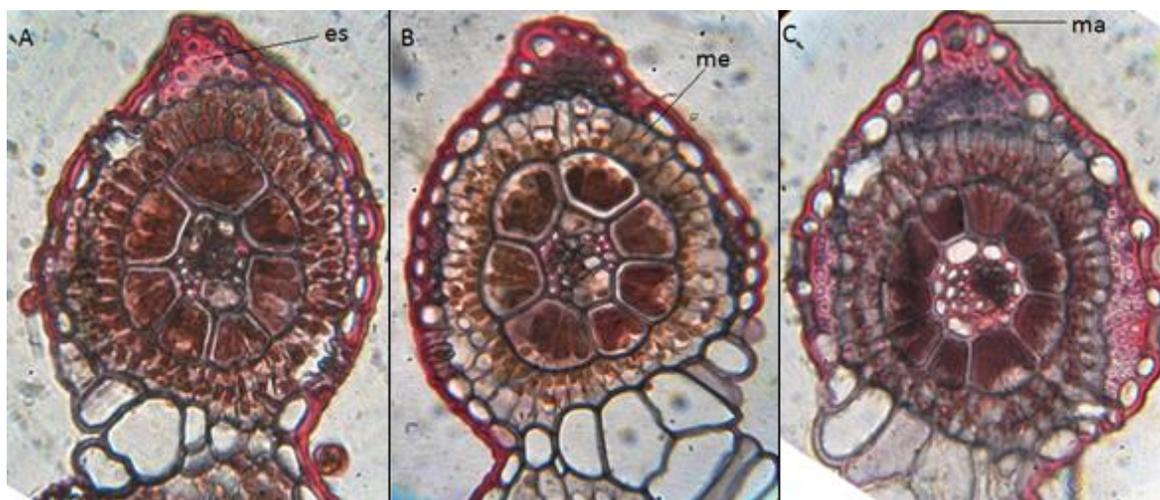


Figura 2.5 Cortes transversales de hojas visto a 100x. A: *B. aristoides* var. *aristoides* (Columbus 3426); B: *B. aristoides* var. *arizonica* (Columbus 2513); C: *B. annua* (Columbus 4659). es: células de esclerenquima; ma: margen de la hoja; me: mesófilo formado por células de clorénquima rodeando la vaina del haz vascular.

El área del mesófilo de las hojas está constituido por células de esclerenquima, clorénquima, transparentes y buliformes. Las células de clorénquima están dispuestas en un arreglo radial, distribuidas como una sola capa de células de forma tubular, y posicionadas alrededor de cada una las células de la vaina del haz, la mayoría de las veces rodeando por completo a los haces vasculares, pero otras veces, con interrupciones de columnas de esclerenquima, clara separación entre los grupos de células de clorénquima de los diferentes haces vasculares ya que siempre se encuentran completamente divididas por columnas uniseriadas de células transparentes y buliformes que se extienden desde la base del surco de la epidermis adaxial, hasta la epidermis abaxial. Por otro lado, las células transparentes se asocian en grupos bien definidos, cercanamente unidos a otros grupos de células buliformes, formando una clara extensión (mas angosta, y casi siempre única) de los grupos de células buliformes que se extiende hasta la epidermis abaxial, cada célula transparente individual conserva un tamaño irregular, que se asemeja al de las células de clorénquima y siempre es menor al de las células

buliformes, conservando formas ovoides de tipo irregulares. Los grupos de células buliformes siempre están presentes en contacto con la epidermis adaxial, pero nunca con la epidermis abaxial (figura 2.6).

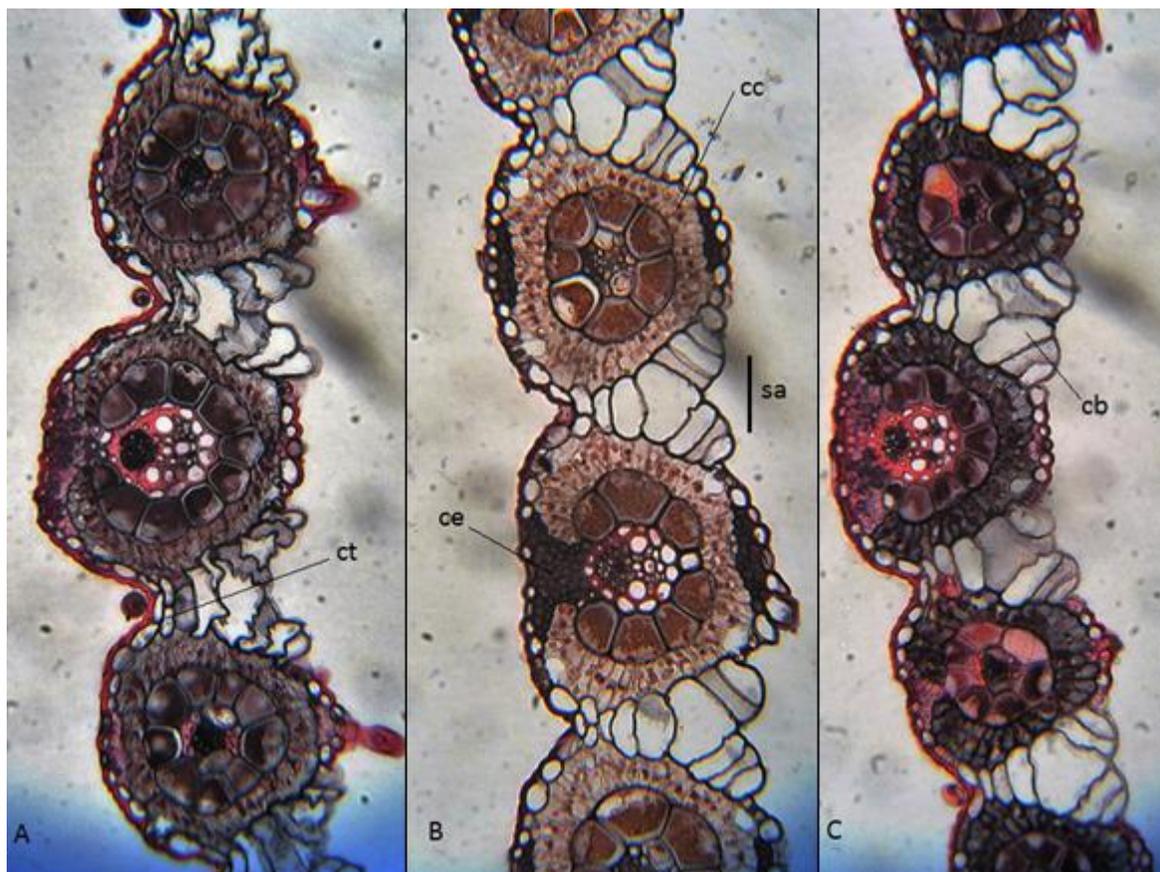


Figura 2.6 Cortes transversales de hojas visto a 40x. A: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 3104); B: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273); C: *B. annua* (Columbus 4679). cb: células buliformes; cc: células de clorénquima; ce: células de esclerénquima; ct: células transparentes; sa: surco de zona adaxial.

Para el caso de la epidermis, encontramos que las células que la conforman, siempre tienen todas sus paredes celulares gruesas y cubiertas por una cutícula gruesa continua a lo largo de toda la epidermis, no obstante el grosor de la cutícula y pared celular tangencial externa nunca llega a rebasar el grosor de la célula epidérmica promedio (figura 2.7). Todos los miembros del complejo contienen depósitos de cuerpos de sílice en epidermis abaxial y adaxial (figura 2.8). Es difícil encontrar un patrón general de tipos y distribución de tricomas en epidermis a partir de la evaluación de cortes transversales anatómicos de hoja.

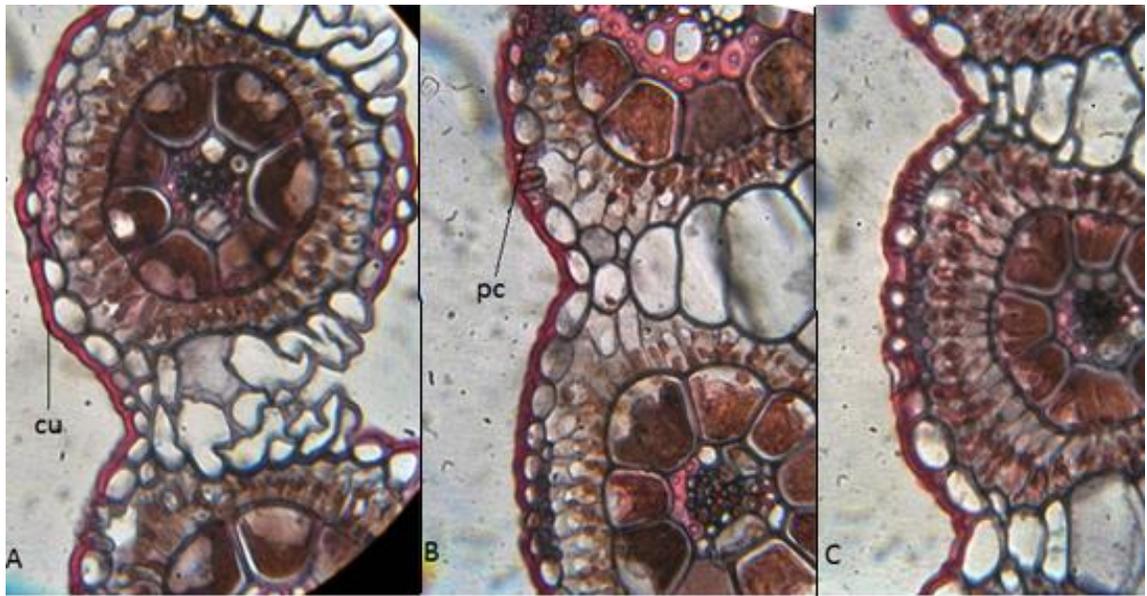


Figura 2.7 Cortes transversales de hojas visto a 100x. A: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 5283); B: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2513); C: *B. annua* (Columbus 4649). cu: cutícula de epidermis; pc: pared celular de célula epidérmica.

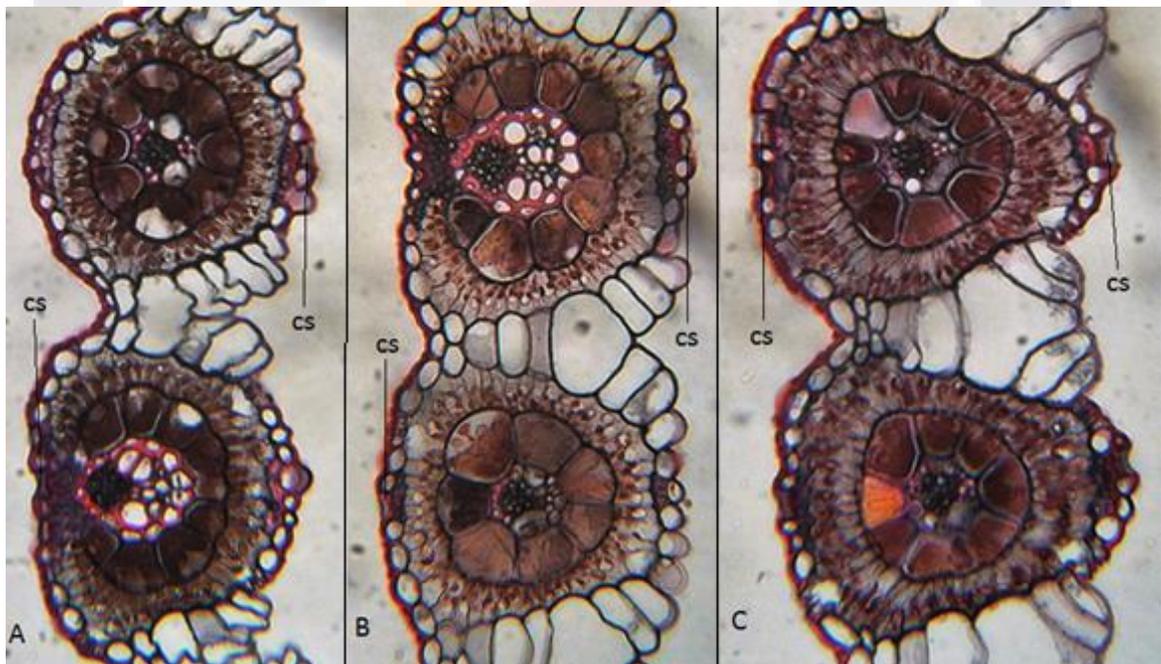


Figura 2.8 Cortes transversales de hojas visto a 100x. A: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 5283); B: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2513); C: *B. annua* (Columbus 4649). cs: cuerpo de sílice en epidermis de hoja.

Descripciones:

- *Bouteloua annua*

Se describen únicamente los caracteres anatómicos que comparten en común todos los ejemplares de *B. annua* examinados (descartando los caracteres ya descritos en las observaciones generales). Los caracteres de la zona del mesófilo presentaron muy poca variabilidad anatómica con respecto a las observaciones generalizadas hechas a partir de la evaluación de todas las especies, mientras que los caracteres de esclerénquima y células de la vaina del haz vascular, fueron los que más diferencias presentaron.

Entre los caracteres anatómicos propios de *B. annua*, encontramos la presencia de costillas similares (de tipo redondeado causado por presencia de células de esclerénquima), situadas por encima de cada uno de los haces vasculares en la parte adaxial de la hoja, mientras que las costillas abaxiales están compuestas por células de esclerénquima en forma de capuchones redondos o de capuchones planos (figura 2.9).

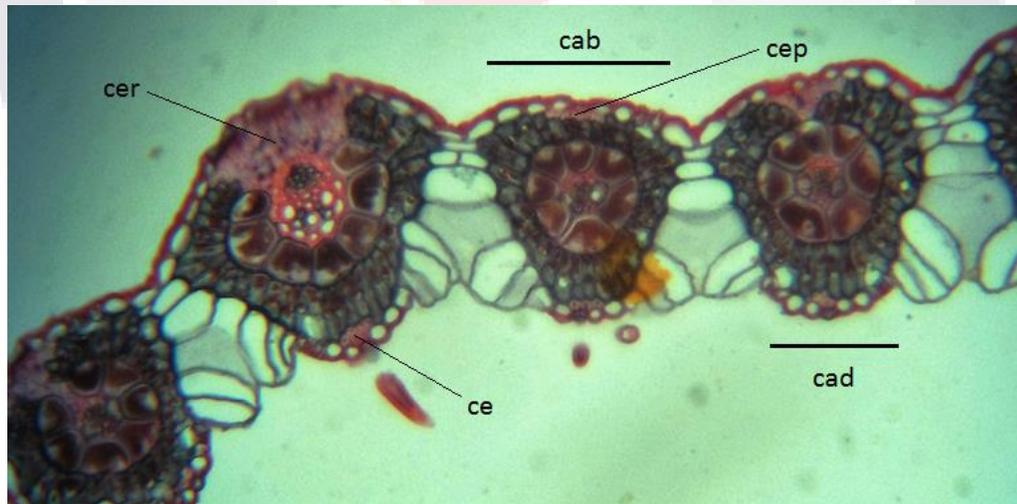


Figura 2.9 Corte transversal de hoja de *B. annua* (Columbus 2433) visto a 40x. cab: costilla abaxial; cad: costilla adaxial; ce: células de esclerénquima; cep: capuchón de esclerénquima plano; cer: capuchón de esclerénquima redondo.

Todos los ejemplares de *B. annua* revisados contienen haces vasculares de primer, segundo y tercer orden (los de segundo orden con contornos redondos) dispuestos en diferentes niveles de posicionamiento dependiendo del tipo de orden de haz vascular que se trate. Los haces vasculares de primer orden siempre se encuentran desplazados hacia la parte abaxial de las costillas de la hoja, mientras que los haces vasculares de tercer y segundo orden se mantienen centralizados en todo momento (figura 2.10).

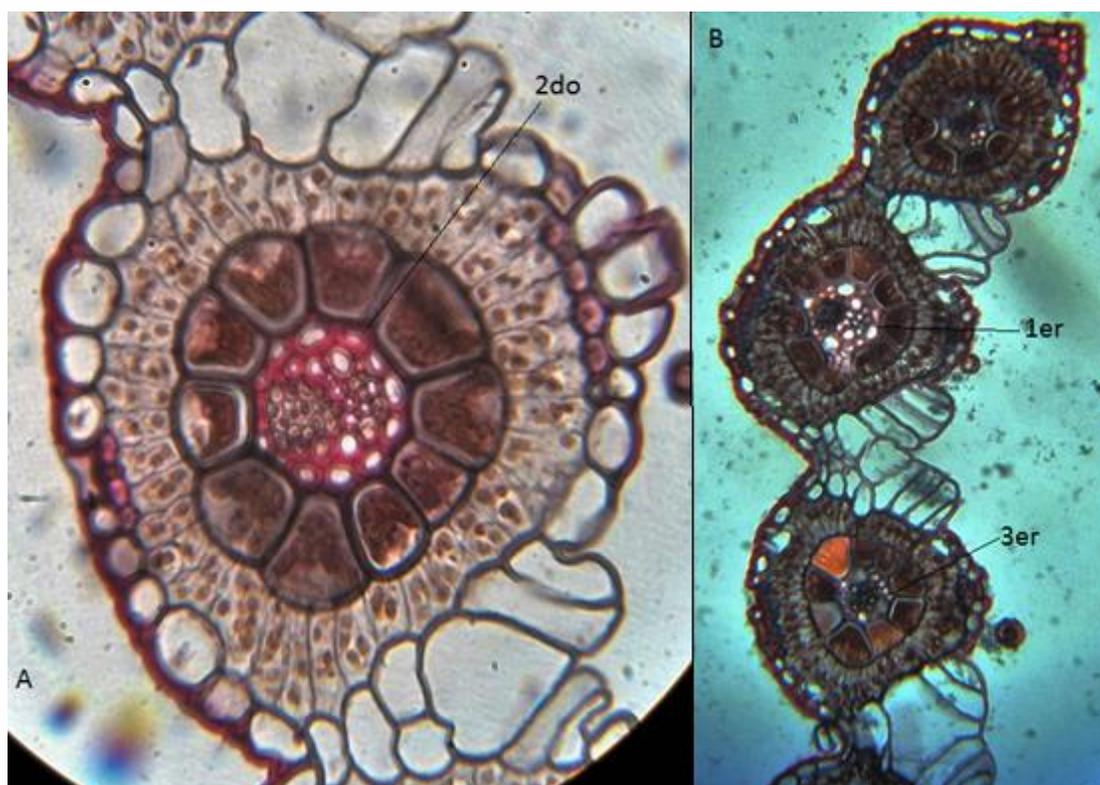


Figura 2.10 Cortes transversales de hojas de *B. annua*. A: Columbus 2434 visto a 100x. B: Columbus 4649 visto a 40x. 1er: haz vascular de primer orden; 2do: haz vascular de segundo orden; 3er: haz vascular de tercer orden.

Vaina del haz vascular de primer orden, comúnmente formada por nueve células parenquimatosas que rodean por completo al floema y xilema, de diversas formas irregulares, siendo la forma más común, la de paredes celulares radiales y tangenciales internas rectas, mientras que la pared celular tangencial externa se mantiene inflada (estructura de ventilador), en este tipo de orden de haz vascular es bastante común encontrar células de vaina del haz sin presencia de cloroplastos. Las células de la vaina del haz vascular que

conforman a los haces vasculares de segundo orden presentan células individuales con paredes celulares de gran grosor de diversas formas irregulares, siendo la estructura de ventilador la más común. En haces vasculares de tercer orden, el conjunto de células de la vaina del haz vascular presenta una forma circular compuesta en la mayoría de los casos por nueve células parenquimatosas de formas irregulares y sin la presencia de algún tipo extensión celular (figura 2.11).

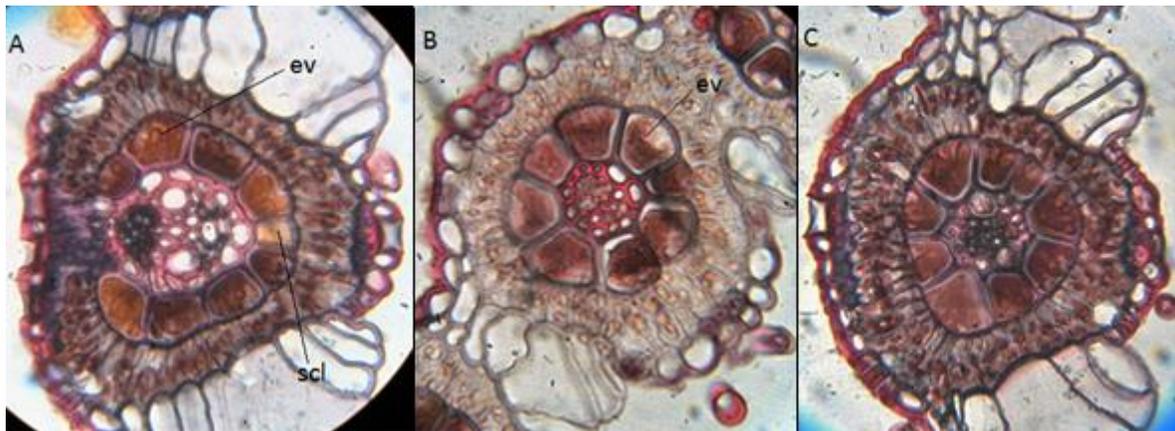


Figura 2.11 Cortes transversales de hojas de *B. annua*. A: Haz de primer orden (Columbus 4649) visto a 100x. B: Haz de segundo orden (Columbus 2434) visto a 100x. C: Haz de tercer orden (Columbus 4649) visto a 100x. ev: célula parenquimatosas de la vaina del haz con estructura de ventilador; scl: célula parenquimatosas de la vaina del haz sin cloroplastos visibles.

Los haces vasculares de tercer orden se caracterizan por tener una hilera muy reducida de esclerenquima subepidérmica en la zona adaxial de la hoja, compuesta por tan solo unas cuantas fibras. Así mismo, todos los ejemplares estudiados, presentaron un capuchón de células de esclerenquima muy bien desarrollado en los márgenes de las hojas (más amplio que la anchura de los haces vasculares de tercer orden). Se encontraron en todo momento células epidérmicas no fibrosas y con paredes celulares delgadas en márgenes (figura 2.12).

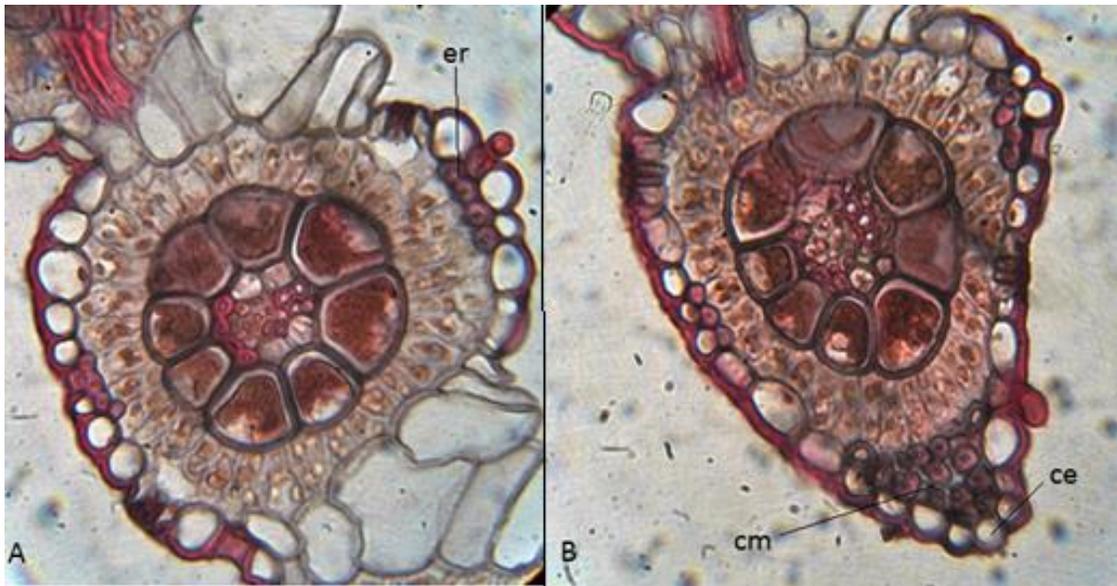


Figura 2.12 Cortes transversales de hojas de *B. annua* (Columbus 2434) visto a 100x. A: Haz vascular de tercer orden. B: Margen de hoja. ce: célula epidérmica; cm: capuchón de esclerénquima en margen de hoja; er: hilera reducida de esclerénquima.

Células buliformes y transparentes asociadas cercanamente, formando siempre una columna uni o biseriada que se extiende desde la base de la zona adaxial, hasta la epidermis abaxial. Dos tipos de pelos puntiagudos presentes en epidermis, de base bulbosa sin lengüeta y erectos sin base bulbosa (ver figura 2.13).

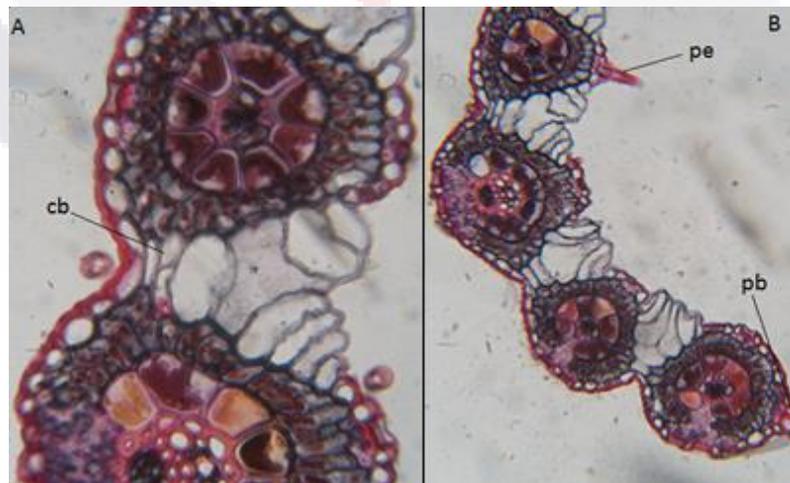


Figura 2.13 Cortes transversales de hojas de *B. annua* (Columbus 4679). A: Vista a 100x. B: Vista a 40x. cb: columna biseriada compuesta por células buliformes y células transparentes; pb: pelo de base bulbosa sin lengüeta; pe: pelo erecto sin base bulbosa.

- ***Bouteloua aristidoides* var. *aristidoides***

Se describen únicamente los caracteres anatómicos que comparten en común todos los ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides* examinados (descartando los caracteres de la especie ya descritos en las observaciones generales). En general se tiene una gran variabilidad de todos los caracteres anatómicos evaluados, conservando solo unos cuantos como invariables entre un ejemplar y otro. No obstante, los caracteres más conservados son aquellos que describen las generalidades y tipos de arreglos de haces vasculares. Por otro lado, los caracteres que más variabilidad tuvieron dentro del grupo, fueron aquellos para la descripción de epidermis, vainas del haz vascular, células buliformes y células transparentes.

Costilla media distinguible debido a proyección abaxial causada por posición del haz vascular. Haces vasculares de primer orden en forma de “huevo” (parte adaxial más ancha que la abaxial), desplazados adaxialmente en costillas, mientras que los haces vasculares de tercer orden siempre se encuentran centralizados (figura 2.13), haces vasculares con arreglo y alternación específica a lo largo de toda la hoja (dos haces vasculares de tercer y/o segundo orden consecutivos, seguidos de un haz vascular de primer orden) (ver figuras 2.14 y 2.15).

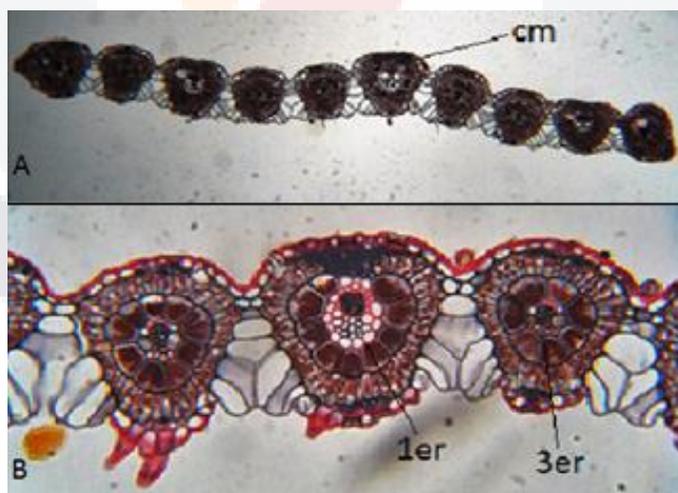


Figura 2.14 Cortes transversales de hojas de *B. aristidoides* var. *aristidoides*. A: Vista a 10x (Columbus 4074). B: Vista a 100x (Columbus 4610). cm: costilla media; 1er: haz vascular de primer orden; 3er: haz vascular de tercer orden.

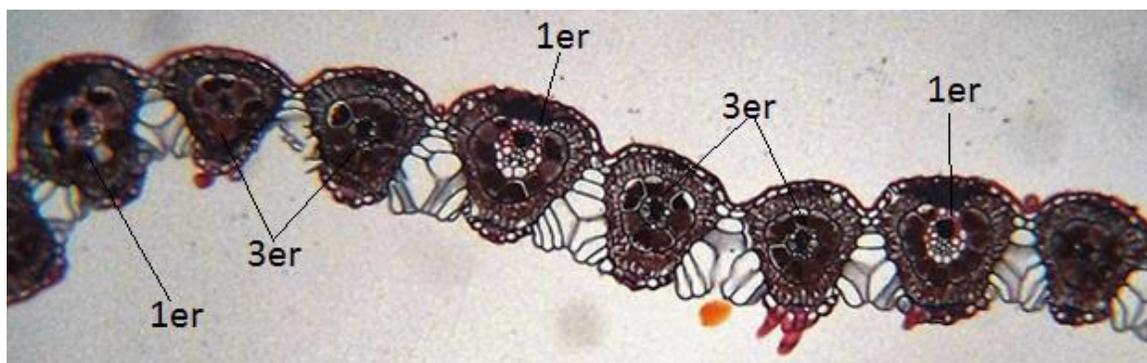


Figura 2.15 Cortes transversales de hojas de *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 4610) visto a 10x. 1er: haz vascular de primer orden; 3er: haz vascular de tercer orden.

Haces vasculares de primer y tercer orden son los más comunes, solo en ocasiones se tienen haces de segundo orden presentes. Vaina del haz vascular de primer orden sin rodear por completo a los tejidos vasculares (interrupción amplia en zona abaxial debido a la presencia de una columna profunda compuesta por células de esclerenquima de por lo menos tres células de ancho), forma de vaina tipo elíptica con elongación sobre el plano horizontal, células individuales de la vaina de tamaños irregulares pudiendo o no contener cloroplastos, cuando están presentes, se encuentran concentrados cerca de la pared celular tangencial interna. Células individuales de la vaina del haz vascular de tercer orden de tamaños irregulares, pudiendo o no contener cloroplastos, cuando están presentes, se encuentran concentrados cerca de la pared celular tangencial interna. Forma de la vaina de los haces vasculares de segundo orden (cuando están presentes) de tipo elíptica, con elongación sobre el plano horizontal, células individuales de la vaina completamente rodeando a los tejidos vasculares y nunca formando extensiones celulares hacia el área del mesófilo (figura 2.16).

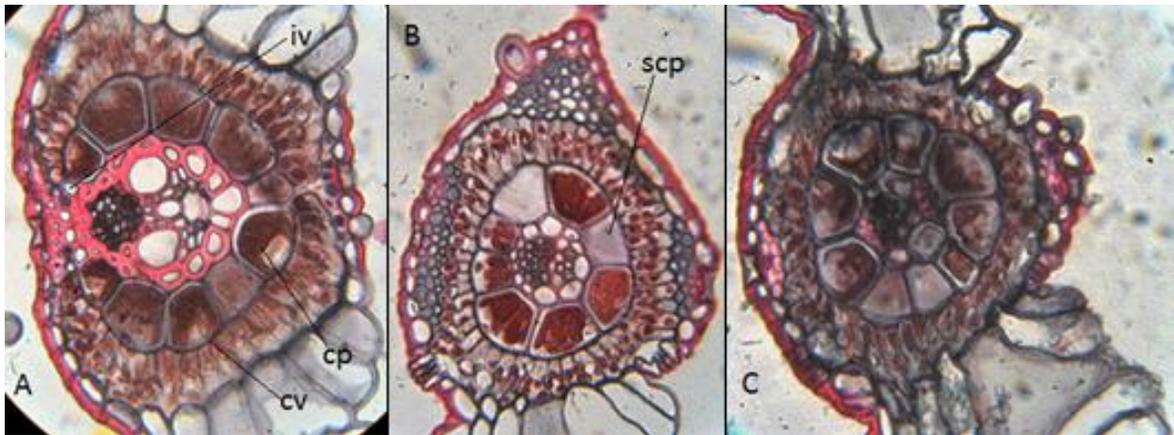


Figura 2.16 Cortes transversales de hojas de *B. aristidoides* var. *aristidoides* vistos a 100x. A: Haz vascular de primer orden (Columbus 3426). B: Haz vascular de segundo orden (Columbus 4610). C: Haz vascular de tercer orden (Columbus 3104). cp: cloroplastos presentes en célula de la vaina del haz; cv: células de la vaina del haz; iv: interrupción abaxial de la vaina del haz debido a células de esclerénquima; scp: células de la vaina del haz sin cloroplastos presentes.

Esclerénquima adaxial de haces vasculares de segundo orden siempre formando una pequeña banda superficial justo encima del haz, compuesta desde dos hasta cuatro fibras de profundidad y nunca alterando la forma o distribución de células epidérmicas. Las zonas de esclerénquima pueden llegar a estar conformadas tanto por fibras elongadas y gruesas de paredes celulares compuestas por lignina o celulosa (en columnas individuales o grupos de hileras), como por células colenquimatosas con lumen amplio. Células epidérmicas pequeñas y fibrosas con paredes celulares engrosadas (similares a fibras) en márgenes foliares (figura 2.17).

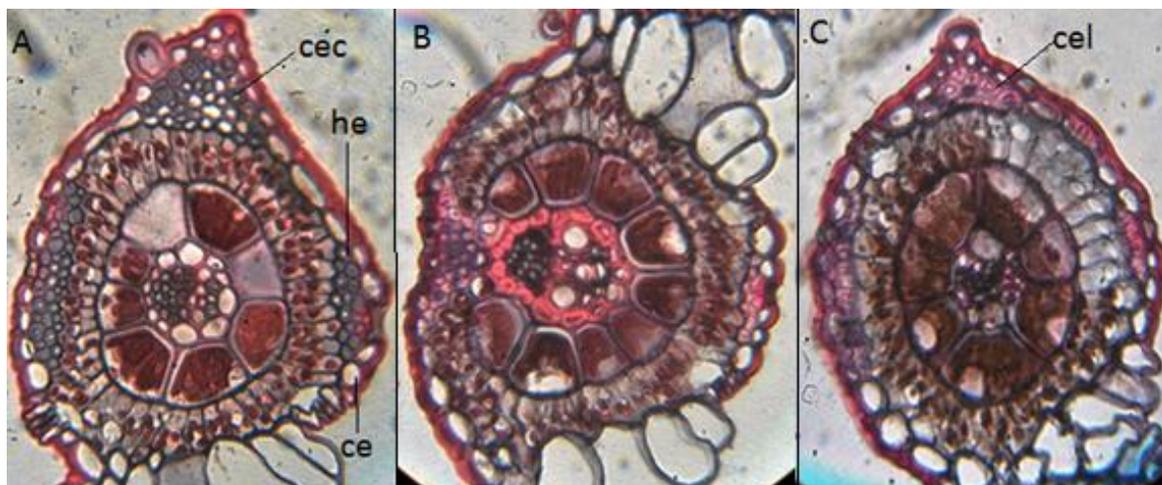


Figura 2.17 Cortes transversales de hojas de *B. aristoides* var. *aristoides* vistos a 100x. A: Haz vascular de segundo orden (Columbus 4610). B: Haz vascular de primer orden (Columbus 4648). C: Haz vascular de tercer orden (Columbus 5283). ce: células de epidermis; cec: células de esclerénquima con celulosa en pared celular; cel: células de esclerénquima con pared celular lignificada; he: banda de esclerénquima adaxial.

- ***Bouteloua aristidoides* var. *arizonica***

Se describen únicamente los caracteres anatómicos que comparten en común todos los ejemplares de *B. aristidoides* var. *arizonica* examinados (descartando los caracteres de la especie ya descritos en las observaciones generales). Destacan en variabilidad los caracteres descriptivos de esclerénquima, vaina del haz vascular y epidermis, mientras que los caracteres de haces vasculares y sus arreglos fueron los que menos variabilidad presentaron.

Todas las costillas adaxiales similares entre sí, con forma redondeada, situadas siempre por encima de los haces vasculares. Por otro lado, las costillas abaxiales se encuentran compuestas por células de esclerénquima en forma de capuchones redondos que sobresalen por encima de los haces vasculares. Presencia de costilla media proyectada siempre abaxialmente debido a la posición o tamaño del haz vascular medio (figura 2.18).

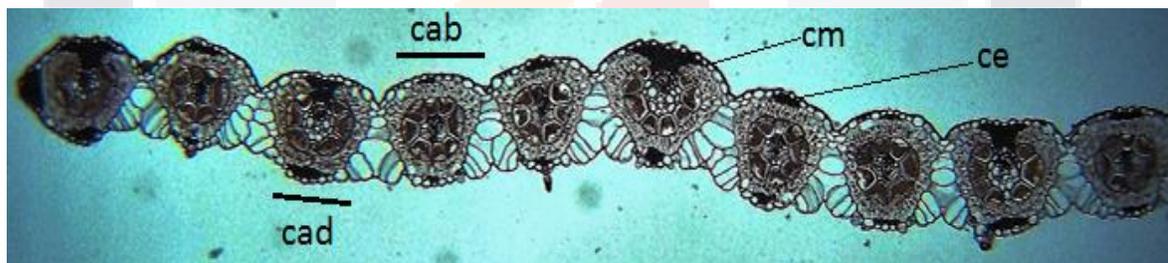


Figura 2.18 Corte transversal de hoja de *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) vista a 10x. cab: costilla de zona abaxial; cad: costilla de zona adaxial; ce: capuchón de esclerénquima; cm: costilla media.

Haces vasculares de primer y tercer orden siempre presentes, haces de segundo orden presentes solo en ocasiones. Forma de la vaina del haz vascular de primer orden elíptica (elongada horizontalmente), vaina casi siempre compuesta por ocho células de parénquima de formas y tamaños irregulares, interrumpidas en su continuidad en la parte abaxial debido a la presencia de una columna compuesta por más de tres fibras o células parenquimatosas de ancho, estructura de células individuales conformada por paredes celulares radiales y tangenciales internas rectas y paredes tangenciales externas infladas (forma de ventilador), conteniendo cloroplastos en su interior concentrados en zona cercana a la pared celular tangencial interna y un mestoma compuesto por células colenquimatosas adaxiales

conspicuamente más grandes que aquellas dispuestas en la zona abaxial. Forma de la vaina del haz vascular de tercer orden redonda (circular), vaina casi siempre compuesta por siete células parenquimatosas de distintas formas y tamaños, con presencia de cloroplastos en su interior concentrados cerca de la pared celular tangencial interna y sin extensiones de ningún tipo presentes (figura 2.19).

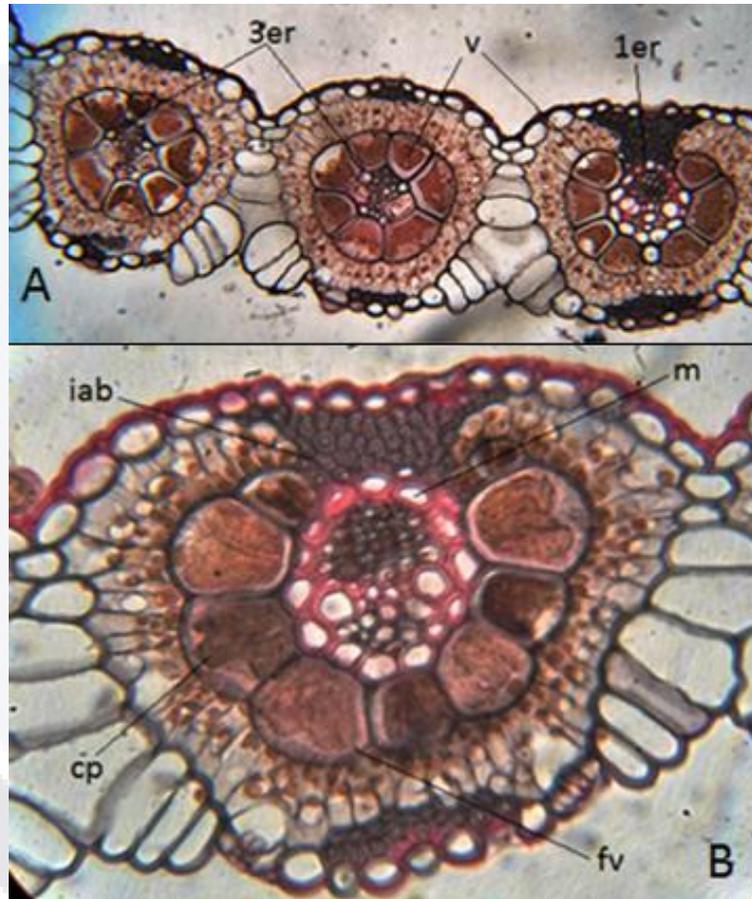


Figura 2.19 Cortes transversales de hoja de *B. aristidoides* var. *arizonica*. A: Haces vasculares de tercer y primer orden vistos a 40x (Columbus 2273). B: Haz vascular de primer orden visto a 100x (Columbus 2513). 1er: haz vascular de primer orden; 3er: haz vascular de tercer orden; cp: cloroplasto; fv: forma de ventilador de célula de la vaina del haz vascular; iab: interrupción de esclerenquima de la vaina del haz vascular; m: mestoma; v: vaina del haz vascular.

Esclerenquima de zona adaxial posicionado por encima de haces vasculares de primer orden y constituido por una hilera de células superficiales compuestas por dos a cuatro fibras de profundidad, columnas de esclerenquima de zona abaxial posicionadas por encima de haces

vasculares de primer orden de tipo fibroso y en contacto con células parenquimatosas de la vaina del haz celular. Esclerénquima posicionada por encima de haces vasculares de tercer orden de zona adaxial y abaxial compuesta por una hilera superficial minúscula compuesta por tan solo unas cuantas fibras, en ocasiones encontramos hileras superficiales de esclerénquima más grandes y profundas (de dos a cuatro fibras de profundidad) en zona abaxial. La mayoría de las células de esclerénquima tienen paredes celulares compuestas por celulosa. Capuchones de esclerénquima con forma puntiaguda bien desarrollados en márgenes (más anchos que haces vasculares de tercer orden), células epidérmicas del margen pequeñas, fibrosas y con paredes celulares engrosadas (figura 2.20).

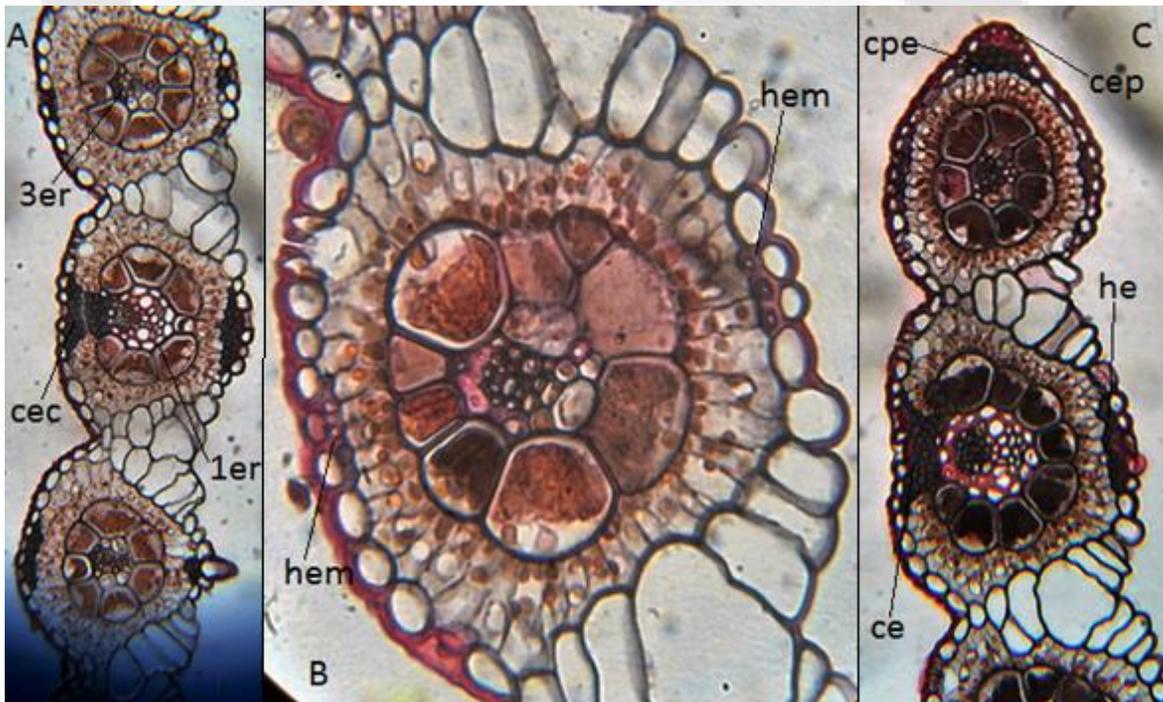


Figura 2.20 Cortes transversales de hoja de *B. aristoides* var. *arizonica*. A: Haces vasculares de primer y tercer orden visto a 40x (Columbus 2273). B: Haz vascular de tercer orden visto a 100x (Columbus 2513). C: Margen de hoja visto a 40x (Columbus 2513). 1er: haz vascular de primer orden; 3er: haz vascular de tercer orden; ce: columna de esclerénquima; cec: paredes celulares de células de esclerénquima compuestas por celulosa; cep: células epidérmicas de margen; cpe: capuchón de esclerénquima en margen de hoja; he: hilera de células de esclerénquima; hem: hilera de células de esclerénquima diminuta.

Extensión radial de células de clorénquima de la zona del mesófilo en ocasiones interrumpida por encima del haz vascular por columnas de células de esclerénquima. Células buliformes

íntimamente asociadas a células transparentes formando una columna biseriada que se extiende a lo largo de toda la hoja (figura 2.21)



Figura 2.21 Corte transversal de hoja de *B. aristidoides* var. *arizonica* visto a 40x. cb: células buliformes; ct: células transparentes; icl: interrupción de la extensión radial de células de clorénquima ocasionadas por columnas de células de esclerénquima.

Pelos puntiagudos de base bulbosa y sin lengüeta presentes a lo largo de toda la epidermis de la hoja, papilas anchas (casi tan anchas como células epidérmicas) de paredes celulares internas delgadas y paredes externas distales engrosadas, esparcidas en toda la epidermis (figura 2.22).

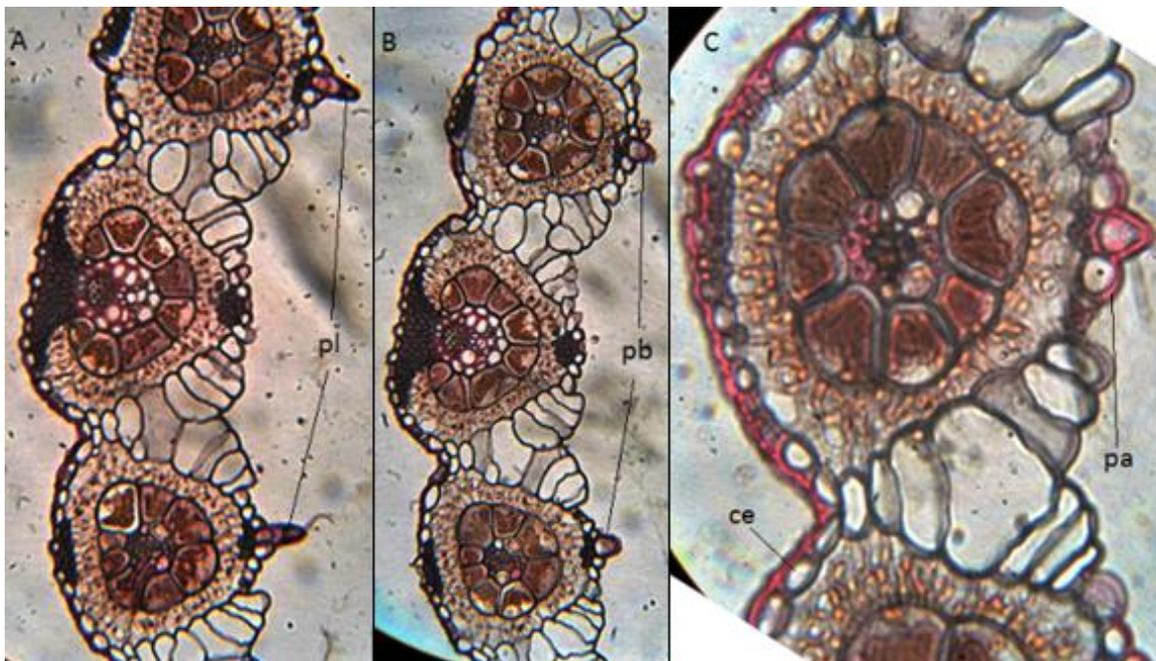


Figura 2.22 Cortes transversales de hojas de *B. aristidoides* var. *arizonica*. A: pelos puntiagudos con lengüeta (pl) vistos a 40x. B: pelos puntiagudos de base bulbosa sin lengüeta vistos a 40x. C: papilas (pa) y células de epidermis (ce) vistas a 100x.

Capítulo 3: Micromorfología de Lámina Foliar

Material

Se usaron hojas de ejemplares del RSABG preservadas en solución de fijación (FPA) compuesta al 50% v/v por etanol al 95%, 5% v/v por ácido propiónico, 10% v/v por formalina y 35% v/v por agua desionizada. Se utilizaron envases de plástico pequeños para contener al material vegetal fijado en FPA.

Para la deshidratación de las hojas se usó una serie de soluciones de etanol de diversas concentraciones (30%, 50%, 70%, 90%, 95% y 100%), así como dióxido de carbono líquido por medio del empleo de un secador de punto crítico marca Pelco. Se usaron casetes de plástico (marcados con lápiz de grafito) como contenedores del material vegetal y vasos de precipitado de 1 litro de volumen, como contenedores de las diversas soluciones de etanol.

Previo al análisis, las muestras vegetales fueron adheridas a portaobjetos metálicos cilíndricos y revestidas con partículas finas de oro mediante el empleo de un revestidor automático de pulverización catódica a base de Argón marca Pelco, modelo SC-7.

Para el análisis micromorfológico de lámina foliar, se empleó un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca ISI (International Scientific Instruments), modelo WB-6. Para reemplazar el aire contenido en la cámara de las muestras del microscopio, se utilizó una bomba para crear vacío y reemplazar el aire por nitrógeno suministrado por un tanque estacionario. Las fotografías tomadas a partir del MEB fueron digitalizadas mediante el empleo de una computadora con sistema operativo Windows 7.

La manipulación del material vegetal y preparación de soluciones, se utilizaron diversas herramientas y material de laboratorio, como bisturís, pinzas de punta fina, cajas de Petri, matraces, vasos de precipitado, pipetas, etc. Para la edición de las fotografías tomadas se utilizó el programa Microsoft Paint.

Método

Material vegetal:

Se utilizaron fragmentos tanto adaxiales como abaxiales de hoja de 12 ejemplares para su estudio micromorfológico de lámina foliar; 7 pertenecientes a *B. aristidoides* var. *aristidoides*, 2 de *B. annua*, 1 de *B. aristidoides* var. *arizonica*, 1 de *B. eriostachya* y 1 de *B. eriopoda* (estas últimas dos especies como grupo hermano de referencia para el complejo *B. annua* - *B. aristidoides*).

Cada uno de los 12 ejemplares es representativo de poblaciones únicas, cuentan con su respectivo voucher de colecta y corresponden a colecciones previamente identificadas y personalmente corroboradas (tabla 3.1).

Tabla 3.1 Listado del material vegetal utilizado en el análisis de micromorfología de lámina foliar. Entre paréntesis se establecen las coordenadas exactas del lugar de colecta.

<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>aristidoides</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 3104	Córdoba, Argentina (32° 00.39' S, 65° 03.56' W).	RSABG
Columbus 3426	Piura, Peru (4° 8' 21'' S, 81° 5' 8'' W).	RSABG
Columbus 3948	Texas, U.S.A. (29° 40' 48" N, 103° 10' 59" W).	RSABG
Columbus 4074	Nayarit, México (20° 53' 25" N, 105° 08' 04" W).	RSABG
Columbus 4610	Oaxaca, México (16° 40' 56" N, 96° 19' 03" W).	RSABG
Columbus 4648	B.C.S., México (24° 16' 25" N, 110° 19' 11" W).	RSABG
Siqueiros 5283	B.C.S., México (24° 48' 2.9" N, 111° 33' 59.7" W).	HUAA
<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>arizonica</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2273	Arizona, U.S.A. (31° 29' 43" N, 110° 51' 19" W).	RSABG
<i>Bouteloua annua</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus_4649	B.C.S., México (24° 12' 52" N, 110° 13' 51" W).	RSABG

Columbus_4659	B.C.S., México (23° 25' 40" N, 110° 12' 04" W).	RSABG
<i>Bouteloua eriopoda</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 3964	New México, U.S.A. (32° 50' 30" N, 108° 08' 39" W).	RSABG
<i>Bouteloua eriostachya</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus_2843	Coahuila, México (26° 45' 17" N, 102° 09' 08" W).	RSABG

Fijación:

Se tomaron hojas maduras de la parte media del tallo de los ejemplares evaluados al momento de su colecta. Las hojas se seccionaron en tres partes de longitud similar y se tomaron los segmentos medios, los cuales se cortaron en fragmentos menores a 5 milímetros de longitud. Posteriormente se introdujeron y etiquetaron en frascos de plástico que contenían FPA.

Todo el material vegetal se dejó en FPA por tiempos mayores a 24 horas antes de ser utilizados para el proceso de deshidratación.

Deshidratación:

Los fragmentos de hoja fueron sometidos a una serie de etapas de deshidratación paulatina, usando un gradiente de concentraciones (de menor a mayor) de etanol, seguido por una última deshidratación con dióxido de carbono líquido (mediante el empleo de un deshidratador de punto crítico) (tabla 3.2). Para lo anterior, se colocaron dos fragmentos de cada uno de los ejemplares analizados (uno para su análisis adaxial y el otro para su análisis abaxial) en casetes de plástico identificados con lápiz de grafito, los cuales fueron sumergidos en las distintas soluciones.

Tabla 3.2 Proceso detallado de deshidratación del material vegetal de los ejemplares usados para el estudio de micromorfología de lámina foliar.

# Paso	Soluciones y concentraciones usadas.	Exposición (horas)
1	30% Etanol	2
2	50% Etanol	2
3	70% Etanol	2
4	90% Etanol	2
5	95% Etanol	2
6	100% Etanol	2
8	100% Etanol	2
9	100% Dióxido de carbono	1

Revestimiento:

Los fragmentos de hoja fueron montados en portaobjetos metálicos, cilíndricos, cubiertos con cinta adhesiva inerte en sentido de las manecillas del reloj. Se le realizó una marca personal a la cinta adhesiva para poder llevar un registro (en un formato especial) de las muestras montadas en cada portaobjetos.

El revestidor de pulverización catódica a base de Argón fue programado para trabajar de forma automática durante 2 sesiones de 60 segundos de duración (cada una), con un amperaje de 10mA y a 45 milímetros de distancia de la muestra vegetal.

Microscopia electrónica de barrido:

Todas y cada una de las muestras (tanto parte adaxial, como abaxial) fueron analizadas a conciencia bajo el microscopio electrónico de barrido, tomando fotografías de toda la superficie de la muestra, procurando usar cuando fuese posible aumentos preestablecidos de

50x, 150x y 300x para caracteres generales, mientras que para tomar fotografías de caracteres específicos, se utilizaron aumentos variables (mayores a 300x y hasta 1000x).

Se calibró de manera manual el brillo y contraste de cada una de las fotografías al momento de su captura, no obstante, una vez digitalizadas, estos parámetros fueron optimizados con ayuda de programas computacionales.

Todas las fotografías fueron tomadas con la misma orientación, esto es, con el ápice de la hoja siempre apuntando hacia el lado derecho de las fotografías.

Descripción de los caracteres micromorfológicos de lámina foliar:

Los ejemplares seleccionados se sometieron a una búsqueda exhaustiva de caracteres conforme al protocolo de Ellis (1979) (ver tabla 3.3).

Tabla 3.3 Listado de los caracteres micromorfológicos evaluados tanto en zona abaxial, como adaxial, en los 12 ejemplares seleccionados, acorde a lo estipulado en el protocolo de Ellis R. P. de 1979.

Caracteres micromorfológicos evaluados en epidermis de lámina foliar de ejemplares del complejo <i>B. annua</i> – <i>B. aristidoides</i>.	
Zona evaluada	Carácter evaluado
Células intercostales largas	Descripción de la forma celular
	Variación en la forma celular
	Distribución de células asociadas
	Descripción de células buliformes
Estomata	Complejo estomatal
	Células largas estomatales
Células intercostales cortas	Descripción de células cortas
	Distribución de células cortas
Papilas	Descripción de la papila
	Distribución

	Arreglos
Pelos puntiagudos	Distribución de pelos puntiagudos
	Descripción de pelos puntiagudos
	Distribución de pelos tipo gancho
	Pelos rígidos angulares del margen
Micropelos	Descripción
	Distribución
Macropelos	Descripción
Cuerpos de sílice	Descripción
	Distribución
Células costales cortas	Descripción
	Arreglos

Las descripciones propuestas en el protocolo de Ellis de 1979 contienen un código numérico, gracias a esto, se elaboró una matriz de datos en Excel, en el cual se fueron llevando el registro de los caracteres evaluados tanto de la zona abaxial como de la adaxial de la lámina foliar de cada ejemplar (en la sección de anexos se pone a manera ilustrativa una parte del protocolo de Ellis de 1979, así como parte de la matriz de datos en Excel, donde queda implícito la dinámica del empleo del código numérico en cuestión).

Resultados

Observaciones Generales:

- **Zona abaxial**

Se describen todos los caracteres micromorfológicos de zona abaxial, que se mantuvieron invariables a lo largo de todos los ejemplares estudiados del complejo. En general, se encontró la mayor variabilidad morfológica para el complejo en caracteres concernientes a pelos puntiagudos y macropelos, mientras que los caracteres menos variables fueron aquellos que corresponden a los estomas.

No se pudieron hacer observaciones de los caracteres micromorfológicos de las células intercostales (largas y cortas), papilas y células costales cortas de todos los ejemplares debido a un exceso de cutícula que presentan todos los ejemplares en zona abaxial de la lámina foliar. No se encontraron células buliformes presentes en la superficie de la lámina foliar de ninguno de los ejemplares analizados.

Siempre se tienen dos filas de estomas distribuidas a orillas de zonas intercostales (cada fila esta contigua al inicio de la zona costal), separadas entre sí por más de una fila de células intercostales largas. Una célula interestomatal con extremos cóncavos, siempre presente entre cada estoma de una misma fila de estomas (figura 3.1).

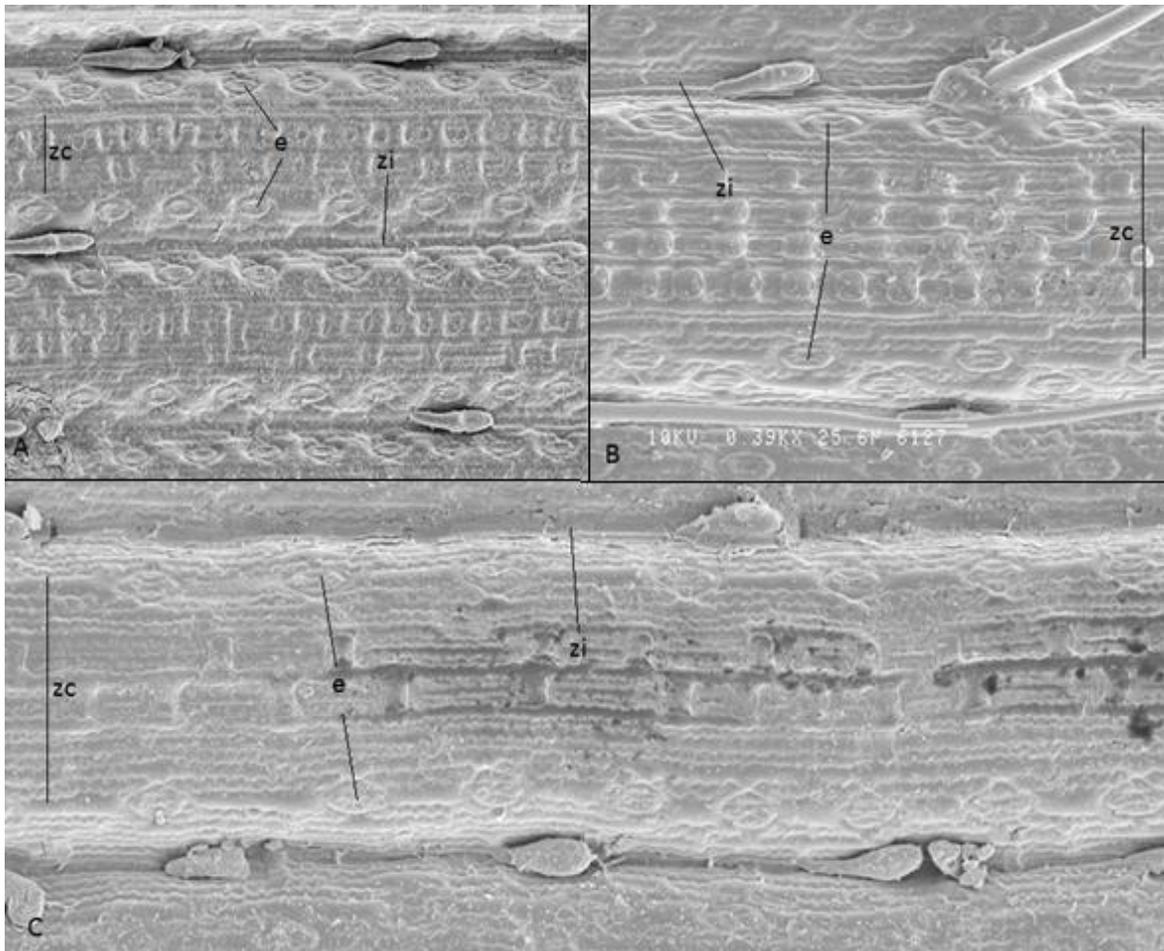


Figura 3.1 Fotografías de zona abaxial de lámina foliar tomadas mediante MEB. A: *Bouteloua annua* (Columbus 4659) visto a 156x. B. *aristoides* var. *aristoides* (Columbus 3104) visto a 390x. C: *B. aristoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 290x. e: estomas; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

Micropelos presentes en todos los ejemplares estudiados, siempre compuestos por dos células, la célula basal mucho más larga que ancha (más larga que dos veces su anchura), menos inflada que la célula distal, punto de unión de célula basal a la lámina foliar pequeño y formando costados paralelos, micropelos emergiendo siempre de forma recta a partir de una célula corta (no forma ángulos en la base), distribuidos entre células intercostales largas únicamente, cerca de las zonas costales (entre bandas estomatales y zona costal) (figura 3.2).

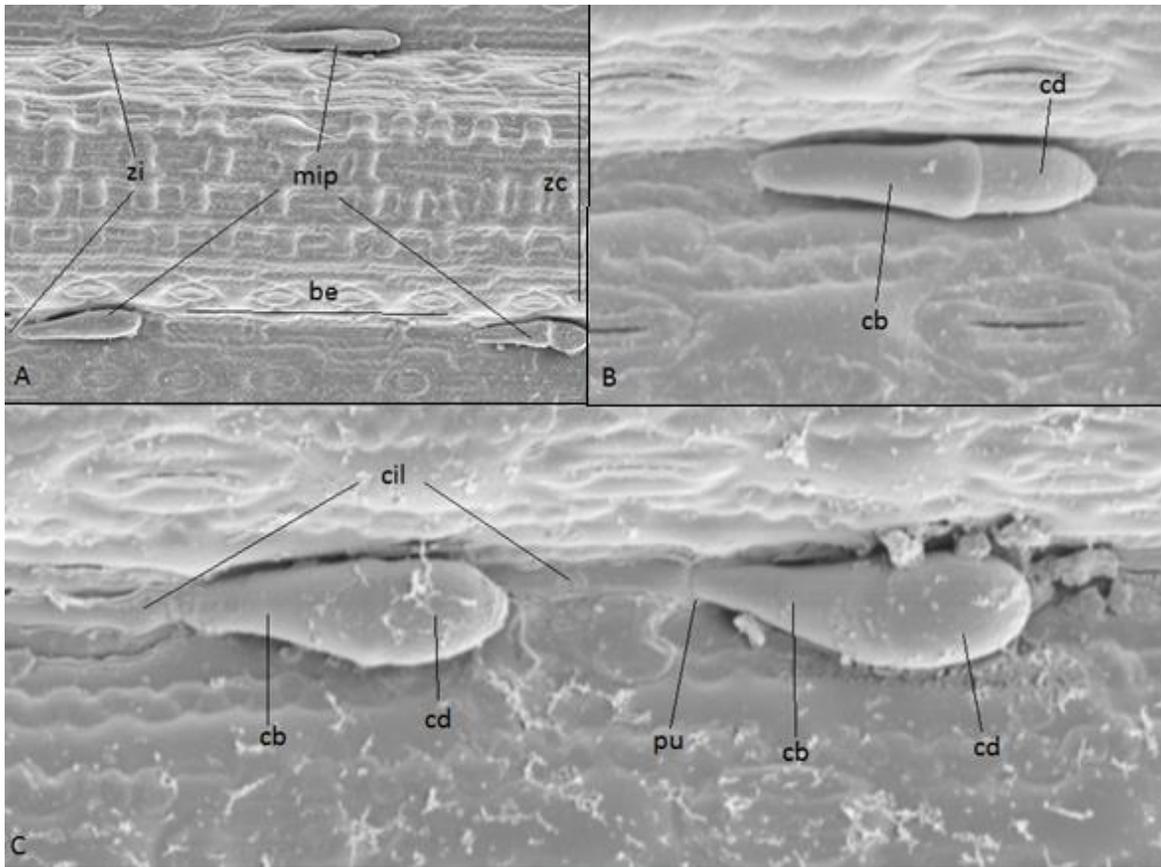


Figura 3.2 Fotografías de zona abaxial de lámina foliar tomadas mediante MEB. A: *Bouteloua annua* (Columbus 4659) visto a 390x. B: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 3426) visto a 1180x. C: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 990x. be: banda estomatal; cb: célula basal de micropelo; cd: célula distal de micropelo; cil: célula intercostal larga; mip: micropelo; pu: punto de unión de célula basal; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

Cuerpos de sílice equidimensionales (dimensiones horizontales y verticales aproximadamente de igual magnitud) siempre presentes, de tipo redondo con forma circular y nunca asociados íntimamente con células de corcho. Distribuidos a lo largo y ancho de todas las zonas costales, sin presencia aparente de gránulos y con una anchura aproximadamente igual a la de las células adyacentes (figura 3.3).

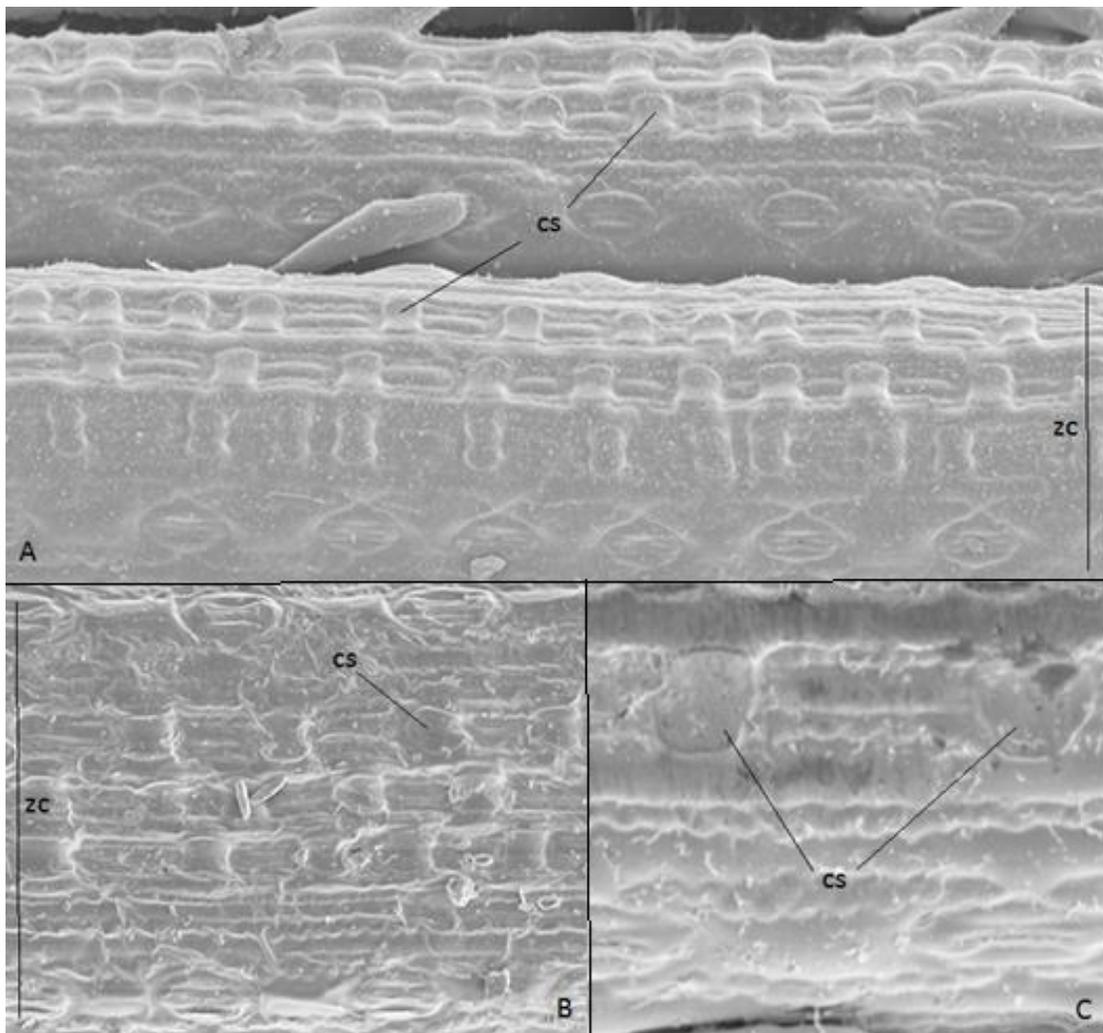


Figura 3.3 Fotografías de zona abaxial de lámina foliar tomadas mediante MEB. A: *Bouteloua annua* (Columbus 4659) visto a 390x. B: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 4610) visto a 590x. C: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 990x. cs: cuerpo de sílice; zc: zona costal.

- **Zona adaxial**

A continuación se describen todos los caracteres micromorfológicos de zona adaxial que se mantuvieron invariables en todos los ejemplares estudiados del complejo. En general, se encontró la mayor variabilidad morfológica para el complejo en caracteres concernientes a células intercostales y costales cortas, pelos puntiagudos cortos y macropelos, mientras que los caracteres con menor variabilidad fueron aquellos de micropelos, cuerpos de sílice y estomas.

Células costales largas de tipo elongadas (longitud tres veces más grande que anchura). Forma general de células costales largas constante o relativamente constante a lo largo de toda la lámina foliar; paredes celulares anticlinales horizontales paralelas entre sí (células de forma rectangular, trapezoidal o cuadrada), paredes celulares anticlinales verticales redondas (células de tipo infladas). Células costales cortas separando células costales largas en la fila celular (una única célula corta presente entre varias células costales largas sucesivas). Cuerpos de sílice no siempre presentes, cuando presentes, se distribuyen a lo largo y ancho de todas las zonas costales y sin presencia de ningún tipo de gránulos (figura 3.4).

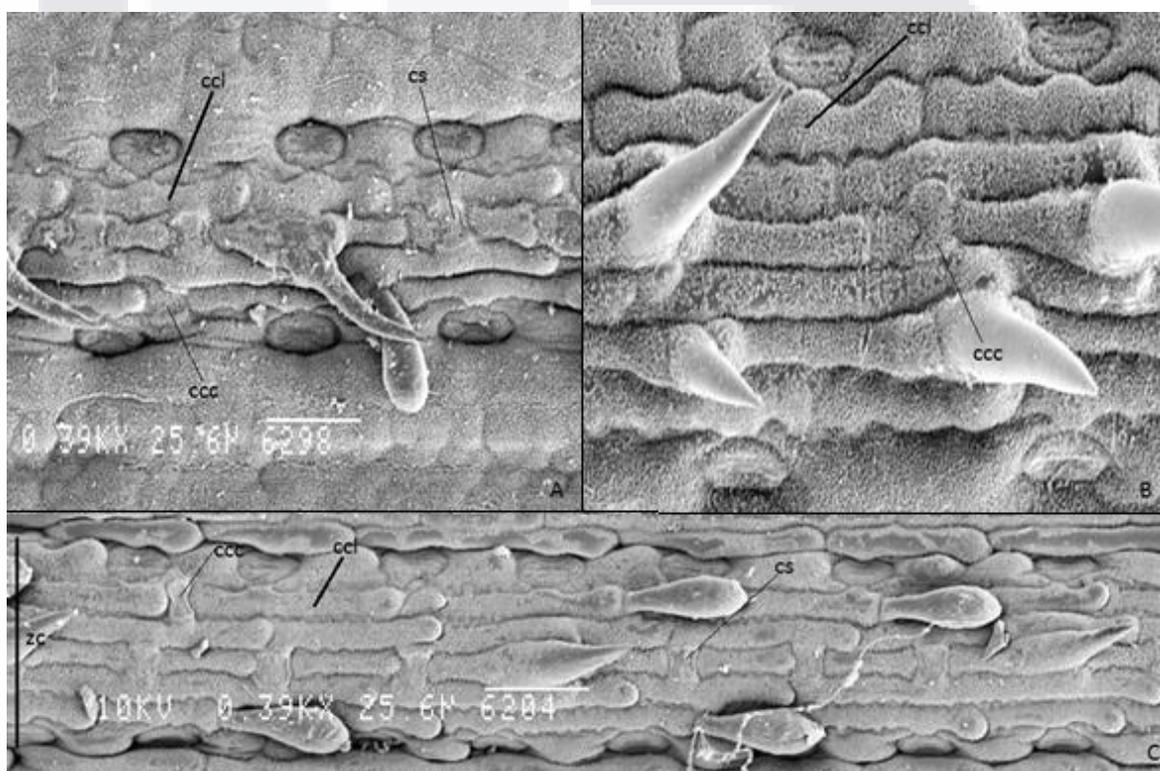


Figura 3.4 Fotografías de zona adaxial de lámina foliar tomadas mediante MEB. A: *Bouteloua annua* (Columbus 4649) visto a 390x. B: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Siqueiros 5283) visto a 570x. C: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 390x. ccc: célula costal corta; ccl: célula costal larga; cs: cuerpo de sílice; zc: zona costal.

Células intercostales largas de tipo elongadas (longitud tres veces más grande que anchura). Forma general de células intercostales largas constante o relativamente constante en zonas intercostales a lo largo de toda la lámina foliar; paredes celulares anticlinales horizontales

paralelas entre sí (células de forma rectangular, trapezoidal o cuadrada). Células intercostales cortas (cuando presentes) con poca presencia a lo largo de toda la lámina foliar, tienen una anchura igual a la de células intercostales largas, siempre se encuentran solitarias entre varios pares de células largas sucesivas a los lados. Células buliformes usualmente difíciles de distinguir de células intercostales largas infladas; tienen un contorno variable, paredes celulares delgadas, infladas de forma rectangular (figura 3.5).

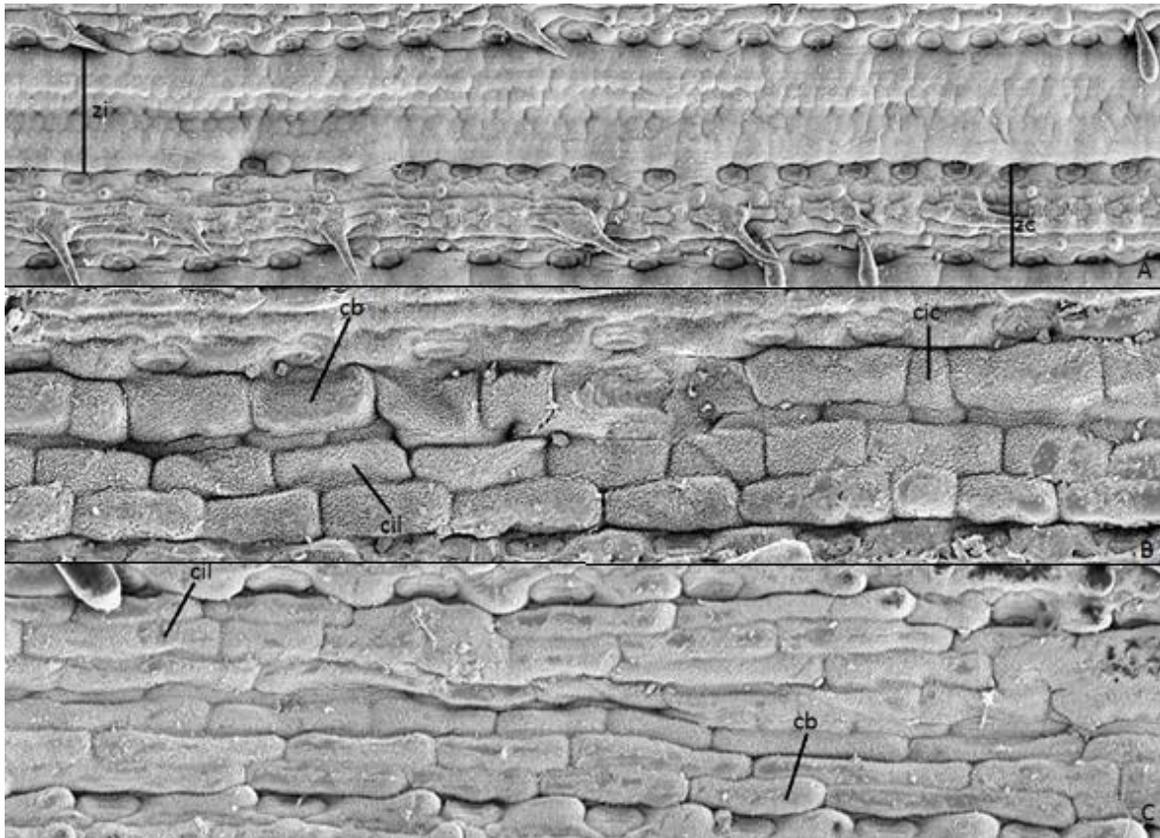


Figura 3.5 Fotografías de zona adaxial de lámina foliar tomadas mediante MEB. A: *Bouteloua annua* (Columbus 4649) visto a 154x. B: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 4648) visto a 290x. C: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 390x. cb: célula buliforme; cic: célula intercostal corta; cil: célula intercostal larga; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

Dos hileras de estomas siempre presentes en todas las zonas intercostales, separadas por más de una sola fila de células intercostales largas. Cada fila de estomas posicionadas siempre contigua a la zona costal, y conteniendo una célula interestomatal de extremos cóncavos entre cada estoma de la fila. Papilas no siempre presentes, cuando presentes, tienen una forma

circular o redondeada, larga (con diámetros mayores a la mitad de la anchura vertical de células largas), delgadas, con forma de domo e infladas. Una sola papila presente por célula situada distalmente en células epidérmicas, sin empalmarse a células adyacentes (figura 3.6).

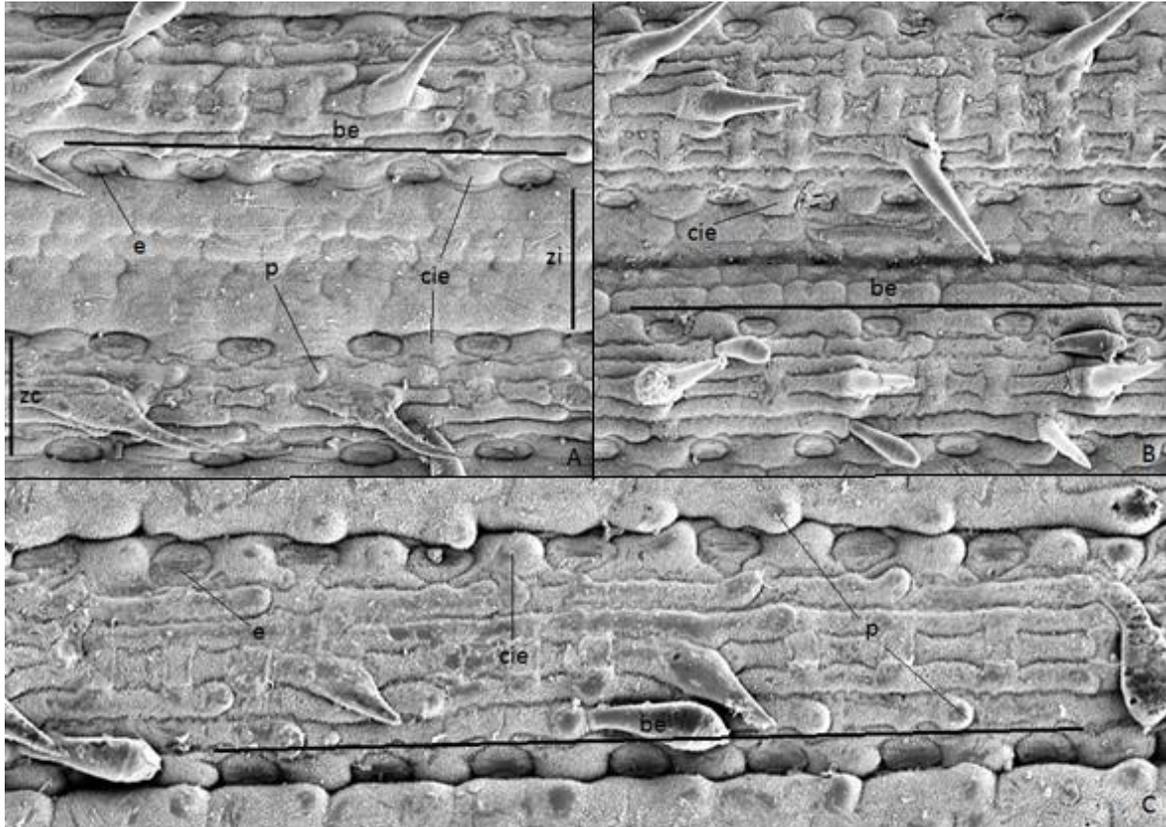


Figura 3.6 Fotografías de zona adaxial de lámina foliar tomadas mediante MEB. A: *Bouteloua annua* (Columbus 4649) visto a 390x. B: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Siqueiros 5283) visto a 290x. C: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 390x. be: banda estomatal; cie: célula interestomatal; e: estoma; p: papila; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

Pelos puntiagudos cortos siempre presentes en márgenes, nunca en zonas intercostales, con lengüetas largas en todos los casos (lengüeta tan larga o más larga que la base del pelo puntiagudo corto) (figura 3.7).

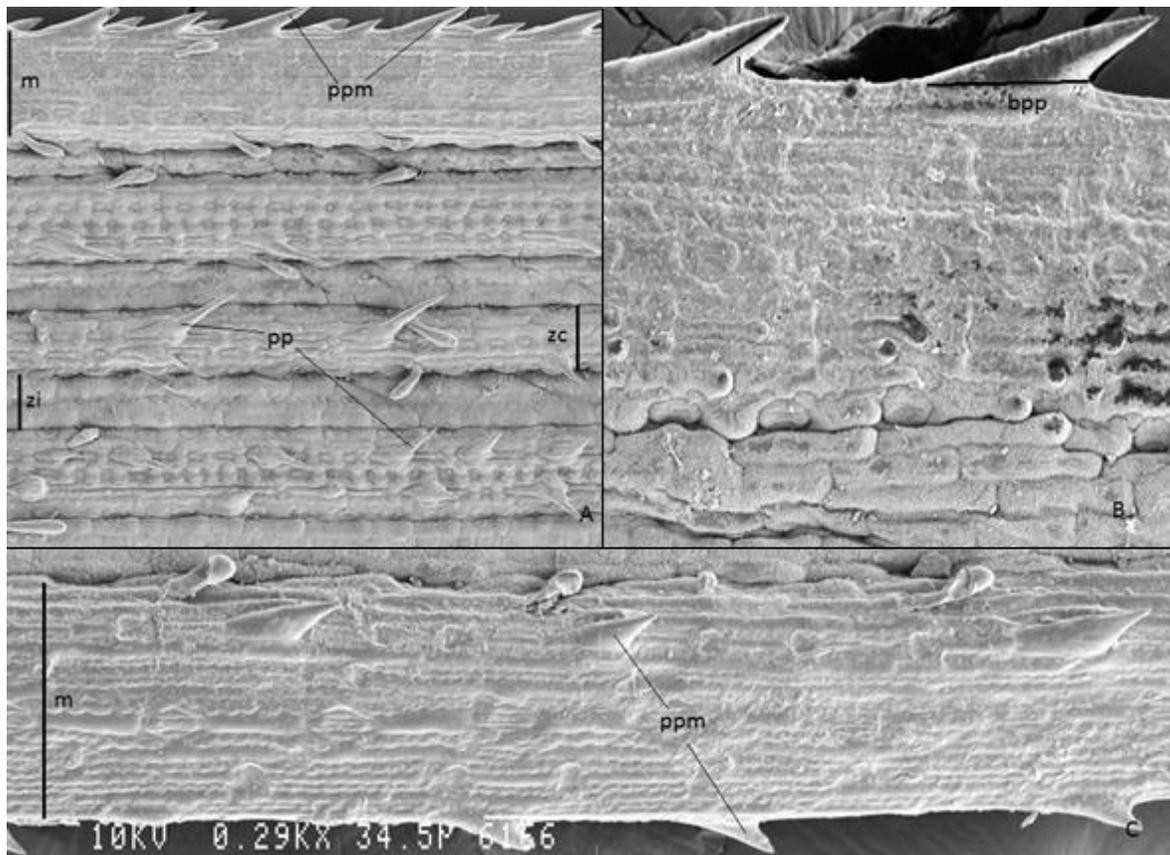


Figura 3.7 Fotografías de zona adaxial de lámina foliar tomadas mediante MEB. A: *Bouteloua annua* (Columbus 4659) visto a 156x. B: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 4074) visto a 290x. C: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 390x. bpp: base pelo puntiagudo corto; l: lengüeta de pelo puntiagudo corto; m: margen de lámina foliar; pp: pelo puntiagudo corto; ppm: pelo puntiagudo corto marginal; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

Micropelos siempre de tipo bicelular, célula basal mucho más larga que ancha, con un punto de unión a la lámina foliar paralelo y pequeño, menos inflada y dos o más veces más larga que la célula distal. Micropelos siempre emergiendo de una célula corta de forma recta sin formar ángulo en la base y distribuidos entre células costales largas cercanas a zona costal. Macropelos no siempre presentes, cuando presentes, distribuidos exclusivamente en zonas intercostales y nunca presentando macropelos especializados de ningún tipo (figura 3.8).

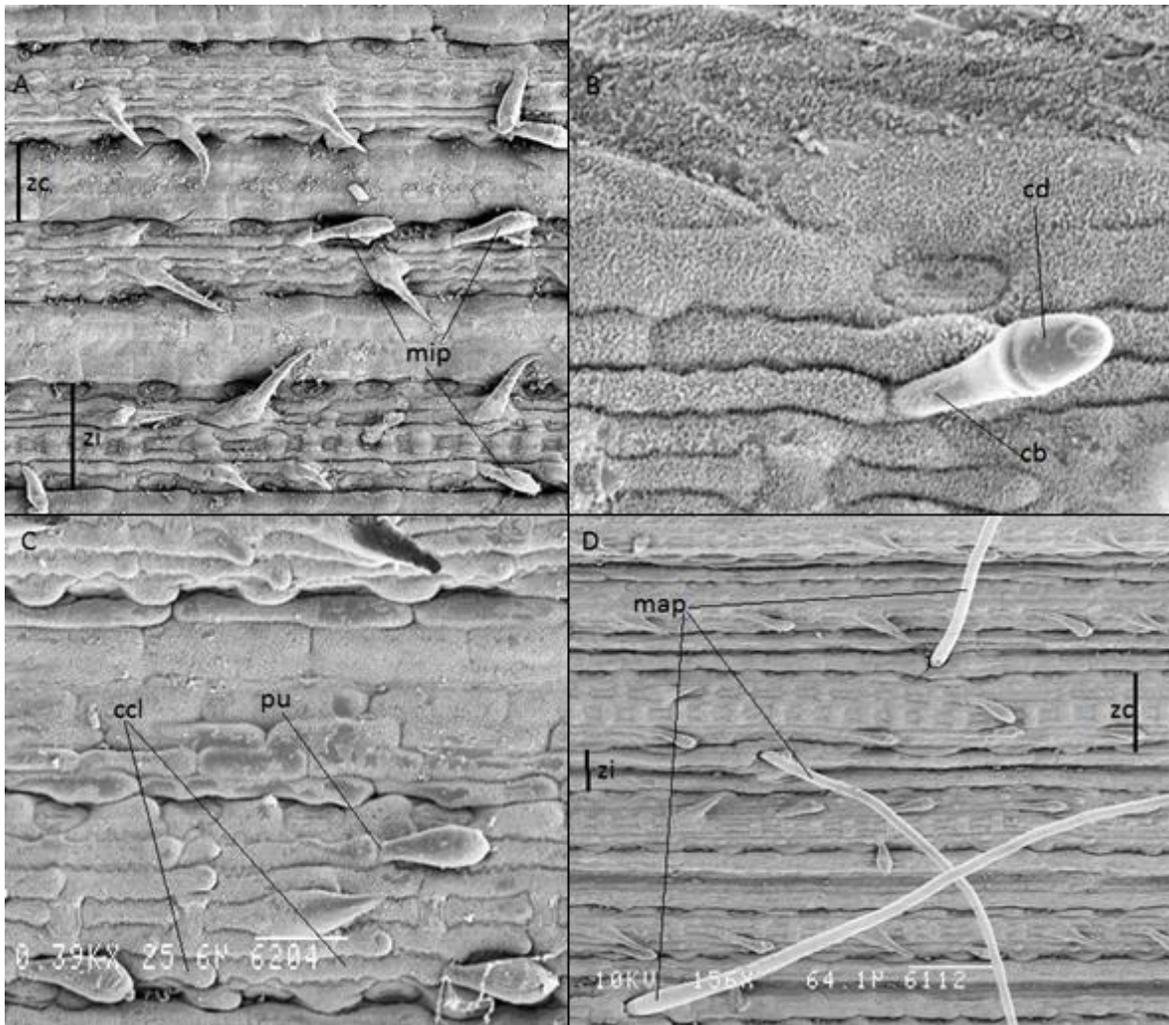


Figura 3.8 Fotografías de zona adaxial de lámina foliar tomadas mediante MEB. A: *Bouteloua annua* (Columbus 4659) visto a 156x. B: *Bouteloua aristidoides* var. *aristidoides* (Siqueiros 5283) visto a 570x. C: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 390x. D: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 3104). cb: célula basal de micropelo; cd: célula distal de micropelo; ccl: célula costal larga; map: macropelo; mip: micropelo; pu: punto de unión de micropelo; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

B. aristidoides var. *arizonica* cuenta con un conspicuo mayor número de papilas en zona adaxial que *B. annua* y *B. aristidoides* var. *aristidoides*, (de tipo distales y únicas por célula) distribuidas a lo largo de toda la lámina foliar, siendo células buliformes, células interestomatales y células costales largas donde se da más su prevalencia (ver figura 3.9).

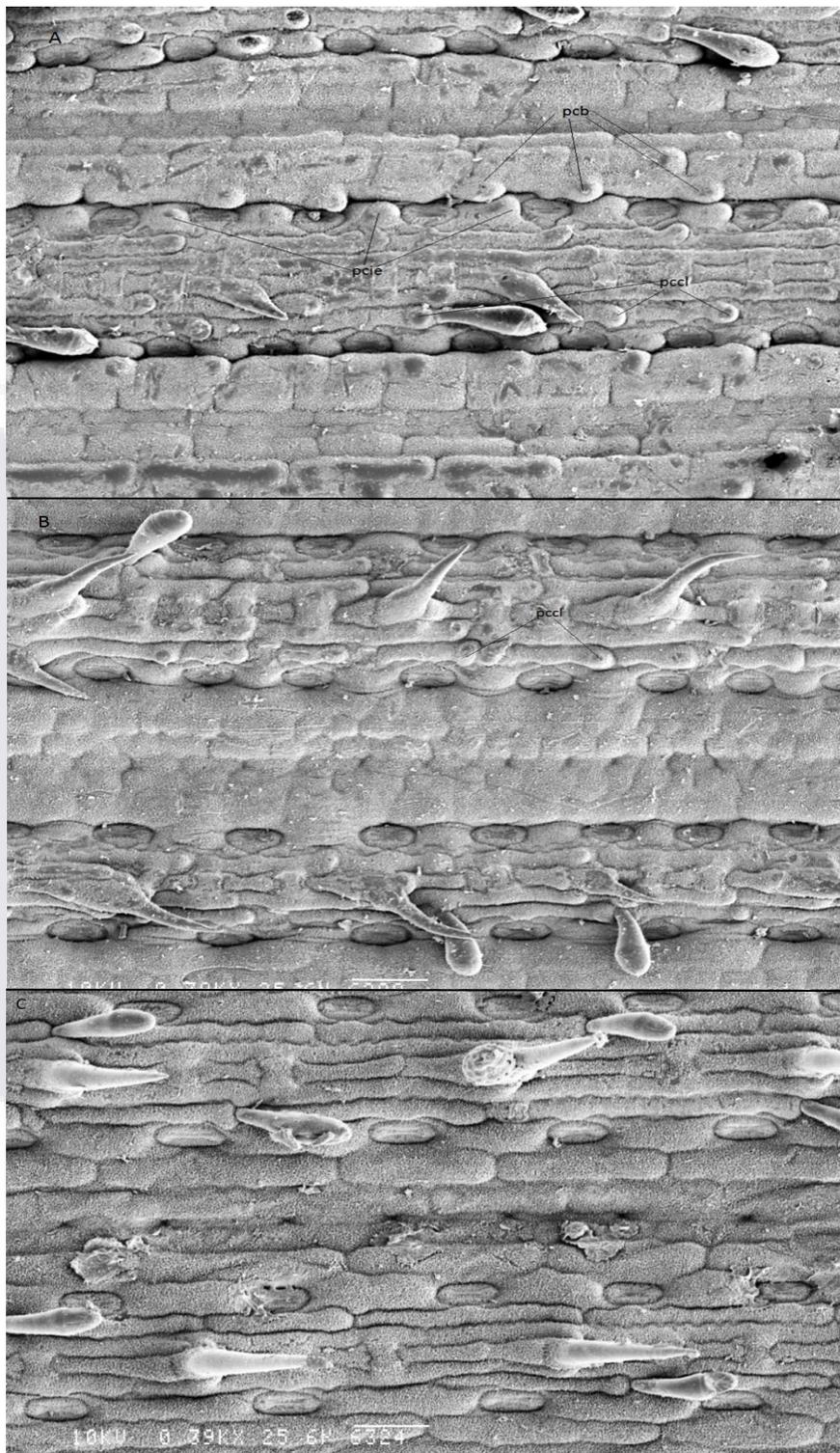


Figura 3.9 Fotografías de zona adaxial de láminas foliares tomadas mediante MEB a 390x. A: *B. aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273). B: *B. annua* (Columbus 4659). C: *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Siqueiros 5283). pcb: papilas en células buliformes; pccf: papilas en células costales largas; pcie: papilas en células interestomatales.

Descripciones:

- *Bouteloua annua*

- **Zona abaxial**

A continuación se describen todos los caracteres micromorfológicos de zona abaxial, que se mantuvieron invariables en los ejemplares estudiados de *B. annua*. En general, no se encontró gran variabilidad micromorfológica, ya que los ejemplares estudiados son muy parecidos entre sí.

No se pueden hacer observaciones de los caracteres micromorfológicos de células intercostales largas, células intercostales cortas, células costales cortas, células interestomatales ni papilas, debido a un exceso de cutícula que presentan todos los ejemplares en zona abaxial de la lámina foliar.

Estomas de tipo triangular (ápice reducido a un punto, formando una evaginación), amplios y con células subsidiarias marcadamente angulares (figura 3.10).

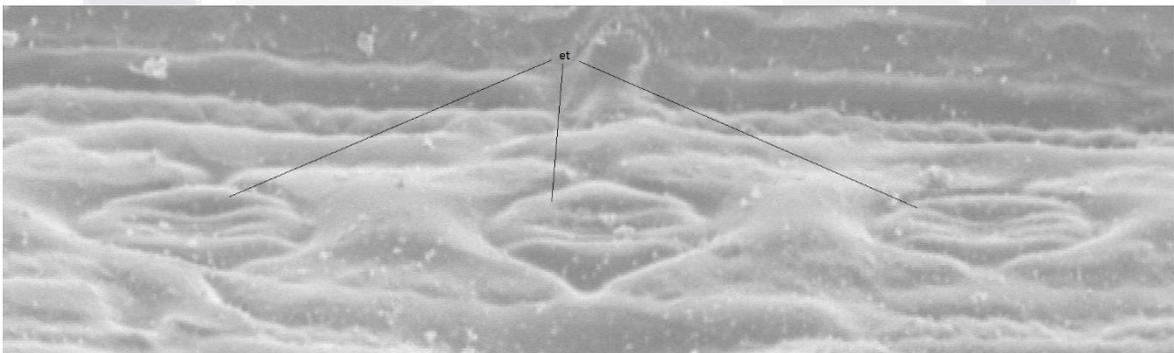


Figura 3.10 Fotografía de zona abaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua annua* (Columbus 4659) visto a 390x. et: estomas de tipo triangular.

Pelos puntiagudos cortos presentes solamente en áreas del margen de la lámina foliar, presentando lengüetas de tipo medianas (igual o solo un poco más largas que la base del pelo). Pelos tipo gancho presentes en zonas costales del margen exclusivamente (figura 3.11).

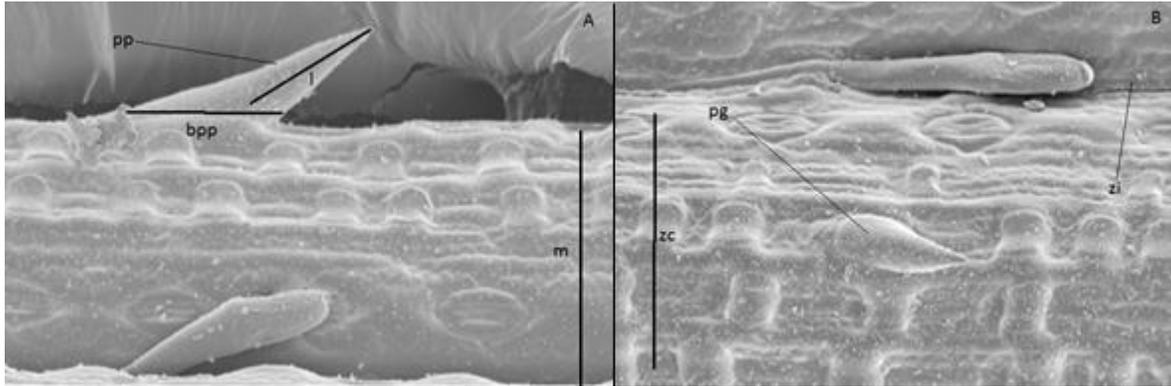


Figura 3.11 Fotografías de zona abaxial de lámina foliar tomadas mediante MEB. A: *Bouteloua annua* (Columbus 4659) visto a 390x. B: *Bouteloua annua* (Columbus 4659) visto a 390x. bpb: base pelo puntiagudo rígido; m: margen; pg: pelo tipo gancho; pp: pelo puntiagudo rígido; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

Micropelos bicelulares, con célula basal dos o más veces más grande que célula distal, grosor de paredes celulares de ambas células muy similar, célula distal solo un poco más larga que ancha (no mayor a dos veces la anchura) con ápices ligeramente en forma cónica. Ningún tipo de macropelo presente en ninguno de los ejemplares. Cuerpos de sílice en forma de silla de montar equidimensionales (dimensiones verticales y horizontales aproximadamente iguales) presentes en todos los ejemplares (figura 3.12).

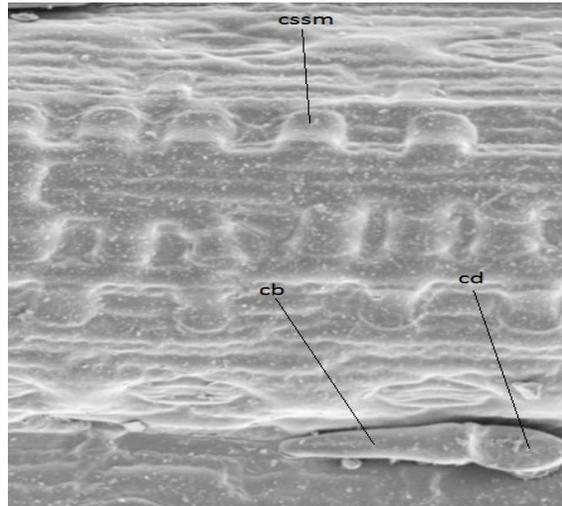


Figura 3.12 Fotografía de zona abaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua annua* (Columbus 4659) visto a 390x. cb: célula basal de micropelo; cd: célula distal de micropelo; cssm: cuerpo de sílice tipo silla de montar; mip: micropelo.

○ **Zona adaxial**

A continuación se describen todos los caracteres micromorfológicos de zona adaxial, que se mantuvieron invariables en los ejemplares estudiados de *B. annua*. La mayor variabilidad de caracteres se dio en células costales cortas y largas, mientras que caracteres de micropelos y cuerpos de sílice fueron los que menor variabilidad presentaron. Células de zona intercostal sin exceso de cutícula, no obstante, indistinguibles.

Células costales largas con paredes celulares verticales y horizontales anticlinales ligeramente engrosadas (probable desarrollo de bridas cuticulares), formando ondulaciones pequeñas e irregulares (onda larga de amplitud superficial y baja frecuencia). Sus tamaños varían en una misma fila de células y a lo largo de una misma zona costal (las células costales largas más angostas en el centro de las zonas costales). Células costales cortas separando en una misma fila a células costales largas adyacentes, algunas veces esta separación se da por un par de células sílice-suberosas o de corcho-sílice, otras veces la separación se da por presencia de tricomas (micropelos y/o pelos puntiagudos). Células interestomatales largas

relativamente cortas a pesar de que son más largas que anchas (largo de la célula menor a tres veces su anchura). Papilas siempre presentes (figura 3.13).

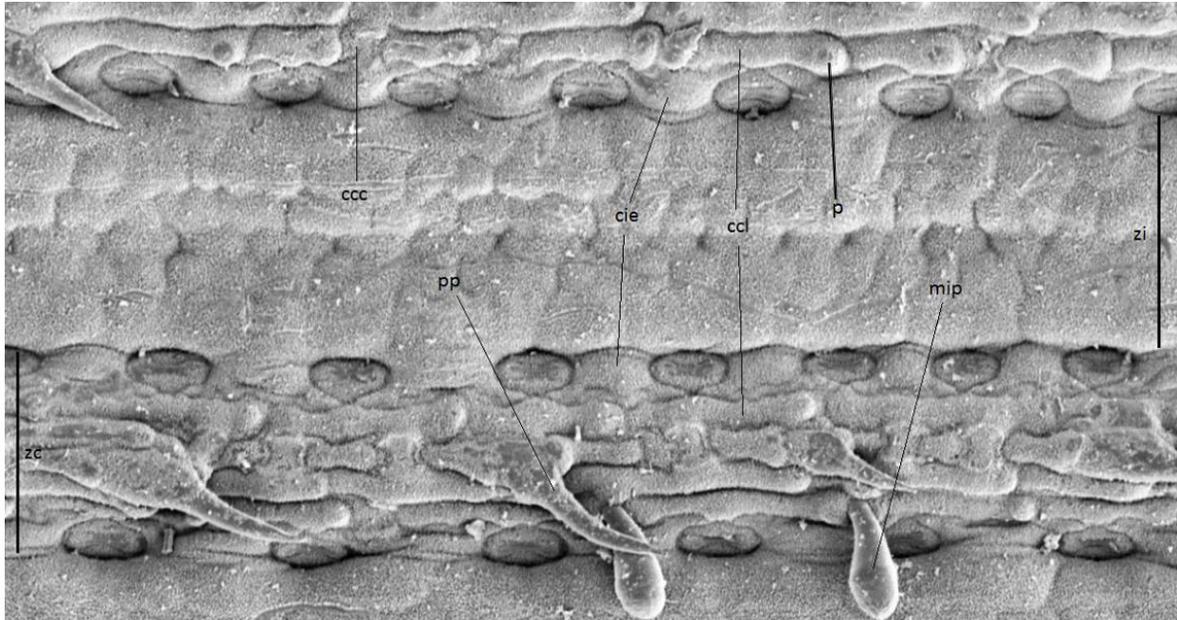


Figura 3.13 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua annua* (Columbus 4649) visto a 390x. ccc: célula costal corta; ccl: célula costal larga; cie: célula interestomatal; mip: micropelo; p: papila; pp: pelo puntiagudo corto; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

Pelos puntiagudos rígidos de tamaño mediano (base igual o ligeramente más grande que estomas) con lengüetas desarrolladas desde el ápice de la base pero ligeramente levantada, presentes solo en zonas costales (nunca presentes en zonas intercostales), con frecuencia variable (puede o no que existan más de cinco cuerpos de sílice entre dos pelos puntiagudos sucesivos en una misma fila de células). Pelos puntiagudos rígidos en margen grandes (con bases más de dos veces más largas que estomas) y con lengüetas de tamaño mediano (igual o solo un poco más largas que su base) (figura 3.14).

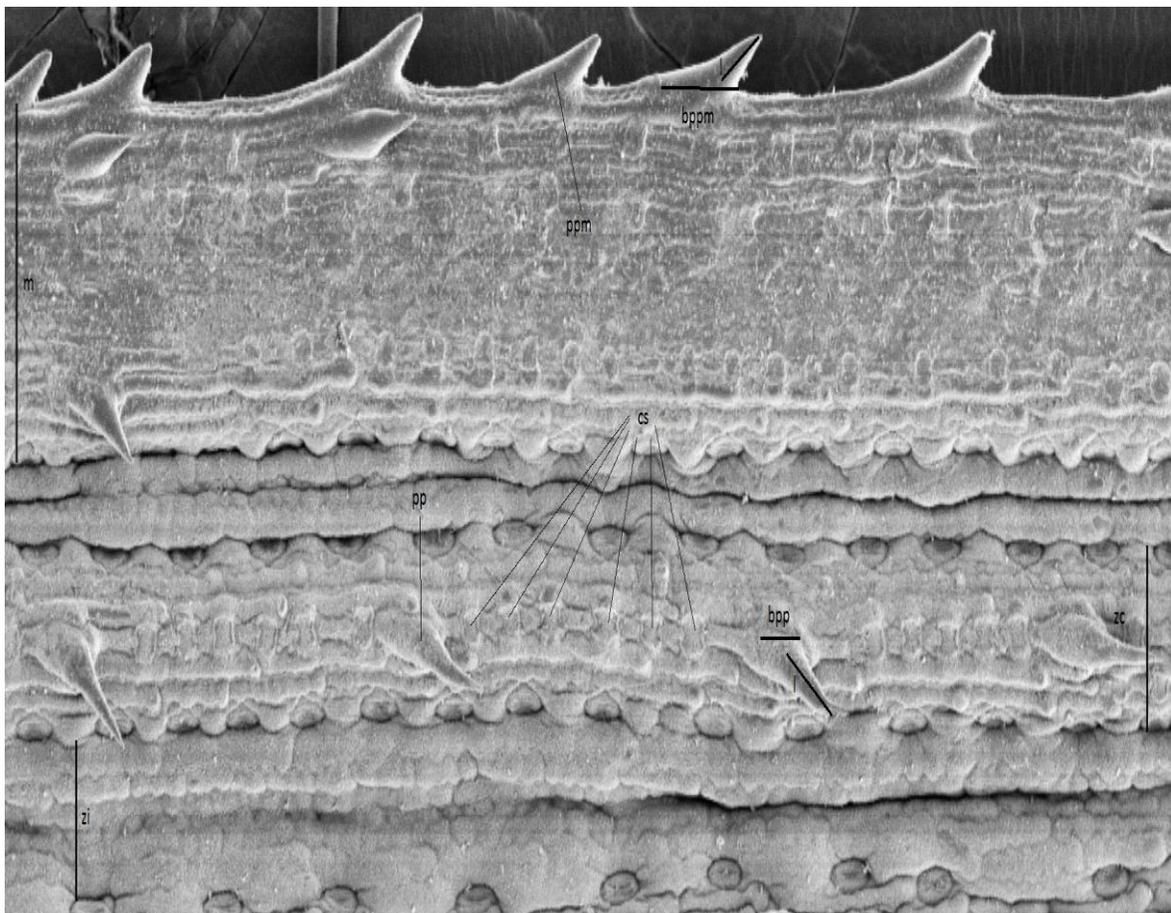
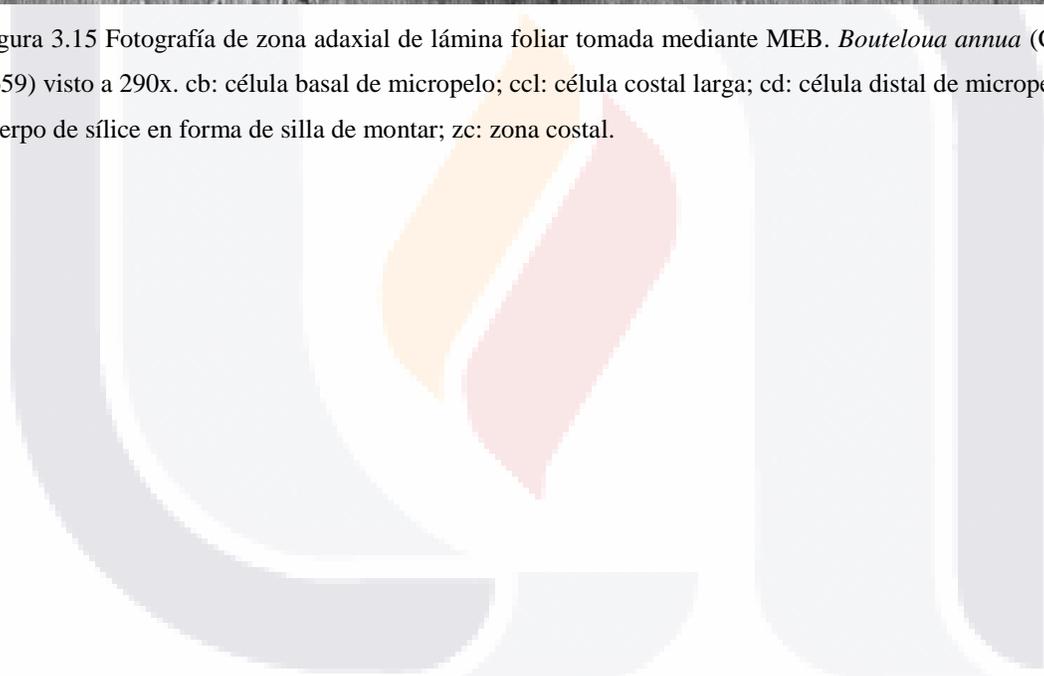


Figura 3.14 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua annua* (Columbus 4649) visto a 154x. bpb: base de pelo puntiagudo rígido; bpbm: base de pelo puntiagudo rígido de margen; cs: cuerpo de sílice; l: lengüeta de pelo puntiagudo rígido; m: margen de lámina foliar; pp: pelo puntiagudo corto; ppm: pelo puntiagudo rígido de margen; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

Micropelos de tipo bicelular, emergiendo desde la base en forma recta, o en ocasiones, formando ángulo, el grosor relativo de sus paredes celulares es igual entre la célula basal y la distal, célula distal un poco más larga que ancha (largo no más grande que dos veces su anchura) y ápice con forma intermedia entre cónica y redonda. Se distribuyen en zonas costales, intermitentes entre células costales largas. Ningún tipo de macropelo presente en ninguno de los ejemplares. Cuerpos de sílice siempre presentes, aproximadamente igual de anchos que las células que los rodean, son equidimensionales (dimensiones verticales y horizontales aproximadamente iguales), en formas de silla de montar y redondas (no íntimamente asociadas a células de corcho) (figura 3.15).



Figura 3.15 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua annua* (Columbus 4659) visto a 290x. cb: célula basal de micropelo; ccl: célula costal larga; cd: célula distal de micropelo; cssm: cuerpo de sílice en forma de silla de montar; zc: zona costal.



• ***Bouteloua aristidoides* var. *aristidoides***

○ **Zona abaxial**

A continuación se describen todos los caracteres micromorfológicos de zona abaxial que se mantuvieron invariables en los ejemplares estudiados de *B. aristidoides* var. *aristidoides*. La mayor variabilidad se dio en caracteres de micropelos, mientras que los caracteres de cuerpos de sílice y estomas fueron los que menor variabilidad tuvieron.

No se pueden hacer observaciones de los caracteres micromorfológicos de células costales cortas, células intercostales largas, células intercostales cortas ni papilas, debido a un exceso de cutícula que presentan todos los ejemplares en zona abaxial de la lámina foliar.

Pelos puntiagudos rígidos no siempre presentes, cuando presentes, tienen una lengüeta corta (más corta que la base del pelo) que se desarrolla desde el ápice de la base, ligeramente erguida, y siempre apuntando hacia el ápice de la hoja (todas las lengüetas apuntan hacia la misma dirección). Cuerpos de sílice equidimensionales (dimensiones verticales y horizontales aproximadamente iguales) con forma de silla de montar siempre presentes (figura 3.16).

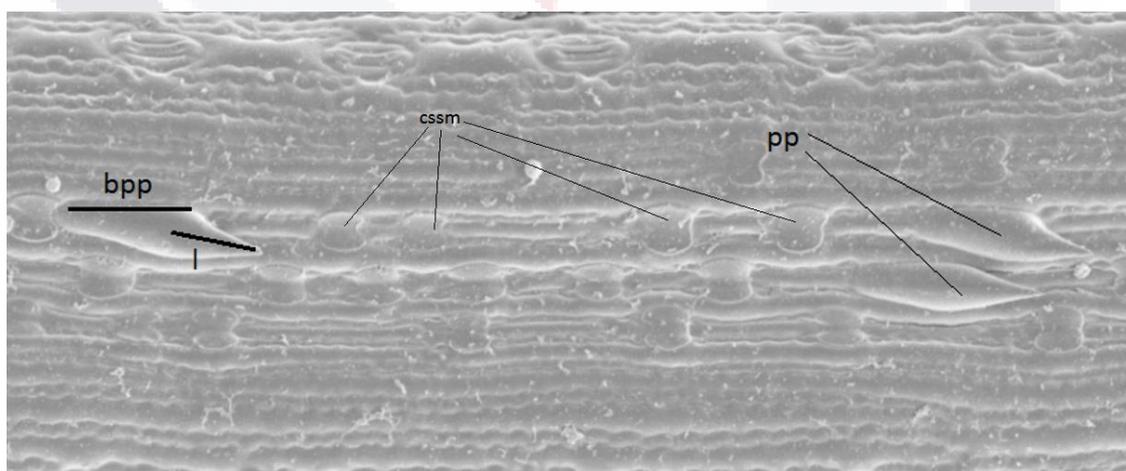


Figura 3.16 Fotografía de zona abaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 3948) visto a 290x. bpp: base pelo puntiagudo rígido; cssm: cuerpo de sílice con forma de silla de montar; l: lengüeta de pelo puntiagudo rígido; pp: pelo puntiagudo rígido.

Macropelos no siempre presentes, cuando presentes, son delgados, flexibles (blandos), de tamaño menor a 1.125 milímetros, distribuidos únicamente en zonas intercostales, con paredes celulares delgadas, presentan una célula epidérmica elevada hemisférica especializada con un orificio del cual emerge la base del pelo (figura 3.17).

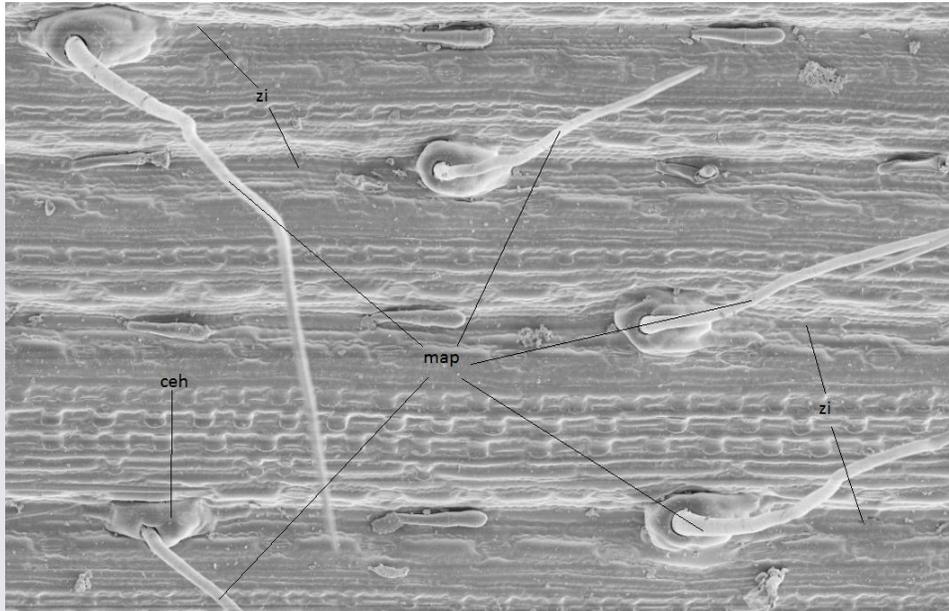


Figura 3.17 Fotografía de zona abaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *aristidoides* (Siqueiros 5283) visto a 150x. ceh: célula epidérmica hemisférica; map: macropelo; zi: zona intercostal.

Únicamente ciertos ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides* presentaron macropelos en zona abaxial, dispuestos exclusivamente en zonas intercostales y emergiendo de bases glandulares (ver figura 3.18).

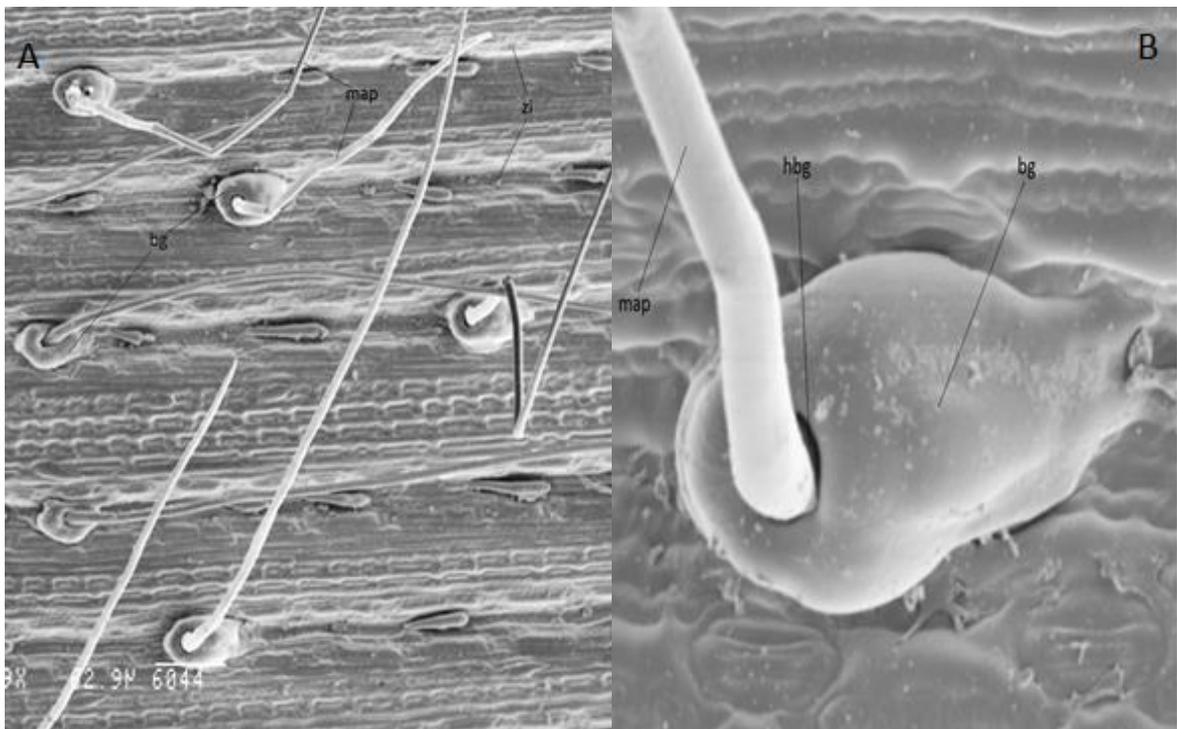


Figura 3.18 Fotografías de láminas foliares tomadas mediante MEB. A: Siqueiros 5283, zona abaxial vista a 160x. B: Siqueiros 5283 zona abaxial vista a 1000x. bg: base glandular de macropelo; hbg: hendidura en base glandular de macropelo; map: macropelo; zi: zona intercostal.

○ **Zona adaxial**

A continuación se describen todos los caracteres micromorfológicos de zona adaxial, que se mantuvieron invariables en los ejemplares estudiados de *B. aristidoides* var. *aristidoides*. La mayor variabilidad de caracteres se dio en caracteres de macropelos, células intercostales cortas y células costales cortas, mientras que los caracteres de células costales largas, micropelos y cuerpos de sílice fueron los que mostraron menor variabilidad.

Células costales largas con paredes celulares no engrosadas, las anticlinales verticales formando ángulos rectos con respecto a paredes celulares horizontales. Sus tamaños son muy variados, incluso en una misma fila de células costales largas, no obstante, las más angostas siempre distribuidas en el centro de las zonas costales. Cuerpos de sílice no siempre presentes, cuando presentes, de tipo equidimensional (dimensiones verticales y horizontales aproximadamente iguales) circulares y nunca asociados íntimamente con células de corcho,

su altura siempre es aproximadamente igual al de células cortas o largas adyacentes (figura 3.19).

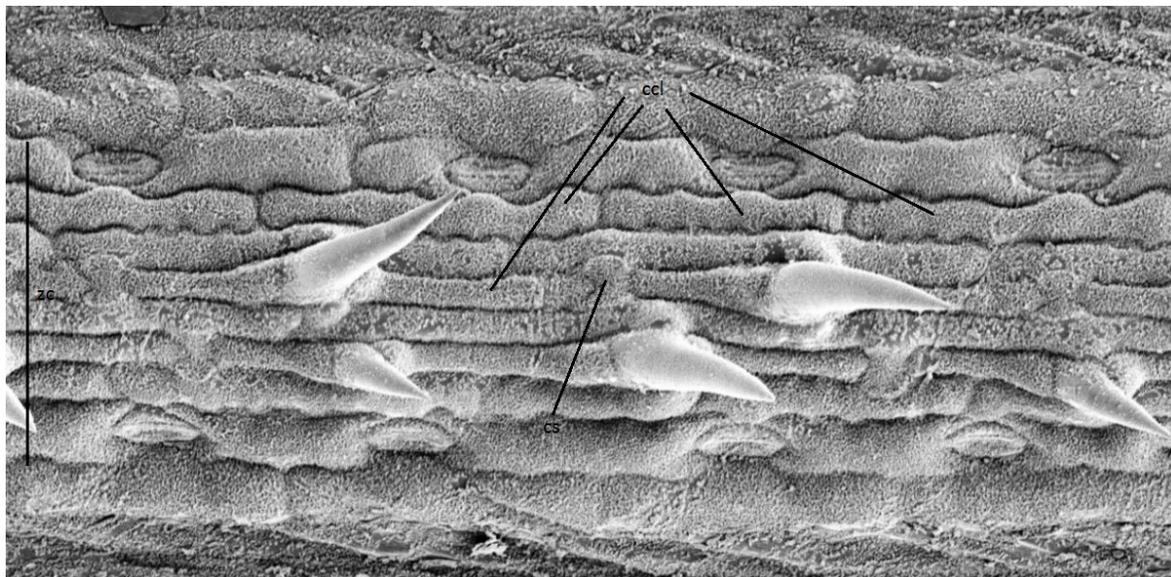


Figura 3.19 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *aristidoides* (Siqueiros 5283) visto a 380x. ccl: célula costal larga; cs: cuerpo de sílice; zc: zona costal.

Células intercostales cortas de forma rectangular y más angostas que células costales largas (largo de la célula nunca mayor que tres veces su anchura) (figura 3.20).



Figura 3.20 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *aristidoides* (Siqueiros 5283) visto a 390x. cic: célula intercostal corta; cil: célula intercostal larga; zi: zona intercostal.

Pelos puntiagudos rígidos presentes en todos los ejemplares, sin embargo, su distribución se remite a zonas costales siempre. Lengüetas desarrolladas basalmente desde el ápice de la

base del pelo y orientándose siempre hacia el ápice de la hoja (todas las lengüetas orientadas hacia la misma dirección). Ganchos algunas veces presentes, cuando presentes, siempre distribuidos en zonas costales. Macropelos no siempre presentes (figura 3.21).

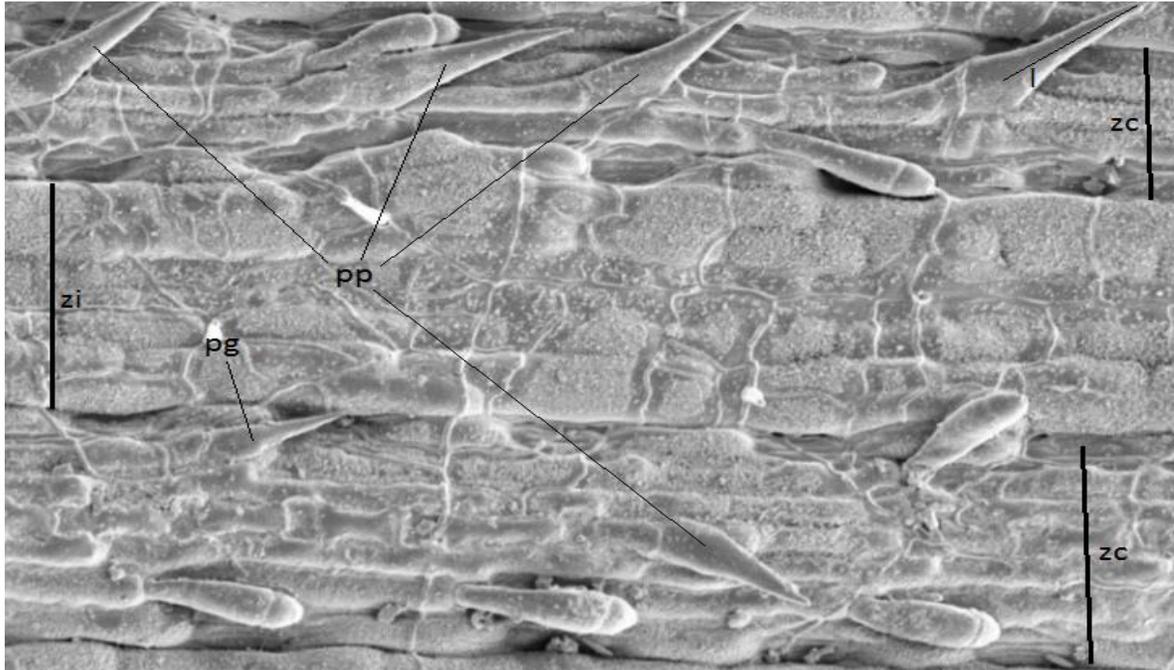


Figura 3.21 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 4074) visto a 290x. l: lengüeta de pelo puntiagudo; pg: pelo tipo gancho; pp: pelo puntiagudo; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

Únicamente ciertos ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides* presentaron macropelos que aparentan emerger por debajo de la epidermis en zona adaxial, dispuestos exclusivamente en zonas intercostales y con un complejo de células en base de epidermis circundando al macropelo (ver figura 3.22).

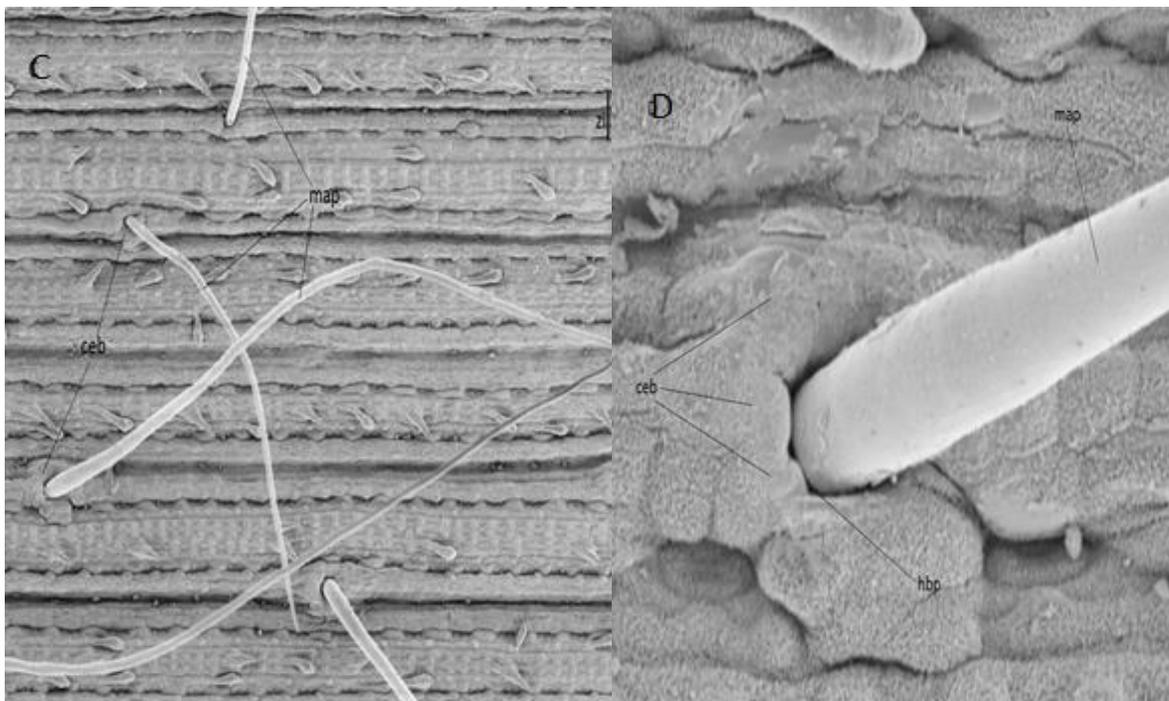


Figura 3.22 Fotografías de láminas foliares tomadas mediante MEB. C: Columbus 3104, zona adaxial vista a 120x. D: Columbus 3104, zona abaxial vista a 1000x. ceb: células epidérmicas circundantes en base de macropelo; hbp: hendidura en base de macropelo; map: macropelo; zi: zona intercostal.

• ***Bouteloua aristidoides* var. *arizonica***

○ **Zona abaxial**

A continuación se describen todos los caracteres micromorfológicos de zona abaxial que se mantuvieron invariables en los ejemplares estudiados de *B. aristidoides* var. *arizonica*. La mayor variabilidad se dio en caracteres de pelos puntiagudos rígidos y micropelos, mientras que los caracteres de cuerpos de sílice, macropelos y estomas se mantuvieron prácticamente invariables.

No se pueden hacer observaciones de los caracteres micromorfológicos de células intercostales largas, células costales largas, células intercostales cortas, papilas y células costales cortas, debido a un exceso de cutícula que presentan todos los ejemplares en zona abaxial de la lámina foliar.

Pelos puntiagudos rígidos presentes solo en zonas de margen de la lámina foliar, con bases largas (dos o más veces más grande que la longitud de un estoma) y lengüetas medianas (tan largas o ligeramente más largas que la longitud de un estoma) (figura 3.23).

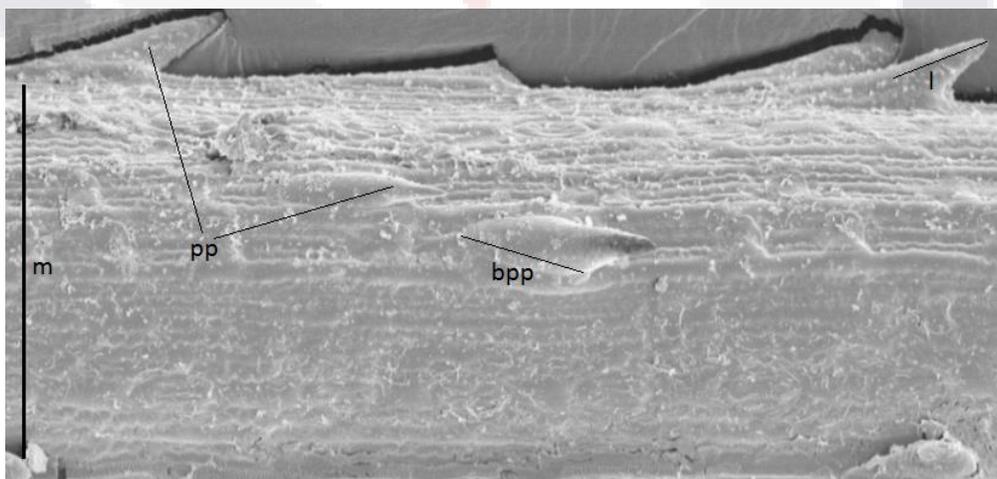


Figura 3.23 Fotografía de zona abaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 290x. bpp: base de pelo puntiagudo; l: lengüeta de pelo puntiagudo; m: margen de lámina foliar; pp: pelo puntiagudo.

Micropelos de tipo bicelular, con célula basal dos o más veces más larga que la célula distal, grosor relativo de paredes celulares de ambas células aproximadamente igual, célula distal ligeramente más larga que ancha (no mayor a dos veces su anchura) y con un ápice de forma redondeada (en forma de domo). Ningún tipo de macropelo presente. Estomas de forma triangular con células subsidiarias largas formando ángulos amplios. Células interestomatales largas relativamente largas (tres o más veces más largas que anchas) (ver figura 3.24).

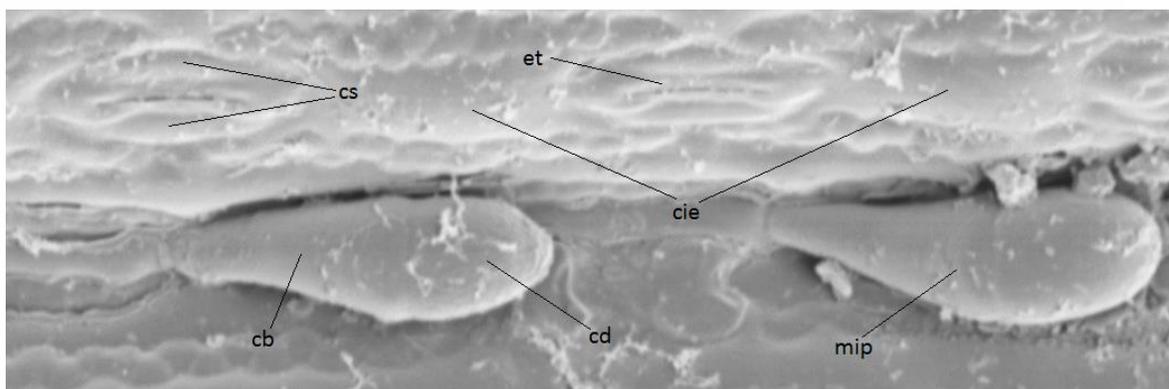


Figura 3.24 Fotografía de zona abaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 1000x. cb: célula basal de micropelo; cd: célula distal de micropelo; cie: células interestomatales; cs: células subsidiarias de estoma triangular; et: estoma de tipo triangular; mip: micropelo.

○ Zona adaxial

A continuación se describen todos los caracteres micromorfológicos de zona adaxial que se mantuvieron invariables en los ejemplares estudiados de *B. aristidoides* var. *arizonica*. La mayor variabilidad de caracteres se dio en caracteres de pelos puntiagudos rígidos y células costales cortas.

Células costales largas más angostas que células intercostales largas, muchas veces extremadamente largas, con paredes celulares delgadas, ligeramente onduladas (longitud de ondas cortas con amplitud superficial y alta frecuencia), de tamaño celular variable tanto en filas celulares individuales como a lo largo de toda la zona costal (las células más angostas en el centro de la zona costal). Células asociadas presentes (micropelos, pares de células

cortas y pelos puntiagudos) entre células costales largas sucesivas. Filas de células en zonas costales compuestas por células costales cortas de forma cuadrada (con paredes celulares sinuosas) y/o rectangular (mas angostas que células intercostales largas). Solo en ocasiones (poco frecuente) se tienen presente pares de células costales cortas sílice-suberosas o células de corcho con forma de cuerpos de sílice. Zonas costales compuestas regularmente de cuatro, cinco o seis filas celulares (figura 3.25).

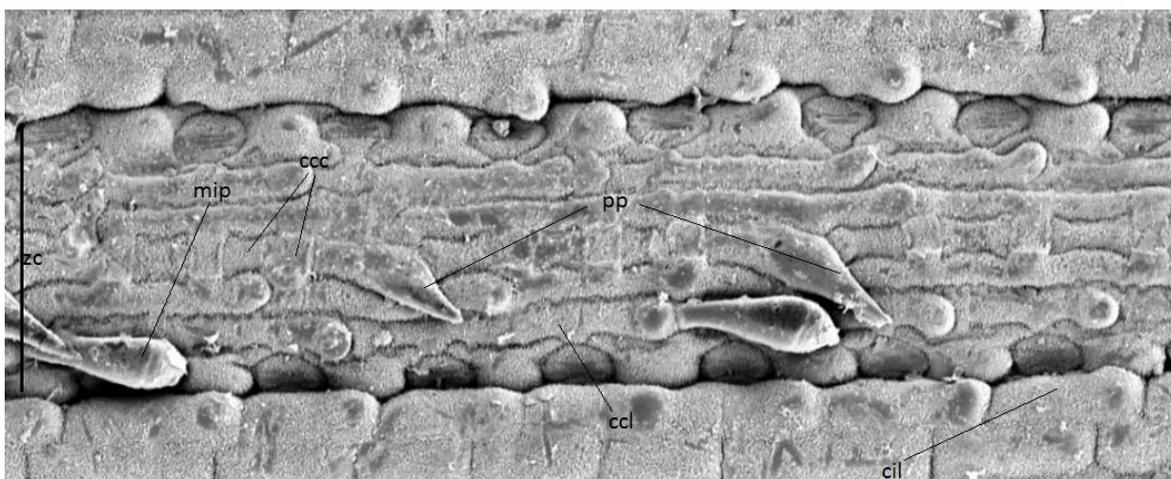


Figura 3.25 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 390x. ccc: células costales cortas; ccl: célula costal larga; cil: célula intercostal larga; mip: micropelo; pp: pelo puntiagudo; zc: zona costal.

Células intercostales largas con paredes celulares delgadas, sin ondulaciones (rectas), las verticales anticlinales formando ángulos rectos con respecto a paredes celulares horizontales, de tamaño variable en una misma fila celular. Células intercostales cortas de forma cuadrada o rectangular, solitarias sin cuerpos de sílice y con paredes celulares lisas entre células intercostales largas sucesivas. Zonas intercostales compuestas casi siempre de siete a nueve filas celulares (figura 3.26).

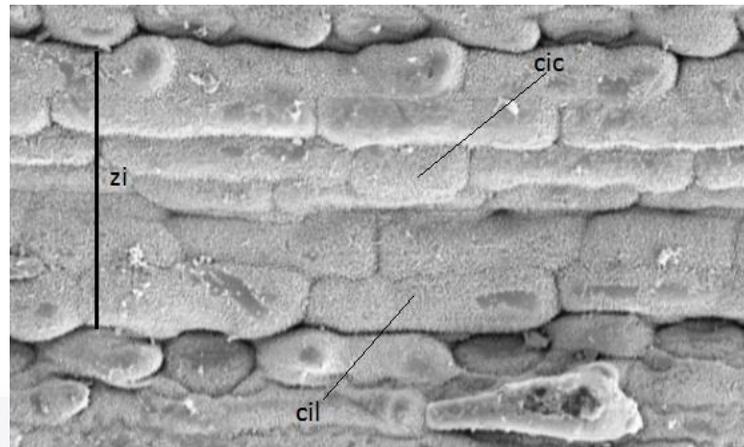


Figura 3.26 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 390x. cic: célula intercostal corta; cil: célula intercostal larga; zi: zona intercostal.

Dos tipos de estomas presentes, de tipo triangular con células subsidiarias largas y angulares anchas y de forma de domo bajo (ovoides, con dimensión vertical de las células subsidiarias más pequeña que el de su dimensión horizontal). Células interestomatales largas relativamente cortas (más largas que anchas, pero largo no mayor que tres veces la anchura de la célula). Papilas muy frecuentes, presentes en la mayoría de las células buliformes, células interestomatales largas y células costales largas (figura 3.27).

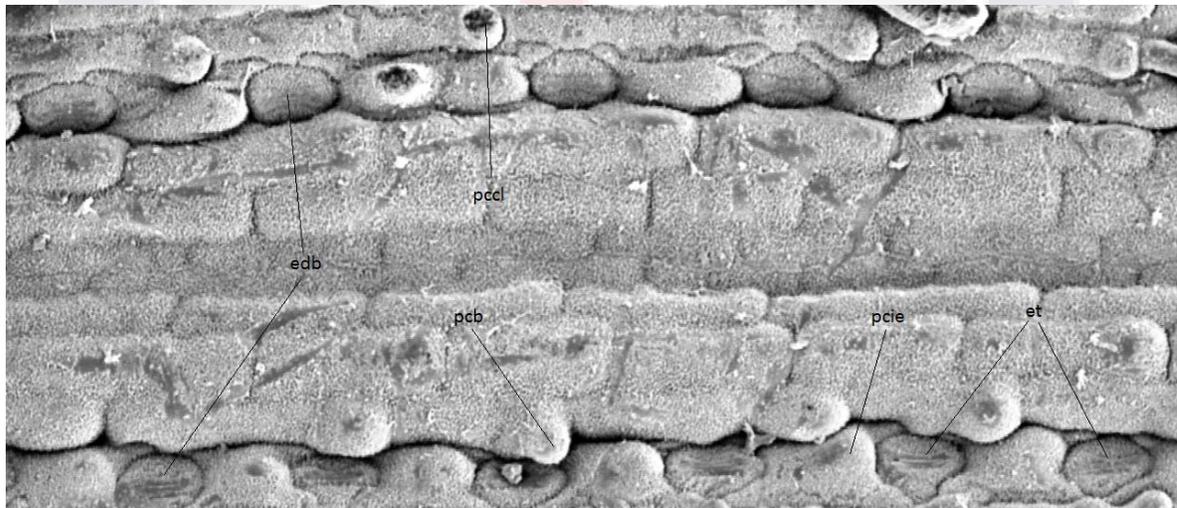


Figura 3.27 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 390x. edb: estoma de domo bajo; et: estoma triangular; pcb: papila de célula buliforme, pcc: papila de célula costal larga; pcie: papila de célula interestomatal.

Pelos puntiagudos rígidos medianos (base del pelo igual o un poco más grande que estomas) con lengüetas desarrolladas basalmente desde el ápice de la base y siempre orientadas hacia el ápice de la lámina foliar. Nunca presentes en zonas intercostales, solo en zonas costales distribuidos de forma frecuente en una sola fila celular (no más de cinco cuerpos de sílice presentes entre pelos puntiagudos rígidos sucesivos) (figura 3.28).

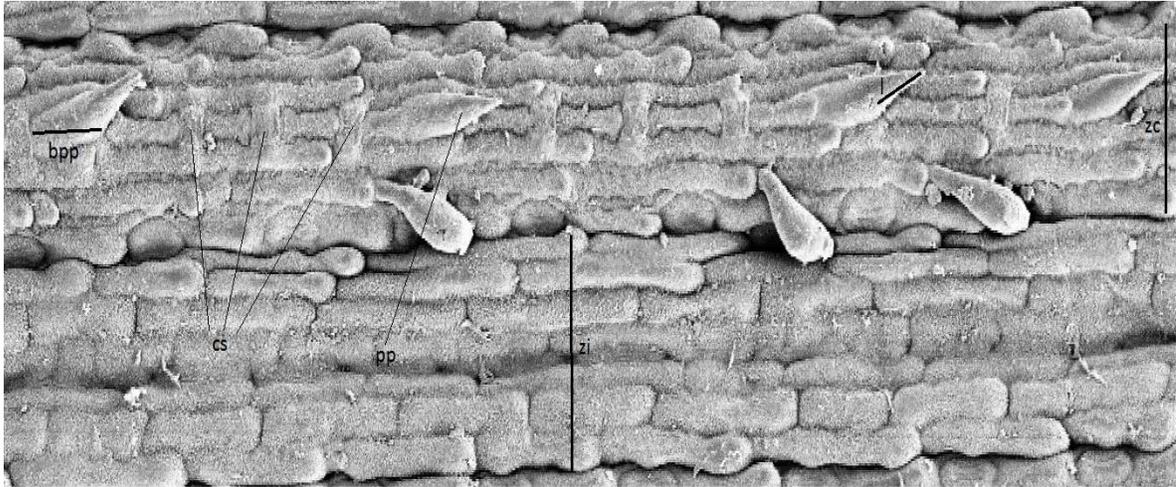


Figura 3.28 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 150x. bpp: base de pelo puntiagudo; cs: cuerpos de sílice; l: lengüeta de pelo puntiagudo; pp: pelo puntiagudo; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

Pelos puntiagudos rígidos en margen siempre presentes, de base grande (dos o más veces más grande que un estoma) y con lengüeta mediana (tan grande o un poco más grande que el tamaño de la base). Pelos tipo gancho ausentes. Cuerpos de sílice equidimensionales (dimensiones verticales y horizontales aproximadamente iguales) presentes, con forma de silla de montar y distribuidos en la zona del margen de la hoja. Filas de células de sílice alternando con una única fila de células costales cortas o largas (figura 3.29).

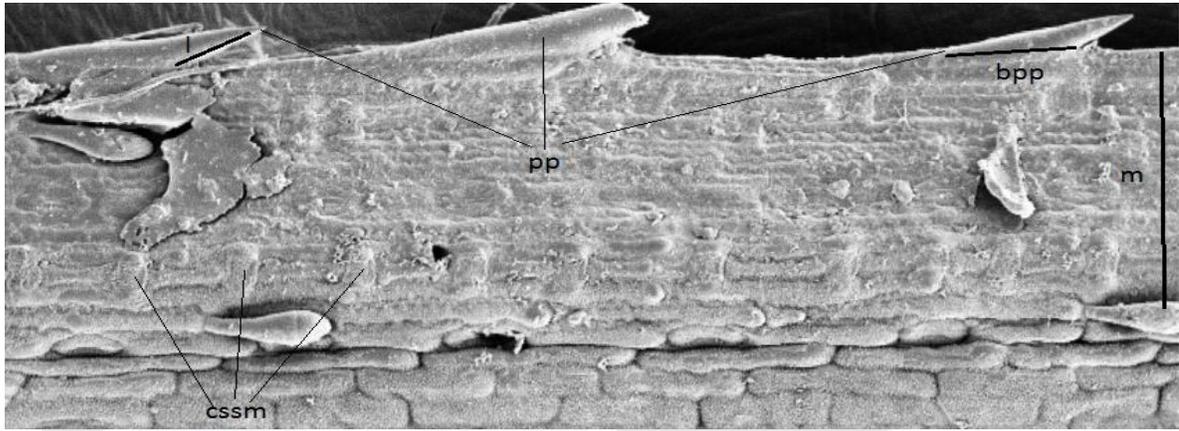


Figura 3.29 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 150x. bpp: base de pelo puntiagudo; cs: cuerpos de sílice; cssm: cuerpo de sílice con forma de montar en margen; l: lengüeta de pelo puntiagudo; m: margen de lámina foliar; pp: pelo puntiagudo.

Micropelos siempre de tipo bicelular, grosor relativo de paredes celulares de ambas células similar, longitud de la célula distal igual o menor que su anchura, con forma de ápice entre ligeramente cónico a redondeado. Pueden llegar a emerger de la epidermis formando ángulo (no rectos), siempre distribuidos en zonas costales, alternados entre células costales largas solamente. Ningún tipo de macropelo presente (figura 3.30).

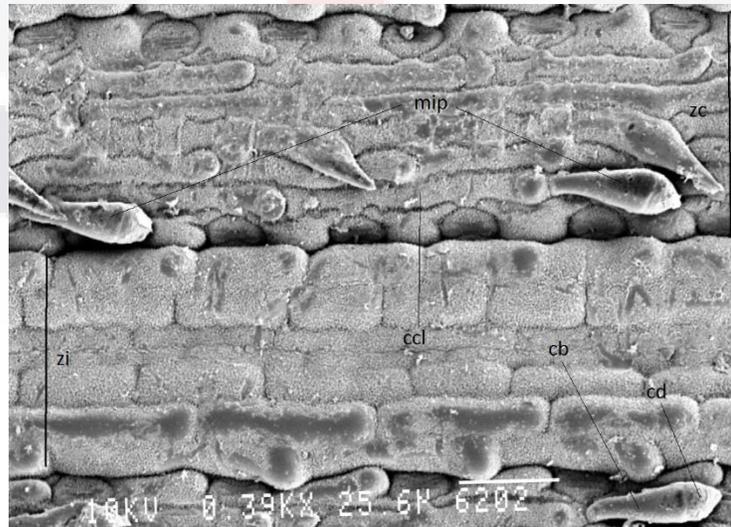


Figura 3.30 Fotografía de zona adaxial de lámina foliar tomada mediante MEB. *Bouteloua aristidoides* var. *arizonica* (Columbus 2273) visto a 390x. cb: célula basal de micropelo; ccl: célula costal larga; cd: célula distal de micropelo; mip: micropelo; zc: zona costal; zi: zona intercostal.

Capítulo 4: Filogenética Molecular

Material

Para el análisis molecular se usó ADN proveniente de hojas maduras de ejemplares del RSABG (colectadas por Columbus) y HUAA (colectadas por Siqueiros) preservadas al momento de su colecta en bolsas plásticas conteniendo sílice gel.

Durante la extracción de ADN se utilizaron diversos reactivos químicos acorde al tipo de protocolo usado. En el protocolo Miniprep (establecido por Murray y Thompson en 1980 y siguiendo las modificaciones propuestas por Quijada et al. en 1998) se utilizó nitrógeno líquido, buffer CTAB (compuesto por tris-HCl pH 8, NaCl a 1.4M, EDTA 20mM, bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 2% y β -mercaptoetanol al 0.3%), cloroformo alcohol isoamílico relación 24:1, isopropanol frío, etanol al 70% y agua destilada. Por otro lado, para la extracción mediante el protocolo de Quiagen se utilizó el kit DNeasy Plant Mini Kit QIAGEN. El equipo usado durante la extracción de ADN contempló el uso de morteros de porcelana, una balanza analítica marca Ohaus modelo Pioneer, tubos eppendorf de 2ml de volumen, un baño maría digital marca ICB modelo ICB-BATH, un termoblock digital marca Lab-Line modelo Multi-blok Heater y una centrifuga marca Labnet modelo Spectrafuge 16M.

En la amplificación de ADN se utilizó agua estéril, mezcla de reacción marca RedTaq polimerasa, alícuotas de ADN a concentración de 20-50ng/ μ l y mezcla de oligos (de acuerdo a lo descrito por Prince en 2010) compuesto por los primers ITS 18s forward (CGATTGAATGGTCCGGTGAAG) e ITS 26s reverse (AGGACGCTTCTACAGACTACAA) y a concentración final de 10ng/ μ l. El equipo usado para la amplificación de ADN incluyó el empleo de campanas de flujo laminar, tubos eppendorf para microcentrífuga de 500 μ l de volumen y un termociclador marca Techne modelo TC-312.

Para los análisis comprobatorios de electroforesis se utilizó gel de agarosa al 1 y 1.2% en solución T.A.E. al 1x (compuesta por tris, acetato y EDTA en solución), marcador de peso molecular marca Sigma, bromuro de etidio, una cámara de electroforesis marca Fotodyne conectado a un regulador de voltaje marca Sigma Techware modelo PS250-1 y un trasluminador de luz UV marca Syngene modelo GelVue M20 conectado a una computadora de escritorio con sistema operativo Windows 7. Por otro lado, para los análisis de concentración de ADN se utilizó un espectrofotómetro marca Jenway modelo Genova que contaba con celdillas de cuarzo de 0.5ml de volumen.

Durante todos los diversos procesos del análisis molecular se utilizaron espátulas metálicas, vasos de precipitado de diversos volúmenes, un vortex marca Daigger modelo Vortex-Genie 2, micropipetas marca Huawei de 20, 200, 500 y 1000 μ l de volumen máximo junto con sus respectivas puntas de plástico, dos refrigeradores a temperaturas de 0° y -20° centígrados respectivamente, marcadores de base aceite y guantes de látex estériles.

El proceso inicial para el tratamiento de los datos moleculares se llevó a cabo a través del empleo de los programas computacionales BioEdit, Mesquite, Notepad, mientras que la reconstrucción filogenética se hizo en programa computacional PAUP4 y la plataforma virtual CIPRES. Todos los programas computacionales fueron corridos en una computadora marca Lenovo modelo Y-50 con un procesador Intel Core i7 de 2.5 GHz, 8 GB de memoria RAM y sistema operativo Windows 10 de 64 bits.

Método

Material vegetal:

Se sometió al análisis molecular a un total de 30 ejemplares, constituidos por 16 ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides*, 4 ejemplares de *B. annua*, 5 ejemplares de *B. aristidoides* var. *arizonica*, 2 ejemplares de *B. repens*, 2 ejemplares de *B. eriopoda* y 1 ejemplar de *B. eriostachya* (estas últimas tres especies como grupo externo del complejo *B. aristidoides* – *B. annua*).

Cada uno de los 30 ejemplares es representativo de poblaciones únicas, cuentan con su respectivo voucher de colecta y corresponden a colecciones previamente identificadas y personalmente corroboradas (tabla 4.1).

Tabla 4.1 Listado del material vegetal utilizado en el análisis molecular del complejo *B. aristidoides* – *B. annua*. Entre paréntesis (cuando existe la información) se establecen las coordenadas exactas del lugar de colecta.

<i>Bouteloua aristidoides</i> var. <i>aristidoides</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2359	Jalisco, México (19° 48' 42" N, 104° 04' 25" W).	RSABG
Columbus 2444	Arizona, U.S.A. (32° 39' 48" N, 114° 23' 05" W).	RSABG
Columbus 3213	California, U.S.A. (34° 57.72' N, 116° 38.77' W).	RSABG
Columbus 3948	Texas, U.S.A. (29° 40' 48" N, 103° 10' 59" W).	RSABG
Columbus 3969	New México, U.S.A. (32° 50' 30" N, 108° 08' 39" W).	RSABG
Columbus 4074	Nayarit, México (20° 53' 25" N, 105° 08' 04" W).	RSABG
Columbus 4085	Colima, México (19° 07' 00" N, 104° 18' 37" W).	RSABG
Columbus 4610	Oaxaca, México (16° 40' 56" N, 96° 19' 03" W).	RSABG
Columbus 4648	B.C.S., México (24° 16' 25" N, 110° 19' 11" W).	RSABG
Columbus 4879	Argentina.	RSABG
Siqueiros 5113	Durango, México (24° 58' 53.5" N, 103° 44' 3.7" W).	HUAA
Siqueiros 5187	Sonora, México (31° 6' 8.1" N, 110° 2' 40.2" W).	HUAA
Siqueiros 5280	B.C.S., México (24° 48' 2.9" N, 111° 33' 59.7" W).	HUAA

Siqueiros 5281	B.C.S., México (24° 48' 2.9'' N, 111° 33' 59.7'' W).	HUAA
Siqueiros 5283	B.C.S., México (24° 48' 2.9'' N, 111° 33' 59.7'' W).	HUAA
Siqueiros 5311	Sinaloa, México (23° 11' 17.77'' N, 106° 25' 15'').	HUAA
<i>Bouteloua aristidoides var. arizonica</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2273	Arizona, U.S.A. (31° 29' 43" N, 110° 51' 19" W).	RSABG
Columbus 2513	Arizona, U.S.A. (31° 35.923' N, 110° 29.078' W).	RSABG
Siqueiros 5216	Sonora, México (30°57'12.8"N 110°35'42.2"W).	HUAA
Siqueiros 5218	Sonora, México (30°57'12.8"N 110°35'42.2"W).	HUAA
Siqueiros 5220	Sonora, México (30°57'12.8"N 110°35'42.2"W).	HUAA
<i>Bouteloua annua</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2433	B.C.S., México (27° 18' 27" N, 112° 56' 16" W).	RSABG
Columbus 2434	B.C.S., México (27° 24' 21" N, 112° 33' 16" W).	RSABG
Columbus 4649	B.C.S., México (24° 12' 52" N, 110° 13' 51" W).	RSABG
Columbus 4659	B.C.S., México (23° 25' 40" N, 110° 12' 04" W).	RSABG
<i>Bouteloua eriopoda</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Herrera y Siqueiros 1340	Chihuahua, México.	HUAA
Columbus 2461	Arizona, U.S.A. (31° 42' 03" N, 110° 31' 50" W).	RSABG
<i>Bouteloua eriostachya</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Columbus 2843	Coahuila, México (26° 45' 17'' N, 102° 09' 08'' W).	RSABG
<i>Bouteloua repens</i>		
Colecta	Lugar de colecta	Voucher
Siqueiros 5322	Durango, México (23°47'57.9"N 103°57'55.2"W).	HUAA
Siqueiros 5330	Oaxaca, México.	HUAA

Al momento de la colecta de la mayoría de los ejemplares sometidos al análisis molecular se les tomaron hojas maduras y sanas (verdes, sin presencia de contaminantes o proliferación de hongos), las cuales fueron preservadas en una bolsa plástica con sílica gel hasta el

momento de la extracción de su ADN. Para la extracción de ADN de los demás ejemplares, se utilizaron hojas maduras y sanas de ejemplares de herbario.

Extracción de ADN:

Para la extracción de ADN de los ejemplares usados en el análisis molecular, se utilizaron dos tipos diferentes de protocolos, un protocolo personalmente estandarizado tipo miniprep usando CTAB al 2% para el caso de que se partiese de material vegetal preservado en sílice gel, y un protocolo para el uso del kit de reactivos de Quiagen para el caso de que se partiese de material vegetal de ejemplares de herbario.

- **Protocolo CTAB al 2%**

Se pesó hasta un máximo de 0.3g de hojas maduras sanas y se pulverizaron en mortero con ayuda de nitrógeno líquido. El pulverizado se vació en tubos eppendorf y se les agregó 1.4ml de buffer de extracción CTAB al 2% (previamente preparado y disuelto a 60°C). Los tubos fueron centrifugados durante 8 minutos a 10,000 rpm e incubados en baño maría durante 15 minutos a 60°C.

Posteriormente se le agregó 600µl de solución cloroformo-alcohol isoamílico a cada tubo eppendorf agitando suavemente hasta homogeneizar, se centrifugaron a 7,000 rpm durante 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Una vez más, se le agregó la misma cantidad de solución cloroformo-alcohol isoamílico, se agitó suavemente y se centrifugó en las mismas condiciones al sobrenadante. El nuevo sobrenadante se volvió a transferir a un nuevo tubo.

Después, se agregó isopropanol frío (dos terceras partes del volumen del sobrenadante) a los tubos eppendorf que contenían el sobrenadante, se agitó el contenido, y se dejó reposar durante mínimo 12 horas a una temperatura de -20°C.

Finalmente, se centrifugó durante 5 minutos a 12,000 rpm a los tubos eppendorf con la mezcla de isopropanol y se les descartó el sobrenadante resultante. A la pastilla formada se le agregó 1ml de etanol al 70%, para después centrifugarla durante 5 minutos a 12,000 rpm y descartar el nuevo sobrenadante. El último paso consistió en resuspender la pastilla formada en el tubo eppendorf, con 200µl de agua destilada estéril y guardando la solución resultante a -20°C hasta el momento de su amplificación y/o cuantificación de DNA.

- **Protocolo Quiagen**

La preparación inicial de la muestra se dio de la misma manera que el usado en el protocolo miniprep de CTAB al 2%, es decir, se pesó el material vegetal y se pulverizó en mortero con ayuda del empleo de nitrógeno líquido, para posteriormente vaciar el pulverizado en tubos eppendorf de centrifuga. No obstante, a partir de este punto se siguió el protocolo DNeasy Plant Mini Kit, proporcionado por la empresa Quiagen (para especificaciones del protocolo ver el segundo apartado de la sección de anexos).

Una vez obtenida la solución final con el ADN en suspensión, esta se almacenó en refrigeración a una temperatura de -20°C hasta el momento en que fue usada para la cuantificación de ADN y/o amplificación.

Cuantificación de ADN:

Para la cuantificación espectrofotométrica de ADN, se tomó una alícuota de 0.1ml de cada una de las muestras obtenidas a partir de los protocolos de extracción de ADN y se diluyeron en agua destilada estéril hasta llegar a un volumen final de 0.5ml. La muestra diluida se leyó en un espectrofotómetro de luz UV/visible a una longitud de onda de 260 y 280nm (previamente calibrando el blanco con el agua destilada estéril).

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se calculó la concentración final y pureza de ADN de cada una de las muestras a partir de las siguientes fórmulas:

$$[\text{ADN}]_{260\text{nm}} = \frac{(\text{absorbancia a } 260\text{nm})(50)(\text{factor de dilución})}{1000}$$

$$\text{Pureza} = \frac{(\text{absorbancia a } 260\text{nm})}{(\text{absorbancia a } 280\text{nm})}$$

Amplificación:

Para la amplificación de los marcadores moleculares de ITS, se preparó una mezcla de reacción por cada muestra amplificada (compuesta por agua destilada estéril, mezcla de oligos, mezcla de red taq polimerasa y ADN) (ver tabla 4.2).

Tabla 4.2 Especificaciones de los contenidos y cantidades de las mezclas de reacción preparados para llevar a cabo la amplificación de ADN.

Mezcla (para 25 µl de reacción)	
Reactivos de la mezcla de reacción	Cantidad de muestra de reactivos (µl)
Agua destilada y estéril	8.5
Mezcla de oligos a concentración final de 10ng/ ml	2
Mezcla de reacción Red Taq polimerasa	12.5
Muestra ADN	2
Volumen total	25

Inmediatamente después de preparar la mezcla de reacción de cada una de las muestras, estas fueron colocadas en un termociclador, donde fueron sometidas a un proceso de desnaturalización inicial, seguida por 35 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión, y finalmente una extensión final (ver tabla 4.3).

Tabla 4.3 Configuración del termociclador para la amplificación del marcador molecular ITS a partir de las mezclas de reacción.

Configuración del termociclador			
Etapa	Numero de ciclos	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	1	4	94
Desnaturalización	35	1	94
Alineamiento	35	1	52
Extensión	35	1	72
Extensión final	1	7	72

Electroforesis:

Una vez concluido el proceso de amplificación, se realizaron corridas de electroforesis para corroborar la presencia de los productos de PCR correspondientes al marcador molecular ITS. Para esto, se prepararon pocillos en geles de agarosa al 1.2%, el gel se montó en una cámara de electroforesis, se cubrió con solución T.A.E. al 1x y se le colocó 10µl de producto de PCR de cada muestra en pocillos diferentes previamente identificados, así como un marcador de peso molecular comercial en otro pocillo. Después la cámara electroforética se conectó a un regulador de voltaje el cual suministró una corriente regulada a 100 volts durante un periodo de tiempo de 50 minutos.

Posteriormente el gel se sumergió en solución reveladora de bromuro de etidio durante 1 minuto en agitación, para posteriormente pasar el gel a otra solución de desteñido (compuesta por simple agua destilada) donde estuvo sumergido en agitación durante 5 minutos. Una vez desteñido el gel, este se colocó en un trasluminador de luz UV a oscuras para ratificar la presencia y peso molecular de los productos de PCR.

Secuenciación:

Todos aquellos productos de PCR que exhibieron una banda bien definida, de peso molecular aproximado a 950pb, fueron debidamente empaquetados y enviados a la empresa MacroGen con sede en Maryland E.U.A., en donde fueron purificados y secuenciados (a través de un

proceso de secuenciación de tipo Sanger). Los resultados de la secuenciación fueron mandados por parte de la empresa vía email.

Reconstrucción filogenética del complejo *B. aristidoides* – *B. annua*:

Para la reconstrucción filogenética se utilizaron únicamente aquellos resultados de secuenciación que mostraran cromatogramas claros, sin ambigüedades ni empalmes, y/o que contaran con la mayoría de sus caracteres con valores QV (valor de calidad) iguales o por encima de 20, esto con la finalidad de tener una alta certeza de que los resultados obtenidos reflejen la realidad del complejo *B. aristidoides* – *B. annua*.

Todas las secuencias fueron ingresadas y alineadas manualmente mediante el empleo del programa computacional BioEdit, en el cual se creó una matriz de datos con extensión de archivo tipo fasta (cada uno de los caracteres fueron corroborados cotejando los respectivos cromatogramas de secuenciación a la hora de realizar el alineamiento). Posteriormente el archivo se importó al programa computacional Mesquite, a través del cual se le cambió el formato del archivo de tipo fasta a uno de tipo nexus.

Mediante el empleo de la matriz de caracteres moleculares en formato nexus, se hizo la reconstrucción filogenética a partir de los métodos de máxima verosimilitud y bayesianos, empleando el programa computacional PAUP4 y la plataforma virtual CIPRES (respectivamente).

Para el método de máxima verosimilitud se usó un enraizamiento para hacer un grupo externo (compuesto por los taxa de *B. repens*, *B. eriopoda* y *B. eriostachya*) monofilético al grupo interno. Los valores de sustitución fueron del tipo $Ti/Tv = 2$, usando frecuencias empíricas para modelos de nucleótidos y aminoácidos, también se usó el modelo Hasagawa-Kishino-Yano para frecuencias desiguales, las estimaciones de sitios fueron iguales para todos los caracteres moleculares, el tamaño de ramas iniciales fue a través del método Rogers-Swofford con un límite de aproximación del 5%, una optimización de tamaño de rama usando

el método de Newton, mientras que el método Brent-Powell fue usado como optimizador multidimensional de parámetros, finalmente se utilizó una estimación de estado ancestral de tipo marginal. El análisis se llevó a cabo bajo los parámetros de búsqueda heurística, manteniendo solo los árboles óptimos, una adición escalonada de tipo “axis” manteniendo un árbol en cada paso, también adición escalonada para el cambio de ramas de árboles iniciales y un intercambio de ramas bajo el algoritmo TBR. Terminado el análisis se generaron árboles consenso bajo los criterios de la mayoría del 50%, estricto y semiestricto para posteriormente llevar a cabo un análisis bootstrap completamente heurístico de 1000 replicados, reteniendo grupos con frecuencias del 50%.

En el caso del método bayesiano, se utilizó el programa Mr.Bayes 3.2.6 en XSEDE con 6 tipos de sustituciones, bajo el modelo de sustitución de nucleótidos de tipo 4x4, invgamma como modelo de entre sitios, dos corridas con un número de generaciones de 5,000,000, cuatro cadenas y un muestreo de cadena de Markov cada 2500 generaciones. El árbol filogenético obtenido fue editado a través del programa computacional FigTree.

Resultados

Todas las muestras de ADN usadas para amplificación, dieron valores de concentración de ADN de entre 15 a 50ng/μl, así como valores de pureza de entre 1.4 a 1.9. Las muestras amplificadas presentaron una única banda bien definida de alrededor de 900pb (ver figura 4.1).

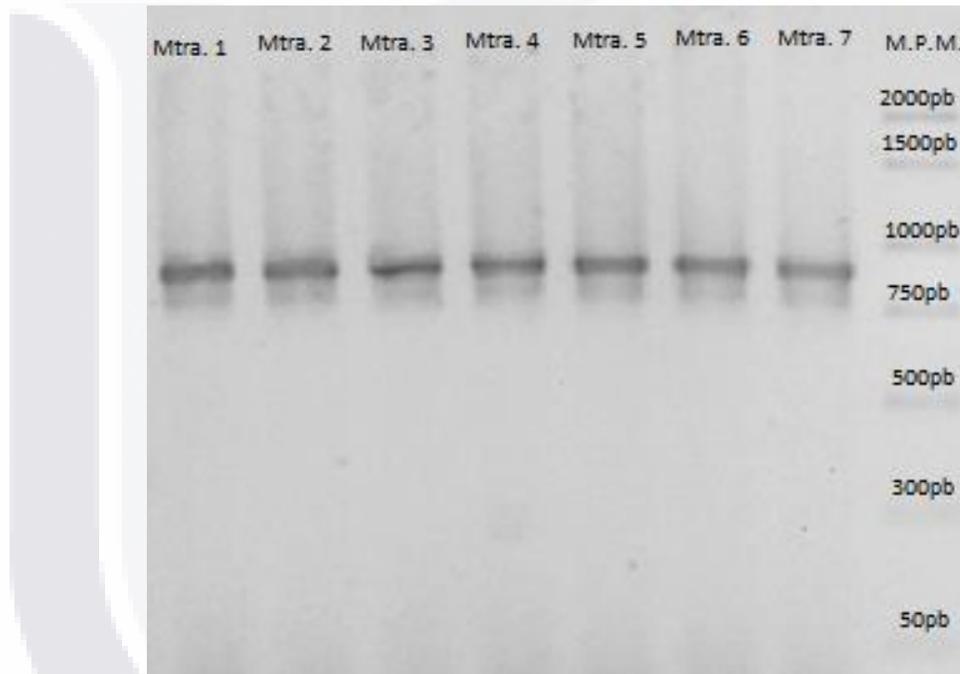


Figura 4.1 Gel de electroforesis visto en trasluminador UV después de aplicar un filtro de contraste. Mtra: Muestra; M.P.M.: Marcador de peso molecular. Se logra apreciar claramente una única banda por muestra, bien definida (producto de la PCR) de entre 750 a 1000pb.

Casi todas las muestras secuenciadas tuvieron un tamaño de lectura mayor a 800 caracteres, siendo en su mayoría con valores QV iguales o por encima de 20 y con porcentajes globales de relación guanina citosina de alrededor del 50% (ver tabla 4.4).

Tabla 4.4 Especificación de la calidad de secuencias usadas para la reconstrucción filogenética del complejo *B. aristidooides* – *B. annua*.

Muestra	Tamaño de secuencia (pb)	Caracteres con QV ≥ 20	Relación %GC
Herrera y Siqueiros 1340	832	803	50
Columbus 2273	842	829	50
Columbus 2359	857	856	50
Columbus 2433	858	857	51
Columbus 2434	853	848	51
Columbus 2444	841	803	51
Columbus 2461	833	815	50
Columbus 2513	819	818	50
Columbus 2843	853	841	49
Columbus 3213	846	845	50
Columbus 3948	847	846	50
Columbus 3969	857	842	50
Columbus 4074	851	850	50
Columbus 4085	716	417	49
Columbus 4610	846	832	50
Columbus 4648	853	737	49
Columbus 4649	778	368	43
Columbus 4659	837	831	49
Columbus 4879	833	831	50
Siqueiros 5113	727	648	51
Siqueiros 5187	888	857	49
Siqueiros 5216	856	846	50
Siqueiros 5218	823	793	51
Siqueiros 5220	752	713	49
Siqueiros 5280	852	851	50
Siqueiros 5281	859	858	50

Siqueiros 5283	858	857	50
Siqueiros 5311	856	759	49
Siqueiros 5322	859	858	53
Siqueiros 5330	867	866	52

Filogenia del complejo *B. aristidoides* – *B. annua*:

- **Método de máxima verosimilitud**

El análisis bajo el método de máxima verosimilitud arroja en forma generalizada un grupo monofilético interno compuesto por todas las especies y variedades del complejo *B. annua* – *B. aristidoides*. Dentro de este grupo interno encontramos a su vez, la formación de dos clados bien delimitados y separados, uno de ellos formado por todos los ejemplares evaluados de *B. annua*, mientras que el otro está formado por todos los ejemplares de *B. aristidoides*, incluyendo a sus variedades. Dentro de este último clado podemos observar que todos los ejemplares de *B. aristidoides* var. *arizonica* se agrupan aparte de todos los ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides*. No obstante, esto no ocurre de la misma manera para todos los ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides*, ya que la mayoría de los ejemplares se agrupan en dos grupos distintos, e incluso tenemos cuatro ejemplares formando politomias dentro del clado. Los valores de la prueba de bootstrap obtenidos son altos en los nodos principales y le dan soporte a los resultados obtenidos (ver figura 4.2).

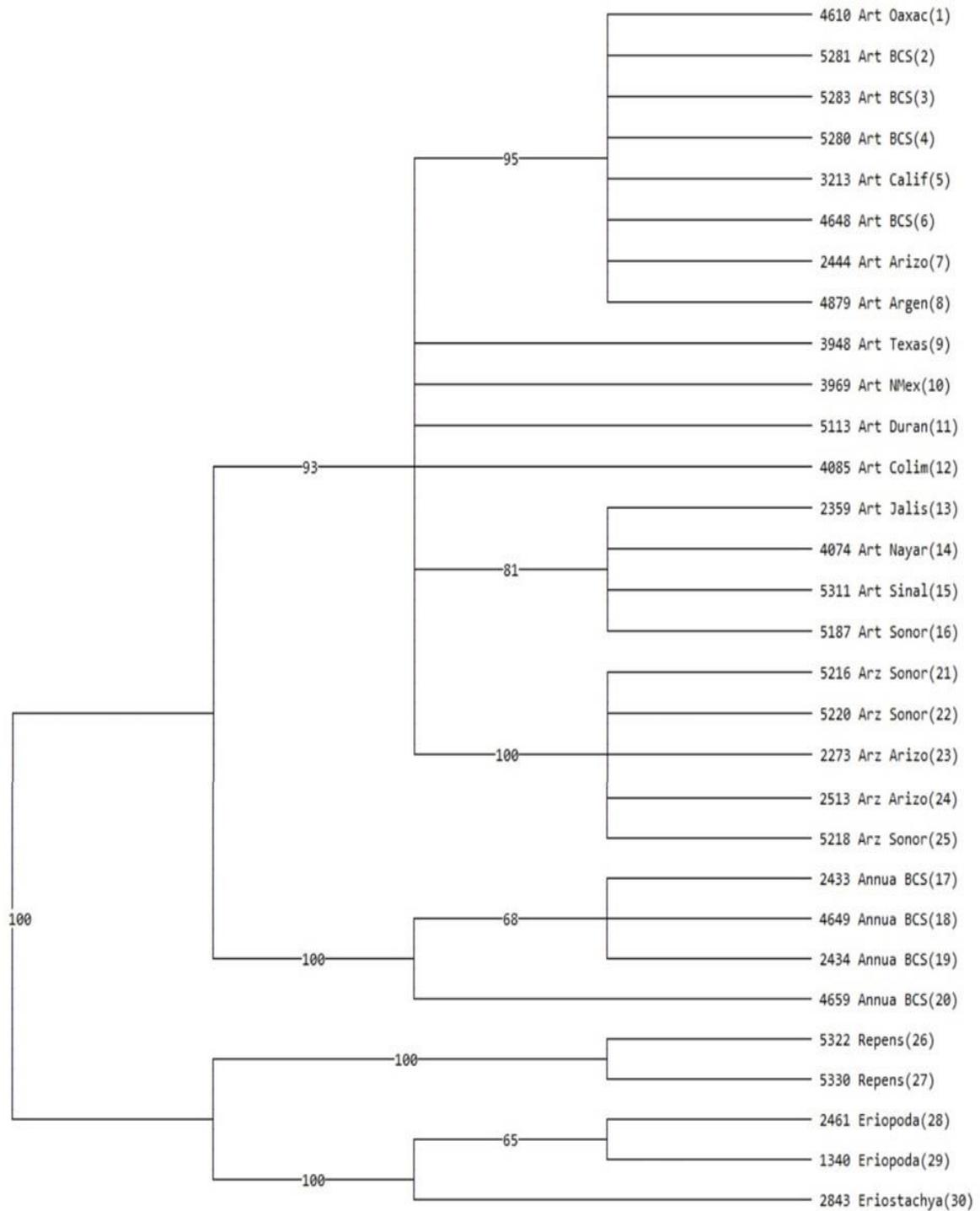


Figura 4.2 Árbol filogenético del complejo *B. aristidoides* – *B. annua*, obtenido a través del método de máxima verosimilitud. Los números arriba de las ramas indican los valores de confianza obtenidos a través de la prueba de Bootstrap. La nomenclatura usada para nombrar cada ejemplar consistió en usar el número de colecta, seguido por el nombre de la especie o variedad (o las tres primeras letras del nombre en su defecto) y finalmente, el nombre de la localidad donde fue colectado.

• Método Bayesiano

Los resultados obtenidos bajo el método Bayesiano son exactamente iguales a los obtenidos previamente bajo el método de máxima verosimilitud, incluso bajo el esquema de probabilidad Bayesiana, encontramos un mayor soporte probabilístico de los clados formados. Una vez más encontramos la formación de un grupo monofilético interno formado por todos los ejemplares del complejo *B. aristidoides* – *B. annua*. El grupo interno se divide a su vez en dos clados principales de igual jerarquía, uno compuesto únicamente por ejemplares de *B. annua*, y el otro formado en su totalidad por ejemplares de *B. aristidoides* y sus variedades. Dentro del clado formado por ejemplares de *B. aristidoides* vemos la división en dos grupos de la mayoría de los ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides*, mientras que otros 4 miembros están formando politomias dentro del clado, por otro lado, dentro del mismo clado también encontramos un tercer grupo formado por todos los ejemplares de *B. aristidoides* var. *arizonica*, en el cual se distingue una rama de mucho mayor longitud que aquellas formadas en los grupos y politomias formadas por *Bouteloua aristidoides* var. *aristidoides* (ver figura 4.3).

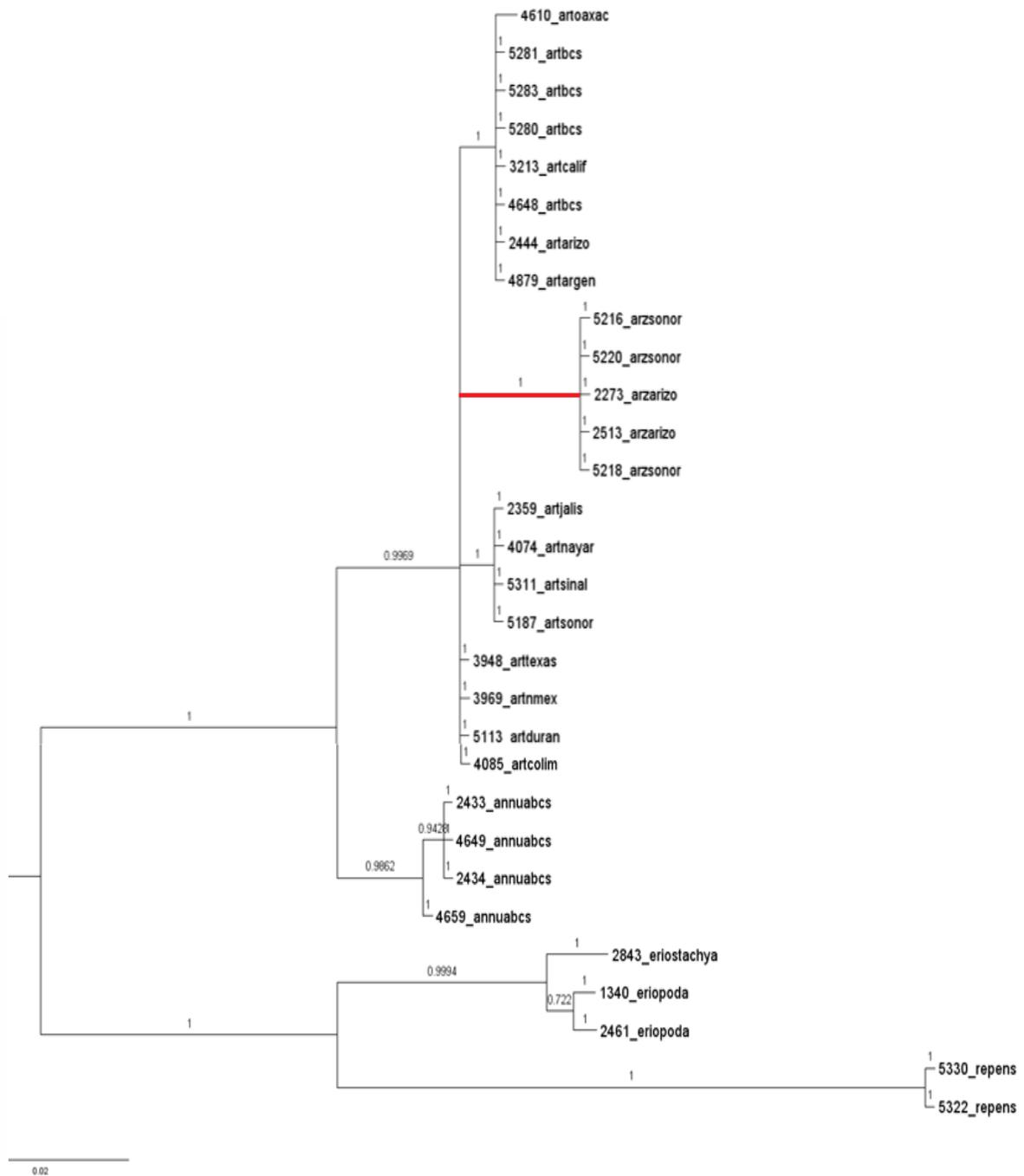


Figura 4.3 Árbol filogenético del complejo *B. aristidoides* – *B. annua*, obtenido a través del método de probabilidad Bayesiana. Los números de cada clado indican los valores de probabilidad obtenidos para la existencia de cada nodo, un valor de 1 denota una factibilidad del 100% de la existencia de dicho nodo. La nomenclatura usada para nombrar cada ejemplar consistió en usar el número de colecta, seguido por el nombre de la especie o variedad (o las tres primeras letras del nombre en su defecto) y finalmente, el nombre de la localidad donde fue colectado. Línea roja: Rama de separación del grupo compuesto por ejemplares de *B. aristidoides* var. *arizonica*.

Discusión

A lo largo de todos los análisis realizados, podemos ver una clara cohesión entre todos los ejemplares de *B. annua*, compartiendo una misma historia evolutiva (basada en datos moleculares) así como poca variabilidad morfológica entre ellos (basada en análisis morfométricos, anatómicos y micromorfológicos). Lo mismo sucede en el caso de los ejemplares evaluados de *B. aristidoides* var. *arizonica*, los cuales tienen poca variabilidad morfológica entre ellos y se organizan aparte de los taxa de *B. aristidoides* var. *aristidoides* en un solo grupo bien definido dentro del clado formado por todos los ejemplares evaluados de *B. aristidoides*, pero con una rama claramente distanciada del resto de los grupos (ver línea roja en figura 4.3) lo cual denota que genéticamente presenta varias diferencias con respecto a la variedad *aristidoides*. Para el caso de *B. aristidoides* var. *aristidoides*, su variabilidad morfológica y su historia evolutiva dan pauta a la presencia de dos o más grupos o variedades presentes dentro del grupo formado (ver figuras 4.2 y 4.3).

- **Análisis morfométrico**

El área delimitada por los ejemplares del grupo *B. annua* en los análisis morfométricos realizados, se extiende considerablemente debido a que el ejemplar 4679 no tiene una fuerte cohesión con los demás ejemplares del grupo (figuras 1.4, 1.5, 1.6 y 1.7), incluso el fenograma arroja al ejemplar 4679 como un miembro del grupo de *B. aristidoides* var. *arizonica* (figura 5.1). Esta separación se debe a la ausencia de observaciones correspondientes para el carácter de longitud de anteras de espiguillas de la espiga basal fértil de la inflorescencia para el caso específico del ejemplar 4679. La exclusión del ejemplar 4679 del estudio nos da como resultado una mayor cohesión entre los miembros del grupo (ver figura 1.9).

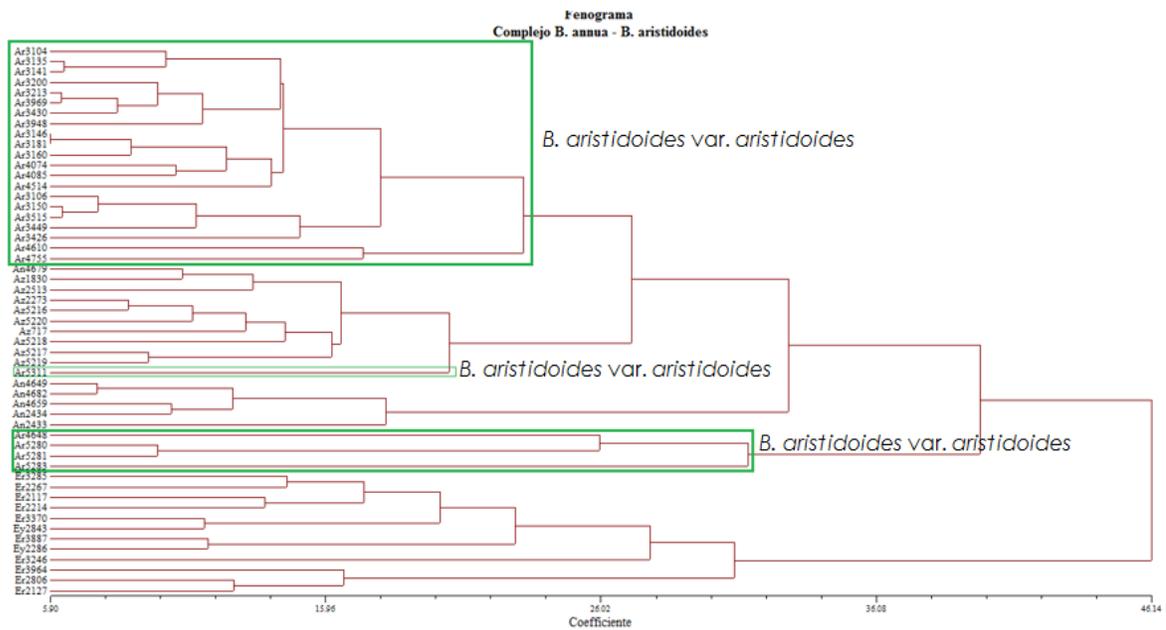


Figura 5.2 Fenograma elaborado a partir de la matriz usada para la construcción de los análisis morfométricos. Recuadros verdes; grupos formados por los ejemplares de *B. aristoides* var. *aristoides*.

Lo anterior desmiente la posibilidad de que el ejemplar 4755 forme un grupo nuevo por sí solo. Su separación del grupo principal (que cuenta con el mayor número de ejemplares), se debe más bien, a la ausencia de observaciones correspondientes para los caracteres de longitud de anteras de espiguillas de la espiga basal fértil de la inflorescencia y de longitud de anteras de espiguillas de la espiga apical fértil de la inflorescencia en la matriz morfológica usada. Por otro lado, la posibilidad de que el ejemplar 5311 forme parte del grupo formado por *B. aristoides* var. *arizonica* no se debe a una mala identificación, sino más bien, a que dicho ejemplar no era apropiado para incluirlo al análisis, debido a la naturaleza del lugar de colecta del ejemplar (un estacionamiento de automóviles), el cual contaba con muchas perturbaciones ocasionadas por actividades humanas, que en un momento dado, pudieron ocasionaron mutilaciones a la muestra (como es la pérdida de espigas por inflorescencia) y por consiguiente, alteraron las observación hechas al momento del llenado de la matriz morfológica.

Los análisis morfométricos dan soporte a la filogenia obtenida a partir de los datos moleculares, ya que muestran a los ejemplares evaluados de *B. annua* y *B. aristoides* var.

arizonica en grupos separados, bien definidos y mutuamente excluyentes, mientras que para los ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides* vemos una clara separación en varios grupos entre los ejemplares evaluados (ver figura 1.4). En específico son 5 ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides* (4 de localidades de Baja California Sur, México; y 1 de Piura, Perú) los que se separan del grupo principal en el análisis morfométrico.

También dan pauta a inferir varias de las posibles sinapomorfias presentes dentro del complejo *B. annua* – *B. aristidoides*, ya que así como los vectores eigen obtenidos indican; los caracteres de longitud de lema, número de espiguillas contenidas por espiga, longitud de anteras basales y apicales de espiguillas de una misma inflorescencia y la distancia existente entre el punto de unión de la espiguilla apical y el punto apical de la espiga, explican en gran medida la variación morfológica de todos los grupos formados. Esto es un indicativo de que dichos caracteres están involucrados de una u otra forma en el esclarecimiento de algunas de las sinapomorfias del complejo (ver figura 1.3).

Revisando detalladamente los datos obtenidos en la matriz morfométrica, podemos esclarecer de forma lógica el papel de estos caracteres en el establecimiento de las sinapomorfias del complejo:

Todos los ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides* tienen en promedio alrededor de 2 espiguillas por espiga, mientras que los ejemplares de *B. annua* y *B. aristidoides* var. *arizonica* contienen alrededor de 6 espiguillas por espiga. Lo anterior indica que todos los grupos formados por *B. aristidoides* var. *aristidoides*, presentan una reducción de espiguillas por espiga (pasando de en promedio 6 espiguillas por espiga, a solo 2 espiguillas por espiga).

Con respecto al carácter de longitud de lema, podemos ver que *B. aristidoides* var. *arizonica* tiene una reducción promedio en longitud de lema de alrededor de un 36% (midiendo en promedio 4.7 milímetros) con respecto a la longitud promedio de lema en *B. annua* (de alrededor de 7.3 milímetros), mientras que *B. aristidoides* var. *aristidoides* y *B. annua* conservan prácticamente la misma longitud de lema (entre 6 y 7 milímetros). Esto hace que

una reducción en la longitud de lema sea un fuerte candidato para las sinapomorfias del clado formado por *B. aristidooides* var. *arizonica*.

Los caracteres de medición de anteras basales y apicales de una misma inflorescencia madura arrojan un tamaño invariable en ambos casos cuando se trata de *B. aristidooides* var. *aristidooides* y *B. aristidooides* var. *arizonica*, no obstante, esto no se cumple para el caso de *B. annua*, donde vemos una fuerte reducción del tamaño de anteras basales (de 0.5 milímetros de longitud) con respecto a sus anteras apicales (que llegan a medir hasta por encima de 1 milímetro de longitud), este hallazgo concuerda con lo descrito por Columbus (1999b), en el cual advierte una fuerte presencia de los caracteres tanto de cleistogamia, como de casmogamia para *B. annua* y el carácter de cleistogamia como predominante para *B. aristidooides* (ya que también advierte que en ocasiones muy esporádicas se encontraron discrepancias de tamaño de anteras en la variedad *aristidooides*), para lo anterior se basó en una posible correlación en el tamaño de anteras y el tipo de reproducción llevado a cabo en la flor, siendo un tamaño pequeño de anteras propio de flores con autopolinización (cleistogamia), mientras que un tamaño grande de anteras es propio de flores con polinización cruzada (casmogamia). Por todo lo anterior, se tienen pruebas para creer que una de las sinapomorfias para *B. annua* es una fuerte presencia tanto del sistema de cleistogamia como el de casmogamia, mientras que *B. aristidooides* var. *aristidooides* y *B. aristidooides* var. *arizonica* presentan predominantemente el carácter de cleistogamia como sinapomorfia.

Por último, el carácter evaluado como la distancia que existe entre el punto de unión del raquis de la espiguilla apical a la rama de la espiga, y el punto apical de la rama de la espiga, nos da una idea de que tanto sobresale la rama de la espiga por encima de las espiguillas. Esta distancia es menor en el caso de *B. annua* (de 0.5 a 3 milímetros de longitud), seguida por *B. aristidooides* var. *arizonica* (de 4 a 6 milímetros de longitud) y alcanzando su máxima longitud para el caso de los ejemplares de *B. aristidooides* var. *aristidooides* (de 8 hasta 13 milímetros de longitud e incluso valores mayores a 27 milímetros para algunos ejemplares de localidades de baja california sur). Lo anterior queda demostrado de manera gráfica en la figura 1.6 donde el vector eigen del componente 2 del análisis de coordenadas principales (que es explicado casi por completo por el carácter en cuestión) se observa en un punto

intermedio entre los grupos formados por *B. annua* y *B. aristidooides* var. *arizonica*, mientras que a su vez, queda muy retirado del grupo formado por *B. aristidooides* var. *aristidooides*. Por lo tanto, se propone una rama de espiga conspicuamente sobresaliente, como característica en común para el caso de todos los grupos de *B. aristidooides* var. *aristidooides* formados durante los análisis morfométricos.

- **Análisis anatómico**

Los resultados del análisis anatómico de cortes transversales de hojas, de forma generalizada, muestran muy poca variabilidad de caracteres a lo largo de todos los ejemplares evaluados en el complejo *B. annua* - *B. aristidooides*, así como un pobre aporte para dilucidar posibles sinapomorfias dentro del complejo, no obstante, al revisar los diversos caracteres anatómicos a nivel especie (y no de forma generalizada), podemos observar que todos los ejemplares de *B. annua* comparten una gran cantidad de caracteres anatómicos entre sí. El caso anterior ocurre de la misma manera para *B. aristidooides* var. *arizonica*, sin embargo, esto no ocurre para *B. aristidooides* var. *aristidooides*, donde entre todos los ejemplares evaluados, solo se comparten unos cuantos pocos caracteres entre sí. Lo anterior va acorde a los resultados obtenidos en el análisis morfométrico y análisis molecular, en los cuales muestran a *B. aristidooides* var. *arizonica* y *B. annua* como dos grupos diferentes, con poca variabilidad morfológica y bien diferenciados entre sí, y a *B. aristidooides* var. *aristidooides* como varios grupos formados con variabilidad morfológica y molecular entre ellos.

- **Análisis micromorfológico**

Una vez más los resultados obtenidos en este apartado dan soporte a los resultados obtenidos en los estudios moleculares y morfométricos. Todos los ejemplares de *B. annua* comparten una gran cantidad de caracteres epidérmicos invariables entre sí, lo mismo ocurre con *B. aristidooides* var. *arizonica*, pero una vez más, *B. aristidooides* var. *aristidooides* presenta una gran variabilidad morfológica entre sus ejemplares, al grado que solo llegan a compartir unos cuantos caracteres invariables entre sí.

El análisis micromorfológico en epidermis de hoja de los ejemplares del complejo *B. annua* – *B. aristidoides* aportó mayor información que el análisis anatómico sobre las posibles sinapomorfias del complejo.

Como ya se mencionó en las observaciones generales del capítulo 3, durante la búsqueda de caracteres únicos de cada especie, se encontró que *B. aristidoides* var. *arizonica* cuenta con un conspicuo mayor número de papilas en zona adaxial que *B. annua* y *B. aristidoides* var. *aristidoides*, (de tipo distales y únicas por célula) distribuidas a lo largo de toda la lámina foliar, siendo células buliformes, células interestomatales y células costales largas donde se da más su prevalencia (ver figura 3.9).

Una de las características más sobresalientes observadas en este análisis, es que de todos los ejemplares del complejo *B. annua* – *B. aristidoides* estudiados, únicamente ciertos ejemplares de *B. aristidoides* var. *aristidoides* (Columbus 3104, Columbus 3426, Columbus 4610, Columbus 4648 y Siqueiros 5283) que corresponden a colectas realizadas en localidades de Argentina, Oaxaca, Baja California Sur y Perú, tienen presencia de macropelos tanto en zona abaxial como adaxial. En zona abaxial se caracterizan por ser macropelos multicelulares, delgados, con paredes celulares delgadas, de tipo glandulares en la base (presencia de una única célula epidérmica hinchada con forma hemisférica especializada que acompaña la base del pelo), con una longitud menor a 1.25 milímetros, presencia frecuente a lo largo de toda la lámina foliar, de distribución exclusiva para zonas intercostales y con una hendidura profunda en medio de la base a partir de la cual emerge el pelo. Por otro lado, en zona adaxial, los macropelos son de tipo bicelular, pudiendo ser rígidos o suaves (dependiendo de si tienen paredes celulares gruesas o delgadas), menores a 1.25 milímetros de longitud, frecuencia irregular a lo largo de toda la lámina foliar, distribuidos de manera exclusiva en zonas intercostales, con varias células epidérmicas ralas y pequeñas rodeando el punto de donde emerge el pelo, base del pelo hundida e incrustada por debajo de las células epidérmicas que lo rodean, por lo que aparenta que el pelo emerge por debajo de las células epidérmicas (ver figuras 3.18 y 3.22).

Al observar el árbol filogenético obtenido en los resultados del análisis molecular (ver figuras 4.2 y 4.3), podemos ver que los ejemplares que presentan este último carácter (Columbus 4610, Columbus 4648 y Siqueiros 5283), así como el ejemplar 4879 (Columbus) colectado en Argentina (que sirve de referencia para el ejemplar 3104 de Columbus, el cual cuenta con la presencia de macropelos y también fue colectado en Argentina), se encuentran agrupados en un mismo conjunto dentro del clado de todos los ejemplares evaluados de *B. aristidooides*. Lo anterior le da validez al análisis molecular, al presentar a este carácter como una posible autapomorfia del subgrupo en cuestión formado dentro de la filogenia de *B. aristidooides*. Cabe mencionar que los demás ejemplares que también fueron sometidos tanto al análisis morfométrico, como molecular (Columbus 3948 y Columbus 4074), se agruparon en grupos distintos al grupo que comparte la presencia de macropelos en zonas abaxial y adaxial.

De forma generalizada se puede establecer que un análisis morfométrico basado en MEB, es de gran ayuda para revisar caracteres micromorfológicos de epidermis de lámina foliar referentes a todo tipo de pelos (puntiagudos, de gancho, micropelos y macropelos), papilas, cuerpos de sílice, así como la distribución y el arreglo general de las células. Sin embargo, esta aproximación tiene bastantes limitantes a la hora de querer establecer caracteres micromorfológicos de células individuales (células costales, células intercostales, células interestomatales y estomas), debido a una fuerte prevalencia de cutícula en la hoja, sobretodo, en zona abaxial, por lo que no se descarta que queden varios caracteres de gran importancia faltantes de dilucidar en este tipo de análisis. Por todo lo anterior, se recomienda que en futuros análisis micromorfológicos en epidermis de lámina foliar del complejo, se busque una aproximación diferente a la de MEB, como lo podría ser el método de raspado de lámina foliar de hojas para la evaluación de caracteres micromorfológicos de epidermis descrito por Metcalfe C. R. (1960).

- **Análisis molecular**

Con base a los árboles filogenéticos obtenidos en los resultados moleculares (los cuales contienen altos valores de soporte) y todos los caracteres evaluados en los diferentes estudios

anatómicos, morfométricos y micromorfológicos, podemos proponer una historia evolutiva integral del complejo *B. annua* – *B. aristidoides*, en la cual se establecen los diversos clados que lo conforman, así como los caracteres evolutivos propios del complejo (ver figura 5.3).



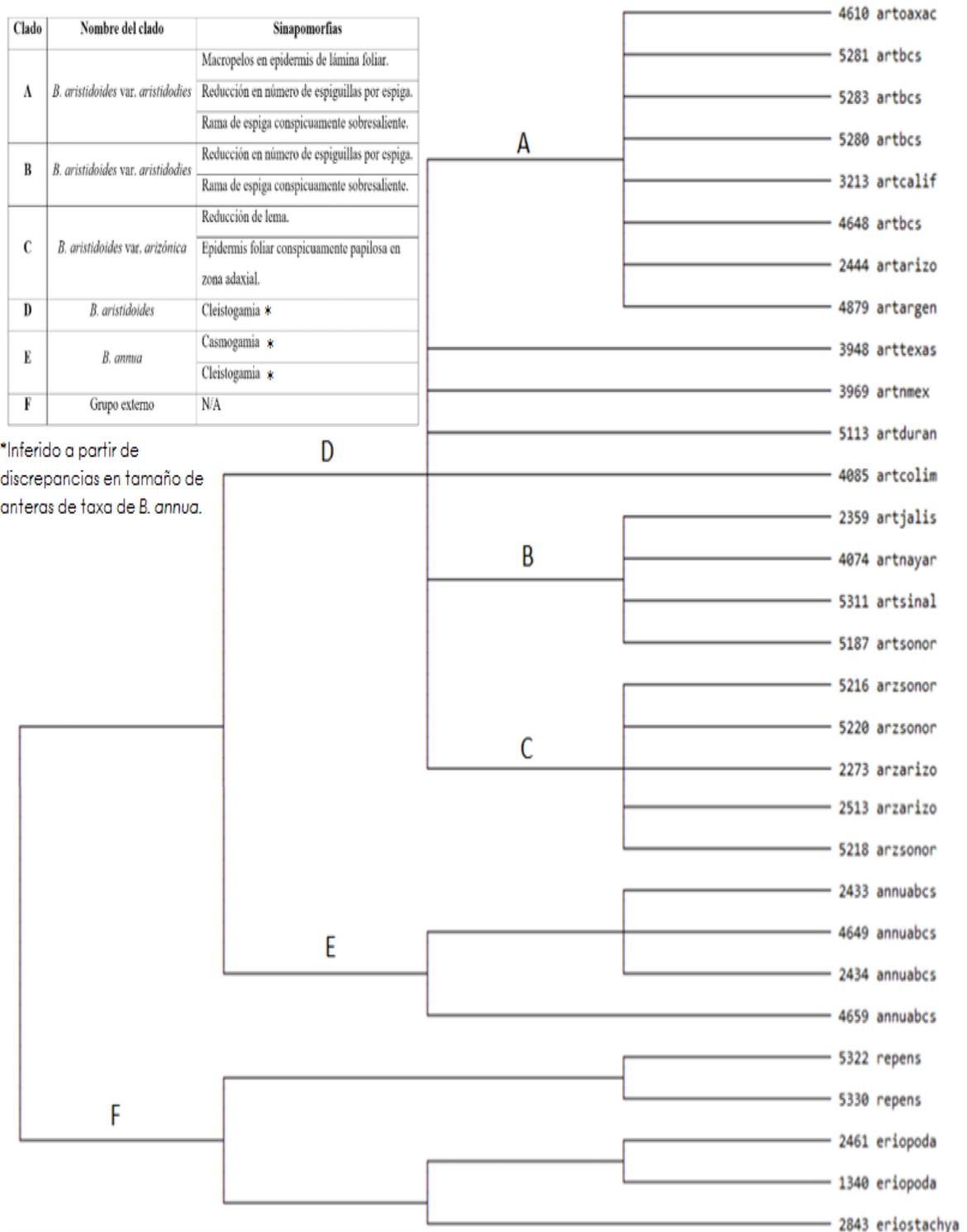


Figura 5.3 Reconstrucción filogenética del complejo *B. annua* – *B. aristidoides* basado en datos moleculares, junto con el mapeo de caracteres dentro del complejo basado en datos morfométricos, anatómicos y micromorfológicos de hoja. Las letras A, B, C, D, E y F corresponden a los principales clados formados, así como servir de claves que hacen alusión a las sinapomorfias descritas en el recuadro dentro del gráfico.

En la figura 5.3 podemos observar que las sinapomorfias propuestas para el clado E formado por ejemplares de *B. annua* es el de cleistogamia y casmogamia, mientras que para el caso del clado D de ejemplares de *B. aristidoides* encontramos únicamente la sinapomorfia de cleistogamia, lo anterior se infirió a partir de discrepancias en las mediciones (tomadas durante el análisis morfométrico) del tamaño de anteras presentes en todos los ejemplares de *B. annua*, los cuales presentaron en todo momento, anteras grandes y chicas (al compararlas entre sí) en diferentes ramas de una misma inflorescencia, lo cual concuerda con resultados descritos con anterioridad por Columbus (1999b), el cual a partir de diferencias en tamaño de anteras y estigmas, confirmó una predominancia del carácter de cleistogamia para *B. aristidoides* y tanto cleistogamia como casmogamia para *B. annua*, siendo la presencia de anteras chicas indicativo de cleistogamia y presencia de anteras grandes indicativo de casmogamia. Lo anterior nos lleva a formar las dos teorías más probables sobre la historia evolutiva de estos caracteres, la primera, en la que el ancestro inmediato común de *B. annua* y *B. aristidoides* contara con igual predominancia de ambos caracteres y que con el paso del tiempo varias de sus poblaciones redujeron drásticamente la presencia de casmogamia, dando surgimiento a *B. aristidoides*, mientras que la segunda teoría nos habla de que el ancestro común tuviera como predominante el carácter de cleistogamia y que con el tiempo el carácter de casmogamia hubiera obtenido igual prevalencia que el carácter de cleistogamia en varias de sus poblaciones, dando como resultado el surgimiento de *B. annua*. De las dos teorías, la primera tiene mayor factibilidad ya que es bien sabido que evolutivamente hablando, es más fácil perder un carácter que ganarlo, no obstante, no se puede descartar la segunda teoría por completo.

No podemos determinar los tiempos de divergencia para el caso de *B. annua* y *B. aristidoides*, pero sí podemos especular que una especie no se deriva directamente de la otra, sino que en algún momento de su evolución, compartieron uno o más ancestros en común. Lo anterior lo podemos asegurar, ya que cada especie forma un grupo monofilético, lo cual confirma el tratamiento que se les ha dado a cada grupo (desde su descubrimiento) como especies cercanamente emparentadas (donde el sistema de reproducción en flores es la principal característica que las diferencia).

Hablando específicamente del clado E conformado por ejemplares de *B. annua*, podemos observar que el ejemplar 4659 (Columbus) se agrupa aparte de los demás ejemplares del grupo, no obstante, si revisamos toda la información recabada a lo largo de los estudios morfométricos, anatómicos y micromorfológicos, encontramos que no existe ningún fundamento para creer que la especie se compone por dos tipos de variedades diferentes, sino que más bien se trata de alguna variación propia del análisis molecular del ejemplar 4659 (calidad de la secuenciación, un número menor de caracteres moleculares evaluados con respecto a los demás ejemplares de *B. annua*, etc.).

El clado D está formando un grupo monofilético compuesto en su totalidad por ejemplares de ambas variedades de *B. aristidooides*, siendo la principal sinapomorfia de la especie la reducción en el tamaño de anteras y por tanto la inferencia de un predominante sistema de reproducción en flores de tipo cleistogamia. No se incluyó en este clado la reducción en el número de espiguillas por espiga, por el hecho de que la variedad *arizonica* todavía conserva un número muy similar de espiguillas por espiga con respecto a su especie hermana *B. annua*, lo cual da evidencia de que uno de los escenarios más probable es que el ancestro común de todas las variedades de *B. aristidooides* tenía un número de espiguillas por espiga similar al de *B. annua*.

Todos los ejemplares de *B. aristidooides* var. *arizonica* se agrupan dentro del clado C, el cual a su vez está contenido dentro del grupo monofilético formado por el clado D de *B. aristidooides*, no obstante, como ya se mencionó con anterioridad, la gran distancia genómica observada en la reconstrucción filogenética por el método de probabilidad Bayesiana (ver figura 4.3), así como la presencia de sinapomorfias (6 espiguillas por espiga) y autapomorfias muy marcadas y distintas a las de la variedad *aristidooides* (reducción del tamaño de lema y un conspicuo aumento de papilas únicas distales en zona adaxial de hojas), dan pauta a pensar que es probable que *B. aristidooides* var. *arizonica* es en realidad una especie aparte y no una variedad (no obstante se necesita de un estudio molecular más profundo donde se empleen más marcadores moleculares para probar esta hipótesis).

Finalmente, al analizar a los ejemplares de *B. aristidoidea* var. *aristidoidea* podemos observar que estos no forman un grupo monofilético entre ellos, ya que se distribuyen en dos clados diferentes (A y B) formando dos grupos bien definidos y soportados por valores bootstrap altos (ver figura 4.2 y 4.3) e incluso tenemos taxones que forman politomias dentro del clado D. Esto da pauta a pensar una serie de posibles hipótesis sobre lo que pasa en esta variedad:

Una hipótesis es la posibilidad de que lo que conocemos hasta hoy como *B. aristidoidea* var. *aristidoidea*, es en realidad la composición de dos (o incluso más) variedades que a simple vista parecen muy similares entre sí, e incluso comparten autapomorfias semejantes (como es la reducción de número de espiguillas por espiga y ramas de espigas conspicuamente sobresalientes), los cuales fungen (en este caso hipotético) como caracteres homoplásicos. Otra posible hipótesis, es que las diferencias morfológicas y moleculares sean propias de la condición tetraploide de la variedad *aristidoidea*. Una última hipótesis es la posibilidad de que estemos presenciando un fenómeno evolutivo de especiación en un estado muy temprano dentro de la variedad *aristidoidea*. A favor de la primer teoría, tenemos la presencia de macropelos en epidermis de lámina foliar en el clado A (la cual correspondería a una autapomorfia de la nueva variedad) y la conspicua variabilidad morfométrica presentada en todos los ejemplares de *B. aristidoidea* var. *aristidoidea* de localidades de Baja California Sur, con respecto a los demás ejemplares analizados (ver figuras 1.4, 1.5, 1.6 y 1.7), en contra de esta teoría tenemos el hecho de que no todos los miembros del clado A tienen una variabilidad morfométrica parecida a la de los ejemplares de *B. aristidoidea* var. *aristidoidea* de localidades de Baja California Sur (ver figuras 1.4, 1.5, 1.6 y 1.7). Con respecto a la segunda teoría, encontramos a su favor, que al revisar detalladamente los caracteres moleculares de los ejemplares que están formando politomias en el clado D y contrastarlas con caracteres moleculares obtenidos en ejemplares de clados A y B, podemos observar que aquellos taxones que forman las politomias contienen tanto sinapomorfias moleculares pertenecientes a los ejemplares del clado A como a los del clado B en lugares específicos de la secuencia de nucleótidos del marcador molecular ITS usado para la secuenciación (es decir, estos ejemplares están en un punto intermedio en cuanto a las sinapomorfias moleculares propias del clado A y B), no obstante se necesita un mayor muestreo de localidades faltantes y el empleo de distintos marcadores moleculares para esclarecer el papel

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

dentro del grupo de estos ejemplares politómicos. La tercer teoría explicaría de forma eficiente la alta variabilidad morfométrica, anatómica y micromorfológica encontrada dentro de los diferentes miembros de *B. aristidooides* var. *aristidooides* a lo largo de los análisis realizados, pero también implicaría encontrar un ancestro común entre los clados A y B el cual muy probablemente sería *B. aristidooides* var. *arizonica* (en base a los datos moleculares y morfológicos ya presentados), el cual formaría un clado nuevo que (de forma indirecta) le daría una condición de especie y no de variedad a *B. aristidooides* var. *arizonica*.

Cualquiera que sea el caso de lo que está pasando dentro de los ejemplares de *B. aristidooides* var. *aristidooides*, lo que se tiene claro es que existen relaciones complejas difíciles de esclarecer (con los datos actuales) dentro del grupo, por lo que se necesita un posterior estudio que se enfoque al tratamiento exclusivo de esta variedad, en el cual se incluya un mayor número de ejemplares (para su estudio molecular) correspondientes a localidades faltantes en este estudio (sobre todo enfocándose a las zonas sur y centro oriente de México), se incluyan otros marcadores moleculares y se haga un especial énfasis en describir y contrastar las notorias diferencias morfológicas que existen entre los ejemplares de localidades de Baja California Sur, con respecto a las de otras localidades.

La propuesta de las sinapomorfias, autapomorfias y simplesiomorfias del complejo *B. annua* – *B. aristidooides* en el presente estudio, abre el panorama para la realización de futuros análisis que ayuden a dilucidar los diferentes mecanismos biológicos y procesos biogeográficos que llevaron a la actual distribución de los ejemplares del complejo. Sobre este tema, algunas de las preguntas que necesitan respuesta es el por qué *B. annua* es endémica de Baja California Sur, o por qué *B. aristidooides* var. *aristidooides* tiene una distribución mucho más grande que *B. aristidooides* var. *arizonica* (por poner algunos ejemplos). Con respecto a la primera pregunta, es posible que un enfoque biogeográfico con énfasis a eventos de vicarianza logren buenos resultados, mientras que para la segunda pregunta, hacer énfasis en las autapomorfias de cada variedad (en específico en el papel que realiza el carácter de ramas de espigas conspicuamente sobresalientes, como vector de propagación para *B. aristidooides* var. *aristidooides*) podrían traer a la luz nuevos hallazgos.

Conclusión

Mediante el presente estudio se logra confirmar la monofilia del complejo *B. annua* – *B. aristidoides* propuesta por Columbus en 1999 (a través de la reconstrucción filogenética a partir del empleo de datos moleculares), así como establecer las sinapomorfias, autapomorfias y simplesiomorfias de los clados que conforman al complejo, por medio de estudios morfométricos, anatómicos de cortes transversales de hoja y micromorfológicos de epidermis de hoja (siendo los estudios morfométricos y micromorfológicos los más informativos) aunados a la reconstrucción filogenética obtenida.

También se establece la variabilidad propia de las variedades de *B. aristidoides*, dando como resultados, un posible tratamiento de *B. aristidoides* var. *arizonica* como especie propia y no una variedad de *B. aristidoides* (no obstante se necesitan posteriores análisis para corroborar esta hipótesis, y el descubrimiento de variaciones de caracteres moleculares y morfológicos dentro de los ejemplares analizados de *B. aristidoides* var. *aristidoides* (siendo más conspicuos en aquellos ejemplares de localidades de Baja California Sur), que dan pauta a sospechar la existencia de nuevas variedades dentro de la especie, no obstante, se necesitan hacer futuros análisis enfocados en *B. aristidoides* var. *aristidoides* en el cual se incluyan ejemplares de localidades faltantes a este estudio, así como nuevos marcadores moleculares, para llegar a una conclusión certera sobre este punto.

Glosario

A

Abaxial: Cara inferior o envés de la lámina de una hoja.

Acrónimo: Sigla que se pronuncia como una palabra o vocablo formado al unir parte de dos palabras.

Adaxial: Cara superior o haz de la lámina de una hoja.

Agarosa: Polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*.

Algoritmo: Conjunto prescrito de instrucciones o reglas bien definidas, ordenadas y finitas que permite realizar una actividad mediante pasos sucesivos que no generen dudas.

Alícuota: Parte que se toma de un volumen o masa iniciales, cuyas propiedades físicas y químicas, así como su composición, representan las de la sustancia original.

Alogamia: Reproducción sexual en plantas consistente en la polinización cruzada y fecundación entre individuos genéticamente diferentes.

Ambiguo: Que puede entenderse o interpretarse de diversas maneras.

Anatomía: Estructura o disposición de los órganos y las partes del cuerpo de un ser orgánico.

Ancestro: Individuo del que desciende otro.

Andromonoico: Que presenta flores hermafroditas y flores unisexuales masculinas sobre un mismo individuo.

Aneuploide: Que posee un número anormal de cromosomas debido a un error durante la mitosis.

Antera: Parte superior del estambre de la flor que contiene el polen.

Anticlinal: Que tiene una curvatura convexa hacia arriba.

Ápice: Extremo superior o punta de la hoja, del fruto, etc.

Apomixis: Reproducción asexual en donde los descendientes son genéticamente idénticos a la planta madre

Autapomorfia: Novedad evolutiva que sólo aparecen en un grupo.

Autogamia: Reproducción sexual consistente en la fusión de gametos femeninos y masculinos producidos por el mismo individuo.

B

Biogeografía: Ciencia biológica que estudia la distribución geográfica de los animales y las plantas.

Bráctea: Órgano foliáceo de función protectora en la proximidad de las flores, diferente a las hojas normales y a las piezas del perianto.

Brida: Reborde circular en el extremo de los tubos de metal que sirve para ajustarlos unos con otros.

Buffer: Solución que puede oponerse a grandes cambios de pH (en un margen concreto) en una disolución acuosa.

C

Cariopsis: Fruto floral.

Casmogamia: Mecanismo de reproducción en flores que promueve la polinización cruzada.

Celulosa: Biopolímero compuesto exclusivamente de moléculas de β -glucosa.

Clado: Cada una de las ramificaciones que se obtiene después de hacer un único corte en el árbol filogenético.

Cleistogamia: Mecanismo de reproducción por la cual la flor se autopoliniza y se autofecunda debido a que la misma permanece cerrada.

Clorénquima: Tejido vegetal de tipo parenquimático característico por contener en su interior cloroplastos.

Cloroplasto: Orgánulo de las células vegetales y de las algas que contiene la clorofila y en el que se realiza la fotosíntesis.

Colénquima: Tejido vegetal formado por células alargadas con paredes reforzadas de celulosa.

Cóncavo: Forma curva más hundida en el centro que en los bordes.

Consenso: Acuerdo o conformidad entre todos los elementos que pertenecen a una colectividad.

Conspicuo: Notorio, obvio, de fácil identificación o reconocimiento.

Contiguo: Que está junto a otra cosa.

Cromatograma: Resultado gráfico de la cromatografía, en el cual, los diferentes picos del cromatograma corresponden a los diversos componentes de una mezcla.

Cualitativo: Que hace referencia a una cualidad de algo.

Cuantitativo: Que hace referencia a una cantidad de algo.

Cutícula: Tejido delgado y elástico que tapiza exteriormente al tallo y hojas de los vegetales; está formada por cutina y evita la pérdida de agua.

D

Dioico: Que contiene plantas unisexuales (masculinas o femeninas en su totalidad).

Diploide: Que presenta en su núcleo dos juegos de cromosomas homólogos.

Distal: Que indica lejanía hacia el punto de origen o inserción.

Divergencia: Proceso en el cual dos o más poblaciones de especies ancestrales acumulan cambios genéticos independientes.

E

Electroforesis: Técnica de laboratorio usada para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico.

Endémico: Que es exclusivo de un lugar.

Epidermis: Membrana epitelial externa, constituida por una única capa de células desprovistas de clorofila.

Equidimensional: Que tiene las mismas dimensiones.

Escabroso: Lleno de asperezas, de tricomas cortos y rígidos que se aprecian al tacto.

Esclerénquima: Tejido de sostén vegetal formado por células muertas con las paredes engrosadas y lignificadas.

Espectrofotometría: Medición de la cantidad de energía radiante que absorbe o transmite un sistema químico en función de la longitud de onda a la cual es evaluado.

Espiga: Inflorescencia formada por un conjunto de flores que están dispuestas a lo largo de un eje.

Espiguilla: Inflorescencia elemental que, junto a otras, forma parte de la espiga principal en algunas plantas.

Estoma: Estructura microscópica del tejido epidérmico de vegetales superiores por donde se verifica el intercambio de gases entre la planta y el exterior.

F

Fenograma: Diagrama bifurcado que representa el grado de similaridad fenética de un taxón y a partir del cual se puede inferir una relación filogenética.

Filogenia: Origen, formación y desarrollo evolutivo general de una especie biológica.

Floema: Tejido conductor encargado del transporte de nutrientes orgánicos e inorgánicos, hacia las partes basales subterráneas, no fotosintéticas, heterótrofas de las plantas vasculares.

Formalina: También llamado formaldehído, es un aldehído altamente volátil y muy inflamable, de fórmula $H_2C=O$.

G

Ginodioico: Plantas en la que unos individuos solo poseen flores femeninas, mientras que otros poseen flores unisexuales masculinas y femeninas o flores hermafroditas.

Gluma: Vaina estéril, externa, basal y membranosa que a modo de brácteas rodea las espiguillas de las gramíneas.

Gramínea: Familia de plantas herbáceas, o muy raramente leñosas, perteneciente al orden Poales de las monocotiledóneas.

Gránulo: Grano diminuto.

H

Heurístico: Estrategia sistémica para generar innovaciones positivas.

Hirsuto: Que cuenta con pelos ásperos, desaliñados y duros.

Histología: Disciplina que estudia todo lo relacionado con los tejidos orgánicos.

Homoplasia: Cambio evolutivo paralelo que hace que dos organismos presenten un mismo carácter adquirido independientemente.

I

Incrustar: Introducir una cosa, en los huecos previamente realizados en un objeto.

Infiltración: Acumulación o depósito que se forma en un tejido del cuerpo con una sustancia ajena a él.

Inflorescencia: Disposición de las flores sobre las ramas o la extremidad del tallo.

Interestomatal: Que se encuentra entre estomas.

Intergradación: Modo en que dos subespecies confluyen en áreas donde las poblaciones cuentan con características comunes para las dos subespecies.

L

Lema: Escama más externa de la inflorescencia de las gramíneas.

Lignina: Biopolímero presente en las paredes celulares a las cuales da dureza y resistencia.

Lumen: Espacio interno de un componente o estructura celular.

M

Maleza: Cualquier especie vegetal no deseada, que crece de forma silvestre en una zona cultivada o controlada por el ser humano.

Matriz: Ordenación rectangular de elementos algebraicos.

Mesófilo: Tejido que se encuentra entre las epidermis del haz y del envés de las hojas.

Micrótopo: Instrumento para cortar objetos o tejidos que se han de observar en microscopio.

Monocliuo: Que tiene plantas o flores hermafroditas.

Monofilia: Relación filogenética donde se agrupan organismos de todos los descendientes de un único ancestro común y cuya historia evolutiva se destaca por compartir características derivadas.

Monoico: Especies en las cuales ambos sexos se presentan en una misma planta.

Morfometría: Análisis cuantitativo del tamaño y la forma.

Mortero: Utensilio que sirve para moler o machacar

N

Nodo: Espacio en que confluyen parte de las conexiones de otros espacios reales o abstractos que comparten sus mismas características.

Nucleótido: Compuesto químico orgánico fundamental de los ácidos nucleicos, constituido por una base nitrogenada, un azúcar y una molécula de ácido fosfórico.

O

Oligo: Cadena de ácidos nucleicos o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

P

Palea: Pieza periántica bracteiforme por encima de la lema.

Papila: Prominencia cónica de pequeño tamaño que se forma debajo de la epidermis.

Parafilético: Que incluye al antepasado común de sus miembros, pero no a todos los descendientes de este.

Parsimonia: Preferencia por la explicación más simple entre varias alternativas.

Perenne: Aquella planta que vive durante más de dos años.

Plesiomorfia: Estado ancestral o primitivo de un carácter.

Polimerasa: Enzima capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos.

Poliploide: Célula, tejido u organismo con tres o más juegos completos de cromosomas de la misma o distintas especies o con dos o más genomas de especies distintas.

Politomia: Nodo sin bifurcación en un cladograma (nodo sin resolver).

Primer: Cadena de ácidos nucleicos o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Pubescente: Que tiene vello.

R

Ralo: Aquello que dispone de unidades o fragmentos que se hallan más separados de lo habitual en comparación a otros elementos del mismo tipo.

S

Sílice: Combinación de silicio con oxígeno (SiO_2).

Sinapomorfia: Novedad evolutiva compartida por todos los individuos de una especie.

Sinuoso: Que tiene recodos, curvas y ondulaciones irregulares y en distintos sentidos.

Sistemática: Área de la biología encargada de clasificar a las especies a partir de su historia evolutiva.

Suberoso: Que tiene las características del corcho o es parecido a él.

T

Tangencial: Perteneciente o relativo a la tangente (recta que toca a una curva o a una superficie sin cortarla).

Taxa: Grupo de organismos emparentados.

Taxón: Singular de taxa.

Taxonomía: Ciencia que trata de los principios, métodos y fines de la clasificación.

Termociclador: Aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de ADN.

Tetraploide: Que posee una dotación cromosómica formada por cuatro series de cromosomas homólogos.

Tricoma: Apéndices epidérmicos con diversa forma, estructura y función.

Vaina: Envoltura alargada.

Verosimilitud: Credibilidad o congruencia de un elemento determinado dentro de su universo.

Vertiginoso: Que se hace con mucha rapidez o intensidad.

Vicarianza: Separación geográfica de poblaciones que antes eran geográficamente continuas, impuesta por discontinuidades en el ambiente.

Voucher: Comprobante.

Xerófilo: Vegetación específicamente equipada para la vida en un medio seco.

Xilema: Tejido vegetal lignificado de conducción y soporte (otorga rigidez), que transporta líquidos de una parte a otra de las plantas vasculares.

Bibliografía

- Columbus J. T. (1999a). An expanded circumscription of *Bouteloua* (Gramineae: Chloridoideae): New combinations and names, *Aliso*, 18(1), 61–65.
- Columbus J. T. (1999b). Morphology and leaf blade anatomy suggest a close relationship between *Bouteloua aristidoides* and *B. (chondrosium) eriopoda* (Gramineae: Chloridoideae), *Systematic Botany*, 23(4), 467-478.
- Columbus J. T., Kinney M. S., Pant R., y Siqueiros M. E. (1998). Cladistic parsimony analysis of internal transcribed spacer region (nrDNA) sequences of *Bouteloua* and relatives (Gramineae: Chloridoideae), *Aliso*, 17(2), 99-130.
- Columbus J. T., Kinney M.S., Siqueiros M. E. y Porter J. M. (2000). Phylogenetics of *Bouteloua* and relatives (Gramineae: Chloridoideae): Cladistic parsimony analysis of internal transcribed spacer (nrDNA) and trnL-F (cpDNA) sequences, *Grasses: Systematics and evolution*, 2000.
- Columbus J. T., Cerros T. R., Kinney M. S., Siqueiros M. E., Bell H. L., Griffith M. P. y Refulio R. N. (2007). Phylogenetics of Chloridoideae (Gramineae): A preliminary study based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast trnL-F sequences, *Aliso*, 23, 565-579.
- Columbus J. T., Peterson P.M., Refulio R. N., Cerros T. R. y Kinney M. S. (2010). Phylogenetics of Muhlenbergiinae (Poaceae: Chloridoideae, Cynodonteae) Based on ITS and trnL-F DNA sequences, *Diversity, Phylogeny, and evolution in the monocotyledons*, Aarhus university press, Dinamarca, 2010.
- Cuéllar G. R. (2004). Sistemática moderna. Aguascalientes, México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Ellis R. P. (1976). A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. I. The leaf-blade as viewed in transverse section, *Bothalia*, 12(1), 65-109.
- Ellis R. P. (1979). A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae. II. The epidermis as seen in surface view, *Bothalia*, 12(4), 641-671.
- Everitt B. y Hothorn T. (2011). An introduction to applied multivariate analysis with R. New York, U.S.A.: Springer.

- Gould F. W. (1969). Taxonomy of the *Bouteloua repens* complex, *Brittonia*, 21(3), 261-274.
- Gould, F. W. (1979). The genus *Bouteloua* (Poaceae). *Missouri botanical garden press*, 66 (3), 348-416.
- Gould F. W. y Kapadia Z. J. (1964). Biosystematic studies in the *Bouteloua curtipendula* complex II. Taxonomy, *Brittonia*, 16(2), 182-207.
- Herrera, A. Y., Peterson, P. M. y Lemus, M. C. (2004). Revisión de *Bouteloua* Lag. (POACEAE). Durango, México: Filo de agua.
- Kinney M. S., Columbus J. T., y Friar E. A. (2007). Dicliny in *Bouteloua* (Poaceae: Chloridoideae): Implications for the evolution of dioecy, *Aliso*, 23, 605-614.
- Lemus, M. C. (1996). Las gramíneas de Aguascalientes. Aguascalientes, México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Lot A. y F. Chiang. (1986). Manual del Herbario. Administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos. México: Consejo Nacional de la Flora de México, A. C.
- Metcalfe C. R. (1960). Anatomy of the monocotyledons. Oxford: The clarendon press.
- Neapolitan R. y Naimipour K. (2011). Foundations of algorithms. Sudbury, MA: Jones and Bartlett publishers.
- Nobis M. (2014). Taxonomic revision of the central Asian *Stipa tianschanica* complex (Poaceae) with particular reference to the epidermal micromorphology of the lemma. *Folia Geobot*, 49, 283-308.
- Peterson P. M., Romaschenko K. y Johnson G. (2010). A classification of the Chloridoideae (Poaceae) based on multi-gene phylogenetic trees. *Molecular phylogenetics and evolution*, 55, 580-598.
- Prince L. M. (2010). Phylogenetic relationships and species delimitation in *Canna* (Cannaceae). Diversity, phylogeny, and evolution in the monocotyledons, Denmark: Aarhusuniversity press.

- Quijada A., Listón A., Delgado P., Vázquez L. A. y Álvarez B. E. (1998). Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region of *Pinus rzedowskii* revealed by PCR-RFLP. *Theor appl genet*, 96, 539-544.
- Rzedowski, J. (2006). Vegetación de México. *Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad*, 1(14), 225-246.
- Scarcelli N., Barnaud A., Eiserhardt W., Treier U., Seveno M., d'Anfray A., Vigouroux Y. y Pintaud J. (2011). A Set of 100 Chloroplast DNA Primer Pairs to Study Population Genetics and Phylogeny in Monocotyledons. *PLoS ONE*, 6(5), e19954.
- Sharman B. C. (1943). Tannic acid and iron alum with safranin and orange G in studies of the shoot apex. *Stain Technology*, 18, 105-111.
- Shaw J., Lickey E., Beck J., Farmer S., Liu W., Miller J., Siripun K., Winder C., Schilling E. y Small R. (2014). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American journal of botany*, 101(11), 1987-2004.
- Siqueiros M. E. (2007). Culm anatomy of *Bouteloua* and relatives (Gramineae: Chloridoideae: Boutelouinae). *Acta botánica mexicana*, 78, 39-59.
- Siqueiros M. E., Ainouche M., Columbus J. T. y Ainouche A. (2013). Phylogeny of the *Bouteloua curtispindula* complex (Poaceae: Chloridoideae) Based on nuclear ribosomal and plastid DNA sequences from diploid taxa. *Systematic botany*, 38(2), 379-389.
- Tzvelev, N. N. (1989). The system of grasses (Poaceae) and their evolution. *Botanical Review*, 55(3), 141-204.
- Vera A., Hirose T. y Sugiura M. (1996). A ribosomal protein gene (rp132) from tobacco chloroplast DNA is transcribed from alternative promoters: similarities in promoter region organization in plastid housekeeping genes. *Mol Gen Genet*, 251, 518-525.
- Villaseñor J. L. y Dávila P. (1992). Breve introducción a la metodología cladística. México: Coordinación de servicios editoriales facultad de ciencias, UNAM.

- Zuur A. F., Leno E. N. y Smith G. M. (2007). *Analysing ecological data*. U.S.A.: Springer.



Anexos

1.- Extracto del protocolo de Ellis de 1976:

A PROCEDURE FOR STANDARDIZING COMPARATIVE LEAF ANATOMY IN THE POACEAE.
I. THE LEAF-BLADE AS VIEWED IN TRANSVERSE SECTION

1. OUTLINE OF THE LAMINA IN TRANSVERSE SECTION

Outline usually determined by the shape of the abaxial surface. Includes the entire transverse section of the leaf blade at a point about halfway between the leaf apex and the base of the lamina. Subdivided into leaves that can be or are relatively flattened and permanently infolded, acicular leaves.

OUTLINE OF THE LAMINA OF OPEN LEAVES:

Includes all leaves which are not permanently infolded to such a degree that the internal structure is altered. These leaves overall shape.

DESCRIPTION:

Expanded; commonly flattened; a line connecting both margins and the median bundle straight:

Nature of blade; ribs and furrows not considered:

Flat, even or straight	101*
Undulating gently	102*
Distinctly wavy or undulating:	
Corrugated leaf i.e. waves rounded	103*
Pleated leaf i.e. waves pointed or angled	104*
V-shaped; two halves of the lamina folded toward each other on either side of the midrib i.e. a line connecting both margins with the median bundle angled at the median bundle; carinate:	
<i>Angle</i> formed by the two arms of the lamina at the midrib:	
Narrow; closed V i.e. less than 45° to each other	105*
Standard V i.e. between 45° and 90° to each other	106*
Broad, open V i.e. more than 90° to each other	107*
Wide, very open V i.e. almost 180°; presence of projecting keel gives appearance of V -shape	108*
<i>Shape</i> of arms of the lamina:	
Straight.....	109*
Outwardly bowed; concave	110*
Outwardly curving; convex	111*
Outline heart-shaped	112*
Distinctly wavy or undulating:	
Corrugated leaf i.e. waves rounded	113*
Pleated leaf i.e. waves pointed or angled; plicate	114*
Irregularly wavy or bent	115*
<i>Symmetry</i> of two halves of the lamina:	
Symmetrical on either side of the median vascular bundle	116
Two halves assymetrical on either side of the median vascular bundle	117*
U-shaped; two halves of the lamina curved upwards on either side of the midrib or with a prominent rounded keel i.e. no definite angle formed with the midrib; canaliculate:	
<i>Shape</i> of the U formed:	
Broad, wide i.e. horizontally elongated.....	118*
Tall, nanow i.e. vertically elongated	119*
Base and sides same length i.e. equidimensional.....	120*
Imolled; lamina rolled inwards towards the adaxial surface:	
<i>Nature</i> of inrolling:	
Convolute; inrolled from ONE margin only; margins wrapped around each other	121*
Involute; inrolled from BOTH margins	122*
<i>Degree</i> of inrolling:	
Tightly inrolled	123
Loosely in rolled	124

DESCRIPTION CONTINUED. Measurements taken by estimation utilizing the known diameter of the field of view of the objective where the thickness or width of the leaf almost fill this field of view. This standardisation is for the Zeiss Standard RA microscope fitted with X 10 Kpl W eyepieces.

Width of one half of the lamina i.e. from blade margin to midrib or median vascular bundle if midrib indistinguishable:

X16 Objective:

Less than half the field of view at x 160 i.e. less than 0,56 mm wide	125
Between half and the full field of view at x 160 i.e. from 0,56 mm - 1,125 mm wide	126

X2,5 Objective:

Less than half the field of view at x25 Le. 1,125 mm - 3,6 mm wide 127
Between half and the full field of view at x25 i.e. from 3,6 mm - 7,2 mm wide 128
Up to twice the field of view at x25 i.e. from 7,2 mm - 14,4 mm wide 129
More than twice the field of view at x25 i.e. more than 14,4 mm wide 130
Thickness of lamina taken at a point about halfway between the median bundle and the margin. Depth of largest rib in central area of lamina measured:

X40 Objective:

Less than one quarter of the field of view at x400 i.e. less than 0,112 mm thick 131
Between one quarter and half the field of view at x400 i.e. from 0,112 mm - 0,225 mm thick 132
Between half and three quarters of the field of view at x400 Le. from 0,225 mm - 0,336 mm thick 133
Between three quarters and the full field of view at x400 Le. from 0,366 mm - 0,450 mm thick 134
More than the full field of view at x400 i.e. more than 0,450 mm thick 135



2.- Extracto de la matriz anatómica obtenida en Excel a partir de los códigos numéricos empleados en el protocolo de Ellis de 1976:

A	B	C	F	I	L	O	R	
1	Especie	ARISTIDOES		ARIZÓNCA		ANJUA		
2	Número de colecta	4648 Columbus (BCS)	5282 Siqueros (BCS)	2434 Columbus (BCS)	2433 Columbus (BCS)	2843 Columbus (COAHUILA)	3864 Columbus (NEW MEXICO)	
3	Contorno de la lamina de hojas abiertas	Expandida	103	103	103	103	104	
4		Forma V	NA	NA	NA	NA	NA	
5		Forma U	NA	NA	NA	NA	NA	
6		Enrollada	NA	NA	NA	NA	NA	
7		Anchura	127 (2mm)	126 (1mm)	127 (1.8mm)	127 (1.8mm)	127 (2mm)	127 (2mm)
8		Grosor	131	131	131	131	132	132
9	Costillas y zarcos longitudinales adaxiales y abaxiales	Ausentes	NA	NA	NA	NA	NA	
10		Presentes en parte adaxial	202, 205, 208, 216, 223	202, 205, 208, 214, 223	202, 205, 208, 214, 223	202, 205, 208, 214, 223	202, 205, 208, 214, 216, 223	
11		Presentes en parte abaxial	233, 239, 242	233, 239, 242, 242	233, 239, 240, 241, 242	233, 239, 240, 241, 242	233, 239, 240, 241, 242	
12	Haz vascular medio, costilla media y estructura de quilla	Indeterminables	NA	NA	NA	NA	NA	
13		Solo haz medio presente	NA	NA	NA	NA	NA	
14		Solo costilla media presente	304, 303	304, 305	304	304	303	303
15		Quilla desarrollada	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	Arreglos de haces vasculares	# de haces de 1er orden de la mitad (de ancho) de la hoja	404	403	404	403	404	
17		Arreglos y alternaciones	417, 426	417, 426	414	412	414	
18		Posición	436 (3er orden, ab)	46 (3er Orden, 1er ord desplazo abaxi)	436 (ab)	436 (ab)	432	
19	Descripción del haz vascular	Haces vasculares de tercer orden	502, 509	502, 509	502, 509	502, 509	503, 508	
20		Haces vasculares de segundo orden	510	510	511	511	511	
21		Haces vasculares de primer orden	519, 520, 523, 527, 531, 534	519, 520, 523, 527, 531, 534	519, 520, 524, 527, 531, 534	519, 520, 524, 527, 531, 534	517, 520, 523, 527, 531, 534	
22	Vainas del haz vascular	Órdenes de haces vasculares	Primer orden (603)	Primer orden (603)	Primer orden (603)	Primer orden (603)	Primer orden (603)	
23		Sin vainas de haz rodeando los haces vasculares	NA	NA	NA	NA	NA	
24		Vaina de haz exterior o única existente	606 (elongado horizontal), 610, 614, 611	606 (elongado horizontal), 614, 616, 614	605, 612, 616, 642, 643	605, 612, 616, 642, 643	609, 614, 616, 645, 646	609, 611, 614, 616, 644, 646, 647
25		Estructura de células de parenquima de la vaina	652, 654, 662, 667 (mas chicas son ab)	652, 654, 656, 667, 673, 676, 679, 681	652, 654, 657, 667, 673, 676, 679	652, 654, 657, 667, 673, 676, 679	651, 652, 657, 667, 673, 679	652, 653, 654, 657, 667, 673, 676, 679
26	Vaina del haz interno	684, 694	684, 694	684, 691	684, 691	684, 691	684, 691	
27	Esclerenquima de la hoja	Órdenes de haces vasculares	Primer orden (703)	Primer orden (703)	Primer orden (703)	Primer orden (703)	Primer orden (703)	
28		Esclerenquima adaxial	706, 705, 705		705	705	705, 724, 706, 720	
29		Esclerenquima abaxial	736, 735, 745, 754	745, 754	743, 745	743, 745	745, 748, 754	747, 748
30		Estructura de células de esclerenquima	755, 760, 762	755, 760, 762	755, 760, 762	755, 760, 762	755, 756, 759	755, 760
31		Esclerenquima presente entre haces	763	763	763	763	763	763
32		Esclerenquima en el margen de la hoja	771, 774, 779, 780, 782	770, 773, 779, 780, 782	771, 774, 778, 780, 782	771, 774, 778, 780, 782	771, 773, 778, 780, 782	771, 772, 773, 779, 781, 782
33		Arreglo de esclerenquima en hojas asociadas	NA	NA	NA	NA	NA	NA
34	Mesófilo de la hoja	Clorénquima	2.do orden), 806 (1er orden en parte a	2.do orden), 806 (1er orden parte aba	805, 809, 810 (en margen), 812 (marg	805, 809, 810 (en margen), 812 (m	801, 805, 806 (ab), 809	801, 805, 806, 807, 809
35		Células transparentes	838, 840, 842, 844	838, 840, 841, 842, 844	838, 840, 842, 844	838, 840, 842, 844	838, 840, 842, 844	838, 840, 842, 844
36		Descomposición individual de células transparentes	859	859	859	859	859	859
37	Células epidermales	Células bulbiformes (adaxial)	929, 932	929, 930, 932	929, 930, 932	929, 930, 932	929, 930, 932	929, 930, 932
38		Células bulbiformes (abaxial)	903	903	903	903	903	903
39		Otras células epidermales y apéndices	937, 941, 965, 969, 972	937, 941, 965, 969, 968, 973, 974	937, 941, 962, 965, 970, 967, 969	937, 941, 962, 965, 970, 967, 969	937, 941, 962, 967, 969	937, 967, 962

3.- Extracto del protocolo de Ellis de 1979:

A PROCEDURE FOR STANDARDIZING COMPARATIVE LEAF ANATOMY IN THE POACEAE. II. THE EPIDERMIS AS SEEN IN SURFACE VIEW

3. INTERCOSTAL SHORT CELLS

Includes cells that are usually nearly equidimensional in shape but may be somewhat longer horizontally than they are vertically or their vertical width may exceed their horizontal length. They are, however, always smaller than the intercostal long cells with which they often alternate in horizontal rows. Intercostal short cells occur in pairs such as cork and silica cells or are solitary such as short intercostal cells and the cells from which micro-hairs, hooks and prickles arise. The silica bodies contained within typical silica cells of the cork-silica cell pairs are not included in this section but are described under Silica Bodies. Similarly, stomatal complexes and the cells of the cushion base of macro-hairs are excluded and described under the relevant sections.

DESCRIPTION OF SHORT CELLS: For variable types include all different types that occur on the preparation.
 Absent; no short cells in intercostal zones of surface examined 301
 Solitary short cells; includes cells from which hooks and micro-hairs arise:

Unsilicified; excludes only cells containing a distinct silica body; if cell walls only are silicified they are included here:
 Tall and narrow in shape; vertical dimension greater than horizontal dimension:
 Smooth outline 302*
 Crenate outline 303*
 Square or rectangular in shape:
 Smooth walls 304*
 Sinuous or undulating walls 305*
 Round or elliptical in shape 306*

Silicified silica cells containing distinct silica body or phytolith; solitary; excludes silicified cork cells, hooks or prickles; silica body described under Silica Bodies:
 Silica body and silica cell of same or similar shape 307*
 Silica body and silica cell different in shape 308*
 Paired short cells situated between long cells:

Silico-suberose couples; intercostal cork-silica cell pairs:
 Shape of cork cell; silica body described under Silica Bodies:
 Tall and narrow:
 With smooth outlines 309*
 With crenate or irregular outlines 310*
 Crescentic, enfolding the silica cell 311*
 Square to rectangular in shape 312*

Short cell pairs; excludes cork and silica cells; included are cells from which hooks and micro-hairs arise:
 Tall and narrow; both cells of the pair vertically elongated:
 Smooth outline 313*
 Irregular outline 314*
 Crenate outline 315*
 Square to rectangular; either one or both cells:
 Straight walls 316*
 Sinuous or undulating walls 317*

DISTRIBUTION OF SHORT CELLS:

Location of short cells or cell pairs in relation to long cells:
Between each successive long cell in a file; present at both ends of each long cell:
 Between all or most long cells i.e. 75% or more of the long cells with a short cell or cell pair between them . . . 318*
 Common between long cells only in the region flanking the costal zone 319
 Irregular; presence varies for different areas of the preparation..... 320
 Rare throughout the preparation 321

Between pairs of successive long cells in a file; present at only one end of each long cell:
 Present between most or all alternative long cells ie. 75% or more of the long cells 322*
 Irregular; presence differs for different areas of the preparation 323
 Rare throughout the preparation 324

4.- Extracto de la matriz anatómica obtenida en Excel a partir de los códigos numéricos empleados en el protocolo de Ellis de 1979:

Especie/Variación		ANHUA 4649		ARISTIDOIDES 3104		ARIZONICA 2273	
Número de colecta		ABASIAL	ADASIAL	ABASIAL	ADASIAL	ABASIAL	ADASIAL
Parte de la hoja que describe		ABASIAL	ADASIAL	ABASIAL	ADASIAL	ABASIAL	ADASIAL
Célular intercartalar larqar	Descripción de la forma celular	Relación longitud-	?	101?	101?	101	101
		Pared celular horizontal	?	105?	105?	105	105
		Pared celular lateral	?	110?	108?	108	108
		Gravar pared celular	?	113?	112?	112	112
	Variación en la forma celular	Ondulación pared	?	118?	117?	117	117
		Forma celular	?	126?	126?	126	126
		Tamaño celular	?	129?	127, 129	?	127
		Distribución de celular asociada	?	N/A	N/A	?	N/A
Descripción de celular buliforme	¿Auretor?	?	133?	133?	133	133	
	¿Preauretor?	?	138	138	138	138	
	¿Auretor?	138	138	138	138	138	
	¿Preauretor?	?	139?	139?	139	139	
Ertamata	Complejo ertamatal	¿Aurencia?Forma	?	202, 204	204	205	202, 205
		Distribución	213	213	213	213	213
		Arreglo	221	221	221	221	221
	Célular larqar interertamatal	Parición	227	227	227	227	227
		¿Aurencia?	?	N/A	N/A	N/A	N/A
		Tamaño	?	232	232	232	232
Célular intercartalar cartar	Descripción de celular cartar	Arreglo de filar	?	234	234	234	234
		¿Auretor?	?	N/A	?	N/A	
	Distribución de celular cartar	Salitarrar	?	305?	N/A	304?	N/A
		Paroadar	?	N/A	?	N/A	N/A
Papilar	Descripción de la papila	Localización con respecto a celular larqar	?	321, 324	?	324?	324
		¿Auretor?	?	N/A	?	N/A	
		Circular	?	402?	402?	402	402
	Distribución	Oblicuar	?	N/A	?	N/A	N/A
		En zona intercartalar epidormal	?	N/A	?	413?	414, 412
		En zona cartalar epidormal	?	420?	421?	420	420
		Una papila por célula	?	424?	424?	424	424
		Arreglo	?	N/A	?	N/A	N/A
Polar puntiaguda	Descripción de la polar rígidar	Asociación de papilar con celular vecinar	?	431?	431?	431	431
		¿Auretor?	501 (preauretorala en margen)	N/A	501	501 (preauretorala en margen)	N/A
		Tamaño de la base	N/A	503	N/A	503	503
		Tamaño de la lengüeta	N/A	505	N/A	505	505
		Forma de la lengüeta	N/A	510	N/A	509	509
		Orientación de la	N/A	513	N/A	513	513
	Distribución de la polar rígidar	Intercartalar	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		¿Auretor?	528	528	528	528	528
		Cartalar	N/A	523 (fila central), 524 (fila ale daña)	523, 524	N/A	521
		¿Auretor?	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Intercartalar	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		¿Auretor?	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Polar rígidar angular del margen	Distribución de la polar rígidar	Sin margen	N/A	N/A	N/A	N/A	
		Tamaño de la base	538	538	538	538	
	Distribución de la polar rígidar	Longitud de la lengüeta	540	540?	540	540	540
		¿Auretor?	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Micropolar	Descripción	Unicelular	N/A	N/A	N/A	N/A	
		Bicelular	607, 612, 614, 617, 620, 624, 627, 632, 631	608, 612, 615, 617, 619, 624, 627, 632	607, 612, 614, 616, 619, 624, 627, 632	607, 612, 614, 617, 620, 624, 627, 631, 632	
	Distribución	Intercartalar	634	634, 635	634	634, 635	634
		¿Auretor?	701	701	701	701	701
Macropolar	Descripción	# celular que campan en la pola	N/A	N/A	704	703	N/A
		Flexibilidad	N/A	N/A	706	705, 706	N/A
		Célular epidormal asociada a la base	N/A	N/A	707	709	N/A
		Naturalidad de la base del pola	N/A	N/A	711	713	N/A
		Asociación base macropolar con epidormir	N/A	N/A	716	715	N/A
		Tipo especializado de macropolar	N/A	N/A	Ninguna	Ninguna	N/A
		Longitud	N/A	N/A	723 (0.586 mm)	723 (0.920 mm)	N/A
		Frecuencia	N/A	N/A	727	725	N/A
		Distribución	N/A	N/A	728	728	N/A
		¿Auretor?	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Cuorpar de rílica	Descripción	Elongador verticalmente	N/A	N/A	N/A	N/A	
		Equidimensional	818, 817	817, 818	818, 817	817	
		Elongador	N/A	N/A	N/A	827	N/A
Distribución y descripción continua	Distribución	841	841	841	841	841	
	Descripción continua	845, 848	845, 848	845, 848	845, 848	845	
Célular cartalar cartar	Descripción y arreglo	Arreglo horizontal	?	902, 908, 908, 909, 911, 915	?	902, 904, 905, 908, 909, 912, 915	901, 904, 906, 908, 909, 912, 915
		Arreglo vertical	?	931, 932, 941 (zona central)	?	930, 931, 932, 940	930, 931, 932, 940

5.- Protocolo de extracción de ADN de Qiagen:

Quick-Start Protocol

DNeasy® Plant Mini Kit

The DNeasy Plant Mini Kit (cat. nos. 69104 and 69106) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year.

For more information, please refer to the *DNeasy Plant Handbook*, which can be found at www.qiagen.com/handbooks.

For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at www.qiagen.com/contact.

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
 - If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AW1 concentrates.
 - Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates.
 - Preheat a water bath or heating block to 65°C.
1. Disrupt samples (≤ 100 mg wet weight or ≤ 20 mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor®, the TissueLyser II, or a mortar and pestle.
 2. Add 400 μ l Buffer AP1 and 4 μ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation.
Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.
 3. Add 130 μ l Buffer P3. Mix and incubate for 5 min on ice.
 4. **Recommended:** Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
 5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
 6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AW1, and mix by pipetting.

April 2012



Sample & Assay Technologies

7. Transfer 650 μ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (≥ 8000 rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.

8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500 μ l Buffer AW2, and centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$. Discard the flow-through.

9. Add another 500 μ l Buffer AW2. Centrifuge for 2 min at 20,000 $\times g$.

Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.

10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.

11. Add 100 μ l Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$.

12. Repeat step 11.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, DNeasy®, TissueRuptor® (QIAGEN Group).
1071299 04/2012 © 2011–1012 QIAGEN, all rights reserved.

