

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DEL PASTO NATIVO *Bouteloua curtipendula* Michx. Torr. MEDIANTE MARCADORES DE AFLP

NATIVE GRASS *Bouteloua curtipendula* Michx. Torr. DIVERSITY CHARACTERIZATION USING AFLP MARKERS

Carlos Morales-Nieto¹, Adrián Quero-Carrillo², Olivier Le-Blanc³, Alfonso Hernández-Garay²,
Jorge Pérez-Pérez² y Sergio González-Muñoz²

¹INIFAP-CIRNOC. Campo Experimental La Campana. Avenida Homero No. 3744 Colonia El Vergel. 31100. Chihuahua, Chihuahua, México (morales_nieto_c_r@hotmail.com). ²Ganadería. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo. Estado de México. ³IRD-CIMMYT. Texcoco, México-Montpellier, Francia.

RESUMEN

El pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*) Michx. (Torr.), es una especie nativa de México, pero no se ha hecho un uso planificado de su riqueza genética. Para determinar relaciones genéticas en 90 poblaciones nativas de Banderita, de varios Estados de México, se analizó la expresión de marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y su consistencia, mediante cinco combinaciones de iniciadores, diseñados con base en las secuencias de *EcoRI* y *MseI*. Las distancias genéticas se estimaron utilizando el coeficiente de Jaccard, estableciéndose grupos funcionales mediante análisis de componentes principales (ACP) y de conglomerados (AC). Hubo 281 bandas iniciales que mostraron 36.6% de polimorfismo, utilizándose las 104 más consistentes para el análisis. Los coeficientes de Jaccard variaron de 0.0 a 0.82. El número de bandas polimórficas fluctuó desde 11 para *EcoRI*-AGG+*MseI*-CTA, hasta 29 para *EcoRI*-ACA+*MseI*-CAC. El ACP estableció dos grupos basados en polimorfismo genético que fueron consistentes con los del AC. Los dos primeros componentes principales explicaron 21.8% de la variación total. El ACP proporcionó evidencias para integrar germoplasma de poblaciones de zonas semiáridas de México. El dendograma generado por el método de ligamiento promedio no ponderado entre agrupamientos (UPGMA) dividió las 90 poblaciones en dos grupos. La variabilidad genética en las poblaciones se debió al origen del germoplasma y a movimientos de semilla por diferentes factores. Las poblaciones nativas de Banderita, en México, mantienen elevados niveles de variación genética, y en este estudio se ha obtenido información útil para su uso y conservación eficiente.

Palabras clave: *Bouteloua curtipendula*, componentes principales, pastos forrajeros.

INTRODUCCIÓN

México es un centro de diversidad genética de muchas especies forrajeras, en particular del complejo agámico del pasto Banderita

Recibido: Agosto, 2005. Aprobado: Abril, 2006.
Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 40: 711-720. 2006.

ABSTRACT

Bouteloua curtipendula Michx. Torr. (sideoatsgrana) is a native grass in México, but a structured use of its genetic diversity is missing. Amplified fragments length polymorphism (AFLP) analysis was conducted to define genetic relationships among 90 sideoatsgrana populations. Five AFLP primer combinations of *EcoRI* and *MseI* produced 281 bands, 36.6% of which were polymorphic, and the 104 most consistent of these were used for analysis. Genetic similarities were based on the Jaccard coefficient. Functional groups were established through principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA). Jaccard's coefficients varied from 0.0 to 0.82. Polymorphic bands ranged from 11 for *EcoRI*-AGG+*MseI*-CTA, to 29 for *EcoRI*-ACA+*MseI*-CAC. PCA established two groups based on genetic polymorphism that were consistent with the CA. The two first principal components explained 21.8% of the total variation. The PCA provided evidence to integrate germplasm of populations from Mexico's semi-arid areas. The dendrogram resulting from unweighted pair group methods using arithmetic averages (UPGMA) divided the 90 populations in two groups. Genetic variability in these populations was directly related to the geographic origin of the germplasm, as well as to seed movement due to different factors. Native sideoatsgrana populations, in México, maintain high levels of genetic variation, and this study provides useful information for its efficient use and conservation.

Key words: *Bouteloua curtipendula*, principal components, forage grasses.

INTRODUCTION

México is a center of genetic diversity of many forage species, in particular of the agamic complex of sideoatsgrana (*Bouteloua curtipendula*) (Michx.) Torr., widely distributed throughout the country (Hernández-X and Ramos, 1968). In *Bouteloua*, 57 species have been integrated, many of which are of great importance for the grazing

(*Bouteloua curtipendula*) (Michx.) Torr., ampliamente distribuido en el país (Hernández-X y Ramos, 1968). En *Bouteloua* se han integrado 57 especies, muchas de gran importancia para los agostaderos de América del Norte (Columbus, 1999). Los recursos genéticos son básicos para efectuar programas de mejoramiento en los que se debe considerar la recolección de materiales en el centro de origen (Hanna, 1990).

Los programas de mejoramiento genético en gramíneas forrajeras se han realizado con poca variabilidad genética (Roundy, 1999; Larson *et al.*, 2000). Así, las variedades liberadas se adaptan a ambientes reducidos sin conocer el potencial productivo en la diversidad natural de la especie de interés (Huff, 1997; Fu *et al.*, 2004a). Ésto se debe a la falta de estudios específicos de efectividad de recolecta y de desarrollo del material (Phan *et al.*, 2003). Es necesario valorar la importancia de esta diversidad en diferentes ambientes y con técnicas moleculares (Fu *et al.*, 2004b), promover la conservación, el uso racional de los recursos y su aplicación en programas de rehabilitación de pastizales (Jones *et al.*, 2002; Smith y Whalley, 2002).

El uso de marcadores moleculares facilita la valoración rápida y eficiente de la diversidad genética (Hammer, 2003). Los marcadores de AFLP (amplified fragment length polymorphism) o de polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados, aportan información precisa de la variación genética de una especie; así, los mejoradores deben combinar métodos para incrementar su eficiencia. Los marcadores de AFLP se han utilizado en gramíneas forrajeras por su eficiencia para detectar polimorfismos (Pillay y Myers, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Roldán-Ruiz *et al.*, 2000).

El Banderita conserva su valor forrajero durante más tiempo que otros pastos y, junto con otras especies nativas, posee gran potencial de uso en programas de mejoramiento genético y recuperación de pastizales en México (Hernández, 1959; Hernández y Ramos, 1968). Además, conocer las relaciones genéticas entre individuos de diversas poblaciones es básico en programas de mejoramiento, ya que permite reconocer genotipos superiores y, con otros datos agronómicos, facilita el avance genético. Por tanto, el objetivo de este estudio fue diferenciar y determinar las relaciones genéticas entre diversas poblaciones nativas de *Bouteloua curtipendula*, utilizando marcadores de AFLP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

En 11 Estados de México se recolectaron 577 ecotipos de Banderita durante 2002 y 2003 que se establecieron en el Campus San

lands of North America (Columbus, 1999). Genetic resources are essential for conducting breeding programs, which should include the collection of materials in the center of origin (Hanna, 1990).

Forage grass breeding programs have been conducted with little genetic variability (Roundy, 1999; Larson *et al.*, 2000). Thus, the varieties that are released adapt to reduced environments without knowing the productive potential in the natural diversity of the species of interest (Huff, 1997; Fu *et al.*, 2004a). This is due to the lack of specific studies of collection effectiveness, and development of the material (Phan *et al.*, 2003). It is necessary to evaluate the importance of this diversity in different environments with molecular techniques (Fu *et al.*, 2004b), to promote the conservation and rational use of the resources and their application in grassland rehabilitation programs (Jones *et al.*, 2002; Smith and Whalley, 2002).

The use of molecular markers facilitates the rapid and efficient evaluation of genetic diversity (Hammer, 2003). The markers of AFLP (amplified fragment length polymorphism) or of polymorphism in the length of amplified fragments, provide precise information of the genetic variation of a species; thus, breeders should combine methods to increase their efficiency. AFLP markers have been used in forage grasses because of their efficiency in detecting polymorphisms (Pillay and Myers, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Roldán-Ruiz *et al.*, 2000).

Sideoatsgrama conserves its forage value longer than other grasses, and along with other native species, has great potential for use in the breeding and pasture recovery programs in México (Hernández, 1959; Hernández and Ramos, 1968). Furthermore, knowing the genetic relationships among individuals of diverse populations is essential in breeding programs, as makes it possible to recognize superior genotypes and, with other agronomic data, facilitates the genetic advancement. Therefore, the objective of the present study was to differentiate and determine the genetic relationships among diverse native populations of *Bouteloua curtipendula*, using AFLP markers.

MATERIALS AND METHODS

Genetic material

During 2002 and 2003, 577 ecotypes of sideoatsgrama were collected in 11 states of México, and established in the San Luis Campus of the Colegio de Postgraduados in Salinas, San Luis Potosí, México. The climate is arid (BSo kw), with an average annual temperature of 16 to 18 °C and average annual precipitation

Luis del Colegio de Postgraduados, en Salinas, San Luis Potosí, México. El clima es árido (BS0 kw), temperatura promedio anual de 16 a 18 °C y precipitación promedio anual de 350 a 400 mm. De estos ecotipos, 193 sobrevivieron y se integraron en 90 poblaciones (Cuadro 1), para el análisis de marcadores de AFLP. El estudio se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), en Texcoco, México. Se recolectaron 30 hojas por ecotipo, se colocaron en nitrógeno líquido, se secaron mediante un liofilizador LABCONCO por 72 h, se molieron y almacenaron a -20 °C. El

of 350 to 400 mm. Of these ecotypes, 193 survived and were integrated in 90 populations (Table 1) for the analysis of AFLP markers. The study was conducted in the Applied Molecular Genetics Laboratory of the Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), in Texcoco, México. Thirty leaves were collected per ecotype, which were placed in liquid nitrogen, and dried in a LABCONCO lyophilizer for 72 h, then were ground and stored at -20 °C. The DNA was obtained from 40 mg of leaf, according to the Saghai-Marooof technique (Hoisington *et al.*, 1998), quantified and stored at 4 °C.

Cuadro 1. Poblaciones de zacate Banderita (*Bouteloua curtipendula*), utilizadas en el análisis de AFLP (2004), recolectadas en 11 Estados de México, durante 2002 y 2003.

Table 1. Populations of sideoatsgrama (*Bouteloua curtipendula*), used in the analysis of AFLP (2004), collected in 11 States of México, during 2002 and 2003.

Población	Clave de la población	Altitud (m)	Estado de origen	Población	Clave de la población	Altitud (m)	Estado de origen
1	SAL-PN-1	800	Coahuila	46	DGO-46	1800	Durango
2	SAL-PN-2	1100	Coahuila	47	SALI-SLP-47	1795	SLP
3	SAL-PN-3	1300	Coahuila	48	DGO-48	1700	Durango
4	SAL-ZAC-4	1500	Coahuila	49	DGO-PA-49	1750	Chihuahua
5	SAL-ZAC-5	1500	Coahuila	50	DGO-PA-50	1800	Durango
6	SAL-ZAC-6	1600	Coahuila	51	DGO-PA-51	1900	Chihuahua
7	SAL-ZAC-7	1500	Coahuila	52	DGO-PA-52	2000	Chihuahua
8	SAL-ZAC-8	1600	Coahuila	53	DGO-PA-53	2100	Durango
9	SAL-ZAC-9	1500	Coahuila	54	DGO-PA-54	2050	Durango
10	SAL-ZAC-10	1500	Coahuila	55	DGO-PA-55	1950	Durango
11	SAL-ZAC-11	1500	Coahuila	56	DGO-PA-56	1700	Durango
12	SAL-ZAC-12	1500	Coahuila	57	DGO-PA-57	1600	Durango
13	SAL-ZAC-13	1500	Coahuila	58	SAL-MO-58	1490	Coahuila
14	SAL-ZAC-14	1700	Coahuila	59	SAL-MO-59	1490	Coahuila
15	SAL-ZAC-15	2300	Coahuila	60	SAL-MA-60	1400	Coahuila
16	SAL-ZAC-16	2000	Coahuila	61	SAL-MA-61	1400	Coahuila
17	SAL-ZAC-17	2000	Zacatecas	62	SAL-MA-62	1490	Coahuila
18	SAL-ZAC-18	1800	Zacatecas	63	SAL-MA-63	1400	Coahuila
19	SAL-ZAC-19	1700	Zacatecas	64	SAL-MA-64	1500	Coahuila
20	SAL-ZAC-20	1800	Zacatecas	65	SAL-MA-65	1615	SLP
21	SLP-ZAC-21	1900	SLP	66	SAL-MA-66	1650	SLP
22	SLP-ZAC-22	2000	SLP	67	MA-SLP-67	1670	SLP
23	SLP-ZAC-23	2100	SLP	68	SLP-SALI-68	1700	SLP
24	SLP-ZAC-24	2200	SLP	69	SLP-SALI-69	1800	SLP
25	OJ-PI-25	2300	Jalisco	70	SLP-SALI-70	2060	SLP
26	SLP-ZAC-26	2180	SLP	71	OAX-MEX-71	2000	Oaxaca
27	SLP-ZAC-27	2400	SLP	72	TO-CHI-72	1100	Coahuila
28	SLP-ZAC-28	2400	SLP	73	DE-CHI-73	1270	Chihuahua
29	SLP-ZAC-29	2300	Zacatecas	74	CHI-JU-74	1200	Chihuahua
30	SLP-ZAC-30	2300	Zacatecas	75	CHI-JU-75	1240	Chihuahua
31	SLP-ZAC-31	2300	SLP	76	FM-SB-76	1180	Chihuahua
32	SLP-ZAC-32	2380	SLP	77	FM-SB-77	1160	Chihuahua
33	SLP-ZAC-33	2400	SLP	78	CG-JA-78	1550	Chihuahua
34	AGU-PI-34	1900	Aguascalientes	79	AP-NO-79	1150	Sonora
35	AGU-PI-35	1900	Aguascalientes	80	AP-CA-80	1120	Sonora
36	AGU-PI-36	1900	Aguascalientes	81	CA-IM-81	820	Sonora
37	AGU-PI-37	1900	Aguascalientes	82	CR-LJ-82	2050	Chihuahua
38	QRO-SLP-38	2100	Querétaro	83	CU-CHI-83	2100	Chihuahua
39	QRO-SLP-39	2000	Querétaro	84	CHI-OJ-84	1200	Chihuahua
40	TOL-TAX-40	2500	México	85	CHI-OJ-85	1250	Chihuahua
41	MAP-PA-41	1300	Durango	86	CHI-OJ-86	1580	Chihuahua
42	MAP-PA-42	1400	Durango	87	CHI-OJ-87	1400	Chihuahua
43	MAP-PA-43	1600	Durango	88	PA-DGO-88	1960	Durango
44	MAP-PA-44	1600	Durango	89	VA-OJ-89	1750	Jalisco
45	MAP-PA-45	1700	Durango	90	OJ-PI-90	2100	Jalisco

ADN se obtuvo de 40 mg de hoja, según la técnica de Saghai-Ma-roof (Hoisington *et al.*, 1998), se cuantificó y almacenó a 4 °C.

Caracterización de la diversidad

Los marcadores de AFLP utilizados fueron del tipo quimio-luminiscentes (Hoisington *et al.*, 1998). Con base en el poli-morfismo expresado se utilizaron cinco pares de combinaciones de iniciadores *EcoRI* y *MseI* (Cuadro 2), a partir de 12 pares iniciales. Para definir el porcentaje de polimorfismo, se sumó el porcentaje de polimorfismo de cada combinación de iniciadores y se dividió entre el número total de combinaciones de iniciadores. El producto de pre-amplificación (PA), se verificó en gel de agarosa. Los productos de la PA se diluyeron con 80 μL de H_2O con destilación doble. Se añadieron progresivamente 3 μL de la reacción de PA para la reacción de amplificación selectiva (AS), 0.25 μM del iniciador *MseI* de la AS, 0.1 μM del iniciador *EcoRI* de la AS, marcado con digoxigenina, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl_2 y 0.75 U de *Taq* polimerasa. Se obtuvo un volumen total de 18 μL , con iniciadores considerando tres bases selectivas. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador ERICOMP TwinBlock.

Para la electroforesis de ADN se mezclaron 5 μL del producto de la AS con 2 μL de 5X SGB (amortiguador: 95% formamida, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xileno cianol y 10 mM NaOH). El ADN se desnaturizó a 95 °C por 10 min. Se transfirieron las bandas de ADN del gel, a membrana de nailon (0.45 micras de 30×39 cm), por 16 h con la técnica de Southern blot en seco. Las membranas se expusieron 3 a 4 h a películas radiográficas.

Los grupos de entrada se definieron con base a Pseudo F y Pseudo t^2 , con el PROC CLUSTER (SAS, 1996) y se reconoció, dentro del grupo de caracteres utilizados, los de mayor valor discriminante y con eficiente identificación de relación entre las poblaciones en estudio. A partir de las bandas producidas, se construyó una matriz binaria (MB; presencia, ausencia) y cada banda representó un *locus* dominante. La distancia genética se estimó al transformar la MB en matriz de similitud, mediante el coeficiente de similitud de Jaccard (Jaccard, 1908). Se hizo un análisis de componentes principales (SAS, 1996) y un análisis de conglomerados de agrupación jerárquica (AC), mediante el método de ligamiento promedio entre

Characterization of diversity

The AFLP markers used were of the chemiluminescent type (Hoisington *et al.*, 1998). Based on the polymorphism expressed, five pairs of combinations of primers *EcoRI* and *MseI* were used (Table 2), from 12 initial pairs. To define the percentage of polymorphism, the percentage of polymorphism of each primer combination was added and then divided by the total number of primer combinations. The pre-amplification product (PA) was verified in agarose gel. The PA products were diluted with 80 μL of H_2O with double distillation. 3 μL of the reaction of PA were progressively added for the selective amplification reaction (SA), 0.25 μM of the primer *MseI* of the SA, 0.1 μM of the primer *EcoRI* of the SA, marked with digoxigenine, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl_2 and 0.75 U of *Taq* polymerase. A total volume of 18 μL was obtained, with primers considering three selective basis. All of the amplifications were carried out in an ERICOMP TwinBlock thermocycler.

For the electrophoresis of DNA, 5 μL of the product of the SA were mixed with 2 μL of 5X SGB (buffer: 95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% cyanol xylene and 10 mM NaOH). The DNA was denaturalized at 95 °C for 10 min. The DNA bands were transferred from the gel to nylon membrane (0.45 micras of 30×39 cm), for 16 h with the Southern dry blot technique. The membranes were exposed 3 to 4 h to radiographic film.

The entrance groups were defined based on Pseudo F and Pseudo t^2 , with PROC CLUSTER (SAS, 1996), and within the group of characters used, recognition was made of those of higher discriminating value and with efficient identification of relationship among the populations under study. From the bands produced, a binary matrix was constructed (BM; presence, absence) and each band represented a dominant *locus*. The genetic distance was estimated upon transforming the BM into a similitude matrix, through the Jaccard similarity coefficient (Jaccard, 1908). An analysis of principal components (SAS, 1996) was made, as well as an analysis of hierarchic grouping conglomerates, type UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), and the dendrogram was obtained with the program NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 1997). The reliability and persistence of the dendrogram was

Cuadro 2. Combinaciones de iniciadores de marcadores de AFLP utilizadas en 90 poblaciones de zacate Banderita (*Bouteloua curtipendula*), recolectadas en 11 Estados de México, durante 2002 y 2003.

Table 2. Combinations of primers of AFLP markers used in 90 populations of sideoatsgrama (*Bouteloua curtipendula*), collected in 11 States of México, during 2002 and 2003.

Combinación de iniciadores	Total de bandas	Total de bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo (%)	Total de bandas monomórficas
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CTG	64	20	31.2	8
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CTA	45	11	24.4	5
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CGG	54	24	44.4	3
<i>EcoRI</i> -ACA + <i>MseI</i> -CGA	58	20	34.5	7
<i>EcoRI</i> -ACA + <i>MseI</i> -CAC	60	29	48.3	10
Total	281	104	182.8	33
Promedio	56.2	20.8	36.6	6.6

agrupamientos, tipo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) y se obtuvo el dendograma mediante el programa NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 1997). La confiabilidad y persistencia del dendograma se probó mediante Bootstrap para probabilidades porcentuales de cada nodo del árbol resultante, con 3000 permutaciones (Felsenstein, 1985; Yap y Nelson, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinco combinaciones de iniciadores amplificaron 281 bandas de marcadores de AFLP y 36.6% fueron polimórficas (Cuadro 2). Los fragmentos variaron de 45 a 64 bandas. El número de bandas polimórficas fue 11 para *EcoRI*-AGG+*MseI*-CTA y 29 para *EcoRI*-ACA+*MseI*-CAC. Los fragmentos monomórficos en las combinaciones variaron de 3 a 10 (Cuadro 2). Vergara y Bughrara (2004), al diferenciar ecotipos de *Agrostis stolonifera* var. *Palustris* (Huds.), obtuvieron fragmentos que variaron de 100 a 150 bandas, con 22 a 94 bandas polimórficas. Fu *et al.* (2004b) al evaluar *Schizachyrium scoparius* (Michx.) Nash, reportaron 854 y 653 fragmentos en tallo y semilla, pero sólo 158 bandas polimórficas, que representan 18.5 y 24.2% para tallo y semilla y 22 a 34 bandas polimórficas, valores similares a los de las poblaciones de Banderita aquí obtenidas (11 a 29). En *Festuca arundinacea* Schreb, Mian *et al.* (2002), obtuvieron 461 bandas (261 polimórficas y 200 monomórficas), en seis combinaciones de iniciadores y 33 a 61 bandas polimórficas. Lo anterior indica una amplia variabilidad para polimorfismo, según los marcadores AFLP, para los diferentes pastos. Bolaric *et al.* (2005) usaron RAPD (random amplified polymorphic DNA), para 440 individuos de 22 cultivares de *Lolium perenne* L. y obtuvieron 165 bandas polimórficas y 12 bandas en promedio por combinación de iniciador.

El polimorfismo obtenido en este estudio puede atribuirse a que Banderita es apomítico, aneuploide, de polinización cruzada y altamente autoincompatible (Berthaud, 2001). Además, el material evaluado está inmerso en el centro de origen de esta especie, incluyendo diversos niveles de ploidía y tipos reproductivos en simpatria. Estos resultados son consistentes, en relación con la variación obtenida, con respecto a: la utilización de RAPD en *Schizachyrium scoparius* (Huff *et al.*, 1998) y en *B. gracilis* H.B.K. Lag. Ex Steud (Phan *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2004a); también con respecto al uso de marcadores AFLP en *Pseudoroegneria spicata* Pursh (Larson *et al.*, 2000), *Poa* spp. (Larson *et al.*, 2001), *Bromus inermis* Leyss, *B. riparius* Rehmman (Ferdinandez y Coulman, 2002), y *Agropyron* spp. Gaertn (Mellish *et al.*, 2002), todos de polinización libre.

tested with Bootstrap for percent probabilities of each node of the resulting tree, with 3000 permutaciones (Felsenstein, 1985; Yap and Nelson, 1996).

RESULTS AND DISCUSSION

Five combinations of primers amplified 281 bands of AFLP markers, and 36.6% were polymorphic (Table 2). The fragments varied from 45 to 64 bands. The number of polymorphic bands was 11 for *EcoRI*-AGG+*MseI*-CTA and 29 for *EcoRI*-ACA+*MseI*-CAC. The monomorphic fragments in the combinations varied from 3 to 10 (Table 2). Vergara and Bughrara (2004), when differentiating ecotypes of *Agrostis stolonifera* var. *Palustris* (Huds.), obtained fragments that varied from 100 to 150 bands, with 22 to 94 polymorphic bands. Fu *et al.* (2004b), when evaluating *Schizachyrium scoparius* (Michx.) Nash, reported 854 and 653 fragments in stem and seed, but only 158 polymorphic bands, which represented 18.5 and 24.2% for stem and seed and 22 to 34 polymorphic bands, values similar to those of the sideoatsgrama populations obtained here (11 to 29). In *Festuca arundinacea* Schreb, Mian *et al.* (2002) obtained 461 bands (261 polymorphic and 200 monomorphic), in six combinations of primers and 33 to 62 polymorphic bands. The above indicates a wide variability for polymorphism, according to the AFLP markers, for the different grasses. Bolaric *et al.* (2005) used RAPD (random amplified polymorphic DNA) for 440 individuals of 22 cultivars of *Lolium perenne* L. and obtained 165 polymorphic bands and an average of 12 bands per primer combination.

The polymorphism obtained in the present study may be attributed to the fact that sideoatsgrama is apomictic, aneuploid, of cross pollination and highly autoincompatible at diploid level (Berthaud, 2001). Furthermore, the material evaluated is immersed in the center of origin of this species, including diverse levels of ploidy and reproductive types in sympatry. These results are consistent, with respect to the variation obtained, in the utilization of RAPD in *Schizachyrium scoparius* (Huff *et al.*, 1998) and in *B. gracilis* H.B.K. Lag. Ex Steud (Phan *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2004a); also with respect to the use of AFLP markers in *Pseudoroegneria spicata* Pursh (Larson *et al.*, 2000), *Poa* spp. (Larson *et al.*, 2001), *Bromus inermis* Leyss, *B. riparius* Rehmman (Ferdinandez y Coulman, 2002), and *Agropyron* spp. Gaertn (Mellish *et al.*, 2002), all of open pollination.

The genetic distances varied from 0.0 to 0.82. The populations with low genetic distances (0.00) were AP-NO-79 and AP-CA-80, from Sonora, and collected with a difference in distance of 50 km and

Las distancias genéticas variaron de 0.0 a 0.82. Las poblaciones con distancias genéticas bajas (0.00) fueron AP-NO-79 y AP-CA-80, provenientes de Sonora, y recolectadas con una diferencia en distancia de 50 km y altitud de 1550 y 1150 m (Cuadro 1). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Phan *et al.* (2003) en *B. gracilis*, donde la variación del ADN no se asoció con distancia geográfica ni altitud. Banderita mostró distancias genéticas máximas (0.82) en MA-PA-43 y SAL-MA-65, de Durango y Coahuila (Figura 1). Las poblaciones distintas son SAL-PN-1 y SAL-MA-65, distantes geográficamente y con similar altitud (1600 y 1615 m; Cuadro 1). Mian *et al.* (2002) obtuvieron coeficientes de 0.05 a 0.54 en *Festuca* spp., mientras que Vergara y Bughrara (2004) reportaron coeficientes de 0.55 a 0.98 en *Agrostis* spp. Según Wu *et al.* (2005) en sólo 14 accesiones de Bermuda (*Cynodon transvaalensis*) Burtt-Davy hay coeficientes de 0.01 a 0.51.

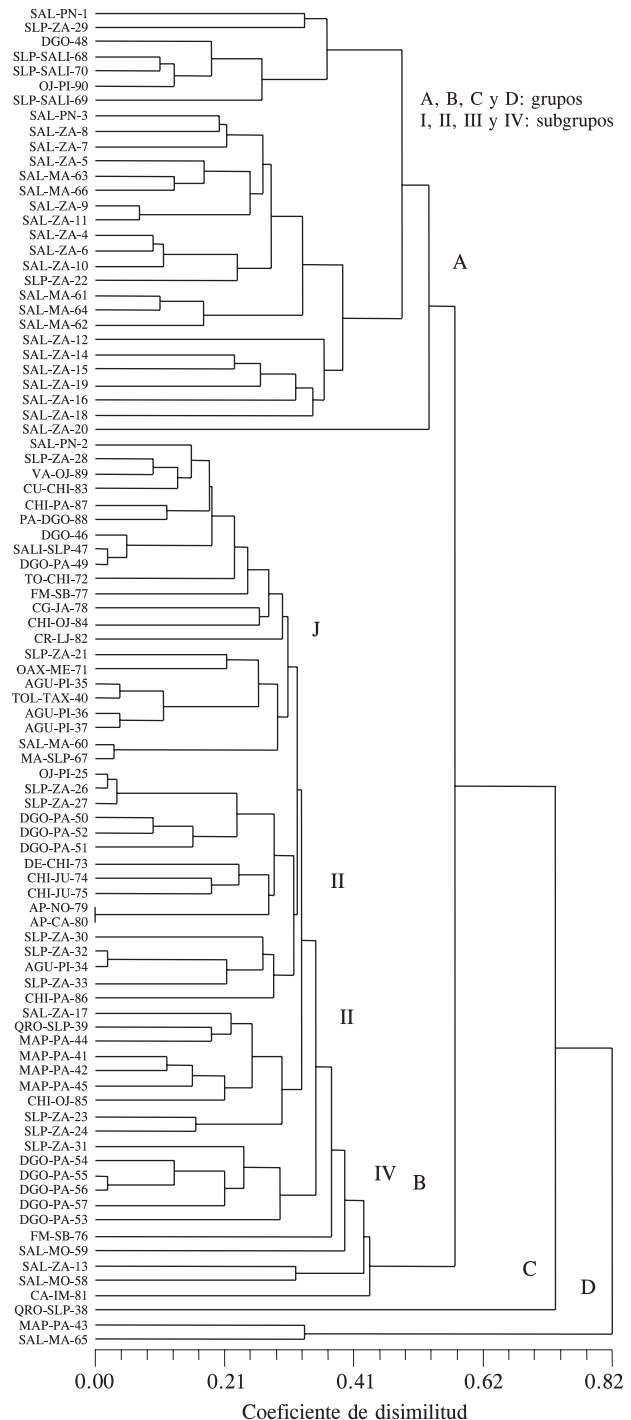
Definir disimilitud en estos ecotipos distribuidos en México genera la oportunidad de utilizar sistemáticamente la variabilidad en las poblaciones nativas de Banderita, debido a que la selección puede ser efectiva. Esta variabilidad genética resulta de la dinámica de cruzamiento de las poblaciones en las variables morfológica y genética (complejo agámico; Berthaud, 2001), además de lo inherente a movimientos o dispersión de semilla por animales, viento, hombre, etc. Ésto contribuye a mantener la diversidad en los pastizales nativos (Poschlod *et al.*, 1998; Milton y Dean, 2001), así como la adaptación evolutiva del germoplasma a condiciones climáticas adversas (Taylor y Ewing, 1996) durante largos periodos. Este proceso sienta bases sólidas para programas de mejoramiento genético, cuando son complementados con datos agronómicos (Casler *et al.*, 2000).

La dispersión de las poblaciones se definió con base en los valores característicos. El ACP definió dos grupos de diversidad genética diferente, y los grupos observados fueron consistentes con los determinados con el análisis de conglomerado (AC). Este ACP proporcionó evidencias de la integración de poblaciones de Banderita de diferentes Estados de México. La separación de las poblaciones se debió, principalmente, a diferencias de frecuencia de marcadores de AFLP, comunes entre las poblaciones evaluadas.

Figura 1. Dendrograma de poblaciones del zacate Banderita (*Bouteloua curtipendula*), basado en el coeficiente de Jaccard (J) y el método de agrupamiento de la distancia promedio (UPGMA).

Figure 1. Dendrogram of populations of sideoatsgrama (*Bouteloua curtipendula*), based on the Jaccard (J) coefficient and the method of grouping the average distance (UPGMA).

altitude of 1550 and 1150 m (Table 1). These results coincide with those obtained by Phan *et al.* (2003) in *B. gracilis*, where the variation of the DNA was not associated with geographic distance or with altitude. Sideoatsgrama showed maximum genetic distances (0.82) in MA-PA-43 and SAL-MA-65, from Durango and Coahuila (Figure 1). The distinct populations are SAL-PN-1 and SAL-MA-65, geographically distant and with similar altitude (1600 and 1615 m; Table 1).



Las variables (loci) de mayor contribución a los componentes principales (CP), explican en mayor proporción la variación observada definida con base en vectores característicos de las variables originales con los CP. Los dos primeros CP explican 21.8% de la variación total (Cuadro 3; Figura 1). Los loci x24, x41, x25, x63 y x19, contribuyeron significativamente en la determinación del primer CP; el segundo CP estuvo determinado fundamentalmente por los loci x36, x39, x29, x26 y x101. Al respecto, Ferdinandez y Coulman (2002) en *Bromus* spp. y Fu *et al.* (2004a) en *B. gracilis*, reportan 20 y 10.3% de variabilidad explicada con los primeros dos y tres componentes.

La gráfica de dispersión de variabilidad para los CP1 y CP2, ubicaron los ecotipos provenientes de San Luis Potosí (SLP; cuatro), Coahuila (Coah; tres), Durango (Dgo; uno) y Chihuahua (Chih; uno), en el cuadrante I (Figura 1), lo cual se debió a diferencias de las frecuencias de los marcadores de AFLP, que resultaron consistentes entre estas poblaciones. La dispersión natural indica que entre ellos hubo una amplia diferenciación genética. En los cuadrantes II y III (Figura 2) se integró un grupo formado por poblaciones de Chih (14), Dgo (14), SLP (12), Coah (seis), Zacatecas (Zac; tres), Aguascalientes (Ags; tres), Jalisco (Jal; tres), Sonora (Son; tres), Querétaro (Qro; dos), México (Mex; una) y Oaxaca (Oax; una). Este grupo fue el de mayor variabilidad genética, al incluir 62 poblaciones. El cuadrante IV (Figura 2) evidenció un grupo homogéneo y la mayoría de las poblaciones integradas procedían de Coah (15), Zac (tres) y Ags (una). El agrupamiento detectado por el ACP asume

Cuadro 3. Vectores característicos del análisis de componentes principales y proporción explicada para 90 poblaciones de zacate Banderita (*Bouteloua curtipendula*).
Table 3. Characteristic vectors of the analysis of principal components and proportion explained for 90 populations of sideoatsgrama (*Bouteloua curtipendula*).

Componente principal	Valor característico	Proporción de varianza	
		Explicada (%)	Acumulada (%)
1 [†]	16.180	15.56	15.56
2 [†]	6.530	6.28	21.84
3	5.056	4.86	26.70
4	4.587	4.41	31.11
5	4.557	4.38	35.49
6	4.085	3.93	39.42
7	3.899	3.75	43.17
8	3.171	3.05	46.22
9	3.024	2.91	49.13
10	2.782	2.68	51.80

[†] Los loci que contribuyeron significativamente para definir el CP1 fueron: x24, x41, x25, x63 y x19. Los loci que contribuyeron significativamente para definir el CP2 fueron x36, x39, x29, x26 y x101.

Mian *et al.* (2002) obtained coefficients of 0.05 to 0.54 in *Festuca* spp., while Vergara and Bughrara (2004) reported coefficients of 0.55 to 0.98 in *Agrostis* spp. According to Wu *et al.* (2005), in just 14 accessions of Bermuda (*Cynodon transvaalensis*) Burt-Davy there are coefficients of 0.01 to 0.51.

Defining dissimilarity in these ecotypes distributed in México represents the opportunity to make a systematic utilization of variability in the native sideoatsgrama populations, because the selection can be effective. This genetic variability results from the crossing dynamics of the populations in the morphological and genetic variables (agamic complex; Berthaud, 2001), in addition to what is inherent to seed movements or dispersal by animals, wind, man, etc. This contributes to maintain the diversity in the native grasslands (Poschlod *et al.*, 1998, Milton and Dean, 2001), as well as the evolutive adaptation of the germplasm to adverse climatic conditions (Taylor and Ewing, 1996) over long periods. This process provides solid bases for breeding programs, when they are complemented with agronomic data (Casler *et al.*, 2000).

The dispersal of the populations was defined based on the characteristic values. The ACP defined two groups of different genetic diversity, and the groups observed were consistent with those determined with the conglomerate analysis (CA). This ACP provided evidence of the integration of sideoatsgrama populations of different states of México. The separation of the populations was mainly due to the differences of frequency of AFLP markers, common among the evaluated populations.

The variables (loci) of greatest contribution to the principal components (PC), explain in a higher proportion the variation observed defined based on characteristic vectors of the original variables with the PC. The two first PC explain 21.8% of the total variation (Table 3; Figure 1). The loci x24, x41, x25, x63 and x19, contributed significantly in the determination of the first PC; the second PC was determined fundamentally by the loci x36, x39, x29, x26, and x101. To this respect, Ferdinandez and Coulman (2002) in *Bromus* spp. and Fu *et al.* (2004a) in *B. gracilis*, report 20 and 10.3% of variability explained with the first two and three components.

The graph of dispersion of variability for the PC1 and PC2, placed the ecotypes from San Luis Potosí (SLP; four), Coahuila (Coah; three), Durango (Dgo; one) and Chihuahua (Chih; one), in quadrant 1 (Figure 1), which was due to differences in the frequencies of the AFLP markers, which were consistent among these populations. The natural dispersion indicates that there was a wide genetic differentiation among

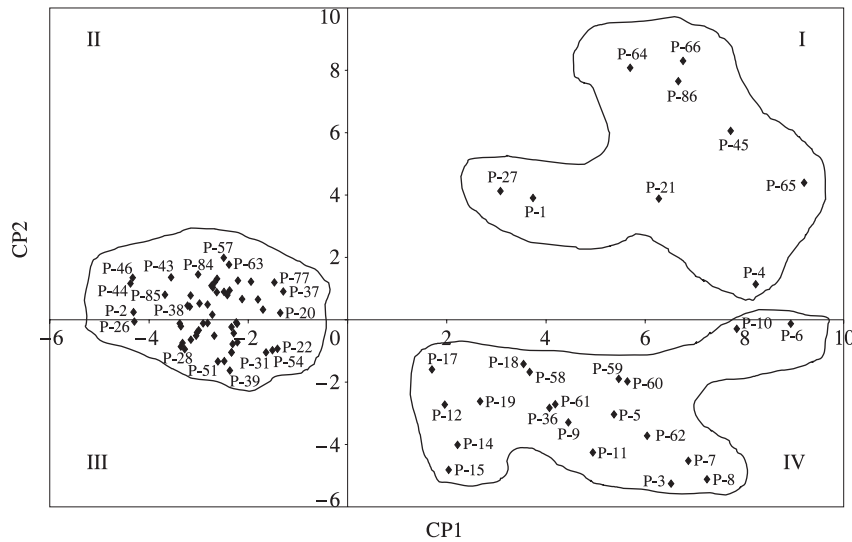


Figura 2. Distribución de 90 poblaciones de zacate Banderita en función de los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2), recolectadas en 11 Estados de México, durante 2002 y 2003.

Figure 2. Distribution of 90 populations of sideoatsgrama as a function of the first two principal components (PC1 and PC2), collected in 11 States of México, during 2002 and 2003.

que éstas son genéticamente similares, al proceder de una región definida. Los grupos resultantes poseen alta homogeneidad dentro de grupos y alta heterogeneidad entre grupos.

El dendrograma, generado a partir del UPGMA, dividió las poblaciones en cuatro grupos (A, B, C y D; Figura 2), acorde con su relación genética. El grupo A, formado por 29 poblaciones, corresponde a Coah (18; 62%), SLP (5; 17%), Zac (4; 13.8%), Dgo (1; 3.5%) y Jal (1; 3.5%). Las 29 poblaciones de este grupo comprendieron una altitud de 800 a 2300 m. Por tanto, la altitud no fue un factor importante para agruparlas en función de su similitud genética. El rango de la distancia genética en el grupo A fluctuó de 0.07 a 0.53 (Figura 2). Phan *et al.* (2003) concluyeron que las distancias genéticas no se asocian con la altitud en poblaciones de *B. gracilis*. Sin embargo, el grupo A tuvo una tendencia al agrupamiento, basado en el origen o distancia geográfica, con excepción de DGO-48 y OJ-PI-90, las cuales se encuentran muy distantes (Cuadro 1).

El grupo B se subdividió en cuatro subgrupos. El B-I fue numeroso y heterogéneo, con 22 poblaciones procedentes de Chih (7), SLP (4), Ags (3), Coah (3), Dgo (2), Oax (1), Jal (1) y Méx (1); la distancia genética fluctuó de 0.02 a 0.31 (Figura 2). Además, el conjunto de poblaciones que lo integran no mostró tendencia a agruparse por la altitud (1100 a 2500 m). El grupo B-II agrupó 16 poblaciones recolectadas en Chih (6), SLP (4), Son (2), Ags (1), Dgo (1), Zac (1) y Jal (1) y fue heterogéneo al agrupar poblaciones de siete Estados; la distancia genética fue 0.02 a 0.33 (Figura 2), y no hubo tendencia de estar agrupado por altitud (1120 a 2400 m). El grupo B-III consistió de 15 poblaciones procedentes de Dgo (9), SLP (3), Chih (1), Qro (1) y Zac (1); fue homogéneo, reunió

them. In quadrants II and III (Figure 2), a group was integrated that was formed by populations from Chih (14), Dgo (14), SLP (12), Coah (six), Zacatecas (Zac; three), Aguascalientes (Ags; three), Jalisco (Jal; three), Sonora (Son; three), Querétaro (Qro; two), México (Mex, one), and Oaxaca (Oax; one). This group, which included 62 populations, showed the highest genetic variability. Quadrant IV (Figure 2) evidenced a homogeneous group, and the majority of the integrated populations were from Coah (15), Zac (Three) and Ags (one). The grouping detected by the ACP assumes that they are genetically similar, as they come from a defined region. The resulting groups have high homogeneity within groups and high heterogeneity among groups.

The dendrogram, generated from the UPGMA, divided the populations into four groups (A, B, C and D; Figure 2), according to their genetic relationship. Group A, formed by 29 populations, corresponds to Coah (18; 62%), SLP (5; 17%), Zac (4; 13.8%), Dgo (1; 3.5%) and Jal (1; 3.5%). The 29 populations of this group were of an altitude of 800 to 2300 m. Therefore, altitude was not an important factor for grouping the populations as a function of their genetic similarity. The range of the genetic distance in group A fluctuated from 0.07 to 0.53 (Figure 2). Phan *et al.* (2003) concluded that the genetic distances are not associated with altitude in populations of *B. gracilis*. However, group A showed a grouping tendency, based on the origin or geographic distance, with the exception of DGO-48 and OJ-PI-90, which are very distant (Table 1).

Group B was subdivided into four subgroups. B-1 was numerous and heterogeneous, with 22 populations from Chih (7), SLP (4), Ags (3), Coah (3), Dgo (2), Oax (1), Jal (1) and Méx (1); the genetic distance

a la mayoría de poblaciones recolectadas en Durango, su distancia genética fue 0.02 a 0.35 (Figura 2) y no se agrupó por altitud (1250 a 2300 m). El grupo B-IV estuvo integrado por cinco poblaciones de Coah (3), Chih (1) y Son (1) su altitud fue 820 a 1500 m y la distancia genética osciló entre 0.30 y 0.56 (Figura 2). Poblaciones distantes genéticamente fueron QRO-SLP-38 (Grupo C), MAP-PA-43 y SAL-MA-65 (Grupo D), procedentes de Qro, Dgo y SLP. La alta variabilidad genética puede resultar de distintas circunstancias: historial de manejo del pastoreo en los agostaderos (Brummer y Bouton, 1991; Vaylay y van Santen, 1999), la selección natural de las poblaciones estudiadas, la cual mantiene contacto con la riqueza de niveles de ploidía y genotipos diversos (simpatria), integrando adaptación a diversas condiciones ambientales; poblaciones que no han estado expuestas al pastoreo (Mian *et al.*, 2002) o que crecen en ambientes protegidos.

CONCLUSIONES

El análisis de AFLP permite estructurar la variabilidad genética del pasto nativo Banderita, dado el alto polimorfismo detectado (36.6%). La variabilidad genética resultaría del origen evolutivo y geográfico del germoplasma, la variación fisiográfica de los sitios de recolección, así como los movimientos de semilla por diversos factores bióticos y abióticos.

La mejor combinación de iniciadores fue *EcoRI*-ACA+*MseI*-CAC dado que reportaron el mayor polimorfismo. Los materiales nativos de Banderita mantienen elevados niveles de variación genética, por lo que constituyen un recurso genético valioso que se debe estudiar, para mejorar su potencial productivo, uso y conservación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo recibido al grupo de trabajo Quebec-Mexique para la realización de este proyecto. También al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo CIMMYT, a la M.C. Martha Hernández y a Margarita Crosby por su invaluable ayuda.

LITERATURA CITADA

- Berthaud, J. 2001. Apomixis and management of diversity. In: Savidan, Y. J., Carman, and T. Dresselhaus (eds). The Flowering of Apomixis. From Mechanisms to Genetic Engineering. CIMMYT-IRD pp: 8-23.
- Bolaric, S., S. Barth, A. E. Melchinger, and K. Posselt. 2005. Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers. *Plant Breeding* 124: 161-166.
- Brummer, E. C., and J. H. Bouton. 1991. Plant traits associated with grazing-tolerant alfalfa. *Agron. J.* 83: 996-1000.

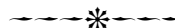
fluctuated from 0.02 to 0.31 (Figure 2). In addition, the group of populations of which it is comprised did not show a tendency to group by altitude (1100 to 2500 m). Group B-II grouped 16 populations collected in Chih (6), SLP (4), Son (2), Ags (1), Dgo (1), Zac (1) and Jal (1) and was heterogeneous grouping populations from seven states; the genetic distance was 0.02 to 0.33 (Figure 2), and there was not a tendency to group by altitude (1120 to 2400 m). Group B-III consisted of 15 populations from Dgo (9), SLP (3), Chih (1), Qro (1) and Zac (1); it was homogeneous, it included the majority of populations collected in Durango, its genetic distance was 0.02 to 0.35 (Figure 2) and was not grouped by altitude (1250 to 2300 m). Group B-IV was comprised of five populations from Coah (3), Chih (1) and Son (1), its altitude was 820 to 1500 m and the genetic distance oscillated between 0.30 and 0.56 (Figure 2). Populations that were genetically distant were QRO-SLP-38 (Group C), MAP-PA-43 and SAL-MA-65 (Group D), from Qro, Dgo and SLP. The high genetic variability could result from different circumstances: history of grazing management in the pastures (Brummer and Bouton, 1991; Vaylay and van Santen, 1999), the natural selection of the populations under study, which maintains contact with the wealth of levels of ploidy and diverse genotypes (sympatry), integrating adaptation to diverse environmental conditions; populations that have not been exposed to grazing (Mian *et al.*, 2002) or that grow in protected environments.

CONCLUSIONS

The analysis of AFLP makes it possible to structure the genetic variability of the native sideoatsgrama, given the high polymorphism detected (36.6%). The genetic variability would result from the evolutionary and geographic origin of the germplasm, the physiographic variation of the collection sites, and seed movements due to diverse biotic and abiotic factors.

The best combination of primers was *EcoRI*-ACA+*MseI*-CAC, given that they reported the highest polymorphism. The native materials of sideoatsgrama maintain high levels of genetic variation, thus they represent a valuable genetic resource that should be studied, in order to improve its productive potential, use and conservation.

—End of the English version—



- Caster, M. D., K. P. Vogel, J. A. Balako, J. D. Miller, J. L. Hansen, and J. O. Fritz. 2000. Genetic progress from 50 years of smooth brome grass breeding. *Crop Sci.* 40: 13-22.

- Columbus, J. T. 1999. Morphology and leaf blade anatomy suggest a close relationship between *Bouteloua aristidoides* and B. (*Chondrosium eriopoda* (Gramineae): (Chloridoideae). Systematic Bot. 23: 467-478.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 789-791.
- Ferdinandez, Y. S. N., and B. E. Coulman. 2002. Evaluating genetic variation and relationships among two bromegrass species and their hybrid using RAPD and AFLP markers. Euphytica 125: 281-291.
- Fu, Y. B., Y. S. N. Ferdinandez, A. T. Phan, B. E. Coulman, and K. W. Richards. 2004a. AFLP variation in four blue grama seed sources. Crop Sci. 44: 283-288.
- Fu, Y. B., Y. S. N. Ferdinandez, A. T. Phan, B. E. Coulman, and K. W. Richards. 2004b. Genetic diversity in natural populations and corresponding seed collections of little bluestem as revealed by AFLP markers. Crop Sci. 44: 2254-2260.
- Hammer, K. 2003. A paradigm shift in the discipline of plant genetic resources. Genet. Resour. Crop. Evol. 43: 337-341.
- Hanna, W. W. 1990. Mejoramiento genético de zacates tropicales. In: Memorias de la IV Conferencia Internacional de Ganadería Tropical. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Cd. Victoria, Tamps. México. pp: 9-11.
- Hernández X., E., 1959. Zacates indígenas. Agric. Tec. Méx. 1(8): 26-30.
- Hernández X., E., y A. Ramos. 1968. Mejoramiento de las plantas forrajeras en México. Memoria. Tercer Congreso Nacional de Fitogenética (I Simposio). Chapingo, México. pp: 224-254.
- Hoisington, D., M. Khairallah, and D. González de-León. 1998. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Second edition. México, D. F. CIMMYT. 72 p.
- Huff, D. R. 1997. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. Crop Sci. 37: 557-564.
- Huff, D. R., J. A. Quinn, B. Higgins, and A. J. Palazzo. 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among native little bluestem [*Schizachyrium scoparium* (Michx.) Nash] populations from sites of high and low fertility in forest and grassland biomes. Mol. Ecol. 7: 1591-1597.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florales. Bull. Soc. Vaudoise Sci. Natl. 44: 223-270.
- Jones T. A., S. R. Larson, D. C. Nilson, S. A. Young, N. J. Chatterton, and A. J. Palazzo. 2002. Registration of P-7 bluebunch wheatgrass germplasm. Crop Sci. 42: 1754-1755.
- Larson, S. R., T. A. Jones, Z. M. Hu, C. L. McCracken, and A. Palazzo. 2000. Genetic diversity of bluebunch wheatgrass cultivars and multi-origin polycross. Crop Sci. 40: 1142-1147.
- Larson, S. R., B. L. Waldron, S. B. Monsen, L. St. Jhon, A. J. Palazzo, C. L. McCracken, and R. D. Harrison. 2001. AFLP variation in agamosperous and dioecious bluegrasses of western North America. Crop Sci. 41: 1300-1305.
- Mellish, A., B. Coulman, and Y. S. N. Ferdinandez. 2002. Genetic relationship among selected crested wheatgrass cultivars and species determined on the basis of AFLP markers. Crop Sci. 42: 1662-1668.
- Mian, M. A., A. Hopkins, and J. Zwonitzer. 2002. Determination of genetic diversity in Tall Fescue with AFLP markers. Crop Sci. 42: 944-950.
- Milton, S. J., and W. R. J. Dean. 2001. Seeds dispersed in dung of insectivores in semi-arid southern Africa. J. Arid Environ. 47: 465-483.
- Phan, A. T., Y. B. Fu, and S. R. Smith, Jr. 2003. RAPD variation in selected and unselected blue grama populations. Crop Sci. 43: 1852-1857.
- Pillay, M., and G. O. Myers. 1999. Genetic diversity in cotton assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers. Crop Sci. 39: 1881-1886.
- Poschold, P., S. Kiefer, U. Trankle, S. Fischer, and S. Bonn. 1998. Plant species richness in calcareous grasslands as affected by dispersability in space and time. Appl. Veget. Sci. 1: 75-90.
- Rohlf, F. L. 1997. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, New York. NTSYS-pc version 2.1.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker, and M. de Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphism rates in ryegrass (*Lolium spp.*). Mol. Breed. 6: 125-134.
- Roundy, B. A. 1999. Lessons from historical rangeland revegetation for today's restoration. In: Holzworth, L. K. and R. W. Ray. Revegetation with Native Species: Proceedings. USDA, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Ogden, UT. pp: 33-38
- SAS. 1996. SAS Users Guide, version 6.12 ed. SAS Institute, Incorporated. Cary, NC.
- Smith, S. R., Jr., and R. D. B. Whalley. 2002. A model for expanded use of native grasses. Nat. Plants J. 3: 38-49.
- Taylor, G. B., and M. A. Ewing. 1996. Effects of extended (4-12 years) burial on seed softening in subterranean clover and annual medics. Aust. J. Exptl. Agric. 36: 145-150.
- Vaylay, R., and E. van Santen. 1999. Grazing induces a patterned selection response in tall fescue. Crop Sci. 39: 44-51.
- Vergara, G. V., and S. Bughara. 2004. Genetic differentiation of tetraploid creeping bentgrass and hexaploid redtop bentgrass genotypes by AFLP and their use in turfgrass breeding. Crop Sci. 44: 884-890.
- Wu, Y. Q., C. M. Taliaferro, G. H. Bai, and M. P. Anderson. 2005. Genetic diversity of *Cynodon transvaalensis* Burt-Davy and its relatedness to hexaploid *C. dactylon* (L.) Pers. as indicated by AFLP markers. Crop Sci. 45: 848-853.
- Yap, I. V., and R. J. Nelson. 1996. Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IIRRI discussion paper. pp: 14-22.
- Zhang, L. H., P. Ozias-Akins, G. Kochert, S. Kresovich, R. Dean, and W. Hanna. 1999. Differentiation of bermudagrass (*Cynodon spp.*) genotypes by AFLP analyses. Theor. Appl. Genet. 98: 895-902.