



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS**

**Tolerancia de Genotipos de *Bouteloua gracilis* a  
Cadmio.**

Tesis que presenta

**Arcelia Martínez Salazar**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias Aplicadas**

En la opción de

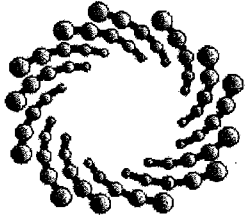
**Ciencias Ambientales**

Codirectores de la Tesis:

Dra. Elisabeth Huber-Sannwald

Dr. José Tulio Arredondo Moreno

San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2005.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 003 del Libro 001 de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 28 días del mes de enero del año 2005, se reunió a las 17:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. José Tulio Arredondo Moreno</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Roberto Briones Gallardo</b>	<b>Secretario</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Elisabeth Huber- Sannwald</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS APLICADAS  
EN LA OPCIÓN DE CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó la C.

**Arcelia Martínez Salazar**

sobre la Tesis intitulada:

*Tolerancia de Genotipos de Bouteloua gracilis a Cadmio*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Elisabeth Huber- Sannwald**  
**Dr. José Tulio Arredondo Moreno**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 19:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

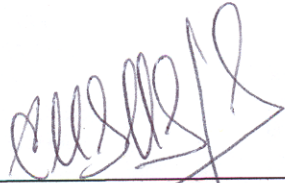
A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 28 días del mes enero de 2005.

  
**Dr. Marcial Bonilla Martínez**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

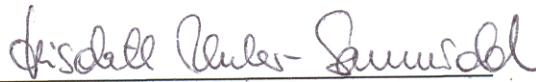


La presente tesis de Maestría en Ciencias Aplicadas en la especialidad de Ciencias Ambientales fue elaborada por Arcelia Martínez Salazar y aprobada el 26 de enero del 2005 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ingeniería Ambiental y Manejo de Recursos Naturales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



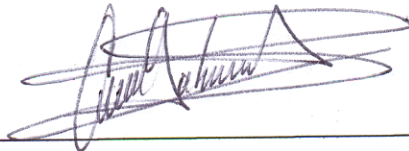
---

Dr. José Tulio Arredondo Moreno  
Codirector de la tesis



---

Dra. Elisabeth Huber-Sannwald  
Codirector de la tesis



---

Dr. Ángel Alpuche Solís  
Miembro del comité tutorial



---

Dr. Roberto Briones Gallardo  
Miembro del comité tutorial

## DEDICATORIAS

Hay hombres que luchan un día y son buenos.  
Hay otros que luchan un año y son mejores.  
Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos,  
Pero hay los que luchan toda la vida:  
Esos son imprescindibles.

Bertolt Brechat

**A mi madre**, por su amor y fortaleza.  
**a mi padre**, se que siempre estará conmigo....

Especialmente: A mi esposo **Tito**,  
y a mis hijas  
**Kathia y María José**  
Por su amor, comprensión,  
y apoyo constante.

## **AGRADECIMIENTOS**

Un toque de naturaleza,  
hermana a todo el mundo.

Shakespeare

Gracias a Dios, en quien creo firmemente. Por todas las bendiciones recibidas.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por brindarme la oportunidad de superarme, por los conocimientos compartidos y por su apoyo brindado. Especialmente al Director General del IPICYT, Dr. José Luis Morán López, al Secretario Académico Dr. Marcial Bonilla, y al Dr. Elías Razo jefe de la División de Ingeniería Ambiental y Manejo de Recursos Naturales.

Al apoyo brindado por el CONACYT para la realización del proyecto 42628.

A los directivos y personal de becas del Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica, y de la Dirección General de Educación Tecnológica Industrial por el apoyo que me brindaron a través del programa Institucional de becas para realizar estudios de posgrado.

Al Coordinador de Enlace de la DGETI en el Estado, al director del Cetis No. 125, compañeros docentes del CETis 125. Y amigas del CETis 125 y CBtis131.

En forma muy especial a mis codirectores de tesis: Dr. José Tulio Arredondo Moreno y Dra. Elisabeth Huber-Sannwald por su apoyo, asesoría y supervisión constante durante todas las fases de este trabajo de tesis. Mi más sincero agradecimiento, y estimación. Muchas gracias por su tiempo y conocimientos compartidos.

Al Dr. Ángel Alpuche Solís por su apoyo y asesoría en la realización de pruebas moleculares, así como al Dr. Roberto Briones Gallardo por su asesoría en el ensayo de metales pesados. Gracias por sus valiosas observaciones y sugerencias.

A los Doctores de los diversos departamentos, así como al personal administrativo y técnicos de laboratorio, de forma particular a los doctores del departamento de Ingeniería Ambiental y Manejo de Recursos Naturales. En forma especial al Dr. José Luis Flores, quien aún cuando no formó parte de mi comité tutorial me hizo valiosas sugerencias y observaciones durante la realización de la fase experimental de este trabajo de tesis. Así como al Dr Haret Rosu por su apoyo y espíritu humanitario que lo caracteriza.

A todo el personal del Departamento de Asuntos escolares sobre todo a la M. C. Elisa. Gracias por todo.

A la M. C. Dulce Partida y a la M. C. Rocío Martínez, técnicos del laboratorio de Ingeniería Ambiental por su apoyo, confianza y amistad.

A la Tec. del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, Verónica Zárate por su apoyo en la realización de la fase molecular y por su amistad. Así como a todo el personal de este laboratorio.

A Margarita, muchas gracias por la ayuda que me brindó en la realización de pruebas de laboratorio y por su amistad.

También quiero agradecer de forma especial a mi compañero de área, Eduardo Medina por su apoyo permanente y asesorías brindadas. Se que vas a ser un gran hombre de Ciencia, pero como lo dijiste algún día, nunca olvides también ser un gran ser humano sobre todo si además te dedicas a la enseñanza.

A todos mis compañeros de la primera y segunda generación de Ciencias Ambientales, especialmente a Claudia, Jorge, y César. Así como a Angélica, Armando, Lalo, Felipe y Leonardo, con quienes tuve la oportunidad de compartir y a quienes admiro por su dedicación y esfuerzo.

A todos mis compañeros de las maestrías de: Materiales avanzados, Control de sistemas y Biología molecular. Sobre todo a Samuel, a J.J. y a Vicente con quienes realicé muchos de mis trabajos, gracias por su amistad.

A mi amiga Rosalinda por su amistad y apoyo, así como a su esposo Juan José, mil gracias.

A mi amiga Alba Elizabeth de la Fac. de Medicina, a María Luisa y Rebeca, gracias por su amistad desde siempre.

A mamá Coco y papá Chava por ser tan entusiastas y por todo el cariño y ayuda que nos han brindado.

Solamente cuando se haya envenenado  
el último río,  
cortado el último árbol,  
y matado el último pez,  
el hombre se dará cuenta...  
que de nada le sirve todo lo demás.

*Inscripción en las cataratas del Iguazú.*



---

---

## Contenido

---

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	1
<b>2</b>	<b>Materiales y métodos</b>	6
2.1	Descripción del sitio	6
2.2	Muestreo	7
2.3	Análisis de variabilidad genética	7
2.4	Ensayo de tolerancia a cadmio	9
2.5	Análisis estadístico de características morfológicas y fisiológicas	12
<b>3</b>	<b>Resultados</b>	13
3.1	Variabilidad genética entre las poblaciones de <i>Bouteloua gracilis</i>	13
3.2	Respuestas de crecimiento, de la morfología, y fisiología de <i>Bouteloua gracilis</i> a cadmio	13
3.2.1	Variables de crecimiento en individuos	13
3.2.2	Variables morfológicas	15
3.2.3	Variables de asignación de biomasa	16
3.2.4	Variables fisiológicas	17
<b>4</b>	<b>Discusión</b>	20
4.1	Análisis molecular	20
4.2	Variables de crecimiento	23
4.3	Variables morfológicas	24
4.4	Variables de asignación de biomasa	25
4.5	Variables de respuesta fisiológicas	26
<b>5</b>	<b>Conclusiones</b>	28
<b>6</b>	<b>Bibliografía</b>	30

---

---

## Lista de Figuras

---

- Figura 1.** Valores de Medias  $\pm$  ES del número de vástagos muertos en la interacción Sitio x Tratamiento. 13
- Figura 2.** Valores de Medias  $\pm$  ES del número de hojas muertas para la interacción Sitio x Tratamiento. 14

---

---

## Lista de Tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Valores de Medias ( $X = \text{retransformadas} \pm \text{ES}$ ), para las variables de crecimiento de individuos bajo los tratamientos con cadmio (Cd) y Testigo (T).	13
<b>Tabla 2.</b> Valores de Medias ( $X = \text{retransformados} \pm \text{ES}$ ) de las variables morfológicas, en función de los tratamientos cadmio (Cd) y testigo (T).	15
<b>Tabla 3.</b> Valores de Medias ( $X \pm \text{ES}$ ) de las variables de asignación de biomasa en función de los tratamientos de Cadmio y Testigo.	16
<b>Tabla 4.</b> Coeficientes para componente lineal y cuadrático $\pm$ el error estándar (ES), de la regresión de curvas de fotosíntesis a temperatura de la hoja comparando el factor sitio (Ejido y La Mesa).	17
<b>Tabla 5.</b> Coeficientes para componente lineal y cuadrático $\pm$ el error estándar (ES), de la regresión de curvas de fotosíntesis a temperatura de la hoja comparando respuestas a tratamientos (Cadmio y Testigo).	18

## Resumen

*Bouteloua gracilis* es una gramínea nativa de pastizales semiáridos de México, que evolucionó bajo condiciones extremas de sequía, herbivoría y fuego, razón por la cual desarrolló diversas adaptaciones morfológicas y fisiológicas a estas condiciones. Una característica de las especies vegetales que han sido capaces de adaptarse a condiciones extremas, es su capacidad para tolerar otros tipos de estrés ambiental. En este trabajo, se estudiaron dos poblaciones de *Bouteloua gracilis*, provenientes de sitios que exhiben niveles de estrés contrastantes debido a historiales de pastoreo contrastantes durante los últimos 70 años y su capacidad para tolerar concentraciones de cadmio en suelo. Los objetivos del estudio fueron: (1) determinar si el grado de disturbio que han sufrido estas poblaciones ha causado diferenciación genética entre las dos poblaciones; (2) examinar si existen diferencias en tolerancia a cadmio y si esta se relaciona con el sitio de origen de la población. Se trabajó con 9 genotipos de *Bouteloua gracilis* por sitio (18 en total). Este estudio se realizó en dos etapas. La primera etapa consistió en examinar si existía diferenciación genética entre las dos poblaciones de *Bouteloua gracilis*, utilizando para ello la técnica de marcadores moleculares con AFLP's. La segunda etapa del estudio consistió en un ensayo de tolerancia a cadmio, para ello se utilizaron los mismos genotipos que en el primer ensayo. Para este ensayo se aplicaron dos tratamientos, uno que consistió en suministrar cada tercer día una solución de nitrato de cadmio (50 ppm), mientras que el grupo testigo recibió solución nitrogenada, cada uno con 5 repeticiones. El ensayo se realizó en el invernadero de la División de Ingeniería Ambiental y Manejo de Recursos Naturales del IPICYT durante 7 semanas. Se realizaron evaluaciones periódicas de variables de crecimiento, morfológicas, de asignación de biomasa y fisiológicas. Los resultados derivados de este estudio, en primer lugar revelaron que el análisis de AFLP no mostró diferenciación genética entre las dos poblaciones que difieren en historial de utilización y grado de estrés. Para el estudio de tolerancia a cadmio se observó que en general *B. gracilis* es una especie muy tolerante a altas concentraciones de cadmio (50 ppm). Aunque el análisis de las variables morfológicas y fisiológicas mostró pocas diferencias en la respuesta de las plantas entre grupos, algunas variables como fue la mortalidad de vástagos y hojas, el área foliar específica, densidad de tejido foliar, tasa de fotosíntesis, etc., mostraron diferencias estadísticas entre los dos grupos. Las diferencias sugieren que el grupo de plantas originario del sitio con mayores niveles de estrés incluye genotipos que exhiben mejores respuestas de crecimiento en presencia de cadmio aunque el estudio no permitió identificar estas respuestas como tolerancia.

---

## Introducción

---

Las plantas exhiben características morfológicas y fisiológicas que han resultado de los procesos de selección natural, las cuales reflejan los mecanismos de adaptación tanto a factores bióticos como abióticos, dentro de éstos podemos citar, por ejemplo, el desarrollo de tricomas y espinas reflejantes como adaptación a ambientes con alta radiación, tejido aerenquimatoso para condiciones de anegamiento, capacidad de extrusión o almacenamiento de iones en suelos salinos o con alto contenido de minerales, etc (Lambers *et al.*, 1998). Los hábitats o condiciones extremos en particular, han favorecido con mayor frecuencia la emergencia de estas características. Existiendo biomas cuyas condiciones para la sobrevivencia son particularmente difíciles, y a pesar de ello las especies vegetales se han adaptado. Aunado a esto, las condiciones actuales en que la presión demográfica ejerce tanto presión directa como indirecta en los ecosistemas, ha propiciado que las especies vegetales se enfrenten a estrés adicional, lo cual se ha constatado puede actuar también como mecanismo de selección (Larcher, 2003; Wilfried, Box 6.3). Un ejemplo de esto es el desarrollo de distintos morfotipos en especies de gramíneas como respuesta a altas intensidades de pastoreo en vegetación de pastizal (Quinn y Miller, 1967; Detling y Painter, 1983; Smith, 1998).

De los ecosistemas naturales, los áridos y semiáridos exhiben gran número de factores que ejercen estrés y gran presión de selección, y son por ende los que favorecen un gran número de adaptaciones. Un ecosistema de este tipo es el pastizal semiárido el cual se ha ligado a un proceso evolutivo con pastoreo intenso, sequía y fuego (Milchunas *et al.*, 1988; Cougenour, 1985). En estos pastizales semiáridos, el sobrepastoreo toma lugar cuando las plantas son

expuestas a pastoreo durante largos periodos de tiempo, y sin tener oportunidad de recuperarse, ocasionando una reducción en la cubierta vegetal, pérdida de vigor, y poco desarrollo anual de plantas preferidas por herbívoros (Stoddart *et al.*, 1975).

Lo anterior puede conducir a que las plantas más apetecidas por los herbívoros decrezcan o desaparezcan (Stoddart *et al.*, 1975), siendo así eliminadas vía selección natural, mientras que las características de las plantas remanentes pueden llegar a ser fijadas en la población con la consecuente disminución de la diversidad genética (Smith, 1998; Falkner y Casler, 2000; Aguado-Santacruz *et al.*, 2004). También como resultado de pastoreo pesado y continuo es común observar cambios en la vegetación, que conducen al deterioro en varias propiedades del suelo (Johnston *et al.*, 1971), y a una mayor aridez debido a que disminuye la capacidad de la vegetación para capturar agua de lluvia (Medina, 2003), se reduce la infiltración (Hanson *et al.*, 1970; Rauzi y Smith, 1973; Thurow *et al.*, 1986), y se incrementa la compactación del suelo vía pisoteo (McGinty *et al.*, 1979; Van Haveren, 1983; Russell *et al.*, 2001).

La evolución de los pastizales semiáridos, también se ha ligado a la ocurrencia de fuegos naturales recurrentes (Axelrod, 1985; McPherson, 1995; Hart, 1997), de tal forma que en aquellos pastizales sometidos a sobrepastoreo, las reducciones concomitantes en biomasa han contribuido a la disminución de la frecuencia de fuegos (Johnsen, 1962; Young y Evans, 1981; Anderson, 1990). Esto ha propiciado cambios en la composición, estructura y diversidad de comunidades nativas, que ha favorecido la invasión de especies no nativas (Burkhardt y Tisdale, 1976; Axelrod, 1985; Ford y McPherson, 1998), causando cambios en las condiciones ambientales.

De igual manera, las actividades agropecuarias e industriales han impuesto nuevas condiciones de estrés a las plantas. Por ejemplo, la industria de la minería, a pesar de los beneficios económicos que resultan de ella, ha provocado graves problemas de contaminación de suelos, derivados de los métodos de extracción y procesamiento de los minerales. Por lo que, una preocupación creciente para

resolver este problema ha explorado varias alternativas entre las que se incluye la fitorremediación.

La fitorremediación se basa en el uso de especies vegetales que tienen la capacidad de absorber y prosperar en presencia de metales tóxicos. Entre estas especies vegetales se encuentran las especies hiperacumuladoras que son un grupo de plantas capaces de acumular en sus tejidos altas concentraciones de metales pesados sin sufrir daño aparente ( Lasat, 1998, 2002; Lombi *et al.*, 2001; Mc Grath, 1998; Skipper y Turco, 1995; Susarla *et al.*, 2002; Reeves y Baker, 1999). En este grupo de especies hiperacumuladoras se encuentran las plantas "metalofitas", las que han mostrado un alto grado de plasticidad genética en virtud de que ciertos ecotipos especializados han evolucionado y desarrollado mecanismos de resistencia a diversos metales pesados (Larcher, 2003). Por ejemplo, *Thlaspi caerulescens* es una metalófita nativa de Inglaterra, de sitios contaminados naturalmente con elevadas concentraciones de metales pesados (Baker y Procter, 1990). Esta especie ha desarrollado adaptaciones morfológicas que incluyen: un mayor desarrollo de tallos, mayor longitud de raíz, e incremento en la longitud de pelos radicales en respuesta a la administración de soluciones ricas en zinc (Whiting *et al.*, 2000). La especie también muestra gran producción de biomasa subterránea (raíz) y patrones zincofílicos de forrajeo de raíz en respuesta a la distribución heterogénea de Zinc en suelo (Haines, 2002).

En las especies de plantas hiperacumuladoras se ha observado que pueden estar presentes alguno o varios de los siguientes mecanismos de tolerancia a metales: a) inmovilización de iones metálicos en la pared celular especialmente por pectinas, b) obstaculización de la penetración y transporte del metal a través de la membrana celular, c) quelación en el citoplasma por la unión del metal a grupos tiol contenidos en polipéptidos y proteínas (fitoquelatinas), y d) compartimentalización y formación de complejos en las vacuolas (Larcher, 2003; Lasat, 2002; Ingrouille y Smirnoff, 1986; Baker *et al.*, 1994; Meerts y Isacker, 1997).

Actualmente se han reportado aproximadamente 400 especies hiperacumuladoras de metales (Baker *et al.*, 2000). La mayoría de estas especies hiperacumuladoras

acumulan níquel, cerca de 30 además acumulan cobalto, cobre, y zinc, y solo pocas especies se han encontrado que acumulen manganeso y cadmio (Lasat, 2002).

El cadmio es un metal altamente tóxico para la mayoría de las plantas, su acción fitotóxica se manifiesta por una disminución de la tasa de fotosíntesis y transpiración, incremento de la respiración, clorosis, oscurecimiento de raíces, inhibición del desarrollo (Kahle, 1993), interrupción de entrada de agua y nutrientes y muerte de la planta (Siripornadulsil *et al.*, 2002; di Toppi y Gabrielli, 1999).

Tomando como base los anteriores antecedentes, en esta investigación se examinó la tolerancia de *Bouteloua gracilis* a la presencia de cadmio en la solución del suelo. La especie seleccionada es una gramínea nativa de los pastizales semiáridos, y también considerada una especie clave para la estabilidad (Hyder *et al.*, 1971), y el mantenimiento de los procesos funcionales de ecosistemas del pastizal y que incluyen, ciclaje de carbono, nutrientes y agua (Hook *et al.*, 1991). *B. gracilis* ha evolucionado bajo diferentes tipos de estrés, como herbivoría, sequía y regímenes de fuego naturales (Coughenour, 1985), y además se ha reportado tolerancia a soluciones salinas de hasta 16,000 ppm (Weiler y Gould, 1983), y gran capacidad para crecer con alta concentración de zinc en la superficie del suelo (White, 1991), y en suelos en los que se han adicionado aguas residuales (Fresquez *et al.*, 1990).

Se estudiaron dos poblaciones de *B. gracilis* que provienen de sitios vecinos en la región semiárida de los Llanos de Ojuelos, Jalisco, que se localiza en la porción meridional del desierto Chihuahuense (Aguado-Santacruz y García-Moya, 1998). Las poblaciones muestran un historial de utilización contrastante. En un sitio (Ejido) los pastizales han sido expuestos a sobrepastoreo por más de 70 años, mientras que el sitio vecino "La Mesa" los pastizales han sido utilizados racionalmente durante los últimos dos siglos. Los diferentes regímenes de pastoreo a que se han expuesto estas poblaciones han generado también diferencias importantes en estrés por sequía y fertilidad.



Los objetivos del presente estudio fueron los siguientes:

- a) Determinar si existe diferenciación genética entre las dos poblaciones de *B. gracilis* sujetas a diferentes regímenes de pastoreo.
- b) Establecer si *B. gracilis* es tolerante a concentraciones de cadmio en suelo y si los patrones de tolerancia están relacionados al historial de utilización de las poblaciones

Las hipótesis planteadas son:

- a) Existirá diferenciación genética entre poblaciones de *B. gracilis* con menor diversidad genética observada en la población colectada del sitio sobrepastoreado.
- b) La población de *B. gracilis* expuesta a mayor grado de estrés natural mostrará en general mayor tolerancia a Cadmio.

---

---

## Materiales y métodos

---

### 2.1 Descripción del sitio.

Se seleccionaron dos poblaciones de plantas de *Bouteloua gracilis*, que mostraban condiciones de estrés contrastantes. Estas dos poblaciones se colectaron en la subprovincia fisiográfica de los Llanos de Ojuelos, Jalisco, que cuenta con una extensión aproximada de 12,000 Km<sup>2</sup> (Arredondo *et al.*, 1986), altitud de 2300 msnm y latitud N 21° 49', W 101° 37'. El clima en esta región es templado seco, y su temperatura media anual oscila entre 12 y 18 °C, con rangos de precipitación anual entre 350 y 450 mm. La mayor parte de esta precipitación ocurre durante el verano en los meses de Junio a Septiembre (Rzedowski, 1981). Los suelos son tipo ígneos de poca a mediana profundidad, con un pH que oscila entre 5.1 a 8.6 (Aguado- Santacruz y García-Moya, 1998).

Los sitios contrastantes incluyeron una propiedad ejidal con un régimen histórico de más de 70 años de sobrepastoreo por herbívoros domésticos (Aguado-Santacruz y García-Moya, 1998). El otro sitio denominado "La Mesa", se encuentra en un predio vecino a no más de 400 m, es una propiedad privada con un régimen histórico de pastoreo moderado durante los últimos 200 años (Aguado-Santacruz y García-Moya, 1998). Las condiciones actuales en el Ejido incluyen sobrepastoreo todo el año, lo que ha conducido a la pérdida de más del 90% de la cubierta vegetal de las gramíneas y un incremento de especies subarbusculares (*Isocoma sp.*, Aguado *et al.*, 2002). Mientras que en el sitio La Mesa el sobrepastoreo es moderado y existe una cobertura vegetal de aproximadamente 35-45%, e incluye mayor diversidad de especies gramíneas perennes y anuales, con dominancia de *B. gracilis* (Aguado *et al.*, 1998, 2002).

## 2.2 Muestreo.

En cada uno de los sitios (Ejido y la Mesa), se colectaron 100 individuos de *B. gracilis* cada uno a una distancia de 10 m. y a lo largo de un transecto de 1 Km de longitud, estos genotipos se sembraron en macetas que contenían un 1 Kg de suelo proveniente de la misma región, y se mantuvieron en condiciones de invernadero sin control ambiental de ningún tipo, y con riego cada tercer día, durante 2 meses. Transcurrido este tiempo, aleatoriamente se seleccionaron 9 genotipos por sitio para realizar el presente estudio, el cual involucró dos ensayos; en el primero, se examinó la variabilidad y estructura genética de *B. gracilis*, y en un segundo estudio donde se examinaron los rasgos fisiológicos, morfológicos y de asignación de biomasa para los individuos de las dos poblaciones.

## 2.3 Análisis de Variabilidad Genética.

Con los 9 genotipos de *B. gracilis* seleccionados aleatoriamente en cada uno de los sitios (18 en total), se realizó el análisis de variabilidad genética utilizando la técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Para ello, primero se llevó a cabo la extracción del ADN según el siguiente protocolo:

Se colectó tejido fresco de hojas de cada uno de los individuos de *B. gracilis*, y se congeló en nitrógeno líquido, 0.05 gramos de este material, se molió por separado en un mortero hasta convertirlo en polvo fino, e inmediatamente después se realizó la extracción de ADN utilizando una modificación del Kit Invitrogen, realizada por Verónica Espericueta en octubre del 2003 (protocolo B-4). Cada muestra de ADN extraído se resuspendió en 100  $\mu$ L de buffer TE, y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para usarlas en los procedimientos posteriores.

Para el análisis de AFLP se usó una modificación del protocolo descrito por Vos (Vos *et al.*, 1995). El protocolo incluyó 4 pasos; i) digestión de 500ng de ADN genómico con enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI* (4  $\mu$ L de la mezcla de estas enzimas por muestra, incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  por 3 hrs), seguida de una incubación a  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos para inactivar las enzimas. Y enseguida se realizó la unión

de los adaptadores a los fragmentos de restricción para crear los templates primarios. ii) preamplificación de los templates primarios con primers de AFLP con un único nucleótido adicional en el extremo 3'. La secuencia de oligos + 1 empleados para cada una de las enzimas fue la siguiente: *EcoRI*+1 (5'-AgACTgCgTACCAATTC/A-3'), *MseI*+1 (5'-gACgATgAgTCCTgAgTAA/C-3').

( iii) Amplificación selectiva de los fragmentos preamplificados con primers de *MseI* + 3 y *EcoRI* + 3, ambos con 3 nucleótidos selectivos en el extremo 3', con la siguiente secuencia de oligos: *EcoRI* +3 (5'-AgACTgCgTACCAATTC/ACC-3'), *MseI*+3 (5'-gACgATgAgTCCTgAgTAA/CAA-3'). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el paso iii fue realizada en un termociclador TouchGene con el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, seguido de un paso de alineación a 65 °C por 30 segundos y una extensión a 72 °C por 60 segundos. Los siguientes 12 ciclos siguieron el formato "touchdown" disminuyendo la temperatura de alineación por 0.7 °C después de cada ciclo hasta llegar a una temperatura de alineación final de 56 °C. El último ciclo fue repetido 23 veces y fue realizado con un perfil de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos, y 72 °C por 60 segundos. iv) Separación por electroforesis de los productos amplificados sobre un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6%, por tres horas a 80Watts y a una temperatura de 50°C. Inmediatamente después, el gel se introdujo en una solución de fijación (fix/stop, ácido acético glacial al 10% en agua destilada) donde se dejó toda la noche, posteriormente el gel se enjuagó 3 veces con agua destilada, y se procedió a su tinción con una solución de nitrato de plata (2g de nitrato de plata, 3 mL de formaldehído al 37% en dos litros de agua destilada), por 30 minutos y con agitación constante, se enjuagó con agua destilada, y se reveló sumergiéndola en una solución de revelado (60 g de carbonato de sodio en 2L de agua), con agitación constante hasta que aparecieron las bandas. Para finalizar el revelado, se agregó 1 L de la solución Fix/stop. Los tamaños de los productos amplificados fueron determinados por comparación con una escala de 25-550 pb AFLP DNA (Gibco-BRL).

Los perfiles de ADN resultantes en el gel fueron escaneados con un escáner de cama doble (Epson EXPRESIÓN 1680) y la imagen resultante analizada en el

programa Cross Checker (v2.91, 1999), a fin de generar una matriz binaria. Bandas polimórficas fueron registradas como 1 (presente) o como 0 (ausente). La frecuencia de alelos de cada locus se estimó usando un método Bayesiano de distribución previa no uniforme de frecuencia de alelos (Zhivotovsky, 1999), y se realizaron estimaciones de frecuencias de alelos y heterocigocidad imparcial esperada (índice de diversidad genética de Nei, 1973) entre los dos grupos de plantas. También se calculó el índice de diferenciación genética ( $F_{st}$  de Wright) con el cual se estimó la diferenciación genética existente entre las dos poblaciones, esto se realizó utilizando el programa AFLP-SURV 1.0 (Vekemans, 2002). El valor significativo de la  $F_{st}$  fue probado por comparación con la  $F_{st}$  observada la cual se obtuvo mediante una distribución nula creada por 1000 permutaciones al azar de individuos entre poblaciones. Adicionalmente, la diferenciación poblacional fue también evaluada por medio de un análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992), usando el programa de cómputo Arlequín V. 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

#### **2.4 Ensayo de tolerancia a cadmio.**

Las mismas plantas que se utilizaron para el análisis de AFLP (9 genotipos del sitio el Ejido y 9 genotipos del sitio la Mesa) se propagaron vegetativamente en el invernadero de la División de Ingeniería Ambiental y Manejo de Recursos Naturales del IPICYT, obteniéndose 10 repeticiones de cada genotipo. A estas plantas se les permitió crecer en macetas que contenían 1 Kg de suelo proveniente de la misma región. Las plantas se mantuvieron en el invernadero sin control ambiental y se proveyó de riego cada tercer día durante un período de 2 meses.

Posteriormente, las plantas se trasplantaron a macetas de 2 Kg que contenían arena, la cual fue previamente tamizada (usando tamices con tamaño de poro de 2 mm y 0.5 mm, respectivamente) y lavada una vez con agua destilada, otra con una solución 0.01 M de ácido nítrico y finalmente otra vez con agua destilada. Los lavados con agua destilada se realizaron a fin de eliminar residuos e impurezas, y

el lavado con solución de ácido nítrico para disolver y eliminar metales como el cadmio. La arena se secó a temperatura ambiente por 5 días; y con una alícuota se determinó la cantidad de agua correspondiente al 70% de saturación (para mantener en todos los tratamientos el mismo nivel de humedad). La arena se colocó dentro de una bolsa de plástico (para reducir pérdidas por percolación) dentro de una maceta y, se le agregó el volumen equivalente al 70% de saturación usando una solución nutritiva que incluyó lo siguiente: 71 mg de  $K_2SO_4$ , 71 mg de  $CaCl_2$ , 20 mg de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10 mg de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 5mg de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2 mg de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.35 mg de  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.18 mg de  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ , y 36 mg de  $KH_2PO_4$ . Al inicio del experimento (7 de septiembre del 2004) Se trasplantaron individuos cada uno con 5 vástagos en cada maceta, cada maceta, incluyendo la planta y el volumen a 70% de saturación fue pesada inmediatamente después del trasplante, para determinar su peso total el cual se mantuvo durante todo el experimento. Para reducir el calentamiento de las raíces, cada maceta se cubrió con papel aluminio.

Se aplicaron 2 tratamientos, solución con y sin cadmio. El tratamiento con cadmio consistió en una aplicación de 60 ml de la solución nutritiva más cadmio (50 ppm de nitrato de cadmio, agregados a una tasa promedio de 2.8 ppm en cada riego) y el tratamiento testigo el cual consistió únicamente en la aplicación de 60 ml de solución nutritiva y agua destilada. En ambos casos se agregó la solución nutritiva en una sola dosis al inicio del estudio, para proveer a todas las plantas de igual cantidad de nutrientes durante toda la fase experimental. En el caso del tratamiento con cadmio, se agregaron 60 mL de la solución de nitrato de cadmio cada tercer día durante las primeras cuatro semanas y se aumentó a 80 mL cada cuatro días durante las tres semanas siguientes. Las macetas que recibieron el tratamiento testigo, se les adicionó en cada riego 5.6 mg de  $KNO_3$  como fuente de nitrógeno el monto equivalente de nitrógeno que se aplicó con la solución de nitrato de cadmio. Las macetas se pesaron antes de agregar la solución para ajustar el contenido de humedad a 70% de saturación con agua desionizada.

A lo largo de las 7 semanas que duró el experimento, se realizaron evaluaciones periódicas de variables morfológicas y de crecimiento del individuo que incluyeron:

producción de vástagos, número de vástagos muertos, y número de hojas muertas. También se evaluó cada cuatro días la tasa de elongación de láminas foliares (dos vástagos de edad similar/maceta) en todas las plantas de ambos tratamientos. En la fase intermedia del ensayo (transcurridos 24 días) y en la fase final (a los 49 días) antes de la cosecha, se realizaron mediciones de intercambio de gases en plantas que recibieron cadmio y en plantas testigo, utilizando un analizador de CO<sub>2</sub> en el espectro infrarrojo (IRGA modelo LCA 4-ADC). Se evaluaron 9 genotipos por sitio y 5 repeticiones por genotipo. La fotosíntesis se midió en un rango de 23 a 36 °C (curvas de fotosíntesis a temperatura), y se registraron las siguientes variables fisiológicas: fotosíntesis, transpiración y variables relacionadas.

A la cosecha, transcurridas 7 semanas desde la implementación del experimento, las plantas se extrajeron cuidadosamente de la arena, utilizando el mismo procedimiento de lavado mencionado anteriormente para la arena. Después de lavar las raíces, las plantas se colocaron inmediatamente en bolsas de sellado hermético (tipo “ziploc”) y se pusieron en refrigeración a 4 °C.

Para el análisis morfológico y de asignación de biomasa, las plantas se separaron en raíces, tallos (vaina) y láminas foliares. De cada fracción se determinó el peso fresco y posteriormente se midieron las siguientes variables: área foliar, ancho promedio de la hoja (cm), longitud máxima foliar (cm), y longitud total de las hojas (cm) con un integrador de área foliar (LI COR, modelo LI-3000). Las raíces frescas se dispersaron en una charola transparente y posteriormente se escanearon en un escáner de cama doble (Epson EXPRESIÓN 1680). La imagen obtenida se analizó con el programa WinRhizo (V1.8c, 2002), para determinar la longitud total (cm), área superficial (cm<sup>2</sup>), diámetro promedio (cm) y el volumen de la raíz (cc). Las tres fracciones de las plantas se secaron en una estufa a 75 °C por 48 h para conseguir el peso seco (g) de hojas, tallos y raíces. Con las medidas de peso fresco y seco se determinaron la asignación de biomasa a diferentes órganos de las plantas: el área foliar específica (m<sup>2</sup>/kg) y la densidad de tejido en hojas (g/g) y raíces (g/g).

## **2.5 Análisis estadístico de características morfológicas y fisiológicas.**

Primero se examinó si la distribución de probabilidad de las observaciones se circunscribía a una distribución normal. Para esto se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks (Zar, 1984). Todas las variables morfológicas, se analizaron con un modelo mixto de análisis de varianza, incluyendo tratamiento (cadmio y testigo), sitio (Ejido y La Mesa) como factores fijos y los genotipos (9 por sitio) como el factor aleatorio. El factor fijo (el sitio) fue comparado con la relación de probabilidad, usando la prueba de F tipo III y usando estimación restringida de máxima probabilidad (PROC MIXED, SAS Institute Inc. 1992). El factor aleatorio (genotipos) se analizó como un factor anidado dentro del sitio y fue probado contra la significancia de los valores z. La variable de tasa de ahijamiento se analizó utilizando un análisis de medidas repetidas mediante un modelo mixto (SAS, 1992).



---

## Resultados

---

### 3.1 Variabilidad genética entre las poblaciones de *B. gracilis*.

La comparación de la heterocigocidad media esperada de las dos poblaciones (índice de diversidad genética de Nei) mostró valores similares entre poblaciones con valores de  $0.401 \pm 0.018$  para plantas del Ejido y  $0.402 \pm 0.021$  para plantas de la Mesa, indicando que no existieron diferencias en diversidad genética entre ambas poblaciones. Igualmente, la prueba de  $F_{st}$  de Wright's para examinar diferenciación genética entre las dos poblaciones de *B. gracilis* ( $F_{st} = 0.0144$ ,  $P = 0.76$ ) no indicó diferencias significativas. Esto a su vez se corroboró con el AMOVA que tampoco detectó diferencias genéticas significativas ( $P = 0.64$ ) entre las dos poblaciones, mientras que la mayor variabilidad (99.7%) fue debido a variabilidad intrapoblacional. Así los resultados sugieren que no existe diferenciación poblacional ni diferencias en diversidad genética entre las poblaciones del sitio sobrepastoreado (Ejido) y los del sitio moderadamente pastoreado (la Mesa, Tabla A, apéndice).

### 3.2 Respuestas de crecimiento, de la morfología y fisiología de *B. gracilis* a cadmio

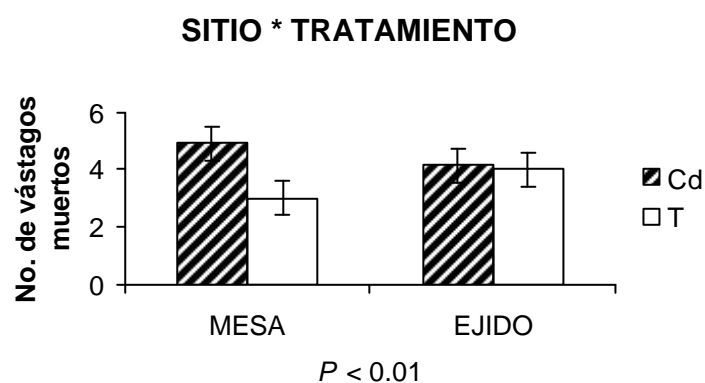
#### 3.2.1 Variables de crecimiento en individuos.

Las plantas que recibieron el tratamiento con cadmio, exhibieron promedios más altos para el número de hojas muertas, número de vástagos muertos, y número de vástagos vivos (Tabla 1; Anexo: Tablas B, C, D). La interacción sitio\*tratamiento mostró diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) para el número de vástagos muertos y número de hojas muertas ( $P < 0.04$ ). Se observaron más vástagos muertos en el

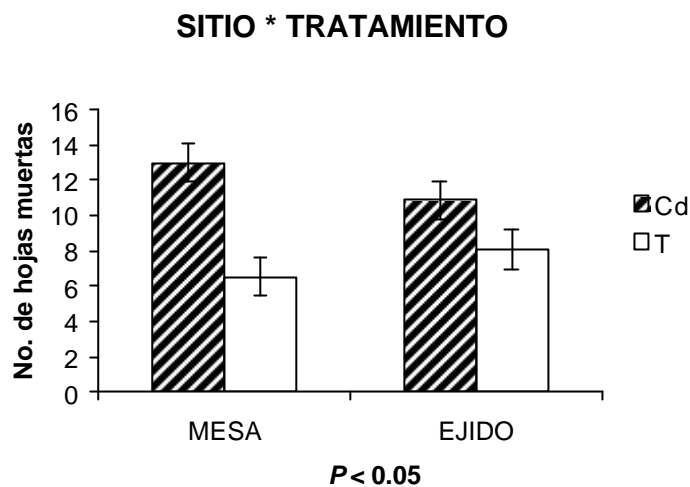
tratamiento con cadmio que en el testigo en la Mesa, mientras en el Ejido el tratamiento con cadmio no tuvo un efecto diferente comparado al testigo (Figura 1). En el caso del número de hojas muertas se observó que, en la Mesa y en el Ejido hubo más hojas muertas con el tratamiento de cadmio que en el testigo, sin embargo el efecto fue mayor en la Mesa (Figura 2). En general, *B. gracilis* también tuvo más vástagos vivos en la solución de cadmio en comparación al tratamiento testigo (factor principal de tratamiento;  $P < 0.05$ ).

**Tabla 1.** Valores de Medias ( $X =$  retransformadas  $\pm$  ES), para las variables de crecimiento de individuos bajo los tratamientos con cadmio (Cd) y Testigo (T).

Variables de Crecimiento	Cadmio (Cd) $X \pm ES$	Testigo (T) $X \pm ES$
Número de hojas muertas	$11.9 \pm 0.81$	$7.29 \pm 0.83$
Número de vástagos muertos	$4.52 \pm 0.44$	$3.51 \pm 0.45$
Número de vástagos vivos	$14.44 \pm 0.56$	$13.16 \pm 0.58$



**Figura 1.** Valores de Medias  $\pm$  ES del número de vástagos muertos en la interacción sitio x tratamiento.



**Figura 2.** Valores de Medias  $\pm$  ES del número de hojas muertas para la interacción Sitio x Tratamiento.

### 3.2.2 Variables Morfológicas.

Las variables morfológicas evaluadas incluyeron: área foliar, longitud máxima foliar, longitud total de las hojas, ancho promedio de la hoja, longitud total de la raíz, área superficial de raíz, volumen de raíz, diámetro promedio de raíz y relación raíz-tallo (Anexo Tablas E, F, G, H, I, J, K, L, M).

De todas las características foliares únicamente se observó un aumento en la longitud máxima foliar (factor principal de tratamiento,  $P < 0.0006$ ; Anexo: Tabla F) y en el ancho promedio de la hoja (factor principal de tratamiento,  $P < 0.01$ ; Anexo: Tabla H) en respuesta al tratamiento de cadmio comparado al tratamiento testigo (Tabla 2).

Con relación a las raíces, no se detectaron diferencias morfológicas del testigo comparado al tratamiento de cadmio ni tampoco entre las diferentes historias de uso de suelo (Tabla 2; Anexo: Tablas I, J, K, L). En ninguna de las variables se detectó un efecto del sitio (Anexo Tablas E, F, G, H, I, J, K, L, M).

**Tabla 2.** Valores de Medias ( $X =$  retransformados  $\pm$  ES) de las variables morfológicas, en función de los tratamientos cadmio (Cd) y testigo (T).

<b>Variables Morfológicas</b>	<b>Cadmio (Cd) X <math>\pm</math> ES</b>	<b>Testigo (T) X <math>\pm</math> ES</b>
Área foliar (cm <sup>2</sup> )	23.98 $\pm$ 0.79	23.01 $\pm$ 0.82
Longitud máxima foliar (cm)	21.26 $\pm$ 0.54	18.42 $\pm$ 0.57
Longitud total de hojas (cm)	128.00 $\pm$ 5.19	135.87 $\pm$ 5.59
Ancho promedio de la hoja (cm)	0.20 $\pm$ 0.004	0.18 $\pm$ 0.004
Longitud total de raíz (cm)	2414.28 $\pm$ 107.83	2459.81 $\pm$ 112.17
Área superficial de raíz (cm <sup>2</sup> )	395.63 $\pm$ 17.67	377.87 $\pm$ 19.44
Volumen de raíz (cm <sup>3</sup> )	5.48 $\pm$ 0.32	4.63 $\pm$ 0.34
Diámetro promedio de raíz (cm)	0.521 $\pm$ 0.01	0.492 $\pm$ 0.01
Relación raíz/tallo	0.395 $\pm$ 0.0	0.375 $\pm$ 0.02

### 3.2.3 Variables de Asignación de Biomasa.

Para este grupo de variables, el área foliar específica fue menor en plantas que recibieron el tratamiento de cadmio que plantas en el tratamiento testigo (factor principal de tratamiento,  $P < 0.0002$ ; Anexo, Tabla N). Por su parte, la densidad del tejido foliar fue menor en las plantas recibiendo el tratamiento de cadmio que en las plantas testigo (factor principal de tratamiento,  $P < 0.04$ ; Anexo: Tabla O).

En el caso de las raíces, se detectó solamente un aumento en el peso seco de las raíces en plantas que crecieron bajo cadmio (peso seco de raíces: factor principal de tratamiento,  $P < 0.05$ ; Anexo: Tabla U; peso fresco de raíces: factor principal de tratamiento,  $P > 0.5$ ; Anexo: Tabla T) pero la densidad del tejido de las raíces no difirió entre los dos tratamientos (Tabla 3;  $P > 0.4$ , Anexo: Tabla V).

El peso fresco y seco de las hojas fue mayor para plantas que recibieron cadmio comparadas al testigo (peso fresco de hojas: factor principal de tratamiento,  $P < 0.0002$ ; Anexo: Tabla P; peso seco de hojas: factor principal de tratamiento,  $P < 0.0002$ ; Anexo Tabla Q). El factor sitio no causó ningún cambio en las características de asignación de biomasa (Anexo: Tablas N, O, P, Q, R, T, U, V).

**Tabla 3.** Valores de medias ( $X \pm ES$ ) de las variables de asignación de biomasa para los tratamientos de cadmio y testigo.

<b>Variables de Asignación de Biomasa</b>	<b>Cadmio <math>X \pm ES</math></b>	<b>Testigo <math>X \pm ES</math></b>
Área foliar específica ( $m^2/g$ )	$7.35 \pm 0.16$	$8.35 \pm 0.17$
Densidad del tejido de la hoja (g/g)	$0.476 \pm 0.00$	$0.497 \pm 0.00$
Peso fresco de hojas (g)	$0.705 \pm 0.02$	$0.564 \pm 0.02$
Peso seco de hojas (g)	$0.334 \pm 0.01$	$0.278 \pm 0.01$
Peso fresco de tallos (g)	$2.54 \pm 0.02$	$2.46 \pm 0.02$
Peso seco de tallos (g)	$0.890 \pm 0.10$	$1.045 \pm 0.11$
Peso fresco de raíz (g)	$4.404 \pm 0.24$	$4.183 \pm 0.25$
Peso seco de raíz (g)	$0.495 \pm 0.02$	$0.039 \pm 0.02$
Densidad del tejido de la raíz (g/g)	$0.072 \pm 0.02$	$0.039 \pm 0.02$

### 3.2.4 Variables Fisiológicas

La tasa de elongación de la hoja fue mayor en plantas de *B. gracilis* que recibieron cadmio comparado a las plantas testigo (factor principal de tratamiento,  $P < 0.002$ , Anexo: Tabla W), mientras el origen de las plantas (sitio) no afectó la tasa de elongación de la hoja (Anexo: Tabla W).

Para el análisis de la fotosíntesis se utilizó un modelo polinomial cuadrático, a fin de comparar la tasa de incremento (componente lineal) de la fotosíntesis y la tasa de fotosíntesis saturada (componente cuadrático). Con relación al origen de las plantas, se observó que el incremento de la tasa de fotosíntesis (componente

lineal), mostró diferencias significativas entre sitios ( $P < 0.03$ ,  $b = 1.75 \pm 1.00$  para ejido,  $b = 3.34 \pm 1.887$  para la Mesa, Tabla 4, Anexo Tabla AA).

Se observó que las plantas originarias de la Mesa mostraron casi el doble en la tasa de fotosíntesis comparadas al grupo de plantas del Ejido. Igualmente se observaron diferencias significativas entre sitios en el caso de fotosíntesis de saturación (componente cuadrático) a aumentos de temperatura ( $P < 0.009$ ,  $b = -0.034 \pm 0.014$  para Ejido,  $b = -0.064 \pm 0.028$  para la Mesa, Tabla 4). El valor negativo (-) del coeficiente cuadrático, indicó que la tasa de fotosíntesis decreció más rápidamente en las plantas del sitio de la Mesa (Tabla 4) con incrementos de la temperatura.

Cuando se evaluó la tasa de fotosíntesis como una función de la temperatura de la hoja no se observaron diferencias en la tasa de incremento de la tasa de fotosíntesis (componente lineal) entre las plantas que recibieron cadmio y las testigo conforme la temperatura de la hoja incrementó ( $P < 0.09$ ,  $b = 2.261 \pm 1.264$  para testigo,  $b = 0.3539 \pm 1.380$  para cadmio, Tabla 5). Igualmente la tasa de fotosíntesis saturada (componente cuadrático no mostró diferencias entre tratamientos, aunque el valor probabilístico fue marginal ( $P < 0.08$ ,  $b = -0.045 \pm 0.018$  para testigo,  $b = -0.014 \pm 0.020$  para cadmio, Tabla 5).

**Tabla 4.** Coeficientes para componente lineal y cuadrático  $\pm$  el error estándar (ES), de la regresión de curvas de fotosíntesis a temperatura de la hoja comparando el factor sitio (Ejido y La Mesa).

<b>Coeficiente</b>	<b>Ejido</b>	<b>La Mesa</b>
<b>Lineal <math>\pm</math> ES</b>	1.7503 $\pm$ 1.000	3.3400 $\pm$ 1.8779
<b>Cuadrático <math>\pm</math> ES</b>	- 0.0344 $\pm$ 0.0146	- 0.0648 $\pm$ 0.0280
<b>Intercepto <math>\pm</math> ES</b>	- 2.3039 $\pm$ 17.02	- 19.291 $\pm$ 31.1878

**Tabla 5.** Coeficientes para componente lineal y cuadrático  $\pm$  el error estándar (ES), de la regresión de curvas de fotosíntesis a temperatura de la hoja comparando respuestas a tratamientos (Cadmio y Testigo).

<b>Coeficiente</b>	<b>Cadmio</b>	<b>Testigo</b>
<b>Lineal <math>\pm</math> ES</b>	0.359 $\pm$ 1.38	2.261 $\pm$ 1.264
<b>Cuadrático <math>\pm</math> ES</b>	-0.014 $\pm$ 0.020	- 0.0457 $\pm$ 0.0184
<b>Intercepto <math>\pm</math> ES</b>	23.391 $\pm$ 22.981	- 6.3648 $\pm$ 21.5364

---

## Discusión

---

El historial evolutivo de *B. gracilis* la especie clave del pastizal semiárido esta asociado con el desarrollo de características morfológicas y fisiológicas que le confieren resistencia al pastoreo, sequía y fuego (Coughenour, 1985; Belsky *et al.*, 1993; Rosenthal y Kotanen, 1994). Se han reportado rasgos como el incremento en el número de vástagos, el incremento en la tasa de fotosíntesis, altas tasas de crecimiento, alta capacidad de almacén de carbono en raíz y corona, capacidad para movilizar reservas de carbono de la raíz a los tallos, como algunas de las características que *B. gracilis* desarrolló a los factores antes mencionados (Strauss y Agrawal, 1999). En esta investigación nosotros partimos de la hipótesis, de que los genotipos de *B. gracilis* provenientes de un sitio con un régimen histórico de sobrepastoreo y un alto nivel de estrés asociado (ej. sequía, infertilidad, salinidad, etc, Medina, 2003) serían más tolerantes a la presencia de altas concentraciones de cadmio, comparado a los genotipos de un sitio con historial de uso moderado y menor nivel de estrés ambiental, esto basado en el principio de selección convergente.

### 4.1 Análisis Molecular

Con base en reportes previos en los que se enfatizan las diferencias morfológicas y fisiológicas entre poblaciones que difieren el grado de estrés o impacto, por ejemplo herbivoría (Painter *et al.*, 1993; Detling y Painter, 1983; Smith, 1998; Kotanen y Bergelson, 2000) se esperaba encontrar que las poblaciones de *B. gracilis* originarias de sitios contrastantes en el nivel de pastoreo (contraste entre



área sobrepastoreada-Ejido vs. área con pastoreo moderado-Mesa) mostrarían diferenciación genética entre poblaciones. Sin embargo, el análisis estadístico de los perfiles de ADN y que incluyó; el índice de diversidad genética de Nei, el índice de fijación  $F_{st}$  de Wright y el análisis de varianza molecular (AMOVA), además de revelar valores similares de diversidad genética (índice de diversidad de Nei) entre los dos grupos, tampoco mostró diferenciación poblacional ni con el índice de fijación ( $F_{st}$  de Wright), ni con el AMOVA (Tabla 1). En el caso del AMOVA la mayor variabilidad genética se observó dentro de las poblaciones con un 99.3% y solamente 0.7% de variación genética ocurrió entre poblaciones.

Algunos estudios previos en los cuales se examinó la diversidad genética morfológica (Quinn y Miller, 1967; Detling y Painter, 1983; Carman y Briske, 1985; Painter *et al.*, 1989; Smith, 1998) reportaron menores valores de los componentes de varianza para los diferentes variables morfológicas examinadas en la población que tenía un historial de pastoreo intenso. Con esos antecedentes, se esperaba observar pérdidas de la diversidad genética en el grupo de plantas provenientes del ejido, debido a su largo historial de intensa utilización, sin embargo el índice de diversidad que determinamos resultó igual en las dos poblaciones (0.401 y 0.402 para Ejido y Mesa respectivamente). Así, parece ser que *B. gracilis* muestra gran resistencia a la pérdida de su banco genético a pesar de observarse grandes diferencias en cubierta vegetal (<15% vs. >40% para Ejido y Mesa respectivamente, Aguado-García Moya, 1998).

Es importante también recalcar el hecho de que los dos grupos no mostraron diferenciación poblacional (índice de fijación y AMOVA) a pesar de las diferencias en historial de uso y la posible preponderancia de poblaciones con ciertas características (ej. rasgos relacionados a resistencia a herbivoría). Estos resultados difieren de otro estudio en la misma región, en el cual se reportó diferenciación genética entre poblaciones de *B. gracilis* sujetas a diferentes regímenes de pastoreo (Aguado-Santacruz *et al.*, 2002). En este estudio, el esquema de muestreo fue tal, que no separó efectos ambientales (ej. pastoreo, sequía, etc) de los efectos geográficos, y además usaron RAPD. De ahí que sus resultados no son comparables con los del presente estudio.

Los resultados de este estudio coinciden con investigaciones recientes en las cuales tampoco se detectó diferenciación genética entre poblaciones de plantas en respuesta al grado de herbivoría (Arredondo *et al* datos sin publicar 2004; Matlaga y Karoly, 2004). En el caso del estudio por Arredondo y col. (datos sin publicar) se emplearon 3 especies de gramíneas entre las que se incluyó *B. gracilis*. El análisis de perfiles de ADN obtenidos mediante AFLP's no indicó diferenciación en *B. gracilis* pero si en *Poa ligularis* con valores intermedios para *Bouteloua curtipendula*. Este resultado se interpretó como una respuesta dependiente del grado de historial evolutivo de las especies de gramíneas con herbívoros ungulados. Así, se observó diferenciación poblacional y pérdida de diversidad claramente en *P. ligularis*, una especie de la estepa patagónica que no coevolucionó con herbívoros ungulados, mientras *B. gracilis* que es una especie a la que se le atribuye una larga historia evolutiva con herbívoros, no mostró diferenciación.

Por otro lado, tomando en consideración que las dos poblaciones de *B. gracilis* proceden de sitios con niveles contrastantes de pastoreo pero vecinos entre sí (máximo 400 metros entre sitios); es posible también que los efectos del apacentamiento sobre la variabilidad genética neutral pudieran haber sido superados por el flujo genético entre ambas poblaciones debido a su cercanía (Matlaga y Karoly, 2004). Se ha comprobado que el polen y en ocasiones las semillas pueden ser dispersadas por el viento a distancias de aproximadamente 800 m, lo que propicia que el flujo genético pueda ocurrir entre sitios vecinos (Richards, 1986) y con posibilidades muy altas para nuestro caso.

Otro aspecto es que el tamaño de muestra empleado en este trabajo, que es demasiado bajo para estudios poblacionales pudiera ser otro factor que estuviese influenciando los resultados. Sin embargo estos dos grupos de pastos también fueron estudiados utilizando un tamaño recomendado de muestra (100 genotipos de cada sitio, Arredondo *et al.*, datos sin publicar), y aun así tampoco se detectó diferenciación genética entre estas poblaciones.

Finalmente, aún y cuando los resultados no mostraron diferenciación genética entre las dos poblaciones de *B. gracilis* a pesar de exhibir un historial de uso

contrastante, esto no indica que no existan cambios a nivel de expresión génica de características que confieren tolerancia a herbivoría u otro factor ambiental. Debido a que esta investigación se limitó a estudiar solo la variación genética a nivel del genoma y no los mecanismos involucrados en la expresión de genes es posible que los cambios directamente involucrados en la expresión de genes no pudieran ser detectados.

#### **4.2 Variables de crecimiento.**

Los resultados de este estudio, no revelaron diferencias significativas en la mayoría de las variables morfológicas y fisiológicas en función del sitio de procedencia o la exposición a soluciones con cadmio, lo que es congruente con los resultados derivados del análisis molecular, en el que tampoco se observó diferenciación genética entre las dos poblaciones de *B. gracilis*.

Se observó que la interacción sitio\*tratamiento mostró diferencias significativas entre sus valores promedio en las variables de número de vástagos muertos y marginalmente el número de hojas muertas.

Por ejemplo, en poblaciones de plantas que se desarrollan en hábitats extremos, éstas deben exhibir suficiente plasticidad para ajustarse a un nivel particular de disponibilidad de recursos a través de combinaciones en el que se ajusta el tamaño y la densidad de las plantas. Cuando se examinan los aspectos de crecimiento de individuos en gramíneas, el reclutamiento de vástagos a partir de propagación vegetativa es más consistente, debido a que los vástagos juveniles pueden importar recursos de vástagos maduros (Tripathi y Harper, 1973). Cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés, los vástagos juveniles que aun son dependientes de los vástagos maduros, no pueden competir por recursos y son los primeros en morir (Parson *et al.*, 1984).

En este estudio se pudo observar que las plantas de *B. gracilis* sometidas a estrés por cadmio manifestaron mayor mortalidad de vástagos que las plantas que no recibieron cadmio (Figura 1). El estudio mostró que hubo además un mayor promedio de vástagos muertos en el sitio la Mesa (pastoreo moderado), que en el

sitio el Ejido (sobrepastoreo) cuando se aplicó cadmio, este último fue el grupo de plantas con mayor exposición a estrés. Estos resultados son congruentes con la hipótesis de la cual partimos, de que genotipos provenientes del sitio con menor estrés (pastoreo moderado) serían más susceptibles al cadmio que los del sitio con mayor estrés (sobrepastoreo).

Aparentemente, parte de esta mayor tasa de mortalidad en presencia de cadmio, fueron compensadas por mayores tasas de producción de nuevos vástagos en este mismo tratamiento (datos no presentados). Esta respuesta coincide con estudios en dos especies de gramíneas tolerantes a metales pesados: *Vetiveria zizanioides* y *Cynodon dactylon* las cuales mostraron incrementos en el número de vástagos en presencia de jales conteniendo diversos metales pesados y residuos domésticos (Shu *et al.*, 1998).

Cuando se evaluó el número de hojas muertas de los genotipos de *B. gracilis* tratados con cadmio también se encontró mayor mortalidad promedio que las plantas testigo, sin embargo esto se circunscribió a las láminas foliares maduras (Figura 2). Ernst,(1974) reportó que la traslocación de metales pesados de raíz a tallos ocurre preferentemente por una ruta hacia láminas maduras y evita láminas jóvenes, de ahí la preponderancia de senescencia en hojas maduras.

#### **4.3 Variables Morfológicas.**

De las variables morfológicas evaluadas en las plantas de *B. gracilis* solamente se observaron respuestas diferenciales al tratamiento en la longitud máxima foliar, el ancho promedio de la hoja, y marginalmente el volumen de la raíz. Particularmente, la longitud máxima y el ancho promedio de las hojas resultó mayor en las plantas que recibieron cadmio (Tabla 2). Esto coincide con la respuesta de las gramíneas a otros tipos de estrés, tal como herbivoría, en las que se ha observado una excesiva demanda de carbono para la formación de nuevos vástagos, lo cual puede conducir a la expansión del área de la hoja, así como a un incremento de desarrollo de la hoja, lo cual puede ocurrir con incrementos concomitantes de la tasa de fotosíntesis para suplir estas demandas (Briske y

Richards, 1995). Sin embargo, con los resultados obtenidos en el presente estudio, no se puede establecer si estos mecanismos están relacionados.

A pesar de las implicaciones que puede tener el sistema radical en ambientes con alta concentración de metales pesados, no observamos mayor efecto de las aplicaciones de cadmio en la longitud de la raíz. Este resultado difiere de las respuestas observadas en otras gramíneas como lo es el caso de *Cynodon dactylon*, en el que su alta tolerancia a diversos metales pesados se ha asociado con la elongación de la raíz (Shu, 1997; Shu *et al.*, 1998). Aunque este estudio no mostró incrementos significativos en la longitud de la raíz en *B. gracilis*, si se observó un efecto marginalmente significativo en el volumen de la raíz, lo que puede estar relacionado con respuestas de tolerancia a metales pesados como son: el aumento en ramificaciones de la raíz y en la longitud de los pelos radicales, que han sido reportadas para *Thlaspi caerulescens* (Whiting *et al.*, 2000).

#### **4.4 Variables de Asignación de Biomasa.**

En cuanto a las variables de asignación de biomasa, se observó que las plantas que recibieron cadmio, tienden a reducir el área foliar específica y la densidad del tejido de la hoja, pero incrementan el grosor de la hoja, el peso fresco y seco de las hojas (Tabla 3). Estos resultados parecen estar relacionados con múltiples estudios en los que se ha observado que las plantas que crecen en condiciones extremas (infertilidad, sequía, temperatura, etc.) tienden a invertir menos en producción de área foliar, y esto se traduce usualmente en una mayor inversión a pared celular y compuestos secundarios los cuales son equivalentes a una mayor inversión en el contenido de materia seca. Estas características confieren mayor robustez a la hoja mejorando así su resistencia a condiciones adversas (Bell, 1981; Bazzaz *et al.*, 1987; Baas, 1989).

El decremento en la densidad del tejido de la hoja en el presente estudio, no coincide con la respuesta de esta variable a condiciones de estrés. Esta respuesta se puede explicar parcialmente en función de los componentes del área foliar específica. El área foliar específica esta constituida tanto por dos componentes, la

concentración de materia seca y el grosor de la hoja (Ryser y Lambers, 1995). En este estudio usamos el contenido de materia seca como un estimado de la concentración de materia seca (Shiple y Vu, 2002), así el decremento en área foliar específica ocurrió concomitantemente con incrementos del grosor de la hoja (Tabla 3). Esto sugiere que aunque se redujo la síntesis de compuestos asignados a pared celular se dio de cualquier manera, un engrosamiento de la lámina, posiblemente por aumento del volumen vacuolar. Se ha observado que en células estresadas por cadmio, puede llevarse a cabo la formación de ciertos compuestos como fitoquelatinas, las cuales secuestran el cadmio y lo conducen y depositan en vacuolas para su compartimentalización (Siripornadulsil, 2002; Howe y Merchant, 1992; Kaplan *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1998; Guerinot, 2000; Hu *et al.*, 2001). Y esto se puede traducir en incrementos del grosor de la hoja.

#### **4.5 Variables de Respuesta Fisiológicas.**

La tasa de elongación de la hoja en plantas de *B. gracilis* mostró aceleración de la elongación cuando recibió solución conteniendo cadmio comparado a plantas que recibieron únicamente solución nutritiva. Esta respuesta coincide con la respuesta observada por otras especies y expuestas a otros tipos de estrés, por ejemplo herbivoría, la cual promueve en gramíneas mayores tasas de elongación de la hoja (Wallace *et al.*, 1985; Wolf y Parrish, 1982). Sin embargo, el cadmio es un fitotóxico poderoso que causa interrupción del crecimiento (Steffens, 1990) y eventualmente la muerte. Una posible explicación para esta respuesta quizás se relaciona con la liberación de recursos (fotoasimilatos y nutrientes). De esta forma, la exposición a cadmio puede provocar mortalidad de hojas y vástagos (Tabla 2) quedando así recursos adicionales para el crecimiento de las hojas.

Cuando se establecieron las curvas de fotosíntesis como función de la temperatura se observó que las plantas expuestas al cadmio exhibieron menores tasas de fotosíntesis (Tabla 4), así como decrementos más rápidos con incrementos de temperatura cuando se alcanzó la saturación de fotosíntesis. Otros estudios han mostrado respuestas variables de la fotosíntesis cuando las plantas

son expuestas a metales pesados. Por ejemplo, el estudio de Nielsen (Nielsen *et al.*, 2003) mostró que los efectos negativos de la acumulación de cobre en las reacciones fotosintéticas de *Fucus serratus* dependieron de la exposición previa de las plantas a contaminación de cobre y al desarrollo de tolerancia. De esta manera, las plantas originarias de sitios contaminados no mostraron efectos en las reacciones fotosintéticas, a altas concentraciones de cobre. También se puede resaltar que el grupo de plantas provenientes del sitio con menor grado de estrés (la Mesa) mostraron tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> casi doble al grupo de plantas del sitio con mayor estrés (Ejido). Si las condiciones de uso del Ejido han producido efectos negativos en fertilidad y humedad del suelo y además ha existido eliminación sistemática de individuos (aunque el análisis molecular no lo respalda), es posible que las plantas predominantes en el Ejido incluyan genotipos de baja tasa de crecimiento y posiblemente menores tasas de asimilación de CO<sub>2</sub>, esto sin embargo no se puede verificar con el presente estudio.

---

## Conclusiones

---

La totalidad de las plantas de los diferentes genotipos de *B. gracilis* que se utilizaron en este estudio, sobrevivieron al tratamiento de cadmio independientemente de las condiciones contrastantes de su sitio de origen. El estudio además mostró que las plantas de *B. gracilis* ajustaron su crecimiento, la morfología, sus patrones de asignación de biomasa en raíces y en tallos y otros aspectos fisiológicos, cuando estas fueron expuestas a una alta concentración de cadmio. Aunque las respuestas entre grupos (Ejido vs. La Mesa) fueron generalmente similares, el ensayo mostró que hubo diferencias entre los genotipos de la Mesa y del Ejido en variables de crecimiento principalmente, las cuales indican que las plantas del Ejido tienen más tolerancia a altas concentraciones de cadmio, lo anterior se observó en el menor número de vástagos muertos y hojas senescentes que se registraron en el grupo proveniente de la Mesa. Con respecto a las otras variables no se pudo establecer un patrón de respuesta que indicara ventaja de un grupo sobre otro.

Fue claro también que la aplicación de una solución de cadmio provocó ajustes importantes en las plantas en general, estos ajustes tuvieron que ver principalmente con cambios en la asignación de biomasa a tejidos (área foliar específica, densidad de tejido de la hoja, grosor de la hoja) y la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>. Los ajustes de las plantas a cadmio incluyeron el desarrollo de hojas con baja área foliar específica y tasa de fotosíntesis.

Finalmente el efecto del sitio de origen (condiciones de estrés contrastante) no fue muy conspicuo aunque si se observó en contadas ocasiones (ej. número de vástagos muertos, fotosíntesis, etc). No es claro si estas pocas diferencias que se detectaron tengan que ver con el resultado del análisis molecular, el cual mostró



que no existió diferenciación poblacional entre poblaciones. Es claro que existe mucha controversia entre la coincidencia de las variables neutras (marcadores) y las variables cuantitativas y el número de individuos que se utilizaron en el presente estudio impide alcanzar una respuesta concluyente.

En conclusión, se puede mencionar que *B. gracilis* tiene capacidad de tolerancia a cadmio y que existe aparentemente una relación entre un origen con alto grado de estrés y su tolerancia a cadmio.

---

## Bibliografía

---

**Aguado-Santacruz, G.A., and E. García-Moya. 1998.** Environmental factors and community dynamics at the southernmost part of the North American Graminetum. I. On the contribution of climatic factors to temporal variation in species composition. *Plant Ecology* 135: 13-29.

**Aguado-Santacruz, G.A., N.E. Leyva –López, K.I. Pérez-Márquez, E. García-Moya, J.T. Arredondo-Moreno, and J.P. Martínez-Soriano. 2004.** Genetic variability of *Bouteloua gracilis* populations differing in forage production at the southernmost part of the North American Graminetum. *Plant Ecology* 170:287-299.

**Anderson, R.C. 1990.** The historic role of fire in the North American grassland. *In Fire in North American Tallgrass Praires* (Collins, S. L. and Wallace, L. L., eds), pp 8-18. Norman, OK: University of Oklahoma Press.

**Arredondo, J.T., M. Giner, M. Alcocer, and M. García. (1986).** El manejo de pastizales en la ganadería extensiva de zonas áridas. En: *Ganadería extensiva de zonas áridas y semiáridas del altiplano central*. CIPEJ-CE Vaquerías. Jalisco.

**Axelrod, D.I. 1985.** Rise of the grassland biome in central North America. *Botanical Review* 51: 163-202.

**Baas, W.J. 1989.** Secondary plant compounds, their ecological significance and consequences for the carbon budget. Introduction of the carbon/nutrient cycle theory. In: *Causes and Consequences of Variation in Growth Rate and Productivity of Higher Plants* (Ed. by H. Lambers, M.L. Cambridge, H. Konings and T.L. Pons), pp 313-340. SPB Academic Publishing, The Hague.

**Baker, A.J.M., and J. Procter. 1990.** The influence of cadmium, copper, lead, and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. *Plant Systematics and Evolution* 173: 91-108.

**Baker, A.J.M., R.D. Reeves, and A.S.M. Hajar. 1994.** Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J & C. Presl. (Brassicaceae). *New Phytologist* 127: 61-68.

- Baker, A.J.M., S.P. McGrath, R.D. Reeves, and J.A.C. Smith. 2000.** Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. P. 85-107. In N. Terry and G. Bañuelos (ed) Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Bazzaz, F.A., N.R. Chiariello, P.D. Coley, and L.F. Pitelka. 1987.** Allocating resources to reproduction and defense. *BioScience* 37: 58-67.
- Bell, J.J. 1981.** The Physiological role (s) of secondary (natural) products. *Biochemistry of Plants*. Vol 7 : 1-19.
- Belsky, A.J., W.P. Carson, C.L. Jensen, and G.A. Fox. 1993.** Overcompensation by plants: herbivore optimization or red herring? *Ecology and Evolution* 7: 109-121.
- Briske, D.D., and J.H. Richards. 1995.** Plant Responses to Defoliation: A Physiological, Morphological and Demographic Evaluation. *Rangeland Plant Physiology*: 636-709.
- Brougham, R.W., and W. Harris. 1967.** Rapidity and extent of changes in genotypic structure induced by grazing in a ryegrass population. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 10: 56-65.
- Burkhardt, J. W., and E. W. Tisdale. 1976.** Causes of juniper invasion in southwestern Idaho. *Ecology* 76: 472-484.
- Carman, J.G., and D.D. Briske. 1985.** Morphological and allozymic variation between long-term grazed and non grazed populations of the bunchgrass *Schizachyrium scoparium* var. *Frequens*. *Oecologia* 66: 332-337.
- Cohen, C.K., T.C. Fox, D.F. Garvin, and L.V. Kochian. 1998.** The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy metal transport in plants. *Plant Physiology* 116: 1063-1072.
- Coughenour, M.B. 1985.** Graminoid responses to grazing by large herbivores: adaptations, exaptations, and interacting processes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 72: 852-863.
- Detling, J.K., and E.L. Painter. 1983.** Defoliation responses of western wheatgrass populations with diverse histories of prairie dog grazing. *Oecologia* 57: 65-71.
- Di Toppi, L.S. and R. Gabrielle. 1999.** Response to Cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.

**Excoffier L., P.E. Smouse, and J.M. Quattro. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

**Falkner, L.K., and M.D. Casler . 2000.** Genetic shifts in smooth brome grass under grazing: changes in nutritional value and preference for surviving vs. Original genotypes. Blackwell Science Ltd. *Grass and Forage Science* 55: 351-360.

**Felsenstein, J. 1986.** PHYLIP. Phylogeny Inference Package, Version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.

**Ford, P.L., and G.R. McPherson, G.R. 1998.** Experimental fire research in semi-arid shortgrass prairie. In *The Future of Arid Grasslands: Identifying Issues, Seeking Solutions*. Pp. 107-116. Fort Collins, CO: USDA Forest Service Rocky Mountain Research Station Report RMRS-P-3.

**Fresquez, P.R., R.E. Francis, and G.L. Dennis. 1990.** Soil and vegetation responses to sewage sludge on a degraded semiarid broom snakeweed/blue grama plant community. *Journal of Range Management* 43(4): 325-331.

**Guerinot, M.L. 2000.** The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 190-198.

**Haines, B.J. 2002.** Zincophilic root foraging in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 155: 363-372.

**Hanson, C.L., A.R. Kuhlman, C.J. Erickson, and J.K. Lewis. 1970.** Grazing effects on runoff and vegetation on western South Dakota rangeland. *Journal of Range Management* 23: 418-420.

**Hart, R.H., and J.A. Hart. 1997.** Rangelands of the Great Plains before European Settlement. *Rangelands* 19: 4-11.

**Hook, P.B., I.C. Burke, and W.K. Lauenroth. 1991.** Heterogeneity of soil and plant N and C associated with individual plants and openings in North American shortgrass steppe. *Plant and Soil* 138: 247-256.

**Howe, G., and S. Merchant. 1992.** Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 98: 127-136.

**Hu, S., K.W.K. Lau, and M. Wu. 2001.** Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science* 161: 987-996.

**Hyder, D.N., A.C. Everson, and R.E. Berment. 1971.** Seedling morphology and seedling failures with blue grama. *Journal of Range Management* 29: 214-216.

- Ingrouille, M.J., and N. Smirnoff. 1986.** *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. (T. Alpestre) in Britain. *New Phytologist* 102: 219-233.
- Johnsen, T.N. 1962.** One-seed juniper invasion of northern Arizona grasslands. *Ecological Monographs* 32: 187-207.
- Johnston, A., J.F. Dormaar, and S. Smoliak. 1971.** Long-term grazing effects on fescue grassland soils. *Journal of Range Management* 24: 185-188.
- Kahle, H. 1993.** Response of roots of trees to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 33: 99-119.
- Kaplan, D., Y.M. Heimer, A. Abeliovich, and P.B. Goldsbrough. 1991.** Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. *Plant Science* 109: 129-137.
- Kotanen, P.M., and J. Bergelson. 2000.** Effects of simulated grazing on different genotypes of *Bouteloua gracilis*: how important is morphology? *Oecologia* 123: 66-74.
- Lambers, H., F.S. Chapin III, and T.L. Pons. 1998.** *Plant Physiological Ecology*. New York, USA: Springer-Verlag.
- Larcher, U.V. 2003.** *Physiological Plant Ecology*. Springer Verlag Pp 428-436.
- Lasat, M.M. 1998.** The Use of plants for the removal of toxic metals from contaminated soil. American Association for the Advancement of Science Environmental Science and Engineering Fellow. Pp 1-33.
- Lasat, M.M. 2002.** Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31: 109-120.
- Lee, J.G., B.A. Ahner, and F.M.M. Morel. 1996.** Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environment Science and Technology* 30, 1814-1821.
- Lombi, E., F.J. Zhao, S.J. Dunham, and S.P. McGrath. 2001.** Phytoremediation of heavy metal- contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality* 30: 1919-1926.
- Matlaga, D., and K. Karoly. 2004.** Long-term grazing effects on genetic variation in Idaho fescue. *Journal of Range Management* 57: 275-279.
- McGinty, W.A., F.E. Smeins, and L.B. Merrill. 1979.** Influence of soil, vegetation, and grazing management on infiltration rate and sediment production of Edwards Plateau rangeland. *Journal of Range Management* 32: 33-37.

**McGrath, S.P., Z.G. Shen, F.J. Zhao. 1998.** Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soil. *Plant Soil* 188: 153-159.

**McPherson, G.R. 1995.** The role of fire in desert grasslands. *In the Desert Grassland* (McClaran, M.P. and Van Devender, T.R., eds), pp. 130-151. Tucson, AZ: University of Arizona Press.

**Medina, E. 2003.** Dinámica del Contenido de Humedad del Suelo a lo Largo de un Gradiente de Condición de Pastizal en el Noreste de Jalisco. Tesis de Lic. En Biología, Universidad de Guadalajara.

**Meerts, P., and N.V. Isacker. 1997.** Heavy metal tolerance and accumulation in metalicolous and non-metallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. *Plant Ecology* 133: 221-231.

**Milchunas, D.G., O.E. Sala, and W.K. Lauenroth. 1988.** A generalized model of the effects of grazing by large herbivores on grassland community structure. *The American Naturalist* 132: 87-103.

**Nei, M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 70: 3321-3323.

**Nei, M. 1987.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

**Nielsen, H.D., C. Brownlee, S.M. Coelho, and M.T. Brown. 2003.** Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion mechanisms in *Fucus serratus*. *New Phytologist* 160: 157-165.

**Ong, C.K. 1978.** The physiology of tiller death in grasses. I. The influence of tiller age, size and position. *Journal of the British Grassland Society* 33: 197-203.

**Painter, E.L., J.K. Detling, and D.A. Steingraeber. 1989.** Grazing history, defoliation, and frequency-dependent competition: effects of two north american grasses. *American Journal of Botany* 76: 1368-1379.

**Painter, E.L., J.K. Detling, and D.A. Steingraeber. 1993.** Plant morphology and grazing history: Relationships between native grasses and herbivores. *Vegetation* 106: 37-62.

**Parsons, A.J., B. Collett, and J. Lewis. 1984.** Changes in the structure and physiology of perennial ryegrass sward when released from a continuous stocking management: implications for the use of exclusion cages in continuously stocked swards. *Grass and Forage Science* 39: 1-9.

- Peterson, R.A. 1962.** Factors affecting resistance to heavy grazing in needle and thread grass. *Journal of Range Management* 15: 183-189.
- Quinn, J.A., and R.V. Miller. 1967.** A biotic selection study utilizing *Muhlenbergia montana*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 94: 423-432.
- Rauzi, F., and M. Smith. 1973.** Infiltration rates: three soils with three grazing levels in northeastern Colorado. *Journal of Range Management* 26: 126-129.
- Reeves, R.D., and A.J.M. Baker. 1999.** Metal-accumulating plants. In *Phytoremediation of toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*, eds, I Raskin, BD Ensley, pp 193-229, John Wiley & Sons Inc, New York, NY.
- Richards, A.J. 1986.** Plant breeding systems. George Allen and Unwin, Boston, Mass.
- Rosenthal, J.P., and P.M. Kotanen. 1994.** Terrestrial plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 145-148.
- Russell, J.R., K. Betteridge, D.A. Costall, and A.D. Mackay. 2001.** Cattle treading effects on sediment loss and water infiltration. *Journal of Range Management* 54: 184-190.
- Ryser P. & Lambers H. 1995.** Root and leaf attributes accounting for the performance of fast- and slow-growing grasses at different nutrient supply. *Plant and Soil* 170: 251-265.
- Rzedowski, J. 1981.** *Vegetación de México*. Limusa, México, D. F.
- Sampson, A. W. 1919.** Effect of grazing upon aspen reproduction, U.S. Dept. Agr. Bull 741.
- Sas Institute Inc. 1992.** SAS/STAT user's guide, release 6.03 edition, Cary, NC, 1028pp.
- Shu, W.S., C.Y. Lan, Z.Q. Shang, 1997.** Analysis of major constraints on plant colonization at Fankou Pb/Zn mine tailings. *Chinese Journal of Applied Ecology* 8(3): 314-318.
- Schneider, S., D. Roessli, and L. Excoffier. 2000.** ARLEQUÍN: a software for population Genetics Data Analysis, Versión 2.0. University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Shipley B. and T.T. Vu. 2002.** Dry matter content as a measure of dry matter concentration in plants and their parts. *New Phytologist* 153: 1-7

**Shu, W.S., C.Y. Lan, Z.Q. Shang, J.W.C. Wong, and M.H. Wong. 1998.** Lead, zinc and copper tolerance in populations of *Cynodon dactylon* and *Paspalum distichum*, International Conference on Environmental Contamination Toxicology and Health, Hong Kong. p6.

**Siripornadulsil, S., S.Traina, D.P.S. Verma, and R.T. Sayre. 2002.** Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. *The Plant Cell* 14: 2837-2847.

**Skipper, H.D., and R.F. Turco. 1995.** Bioremediation: Science and applications. Soil Science Society of America Special Publication No. 43, Madison, Wis

**Smith, E.S. 1998.** Variation in response to defoliation between populations of *Bouteloua curtipendula caespitosa* (Poaceae) with different livestock grazing histories. *American Journal of Botany* 85: 1266-1272.

**Stoddart, L.A., A.D. Smith, and T.W. Box. 1975.** Range Management. 3<sup>d</sup> ed. McGraw-Hill. New York, USA.

**Strauss, S.Y., and A.A. Agrawal. 1999.** The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. Elsevier Science Vol. 14.

**Steffens, J.C. 1990.** The heavy metal-binding peptides of plants. *Ann. Rev. Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 41: 553-575.

**Susarla, S., V.F., Medina, and S.C. McCutcheon. 2002.** Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination *Ecological Engineering* 18: 647-658.

**Thurow, T.L., W.H. Blackburn, and C.A. Taylor-Jr. 1986.** Hydrologic characteristics of vegetation types as affected by livestock grazing systems, Edwards Plateau, Texas. *Journal of Range Management* 39: 505-509.

**Tripathi, R.S., and J.L. Harper. 1973.** The comparative biology of *Agropyron repens* (L.) Beauv. and *A. Caninum* (L.) Beauv. I. The growth of mixed populations established from tillers and from seeds. *Journal of Ecology* 61: 353-368.

**Van Haveren, B.P. 1983.** Soil bulk density as influenced by grazing intensity and soil types on a shortgrass prairie. *Journal of Range Management* 35: 586-588.

**Vekemans, X. 2002.** AFLP-SURV, Version 1.0. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

**Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Freijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995.** AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414.



**Wallace, L.L., S.J. McNaughton, and M.B. Coughenour. 1985.** Effects of clipping and four levels of nitrogen on the gas exchange, growth, and productivity of two east African graminoids. *American Journal of Botany* 72: 222-230.

**Weiler, G., and W.L. Gould.1983.** Establishment of blue grama and fourwing saltbush on coal mine spoils using saline ground water. *Journal of Range Management* 36: 712-717.

**Westoby, M., B. Walker, and I. Noy-Meir. 1989.** Opportunistic management for rangelands not a equilibrium. *Journal of Range Management* 42: 266-274.

**White, E.M. 1991.** Blue grama response to Zn source and rates. *Journal of Range Management* 44(1): 48-51.

**Whiting, S.N., J.R. Leake, S.P. McGrath, and A.J.M., Baker. 2000.** Positive responses to zinc and cadmium by roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 145: 199-210.

**Wilfried, H.O. Ernst. 2003.** Evolution of Adaptation Mechanisms of Plants on Metal-Enriched Soils. *Landbauforschung* 54: 53-72.

**Wolf, D.D., and Parrish. 1982.** Short-term growth responses of tall fescue to changes in soil water potential and to defoliation. *Crop Science* 22: 996-999.

**Young, J.A., and R.A. Evans. 1981.** Demography and fire history of a western juniper stand. *Journal of Range Management* 34: 501-506.

**Zar, J.L. 1984.** Biostatistical analysis. Engle wood cliffs, N.J. Prentice-Hall, 784 pp.

**Zhivotovsky, L.A. 1999.** Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* 8: 907-913.

---



---

**Anexos**


---

**Tabla A .** Análisis de varianza molecular (AMOVA) para explorar la diferenciación genética entre dos poblaciones de *B. gracilis* con diferentes regímenes de pastoreo.

Componentes de varianza	Df	SC	CM	% de variación	P
Entre poblaciones	1	8.748	8.748	0.3	0.639
Entre individuos	14	136.127	9.723	99.7	
	15				

**Tabla B.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre el número de hojas muertas.

---

**Test de Efectos Fijos**

Fuente de variación	df	F	P
SITIO	1,16	0.04	0.8418
TRATAMIENTO	1,16	29.46	0.0001
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	4.73	0.0450

**Estimaciones de componentes de varianza**

Componente de varianza	Estimado	ES	P
GENOTIPO(SITIO)	5.73	3.28	0.0802
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	3.21	2.34	0.1710
RESIDUAL	13.14	1.77	0.0001

---

**Tabla C.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre el número de vástagos muertos.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	0.02	0.8998
TRATAMIENTO	1,16	9.52	0.0071
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	7.53	0.0144
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	2.63	1.06	0.0131
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.08	0.35	0.7996
RESIDUAL	3.51	0.47	0.0001

**Tabla D.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre el número de vástagos vivos.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	1.11	0.3080
TRATAMIENTO	1,16	4.50	0.0500
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	0.33	0.5712
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	2.66	1.47	0.0721
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.00		
RESIDUAL	13.24	1.65	0.0001

**Tabla E.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre el área foliar específica.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	0.00	0.9640
TRATAMIENTO	1,16	0.90	0.3576
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	0.01	0.9138
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	2.55	2.92	0.3823
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	3.59	3.23	0.2655
RESIDUAL	22.44	3.05	0.0001

**Tabla F.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre longitud máxima foliar.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	1.05	0.3209
TRATAMIENTO	1,16	18.35	0.0006
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	0.14	0.7124
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	1.73	1.46	0.2357
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.43	1.42	0.7595
RESIDUAL	13.96	1.86	0.0001

**Tabla G.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre longitud total de las hojas.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,15	0.20	0.6579
TRATAMIENTO	1,15	1.31	0.2697
SITIO*TRATAMIENTO	1,15	0.19	0.6697
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	100.88	130.91	0.4410
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	164.44	139.61	0.2389
RESIDUAL	875.39	124.78	0.0001

**Tabla H.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre el ancho promedio de la hoja.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,15	0.14	0.7145
TRATAMIENTO	1,15	8.78	0.0097
SITIO*TRATAMIENTO	1,15	0.20	0.6585
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	0.000038	0.000070	0.5803
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.000000		
RESIDUAL	0.001255	0.000166	0.0001

**Tabla I.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre longitud total de la raíz.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>SITIO</b>	1,16	0.85	0.3694
<b>TRATAMIENTO</b>	1,16	0.16	0.6978
<b>SITIO*TRATAMIENTO</b>	1,16	0.72	0.4093
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
<b>GENOTIPO(SITIO)</b>	98153.92	57348.09	0.0870
<b>TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)</b>	18850.30	44737.79	0.6735
<b>RESIDUAL</b>	395045.97	54417.40	0.0001

**Tabla J.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre área superficial de raíz.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>SITIO</b>	1,16	0.17	0.6897
<b>TRATAMIENTO</b>	1,16	0.95	0.3432
<b>SITIO*TRATAMIENTO</b>	1,16	2.32	0.1470
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
<b>GENOTIPO(SITIO)</b>	2914.23	1485.27	0.0498
<b>TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)</b>	0.00000		
<b>RESIDUAL</b>	11608.45	1463.91	0.0001

**Tabla K.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre el volumen de raíz.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	0.76	0.3967
TRATAMIENTO	1,16	3.37	0.0852
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	3.00	0.1025
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	0.1349	0.3790	0.7219
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.0000		
RESIDUAL	7.5634	0.9525	0.0001

**Tabla L.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre diámetro promedio de raíz.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	2.40	0.1409
TRATAMIENTO	1,16	2.48	0.1351
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	1.49	0.2404
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	0.00000		
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.00000		
RESIDUAL	0.01266	0.0014	0.0001

**Tabla M.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre la relación raíz/vástago.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	1.09	0.3126
TRATAMIENTO	1,16	0.58	0.4585
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	1.50	0.2390
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	0.00331	0.0027	0.2269
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.00000		
RESIDUAL	0.03656	0.0046	0.0001

**Tabla N.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre el área foliar específica.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	2.21	0.1564
TRATAMIENTO	1,16	22.65	0.0002
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	0.02	0.8901
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	0.1208	0.1277	0.3445
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.0146	0.1381	0.9155
RESIDUAL	1.4921	0.2023	0.0001



**Tabla O.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre la densidad del tejido de la hoja.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	1.65	0.2173
TRATAMIENTO	1,16	5.13	0.0378
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	0.14	0.7171
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	0.0000		
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.0000		
RESIDUAL	0.0025	0.0003	0.0001

**Tabla P.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre peso fresco de las hojas.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	0.03	0.8666
TRATAMIENTO	1,16	22.77	0.0002
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	0.00	0.9969
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	0.0049	0.0032	0.1339
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.0020	0.0027	0.4585
RESIDUAL	0.0230	0.0031	0.0001

**Tabla Q.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre peso seco de la hoja.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>SITIO</b>	1,16	0.42	0.5238
<b>TRATAMIENTO</b>	1,16	22.43	0.0002
<b>SITIO*TRATAMIENTO</b>	1,16	0.04	0.8353
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
<b>GENOTIPO(SITIO)</b>	0.0012	0.0006	0.0555
<b>TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)</b>	0.0001	0.0004	0.8026
<b>RESIDUAL</b>	0.0044	0.0006	0.0001

**Tabla R.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre peso fresco de tallos.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>SITIO</b>	1,16	0.55	0.4710
<b>TRATAMIENTO</b>	1,16	0.16	0.6913
<b>SITIO*TRATAMIENTO</b>	1,16	2.39	0.1415
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
<b>GENOTIPO(SITIO)</b>	0.0024	0.0030	0.4247
<b>TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)</b>	0.0037	0.0033	0.2670
<b>RESIDUAL</b>	0.0259	0.0034	0.0001

**Tabla S.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre el peso seco de tallos.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	1.89	0.1877
TRATAMIENTO	1,16	0.99	0.3334
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	2.46	0.1366
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	0.0000		
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.0000		
RESIDUAL	0.8556	0.1008	0.0001

**Tabla T.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre peso fresco de raíz.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	0.26	0.6139
TRATAMIENTO	1,16	0.49	0.4947
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	0.64	0.4369
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	0.2193	0.2766	0.4278
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.2231	0.3098	0.4715
RESIDUAL	2.6755	0.3646	0.0001

**Tabla U.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre peso seco de raíz.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	0.03	0.8660
TRATAMIENTO	1,16	4.59	0.0478
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	0.28	0.6021
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	0.0066	0.0031	0.0359
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.0000		
RESIDUAL	0.0220	0.0027	0.0001

**Tabla V.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre densidad de la raíz.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
SITIO	1,16	0.72	0.4082
TRATAMIENTO	1,16	0.82	0.3774
SITIO*TRATAMIENTO	1,16	0.88	0.3629
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
GENOTIPO(SITIO)	0.0000		
TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)	0.0000		
RESIDUAL	0.0473	0.0055	0.0001

**Tabla W.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre tasa de elongación de la hoja.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>SITIO</b>	1,16	0.05	0.8303
<b>TRATAMIENTO</b>	1,16	13.65	0.0020
<b>SITIO*TRATAMIENTO</b>	1,16	1.43	0.2487
<b>Estimaciones de componentes de varianza</b>			
<b>Componente de varianza</b>	<b>Estimado</b>	<b>ES</b>	<b>P</b>
<b>GENOTIPO(SITIO)</b>	0.0040	0.0020	0.0430
<b>TRATAMIENTO*GENOTIPO(SITIO)</b>	0.0000		
<b>RESIDUAL</b>	0.0142	0.0017	0.0001

**Tabla AA.** ANOVA. Modelo Mixto. Para examinar los efectos del SITIO y TRATAMIENTO, sobre tasa de fotosíntesis.

<b>Test de Efectos Fijos</b>			
<b>Fuente de variación</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<b>SITIO</b>	1,10	2.55	0.141
<b>TRATAMIENTO</b>	1,603	2.54	0.111
<b>SITIO*TRATAMIENTO</b>	1,603	8.34	0.004
<b>LINEAL*SITIO</b>	1,603	4.53	0.033
<b>LINEAL*TRATAMIENTO</b>	1,603	2.78	0.096
<b>CUADRATICO*SITIO</b>	1,603	6.76	0.009
<b>CUADRATICO*TRATAMIENTO</b>	1,603	3.14	0.077

## Glosario

**AFLP**. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados.

**AMOVA**. Análisis molecular de varianza.

**BIO-RAD**. Máquina termocicladora, modelo icycler.

**Buffer**. Solución amortiguadora.

**Buffer TE**. Solución amortiguadora (10mM tris-HCl (pH 8.0), 0.1mM EDTA)

**df**. Grados de libertad.

**DNA (Gibco-BRL)**. Kit para AFLP, marca Gibco-BRL.

**EcoRI**. Enzima de restricción del ADN, purificada de una cepa de *E. coli*.

**EcoRI + 1**. Secuencia de oligonucleótidos más una base selectiva, que sirven como objetivo de la enzima de restricción *EcoRI*.

**EcoRI + 3**. Secuencia de oligonucleótidos más tres bases selectivas, que sirven como objetivo de la enzima de restricción *EcoRI*.

**Escáner**. Aparato para digitalización de imágenes.

**Escanear**. Proceso de digitalización de imágenes.

**F**. Estadístico de Fisher.

**Factor aleatorio**. Factor seleccionado al azar.

**Factor fijo**. Factor que se establece arbitrariamente para probar sus efectos.

**Fst de Wright**. Índice para la diferenciación genética de poblaciones.

**Locus**. Sitio dentro de un cromosoma, ocupado por un gen.

**Msel**. Enzima de restricción del ADN, purificada a partir de especies de *Micrococcus*.

**Msel + 1**. Secuencia de oligonucleótidos más una base selectiva que sirven como objetivo de la enzima de restricción *Msel*.

**Msel + 3.** Secuencia de oligonucleótidos más tres bases selectivas, que sirven como objetivo de la enzima de restricción *Msel*.

**Nei.** Índice de diversidad genética.

**P.** Probabilidad

**pb.** Pares de bases

**Prueba de Shapiro-Wilks (Zar, 1984).** Estadístico para examinar distribuciones de frecuencia normal.

**Prueba de F tipo III.** Estadístico de Fisher, para un modelo mixto.

**Primers.** Secuencias de oligonucleótidos iniciadores que reconocen sitios específicos del ADN.

**TouchGene.** Termociclador marca Techne. Para amplificación del ADN.

**Touchdown.** Programa de amplificación del ADN, en el que se disminuye gradualmente la temperatura.

**z.** Valores normalizados