



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA**

**MARCADORES MOLECULARES DE SECUENCIAS SIMPLES  
REPETIDAS EN LA CARACTERIZACIÓN DE *Lolium perenne*, *Lolium  
multiflorum*, *Lolium hybridum* y *Dactylis glomerata*.**

**CINTHIA JIMENA AGUIRRE ROBERT**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2009**

La presente tesis titulada: Marcadores moleculares de secuencias simples repetidas en la caracterización de *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Lolium hybridum* y *Dactylis glomerata*, realizada por la alumna: Cinthia Jimena Aguirre Robert bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. OMAR HERNÁNDEZ MENDO

DIRECTOR



DR. BALDOMERO ALARCÓN ZUÑIGA

ASESOR



DR. SERGIO SEGUNDO GÓNZALEZ MUÑOZ

ASESOR



DR. JUAN ANDRÉS BURGUEÑO FERREIRA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2009

MARCADORES MOLECULARES DE SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS EN LA  
CARACTERIZACIÓN DE *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Lolium hybridum* y  
*Dactylis glomerata*

Cinthia Jimena Aguirre Robert, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2009

En Valles Altos Centrales de México ha aumentado el cultivo de *Lolium*, *Festuca*, *Dactylis* y *Vicia*, géneros de especies forrajeras mejor adaptadas a la zona, pero su desventaja son recursos genéticos limitados para continuar la mejora genética de las especies. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue realizar una evaluación agronómica y molecular de 8 accesiones de *Lolium*: Ansy France (AF), New Zealand (NZ), Uruguay (U), Netherland Barenza (NB), USA Manhattan II (UMII), Canada Uri (4n) (CU4n), Australia Wimmera 62 (AW62) y France Itaque (FI); y tres de *Dactylis*: Canada Hércules (CH), USA Potomac (UP) y USA Napier (UN). La estructura poblacional y similitud genética entre accesiones se determinó con 13 loci-SSR, y se estimó la asociación entre loci y caracteres morfológicos. Se encontró que Ansy France sobresalió para altura, peso seco de planta, peso seco de hoja, y tallo por planta; CU4n para porcentaje de hoja y tallo; UP para porcentaje de material muerto, y peso seco de material muerto por planta; y UMII para número de tallos. De los 13 loci-SSR se identificaron 59 alelos (4.5 alelos por locus). Con base en las distancias genéticas de Nei's, el análisis de agrupamiento UPGMA mostró la integración de tres grupos: por especie (*D. glomerata*), por nivel de ploidía (*L. hybridum* y *L. perenne tetraploide*) y por género (*Lolium*), lo cual indica que los SSRs discriminaron a los genotipos por especie, nivel de ploidía y género. La relación entre las distancias genéticas de los 13-loci SSR y los componentes morfológicos, estimada a partir de biplots de mínimos cuadrados parciales (MCP), indicó que en promedio los SSR-loci identificaron hasta un 14.3% de la variación fenotípica de los caracteres morfológica entre accesiones ( $r^2 < 0.143$ ). Se concluye que descriptores morfológicos y distancias genéticas a partir de loci-SSR se pueden usar en la discriminación de gramíneas forrajeras, seleccionando los genotipos con las mejores características para establecer un programa de mejoramiento genético basado en caracteres fenotípicos y genéticos.

**Palabras clave:** accesiones, loci, caracteres morfológicos, SSR.

SIMPLE SEQUENCE REPEATS MARKERS ON THE CHARACTERIZATION OF *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Lolium hybridum* and *Dactylis glomerata*

Cinthia Jimena Aguirre Robert, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2009

In Central Highland Valleys of México there has been an increase in *Lolium*, *Festuca*, *Dactylis* and *Vicia* cropping, which are the grass genera better adapted to the region, but their disadvantage is their limited genetic resources to continue genetic improvement of the species. Therefore, the objective of this study was to carry out an agronomic and molecular evaluation of eight *Lolium* accesions : Ansy France (AF), New Zealand (NZ), Uruguay (U), Netherland Barenza (NB), USA Manhattan II (UMII), Canada Uri (4n) (CU4n), Australia Wimmera 62 (AW62) and France Itaque (FI); and three *Dactylis*: Canada Hércules (CH), USA Potomac (UP) and USA Napier (UN). Population structure and genetic similarity among accesions were determined by 13 SSR-loci, and the association between loci and morphological traits was estimated. It was found that Ansy France (AF) surpassed for plant height, dry weight, leaf dry weight, and stem weight per plant; CU4n for percentage of leaf and stem; UP for percentage of dead material and dry weight of dead material per plant; and UMII for number of stems. Of the 13 SSR-loci, 59 alleles were identified (4.5 alleles per locus). Based on Nei's genetic distances, the group analysis UPGMA showed an integration of three groups: per species (*D. glomerata*), per ploidy level (*L. hybridum* and *L. perenne*) and per genus (*Lolium*), which indicates that SSRs discriminate the genotypes per species, ploidy level and genus. The relationship between genetic distances of the 13 SSR-loci and the morphological characters, estimated by biplots of partial mean squares (PMS), indicated that SSR-loci expressed up to 14.3% of phenotypic variation of morphological traits among accesions ( $r^2 < 0.143$ ). It may be concluded that morphological traits and genetic distances from SSR-loci may be used for discriminating forage grasses, selecting genotypes with the best characteristics in order to establish a breeding program, based on genetic and phenotypic characters.

**Key words:** accesions, loci, morphological traits, SSR.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por la beca otorgada.

Al Colegio de Postgraduados por brindarme la oportunidad de realizar la Maestría.

Al Grupo Produce Estado de México S.A. de C.V. Proyecto folio 13-2006-0963. "Producción de forraje verde para ganado bovino en invierno"

Al Programa universitario de investigación en Biotecnología Agrícola, proyecto folio 09220268. Determinación de genes asociados a polímeros fenólicos de maíz (*Zea Mays L.*) para el mejoramiento genético de gramíneas forrajeras.

Al Dr. Omar Hernández Mendo por sus valiosas aportaciones en la realización de la tesis, por su tiempo, comprensión y paciencia.

Al Dr. Baldomero Alarcón Zúñiga por dirigir el trabajo de investigación y por sus valiosas e importantes contribuciones en el mismo.

Al Dr. Sergio S. González Muñoz por el apoyo brindado en la elaboración y mejora de la tesis, por sus consejos, paciencia y comprensión.

Al Dr. Juan A. Burgueño Ferreira por brindarme su tiempo y por sus atinadas sugerencias en el escrito.

A la Dra. Ma. Rosario Venegas Ordoñez, gracias por el apoyo, enseñanzas y experiencias transmitidas durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Carlos Antonio Apodaca Sarabia por el apoyo incondicional y desinteresado que siempre me brindó para despejar mis dudas.

A todos los profesores que han contribuido en mi formación no sólo profesional, sino humana.

A los compañeros del Laboratorio de Genética Molecular y Microbiología de la UACH, por sus atenciones, apoyo y compañía.

Al personal administrativo del Colegio de Postgraduados, en especial a Celsa, Lupita, Anita, Lucy, Griselda y Jacinto, por el apoyo en la realización de los trámites, por tener siempre una sonrisa y una palabra de aliento.

Y a todas y cada una de las personas que por falta de espacio, no encuentran aquí sus nombres pero que fueron parte importante de este logro.

## DEDICATORIA

**A Dios** porque siempre ha estado a mi lado paciente y compasivo, observando y guiando cada uno de mis pasos. Creo en Dios y en la Ciencia y estoy convencida que juntos hacen un gran equipo.

**A mi hijo Leonardo** por ser un guerrero, por estar conmigo a pesar de mis ausencias. Te amo, eres lo mejor de mi vida, nunca te rindas, mantente siempre fuerte porque eres un ser humano, inteligente, maravilloso y muy valiente.

**A mis padres, Sr. Guillermo y Sra. Petronila** porque son mi gran ejemplo de vida, no tengo palabras para agradecer todo el apoyo y amor que siempre me han brindado; gracias por estar a mi lado. Los amo, respeto y admiro.

**A mis hermanos: Yari, Dayi, Kati, Cori y Lan**, porque no han sabido hacer otra cosa más que apoyarme, gracias por sus palabras de aliento cuando el cielo se tornaba gris, por creer en mí. Sé que no soy muy expresiva pero quiero que sepan que los amo, que sin ustedes no lo hubiera logrado; me siento muy orgullosa de ustedes. **Beto**, espero que la vida nos dé una oportunidad para conciliar nuestras diferencias; a pesar de todo te quiero hermano.

**A mis sobrinos: Chucho, Vicko, Arturito, Astricha, Ale, Vicka, Fati, Audri y Yaretzi** (patito-patito-patito) porque con su inocencia me estimulan a ser mejor cada día.

**Para ti**, que eres parte importante de mi vida porque siempre me has apoyado, me has dejado ser libre, sin olvidar mis valores e ideales, te agradezco sinceramente la paciencia, comprensión y el cariño que me has manifestado. Te admiro por la entrega y amor que tienes por tu trabajo. Ojalá la vida nos diera la oportunidad que hemos buscado. Te quiero **Arturo**, gracias por todo. Somos uno, jamás lo olvides.

A mis compañeros y amigos del Colegio, ya que compartimos un objetivo en común: la superación. Gracias **Juan Manuel, Lorena, Dulce, Kike y Paulino**.

A mis amigos de vida: **Octavio, Rosa, Yanet** (la negra), **Ocaña** (el gordo), **Gil, Marisol, Lili, Lulú, Linda, Maciel, Ramón, Santillan**, porque nuevamente compartieron conmigo penas y alegrías y me hicieron más grata la espera en este proceso.

**A la familia González Mendoza: Sr. Sergio González Muñoz y Sra. Alba Mendoza Ahumada**, por permitirnos entrar en su vida, en su hogar. Les agradezco sinceramente las muestras de cariño que han tenido para Leo y para mí. Gracias por su invaluable amistad; quiero que sepan que aprendimos mucho de ustedes; son un gran ejemplo de amor y lucha. Son seres humanos extraordinarios. Jamás los olvidaremos, siempre están en nuestra mente y corazón. Dios los bendiga; los queremos mucho.

**A la familia Santiago Fabián** por hacernos sentir parte de su familia, gracias por solidarizarse conmigo y no permitir que el sueño me venciera en esos momentos de trabajo intenso. Gracias **Tere y Raúl**.

**A la familia Domínguez Salcedo** (Don Pepe, Doña Carmen, Carmen y Pepe Luis) por el apoyo, consejos, amistad y por el cariño a Leo.

**A todos ustedes**, gracias porque de no haberlos tenido a mi lado esto no hubiera sido posible.

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>..1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>3</b>
<b>4. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>.3</b>
4.1 Descripción de géneros	.4
4.1.1 El género <i>Lolium</i>	..4
4.1.2 El género <i>Dactylis</i>	5
4.2 Mejoramiento genético en gramíneas forrajeras	...7
4.3 Marcadores moleculares	9
4.3.1 Marcadores moleculares bioquímicos	10
4.3.2 Marcadores moleculares de ADN	...10
4.3.2.1 Técnicas basadas en la hibridación de ADN	.11
4.3.2.2 Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	.11
4.4 Características de los marcadores moleculares de secuencias simples repetidas (SSRs) o microsatélites	...14
4.5 Aplicación de los marcadores moleculares en gramíneas	14
4.5.1 Desarrollo y construcción de mapas genéticos	15
4.6. Detección de polimorfismo y detección de la diversidad genética	..16

**Estudio 1.** Evaluación de componentes morfológicos de *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Lolium hybridum* y *Dactylis glomerata*.

1. Introducción	.17
2. Materiales y métodos	.19
2.1 Material genético experimental	..19
2.2 Variables de respuesta	21
2.2.1 Componentes de hoja, tallo y material muerto	.21
2.2.2 Altura y número de tallos	.22
2.3. Análisis estadístico	..22
3. Resultados y discusión	..23
3.1 Porcentaje de hoja (PH) y tallo (PT)	..24
3.2 Porcentaje de material muerto (PMM)	..27
3.3. Relación hoja:tallo (RHT)	...28
3.4 Peso seco total (PST), peso seco de tallo (PST), peso seco de hoja por planta (PSHP) y tallo(PSTP)	.30
3.5. Peso seco de material muerto por planta (PSMMP)	.33
3.6 Altura de la planta (Alt) y número de tallos por planta (NTa)	34
3.7 Interpretación del análisis de varianza	..36
4. Conclusiones	...37

**Estudio 2.** Caracterización molecular de *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Lolium hybridum* y *Dactylis glomerata*.

1. Introducción	.39
2. Materiales y métodos	.40
2.1 Material experimental	...40
2.2 Extracción de ADN, selección de iniciadores y condiciones de PCR	..42
2.3 Organización de datos y análisis estadísticos	.44
3. Resultados y discusión	..45
4. Conclusiones	...51

**Estudio 3.** Relación entre marcadores moleculares y caracteres fenotípicos.

1. Introducción	.52
2. Materiales y métodos	.54
2.1 Caracterización de componentes morfológicos	..54
2.2 Caracterización molecular de los genotipos	.55
2.3 Análisis estadístico	...55
3. Resultados y discusión	..56
4. Conclusiones	...62
<b>5. LITERATURA CITADA</b>	<b>.63</b>

**ANEXOS**

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Lista de 42 cultivares, origen, pedigree, número de réplicas y año de liberación incluidos en la prueba de madurez temprana, media y tardía de pasto ovilla	..6
<b>Cuadro 2.</b> Comparación de los marcadores moleculares de ADN más comúnmente utilizados	...13
<b>Cuadro 3.</b> Descripción de las accesiones incluidas en el experimento. El número de accesión correspondiente al registro asignado por el banco de germoplasma del GRIN-USDA-ARS, Washington, EE.UU.	...20
<b>Cuadro 4.</b> Fecha de corte y días transcurridos entre corte	.21
<b>Cuadro 5.</b> Análisis de varianza	.37
<b>Cuadro 6.</b> Descripción de accesiones empleados de <i>L. perenne</i> , <i>L. multiflorum</i> , <i>L. hybridum</i> y <i>D. glomerata</i>	41
<b>Cuadro 7.</b> Características de los iniciadores seleccionados para la caracterización del material genético experimental	.43
<b>Cuadro 8.</b> Características de los iniciadores evaluados.....	46
<b>Cuadro 9.</b> Matriz de similitud y disimilitud genética de las accesiones experimentales.	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Porcentaje de hoja (PH)	...26
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de tallo (PT)	27
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de material muerto (PMM)	...28
<b>Figura 4.</b> Relación hoja:tallo (RHT)	.30
<b>Figura 5.</b> Peso seco de la planta (PSP)	..31
<b>Figura 6.</b> Peso seco de tallo (PST)	..32
<b>Figura 7.</b> Peso seco de hoja por planta (PSHP)	32
<b>Figura 8.</b> Peso seco de tallo por planta (PSTP)	33
<b>Figura 9.</b> Peso seco de material muerto por planta (PSMMP)	34
<b>Figura 10.</b> Altura de las plantas (Alt)	...35
<b>Figura 11</b> Número de tallos (NTa)	...36
<b>Figura 12.</b> Dendograma de 11 genotipos correspondientes a <i>D. glomerata</i> , <i>L. hybridum</i> <i>L. perenne</i> , <i>L. multiflorum</i>	..49
<b>Figura 13.</b> Biplot de MCP enriquecido con 59 alelos y 11 variables fenotípicas en la estación de otoño	57
<b>Figura 14.</b> Biplot de MCP es enriquecido con 59 a lelos y 11 variables fenotípicas en la estación de invierno	....58
<b>Figura 15.</b> Biplot de MCP es enriquecido con 59 alelos y 11 variables fenotípicas en la estación de primavera	59
<b>Figura 16.</b> Biplot de MCP es enriquecido con 59 alelos y 11 variables fenotípicas en la estación de otoño	60

# MARCADORES MOLECULARES DE SECUENCIAS SIMPLES REPETIDAS EN LA CARACTERIZACIÓN DE *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Lolium hybridum* y *Dactylis glomerata*

## 1. INTRODUCCION GENERAL

La implementación de nuevas técnicas de la biología molecular originó diversos métodos de identificación y caracterización de poblaciones e individuos genéticamente distintos directamente en el ADN, los marcadores moleculares, que son muy útiles porque su uso puede mejorar y acelerar los programas de selección y mejoramiento genético (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Los marcadores moleculares son biomoléculas de secuencia de bases conocidas; se pueden relacionar con un rasgo genético; corresponden a un carácter molecular proveniente de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN, que puede ser detectado y su herencia monitoreada; ayudan a eliminar los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo; contribuyen a la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y repetitiva; y facilitan la valoración rápida y eficiente de la diversidad genética (Cornide, 2002).

Los esquemas de selección y mejoramiento genético en gramíneas forrajeras tienen como fundamento principal el análisis de caracteres fenotípicos, es decir, el mejoramiento se basa en la heredabilidad y requiere un tiempo considerable para completar un ciclo de mejora (Forster *et al.*, 2001). En gramíneas forrajeras se utilizan los marcadores moleculares para estudiar su estructura poblacional, de diferenciación entre especies y genotipos, para la detección de la variación genética intra e interpoblacional, para el establecimiento de relaciones filogenéticas y para la construcción de mapas genéticos (Wang *et al.*, 2001). Dichos estudios se han realizado en especies de los géneros *Lolium*, *Festuca* y *Dactylis*, para detectar distancia y variación genética entre especies y variedades (Wang *et al.*, 2005). El interés por estudiar estos géneros radica en su docilidad para manejarlos, son los más comunes en zonas templadas, su establecimiento es fácil y su valor nutritivo es alto (Jung, 1996).

Los marcadores moleculares de Secuencias Simples Repetidas (SSR) o microsatélites se utilizan ampliamente en la selección de plantas debido a que son altamente repetibles, estables y pueden detectar niveles altos de polimorfismo en los individuos de una población (Goldstein y Schloterer, 1999). En las gramíneas forrajeras los SSR se usan principalmente en el estudio de huellas genómicas de variedades, evaluación de la diversidad genética, mapeo molecular y selección asistida con marcadores (Squirrell *et al.*, 2003). Sin embargo, su uso aún no es generalizado, y por ende, la investigación al respecto es poca. Por tanto, el presente estudio enfatiza la evaluación y caracterización molecular de accesiones de *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Lolium hybridum* y *Dactylis glomerata*, con el objetivo de establecer la relación que existe entre los marcadores moleculares con caracteres fenotípicos de los componentes morfológicos evaluados en campo, para el establecimiento de un esquema de selección y mejoramiento genético.

## 2. OBJETIVOS

### ❖ Objetivo General

- Evaluar en campo los componentes morfológicos de los genotipos de *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. hybridum* y *D. glomerata*, realizar una caracterización molecular de dichas poblaciones y, con base en ello, determinar la relación que existe entre los marcadores moleculares con los caracteres fenotípicos (componentes morfológicos) estimados.

### ❖ Objetivos Particulares

- Evaluar los componentes morfológicos de 11 genotipos correspondientes a *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. hybridum* y *D. glomerata*.
- Emplear marcadores moleculares SSR para caracterizar poblaciones de *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. hybridum* y *D. glomerata*.
- Establecer la relación entre los marcadores moleculares con los caracteres fenotípicos (componentes morfológicos).

### **3. HIPÓTESIS**

- ❖ La variación en los caracteres fenotípicos está determinada por la constitución genómica de cada genotipo y especie de gramíneas, por lo que el entendimiento y descripción de dicha variación, permitirá establecer estrategias de caracterización, selección y mejoramiento de genotipos con el mejor comportamiento en componentes morfológicos y alta adaptación con el apoyo de marcadores moleculares SSRs.

### **4. REVISIÓN DE LITERATURA**

La zona templada del país, que incluye los Valles Altos Centrales de México, se caracteriza por ser una región con alto potencial en la producción de forrajes, para los sistemas lecheros estabulados y de traspatio, además de la engorda de borregos. La producción de forraje se basa en especies anuales de maíz y sorgo, así como bianuales y perennes de *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* y *Dactylis glomerata*, introducidas desde otros países. De aquí el interés en primer lugar en la identificación de los recursos genéticos o germoplasma de alta adaptación a las condiciones de Valles Altos Centrales, potencial productivo, persistencia del rendimiento, calidad nutritiva, y tolerancia a plagas, enfermedades y estrés ambiental de sequía y bajas temperaturas. Por lo anterior es imprescindible identificar del germoplasma forrajero de dichas especies, así como la magnitud de la variación genética intrapoblacional, para a partir de esto establecer esquemas de selección y mejora de variedades de alto rendimiento para la zona, manteniendo el valor de la varianza genética del genotipo. Dentro de las metodologías propuestas para la caracterización de germoplasma candidato, han sido los ensayos de rendimiento a través de diversos años y ambientes, las pruebas de progenie de genotipos sobresalientes y últimamente el uso de marcadores moleculares neutrales para establecer esquemas de hibridación entre genotipos sobresalientes, seleccionados en los ensayos de rendimiento.

#### 4.1. Descripción de géneros

##### 4.1.1. El género *Lolium*

Los pastos del género *Lolium*, denominados ballicos o ryegrass, son nativos de Europa, forman matas amacolladas de aproximadamente 60 cm de altura, sin rizomas (Hannaway, 1999a). Todas las especies del género *Lolium* tienen 7 pares de cromosomas que han originado variaciones híbridas interespecificas, y existen variedades diploides y tetraploides con un número básico de cromosomas  $2n=14$  y  $4n=28$  (Delgado, 1983). Se adaptan mejor a regiones con climas fríos y húmedos, con altitudes de 1500-3000 msnm y temperaturas de 20-25 °C. En las zonas templadas de México, *L. perenne* es el más común, con mejor crecimiento en primavera y verano, sensible a sequias y temperaturas extremas (Nuñez *et al*, 1991); su producción disminuye si la temperatura al final de primavera y durante el verano rebasa los 32 °C y detienen su crecimiento si la temperatura es menor a 6 °C. Su crecimiento es ideal en suelos húmedos, con buen drenaje y fértiles, aunque pueden adaptarse a suelos con un buen o mal drenaje, suelos ácidos y alcalinos con pH de 5.1 a 8.4, pero se desarrollan mejor en suelos con un pH de 5.5 a 7.5. Las variedades responden de inmediato a fertilizaciones nitrogenadas, en otoño principalmente, favoreciendo el crecimiento invernal. La enfermedad más común es la roya de la corona (*Puccinia coronata*), y existe germoplasma con una variación genética importante de tolerancia-susceptibilidad a dicha enfermedad (Hannaway *et al*, 1999a).

*Lolium perenne* y *L. multiflorum* se utilizan principalmente en la alimentación de rumiantes productores de leche y carne, y es un excelente forraje para conservarlo en forma de ensilado (Heath *et al.*, 1985). Los genotipos de ambas especies son consideradas de alto valor nutritivo, tienen un contenido de proteína cruda similar a otras especies de gramíneas de clima templado (14-18 %), presentan un nivel alto de carbohidratos no estructurales, principalmente en primavera y verano, y la digestibilidad va de 65-70 %, superior a la de otras especies (Minson, 1990).

#### 4.1.2 El género *Dactylis*

Los probables centros de origen del pasto ovillo u orchardgrass son las regiones de clima templado de Europa, Asia y norte de África. Es un pasto erecto amacollado, con una altura de 50-140 cm, sin rizomas. El género *Dactylis* presenta 7 pares de cromosomas (Poehlman y Sleper, 1995). En México, el pasto ovillo se adapta a regiones templadas con temperatura promedio de 10-19 °C (Hannaway *et al*, 1999c); suelos con drenaje de moderado a bueno, y es tolerante a suelos con pH de 5.6 a 8.4, aunque el pH óptimo para un buen crecimiento va de 6.0 a 7.5. No tolera suelos húmedos ni sobrevive a inundaciones prolongadas (Henning y Risner, 1993).

Comparado con los ballicos, el pasto ovillo es más resistente al calor y a la sequia, es tolerante a la sombra debido a su extenso sistema radicular; durante la primavera alcanza su mayor rendimiento, y su producción es menor durante el invierno, lo cual aumenta su resistencia al frío (Hannaway *et al*, 1999c). La digestibilidad es menor hasta en 10 % respecto al ballico y, además pierde rápidamente su valor nutritivo al avanzar la madurez (Heath *et al*, 1985). Esta especie se utiliza principalmente para la producción de carne y en menor grado para la producción de heno en los EE.UU. (Henning y Risner, 1993).

Las enfermedades que más atacan al *D. glomerata* son la roya amarilla, constituida de numerosas pústulas pequeñas que afectan a las hojas y su incidencia es de los últimos días de mayo hasta octubre; la roya negra se presenta con pústulas grandes que aparecen en julio; y la *Scolecotrichosis* se caracteriza por presentar grandes manchas de color marrón claro. Estas tres enfermedades pueden coincidir en tiempo provocando la pérdida de la pradera, ya que atacan los rebrotes. Los métodos de prevención y control consisten en aplicar cortes frecuentes de acuerdo a susceptibilidad de la variedad, y además utilizar variedades resistentes (Hannaway *et al*, 1999c).

En Norte América a partir de la década de 1950 se establecieron programas de mejoramiento genético en *Dactylis*, después de un proceso de selección, con base en germoplasmas más sobresalientes, se logró crear variedades utilizadas ampliamente en los Estados Unidos y que pueden ser usadas en México (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Lista de 42 cultivares, origen, pedigree, número de réplicas y año de liberación del cultivar, incluidos en la prueba de madurez temprana, media y tardía de pasto ovillo.**

Madurez/cultivar	Origen	Pedigree	Réplicas	Año
<b>Madurez temprana</b>				
Amba	Denmark	Muchas fuentes	2	NE
Ambassador	Oregon	Desconocido	7	1989
Benchmark	Indiana	FFR	6	1989
Chinook	Alberta	Alberta naturalizado	9	1977
Hallmark	Indiana	Boone, Potomac, otras	7	1969
Hera	Denmark	Desconocido	2	NE
Potomac	Maryland	Pastizales viejos	9	1955
Reda	Switzerland	Desconocido	2	NE
Sterling	Iowa	Colecciones de Iowa y Minnesota	2	1966
<b>Madurez Media</b>				
Albert	Wisconsin	Cultivares numerosos	4	1997
Boone	Kentucky	Kentucky naturalizado	1	1966
Comet	Minnesota	Aries, Boone, Sterling, otros	6	1977
Crown	Iowa	Potomac	6	1975
Elsie	Oregon	Ruso, Europeo y germoplasma terminado	2	1991
Frode	Sweden	Pastizales viejos o henificados	4	NE
Juno	Ontario	Pastizales viejos	6	1972
Justus	Missouri	Pastizales viejos	4	1988
Kay	Ontario	Accesiones rusas	6	1970
Napier	Iowa	Pastizales viejos o henificados	4	1963
Niba	Netherlands	Desconocido	2	NE
Paiute	UTAH	Accesiones turqueanas	3	1983
Pizza	Netherlands	Desconocido	4	NE
Profil	Switzerland	Desconocido	4	NE
Rapido	Ontario	Desconocido	4	1992
Takena	Oregon	Fuentes extensamente diversas	4	1996
Warrior	Oregon	Fuentes extensamente diversas	6	1993

## Continuación Cuadro 1...

Madurez tardía				
Latematurity Able	Indiana	Masshardy, otros	4	1979
ACNordic	Ontario	Rideau	5	1991
AC Splendor	Ontario	Rideau	4	1992
Arctic	British Colun	Accesiones rusas	5	1989
Dawn	Iowa	Jackson, Ruso Pis	4	1987
Haymate	Indiana	Program de mejoramiento FFR	4	1993
Jesper	Denmark	Desconocido	2	NE
Latar	Whashington	Ruso PI 111536	5	1957
Lupre	Netherland	Desconocido	2	NE
OKAY	Ontario	Kay Sumas	5	1991
Orion	Minnesota	Nordstern, Masshardy, Ruso PI 262459	4	1981
Penlate	Pennsilvania	Swedish y Pls final	2	1957
Prato	Switzerland	Desconocido	4	NE
Rancho	Indiana	Masshardy, Ruso PI 234688, otros	5	1985
Rideau	Ontario	Stonian y germoplasma Swedish	1	1963
Shawnee	Oregon	Pennlate, Pennmead	2	1991

Tomado de Casler *et al.*, 2000. Donde: NE = no especificado y FFR = Farmer's Forage Research Coop.

### 4.2 Mejoramiento genético en gramíneas forrajeras

Las gramíneas forrajeras utilizadas intensivamente y consideradas como las más importantes y representativas de las zonas templadas, son *L. perenne*, *L. multiflorum*, *D. glomerata* *Festuca arundinacea* y *Festuca pratensis*. Estas especies se usan intensivamente por ser la mayor fuente de nutrientes para rumiantes y animales silvestres, y por contribuir al bienestar humano: protección y conservación del suelo y fuentes de agua; mejoramiento en la estructura y fertilidad del suelo; abastecimiento del hábitat para fauna silvestre; entre otros. Los *Lolium* y *Dactylis* son considerados gramíneas ideales en zonas templadas para la producción de forraje, debido a su rápido establecimiento, resistencia al pastoreo, alto valor nutritivo y por ser apetecibles (Humphreys *et al.*, 2003), y además por su tolerancia a la sequía y altas temperaturas (*Dactylis*).

En estudios morfológicos para determinar la ploidía en el género *Lolium*, se encontró que los genotipos tetraploides son superiores genéticamente pues tienen más tallos (Olson *et al.*, 2006), son más resistentes a plagas y enfermedades, son más jugosos y

el contenido de proteína es mayor (López y Peñalosa, 1990). Además estos genotipos muestran mayor tamaño en semillas y hojas con respecto a los diploides (Costa *et al.*, 2004). Dado que los genotipos diploides tienen mayor densidad de tallos, se consideran más persistentes que los tetraploides que presentan mayor producción de tallos pero pueden mostrar menor persistencia al invierno (Lacefield *et al.*, 2003). Comparado con las diploides, las variedades tetraploides tienen mayor porcentaje de azúcares, por lo cual son altamente digestibles y su sabor es agradable al ganado, que lo consume más (Marvin, 1992). Cuando los cultivares diploides y tetraploides se desarrollan en las mismas condiciones, el valor nutritivo de tetraploides aumenta, mientras que los diploides tienen mejor adaptación a ambientes con restricciones de suelo y clima y prácticas de manejo escasas, ya que presentan un macollaje mayor (García 2004).

Las estrategias para obtener incrementos productivos en plantas se basan en técnicas tradicionales de mejoramiento que dependen de la variabilidad natural en ecotipos adaptados, poblaciones naturalizadas y cultivares viejos. Las técnicas usadas son recolección de plantas, evaluación de los recursos genéticos, selección basada en el fenotipo hibridación, regeneración por semilla o propagación vegetativa (Inoue *et al.*, 2007), poliploidía y mutagénesis (Andrés 2005). Los logros obtenidos en el mejoramiento de gramíneas forrajeras está en función de la especie y de su uso, pero la finalidad es obtener un cultivar superior con rasgos específicos o generar un nuevo cultivar con rasgos nuevos. Los objetivos en mejoramiento consideran rendimiento en forrajes y semillas, resistencia al invierno, resistencia a malezas, resistencia a parásitos e insectos, tolerancia al calor y a la sequía y tolerancia a suelos con poca humedad (Varshney, 2007).

Los ballicos presentan una relación cercana con especies de *Festuca*, las cuales muestran una mejor adaptación a estrés provocado por factores abióticos y bióticos. La relación cercana entre el género *Lolium* y especies de *Festuca*, permite cruzarlos por hibridación y transferir genes a través de la recombinación de los cromosomas homólogos (hibridación intergénica) y así obtener un híbrido con mayor tolerancia al

estrés (hídrico, altas temperaturas, etc.), tal es el caso de *Festulolium* que se utiliza en varios programas de mejoramiento en el mundo (Yamada *et al.*, 2005).

#### 4.3 Marcadores moleculares

El desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas ha permitido complementar y brindar alternativas a los programas de mejoramiento en plantas, integrando técnicas moleculares que permiten el tratamiento de caracteres difíciles de manejar y el desarrollo de plantas forrajeras “diseñadas” que contribuyan a aumentar y mejorar la eficiencia productiva de especies pecuarias. Entre las herramientas que han contribuido a estos desarrollos se encuentra el cultivo de tejidos, la transformación de plantas, la hibridación somática, la producción de plantas transgénicas y los marcadores moleculares (Cordine, 2002). Los marcadores moleculares corresponden a cualquier loci cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas), que además puede detectarse fácilmente. Estos marcadores pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo, y se pueden aplicar usando todo o sólo una parte del individuo (Nuez y Carrillo, 2000).

Según Cordine (2002), los marcadores moleculares son secuencias conocidas de ADN o de proteína que se pueden relacionar con un rasgo genético, pueden ser detectados fácilmente y su herencia puede ser monitoreada, lo cual se relaciona con el polimorfismo de bandas obtenido mediante las técnicas moleculares isoenzimáticas o las basadas en el análisis del ADN. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (loci conocidos o fragmentos de secuencia conocidas y de función desconocida). Un marcador molecular monomórfico no presenta variación en todos los organismos estudiados, en cambio un marcador polimórfico presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, mientras que si el grado de variación es alto se denominan hipervariables (Hammer, 2003).

El uso de marcadores moleculares es importante ya que permite estimar la magnitud de la variación genética de poblaciones y establecer esquemas de selección; algunas veces permite seleccionar los individuos aun antes de que expresen el rasgo de interés (Arus y Moreno, 1993). Estos marcadores ayudan a entender y capturar la heterosis,

identificar QTL (Quantitative Trait Loci, por sus siglas en inglés), desarrollar mapas genéticos detallados, introducir variación genética de fuentes convencionales y transgénicas, realizar selección y determinar los factores involucrados en las interacciones genotipo ambiente (Woodfield y Brummer, 2000). Los tipos de marcadores moleculares son los marcadores bioquímicos y los marcadores de ADN (Nuez y Carrillo, 2000), los cuales se describen a continuación.

#### 4.3.1 Marcadores moleculares bioquímicos

Los marcadores bioquímicos incluyen proteínas e isoenzimas o aloenzimas, y constituyen la primera generación de marcadores moleculares. Tienen la ventaja de que la técnica para su identificación es de bajo costo, accesible y no destructiva, debido a que utiliza pequeñas cantidades de material; además el control genético de la mayoría de las isoenzimas es bastante conocido por lo que es posible realizar inferencias genéticas a partir de los patrones de bandas observados en los geles (Valadez y Gunter, 2000).

Las isoenzimas han tenido un uso limitado debido a que no permiten cubrir todo el genoma, pues sólo representan una estrecha fracción del contenido genético, únicamente detectan la variación de los genes que codifican para la expresión de una característica del individuo, presentan polimorfismo ontogenético, es decir, los resultados obtenidos serán diferentes al trabajar con material vegetal proveniente de un individuo joven y de uno adulto; además, las isoenzimas son específicas para determinados sustratos. Debido a las limitantes de las isoenzimas, las proteínas son utilizadas como marcador bioquímico (Valadez y Gunter, 2000).

#### 4.3.2 Marcadores moleculares de ADN

Los marcadores de ADN pueden generar una gran cantidad de otros marcadores, por lo cual solucionan la limitación principal de las isoenzimas de no cubrir todo el genoma (Nuez y Carrillo, 2000). Las técnicas empleadas en la detección de polimorfismo utilizan marcadores de ADN y están basadas en: 1) hibridación de ADN; 2) la reacción

en cadena de la polimerasa (PCR) (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997); las cuales se describen a continuación.

#### 4.3.2.1 Técnicas basadas en hibridación de ADN

Demeke (1997) menciona que estas técnicas consisten en cortar el ADN con enzimas de restricción, separar los fragmentos de ADN con electroforesis y detectar patrones polimórficos por hibridación con una secuencia específica de ADN marcada con algún elemento radiactivo. Estas técnicas incluyen los polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), que se han usado en estudios de diversidad genética y de localización de caracteres complejos en los genomas (Hoisington, 1989).

#### 4.3.2.2 Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR, desarrollada por Kary Mullis en 1985, se basa en la función de la enzima ADN polimerasa y consiste en sintetizar un duplicado de ADN a partir de un ADN molde o blanco, para lo cual se utilizan iniciadores (oligonucleótidos) que se hibridan en los extremos de la secuencia complementaria del ADN molde. Cada uno de los ciclos (20 a 40) que integran la PCR están determinados por temperaturas y tiempos específicos, con los siguientes pasos: 1) desnaturalización del ADN molde; 2) alineamiento de los iniciadores; 3) extensión o amplificación de los iniciadores alineados por la ADN polimerasa (Palumbi, 1996). La técnica de PCR incluye las metodologías del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs), microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs), entre otras (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997).

Los sistemas de marcadores moleculares basados en RFLP y RADP, así como los AFLP, han sido desarrollados para ballico perenne y usados para la construcción de mapas de ligamiento genético (King *et al.* 1998; Bert *et al.* 1999; citados por Jones *et al.*, 2001). Sin embargo, el análisis con RFLP es extensivo y laborioso, mientras que los RAPD son considerados marcadores dominantes pero presentan problemas de repetibilidad (Jones *et al.* 1997). Los análisis con AFLP detectan loci múltiples con repetibilidad alta pero al igual que los RAPD producen marcadores dominantes (Powell *et al.* 1996). En cambio, los SSR son considerados como marcadores que proporcionan

la mayor información para el estudio de poblaciones en subespecies (Koreth *et al.* 1996), debido a que son polimórficos, repetibles y estables a través de especies y laboratorios; además emplean técnicas sencillas de la PCR y los productos de amplificación pueden observarse fácilmente en geles de agarosa, acrilamida, con técnicas de fluorescencia o capilaridad (Weber y May, 1989).

Los detalles de las diferencias que existen entre los marcadores moleculares de ADN más utilizados, se muestran en el Cuadro 2.

## Cuadro 2. Comparación de los marcadores moleculares de ADN más comúnmente utilizados

Características	RFLPs	RAPDs	Microsatélites	AFLPs	
Tipo de sonda*	ADN	Iniciadores de bases	10 pares de bases	Secuencias repetidas específicas de ADN	Secuencias específicas de ADN
Polimorfismo	Medio	Alto	Alto	Muy alto	
Detección de alelos	Si	No	Si	No	
N° de locis detectados	1-3	1-10	1-5	50-100	
Genoma analizado	Parte del genoma	Genoma completo	Genoma completo	Genoma completo	
Herencia	Codominante	Dominante	Codominante	Dominante	
Dificultad técnica	Intermedia	Simple	Simple	Intermedia	
Reproducibilidad	Alta	Intermedia	Alta	Alta	
Cantidad de ADN	2-30 µg	1-10 ng	50-100ng	100ng	
Radioisótopos	Si	No	No	Si	
Costos	Alto	Intermedio	Alto	Alto	
Tiempo	Intermedio	Rápido	Rápido	Intermedio	

Tomado de Demekke *et al.*, 1997. \*Sonda: secuencia definida de ácido nucleico de una sola cadena que puede hibridarse a una cadena desnaturalizada de ADN de secuencia complementaria (homóloga).

#### **4.4 Características de los marcadores moleculares de Secuencias Simples Repetidas (SSRs) o microsatélites**

Los microsatélites son marcadores moleculares multialélicos que combinan la PCR y el uso de secuencias simples repetidas de ADN. Los SSR están constituidos por secuencias de uno a seis nucleótidos, repetidas y unidas en secuencia continua, acompañadas siempre de secuencias específicas altamente conservadas en las zonas aledañas; éstas son importantes, pues generalmente se mantienen entre individuos de la misma especie (Powell *et al.*, 1996). Los SSRs se encuentran esparcidos por todo el genoma de los organismos eucariontes (Tautz, 1989) y procariontes (Zane *et al.* 2002). Powell *et al.* (1996) mencionan que el incremento en el uso de los SSR se debe a que proporcionan la más alta incidencia de polimorfismo en comparación con los RFLPs y RAPDs, presentan herencia genética codominante y en individuos cercanos detectan muchos alelos. El uso de la PCR facilita la automatización en estos marcadores, se requieren pocas cantidades de ADN, los datos obtenidos son confiables y altamente reproducibles, están dispersos en el genoma de manera uniforme, los loci se conservan de forma frecuente entre especies relacionadas, en ocasiones entre géneros y además porque el intercambio entre laboratorios se puede realizar con la simple secuencia de los iniciadores, sin tener que transferirlos físicamente. Los marcadores SSRs son convenientes en estudios de mapeo (Rafalski *et al.* 1996) y en la estimación de diversidad genética (Forster *et al.* 2005) debido a las ventajas mencionadas.

#### **4.5 Aplicación de los marcadores moleculares en gramíneas**

Los marcadores moleculares son utilizados en programas de mejoramiento en plantas, para identificar loci y regiones dentro del genoma, en la detección de sitios estrechamente ligados a un gran número de rasgos agronómicos y de resistencia enfermedades en diferentes especies de plantas (Gupta y Varshney, 2004). Estos marcadores se usan en el análisis de relaciones genéticas entre cultivares, relación filogenética de especies relacionadas (Jones *et al.* 2002a) y en el establecimiento de mapas genéticos como, por ejemplo, en ballico perenne (Jones *et al.* 2002b; Warnke *et al.* 2004). Al respecto, a continuación se describen investigaciones acerca del uso de

marcadores moleculares en el desarrollo y construcción de mapas genéticos, detección del polimorfismo y en la estimación de la diversidad genética.

#### 4.5.1 Desarrollo y construcción de mapas genéticos

A mediados de la década de 1990, la tecnología del marcador molecular desarrollada en ballico perenne tuvo un menor avance en comparación con otras especies de plantas de importancia agrícola. Así, se construyeron mapas genéticos de ligamiento genético de alta resolución para tomate, soya, maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, usando diferentes tipos de marcadores moleculares. Los mapas genéticos fueron utilizados para identificar QTL de caracteres fenotípicos múltiples, asociados con rendimiento, resistencia a enfermedades y tolerancia a estrés abiótico. En contraste, sólo se utilizó una referencia de mapa genético de ballico perenne basado en un número pequeño de marcadores AFLPs y RAPDs. Además del par de cruzamiento interespecífico usado para dicho mapa, un pequeño número de otros pares de cruzamiento derivados de rasgos específicos de poblaciones mapeadas había sido desarrollado en el Reino Unido; esta reducida información de QTL se usó para caracteres de rasgos de desarrollo floral y contenido de carbohidratos solubles en agua, pero el desarrollo de mapas y análisis de QTL estuvieron limitados, especialmente si se compara con otras especies de gramíneas (Forster *et al.* 2004).

Rubik *et al.* (1999) aislaron un número pequeño de SSRs derivados del ADN genómico de clones de ballico perenne, pero fueron insuficientes para desarrollar un mapa. La tecnología de enriquecimiento de bibliotecas genómicas (Edwards *et al.*, 1996) fue utilizada para aislar 450 SSRs de clones de *L. perenne* (LPSSR) para el par de iniciador asignado (Jones *et al.* 2001, 2002b) y el subgrupo de marcadores derivados se probaron para polimorfismo y detección de ortolocus en especies relacionadas (Jones *et al.*, 2001). Un total de 309 pares de iniciadores LPSSR únicos fueron evaluados para polimorfismo genético en 150 poblaciones, en las cuales se detectó 31 % de segregación de alelos. Para la posición en el mapa correspondiente al grupo de ligamiento 7 fueron asignados 93 loci; la mayoría derivó de secuencias clonadas con repeticiones del nucleótido del tipo y, además, una proporción pequeña de pares de

iniciadores detectó loci múltiples y alelos nulos, al observar las frecuencias (CA)n (Jones *et al.* 2002b). El primer mapa genético de *Festuca alta* construido con marcadores AFLPs y EST-SSRs (basados en PCR) fue reportado por Saha y colaboradores (2004).

#### 4.6 Detección de polimorfismo y estimación de la diversidad genética

En un estudio realizado por Kubik *et al.* (2001) para detectar polimorfismo se encontró que al utilizar 157 pares de iniciadores EST-SSR de *Festuca alta* y probarlos en 11 genotipos correspondientes a siete especies de herbáceas, aproximadamente el 92% de los pares de iniciadores SSR produjeron bandas en al menos una especie.

Al determinar la diversidad genética en ballico perenne tunecino, Ghariani *et al.* (2003) obtuvieron un total de 136 marcadores polimórficos ISSR, con un promedio de 12.6 bandas polimórficas por iniciador, y estos iniciadores evidenciaron diversidad genética en las poblaciones de ballicos; además, estos autores observaron divergencia entre los dos cultivares incluidos respecto a las 16 poblaciones espontaneas (nativas). Kirigwi *et al.* (2008) obtuvieron de una selección de 40 marcadores EST-SSR de *Festuca alta* y 60 marcadores SSR genómicos de *Festuca-Lolium*; 10.3 y 9.3; además, ellos encontraron que los marcadores EST-SSR y SSR genómicos agrupan a 48 cultivares de *L. temulentum* en tres grupos, con la excepción de un cultivar que no se agrupó con ninguno.

Al estudiar la relación fenotípica entre diferentes especies del genero *Lolium*, Mirjalili *et al.* (2008) reportaron la formación de grupos individuales para cuatro especies, mientras que las restantes dos especies se agruparon en un solo grupo y además mostraron una relación muy cercana con *L. perenne* y *Lolium multiflorum*.

## **Estudio 1. Evaluación de componentes morfológicos de *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Lolium hybridum* y *Dactylis glomerata*.**

### **1. Introducción**

El principal propósito de una caracterización morfológica es identificar genotipos sobresalientes con caracteres deseados, tales como altura de la planta, número de tallos, resistencia a enfermedades, calidad nutritiva, entre otras, para incorporarlas a poblaciones, los cuales puedan ser registrados, liberados y utilizados en programas de mejoramiento (Do Valle, 2001). De esta forma, mediante la utilización de los diferentes descriptores se formarán grupos morfológicamente definidos que permitirán seleccionar los caracteres más importantes, que expliquen la variabilidad de estas poblaciones y la constancia de éstos, dentro de las mismas (Steiner, 1998). En el Cuadro 1 se muestran 42 cultivares de *D. glomerata*, obtenidos a partir de programas de selección y mejoramiento genético. Desde principios de la década de 1950, la obtención de estos cultivares se ha basado principalmente en el mejoramiento tradicional, seleccionándolos de acuerdo a caracteres fenotípicos como: altura, rendimiento, producción, resistencia a plagas y enfermedades, etc.; aunque también se han utilizado herramientas biotecnológicas.

Las características morfológicas y biológicas en los pastos pueden ser altamente variables, debido a la influencia ecológica y a las características propias del forraje. Las especies perennes están sujetas a cambios bióticos y abióticos que provocan disturbios y estrés en la variación genética, lo que puede repercutir en su persistencia y adaptación (Jianyang, 2005). Por tal motivo, la clasificación e identificación de los recursos genéticos disponibles, seguido de una caracterización morfológica y agronómica para la región agroecológica de interés, es de vital importancia en los programas de mejoramiento genético.

En el directorio de colecciones de germoplasma en América Latina y el Caribe se reporta que *L. hybridum* cuenta con siete variedades tradicionales: cinco de Brasil, una de Francia y una de Nueva Zelandia. Para *L. multiflorum* se mencionan 63 variedades en Brasil, 27 de Alemania, siete de Dinamarca, 15 de los Países Bajos y seis en Nueva

Zelandia. En lo que respecta a *L. perenne*, se encontraron 483 variedades de Brasil, 27 de Alemania, 10 de Dinamarca, 15 de Los Países Bajos, seis de Nueva Zelandia y siete de Estados Unidos (Knudsen, 2000).

Los forrajes presentan cambios temporales en producción, entre estaciones o entre años (Mendoza 1992). La estación del año hace que el balance entre la tasa de crecimiento y pérdida de tejido de una pradera varíe, es por ello, que el conocimiento de los cambios estacionales en la curva de crecimiento, permite determinar la frecuencia de defoliación a la que deben ser cosechados las especies forrajeras de interés, y así, obtener altos rendimientos y forrajes de buena calidad (Zaragoza *et al.*, 2009).

En un estudio (Velasco *et al.*, 2001) se observó que la relación hoja: tallo en pasto ovillo (variedad Potomac) es mayor en verano y más baja en primavera, presentando diferencias en otoño; en los componentes hojas, tallos y material muerto en los corte de homogenización ocurrieron proporciones de 65, 19 y 16 % en verano; 30, 45 y 25 % en otoño; 38, 20 y 42 % en invierno; y 40, 25 y 35 % en primavera. En una pradera alfalfa-ovillo, se encontró que el mayor rendimiento de forraje se obtuvo cuando la relación hoja: tallo fue 2.8, 3.2, 4.1 y 5.1 en verano, otoño, primavera e invierno, con mayor porcentaje de hojas y material muerto en las primeras y últimas semanas de crecimiento (Zaragoza *et al.*, 2009). En ballico perenne, el aporte de los componentes hojas, tallos y espigas a la biomasa fue mayor durante el verano y otoño, con respecto al observado en invierno y primavera, mientras que la proporción de hojas disminuyó al aumentar el intervalo entre cortes, con excepción del invierno; el número de tallos aumentó únicamente en primavera (Velasco *et al.*, 2005).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la variación a través de las estaciones del año en los componentes morfológicos de 11 genotipos correspondientes a las especies de *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. hybridum* y *D. glomerata*, con el propósito de establecer técnicas de evaluación y selección de genotipos a partir de caracteres morfológicos asistidos con marcadores moleculares en dichas especies forrajeras.

## 2. Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en el Campo Agrícola Experimental “Tabla San Juan” lote J-116 de la Universidad Autónoma Chapingo, localizada a 19° 29’ latitud norte, 98° 54’ longitud oeste y a 2250 m de altitud. El clima en la región de Chapingo es templado sub-húmedo, el más seco de los sub-húmedos Cb(w0)(w)(i)g. La precipitación media anual es 644.8 mm, siendo verano la estación del año en la que más llueve. La temperatura media anual varía de 12 °C a 18°C, con una oscilación térmica entre 5 y 7°C, siendo mayo el mes más caluroso y enero el mes más frío (García, 1988). El tipo de suelo donde se estableció el experimento corresponde a la variante nativitas, la cual presenta las siguientes características: pendiente de 2-3 %, estrato superficial de poco espesor, color pardo grisáceo muy oscuro y de textura franco que cambia a migajón arenoso con la profundidad, presentando un estrato cementado (tepetate) con 37 cm de capa arable; bajo en nitrógeno y fósforo, escaso contenido de materia orgánica y poca capacidad de retención de humedad, el pH va de neutro a ligeramente alcalino (Cachon, 1976).

Los datos climatológicos de temperatura, precipitación y humedad relativa ocurridos durante el periodo experimental (julio de 2007 a noviembre de 2008) se reportan en el Anexo 1, y se obtuvieron de la Estación Meteorológica de la Universidad Autónoma Chapingo.

### 2.1 Material genético experimental

Se evaluaron tres accesiones de *L. multiflorum*, tres de *L. perenne*, tres de *D. glomerata* y dos de *L. hybridum* (Cuadro 3), provenientes del Banco de Germoplasma de la Red de Información de Recursos de Germoplasma del Departamento de Agricultura – Servicio de Investigación Agrícola (GRIN-USDA-ARS), en Beltsville, Maryland, Estados Unidos.

**Cuadro 3. Descripción de las accesiones incluidas en el experimento. El número de accesión corresponde al registro asignado por el banco de germoplasma del GRIN-USDA-ARS, Washington, E.E.U.U.**

Número	Especie	Genotipo	Accesión
1	<i>Lolium multiflorum</i>	Ansyl France (4n)	619468
2	<i>Lolium multiflorum</i>	New Zealand (2n)	189390
3	<i>Lolium multiflorum</i>	Uruguay (2n)	211828
4	<i>Lolium perenne</i>	Netherland Barenza (2n)	237184
5	<i>Lolium perenne</i>	USA Manhattan II (2n)	600878
6	<i>Lolium perenne</i>	Canada Uri (4n)	403903
7	<i>Dactylis glomerata</i>	Canada Hércules (4n)	279808
8	<i>Dactylis glomerata</i>	USA Potomac (4n)	578553
9	<i>Dactylis glomerata</i>	USA Napier (4n)	578665
10	<i>Lolium hybridum</i>	Australia Wimmera 62 (4n)	476817
11	<i>Lolium hybridum</i>	France Itaque (4n)	321679

(2n) = accesión diploide; (4n) = accesión tetraploide

Los genotipos se establecieron usando un diseño experimental en bloques aleatorios, considerando cuatro repeticiones y medidas repetidas a través del tiempo (11 cortes). Cada bloque consistió de 10 genotipos, cada genotipo dentro del bloque tenía tres surcos, que correspondían a una parcela, la cual fue tomada como unidad experimental. En total el experimento comprendió 120 surcos de 3 m de largo (con 20 plantas cada uno) y 40 parcelas.

El genotipo France Itaque se utilizó en los surcos 91, 92 y 93 (parcela 31) y en los surcos 118, 119 y 120 (parcela 40) para completar la falta de plántulas al trasplante de los genotipos USA Manhattan II y USA Potomac, en las repeticiones 3 y 4. El genotipo UK Augusta, no se incluyó en los análisis ya que únicamente se utilizó en el surco 102 correspondiente al genotipo USA Potomac (parcela 38) en la repetición 3. En el Anexo 2 se muestra la distribución de los genotipos en campo. Las plántulas se trasplantaron manualmente en surcos de 3 m de largo a una distancia entre plantas de 15 cm y 80 cm entre hilera, con una densidad total de 20 plantas por surco. El trasplante se realizó el 15 de julio de 2007.

Se realizaron once cortes para evaluar los componentes morfológicos (Cuadro 4). El número de días entre cortes fue variable debido al tiempo de recuperación de las plantas, y de acuerdo a la época de corte.

**Cuadro 4. Fecha de corte y días transcurridos entre corte.**

Número de corte	Fecha de corte	Días entre corte
Trasplante	15 de julio de 2007	
Corte 1	10 de octubre de 2007	87
Corte 2	11 de noviembre de 2007	37
Corte 3	15 de diciembre de 2007	34
Corte 4	26 de enero de 2008	42
Corte 5	02 de marzo de 2008	35
Corte 6	06 de abril de 2008	36
Corte 7	31 de mayo de 2008	54
Corte 8	29 de junio de 2008	29
Corte 9	24 de julio de 2008	25
Corte 10	31 de agosto de 2008	38
Corte 11	29 de septiembre de 2008	29
Promedio entre cortes		40.54

## 2.2. Variables de respuesta

La selección de las variables se hizo con base en otros estudios realizados en la región de Chapingo, donde se evaluaron componentes productivos de 141 genotipos de ballico anual (Ortiz, 2008), rendimiento y componentes morfológicos de genotipos de ballico perenne y anual (Galicia y Prado, 2008) y en una evaluación morfológica y de rendimiento de genotipos de ballico anual, perenne; híbrido y pasto oville (Maldonado, 2008). En total se evaluaron once variables, las cuales se describen a continuación.

### 2.2.1 Componentes de hoja, tallo y material muerto

Se cortó y pesó el forraje acumulado en cada parcela (tres surcos correspondientes al mismo genotipo), homogenizando la muestra, y se tomó una muestra para separar cada componente en hoja, tallo y material muerto; después se pesó cada uno de éstos en fresco. El porcentaje de hoja, tallo y material muerto se obtuvo de la proporción del peso de cada componente, dividido entre el peso total. La relación hoja: tallo se calculó con base en el peso de la hoja dividido entre el peso del tallo. El peso seco total por planta, tallo, hoja y material muerto por planta, se obtuvo en base seca a una temperatura de 60 °C y hasta peso constante.

### 2.2.2 Altura y número de tallos

Para la medición de altura y número de tallos, se seleccionaron al azar cinco plantas por surco, 15 plantas por parcela por genotipo en cada repetición; mismas que se evaluaron en todos los cortes.

El propósito de utilizar estas variables se debió a que en la gran mayoría de los trabajos realizados con gramíneas de zona templada se evalúan rendimiento y producción de forraje, sin tomar en cuenta la evaluación de componentes morfológicos, los cuales son importantes pues intervienen en la adaptación, crecimiento, desarrollo y producción de las plantas.

### 2.3 Análisis estadístico

El diseño experimental usado fue en bloques aleatorizados con cuatro repeticiones y once mediciones repetidas a través del tiempo. Se utilizó este diseño debido a que existió una restricción, la cual consistió en que dentro de cada bloque o repetición se incluyeron todos los genotipos dispuestos en forma aleatoria. Al tener todos los genotipos dentro de cada bloque se logró realizar una comparación entre los bloques. Si todos los bloques proporcionaron igualdad de condiciones en la expresión de los genotipos, no existieron diferencias entre ellos, pues todos tenían los mismos genotipos; pero si existió alguna variación en las condiciones de cada bloque, que pudo ser ocasionada por otros factores (suelo, luz, temperatura, etc.), se tendría una diferencia entre bloques, no atribuible a los genotipos; sino a las variaciones de algunas propiedades entre bloques (Rebolledo, 2002).

Para el análisis estadístico se utilizó un modelo en parcelas divididas, con observaciones repetidas a través del tiempo:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_j + \tau_i + \epsilon\beta_j\tau_i + \alpha_k + \epsilon\alpha_k\tau_i + \epsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$ = Valor de la variable respuesta

$\mu$ = Media general de las observaciones (poblacional)

$\beta_j$ = efecto de j-esimo nivel del factor bloque (repetición: 1, 2, 3, 4)

$\tau_i$ = efecto del i-esimo nivel factor de genotipos (1,2,...,11)

$\epsilon\beta_j\tau_i$ = error experimental tipo a

$\alpha_k$ = efecto del i-esimo nivel de factor corte (1, 2,...,11)

$\epsilon_{ik}$  = efecto de la interacción de la i-esimo genotipo por el k-esimo corte

$\epsilon_{ijk}$  = error experimental tipo b  $\epsilon_{ijk} \sim NI(0, 1)$

En el modelo se asume que el error experimental ( $\epsilon_{ijk}$ ) se distribuye normal e independiente, con media cero (0) y varianza (1);  $\epsilon_{ijk} \sim NI(0,1)$

Las variables de respuesta se analizaron con el procedimiento MIXED (PROC MIXED) del programa SAS para Windows, versión 8 (SAS, 2000). El PROC MIXED produce pruebas de hipótesis válidas, errores estándar e intervalos de confianza que consideran apropiadamente la naturaleza aleatoria de las unidades experimentales aún cuando existan datos desbalanceados, correlación entre las observaciones, efectos anidados o de submuestreos. La prueba de medias (SLICE de LSMEANS) proporcionó la posibilidad de probar medias simultáneas por diferencias entre niveles de un factor dentro de los niveles de otro factor.

### **3. Resultados y Discusión**

Las accesiones que constituyen los recursos genéticos de las especies forrajeras evaluadas en cada una de las áreas de impacto, permite identificar las características favorables y desfavorables para cada uno de los sistemas de producción, así como identificar la magnitud en la variación de adaptación, tolerancia a estrés hídrico y térmico, resistencia a plagas y enfermedades, rendimiento de forraje y persistencia. Los resultados obtenidos en el presente estudio son parte de un esfuerzo constante de varios años en la obtención de material genético de cada una de las accesiones incluidas, la discriminación de recursos genéticos bajo ensayos de rendimiento, y la etapa inicial de la caracterización morfológica y molecular de las accesiones promisorias en etapas anteriores de evaluación. Los resultados obtenidos en once acciones de cuatro especies forrajeras, para la caracterización morfológica se describen a continuación.

### 3.1 Porcentaje de hoja (PH) y tallo (PT)

De acuerdo con los resultados obtenidos, se describe que conforme sucedían los cortes a través del tiempo, el valor de PH disminuyó en promedio para todas las once accesiones incluidas (Figura 1), lo que puede estar relacionado con la acumulación de material muerto por senescencia, a la incidencia de roya en varias accesiones, al aumento en el número de tallos, a la persistencia, entre otros factores. Con cortes frecuentes se reduce la competencia por luz y aumenta la proporción de luz roja/(luz roja lejana + luz azul), provocando que la respuesta fotomorfogénica de la especie sea la formación de hojas cortas y el aumento en la cantidad de tallos, mientras que con cortes menos frecuentes las plantas desarrollan hojas alargadas y disminuyen la aparición de tallos (Lemaire, 2001).

Las especies de *L. perenne* y *D. glomerata* presentaron los porcentajes de hoja más altos y sin diferencias entre ellos (Anexo 3, Cuadro 1), lo que puede atribuirse a que ambas especies se caracterizan por presentar hojas alargadas y abundantes; lo que se traduce en un aumento en el índice de área foliar, permitiendo una mayor capacidad fotosintética (Muslera y Ratera, 1991).

Zaragoza *et al.* (2009) reportaron que el porcentaje de hojas en *D. glomerata* fue mayor en las tres primeras semanas de crecimiento en otoño e invierno (8-19 % y 30-24 %), en primavera y verano fue similar en todas las semanas, mientras que Velasco *et al.* (2001) indican para esta misma especie, variedad Potomac, que el valor máximo del porcentaje de hojas varió con la estación del año (verano 71, otoño 52, invierno 47 y primavera 50 %), lo que puede atribuirse a factores ambientales como: temperatura, intensidad luminosa, fotoperiodo, disponibilidad y utilización de nutrientes. Según Velasco *et al.* (2005), a excepción del invierno, el porcentaje de hojas en *L. perenne* disminuye al aumentar el intervalo entre cortes de cuatro a seis semanas.

Las accesiones con mayor porcentaje de hoja dentro de cada especie fueron: Canada Uri (4n), Ansy France, Canada Hércules y France Itaque (Anexo 3, Cuadro 1), lo cual difiere de lo reportado por Maldonado (2008) de que USA Manhattan II (*L. perenne*), Canada Hércules (*D. glomerata*) y Ansy France (*L. multiflorum*) son los de mayor porcentaje. Cabe mencionar que estos genotipos son tetraploides, concluyendo que un

incremento en el nivel de ploidía aumenta el porcentaje de hoja, probablemente debido a una mayor actividad fotosintética de las accesiones en estudio. Los genotipos con los menores porcentajes de hoja fueron: Australia Wimmera 62, Uruguay, USA Potomac y USA Manhattan, mientras que Maldonado (2008) reporta a Australia Wimmera 62 (*L. hybridum*), como el genotipo menos sobresaliente, lo cual coincide con el resultado del presente estudio.

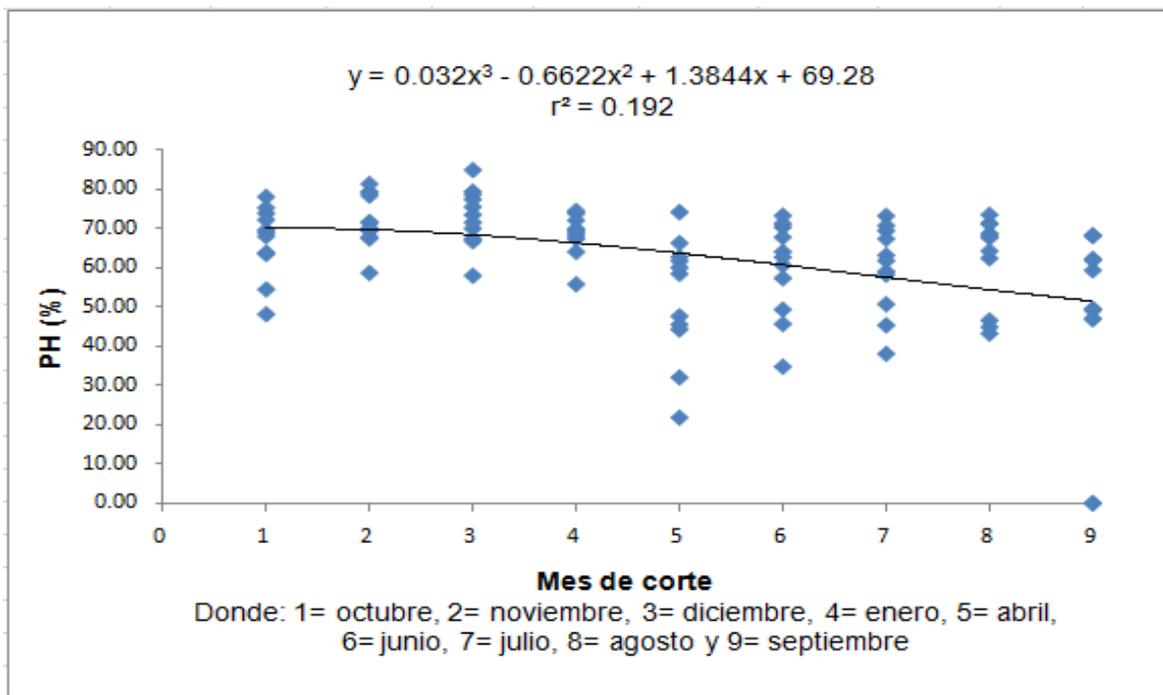
El porcentaje de tallo se incrementó durante los primeros cortes correspondientes de noviembre a junio, y a partir de julio dicho porcentaje disminuyó (Figura 2). En el último corte, el genotipo Australia Wimmera 62 (*L. hybridum*) no persistió, pese a lo cual presentó el mayor porcentaje de tallos (Anexo 3, Cuadro 2) lo que podría atribuirse a que al inicio de primavera un incremento en la temperatura ambiental favoreció el porcentaje de hojas, considerando que las hojas son responsables en la producción de tallos, ya que además de aportar nutrientes, se encargan de captar energía solar y transformarla en fotoasimilados indispensables para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Velasco, 2007).

Maldonado (2008) refirió a Anstyl France (*L. hybridum*) durante el periodo invernal de 2007-2008, como el genotipo con el más alto porcentaje de tallo; con base en lo anterior, se observó que al aumentar el número de cortes existe una relación inversamente proporcional entre la producción de tallos con respecto a las hojas, lo que puede estar relacionado con el hecho de que el crecimiento inicial de los pastos se basa principalmente en las hojas, mientras que al madurar los tallos constituyen el mayor porcentaje del forraje disponible (Duthil, 1990). Conforme la planta va madurando aumenta la cantidad de tallos y disminuyen las hojas, lo que puede asociarse a condiciones ambientales como temperatura, intensidad de luz, fotoperiodo o duración del día y al aporte de nutrientes para las plantas (Muslera y Ratera, 1991). Canada Uri (4n) (*L. perenne*) fue el genotipo con el menor porcentaje de tallo (Anexo 3, Cuadro 2), lo que difiere de Maldonado (2008) quien reporta a USA Manhattan II (*L. perenne*) como el menos sobresaliente.

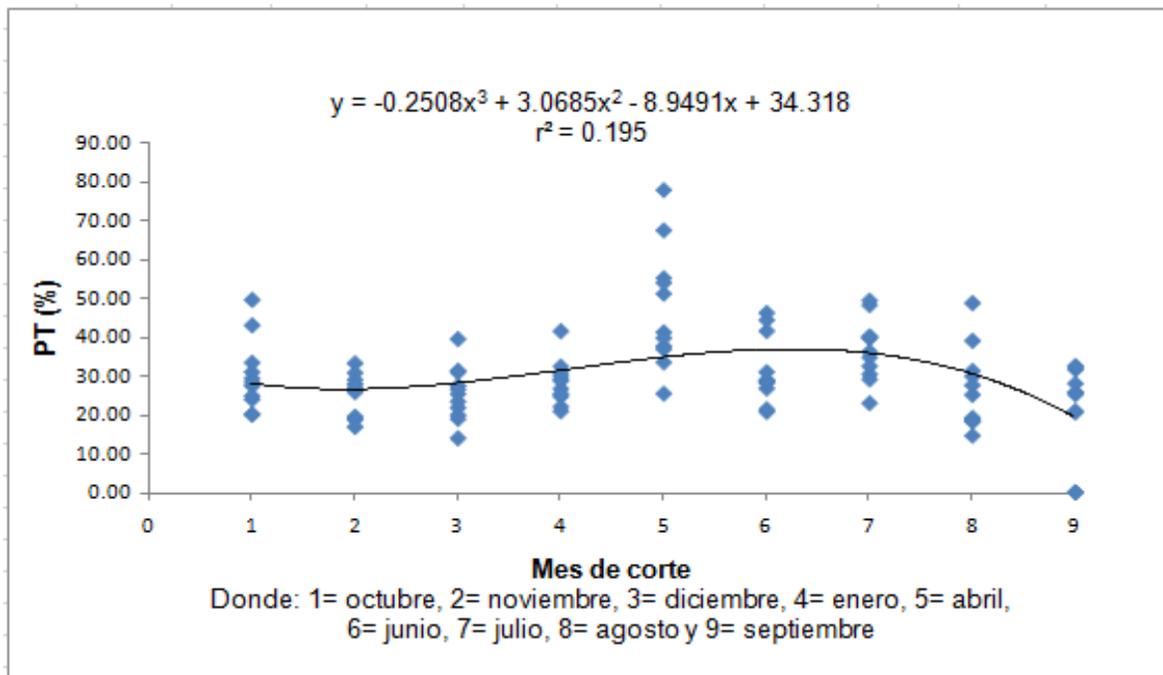
Según Velasco *et al.* (2005), los tallos de *L. perenne* fueron abundantes en primavera, lo cual coincide con el resultado del presente estudio. Esta condición no fue exclusiva

de *L. perenne*, sino que se generalizó para todas las especies evaluadas, lo que puede atribuirse a que en esta estación del año comienza el desarrollo de los órganos reproductores del pasto y el crecimiento de las hojas se inhibe, lo que permite al tallo alargarse (Muslera y Ratera 1991).

En *D. glomerata* L., al corte de uniformización, el forraje residual estuvo compuesto por 19 % de tallos en verano, 45 % en otoño, 20 % en invierno y 25 % en primavera (Velasco *et al.*, 2001) Dicho resultado difiere de lo observado en el presente estudio para esta misma especie, excepto por los valores de invierno que están cercanos a los reportados por Velasco *et al.* (2001) (Anexo 3, Cuadro 2).



**Figura 1. Porcentaje de hoja (PH)**

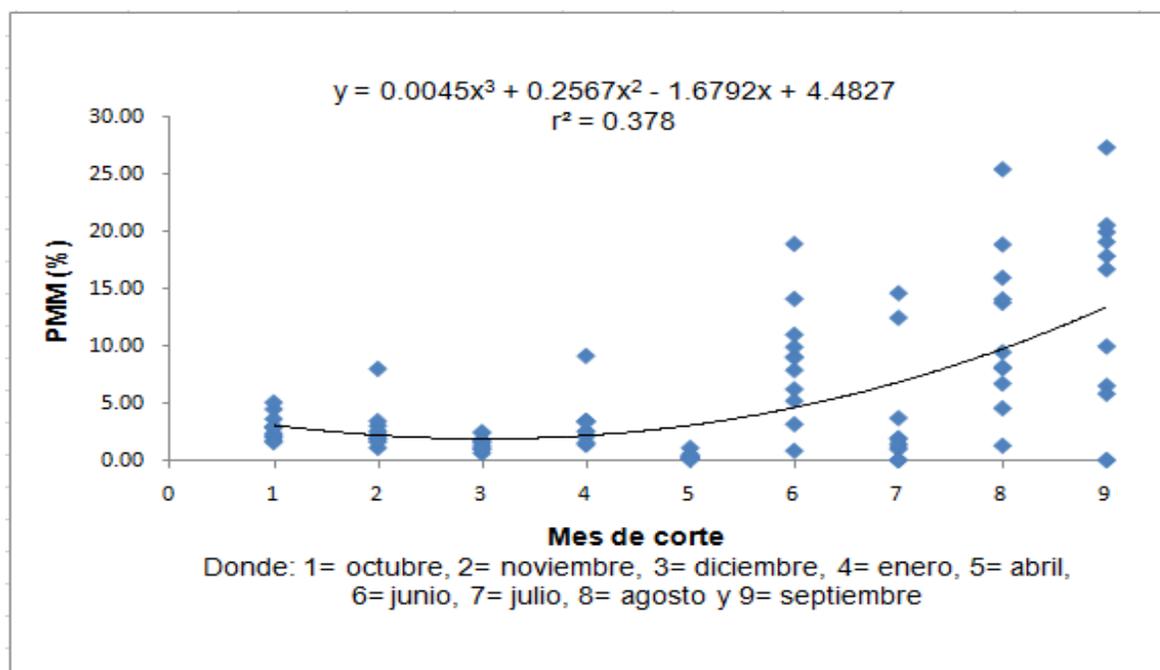


**Figura 2. Porcentaje de tallo (PT)**

### 3.2 Porcentaje de material muerto (PMM)

En la Figura 3 se observa que existe una relación directamente proporcional entre el porcentaje de material muerto y los cortes, es decir, al aumentar el número de cortes aumenta el porcentaje de material muerto. Lo anterior puede ser explicado por el hecho de que a través del tiempo la planta va alcanzando su madurez; lo que estimula el proceso de senescencia. Ansy France (4n) fue el genotipo con el menor porcentaje de material muerto (Anexo 3, Cuadro 3). Según Zaragoza *et al.* (2009), en *D. glomerata*, a la octava semana correspondiente a cada estación, hubo 14.7, 10.6, 5.3 y 45 % en verano, invierno, primavera y otoño, lo que difiere de lo encontrado para esta misma especie en el presente estudio, excepto por los valores de verano (Anexo 3, Cuadro 3). Para *D. glomerata* a la octava semana, correspondiente a otoño e invierno, Velasco *et al.*, (2001) reportan 41 a 45 % de material muerto de la biomasa total, similar a lo observado por Zaragoza (2009). Las diferencias encontradas pueden estar relacionadas con el aumento o disminución de la temperatura, aunque no se presentan datos contundentes de este supuesto.

La accesión con el mayor porcentaje de material muerto fue *D. glomerata* USA Potomac (Anexo 3, Cuadro 3), y esta respuesta se atribuye a un alto porcentaje de infestación de roya de las hojas, tallos y corona (*Puccinia coronata*), la cual estuvo presente desde junio de 2008 hasta el final del presente experimento, y lo cual corresponde al mes de mayor precipitación y humedad en el ambiente (Hannaway *et al.* (1999a).



**Figura 3. Porcentaje de material muerto (PMM)**

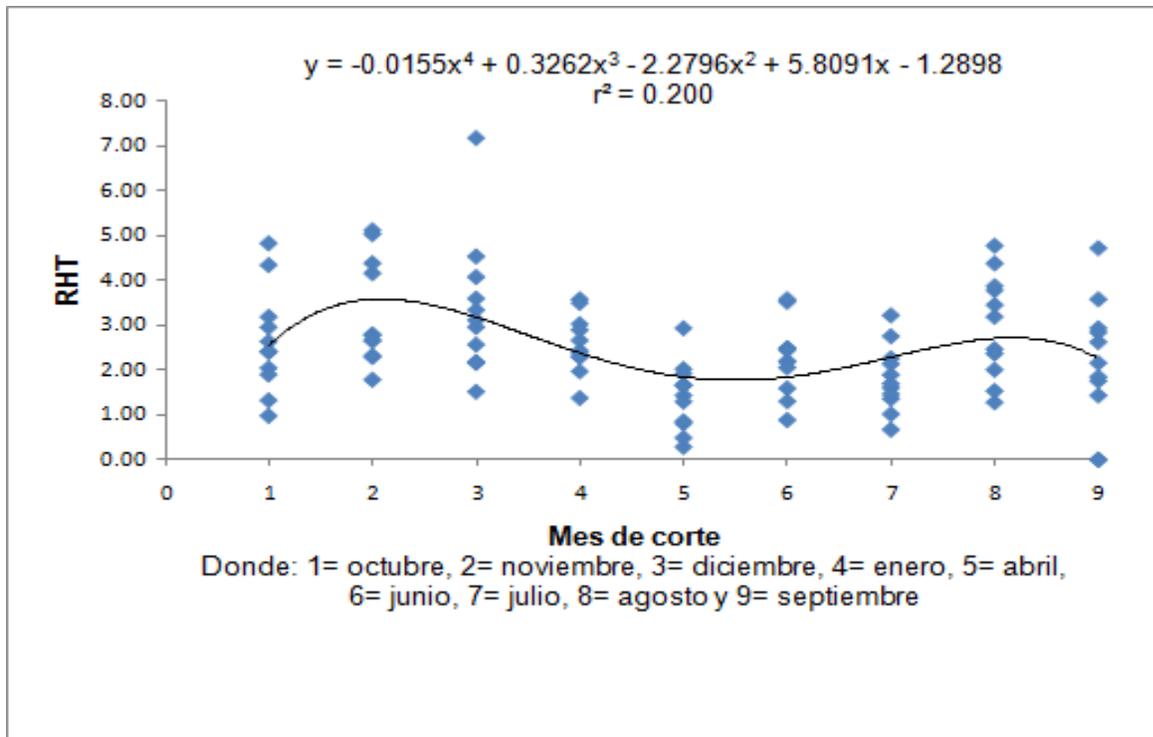
### 3.3. Relación hoja:tallo (RHT)

La relación hoja: tallo fue inconsistente a través de cada estación del año entre las accesiones evaluadas, i.e., en otoño incrementó, en invierno y primavera disminuyó, y en verano hubo un incremento gradual, hasta que en el último corte se redujo drásticamente (Figura 4). La reducción en el porcentaje de hojas durante invierno y primavera puede relacionarse con las bajas temperaturas, ya que los carbohidratos de reserva en la planta son utilizados para mantenimiento y recuperación al término del periodo crítico; además con temperaturas bajas la planta disminuye la transpiración, no ocurre la translocación de fotosintatos y se detiene el crecimiento. En cambio, la disminución en la relación hoja: tallo durante la primavera puede estar asociada a que

al aumentar la temperatura, la planta abandona gradualmente el letargo en el que permaneció durante el invierno y los carbohidratos de reserva estimulan la producción de tallos, pues en el momento en que las condiciones de temperatura, humedad, horas luz, etc. sean del todo favorables se producen nuevas hojas que favorecen la eficiencia de la fotosíntesis.

La accesión Canada Uri (4n) presentó la más alta relación hoja: tallo (Anexo 3, Cuadro 4), lo que difiere de Maldonado (2008) pues él reporta a USA Manhattan II (*L. perenne*) como el más sobresaliente, mientras que Galicia y Prado (2008) encontraron que la relación hoja: tallo para la especie *L. perenne* fue variable entre genotipos y a través de cortes, lo que puede atribuirse al número de genotipos utilizados (16). Australia Wimmera II fue el genotipo con la menor relación hoja:tallo a través de todo el periodo experimental.

De acuerdo con Velasco *et al.* (2001), la relación hoja: tallo en *D. glomerata*, cambia con la estación del año y la relación más alta se presenta en verano, difiriendo del presente estudio donde la mayor relación se observó en otoño (Anexo 3, Cuadro 4). Zaragoza *et al.* (2009) indican que la relación hoja: tallo en *D. glomerata* varía estacional y semanalmente, siendo mayor en las primeras dos semanas de crecimiento en verano y otoño. Estas diferencias pueden deberse al manejo de la defoliación, ya que la relación hoja: tallo puede aumentar o disminuir, de acuerdo con la intensidad de cosecha de un corte a otro (Velasco *et al.*, 2001).



**Figura 4. Relación hoja: tallo (RHT)**

3.4 Peso seco total de la planta (PSP), peso seco de tallo (PST), peso seco de hoja por planta (PSHP) y tallo (PSHP).

De manera general para el peso seco total, y por componente de hoja y tallo, se observó una relación negativa entre el peso de estos descriptores con los cortes sucesivos (Figura 5). Al comparar el peso de cada componente en las accesiones, se observa que las pertenecientes a la especie *L. multiflorum* presentaron los pesos secos total y por componente más altos, principalmente en otoño e invierno (Anexo 3, Cuadro 5), lo que pone de manifiesto que en la región de Chapingo, *L. multiflorum* es la especie que mejor se adapta a las bajas temperaturas (Ortiz, 2008).

La accesión sobresaliente fue Ansy France (4n) para peso seco total y de hoja por planta; y para el caso de peso seco total por planta fue Australia Wimmera 62. Por el contrario, la accesión con menor peso total y por componente fue Manhattan II (2n), lo que coincide con lo reportado por Maldonado (2008) durante la época de otoño e invierno.

Las diferencias encontradas en este y otros estudios, sugiere que a pesar de que las especies y genotipos tetraploides pueden alcanzar mayores rendimientos, comparadas con las diploides, es el ambiente el que influye en la expresión de los caracteres genéticos, porque si las condiciones ambientales (precipitación y temperatura, entre otras) y disponibilidad de nutrientes en el suelo son desfavorables, el potencial genético no se expresa en su totalidad.

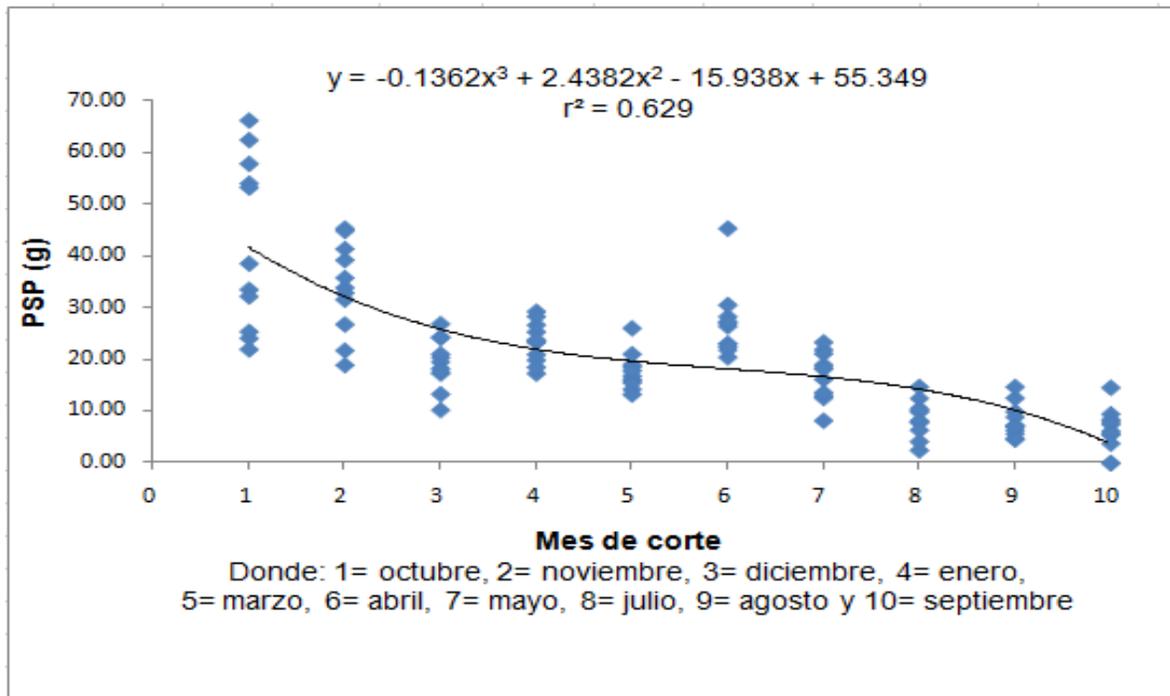
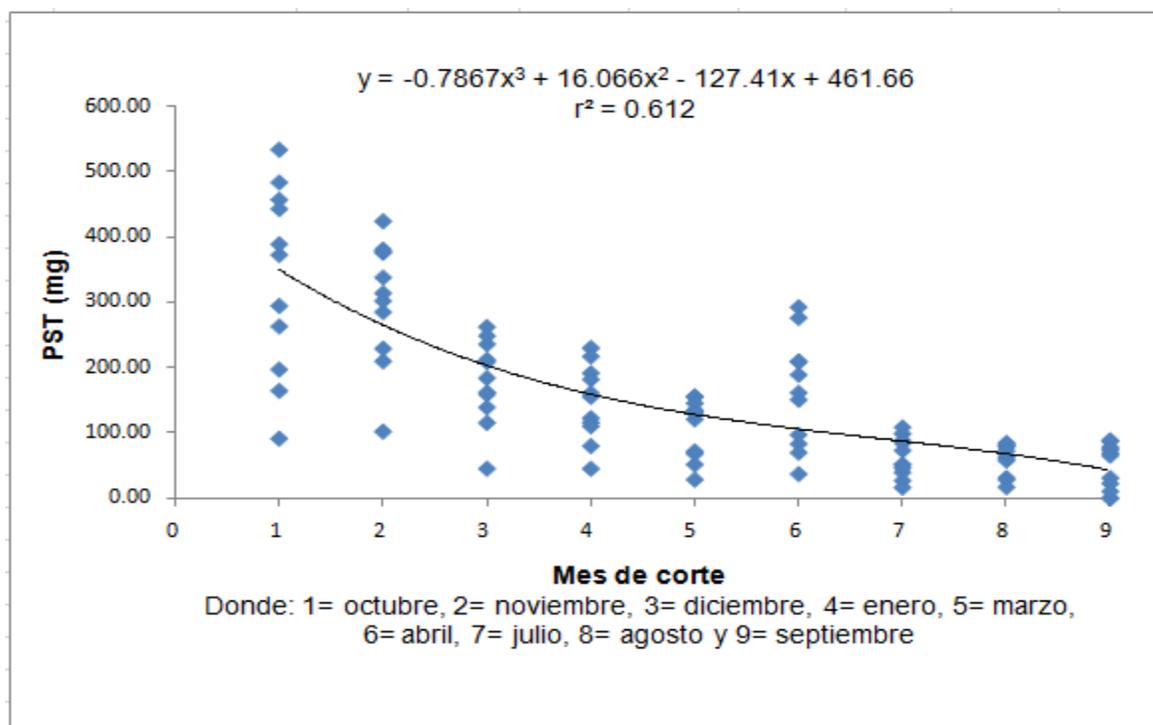
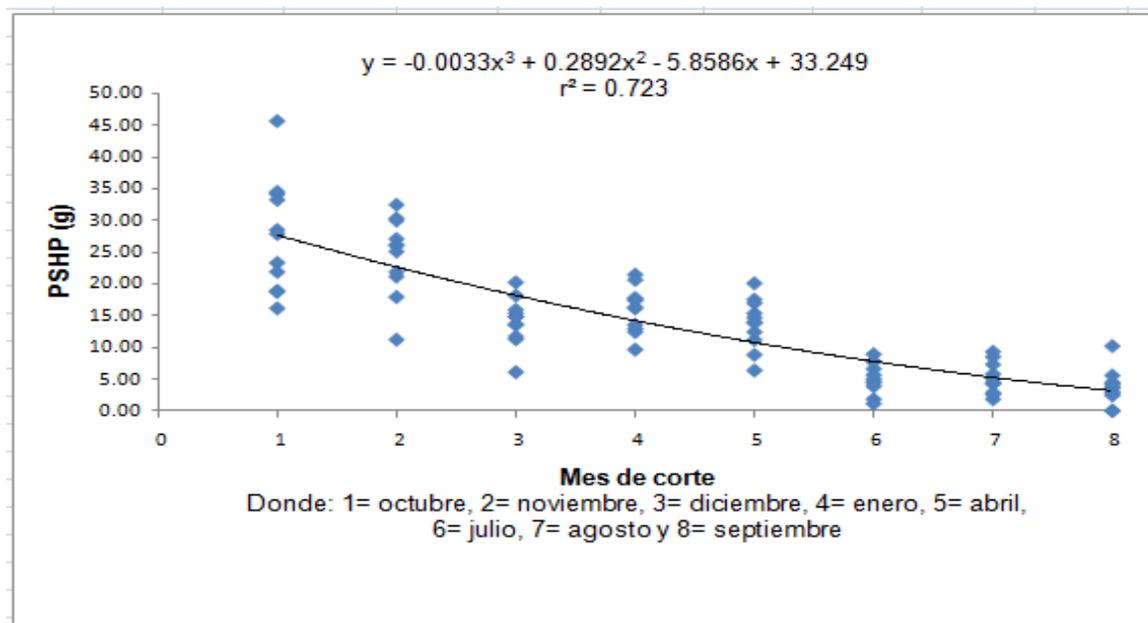


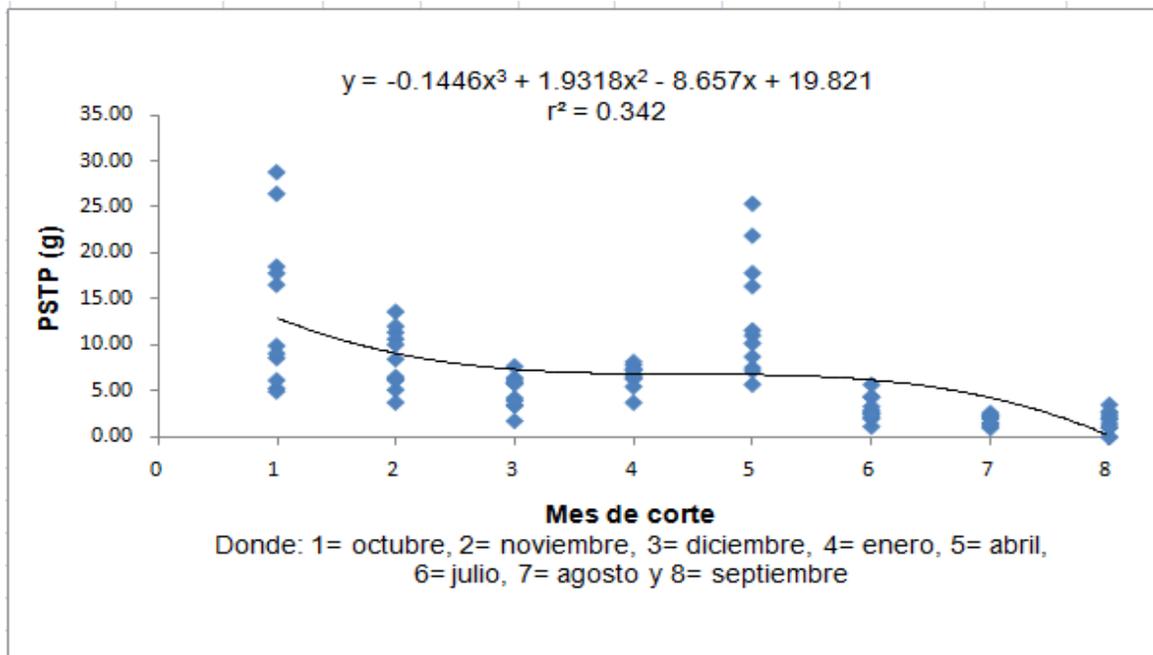
Figura 5. Peso seco total de la planta (PSP)



**Figura 6. Peso seco de tallo (PST)**



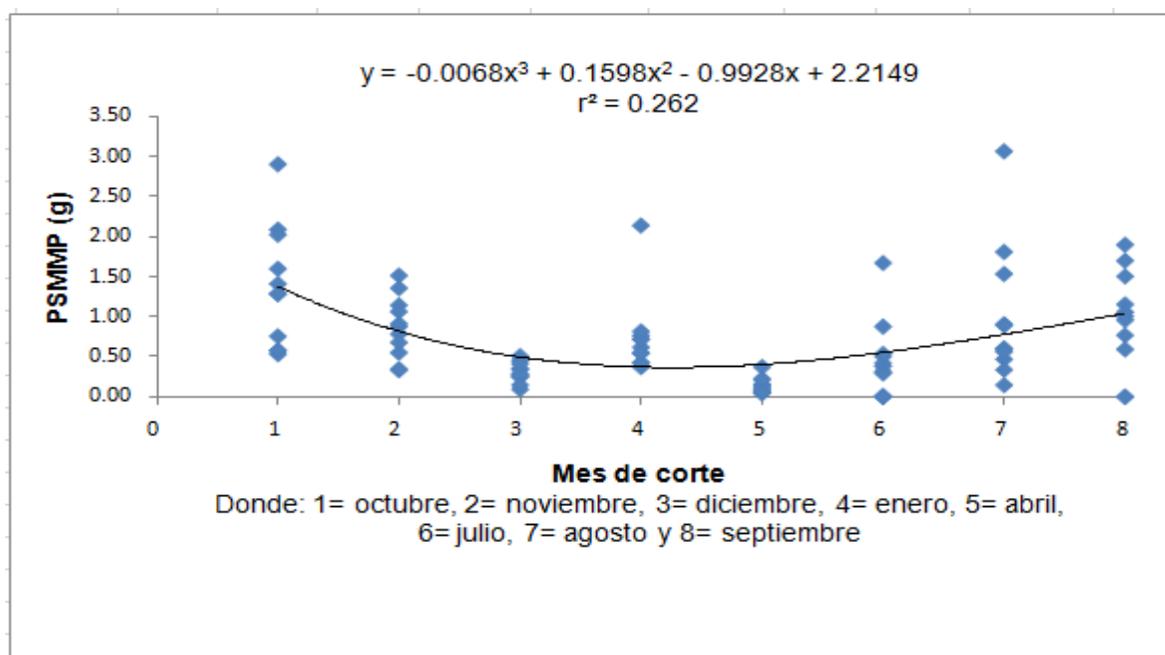
**Figura 7. Peso seco de la hoja por planta (PSHP)**



**Figura 8. Peso seco de tallo por planta**

### 3.5 Peso seco de material muerto por planta (PSMMP)

El peso seco de material muerto por planta varió con respecto a la estación del año y al número de corte, representado con una tendencia cuadrática (Figura 9). En octubre se alcanzó el mayor peso seco de material muerto, siendo este el primer mes de corte, por lo que ocurrió una gran acumulación de biomasa que repercute en el aumento de material muerto. En los últimos meses de corte (de julio a septiembre) el peso seco de material muerto aumenta nuevamente, lo que puede estar relacionado con el hecho de que la edad de la planta avanza y se inicia la senescencia. *D. glomerata* USA Potomac fue el genotipo con el mejor peso seco de material muerto (Anexo 3, Cuadro 9). Al comparar las especies se observó que los pesos más altos los presentaron los genotipos pertenecientes a *D. glomerata* (Anexo 3, Cuadro 9), lo que puede atribuirse a una mayor susceptibilidad a la infestación por roya. El peso seco de material muerto en estos genotipos, se incrementó drásticamente del corte 6 al 8 (Figura 9); al parecer existe una relación directamente proporcional entre la madurez de la planta durante la época de lluvias cuando también existe una mayor presencia de roya foliar, con respecto al aumento en el peso del material muerto (Velasco, 2001).



**Figura 9. Peso seco de material muerto por planta (PSMMP)**

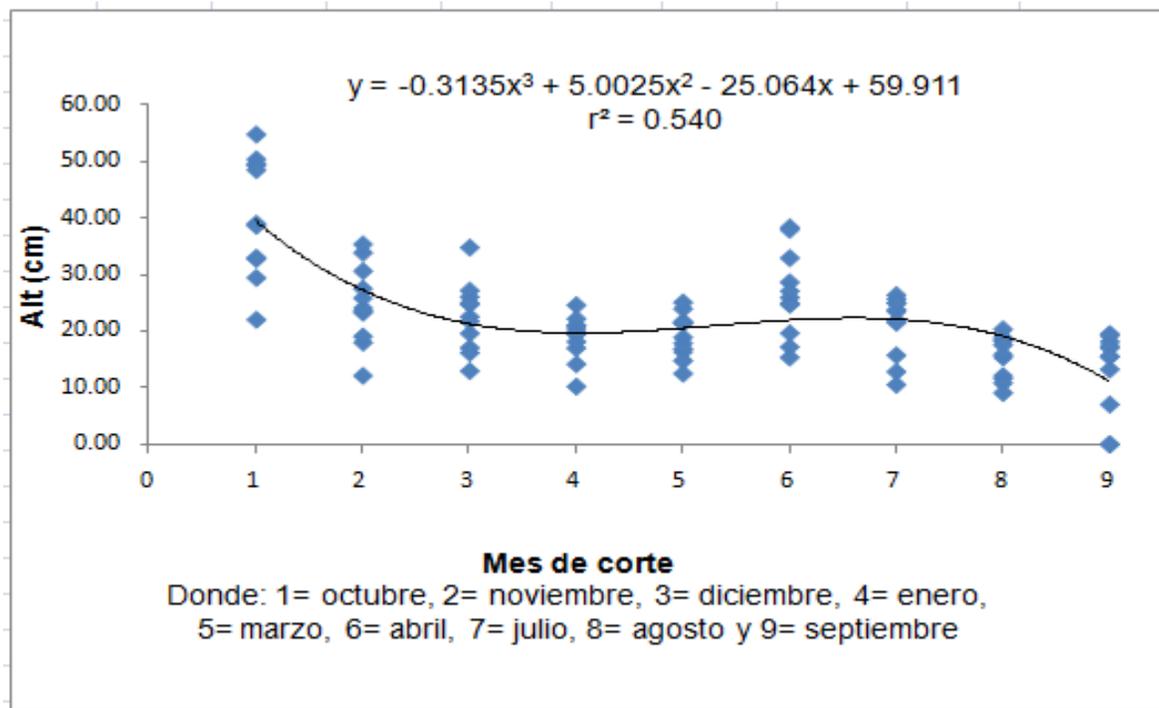
### 3.6 Altura de la planta (Alt) y número de tallos por planta

Se pudo encontrar que a partir del primer corte ocurrió una reducción en la altura de la planta, lo cual puede estar asociado al descenso en la temperatura, lo que provoca que las plantas detengan su crecimiento, principalmente de octubre a diciembre, período que corresponde a los tres primeros cortes. A partir de enero y hasta julio, la altura de las plantas se estabilizó, lo cual puede estar relacionado a que durante ese periodo las condiciones ambientales (temperatura, precipitación, horas luz, etc.) fueron favorables. En julio la altura de las plantas nuevamente disminuye y *L. multiflorum* Ansy France fue el genotipo que presentó la mayor altura (Anexo 3, Cuadro 10).

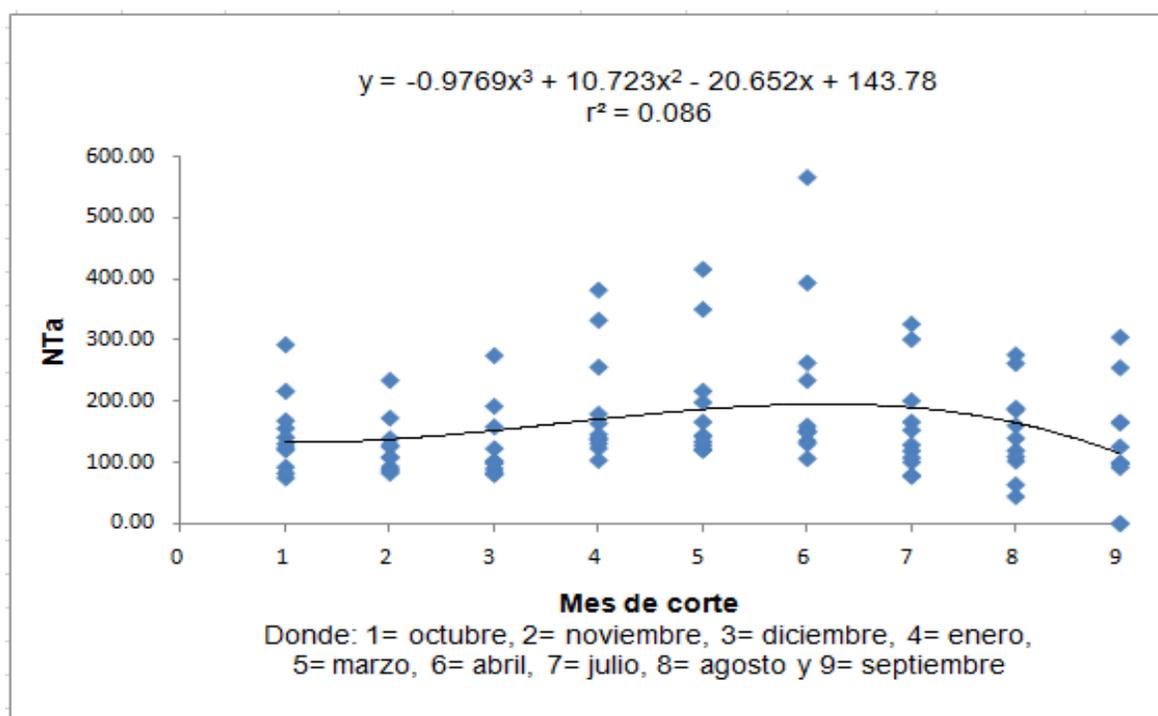
En lo que respecta al número de tallos, se encontró que conforme aumentó el número de cortes, los tallos aumentaron gradualmente. De octubre a abril, cortes uno a cinco, el aumento de tallos fue exponencial, aunque a partir de julio se observó una reducción drástica en el número de tallos, lo que puede atribuirse a la edad de la planta, a características propias del genotipo y al ambiente. El mayor número de tallos lo presentó la accesión *L. perenne* USA Manhattan (2n) (Anexo 3, Cuadro 11), similar a lo encontrado por Maldonado (2008) y Ortiz (2008). El incremento en el número de tallos

puede estar relacionado con las características genéticas de cada especie, pues la diferenciación de las yemas formadoras de tallos está condicionada principalmente por dichos caracteres, el ambiente también forma parte importante en la formación de tallos, ya que si se alcanzan condiciones óptimas en temperatura, intensidad luminosa y precipitación; el proceso de fotosíntesis se vuelve más eficiente, aumentando en la planta la posibilidad de asimilar carbohidratos, para el mantenimiento y reserva.

Los genotipos Netherland Barenza y USA Manhattan, ambos diploides y pertenecientes a *L. perenne*; presentaron un mayor número de tallos con respecto a Canada Uri (4n) que es tetraploide (Anexo 3, Cuadro 11). Dicho resultado coincide con el presentado por Olson (2006), quien menciona que los genotipos diploides tienen mayor densidad de tallos, comparado con los tetraploides.



**Figura 10. Altura de las plantas (Alt)**



**Figura 11. Número de tallos (NTa)**

### 3.7 Interpretación del análisis de varianza

En el análisis estadístico las variables altura, número de tallos, peso fresco por planta, peso seco por planta, peso seco de tallo por planta, relación hoja: tallo, peso seco de la hoja por planta, peso seco de tallo por planta y el porcentaje de hoja; mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre especies, entre cortes, entre genotipos y en la interacción corte por genotipo.

El peso seco de material muerto presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre cortes y entre la interacción corte por genotipo. La variación en el peso seco de material muerto también puede estar asociada a factores ambientales que influyen de forma directa en la sobrevivencia de la planta y que determinan su persistencia.

Para el porcentaje de tallo hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre especie, entre cortes, entre genotipos, entre la interacción corte por especie e interacción corte por genotipo.

Por último, existieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre cortes y entre la interacción corte por genotipo para la variable porcentaje de material muerto. Para esta

variable las diferencias encontradas pueden relacionarse a la infestación por roya, ya que se presentó en meses en que las condiciones ambientales fueron favorables para la enfermedad, con diversa intensidad en la infestación y daño foliar de acuerdo a la accesión.

**Cuadro 5. Análisis de varianza**

Efectos	Pr > F										
	PH	PT	PMM	RHT	PSP	PST	PSHP	PSTP	PSMMP	Alt	Nta
Repetición	0.673	0.2454	0.492	0.249	<.0001	0.0018	0.0005	<.0001	0.7184	<.0001	0.1482
Especie	<.0001	<.0001	0.759	<.0001	0.0002	<.0001	0.0003	<.0001	0.1593	<.0001	<.0001
Variedad(Especie)	<.0001	<.0001	0.076	0.002	0.0009	0.0003	<.0001	0.0013	0.9046	<.0001	<.0001
Corte	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Corte*Especie	0.04	0.0207	0.34	0.005	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Corte*Varied(Especie)	0.00	0.0015	0.004	0.016	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0294	<.0001	0.0074
Residual	87.41	69.12	27.75	1.34	21.08	1602.3	9.0012	5.9169	0.3813	6.98	1432.63
Desviación estandar del residu	9.35	8.31	5.27	1.16	4.59	40.03	3.00	2.43	0.62	2.64	37.85
Error estandar del residual	8.65	6.8368	2.736	0.127	1.875	151.14	0.9136	0.6022	0.0386	0.66	135.33

Donde: PH= Porcentaje de hoja, PT= Porcentaje de tallo, PMM= Porcentaje de material muerto, RHT= Relación hoja:tallo, PST= Peso seco de la planta, PST= Peso seco de tallo, PSHP= Peso seco de hoja por planta, PSTP= Peso seco de tallo por planta, PSMMP= Peso seco del material muerto por planta, Alt= Altura y NTA= Número de tallos.

#### 4. Conclusiones

El comportamiento que mostraron los genotipos en la proporción de cada componente durante los 11 cortes, estuvo influenciado por el número y fecha de corte, aunado al efecto ambiental.

El genotipo Ansy France (4n) de la especie *L. multiflorum*, fue el más sobresaliente para altura, peso fresco por planta, peso seco por planta, peso seco de tallo y peso seco de hoja por planta. *L. perenne* USA Manhattan II (2n) presentó el mayor número de tallos y Canada Uri (4n) de la misma especie en porcentaje de hoja y relación hoja:tallo. Estos genotipos pueden ser considerados como alternativa forrajera, no sólo de invierno, sino a lo largo del año, lo cual es de suma importancia, pues al utilizarlos se podría garantizar la disponibilidad de forraje durante todo el año.

El porcentaje de tallo y peso seco de tallo por planta más sobresaliente lo presentó el genotipo Australia Wimmera 62 de la especie *L. hybridum*; aunque su persistencia se redujo en los últimos cortes.

El genotipo USA Potomac correspondiente a la especie *D. glomerata*, fue el que sobresalió en porcentaje de material muerto y peso seco de material muerto por planta, lo que se asocia a la susceptibilidad que presenta a la roya, agudizándose la enfermedad a partir del mes de junio. Con base en lo anterior, se sugiere realizar una evaluación multilocalidad para determinar la estabilidad del comportamiento morfológico y rendimiento de las accesiones descritas en este estudio.

## **Estudio 2. Caracterización molecular de *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Lolium hybridum* y *Dactylis glomerata*.**

### **1. Introducción**

La diversidad genética es uno de los principales factores en la determinación del rendimiento y de la susceptibilidad de las especies cultivadas a presiones bióticas y abióticas (Brennan y Fox, 1998; citados por Almanza, 2000). Existe poca información sobre la estructura genética de los pastos y del grado en el cual los factores bióticos y abióticos afectan la presión de selección de los mismos; por tanto, conocer la relación existente entre éstos es necesario para desarrollar estrategias de selección eficaces que permitan explotar los recursos genéticos de las plantas en beneficio del hombre. Para este propósito, los marcadores moleculares son una herramienta eficaz para examinar la diversidad genética debido a su abundancia y la poca afectación que presentan por la interacción genotipo por ambiente (Jiayang, 2005).

Los marcadores moleculares que se han utilizado en el estudio de la estructura poblacional, en la detección de la variabilidad genética intra e interpoblacional, de factores ambientales sobre la diferenciación de poblaciones, en la diferenciación de especies y genotipos, en la construcción de mapas genéticos, en la evaluación somaclonal en plantas regeneradas de cultivo de tejidos, en el seguimiento de rasgos agronómicos de interés ((selección asistida por marcadores moleculares (SAMM)) y análisis de patrones hereditarios en gramíneas forrajeras son: isoenzimas, RFLPs, AFLPs, RAPDs, SSRs y SNP (Aguado-Santacruz *et al.*, 2004).

El porcentaje de investigaciones biotecnológicas en plantas forrajeras corresponde a 73 % en gramíneas (60 % en *Lolium* y 40 % en otros géneros) y 27 % en leguminosas (*Trifolium* 45.5 %, *Medicago* 33.3 % y *Lotus* 21.2 %) (Knudsen, 2000).

En ballico perenne se han utilizado marcadores moleculares (RFLPs, RAPDs, AFLPs, SSRs, entre otros) en la identificación asistida y en la cuantificación de la similitud entre cultivares. Los SSRs (Secuencias Simples Repetidas) han resultado ser los más convenientes en la determinación de la diversidad genética y en la identificación de cultivares; debido a las ventajas que presentan (Jiayang, 2005), pues son altamente

polimórficos, abundantes en el genoma, y fáciles de usar (Goldstein and Schloterer, 1999).

En gramíneas, los SSRs han sido utilizados en estudios para determinar el polimorfismo y la repetibilidad entre especies, para la construcción de mapas de ligamiento genético, caracterización y diversidad genética en diferentes especies (Cornide *et al.*, 2002), principalmente en el género *Lolium* y *Festuca*. Para determinar la diversidad genética que existe entre poblaciones de gramíneas forrajeras de zona templada y proponer un esquema de selección que permita inferir en el mejoramiento genético de éstas, el objetivo del presente estudio fue utilizar marcadores moleculares SSR para caracterizar poblaciones de *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. hybridum* y *D. glomerata*.

## **2. Materiales y métodos**

### 2.1 Material experimental

Se utilizaron 11 accesiones correspondientes a *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. hybridum* y *D. glomerata*, establecidos el 15 de julio de 2007 en el Campo Agrícola Experimental “Tabla San Juan” lote J-116 de la Universidad Autónoma Chapingo, como se describe en el cuadro 6.

**Cuadro 6. Descripción de accesiones empleadas de *Lolium multiflorum*, *L. perenne*, *L. hybridum* y *D. glomerata*.**

Número	Especie	Genotipo	Accesión
1	<i>Lolium multiflorum</i>	Ansyl France (4n)	619468
2	<i>Lolium multiflorum</i>	New Zealand (2n)	189390
3	<i>Lolium multiflorum</i>	Uruguay (2n)	211828
4	<i>Lolium perenne</i>	Netherland Barenza (2n)	237184
5	<i>Lolium perenne</i>	USA Manhattan II (2n)	600878
6	<i>Lolium perenne</i>	Canada Uri (4n)	403903
7	<i>Dactylis glomerata</i>	Canada Hércules (4n)	279808
8	<i>Dactylis glomerata</i>	USA Potomac (4n)	578553
9	<i>Dactylis glomerata</i>	USA Napier (4n)	578665
10	<i>Lolium hybridum</i>	Australia Wimmera 62 (4n)	476817
11	<i>Lolium hybridum</i>	France Itaque (4n)	599996

Todos las accesiones se establecieron en un DBCA con cuatro repeticiones, excepto para la accesión 11 con dos repeticiones.

Las accesiones se establecieron utilizando un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones (excepción de *L. hybridum* France Itaque, con dos repeticiones), considerando parcelas de 20 plantas por surco, y un total de 240 plantas por accesión en el experimento.

Se recolectaron en total 238 muestras de tejido foliar, provenientes de 119 surcos (ver descripción en Materiales y Métodos, Estudio 1), considerando dos plantas por surco y 24 individuos por accesión.

La recolección de las muestras se hizo en noviembre de 2007 y enero de 2008, considerando aquellas plantas con las mejores características; con hojas jóvenes, sin áreas necróticas o lesionadas, y los muestreos se realizaron por la mañana. Las hojas recolectadas se colocaron en sobres de papel previamente perforados, los cuales se pusieron dentro de una bolsa de plástico para evitar que se humedecieran. Las muestras fueron transportadas en una hielera al Centro de Biotecnología Aplicada del Centro Internacional del Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

## 2.2 Extracción de ADN, selección de iniciadores y condiciones de PCR

Las muestras se conservaron a -80 °C durante la noche (después de recolectar) y se liofilizaron a una temperatura inicial de -20 °C y final de 0 °C, utilizando una liofilizadora 6L (Labconco®). La molienda de las muestras liofilizadas se hizo en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Zootecnia, con un molino Miller Grinder® con malla de 1mm, y se utilizó aire a presión con una compresora para limpiar los residuos de material entre una muestra y la siguiente. El tejido molido se almacenó en frascos de plástico a -20 °C.

El ADN genómico se extrajo usando el método de CTAB modificado (Hoisington *et al.*, 1994). Se colocó entre 200- 250 mg de muestra liofilizada finamente molida en tubos eppendorf de 2 mL, diluida en 1 mL de solución CTAB al 2 % más 15 µL de beta-mercaptoetanol. Se agitó suavemente durante 90 min a 65 °C, dejando enfriar a temperatura ambiente (18 °C), después se agregó 1 mL de cloroformo/octanol (24:1) y se agitó por inversión durante 10 min. Luego se centrifugaron los tubos con la muestra por 10 min a 3500 revoluciones por minuto, se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo limpio. Al tubo se le agregó 1 mL de fenol/cloroformo (1:1) y se agitó por inversión por 10 min. Se centrifugaron por 10 minutos a 3500 revoluciones por minuto, se tomó el sobrenadante y colocó en un tubo limpio, al cual se le agregó 1 mL de Isopropanol frío (-20 °C), se agitó por inversión, con pipeta Pasteur se tomó el ADN y se transfirió a un tubo con 300 µL de H<sub>2</sub>O más 10 µL RNAsa (10 mgmL<sup>-1</sup>), y se incubó a 37 °C por 30 min. Luego se agregó 1 mL de Isopropanol frío (-20 °C), se agitó por inversión, se tomó el ADN con pipeta Pasteur y se transfirió a un tubo con 1 mL de ETOH a 75 %, se dejó por 5 min, se transfirió a un tubo con 1 mL de ETOH 70 % y se dejó reposar 5 min. Finalmente se transfirió la hebra de ADN a un tubo con 200 µL de TE pH 8 y se dejó resuspender toda la noche a temperatura ambiente (18 °C), para almacenarla a -20 °C. De un total de 37 iniciadores de SSR: 19 de maíz, 7 de *Lolium* y 11 *Festuca pratensis*, se seleccionaron 13 iniciadores SSR, con base en secuencias utilizadas en estudios del género *Lolium* (Cuadro 7), la repetibilidad en PCR, número de alelos amplificados, peso o tamaño esperado de las bandas (100-300 pb), polimorfismo y facilidad de lectura de bandas amplificadas.

**Cuadro 7. Características de los iniciadores seleccionados para la caracterización del material genético experimental.**

Iniciador	Secuencia del iniciador 5'-3' de inicio (F), de reversa (R)	Polimorfismo	T alineación (°C)	Peso esperado (pb)***	No. alelos
*LPSSRH01A10	F GAGGCACGGCCATGGAG R AGGACGAGCCACTCACTTG	SI	48-65	152	4
*LPSSRH01E10	F CGCAGCTTAATTTAGTC R GCTTTGAGTATGTAAAGTT	SI	48-65	103	4
*LPSSRH01H06	F ATTGACTGGCTTCCGTGTT R CGCGATTGCAGATTCTTG	SI	48-65	150	4
*LPSSRK01A11	F CGGCCACCCCTTGATAGAG R TCGTCAAGGATCCGGAGA	SI	48-65	205	4
**NFFa002	F GCTCCAGCTTCTCCATCATC R ACCAAGTCGTCCTCAAGTCAGC	Nr****	62	213	Nr****
**NFFa009	F TCCAACCCTAGATCCACACC R GGTGAAGTCGTCGGTGATCT	Nr****	62	279	Nr****
**NFFa023	F AGTCGGTGGTGAAGCTGAAG R TACAAGTGGGGGCTGGTCA	Nr****	62	200	Nr****
**NFFa024	F TGCCCACGAGGTCTATCTTC R AGCTTCCCCTTCATTCCACT	Nr****	62	208	Nr****
**NFFa027	F CGAGGTCTCAATCCTCCATT R GACAGAGACGACGACGACAT	Nr****	62	164	Nr****
**NFFa030	F AGTCGGTGGTGAAGCTGAAG R ACAACTAGGGGGCTGGTCA	Nr****	62	200	Nr****
**NFFa034	F GCTGGGTGTAGGGCTGTAAA R CTCCTTTCCATCACCTCTGG	Nr****	62	215	Nr****
**NFFa059	F GTCGCCGGAGAAGAGAAGAG R AACGCTAGCCGTGATGACTT	Nr****	62	170	Nr****
**NFFa066	F CTCCTCCGTCCTCCATCT R CAACCTCCTCCACCATCTTG	Nr****	62	217	Nr****

Donde T alineación (°C)= temperatura de alineación, \*nombres y secuencias obtenidas de Jones *et al.* (2001). \*\*nombres y secuencias obtenidas de Warnke *et al.* (2004), (pb)\*\*\*= pares de bases. Nr\*\*\*\*= no reportado

La reacción de PCR se hizo en una campana de flujo laminar SterilGARD III Advance<sup>o</sup> ME 04073, voltaje 115, 60 Hz y 130 Amperes, proveniente de Estados Unidos. Para cada reacción se utilizaron 100 ng de ADN de cada muestra, 1U de Golden Taq Polimerasa con amortiguador 5x (Promega<sup>®</sup>), 200 µM de dNTPs, 3mM MgCl<sub>2</sub> y 200µM del iniciador (F+R), y el volumen total para cada reacción fue 25µL. La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research PTC-100<sup>®</sup> Peltier Thermal, proveniente de Estados Unidos, estableciendo las condiciones: desnaturalización a 95 °C por 10 min, 40 ciclos a 95 °C por 50 s, 50 s a una temperatura entre 58 °C a 64 °C (la temperatura óptima de alineación del par de iniciador respectivo), 72 °C por 90 s y el paso final de extensión 10 min a 72 °C (Warnker *et al.*, 2004). Los productos amplificados fueron separados mediante electroforesis en geles de una fase de poliacrilamida (acrilamida:

bisacrilamida 29:1) al 8 %. La electroforesis se realizó a 135 V durante 4 h y 30 min (tiempo en el que el frente del gel recorre 15 cm aproximadamente) utilizando una fuente de poder Power Pac Basic Bio- Rad y una cámara de electroforesis vertical CBS Scientific MGV13-66 para la separación de fragmentos amplificados. Para la electroforesis se utilizó el amortiguador Tris Glicina 1X. Para detectar las bandas, los gels se tiñeron con nitrato de plata durante 4 min, fueron fotografiados con un fotodocumentador BioDoc-It en luz blanca, y los fragmentos detectados en las imágenes se analizaron y cuantificaron por el peso molecular (pares de bases) con el software Doc-It-UVP. Se utilizaron marcadores de 100, 50 y 25 pb (Axygen) como estándares de peso molecular.

### 2.3 Organización de datos y análisis estadístico

El tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos con los pares de iniciadores SSR, fue calculado a partir de una curva estándar generada de los fragmentos de tamaño conocido de los marcadores de 100, 50 y 25 pb. Después de definir los pesos moleculares de los patrones de bandas generados con los diferentes iniciadores se construyó una matriz en la que se codificó presencia (1) o ausencia (0) de bandas de ADN. En esta matriz los fragmentos obtenidos con los diferentes iniciadores se agruparon de mayor a menor número de pares de bases. Este procedimiento se realizó para establecer el rango de peso molecular donde los alelos estuvieron para así evitar alelos con pesos muy altos o muy bajos. A partir de la base de datos generada, se obtuvo la diversidad genética.

El análisis de agrupamiento (análisis cluster) se efectuó con el método de ligamiento promedio UPGMA y los valores de similitud y distancia genética con estimadores genéticos insesgados de Nei (Nei, 1978); usando el software Análisis de Poblaciones Genéticas (PopGen 32) Versión 1.32. El UPGMA se encarga de medir la distancia mínima entre grupos, que consiste en obtener todas las distancias entre los individuos de cada grupo, es decir, es el promedio de todas las distancias entre los individuos de los grupos (Cervantes, 2007). Los estimadores genéticos insesgados de Nei, estiman la frecuencia de la presencia o ausencia de un alelo en una población, y se obtiene una

matriz de similitud o disimilitud, que indica la distancia genética intra e interpoblacional de los individuos.

### **3. Resultados y discusión**

Para obtener el número de iniciadores con los que se trabajó, se realizaron pruebas con 19 iniciadores de maíz, 7 de *Lolium* y 11 de *Festuca*. Los de maíz se descartaron pues en su mayoría resultaron monomórficos, 3 de *Lolium* no amplificaron y con los 2 de *Festuca* se obtuvieron bandas difusas. En total se probaron 38 iniciadores y se utilizaron 13 de ellos.

La razón por la que se usaron los iniciadores antes descritos, se debió principalmente, a que ya habían sido probados en los géneros *Lolium* y *Festuca*; ambos gramíneas forrajeras de zona templada (características que coinciden con las especies usadas en este estudio), obteniendo resultados favorables; pues fueron polimórficos, se identificaron cuatro alelos en cuatro iniciadores y el rango de pares de bases estuvo dentro de lo establecido (100-300 pb).

Las características de los iniciadores evaluados se presentan en el Cuadro 8.

**Cuadro 8. Características de los iniciadores evaluados**

Iniciador	Polimorfismo	Temperatura optima de alineación (°C)	Rango de pb**** de los alelos encontrados	Número de alelos
*LPSSRH01A10	SI	48.3	143-172	4
*LPSSRH01E10	SI	64.3	99-129	4
*LPSSRH01H06	SI	64.3	136-177	4
*LPSSRK01A11	SI	64.3	172-235	4
**NFFa002	SI	58.0	160-241	6
**NFFa009	SI	62.0	200-296	6
**NFFa023	SI	62.0	195-240	4
**NFFa024	SI	60.0	190-245	4
**NFFa027	SI	63.0	170-220	4
**NFFa030	SI	63.0	168-225	4
**NFFa034	SI	62.0	185-245	5
**NFFa059	SI	60.0	125-205	5
**NFFa066	SI	62.0	200-285	5
<b>Total de alelos identificados</b>				<b>59</b>

\*Fuente: Jones *et al.* (2001); \*\*Fuente: Warnke *et al.* (2004); \*\*\* pares de bases.

Los iniciadores evaluados fueron polimórficos, el tamaño de los fragmentos amplificados (bandas) y la temperatura optima de amplificación, fueron cercanos a los reportados por Jones *et al.* (2001) y Warnke *et al.* (2004).

Los cuatro alelos encontrados para los iniciadores LPSSRH01A10, LPSSRH01E10, LPSSRH01H06 y LPSSRK01A11, coinciden con el número de alelos reportados por Jones *et al.* (2001), lo que indica que estos SSR son repetibles y estables entre especies y laboratorios (Weber y May, 1989), lo cual puede estar asociado a que las especies utilizadas son cercanas con las empleadas por esos autores.

En los nueve iniciadores restantes, el número de alelos fluctuó de cuatro a seis. Kirigwi *et al.* (2008) reportan un número total de bandas por cada par de iniciador SSR genómico de 9.3 para *Festuca X Lolium*. El número de bandas encontradas en la presente investigación fue menor con respecto a Kirigwi *et al.* (2008), lo que puede estar relacionado a que los géneros utilizados fueron distintos y por ende, la naturaleza y cualidades de los cromosomas cambia. En el caso de *Festuca* y *Lolium*, sus

cromosomas presentan alta homología y al hibridarlos se obtiene un descendiente fértil (Zwierzykowski *et al.*, 1999), con características genéticas potencializadas.

Saha *et al.* (2004) encontraron que el número promedio de bandas por par de iniciador SSR fue 2.78 en *Festuca arundinacea* (festuca alta), 2.30 para *Lolium* (ballico perenne y anual), 1.88 para *Festuca pratensis* (festuca media), 2.71 para *Festuca arundinacea* var. *Glaucescens* (festuca tetraploide), 1.92 *Oryza sativa* (arroz) y 2.52 *Triticum aestivum* (trigo). Estos valores son menores a los reportados en el presente estudio, lo que puede atribuirse a la especie utilizada y a la especificidad del iniciador.

De acuerdo con Hoelzen y Green (1992) y Guevara-García *et al.* (1997), en los iniciadores que muestran mayor polimorfismo, de acuerdo al número de alelos que presentan, existe un mayor porcentaje de homología de sus secuencias con las del ADN blanco, en donde se inicia la polimerización; además la temperatura de alineación empleada favorece la estabilidad en el alineamiento de los iniciadores con el ADN. Lo anterior puede estar asociado a los iniciadores NFFa002 y NFFa009, pues fueron los que presentaron mayor polimorfismo evidenciado por el número de alelos identificados (6).

Con base en la matriz de similitud y disimilitud genética de valores insesgados de frecuencias alélicas de los iniciadores, se encontraron valores de similitud de 0.8512 (Ansyl France de *L. multiflorum*) a 0.9596 (Canada Uri 4n de *L. perenne*) y de disimilitud de 0.0412 a 0.1611 para los genotipos Canada Uri (4n) y Ansyl France (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Matriz de similitud y disimilitud genética de las accesiones experimentales.**

	<i>DgCH</i>	<i>DgUN</i>	<i>DgUP</i>	<i>LhAW</i>	<i>LhFI</i>	<i>LpCU(4n)</i>	<i>LpNB</i>	<i>LpUMII</i>	<i>LmAF</i>	<i>LmNZ</i>	<i>LmU</i>
<i>DgCH</i>	****	0.93	0.88	0.93	0.91	0.91	0.88	0.91	0.87	0.90	0.90
<i>DgUN</i>	0.077	****	0.93	0.93	0.90	0.90	0.88	0.88	0.86	0.88	0.89
<i>DgUP</i>	0.13	0.067	****	0.90	0.90	0.88	0.89	0.87	0.85	0.91	0.87
<i>LhAW</i>	0.07	0.070	0.11	****	0.94	0.95	0.92	0.92	0.92	0.92	0.94
<i>LhFI</i>	0.096	0.11	0.11	0.058	****	0.96	0.94	0.95	0.93	0.95	0.94
<i>LpCU(4n)</i>	0.095	0.11	0.13	0.052	0.04	****	0.92	0.94	0.93	0.94	0.95
<i>LpNB</i>	0.13	0.13	0.11	0.085	0.057	0.08	****	0.94	0.93	0.93	0.93
<i>LpUMII</i>	0.095	0.13	0.15	0.082	0.050	0.066	0.066	****	0.91	0.90	0.92
<i>LmAF</i>	0.15	0.15	0.16	0.082	0.071	0.075	0.076	0.095	****	0.91	0.95
<i>LmNZ</i>	0.11	0.13	0.094	0.084	0.05	0.070	0.070	0.105	0.10	****	0.94
<i>LmU</i>	0.10	0.12	0.14	0.066	0.060	0.0523	0.070	0.080	0.054	0.065	****

\*\*\*\*

Valores por arriba de la diagonal indican similitud genética y valores por debajo de ésta indican disimilitud genética (Nei, 1978).

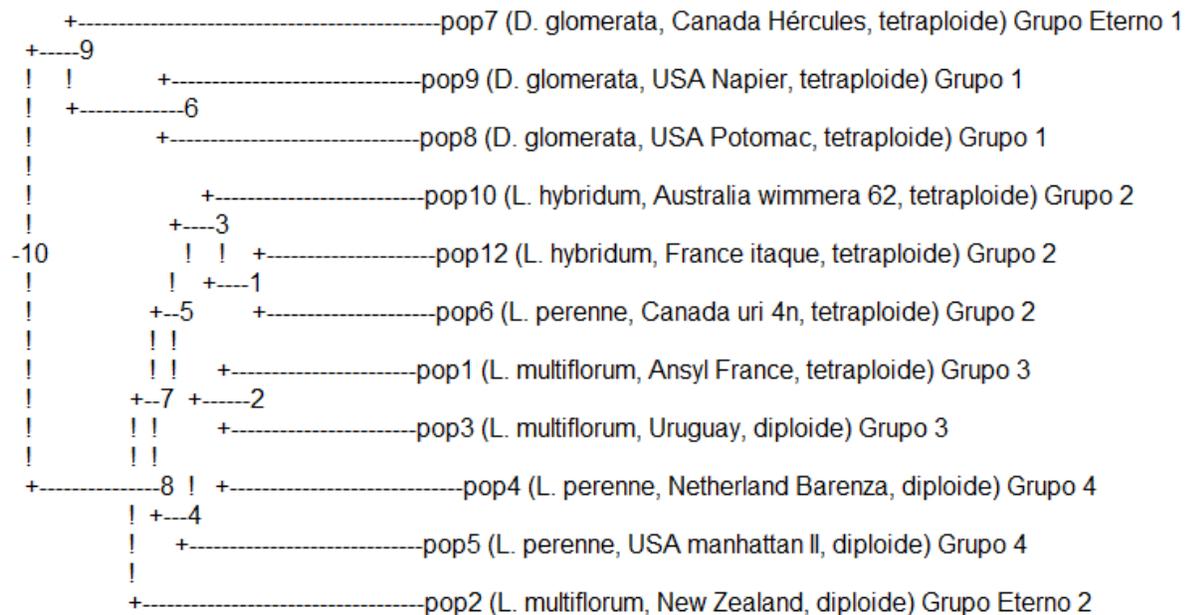
Los valores de distancia genética fueron de 0.0412 a 0.1611. En siete cultivares de *L. perenne* Kubik *et al.* (2001) reportan valores 0.111 a 0.409, mientras que la distancia genética entre nueve ecotipos Polacos de *L. perenne* varió de 0.31 a 0.51 y para las 53 accesiones, incluyendo a los nueve ecotipos fue de 0.25 a 0.67 (Bolaric *et al.*, 2005); además, Ghariani *et al.* (2003) señalan valores de 0.28 a 0.78 en 18 accesiones de *L. perenne*. El rango de distancia genética obtenida en el presente estudio fue menor, con respecto a los observados en los estudios mencionados. Las diferencias encontradas pueden asociarse a que las accesiones o genotipos utilizados en cada estudio fueron distintos; también puede estar relacionado con las diferentes condiciones ambientales donde se desarrollaron los genotipos o accesiones.

El dendograma de los genotipos (Figura 1) indica la integración de dos grupos externos y cuatro grupos más. El grupo externo, 1 y 2, lo conformó el genotipo Canada Hércules (*D. glomerata*, población 7) y el genotipo New Zealand (*L. multiflorum*, población 2). El grupo uno lo formó USA Napier y USA Potomac (*D. glomerata*, población 9 y 8), lo que

indica similitud genética para ambos genotipos y pudiera asociarse al origen ecogeográfico y de pedigrí, en comparación con Canada Hércules que proviene de Canadá, originada del cultivar Manchurian por selección masal, progenitor completamente distinto de USA Potomac y USA Napier (Casler, 1991). El grupo dos quedó constituido por Australia Wimmera 62, France Itaque (*L. hybridum*, población 10 y 12) y Canada Uri (4n) (*L. perenne*, población 6); todos los integrantes de este grupo son tetraploides. El grupo tres lo integró Ansyf France y Uruguay (*L. multiflorum*, población 1 y 3). El grupo cuatro lo constituyó Netherland Barenza y USA Manhattan II, correspondientes a la especie *L. perenne* (población 4 y 5).

Los agrupamientos formados en el dendograma (Figura 1) sugieren que los marcadores moleculares SSR utilizados en el presente estudio permiten hacer una separación entre especies, géneros y nivel de ploidía.

**Figura 12. Dendograma de 11 genotipos, correspondientes a *D. glomerata*, *L. hybridum*, *L. perenne* y *L. multiflorum*.**



pop = número de población (especie, genotipo, ploidía) grupo al que pertenece cada población.

Al igual que en el presente estudio, Kolliker *et al.* (1999) diferenciaron entre especies de *Festuca pratensis*, *Lolium perenne* y *Dactylis glomerata*, al utilizar RAPDs como marcadores. Además, Saha *et al.* (2004) indican que el uso de los SSR les permitió

diferenciar 11 genotipos de acuerdo a especie y ploidía, lo que coincide con la presente investigación.

Además, Kubik *et al.* (2001) señalan la integración de tres grupos con respecto a similitud o distancia genética en siete cultivares de *L. perenne*, de acuerdo con la relación cercana (similitud genética) que presentaron los cultivares: el primer grupo lo integró Pennfine y Linn, el segundo Affinity y Palmer III y el tercero Loretta y Manhattan II. El cultivar Jet, se agrupó por separado, debido a que su colocación en el dendograma, no estuvo fuertemente relacionada con el resto de los grupos.

Ghariani *et al.* (2003) usaron marcadores ISSR en 18 accesiones de *L. perenne*, y encontraron la conformación de tres grupos: el primero y segundo quedó formado por cinco accesiones cada uno y el tercero por ocho; la diferencia en el número de accesiones en cada grupo puede estar asociado a que las variables agroecológicas presentes en los sitios de recolección fueron distintas. De acuerdo con Bolaric *et al.* (2005), en nueve ecotipos de *L. perenne*, únicamente uno (el PN3) fue el más distante, agrupándose por separado de las demás poblaciones. Las diferencias encontradas en la formación de los grupos está determinada por diversos factores, destacando las condiciones agroecológicas en las que se desarrollaron, puesto que en la mayoría de los estudios los cultivares, genotipos o accesiones fueron recolectadas en diferentes zonas dentro de un país o región, ya que el objetivo en las investigaciones fue determinar la distancia genética entre los individuos involucrados.

Las similitudes o diferencias en los resultados obtenidos en la presente investigación, con respecto a otras, pueden estar relacionados a que la variabilidad genética dentro de cultivares depende considerablemente de las especies y genotipos seleccionados (Kolliker *et al.*, 1999), ya que genotipo locales, se adaptan mejor a las condiciones ambientales, con respecto a los que provienen de otras regiones, debido a que crecieron y se desarrollaron bajo esas condiciones (Lesica and Allendorf, 1999).

Mediante la estimación de la distancia genética es posible determinar la diversidad genética que existe entre individuos dentro y fuera de las poblaciones, por lo que es posible aplicar programas de mejoramiento, aplicando estrategias de selección asistida por marcadores moleculares.

#### **4. Conclusiones**

Los marcadores moleculares de secuencias simples repetidas (SSRs) mostraron su eficacia al separar y diferenciar claramente a los genotipos de acuerdo al género y al nivel de ploidía.

La valores similitud y distancia genética encontrados indican que existe una amplia diversidad genética entre los 11 genotipos analizados.

Los SSRs pueden ser potencialmente útiles en la selección de genotipos o individuos contrastantes en cada especie.

Los genotipos correspondientes a las especies de *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. hybridum* y *D. glomerata*, representan un recurso genético valioso que puede ayudar a incrementar la variación genética en gramíneas forrajeras de Valles Altos Centrales de México.

Estudios adicionales de diversidad genética en genotipos que presenten una relación cercana a las especies de *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. hybridum* y *D. glomerata* serían de mucha utilidad ya que permitirían establecer sistemas de selección asistida con marcadores para establecer programas integrados de mejoramiento genético en gramíneas forrajeras de zonas templadas; así como el uso de marcadores neutrales SSR podrían ser útiles en el mapeo asociativo de caracteres morfológicos.

### **Estudio 3. Relación entre marcadores moleculares y caracteres fenotípicos.**

#### **1. Introducción**

La diversidad genética ha desempeñado una función importante en el mejoramiento de plantas, y se ha utilizado en la elección y uso del germoplasma, huella genética y en la selección de genotipos (FAO, 1998 y Engles *et al.*, 2002). Existen diversos métodos para estimar la diversidad genética y el más recurrente es el de rasgos morfológicos ya que proporciona una forma simple de cuantificar la variación genética, aunque la mayor limitante de ese método es que los rasgos morfológicos son modificados por el ambiente y pueden estar controlados por genes con efecto epistático o pleiotrópico (Van Beuninge y Busch, 1997b). Se ha estudiado la utilidad que representa el uso de algunos métodos para determinar la diversidad genética en especies forrajeras (caracterización fenotípica, bioquímica y molecular), pues con base en ellos se ha logrado separar una especie de otra (Warpeha *et al.*, 1998b), identificar poblaciones naturales (Xu *et al.*, 1992), variedades registradas (Huff *et al.*, 1997) y accesiones muy cercanas (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000b).

La relación entre marcadores y distancias fenotípicas puede tener varias aplicaciones prácticas, entre las que destacan: 1) el fenotipo de una línea dada puede predecir una alta similitud en el nivel del marcador, con una línea que fue caracterizada fenotípicamente; 2) entre un grupo de líneas con fenotipos similares. El análisis del marcador permite la identificación de las líneas que probablemente comparten alelos similares en los QTLs, lo que es importante en la identificación de variedades existentes o en creación de nuevas variedades; de esta forma se garantiza la protección de los derechos de autor, así como la conservación de los recursos genéticos (Burstin y Alain, 1997).

Estimar la conformidad genética entre variedades de pasto ballico puede basarse en características fenotípicas similares o empleando la aplicación de técnicas bioquímicas o moleculares (Gilliland *et al.*, 2000). Se han realizado investigaciones para identificar variedades de ballico, empleando diferentes técnicas como: el uso de datos morfológicos (Camlin y Mc Michael, 1990; Loos, 1993; Gilliland *et al.*, 2000), variación

de la proteína (Ostergaard *et al.*, 1985; Moller y Spoor, 1993; Charmet y Bulfourier, 1994) y marcadores moleculares (Warpeha *et al.*, 1998; Roldan-Ruiz *et al.*, 2000a), mismas que han demostrado ser de gran utilidad, al identificar y separar una variedad de otra.

Aunque existen diversas técnicas para determinar la diversidad genética (datos de rasgos morfológicos, marcadores bioquímicos, marcadores moleculares de ADN, etc.), en pocos estudios se ha examinado la relación entre caracteres morfológicos con los marcadores moleculares en gramíneas forrajeras y los que se han realizado se basan en el uso de diagramas, correlaciones, gráficos de coordenadas y componentes principales, regresión de componentes principales o de mínimos cuadrados parciales. La regresión por mínimos cuadrados parciales (MCP) es un método de análisis estadístico que permite estudiar la relación entre marcadores moleculares y caracteres agronómicos de interés. El MCP se ha utilizado en el análisis de este tipo de datos porque aísla la multicolinealidad en las variables predictoras (Vargas, 1999).

La metodología MCP generaliza y combina características del análisis de componentes principales y análisis de regresión múltiple. A diferencia de los componentes principales, en el MCP los datos de entrada además de la matriz de predictores X, debe contener una matriz de respuesta Y (Vargas, 1999). El número de componentes o factores MCP que se requieren para estimar un modelo de regresión, se elige por el criterio de minimización de la suma de cuadrados de residuales (Vargas, 1999). La regresión MCP ha sido utilizada en agronomía para interpretar la interacción genotipo por ambiente (Vargas *et al.*, 1998), y en biotecnología para la identificación de QTLs (Crossa, *et al.*, 1999).

Existe poca información que establezca la relación entre marcadores moleculares y características agronómicas de especies forrajeras. Por tanto, el objetivo de este estudio fue establecer dicha relación, utilizando la información generada de los componentes morfológicos de *L. perenne*, *L. multiflorum*, *L. hybridum* y *D. glomerata* evaluados en campo, con los alelos identificados a partir de los marcadores moleculares de secuencias simples repetidas, mediante regresión por mínimos cuadrados parciales.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Caracterización de componentes morfológicos.

Se utilizaron 11 genotipos, tres de *L. perenne*, tres de *L. multiflorum*, dos de *L. hybridum* y tres de *D. glomerata*; provenientes del Banco de Germoplasma de la Red de Información de Recursos de Germoplasma del Departamento de Agricultura – Servicio de Investigación Agrícola (GRIN-USDA-ARS), en Beltsville, Maryland, Estados Unidos. Los genotipos evaluados provenían de accesiones diploides y tetraploides (Estudio 1, Cuadro 2). Todos los genotipos se establecieron en el Campo Agrícola Experimental “Cuadro San Juan” lote J-116 de la Universidad Autónoma Chapingo, de julio de 2007 a septiembre de 2008, en un diseño completamente al azar en bloques (excepto el genotipo 11, France Itaque, ya que únicamente se utilizó en dos repeticiones, en las parcelas 31 y 40, para completar la falta de plántulas al trasplante de los genotipos USA Manhattan II y USA Potomac, en las repeticiones 3 y 4), considerando cuatro repeticiones y medidas repetidas a través del tiempo, 11 cortes.

El procedimiento para estimar las variables en cada corte fue similar. En el caso de altura y número de tallos a partir del corte 1 se eligieron al azar cinco plantas por surco, 15 por parcela (3 surcos= 1 parcela, que se consideró como unidad experimental) y por ende en cada corte se midieron las mismas plantas. Para calcular los porcentajes de hoja, tallo y material muerto, se mezclaba lo más homogéneo posible el forraje cosechado en una parcela, se tomaba una muestra, para separar por 5 min los componentes y después pesarlos. La relación hoja: tallo se obtuvo al dividir el porcentaje de hoja entre porcentaje de tallo. La obtención del peso seco total por planta, hoja, tallo y material muerto se obtuvo en base seca a una temperatura de 60 °C y hasta peso constante.

Los rasgos de componentes morfológicos utilizados para estimar la relación carácter fenotípico-marcador molecular fueron: porcentaje de hoja (PH), porcentaje de tallo (PT), porcentaje material muerto (PMM), relación hoja: tallo (RHT), peso seco por planta (PSP), peso seco de tallo por planta (PSTP), peso seco de la hoja por planta (PSHP), peso seco de tallo por planta (PSTP), peso seco del material muerto por planta

(PSMMP), altura de las plantas (Alt) y número de tallos (NTa). Estas variables fueron medidas en 11 momentos distintos del ciclo de crecimiento.

## 2.2 Caracterización molecular de los genotipos

En noviembre de 2007 y enero de 2008, se recolectaron 238 muestras en total de tejido foliar, dos plantas por surco, de un total de 119 surcos. Las muestras provenían de los genotipos establecidos en el Campo Agrícola Experimental, Cuadro San Juan de la Universidad Autónoma Chapingo de julio de 2007 a septiembre de 2008. El tejido foliar recolectado se liofilizó, se molió y se almacenó a -20 °C hasta el momento de la extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó por el método de CTAB modificado (Hoisington *et al.*, 1994), el cual se caracteriza porque al emplear determinados reactivos, tales como: CTAB, cloroformo/octanol, fenol/cloroformo, isopropanol, ETOH al 75 % y la enzima RNAasa, se obtiene ADN. El ADN se conservó en tubos de 1 mL hasta su análisis. En la caracterización molecular se usaron 13 iniciadores de secuencias simples repetidas (SSRs) con los que se detectaron 59 alelos, los cuales fueron utilizados en este estudio para relación carácter-marcador.

## 2.3 Análisis estadístico

La relación entre marcadores moleculares de SSR y componentes morfológicos, se estudió mediante regresión por mínimos cuadrados parciales siguiendo la metodología presentada por Vargas (1999).

Los resultados de la descomposición bilineal obtenida de MCP se resumió en forma gráfica (biplots), donde los Y- casos de los caracteres fenotípicos y las X- unidades de los alelos se representan por vectores en un espacio con puntos de inicio en el origen (0,0) y puntos finales determinados por los valores de los casos o unidades (Vargas, 1999).

Los biplots son dispositivos gráficos que representan simultáneamente objetos (genotipos) y variables (caracteres fenotípicos, frecuencias de bandas o frecuencias alélicas de los marcadores moleculares), sirven para identificar las principales características en el genotipo por la matriz de datos de la variable: distancias entre

variedades, correlaciones entre variables y valores de las variedades en las variables (Gower y Hand, 1996).

Los valores de las X unidades (alelos) y los Y casos (caracteres fenotípicos), fueron calculados para cada estación del año. En los Y-Scores se presentan los porcentajes de los factores 1 al 5: destacando el 1 y 2 que fueron los utilizados para la elaboración de cada biplot. Esta información está disponible en el Anexo 4.

Los datos se analizaron con el procedimiento de regresión por mínimos cuadrados parciales (PROC PLS) del programa SAS para Windows, versión 9.1 (SAS, 2000).

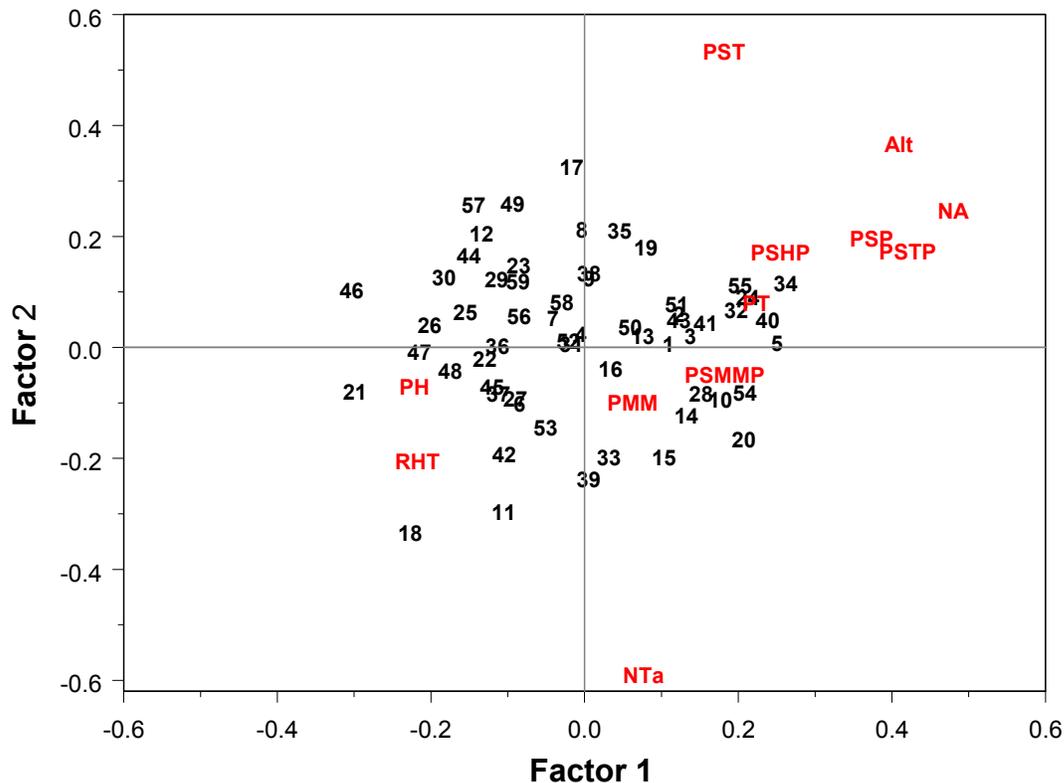
### **3. Resultados y discusión**

En los biplots los números del 1-59 indican el alelo y las letras el carácter fenotípico. Se realizó un biplot por cada estación del año, para identificar la relación entre marcadores moleculares SSR y caracteres fenotípicos, con el propósito de detectar la variación genética y con base en ella establecer programas de mejoramiento genético, utilizando la selección asistida con marcadores. Se observó que la relación entre marcadores moleculares (alelos) con los caracteres fenotípicos, varió de acuerdo a la estación del año.

La Figura 13 corresponde al biplot que relaciona a los marcadores moleculares con los caracteres fenotípicos durante el otoño. Se encontró que el PH está relacionado con los alelos 21 y 48 que corresponden a los marcadores moleculares NFFa002 y NFFa034. El PT se relacionó con los alelos 5, 24, 32, 34, 40 y 55, correspondientes a los marcadores LPSSRH01E10, NFFa009, NFFa023, NFFa024, NFFa027 y NFFa066. Los marcadores LPSSRH01H06, NFFa002 y NFFa030, representados por los alelos 11, 18 y 42, se relacionaron con el carácter RHT. El PSMMP estuvo relacionado con los siguientes alelos: 10, 14, 28 y 54; los cuales pertenecen a los marcadores LPSSRH01H06, LPSSRK01A11, NFFa009 y NFFa059. Los factores 1 y 2 explican 13.37 % de la relación marcador-carácter. Los factores 1 y 2 son el resultado de la descomposición bilineal obtenida de MCP, en donde los Y-casos (11 variables de componentes morfológicos, que corresponden a los caracteres fenotípicos) y las X-unidades (59 alelos que corresponden a 13 marcadores moleculares) se representan

por vectores en un espacio con puntos de inicio en el origen (0,0) y puntos finales determinados por los valores de los casos (caracteres fenotípicos) o unidades (alelos o marcadores) (Vargas, 1999).

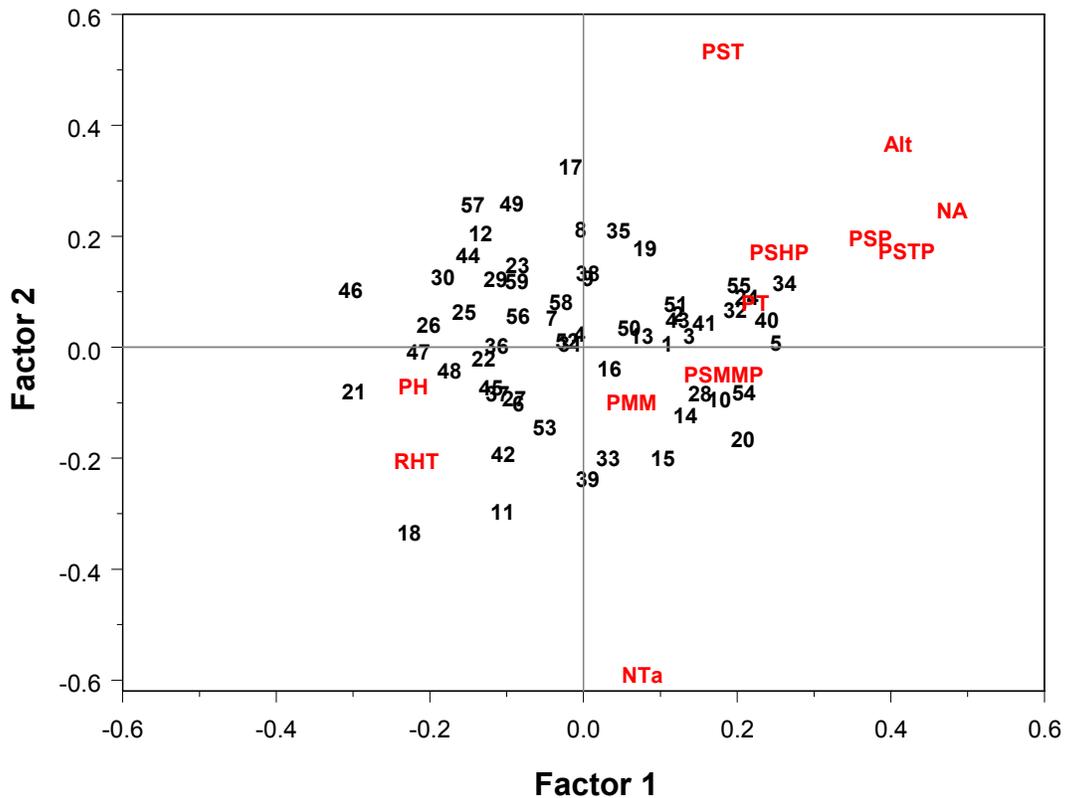
**Figura 13. Biplot de MCP enriquecido con 59 alelos y 11 variables fenotípicas, en la estación de otoño.**



En el biplot de la estación de invierno (Figura 14) se encontró que el PH estuvo relacionado con el alelo 54, correspondiente al marcador NFFa059. El PT se asoció al alelo 2, atribuible al marcador LPSSRH01A10. Los marcadores NFFa002, NFFa009, NFFa024 y NFFa059, representados por los alelos 21, 27, 33 y 53, estuvieron asociados con el PMM. Los alelos 15 y 54; de los marcadores LPSSRK01A11 y NFFa059, se vincularon con la RHT. El carácter PSTP se relacionó con los alelos 8 y 35, pertenecientes a los marcadores LPSSRH01E10 y NFFa024. El porcentaje de

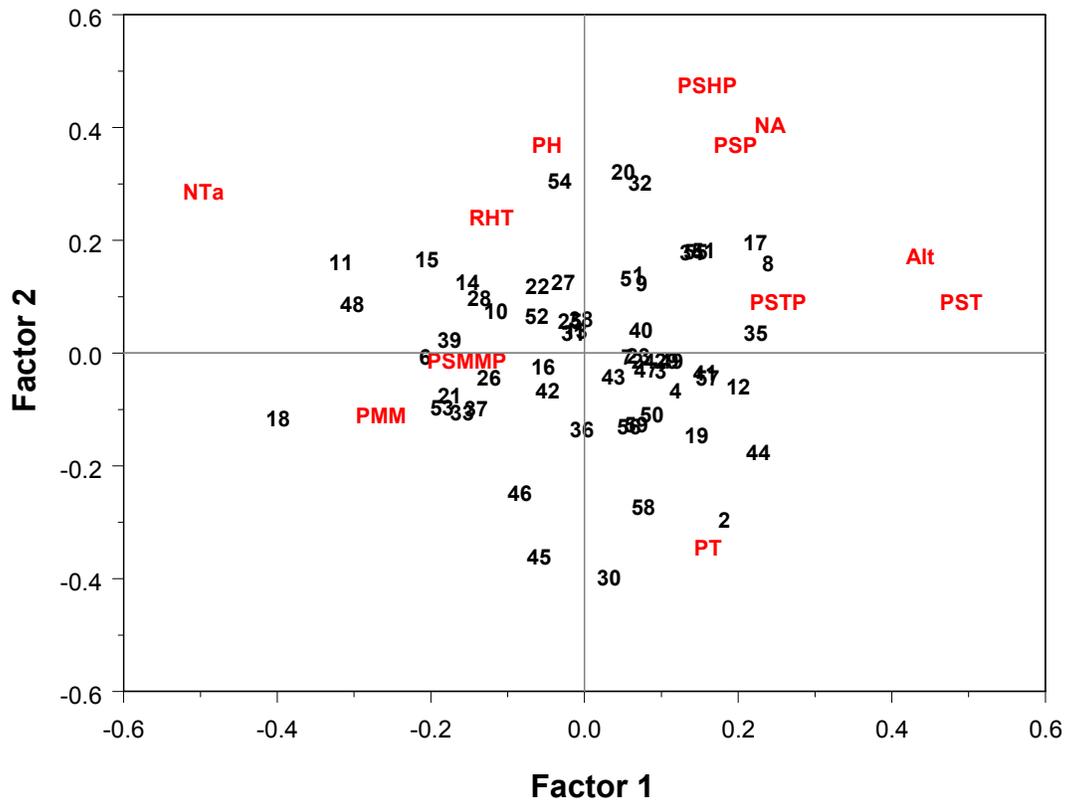
relación entre el marcador con el carácter fenotípico fue de 13.4532, con base en los factores 1 y 2.

**Figura 14. Biplot de MCP enriquecido con 59 alelos y 11 variables fenotípicas, en la estación de invierno.**



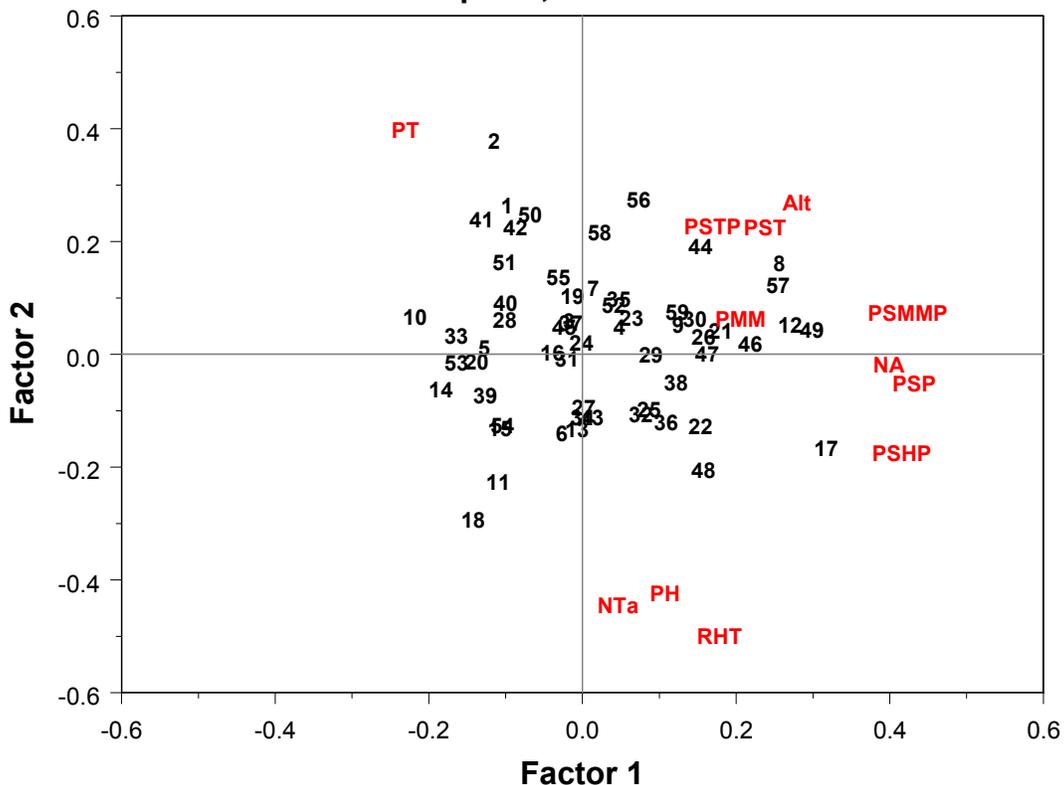
La relación entre marcadores y caracteres durante la primavera, se muestran en la Figura 15. Se encontró que el PSHP estuvo asociado con el alelo 17 del marcador NFFa002. El alelo 56 correspondiente al marcador NFFa066, se relacionó al carácter fenotípico PSMMP. El porcentaje de relación marcador- carácter, basado en los factores 1 y 2, fue 12.252.

**Figura 15. Biplot de MCP enriquecido con 59 alelos y 11 variables fenotípicas, en la estación de primavera.**



La Figura 16 hace referencia al biplot que relaciona a los marcadores moleculares con los caracteres fenotípicos de verano. El porcentaje de relación marcador molecular-carácter fenotípico, de acuerdo con los factores 1 y 2, fue 14.3 %. El marcador LPSSRH01A10, representado por el alelo 2, se relacionó con el carácter PT. Los alelos 12, 21, 26, 30, 46 y 59 correspondientes a los marcadores LPSSRH01H06, LPSSRH01A10, NFFa002, NFFa009, NFFa023, NFFa034 y NFFa066, se asociaron con PMM. El PST presentó relación con los alelos 8 y 57, pertenecientes a los marcadores LPSSRH01E10 y NFFa066. El carácter PSHP, se asoció al alelo 17 del marcador NFFa002. El alelo 44, del marcador NFFa030 se relacionó con el PSTP.

**Figura 16. Biplot de MCP enriquecido con 59 alelos y 11 variables fenotípicas, en la estación de verano.**



Los marcadores moleculares con las siglas LPSSR, en el caso particular del LPSSRH01H06, fue utilizado en el desarrollo y caracterización de marcadores de SSR para *Lolium perenne*, los resultados obtenidos en ese estudio indicaron que detecto tres alelos en el subgrupo p150/112, progenie F1. En el análisis de secuencias de ADN de individuos clonados, los productos de amplificación confirmaron de la presencia de SSRs repetidos, en todas las especies probadas para el locus LPSSRH01H06, aunque SSRs interrumpidos fueron detectados en todos los taxas apartados de *L. perenne* y *L. multiflorum*, un alto grado de secuencias de conservación fue detectado en la región 3' flanqueada, aunque diferentes nucleótidos simples y varios pares de polimorfismo de

inserción/delección fueron distinguidos para cada especie (Jones *et al.*, 2001). En el presente estudio el marcador-locus LPSSRH01H06 se asoció con los caracteres RHT en otoño y PMM en verano, lo que sugiere que este marcador puede estar ligado a estos rasgos y pueden estar expresándose de manera positiva o negativa debido a la interacción genotipo x ambiente. En el caso de RHT, la relación marcador-carácter es negativa, lo que puede atribuirse a que en esta estación del año se da una reducción en la temperatura. Con respecto al PMM, la relación marcador-carácter es positiva, lo que puede estar relacionado a la madurez de la planta, es decir, pueden estar involucrados genes de senescencia que cuando existe condiciones ambientales favorables (temperatura, humedad, edad de la planta).

El porcentaje acumulado del factor 1 y 2 en los biplots presentó un rango de 12.25-14.32 % (una  $r^2$  de 0.1225 a 0.1432) en la relación marcador molecular- carácter fenotípico, según la estación del año. Estos valores son menores a los reportados por Roldan- Ruiz *et al.* (2001), quienes indican una relación marcador-genotipo en variedades de *Lolium perenne* de 42.71 % utilizando AFLPs y 55.58 % con marcadores SSTs; dichos porcentajes son parecidos a los encontrados por Hufa *et al.* (2005), quienes observaron una relación marcador-carácter de 59 % en cultivares de trigo rojo duro de invierno. Además, Roldan- Ruiz *et al.* (2000) en un estudio para estimar la conformación genética en variedades de *Lolium* utilizando AFLPs, reporta que la variación total de los marcadores moleculares con los cultivares fue 51 %.

La diferencia encontrada en el porcentaje de la variación genética de la relación entre marcadores moleculares y caracteres fenotípicos en el presente estudio, fue menor con respecto a las otras investigaciones, lo que puede estar asociada al tipo y número de marcadores moleculares utilizados, al número de alelos identificados, a las combinaciones de marcadores implicadas (Roldan- Ruiz *et al.*, 2000b), al carácter fenotípico estimado, al número de plantas examinadas (Z- Q. Liu *et al.*, 1999) y de la interacción genotipo X ambiente (Vargas *et al.*, 1998, 1999).

Cuando se evalúan por varios años diferentes genotipos cultivados en la misma zona o en diferentes localidades, normalmente éstos responden de forma distinta a los cambios ambientales en el lugar donde se desarrollan, como por ejemplo aumento o

disminución en la temperatura, horas luz, precipitación, presión a plagas y enfermedades; en conjunto es lo que se conoce como interacción genotipo x ambiente. El estudio y conocimiento de las bases genotípicas de la adaptación de los genotipos a las diferentes condiciones ambientales donde se prueban, así como las causas ambientales, son importantes en la evaluación de la relación entre los valores fenotípicos y genotípicos, ya que permiten la selección de genotipos sobresalientes y estables (Vargas, 1999).

#### **4. Conclusiones**

El porcentaje de variación en la relación alelo- carácter fenotípico fue diferente de una estación a otra, lo que puede asociarse a la interacción genotipo-ambiente. Los porcentajes de variación son similares entre estaciones, con un rango de 10 y 20%.

Al seleccionar 13 marcadores distintos, se pueden discriminar bien los materiales, hay poca correlación entre marcadores y no se puede esperar que se explique mucha variación, lo que significa que los marcadores pueden estar ligados o no a los rasgos de interés. Es posible que haya marcadores que estén relacionados con genes que se expresan en distintos momentos del ciclo de la planta, por ejemplo marcadores asociados a producción de lignina, elongación, floración, etc. Hay que tener en cuenta que como se estudian todos los marcadores y características fenotípicas simultáneamente, los o las que se expresan más en determinado momento, pueden enmascarar otras que puedan ser menos importantes, aunque si se analizaran de forma individual podrían detectarse como importantes. Para la identificación y mapeo de segmentos genómicos específicos se podrían cultivar genotipos provenientes de las poblaciones genéticas disponibles: F<sub>2</sub>, retrocruzas, líneas recombinantes, probarlas en ambientes distintos y probando marcadores moleculares que repercutan en los QTLs.

Se encontraron pocos marcadores relacionados con algunas características fenotípicas, por lo que se considera necesario realizar más estudios que permitan caracterizar mejor las relaciones entre el genoma y el fenotipo, con base en la selección de las covariables de covariables más importantes que estén afectando la interacción genotipo x ambiente, utilizando MCP o regresiones factoriales individuales.

## 5. LITERATURA CITADA

- Aguado-Santacruz G. A., C.Q. Rascón, H.J.L. Pons, C.O. Grageda y M.E. García. 2004. Manejo biotecnológico de gramíneas forrajeras. *Téc. Pec Méx.* 42 (2): 261-276.
- Almanza P. M. I. 2000. Estudio comparativo de diversidad genética en trigos harineros de primavera ( *Triticum aestivum* L. em. Thell) utilizando coeficientes de parentesco y marcadores moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 86 p.
- Andrés, A. 2005. El mejoramiento genético de las especies forrajeras. INTA. 5 p.
- Arus, P. and J. Moreno-González. 1993. Marker- assisted selection. In *Plant Breeding: Principles and Prospects*. Hayward, M.D., N.O. Bosemark and I. Romagosa (Eds), Chapman and Hall, London. pp: 16-29.
- Bolaric S., S. Barth, A. E. Melchinger and U.K. Posselt. 2005. Molecular characterization of genetic diversity in European germplasm of perennial ryegrass. *Euphytica* 146: 36-44.
- Brummer, E. C. 1999. Capturing heterosis in forage crop cultivar development. *Crop Sci.* 39:943-954
- Burstin, J. and A. Charcosset. 1997. Relationship between phenotypic and marker distances: theoretical and experimental investigations. *Heredity* 79:477-483.
- Cachón, A. L. E., H. Nery G. y H. E. Cuanalo de la C. 1976. Los suelos del área de influencia de Chapingo. Colegio de Postgraduados. ENA. Chapingo, México. 79 p.
- Caetano-Anollés, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1997. DNA amplification fingerprinting using short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9:553-557.
- Camlin, M. S. y A.C. McMichael. 1990. Registration and testing of varieties future developments, Fodder crops breeding: achievements, novel strategies and biotechnology. *In: A.P.M. Denijs, A. Elgersma (eds)*. Pudoc Press, Wageningen, The Netherlands. pp: 101-109.

- Casler, M. 1991. Genetic variation and covariation in a population of tetraploid *Dactylis* L. accessions. *Theor Appl Genet.* 81:253-264.
- Casler, M. D., S.L. Fales, A.R. McElroy, M.H. Hall, L.D. Hoffman and K.T. Leath. 2000. Genetic progress from 40 years of orchardgrass breeding in North America measured under hay management. *Crop Science.* 40:1019-1025.
- Cervantes, M. C. 2007. Diplomado en biotecnología aplicada a la agricultura, modulo 7. Análisis estadístico de huellas genómicas. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. pp: 33-46
- Charmet, G. y F. Balfourier. 1994. Isozyme variation and species relationships in the genus *Lolium* L. (ryegrasses, Gramineaceae). *Theor Appl Genet.* 87: 641–649.
- Cornide, M. T. 2002. Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Ed. Félix Varela, La Habana, Cuba. 367 p.
- Costa, M. P., J. Battista y C. Seró. 2004. Verdeos de invierno – Raigrás Anual. INTA, Balcarce, Argentina. 8 p.
- Crossa, J., M. Vargas, F.A. van Eeuwijk, C. Jiang, G.O. Edmeades and D. Hoisington. 1999. Interpreting Genotype X Environment Interaction in tropical maize using linked molecular markers and environmental covariables. *Theor. Appl. Genet.* 96: 611-625.
- Demeke, T., B. Sasikumar, P. Hulc and R.N. Chibbar. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) in cereal improvement. *Maydica* 42:133-142.
- Do Valle, B. C. 2001. Genetic resources for tropical areas: achievements and perspectives. *In: ProC. XIX Int. Grassl. Congress. Braz. Soc. Anim. Husb. Sao Paulo. Sao Paulo- Brazil.* pp: 477-482.
- Dorantes, J. J. 1997. Evaluación de la inclusión de diferentes leguminosas en la asociación avena-ballico bajo pastoreo en invierno en Chapingo, México. Tesis profesional. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 73 p.
- Duthil, J. 1990. Producción de forraje. 5° edición, Ed Mundi-Prensa. Madrid, España. pp: 31-33.

- Edwards, K.J., J.H.A. Barker, A. Daly, C. Jones and A. Karp. 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques* 20:758-759.
- Engles, J. M. M., V.R. Rao, A.H.D. Brown and M.T. Jackson. 2002. *Managing Plant Genetic Diversity*. CABI Publishing, UK. 487 p.
- Evans, L.T. 1998. *Feeding Ten Billion: Plants and Population Growth*. Cambridge University Press Cambridge. UK. 264 p.
- FAO, 1998. *The States of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*, FAO. Rome, Italy. 510 p.
- Ferreira, M. y D. Grattapaglia. 1998. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. 1ª ed. Embrapa-Cenargen. Brasilia. 220 p.
- Forster, F., E. Jones, R. Kölliker, M. Drayton, J. Dumsday, M. Dupal, K. Guthridge, N. Mohoney, Van Zijll, E. Jong and K. Smith. 2001. Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. In: *Molecular breeding of forage crops*. Ed. Spangenberg. Kluwer Academic Publishers. pp: 101-133.
- Forster, J. W., E.S. Jones, J. Batley and K.F. Smith. 2004. Molecular marker-based genetic analysis of pasture and turf grasses. In: Hopkins, A., Z.Y. Wang, R. Mian, M. Sledge and R.E. Barker (eds). *Molecular breeding of forage and turf*. Kluwer Academic, Dordrecht. pp: 197–239.
- Forster, J. W., E.S. Jones, K.F. Smith, K.M. Guthridge, M.P. Dupal, S. Howlett, L.J. Hughes, S. Garvie and C. Preston. 2005. Molecular marker technology for the study of genetic variation and comparative genetics in pasture grasses. In: A.K. Sharma, A. Sharma (eds) *Phanerograms. Plant genome: biodiversity and evolution*, Vol 1 part B. Science Hereford. pp: 119–155.
- Galicia J.M. y D.Y.C. Prado. 2008. *Evaluación de rendimiento y componentes morfológicos de genotipos de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum* en Chapingo, Estado de México*. Tesis Profesional Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 70 p.

- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koopen (para adaptarlo a las condiciones de la república mexicana). 4<sup>a</sup> ed. México D.F. 217 p.
- García, J. 2004. Nuevo Cultivar de Ryegrass: LE 19-45<sup>a</sup>. Jornada de pasturas, serie de actividades de difusión No. 380. INIA, Uruguay. 30 p.
- Ghariani, S., N. Trifi-Farah, M. Chakroun, S. Marghali and M. Marrakchi. 2003. Genetic diversity in Tunisian perennial ryegrass revealed by ISSR markers. *Genetics Resources and Crop Evolution* 50:809-815.
- Gilliland, T. J., R. Coll R, E. Calsyn, M. De Loose, M.J.T. van Eijk and Roldán- Ruiz. 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 1. Morphology and biochemical characterization. *Molecular Breeding* 6:569-580.
- Goldstein, D., and C. Schlotterer. 1999. *Microsatellite: Evolution and Applications*. Oxford University Press Inc., Oxford, NY. pp: 25-37.
- Gower, J. C. and D.J. Hand. 1996. *Biplots. Monographs on Statistics and Applied Probability* 54. Chapman and Hall, London, UK. 277 p.
- Guevara- García, A., L. Herrera- Estrella, and G. Olmedo- Alvarez . 1997. Cloning from genomic DNA and production of libraries. In. M. S. Clark (Ed.) *Plant molecular biology-a laboratory manual*. Springer, New York. pp: 54-73
- Gupta, P.K. and R.K. Varshney. 2004. Cereal genomics: an overview In: Gupta, P.K. and R.K. Varshney (eds). *Cereal genomics*. Kluwer Academic Press, Dordrecht. The Netherlands. 639 p.
- Hammer, K. 2003. A paradigm shift in the discipline of plant genetic resources. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 43: 337-341.
- Hannaway, D., S. Fransen, J. Cropper, M. Teel, M. Chaney, T. Griggs, R. Halse, J. Hart, P. Cheeke, D. Hansen, R. Klinger and W. Lane. 1999 (a). *Perennial Ryegrass*. Oregon State University. Oregon U.S.A. PNW 503.
- Hannaway, D., S. Fransen, J. Cropper, M. Teel, M. Chaney, T. Griggs, R. Halse, J. Hart, P. Cheeke, D. Hansen, R. Klinger and W. Lane. 1999 (c). *Orchard Grass*. Oregon State University. Oregon U.S.A. PNW 502.
- Hayward, M.D., N.J. McAdam, J.G. Jones, C. Evans, G.M. Evans, J.W. Forster, A. Ustin, K.G. Hossain, B. Quader, M. Stammers and J.A.K. Will. 1994. Genetic

- markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. *Euphytica*. 77:269-275.
- Hayward, M.D, J.W. Forster, J.G. Jones, O. Dolstra, C. Eans, N.J. McAdam, K.G. Hossain, M. Stammers, J.A.K. Will, M.O. Humphreys and G.M. 1998. Genetics analysis of *Lolium*: Identification of linkage groups and the establishment of genetic map. *Plant Breed*. 117:451-455.
- Heath, E. M, R.F. Barnes and F. Metcalfe. 1985. Forages: The science of grassland agriculture. 4<sup>th</sup> Edition. Iowa State University Press. Ames, Iowa, U.S.A. pp: 136-145.
- Henning, J. and N. Risner. 1993. Orchardgrass. Department of Agronomy, University of Missouri-Columbia. Agricultural publication G04511.
- Hepp, K.C. and F.S. Ganderats. 2003, Mecanismos de crecimiento de *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* y *Dactylis glomerata* en la zona intermedia de Ansel. *Agricultura Técnica* ISSN 0365-2807. 63(3):259-265.
- Hernández-Garay. A., C. Matthew and J. Hodgson. 1997. Effect of spring grazing management on perennial ryegrass and ryegrass- white clover pastures. 2. Tiller and growing point densities and population dynamics. New Zealand. *J. Agric. Res.* 40:37-50.
- Hodgson, J. 1996. Control de consumo de hierba. *In*: Seminario internacional Teórico-Práctico: Tópicos selectos eb sistemas sustentables de producción animal bajo pastoreo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. pp: 41-54.
- Hoelzel, A. R. and A. Green. 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. *In*. A. R. Hoelzel (Ed.) *Molecular genetic analysis of populations a practical approach*. OIRL Press, Oxford. 159-186 pp.
- Hoisington, D. A. 1989. Working linkage maps. *Maize Genet. Coop. Newsletter* 63: 141-151.
- Hoisington, D., M. Khairallah and D. Gonzalez-de-León. 1994. *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Second Edition. Mexico, D.F. CIMMYT. 120 p.

- Hufa, H., P.S. Baenziger, B.S. Beecher, I. Dweikat, R.A. Graybosch and K.E. Eskridge. 2005. Comparison of phenotypic and molecular marker- based classifications of hard red Winter wheat cultivars. *Euphytica* 145:133-146.
- Huff, D. R. 1997. RAPD characterisation of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. *Crop Sci.* 37: 557–564
- Jiayang Liu M.S. 2005. Morphological and genetic variation within perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) Thesis Doctor in Science. School of the Ohio State University. 123 p.
- Ji-Yi Zhang and Zeng-Yu Wang. 2007. Chapter 32: Recent advances in molecular breeding of forage crops for improved drought and salt stress tolerance: M.A. Jenks *et al* (Eds). *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops*. Springer. Pp: 797-817.
- Jones E.S., M. D. Dupal, J. L. Dumsday, L.J. Hughes and J.W. Forster. (2002b). An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105: 577-584.
- Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castiglione, M.O. Winfield, F. Sala, G. Vandewiel, B. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestr, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Lincaero, A. Vasquez and A. Karp. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol Breed.* 3:381-390.
- Jones, E. S., M.P. Dupal, R. Kolliker, M.C. Drayton and J.W. Forster. 2001. Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) marker for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor Appl Genet.* 102:405-415.
- Jones, E.S., N.L. Mahoney, M.D. Hayward, I.P. Armstead, J.G. Jones, M.O. Humphreys, I.P. King, T. Kishida, T. Yamada, F. Balfourier, C. Charmet and J.W. Forster. (2002a). An enhanced molecular marker-based map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) reveals comparative relationships with other Poaceae species. *Genome*, 45: 282-295.

- Jung, G.A., W.F. van Wijk, Hunt and C.E. Watson. 1996. Ryegrasses. In: Moser, L.E., D.R. Buxton and M.D. Casler (Eds), Cool-season forage grasses. American Society of Agronomy. Madison. pp: 605–641.
- Kirigwi, F. M., J.C. Zwonitzer, M.A.R. Mian, W. Zeng-Yu and M.C. Saha. 2008. Microsatellite markers and genetic diversity assessment in *Lolium perenne*. Genet. Resour. Crop Evol. 55:105-114.
- Knudsen, H. 2000. Directorio de colecciones de germoplasma en América Latina y el Caribe. Primera edición. International plant genetic resources Institute (IPGRI), Roma, Italia. 369 p.
- Kölliker, R., F.J. Stadelmann, B. Reidy and J. Nösberger. 1999. Genetic variability of forage grass cultivars: A comparison of *Festuca pratensis* Huds., *Lolium perenne* L., and *Dactylis glomerata* L. Euphytica 106: 261–270
- Koreth, J., J.J O’Leary and J. McGee. 1996: Microsatellite and genomic analysis. Review article. J. Pathology 178:239-48.
- Kubik, C., W.A. Meyer, and B.S. Gaut. 1999. Assessing the abundance and polymorphism of simple sequence repeats in perennial ryegrass. Crop Sci. 39:1136-1141.
- Kubik, C., M. Sawkins, W.A. Meyer and B.S. Gaut. 2001. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. Crop Sci. 41:1565-1572.
- Leimera, G. 2001. Ecophysiology of grasslands. Aspects of forage plant populations in grazed swards. In: Proc. IXI Int. Grassl. Congress. Braz. Soc. Husb. Sao Pedro. Sao Paulo- Brazil. pp: 29-37.
- Lesica, P., and FW. Allendor. 1999. Ecological genetic and the restoration of plant communities: Mix or match? Conserve. Genet. 4:581-593.
- Liu, Z. Q., Y. Pei and Z. J. Pu. 1999. Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheat, *Triticum aestivum* L. Plant Breeding 118:119-123.
- Loos, B. P. 1993. Morphological variation in *Lolium* (Poaceae) as a measure of species relationships. Plant Syst Evol. 188:87-99.

- López, L. L. y P. E. Peñaloza. 1990. Producción de forraje y semilla del ballico anual (*L. multiflorum* L.) en Etna Oaxaca. Tesis Profesional. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 73 p.
- Maiko, I., M. Fujimori and H. Cai. 2007. 2 Forage Crops. Genome mapping and molecular breeding in plants. C. Kole (Ed). Springer-Verlag, Berlin. pp: 51-75.
- Maldonado G. G. 2008. Evaluación morfológica, de rendimiento y filogenia con base en microsatelites (SSR) de genotipos de ballico (*Lolium perenne* L. ssp. *multiflorum* (Lam.) Husnot), ballico híbrido (*Lolium hybridum*) y pasto ovilla (*Dactylis glomerata* L.) en Chapingo, México. Tesis Profesional. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 73 p.
- Mendoza M. G. D. 1992. Utilización de residuos agrícolas en la alimentación de rumiantes en pastoreo. Memorias del curso UNACH-CIES-Gob.Chis. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste. San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México. 78 p.
- Minson, J. 1990. Forage in ruminant nutrition. Academic press, INC. St. Lucia, Queensland, Australia. pp: 200-253.
- Mirjalili, S. A., S.J. Bennett and E. Poorazizi. 2008. A phenetic analysis on the genus *Lolium* (Poaceae) in Iran. *Plant Syst Evol.* 274: 203-208.
- Moller, M. and W. Spoor. 1993. Discrimination and identification of *Lolium* species and cultivars by rapid SDS-PAGE electrophoresis of seed storage proteins. *Seed Sci Technol.* 21:213–223
- Muslera R., E. y C. G. Ratera. 1991. Praderas y Forrajes, Producción y Aprovechamiento. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 673 p.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Nuez, F y J.M. Carrillo. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. 580 p.
- Nuñez, H.G., R. Martínez y D.G. García. 1991. Valor nutricional del ballico anual y perenne: producción y utilización de praderas de ballicos anual y perenne.

- Informes de investigación. INIFAP, Pabellón de Arteaga, Aguascalientes. pp: 22-25.
- Olson, G. L., S.R. Smith, T.D. Phillips and G. D. Lacefield. 2006. Annual and perennial ryegrass report. University of Kentucky, College of Agriculture. 6 p.
- Ortiz, M. P. 2008. Evaluación de componentes productivos de 141 genotipos de ballico anual (*Lolium multiflorum* L.) en Chapingo, México. Tesis profesional. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 95 p.
- Ostergaard, H., G. Nielsen and H. Johansen. 1985. Genetic variation in cultivars of diploid ryegrass, *Lolium perenne* and *L. multiflorum*, at five enzyme systems. Theor Appl Genet. 69:409-421.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II. The polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., C. Moritz and B. K. Mable (Eds.). Molecular systematic. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. pp: 205-247.
- Peacock, J. M. 1975. Temperature and leaf growth in *Lolium perenne*: II The site of temperature perception. J. App. Ecology. 12(1):115-123.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analisis. Mol. Breed. 2:225-238.
- Rafalski, J. A., J.M. Vogel, M. Morgante, W. Powell, C. Andre and S.V. Tingey. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: Non-mammalian genomic analysis: a practical guide. Birren, B, and E. Lai (eds). Academic Press Inc., San Diego. pp: 75-135.
- Rebolledo, R. H. H. 2002. Manual SAS por computadora, análisis estadísticos de datos experimentales. Primera edición. Editorial Trillas. México D.F. 208 p.
- Roldán-Ruiz. I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A. y De Loose M. 2000a. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). Mol. Breed. 6: 125–134.

- Roldán-Ruiz, I., E. Calsyn, T.J. Gilliland, R. Coll, M.J.T. Van Eijk and M. De Loose. 2000b. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. II. AFLP characterization. *Mol. Breed.* 6:593–602
- Roldán-Ruiz, I., F.A. van Eeuwijk, T.J. Gilliland, P. Dubreuil, C. Dillmann, J. Lallemand, M. De Loose and C.P. Baril. 2001. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 103:1138-1150.
- Saha, M.C., M.A.R. Mian, I. Eujayl, J.C. Zwonitzer, L. Wang and G.D. May. 2004. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. *Theor. Appl. Genet.* 109:783–791
- Squirrell, J. P.M.Hollingsworth, M. Woodhead, J. Russell, A.L. Lowe, M. Gibby and W. Powell. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Mol. Ecol.* 12:1339-1348.
- Steiner, J.J., E. Piccioni, M. Falcinelli and A. Liston. 1998. Germplasm diversity among cultivars and the NPGS crimson clover collection. *Crop Sci.* 38:263-271.
- Tabares, L. I. 1995. Patrón de respuesta del ballico italiano (*Lolium multiflorum* Lam.) variedad westerwolds, a diferentes estrategias de corte. Tesis profesional. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 88 p.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.
- Valadez, E. y Gunter, K. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Editorial Mundi-Prensa. Universidad Autónoma Chapingo, México. 147 p.
- Van-Beuningen, L.T. y R.H. Busch. 1997b. Genetic diversity among North American spring wheat cultivars: III. Cluster analysis based on quantitative morphological traits. *Crop Sci.* 37:981-988.
- Vargas, M. J., K. Crossa, M. Sayre, Reynolds, M. E. Ramírez and M.Talbot. 1998. Interpreting genotype X environment interaction in wheat using partial least squares regression. *Crop Sci.* 38(3):679-689.

- Vargas, H. R. 1999. Regresión por mínimos cuadrados parciales: propiedad y aplicaciones. Tesis de Doctorado en Ciencias. Especialidad en Estadística. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco Estado de México. 196 p.
- Vargas, M. J., J. Crossa, F.A. van Eeuwijk, M.E. Ramírez and K. Sayre. 1999. Using partial least squares regression, factorial regression and AMMI models for interpreting Genotype x Environment interaction. *Crop Sci.* 39: 955-967.
- Varshney R. K., T. Mahendar, R.K. Aggarwal and A. Borner. 2007. Chapter 2: Genic Molecular Markers in plants: development and applications. Available in: *Genomics- Assisted Crop Improvement* 1:13-29.
- Velasco-Zebadúa, M.E., G.A. Hernández y H.V.A. González. 2001. Curva de crecimiento y acumulación estacional de pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.) *Téc. Pec. Méx.* 39:1-14.
- Velasco-Zebadúa, M.E., G.A. Hernández y H.V.A. González. 2005. Rendimiento y valor nutritivo del ballico perenne (*Lolium perenne* L.) en respuesta a la frecuencia de corte. *Téc. Pec. Méx.* 43(2):247-258.
- Velasco-Zebadúa, M. E, G.A. Hernández y H.V.A. González. 2007. Cambios en componentes del rendimiento de una pradera de ballico perenne, en respuesta a la frecuencia de corte. *Rev. Fitotec. Méx.* 30(1):79-87.
- Vicente, P. B. 2004. Rendimiento de forraje en avena y ballico anual con diferente nivel de nitrógeno y estrategia de cultivo. Tesis profesional. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 18-53.
- Wang, Z., A. Hopkins y R. Mian. 2001. Forage and turf grass biotechnology. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 20:573-619.
- Wang, M.L., N.A. Barkley, J-K Yu, R.E. Dean, M.L. Newman, M.E. Sorrells and G.A. Pederson. 2005. Transfer of simple sequence repeat (SSR) markers from major cereal crops to minor grass species for germplasm characterization and evaluation. *Plant. Genetic. Resour.* 3:45–57.
- Warnke, S.E., R.E. Barker, G. Jung, S.C. Sim, M.A.R. Mian, M.C. Saha, L.A. Brillman, M.P. Dupal and J.W. Forster. 2004. Genetic linkage mapping of an annual x perennial ryegrass population. *Theor. Appl. Genet.* 109:294–304

- Warpeha, K. M. F., T.J.Gilliland and I. Capesius. 1998a. Genetic diversity in *Lolium* spp. (ryegrass) evaluated by hybridization with ribosomal DNA: implications for species taxonomy. *Genome* 41:307–311
- Warpeha K. M. F., I. Essigmann-Capesius and T.J. Gilliland. 1998b. Genetic diversity in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) evaluated by hybridization with ribosomal DNA: implications for cultivar identification and breeding. *J Agric. Sci.* 131:23–30
- Weber, J. L. and P.E. May. 1989. Abundant class of DNA polymorphism which can be typed using the PCR. *Amer. J. Human Genet.* 44:388-396.
- Woodfield, D. and C. Brummer. 2000. Integrating molecular techniques to maximise the genetic potential of forage legumes. *Book of Abstracts Molecular Breeding of Forage Crops. Second International Symposium. Victoria, Australia.* pp: 51-65.
- Xu, W. W., D.A. Sleper and S. Chao. 1992. Detection of RFLPs in perennial ryegrass using heterologous probes from tall fescue. *Crop Sci.* 32:1366–1370
- Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation a review. *Molecular Ecology.* 11:1-16.
- Zaragoza, E. J., G.A. Hernández, P.J. Pérez, H.J.G. Herrera, G.F. Osnaya, H.P.A. Martínez, M.S.S. y C.A.R. Quero. 2009. Análisis de crecimiento estacional de una pradera asociada alfalfa- pasto ovillo. *Téc. Pec. Méx.* 47(2):173-188.
- Zwierzykowski, Z., A.J. Lukaszewski, B. Naganowska and A. Lesniewska. 1999. The pattern of homoeologous recombination in triploid hybrids of *Lolium multiflorum* with *Festuca pratensi*. *Genome* 42:720-726.

**ANEXOS**

## ANEXOS

Anexo 1. Datos climatológicos de temperatura, precipitación y humedad relativa.

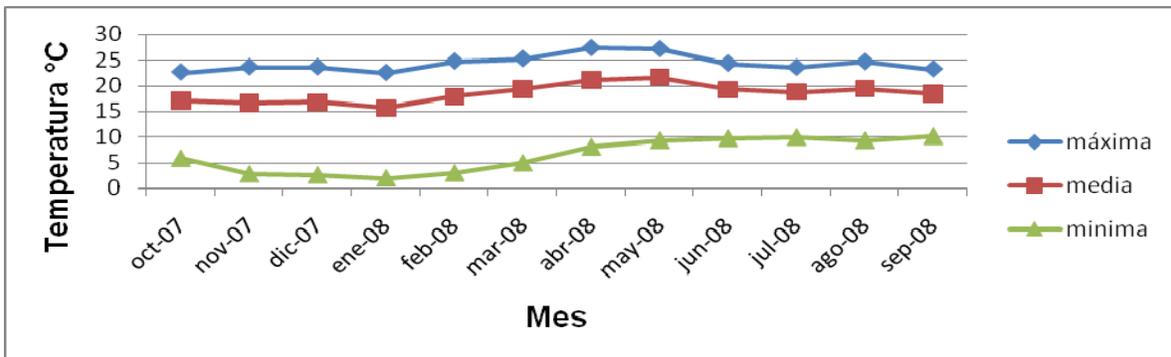


Figura 1. Temperatura máxima, media y mínima (°C) mensual, de octubre de 2007 a septiembre de 2008 en Chapingo, México.

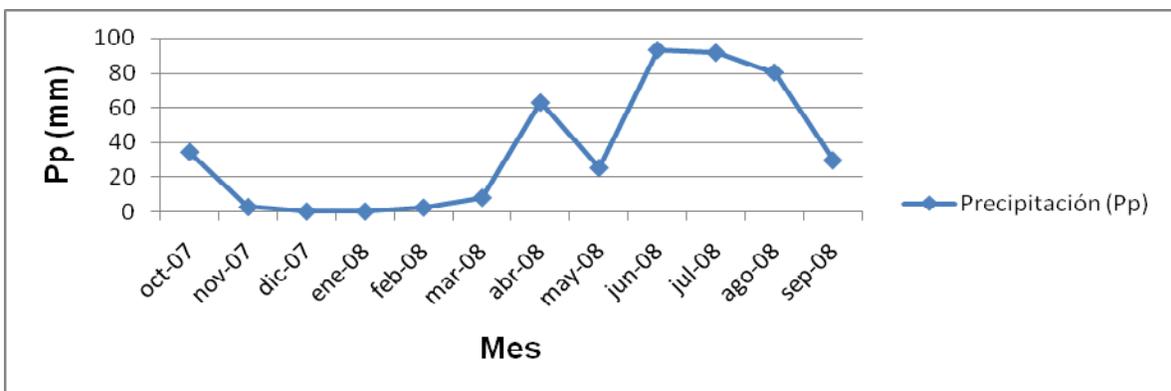


Figura 2. Precipitación (mm) mensual, de octubre de 2007 a septiembre de 2008.

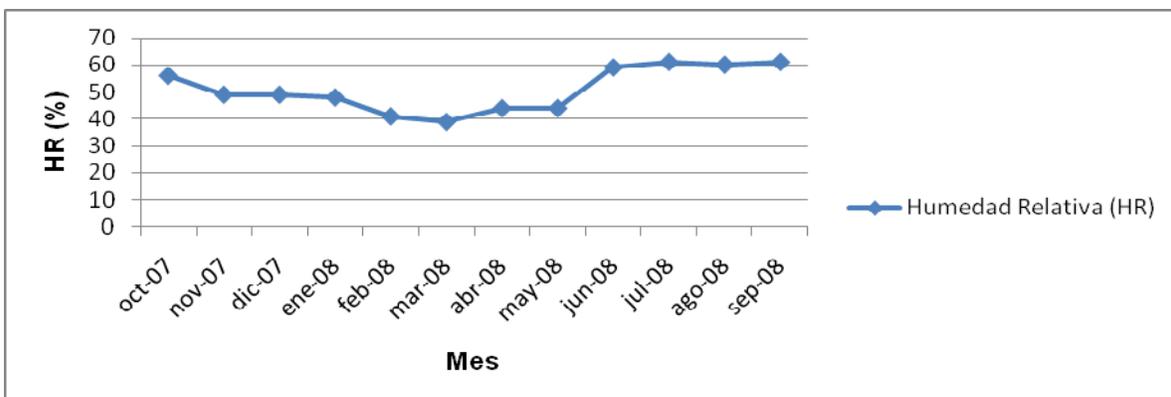


Figura 3. Humedad Relativa (%) mensual, de octubre de 2007 a septiembre de 2008.

## Anexo 2. Arreglo de los genotipos en campo.

### Repetición 2

Hilera 1

Surco 30
Surco 29. <b>Genotipo 10</b>
Surco 28
Surco 27
Surco 26. <b>Genotipo 7</b>
Surco 25
Surco 24
Surco 23. <b>Genotipo 6</b>
Surco 22
Surco 21
Surco 20. <b>Genotipo 9</b>
Surco 19
Surco 18
Surco 17. <b>Genotipo 3</b>
Surco 16

Hilera 2

Surco 31
Surco 32. <b>Genotipo 1</b>
Surco 33
Surco 34
Surco 35. <b>Genotipo 5</b>
Surco 36
Surco 37
Surco 38. <b>Genotipo 4</b>
Surco 39
Surco 40
Surco 41. <b>Genotipo 8</b>
Surco 42
Surco 43
Surco 44. <b>Genotipo 2</b>
Surco 45

### Repetición 3

Hilera 3

Surco 90
Surco 89. <b>Genotipo 10</b>
Surco 88
Surco 87
Surco 86. <b>Genotipo 2</b>
Surco 85
Surco 84
Surco 83. <b>Genotipo 4</b>
Surco 82
Surco 81
Surco 80. <b>Genotipo 3</b>
Surco 79
Surco 78
Surco 77. <b>Genotipo 7</b>
Surco 76

Hilera 4

Surco 91
Surco 92. <b>Genotipo 12*</b>
Surco 93
Surco 94
Surco 95. <b>Genotipo 2</b>
Surco 96
Surco 97
Surco 98. <b>Genotipo 1</b>
Surco 99
Surco 100
Surco 101. <b>Genotipo 8</b>
Surco 102. <b>Genotip 11*</b>
Surco 103
Surco 104. <b>Genotipo 3</b>
Surco 105

### Repetición 1

Surco 15
Surco 14. <b>Genotipo 6</b>
Surco 13
Surco 12
Surco 11. <b>Genotipo 10</b>
Surco 10
Surco 9
Surco 8. <b>Genotipo 4</b>
Surco 7
Surco 6
Surco 5. <b>Genotipo 7</b>
Surco 4
Surco 3
Surco 2. <b>Genotipo 2</b>
Surco 1

Surco 46
Surco 47. <b>Genotipo 1</b>
Surco 48
Surco 49
Surco 50. <b>Genotipo 8</b>
Surco 51
Surco 52
Surco 53. <b>Genotipo 3</b>
Surco 54
Surco 55
Surco 56. <b>Genotipo 5</b>
Surco 57
Surco 58
Surco 59. <b>Genotipo 9</b>
Surco 60

### Repetición 4

Surco 75
Surco 74. <b>Genotipo 5</b>
Surco 73
Surco 72
Surco 71. <b>Genotipo 9</b>
Surco 70
Surco 69
Surco 68. <b>Genotipo 3</b>
Surco 67
Surco66
Surco 65. <b>Genotipo 4</b>
Surco 64
Surco 63
Surco 62. <b>Genotipo 2</b>
Surco 61

Surco 106
Surco 107. <b>Genotipo 6</b>
Surco 108
Surco 109
Surco 110. <b>Genotipo 7</b>
Surco 111
Surco 112
Surco 113. <b>Genotipo 10</b>
Surco 114
Surco 115
Surco 116. <b>Genotipo 1</b>
Surco 117
Surco 118
Surco 119. <b>Genotip 12*</b>
Surco 120

\*Genotipos de relleno.

### Anexo 3. Valores promedio por mes de corte para las variables de componentes morfológicos.

**Cuadro 1. Porcentaje promedio de hoja por mes de corte**

Genotipo	oct	nov	dic	ene	abr	jun	jul	ago	sep	Promedio		
										de cortes	EEM*	C.V.**
<b><i>Dactylis glomerata</i></b>												
Canada_Hércules	74.00	79.41	79.55	69.23	58.55	64.20	63.29	67.82	59.45	68.39	4.73	3.18
USA_Napier	78.19	78.52	78.85	68.69	44.38	60.80	59.15	62.55	68.23	66.60	5.48	3.51
USA_Potomac	75.41	79.40	77.57	69.89	47.73	57.44	45.43	71.35	49.28	63.72	5.61	3.72
<b><i>Lolium hybridum</i></b>												
Australia_Wimmera 62	48.24	58.78	58.09	55.91	21.88	49.45	50.80	43.29	NE***	48.30	5.33	4.78
France_Itaque	63.95	67.95	70.11	67.49	62.86	70.45	69.56	68.85	47.13	65.37	6.72	3.97
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>												
Ansyl_France	69.69	71.78	75.65	73.97	66.41	67.89	67.49	68.16	68.39	69.94	4.73	3.11
New_Zealand	63.66	67.60	66.87	67.70	45.62	62.80	61.90	64.37	49.63	61.13	4.73	3.56
Uruguay	54.60	69.53	67.53	64.16	32.12	34.86	38.14	46.68	NE***	50.95	4.73	4.27
<b><i>Lolium perenne</i></b>												
Canada_Uri (4n)	69.11	71.63	73.62	72.17	74.30	71.40	73.34	71.33	62.36	71.03	5.48	3.29
Netherlands Barenza	68.14	70.23	71.65	74.62	61.85	73.40	70.87	73.65	47.01	67.93	4.73	3.20
USA_Manhattan II	72.32	81.50	85.06	69.97	60.16	45.74	58.39	44.99	62.02	64.46	5.48	3.63

\*EEM= Error estándar de la media

\*\*C.V.= Coeficiente variación

\*\*\*NE= No estimado

**Cuadro 2. Porcentaje promedio de tallo por mes de corte**

Genotipo	oct	nov	dic	ene	abr	jun	jul	ago	sep	Promedio		
										de cortes	EEM*	C.V.**
<b><i>Dactylis glomerata</i></b>												
Canada_Hércules	23.98	18.72	18.94	28.72	41.26	26.78	34.79	18.43	20.63	25.80	4.32	8.05
USA_Napier	20.06	19.06	19.92	29.87	55.23	28.24	39.69	18.62	25.27	28.44	5.00	7.86
USA_Potomac	20.14	19.52	21.83	26.71	51.21	28.48	39.98	14.61	31.65	28.24	5.12	8.01
<b><i>Lolium hybridum</i></b>												
Australia_Wimmera 62	49.63	33.25	39.52	41.55	77.93	41.60	48.25	31.31	NE***	45.38	4.85	4.85
France_Itaque	31.01	29.06	27.46	29.11	36.96	28.73	30.43	29.89	32.35	30.56	6.14	8.11
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>												
Ansyl_France	27.44	26.23	23.44	24.70	33.51	28.97	32.51	25.15	25.81	27.53	4.32	7.55
New_Zealand	33.41	30.77	31.41	30.78	54.02	31.01	36.26	27.60	32.55	34.20	4.32	6.08
Uruguay	43.07	27.06	30.97	32.44	67.54	46.25	49.44	48.79	NE***	43.20	4.32	4.81
<b><i>Lolium perenne</i></b>												
Canada_Uri (4n)	29.32	25.83	25.35	25.34	25.44	20.74	22.99	19.23	20.97	23.91	5.00	9.35
Netherlands Barenza	28.26	27.92	26.57	22.06	37.65	21.41	29.13	18.23	25.69	26.33	4.32	7.89
USA_Manhattan II	24.84	16.88	13.95	20.93	39.77	44.38	40.20	39.08	28.04	29.79	5.00	7.51

\*EEM= Error estándar de la media

\*\*C.V.= Coeficiente de variación

\*\*\*NE= No estimado

**Cuadro 3. Porcentaje promedio de material muerto por mes de corte**

Genotipo	oct	nov	dic	ene	abr	junio	jul	ago	sep	Promedio		
										de cortes	EEM*	C.V.**
<b><i>Dactylis glomerata</i></b>												
Canada_Hércules	2.02	1.87	1.51	2.06	0.19	9.02	1.93	13.75	19.93	5.81	2.74	28.50
USA_Napier	1.75	2.42	1.22	1.44	0.39	10.96	1.15	18.84	6.49	4.96	3.17	35.89
USA_Potomac	4.45	1.08	0.60	3.40	1.06	14.08	14.59	14.04	19.07	8.04	3.25	22.41
<b><i>Lolium hybridum</i></b>												
Australia_Wimmera 62	2.13	7.97	2.39	2.54	0.19	8.96	0.95	25.41	NE***	6.32	3.08	27.76
France_Itaque	5.04	2.99	2.43	3.40	0.18	0.82	0.01	1.26	20.52	4.07	3.89	48.46
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>												
Ansyl_France	2.88	1.99	0.92	1.33	0.08	3.14	0.00	6.69	5.80	2.54	2.74	65.26
New_Zealand	2.93	1.62	1.72	1.53	0.36	6.19	1.84	8.03	17.82	4.67	2.74	35.43
Uruguay	2.33	3.41	1.50	3.40	0.34	18.88	12.43	4.53	NE***	5.85	2.74	28.28
<b><i>Lolium perenne</i></b>												
Canada_Uri (4n)	1.57	2.54	1.03	2.49	0.26	7.86	3.67	9.43	16.67	5.06	3.17	35.22
Netherlands Barenza	3.60	1.85	1.78	3.32	0.51	5.18	0.00	8.12	27.30	5.74	2.74	28.83
USA_Manhattan II	2.84	1.62	1.00	9.10	0.06	9.88	1.41	15.93	9.94	5.75	3.17	30.95

\*EEM= Error estándar de la media

\*\*C.V.= Coeficiente de variación

\*\*\*NE= No estimado

**Cuadro 4. Relación hoja: tallo promedio por mes de corte**

Genotipo	oct	nov	dic	ene	abr	jun	jul	ago	sep	Promedio	
										de cortes	EEM*
<b><i>Dactylis glomerata</i></b>											
Canada_Hércules	3.19	5.13	4.54	2.43	1.44	2.49	1.90	3.78	2.94	3.09	0.58
USA_Napier	4.35	4.39	4.08	2.40	0.81	2.19	1.60	3.46	2.85	2.90	0.67
USA_Potomac	4.83	4.17	3.60	2.67	1.30	2.20	1.36	4.78	2.16	3.01	0.67
<b><i>Lolium hybridum</i></b>											
Australia_Wimmera 62	0.98	1.79	1.52	1.38	0.29	1.59	1.02	1.28	NE**	1.23	0.67
France_Itaque	2.05	2.32	2.57	2.31	1.66	2.48	2.26	2.47	1.44	2.17	0.83
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>											
Ansyl_France	2.64	2.80	3.34	3.03	2.03	2.45	2.14	3.19	4.73	2.93	0.58
New_Zealand	1.90	2.30	2.19	2.29	0.86	2.06	1.70	2.37	1.76	1.94	0.52
Uruguay	1.33	2.67	2.16	1.97	0.49	0.89	0.67	1.54	NE**	1.46	0.52
<b><i>Lolium perenne</i></b>											
Canada Uri (4n)	2.41	2.78	2.96	2.90	2.94	3.53	3.22	3.88	3.58	3.13	0.67
Netherland Barenza	2.42	2.66	3.12	3.58	1.67	3.59	2.76	4.39	1.85	2.89	0.58
USA_Manhattan II	2.96	5.04	7.19	3.50	1.92	1.31	1.46	2.01	2.63	3.11	0.67

\*EEM= Error estándar de la media

\*\*NE= No estimado

**Cuadro 5. Peso seco promedio por planta (g) por mes de corte**

Genotipo	oct	nov	dic	ene	mar	abr	may	jul	ago	sep	Promedio		
											de cortes	EEM*	C.V.**
<b><i>Dactylis glomerata</i></b>													
Canada_Hércules	21.97	26.80	17.32	23.46	18.57	26.43	21.89	12.51	12.57	9.47	19.10	2.46	8.22
USA_Napier	24.12	33.89	18.28	25.35	26.07	45.34	23.35	14.72	14.72	14.59	24.04	2.86	7.03
USA_Potomac	38.56	32.89	19.53	23.37	16.19	23.01	18.35	10.53	9.95	8.41	20.08	2.85	8.41
<b><i>Lolium hybridum</i></b>													
Australia_Wimmera 62	57.85	18.94	10.27	17.33	18.99	28.28	13.06	2.49	6.37	NE***	19.29	2.72	8.56
France_Itaque	54.02	39.23	20.44	20.97	14.27	20.47	16.19	8.13	7.27	7.90	22.33	3.51	8.38
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>													
Ansyl_France	66.20	45.35	26.89	29.29	15.93	21.85	19.00	9.89	8.90	7.51	25.08	2.46	6.26
New_Zealand	53.25	44.89	24.25	26.69	21.06	30.57	21.15	7.84	7.22	6.13	24.30	2.25	6.17
Uruguay	62.43	31.61	17.64	19.89	16.85	26.92	12.59	4.14	4.59	NE***	21.85	2.25	6.86
<b><i>Lolium perenne</i></b>													
Canada Uri (4n)	33.51	41.40	24.37	28.34	15.54	23.04	18.22	10.20	5.65	5.47	20.57	2.86	8.21
Netherland Barenza	32.21	35.79	21.05	23.81	17.84	27.31	13.63	8.12	6.96	5.68	19.24	2.46	8.16
USA_Manhattan II	25.40	21.76	13.33	18.54	13.27	22.45	8.22	6.38	4.75	3.77	13.79	2.86	12.26

\*EEM= Error estándar de la media

\*\*C.V.= Coeficiente de variación

\*\*\*NE= No estimado

**Cuadro 6. Peso seco promedio del tallo por planta (mg) por mes de corte**

Genotipo	oct	nov	dic	ene	mar	abr	jul	ago	sep	Promedio			
										de cortes	EEM*	C.V.**	
<b><i>Dactylis glomerata</i></b>													
Canada_Hércules	294.95	314.40	212.35	191.93	130.43	189.33	98.82	79.90	78.12	176.69	20.85	2.58	
USA_Napier	263.48	376.74	208.90	161.15	155.51	292.99	88.57	78.92	87.11	190.37	24.15	2.58	
USA_Potomac	457.64	377.03	236.20	230.40	135.21	151.02	108.79	84.76	88.83	207.76	24.14	2.36	
<b><i>Lolium hybridum</i></b>													
Australia_Wimmera 62	373.17	229.52	139.40	122.83	156.02	276.50	39.54	64.10	NE***	175.13	23.05	2.74	
France_Itaque	389.52	285.46	162.36	116.10	71.99	83.32	51.25	61.54	69.44	143.44	29.65	3.80	
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>													
Ansyl_France	534.34	424.81	262.65	217.43	121.06	161.69	84.66	83.01	74.72	218.26	20.85	2.09	
New_Zealand	443.59	381.46	248.89	182.13	145.67	209.33	73.25	57.91	65.44	200.85	18.89	2.16	
Uruguay	484.30	302.49	184.34	155.77	132.88	209.73	51.59	72.77	NE***	199.23	18.90	2.18	
<b><i>Lolium perenne</i></b>													
Canada Uri (4n)	197.39	338.47	159.30	110.51	68.29	97.37	46.50	31.21	31.06	120.01	24.15	4.09	
Netherland Barenza	164.81	210.14	115.71	80.10	51.82	69.90	27.02	28.60	22.58	85.63	20.85	5.33	
USA_Manhattan II	91.54	102.42	45.33	45.30	28.60	37.20	16.42	17.22	10.51	43.84	24.15	11.21	

\*EEM= Error estándar de la media

\*\*C.V.= Coeficiente de variación

\*\*\*NE= No estimado

**Cuadro 7. Peso seco promedio de la hoja por planta (g) por mes de corte**

Genotipo	oct	nov	dic	ene	abr	jul	ago	sep	Promedio			
									de cortes	EEM*	C.V.**	
<b><i>Dactylis glomerata</i></b>												
Canada_Hércules	16.13	21.14	13.58	16.12	15.35	7.75	8.48	5.56	13.01	1.60	9.72	
USA_Napier	18.89	27.06	14.79	17.39	20.08	8.91	9.29	10.19	15.82	1.85	8.61	
USA_Potomac	28.48	26.13	15.32	16.32	11.16	4.60	7.28	4.15	14.18	1.85	9.60	
<b><i>Lolium hybridum</i></b>												
Australia_Wimmera 62	27.85	11.20	6.08	9.63	6.34	1.82	2.85	NE***	9.40	1.85	14.49	
France_Itaque	34.14	26.05	13.58	13.53	12.40	4.98	4.27	3.60	14.07	2.28	10.73	
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>												
Ansyl_France	45.64	32.44	20.22	21.45	14.66	6.59	5.77	4.47	18.91	1.60	6.69	
New_Zealand	33.23	30.28	15.90	17.76	13.84	4.40	4.36	2.96	15.34	1.46	7.87	
Uruguay	34.47	21.85	11.28	12.42	8.81	1.10	1.80	NE***	13.10	1.46	9.22	
<b><i>Lolium perenne</i></b>												
Canada_Uri (4n)	23.30	29.95	18.17	20.64	17.50	7.75	4.31	3.72	15.67	1.85	8.69	
Netherland Barenza	21.88	25.09	14.79	17.53	16.94	5.63	4.98	2.73	13.70	1.60	9.24	
USA_Manhattan II	18.74	17.92	11.69	12.91	13.93	3.84	2.56	2.40	10.50	1.85	12.97	

\*EEM= Error estándar de la media

\*\*C.V.= Coeficiente de variación

\*\*\*NE= No estimado

**Cuadro 8. Peso seco promedio de tallo por planta (g) por mes de corte**

Genotipo	oct	nov	dic	ene	abr	jul	ago	sep	Promedio			
									de cortes	EEM*	C.V.**	
<b><i>Dactylis glomerata</i></b>												
Canada_Hércules	5.26	5.11	3.41	6.79	11.02	4.35	2.28	2.02	5.03	1.23	22.09	
USA_Napier	4.95	6.20	3.45	7.83	25.29	5.68	2.61	3.49	7.44	1.43	16.07	
USA_Potomac	8.57	6.51	4.20	6.37	11.57	4.34	1.24	2.64	5.68	1.43	21.04	
<b><i>Lolium hybridum</i></b>												
Australia_Wimmera 62	28.71	6.23	3.95	7.28	21.83	1.13	2.07	NE***	10.17	1.41	11.68	
France_Itaque	16.50	11.34	5.87	6.33	7.52	2.66	2.37	2.75	6.92	1.75	19.14	
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>												
Ansyl_France	18.48	12.00	6.41	7.41	7.15	3.30	2.23	2.27	7.41	1.23	15.00	
New_Zealand	17.76	13.58	7.65	8.14	16.34	2.88	2.03	1.92	8.79	1.11	11.99	
Uruguay	26.38	8.44	5.83	6.57	17.77	1.99	2.27	NE***	9.89	1.11	10.66	
<b><i>Lolium perenne</i></b>												
Canada_Uri (4n)	9.88	10.63	6.17	7.23	5.69	2.16	0.98	1.04	5.47	1.43	21.84	
Netherland Barenza	9.05	10.02	5.84	5.47	10.15	2.49	1.42	1.45	5.74	1.23	19.37	
USA_Manhattan II	6.15	3.74	1.74	3.74	8.70	2.49	1.54	1.01	3.64	1.43	32.84	

\*EEM= Error estándar de la media

\*\*C.V.= Coeficiente de variación

\*\*\*NE= No estimado

**Cuadro 9. Peso seco promedio de material muerto por planta (g) por mes de corte**

Genotipo	oct	nov	dic	ene	abr	jul	ago	sep	Promedio		
									de cortes	EEM*	
<b><i>Dactylis glomerata</i></b>											
Canada_Hércules	0.58	0.55	0.34	0.54	0.06	0.42	1.80	1.89	0.77	0.31	
USA_Napier	0.53	0.87	0.28	0.37	0.22	0.38	3.06	1.15	0.86	0.36	
USA_Potomac	1.60	0.33	0.09	0.76	0.37	1.67	1.53	1.70	1.01	0.36	
<b><i>Lolium hybridum</i></b>											
Australia_Wimmera 62	1.29	1.51	0.25	0.42	0.12	0.50	0.47	NE**	0.65	0.35	
France_Itaque	2.90	1.35	0.51	0.62	0.06	0.01	0.15	1.06	0.83	0.44	
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>											
Ansyl_France	2.08	0.91	0.26	0.43	0.04	0.00	0.90	0.77	0.67	0.31	
New_Zealand	2.02	0.78	0.45	0.54	0.14	0.31	0.59	1.00	0.73	0.28	
Uruguay	1.41	1.14	0.35	0.72	0.16	0.87	0.34	NE**	0.71	0.28	
<b><i>Lolium perenne</i></b>											
Canada_Uri (4n)	0.6	1.1	0.3	0.7	0.1	0.5	0.6	1.0	0.6	0.4	
Netherland Barenza	1.3	0.7	0.4	0.8	0.2	0.0	0.6	1.5	0.7	0.3	
USA_Manhattan II	0.8	0.3	0.1	2.1	0.1	0.3	0.9	0.6	0.7	0.4	

\*EEM= Error estándar de la media

\*\*NE= No estimado

**Cuadro 10. Altura promedio de las plantas (cm) por mes de corte**

Genotipo	oct	nov	dic	ene	mar	abr	jul	ago	sep	Promedio		
										de cortes	EE*	C.V.**
<b><i>Dactylis glomerata</i></b>												
Canada_Hércules	32.82	23.33	19.63	17.03	18.93	28.68	23.78	18.25	17.37	22.20	1.37	5.27
USA_Napier	33.03	23.59	22.59	19.61	21.74	38.41	24.99	20.36	19.52	24.87	1.58	5.06
USA_Potomac	39.04	24.10	21.75	20.96	17.86	24.96	25.73	18.54	15.58	23.17	1.58	5.43
<b><i>Lolium hybridum</i></b>												
Australia_Wimmera 62	50.45	18.02	17.08	18.17	21.45	37.98	23.54	11.69	NE***	24.80	1.37	4.72
France_Itaque	49.38	33.91	26.08	20.25	16.38	25.98	21.55	15.41	18.15	26.12	1.94	5.34
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>												
Ansyl_France	49.62	35.40	34.83	24.63	21.42	24.73	26.42	18.87	19.23	28.35	1.37	4.12
New_Zealand	48.55	30.66	27.22	21.02	23.99	27.11	25.03	17.59	17.07	26.47	1.24	4.20
Uruguay	54.84	25.89	24.78	22.21	25.12	32.97	21.84	15.86	NE***	27.94	1.24	3.98
<b><i>Lolium perenne</i></b>												
Canada_Uri (4n)	38.70	27.56	24.99	19.50	16.87	19.67	15.76	12.12	15.50	21.19	1.58	5.94
Netherland Barenza	29.47	19.10	16.20	14.18	14.82	17.23	12.85	10.85	13.27	16.44	1.37	7.11
USA_Manhattan II	22.05	12.14	12.99	10.23	12.52	15.39	10.56	9.10	7.05	12.45	1.58	10.11

\*EEM= Error estándar de la media

\*\*C.V.= Coeficiente de variación

\*\*\*NE= No estimado

**Cuadro 11. Número de tallos promedio de las plantas por mes de corte**

Genotipo	oct	nov	dic	ene	mar	abr	jul	ago	sep	Promedio		
										de cortes	EEM*	C.V.**
<b><i>Dactylis glomerata</i></b>												
Canada_Hércules	74.83	88.83	82.93	123.55	143.48	153.27	129.00	160.73	125.87	120.28	19.49	3.67
USA_Napier	92.47	92.98	89.80	164.35	166.54	150.58	166.51	186.35	164.91	141.61	22.56	3.35
USA_Potomac	82.46	86.36	82.73	103.73	120.71	160.13	100.60	119.57	99.40	106.19	22.55	4.47
<b><i>Lolium hybridum</i></b>												
Australia_Wimmera 62	156.05	82.77	80.48	139.47	121.00	106.55	79.17	44.30	NE***	101.22	21.91	4.62
France_Itaque	141.34	139.04	122.91	179.44	198.74	263.61	153.17	102.34	97.16	162.57	27.69	3.24
<b><i>Lolium multiflorum</i></b>												
Ansyl_France	123.58	108.93	102.83	131.53	128.15	135.42	119.17	109.80	99.05	117.61	19.49	3.75
New_Zealand	120.82	125.99	99.23	145.65	143.71	149.70	107.95	139.74	91.99	124.98	17.60	3.36
Uruguay	130.54	108.13	99.65	137.73	134.37	131.02	77.63	63.44	NE***	110.31	17.60	3.80
<b><i>Lolium perenne</i></b>												
Canada_Uri (4n)	168.62	128.89	158.55	256.47	217.18	234.62	201.29	188.98	166.18	191.20	22.56	2.48
Netherland Barenza	216.95	172.93	192.33	333.25	351.01	394.63	301.81	262.52	255.40	275.65	19.49	1.60
USA_Manhattan II	293.15	234.78	275.27	382.78	416.75	567.35	326.98	276.62	305.31	342.11	22.56	1.39

\*EEM= Error estándar de la media

\*\*C.V.= Coeficiente de variación

\*\*\*NE= No estimado

## Anexo 4. Valores de X-loadings y Y-scores por cada estación.

**Cuadro 1. X- loadings de 5 factores de MCP, estación de otoño**

		Año														
Factor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	0.11	0.12	0.14	0.00	0.25	-0.09	-0.04	0.00	0.01	0.18	-0.10	-0.13	0.08	0.13	0.10	
2	0.01	0.07	0.03	0.03	0.01	-0.10	0.06	0.22	0.13	-0.09	-0.29	0.21	0.03	-0.12	-0.19	
3	0.08	-0.29	-0.14	-0.26	-0.10	0.06	0.17	0.13	0.13	-0.05	0.16	0.02	0.05	0.07	0.01	
4	-0.14	0.01	-0.12	0.02	0.11	0.06	-0.13	-0.11	-0.02	0.11	0.06	-0.18	0.16	0.13	-0.10	
5	0.31	0.11	0.03	-0.13	-0.01	0.01	0.04	0.00	0.24	-0.28	-0.10	-0.04	0.06	-0.11	-0.23	
		Año														
Factor	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1	0.03	-0.02	-0.23	0.08	0.21	-0.30	-0.13	-0.09	0.21	-0.16	-0.20	-0.09	0.15	-0.11	-0.18	
2	-0.03	0.33	-0.33	0.18	-0.16	-0.08	-0.02	0.15	0.10	0.07	0.05	-0.09	-0.08	0.13	0.13	
3	-0.08	0.40	-0.06	-0.16	0.02	0.07	0.09	0.12	0.06	0.00	0.06	0.27	0.22	-0.03	-0.12	
4	0.13	0.16	0.08	0.14	-0.38	0.05	-0.33	0.15	0.19	-0.01	-0.14	-0.14	0.09	0.24	0.12	
5	-0.16	-0.19	0.12	-0.09	0.11	-0.05	-0.09	0.23	-0.09	-0.10	-0.11	0.23	-0.05	-0.01	0.18	
		Año														
Factor	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	
1	-0.02	0.20	0.03	0.26	0.05	-0.11	-0.11	0.01	0.01	0.24	0.16	-0.10	0.12	-0.15	-0.12	
2	0.01	0.07	-0.19	0.12	0.22	0.01	-0.08	0.14	-0.23	0.05	0.05	-0.19	0.05	0.17	-0.07	
3	0.04	0.15	-0.01	0.03	-0.13	-0.14	0.12	0.08	-0.04	-0.06	-0.15	-0.05	-0.23	-0.22	-0.23	
4	-0.13	-0.12	0.14	-0.13	0.04	-0.09	0.25	-0.03	-0.20	-0.04	0.08	-0.15	-0.18	-0.25	0.24	
5	-0.02	-0.10	0.03	-0.20	0.08	-0.27	-0.06	-0.16	0.12	0.02	0.31	0.08	-0.34	0.15	-0.17	
		Año														
Factor	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59		
1	-0.30	-0.21	-0.17	-0.09	0.06	0.12	-0.02	-0.05	0.21	0.20	-0.09	-0.14	-0.03	-0.09		
2	0.11	0.00	-0.04	0.26	0.04	0.08	0.02	-0.14	-0.08	0.12	0.06	0.26	0.09	0.12		
3	-0.16	-0.05	0.25	0.09	-0.11	0.15	0.08	-0.04	0.11	0.08	0.01	0.03	-0.28	-0.13		
4	-0.12	-0.12	0.02	-0.12	0.17	0.23	-0.11	0.08	-0.32	-0.08	0.00	-0.01	-0.02	-0.12		
5	-0.01	0.04	-0.28	-0.13	0.03	0.26	-0.06	-0.05	-0.04	0.05	0.04	0.02	0.01	-0.05		

**Cuadro 1. Y- scores de 5 factores de MCP, estación de otoño**

	Total de factores extraídos	Efecto total por factor (%)	Efecto acumulado del factor (%)	Efecto total de la variable	Efecto acumulado de la variable
1		8.0948	8.0948	12.1154	12.1154
2		5.3583	13.4532	8.4195	20.5349
3		3.2406	16.6938	8.9367	29.4716
4		4.259	20.9528	2.9337	32.4053
5		3.9124	24.8653	2.4833	34.8886

**Cuadro 2. X- loadings de 5 factores de MCP, estación de invierno**

		Año														
Factor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	0.07	0.18	0.10	0.12	0.05	-0.21	0.06	0.24	0.07	-0.12	-0.32	0.20	-0.01	-0.15	-0.21	
2	0.14	-0.29	-0.03	-0.06	0.14	0.00	0.00	0.16	0.13	0.08	0.17	-0.05	0.04	0.13	0.17	
3	-0.04	0.14	0.06	0.13	0.05	-0.08	0.01	-0.10	-0.19	0.10	0.04	-0.16	-0.07	0.05	0.05	
4	0.26	0.18	0.13	-0.18	0.22	0.12	-0.20	-0.11	0.22	-0.14	-0.12	-0.04	0.31	0.01	-0.04	
5	0.27	-0.01	0.10	-0.03	0.14	0.14	-0.17	0.05	-0.03	0.01	0.01	0.01	0.23	0.24	-0.15	
		Año														
Factor	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1	-0.05	0.22	-0.40	0.15	0.05	-0.18	-0.06	0.07	0.08	-0.02	-0.12	-0.03	-0.14	0.11	0.03	
2	-0.02	0.20	-0.11	-0.14	0.33	-0.07	0.12	0.00	-0.01	0.06	-0.04	0.13	0.10	-0.01	-0.39	
3	0.10	-0.21	-0.01	0.01	0.21	-0.10	-0.22	-0.28	0.20	-0.22	-0.28	-0.05	0.12	-0.24	0.01	
4	0.03	-0.14	0.03	0.12	-0.20	-0.24	0.08	0.11	0.03	-0.16	0.03	-0.19	0.05	-0.16	0.19	
5	-0.03	-0.03	0.14	-0.07	-0.01	0.05	-0.23	0.13	-0.11	0.05	-0.11	0.15	0.03	0.17	-0.02	
		Año														
Factor	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	
1	-0.01	0.07	-0.16	0.14	0.22	0.00	-0.14	0.00	-0.18	0.07	0.16	-0.05	0.04	0.23	-0.06	
2	0.04	0.31	-0.10	0.18	0.04	-0.13	-0.09	0.07	0.03	0.05	-0.03	-0.06	-0.04	-0.17	-0.36	
3	-0.12	-0.02	0.15	0.22	0.07	0.02	-0.01	-0.13	0.16	0.14	0.21	0.03	0.02	-0.08	0.16	
4	-0.08	0.10	-0.05	-0.09	-0.20	-0.15	-0.20	0.15	0.05	0.13	0.21	-0.28	-0.05	-0.09	-0.20	
5	0.12	-0.10	0.17	-0.34	0.23	-0.11	0.06	-0.17	0.12	-0.20	0.12	-0.06	0.03	0.12	0.10	
		Año														
Factor	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59		
1	-0.08	0.08	-0.30	0.11	0.09	0.15	-0.06	-0.19	-0.03	0.14	0.06	0.16	0.08	0.07		
2	-0.24	-0.02	0.09	-0.01	-0.10	0.19	0.07	-0.09	0.31	0.19	-0.12	-0.04	-0.27	-0.12		
3	-0.19	-0.07	-0.27	-0.25	0.02	0.04	-0.08	0.01	0.09	0.11	-0.15	-0.25	0.13	-0.11		
4	0.01	-0.21	-0.02	0.03	0.06	-0.15	0.08	0.10	0.07	-0.02	-0.16	-0.06	-0.07	0.00		
5	-0.32	0.04	-0.13	-0.11	0.13	0.28	0.13	-0.13	-0.05	-0.26	0.16	-0.01	-0.10	-0.15		

**Cuadro 2. Y- scores de 5 factores de MCP, estación de invierno**

	Total de factores extraídos	Efecto total por factor (%)	Efecto acumulado del factor (%)	Efecto total de la variable	Efecto acumulado de la variable
1		8.0948	8.0948	12.1154	12.1154
2		5.3583	13.4532	8.4195	20.5349
3		3.2406	16.6938	8.9367	29.4716
4		4.259	20.9528	2.9337	32.4053
5		3.9124	24.8653	2.4833	34.8886

**Cuadro 3. X- loadings de 5 factores de MCP, estación de primavera**

		Año														
Factor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	-0.06	0.21	0.13	0.23	-0.11	-0.18	0.03	0.31	0.05	-0.15	-0.28	0.24	-0.14	-0.23	-0.12	
2	-0.01	0.30	0.17	0.11	0.13	-0.08	-0.09	-0.24	-0.12	0.08	-0.17	-0.14	0.06	0.04	-0.13	
3	0.09	0.07	-0.01	0.31	-0.01	-0.05	-0.07	0.39	-0.02	0.10	0.03	-0.27	-0.10	0.03	0.23	
4	0.04	-0.07	-0.17	-0.06	-0.12	0.09	-0.02	0.17	0.15	-0.09	0.01	-0.23	0.07	0.02	-0.16	
5	-0.17	-0.13	-0.21	0.16	-0.23	-0.12	0.19	0.01	-0.25	0.07	-0.02	-0.05	-0.14	-0.03	0.16	
		Año														
Factor	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1	-0.04	0.11	-0.23	0.18	-0.11	0.14	0.08	-0.08	-0.05	-0.01	0.00	-0.17	-0.22	-0.02	0.14	
2	0.08	-0.42	0.07	0.17	-0.10	-0.06	-0.16	-0.07	0.01	-0.16	-0.12	-0.19	-0.13	-0.10	0.12	
3	-0.10	0.11	-0.17	-0.02	0.43	0.09	-0.18	-0.18	0.01	-0.01	-0.33	0.05	-0.01	-0.16	-0.22	
4	-0.04	0.16	0.02	0.09	0.00	0.12	-0.23	0.23	0.07	0.15	0.06	0.08	-0.13	0.21	0.20	
5	0.29	-0.12	-0.04	-0.03	-0.11	0.33	0.06	-0.02	-0.08	0.12	0.17	0.02	-0.05	-0.08	-0.12	
		Año														
Factor	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	
1	-0.10	0.01	-0.12	0.06	0.07	0.07	-0.01	-0.05	-0.06	0.04	0.03	0.01	0.02	0.28	0.11	
2	-0.03	-0.17	0.15	-0.04	-0.09	-0.01	0.07	-0.16	0.09	0.12	0.22	0.08	-0.02	0.02	0.18	
3	-0.12	0.07	0.07	0.18	0.10	-0.20	0.02	-0.05	0.08	0.16	0.25	0.08	-0.12	-0.06	-0.03	
4	0.01	-0.30	0.01	-0.10	0.11	-0.02	0.09	0.14	-0.16	-0.22	0.27	0.11	-0.27	-0.15	-0.02	
5	-0.04	-0.08	0.12	0.02	-0.19	0.09	0.31	0.02	0.01	0.15	-0.23	0.26	-0.17	0.11	-0.12	
		Año														
Factor	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59		
1	0.22	0.19	-0.04	0.28	0.02	-0.09	0.06	-0.10	-0.05	0.06	0.13	0.23	0.21	0.19		
2	0.02	0.01	-0.28	-0.30	0.06	0.05	-0.05	0.04	-0.08	-0.06	-0.13	-0.11	0.14	0.02		
3	-0.15	-0.08	-0.11	0.08	0.05	0.19	0.04	0.04	0.29	0.19	0.00	-0.08	0.09	-0.13		
4	0.22	-0.05	-0.05	-0.04	0.14	0.29	-0.12	0.07	-0.19	-0.09	0.02	0.07	0.15	-0.03		
5	0.15	0.13	0.16	-0.10	-0.10	0.18	0.08	0.15	0.07	-0.11	-0.18	-0.07	0.04	-0.05		

**Cuadro 3. Y- scores de 5 factores de MCP, estación de primavera**

Total de factores extraídos	Efecto total por factor (%)	Efecto acumulado del factor (%)	Efecto total de la variable	Efecto acumulado de la variable
1	7.7136	7.7136	17.1249	17.1249
2	4.5384	12.252	12.0548	29.1797
3	4.2462	16.4982	5.7585	34.9382
4	4.8616	21.3598	4.4023	39.3405
5	3.1804	24.5402	3.212	42.5525

**Cuadro 4. X- loadings de 5 factores de MCP, estación de verano**

		Año														
Factor	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	-0.10	-0.11	-0.02	0.05	-0.13	-0.03	0.01	0.26	0.12	-0.22	-0.11	0.27	-0.01	-0.18	-0.11	
2	0.27	0.38	0.06	0.05	0.02	-0.13	0.12	0.17	0.06	0.07	-0.22	0.06	-0.13	-0.06	-0.13	
3	0.00	0.07	0.11	-0.09	0.15	0.01	-0.11	-0.09	0.17	-0.21	-0.31	0.02	0.23	-0.12	-0.15	
4	0.07	0.05	0.26	0.19	0.05	0.05	-0.26	0.25	-0.04	-0.18	0.08	0.06	0.21	0.15	-0.09	
5	-0.08	-0.14	0.02	0.21	0.05	0.04	0.15	0.22	0.15	0.16	0.02	-0.09	0.02	-0.10	0.18	
		Año														
Factor	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1	-0.04	0.32	-0.14	-0.01	-0.14	0.18	0.15	0.06	0.00	0.09	0.16	0.00	-0.10	0.09	0.15	
2	0.01	-0.16	-0.29	0.11	-0.01	0.05	-0.12	0.07	0.03	-0.09	0.04	-0.09	0.07	0.00	0.07	
3	-0.05	0.09	-0.10	0.13	-0.08	-0.41	-0.06	0.20	0.03	-0.06	-0.23	-0.01	-0.12	0.11	0.09	
4	0.04	0.12	-0.19	-0.04	0.17	0.21	0.11	-0.39	0.05	-0.27	-0.20	-0.03	-0.08	-0.21	0.03	
5	-0.04	-0.09	-0.12	-0.29	0.35	0.26	-0.16	0.07	0.28	-0.03	0.11	0.06	0.16	-0.25	-0.08	
		Año														
Factor	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	
1	-0.02	0.08	-0.16	0.00	0.05	0.11	-0.02	0.12	-0.13	-0.10	-0.13	-0.09	0.01	0.15	-0.02	
2	0.00	-0.10	0.04	-0.11	0.10	-0.12	0.06	-0.04	-0.07	0.10	0.24	0.23	-0.11	0.20	0.05	
3	0.04	0.16	-0.12	0.06	0.18	-0.09	-0.19	0.03	-0.02	0.14	0.12	-0.27	0.15	0.10	-0.14	
4	-0.07	0.04	0.18	0.19	-0.09	-0.11	-0.04	-0.19	0.21	-0.07	0.14	-0.02	-0.10	0.02	-0.04	
5	-0.01	0.26	-0.22	0.02	0.05	-0.17	-0.04	0.29	-0.18	0.25	0.14	-0.11	0.03	-0.17	-0.12	
		Año														
Factor	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59		
1	0.22	0.16	0.16	0.30	-0.07	-0.10	0.04	-0.16	-0.10	-0.03	0.07	0.25	0.02	0.12		
2	0.02	0.01	-0.20	0.05	0.25	0.17	0.09	-0.01	-0.12	0.14	0.28	0.13	0.22	0.08		
3	-0.12	-0.14	-0.22	-0.02	-0.05	0.09	-0.07	-0.10	0.09	0.10	-0.25	0.02	-0.11	-0.05		
4	-0.10	0.18	-0.17	0.11	-0.15	-0.09	0.00	-0.26	0.06	-0.10	-0.04	-0.16	0.11	-0.07		
5	-0.10	-0.16	0.10	-0.08	0.06	0.09	0.19	-0.26	0.10	0.09	-0.13	0.13	-0.06	-0.11		

**Cuadro 4. Y- scores de 5 factores de MCP, estación de verano**

Total de factores extraídos	Efecto total por factor (%)	Efecto acumulado del factor (%)	Efecto total de la variable	Efecto acumulado de la variable
1	9.8738	9.8738	20.4229	20.4229
2	4.4478	14.3216	9.07	29.493
3	3.9009	18.2225	5.7169	35.2098
4	4.3773	22.5999	2.6015	37.8114
5	3.5619	26.1618	2.8542	40.6656