

# COMPARACIÓN DE PROCEDIMIENTOS PARA ELABORAR COLECCIONES NUCLEARES EN POBLACIONES ESPAÑOLAS DE RAIGRÁS INGLÉS E ITALIANO

J. E. LÓPEZ <sup>1</sup> Y J.A. OLIVEIRA <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM). Apartado 10. 15080 A Coruña (España). Correo-e: ciala036@igatel.igape.es. <sup>2</sup> Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Area de Producción Vegetal. Catedrático Rodrigo Uría s/n. 33071 Oviedo. Universidad de Oviedo (España). Correo-e: oliveira@correo.uniovi.es.

## RESUMEN

Durante dos años se caracterizaron agromorfológicamente 74 poblaciones de raigrás inglés y 42 de raigrás italiano, pertenecientes a la colección de gramíneas pratenses del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM). Las variables significativas en el análisis de varianza se utilizaron en una clasificación ascendente jerárquica mediante el método de Ward. Sobre ambas colecciones de partida, se compararon diversas estrategias para crear dos colecciones nucleares (“core collection”). Las estrategias empleadas incluyeron muestreos estratificados y aleatorios basados en la clasificación jerárquica, en el índice de diversidad de Shannon-Weaver y en la máxima contribución a la varianza en un análisis de componentes principales. Ninguna de las colecciones nucleares creadas mostró diferencias en las medias y en las varianzas mediante el test de Wilcoxon. Las colecciones seleccionadas en la estrategia de mayor contribución a la varianza fueron las que presentaron un mayor porcentaje de retención de los intervalos de variación, por lo que dicha estrategia se considera la más adecuada para el mantenimiento de la diversidad de las colecciones de partida.

**Palabras clave:** bancos de germoplasma, colección nuclear, *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, recursos fitogenéticos.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el incremento en el número de muestras conservadas en los bancos de germoplasma ha motivado un creciente interés por la racionalización de la diversidad genética almacenada en los mismos. Los objetivos son facilitar el acceso de los recursos fitogenéticos a los mejoradores y hacer más manejable su uso. Sin embargo,

el manejo y mantenimiento de un número elevado de muestras es precisamente la limitación práctica más frecuente a la que se enfrentan la mayoría de las colecciones. Por estas razones, algunos autores han propuesto el concepto de colección nuclear (Frankel, 1984; Brown, 1989b), que consiste en una fracción manejable de muestras, seleccionadas por conservar la mayor diversidad posible del conjunto. La selección debe basarse en criterios de muestreo que garanticen la conservación de la diversidad de la colección total con un número mínimo de entradas, eliminando la redundancia producida por genotipos semejantes. Brown (1989b) sugirió que una muestra al azar del 10% de la colección total conservaría un 70% de la variación total (estrategia R). No obstante, según el mismo Brown (1989a), sería más efectivo organizar la colección en una estructura estratificada basada en grupos de características similares y tomar muestras aleatorias basándose en diferentes criterios: una fracción constante de cada grupo (estrategia C), una proporción del grupo (estrategia P), o bien una proporción logarítmica del grupo (estrategia L). Posteriormente, Schoen y Brown (1993, 1995) propusieron dos nuevas estrategias de agrupación (H y M) basadas en marcadores e índices de diversidad genética. Estos mismos autores evaluaron la efectividad de las cinco estrategias anteriores concluyendo que la retención esperada de alelos, en orden de mayor a menor es: M>H>P>L>C>R.

Las estrategias basadas en procedimientos multivariantes conllevan la agrupación de las entradas en base a descriptores de pasaporte, datos ecogeográficos, geoestadísticos, marcadores moleculares e isoenzimáticos, y caracteres fenotípicos. Sin embargo, requieren el empleo de información preexistente que es inviable en algunas colecciones por el elevado número de entradas que deberían caracterizarse. Peters y Martinelli (1989) compararon diferentes procedimientos de agrupación jerárquica multivariante, obteniendo como resultado que no sólo eran herramientas muy útiles para agrupar las entradas de colecciones de germoplasma, sino que además permiten estimar el potencial de segregación de las entradas en cruzamientos. En los últimos 10 años se ha comparado la efectividad de los métodos multivariantes frente a los métodos aleatorios para crear colecciones nucleares en diferentes cultivos (Basigalup *et al.*, 1995; Bisht *et al.*, 1999; Spagnoletti y Qualset, 1993), y en el desarrollo de colecciones nucleares de raigrás inglés por diferentes autores (Balfourier *et al.*, 1999, Casler, 1995). Una revisión puede observarse en Hamon *et al.* (1998) y en Ortiz *et al.* (1998). Casler (1995), encontró que la presión de cultivo y las condiciones climáticas pueden influir en los ecotipos silvestres de las especies cultivadas. A menudo, las prácticas de cultivo están delimitadas territorialmente por divisiones administrativas, de modo que muchos autores tienen en cuenta el factor país como fuente de variación genética en la creación de colecciones nucleares. Según Balfourier *et al.* (1998, 1999) las estructuras espaciales identificadas

por procedimientos geoestadísticos en *Lolium perenne* L., son el resultado de una presión selectiva del ambiente. Monestiez *et al.* (1994) encontraron estructuras espaciales en, al menos, seis variables agronómicas de *L. perenne* en dimensiones de 120-300 km de distancia. Casi todos los estudios citados se refieren a colecciones de tamaño considerable y, debido a la amplia distribución de las poblaciones, suelen tener en cuenta el origen geográfico del germoplasma. Sin embargo, no existen muchos estudios en colecciones pequeñas de cultivos locales. En el caso de este estudio, casi todas las muestras que componen ambas colecciones de partida fueron recolectadas principalmente en el norte de España, zona en la que está ampliamente extendido el cultivo de estas dos especies para siembra de praderas (Mosquera *et al.*, 1999; Piñeiro, 1994).

Los objetivos de este trabajo son:

- 1) Comparar la eficacia de técnicas de creación de colecciones nucleares utilizando como material de partida dos colecciones de raigrás inglés e italiano recolectadas principalmente en el norte de España.
- 2) La creación de dos colecciones nucleares, para ser multiplicadas y obtener una suficiente cantidad de semilla, con objeto de renovar la máxima diversidad existente en el material de partida del CIAM.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Durante dos años se evaluaron un total de 74 poblaciones de *Lolium perenne* L. y 42 de *Lolium multiflorum* Lam., pertenecientes a la colección de gramíneas pratenses conservada en el CIAM, y que ya ha sido objeto de varios estudios (Oliveira *et al.*, 1997a, 1997b; López y Oliveira, 2000). La distribución geográfica del material se representa en la Figura 1. El estudio se inició en 1998 en el CIAM de A Coruña, situado en Mabegondo (43° 15' N, 8° 18' O) a 100 m de altitud. Las semillas utilizadas fueron sometidas a un tratamiento de calor (Nott y Latch, 1993) para eliminar el hongo endofito y evitar su posible efecto en la evaluación agronómica.

El material vegetal se sembró en bandejas de plástico y germinó bajo condiciones de invernadero, transplantándose al campo al cabo de ocho semanas de crecimiento. Como abono se aplicaron 800 kg/ha de NPK 8:15:15 y previamente se aplicaron 1.500 kg/ha de cal a la superficie del ensayo (90% CaCO<sub>3</sub>, 45% CaO). El control de malas hierbas se efectuó mediante el uso de herbicidas de contacto y residuales. El diseño experimental consistió en dos bloques completos al azar con 10 individuos por población y bloque separados en líneas de 50 cm de distancia. Como testigos se introdujeron en el ensayo

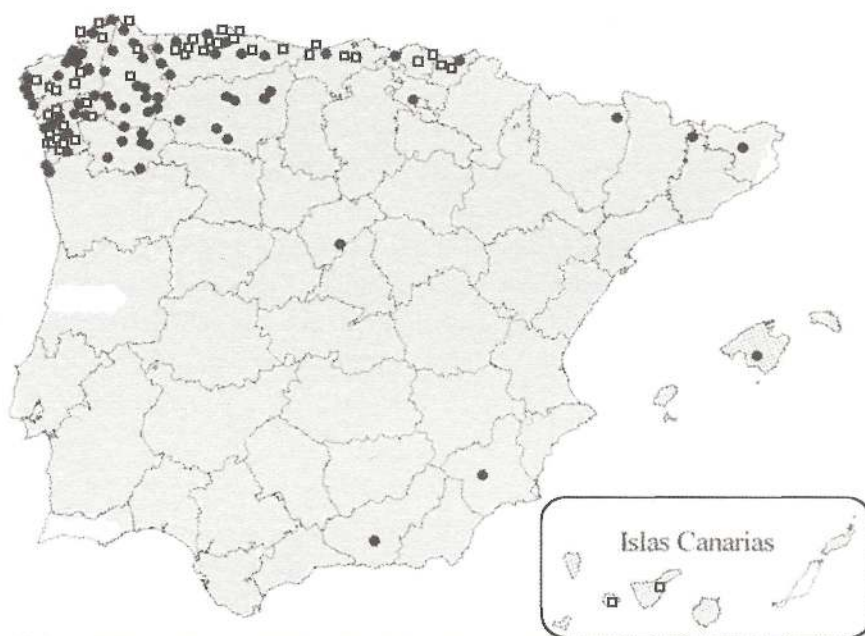


FIGURA 1

**Distribución de los puntos de muestreo de las poblaciones de raigrás inglés e italiano (74 y 42 respectivamente). Los círculos corresponden al raigrás inglés y los cuadrados al raigrás italiano.**

*Distribution of the sampling points of perennial and Italian ryegrass populations (74 and 42 respectively). Circles correspond to the perennial ryegrass and the squares to the Italian ryegrass.*

de raigrás inglés las variedades comerciales 'Brigantia', 'Arion', 'Vigor', 'Talbot', 'Cropper' y la experimental 'Ciam1', creada a partir de ecotipos locales. En el ensayo de raigrás italiano se introdujeron los cultivares 'Promenade', 'Finul', 'Exalta' y 'Vitesse'. En cada planta individual se tomaron datos de las variables agronómicas siguientes: *fes* (fecha de espigado, contabilizada como nº días a partir del 1 de enero de cada año), *cri*, *crp*, *cre*, *crv* (producción en g de materia seca en invierno, primavera, en espigado y en verano), *ain* (nº de inflorescencias por planta), *alp* (altura en espigado en cm), *lhb* (longitud de la hoja bandera en cm) y *ahb* (anchura de la hoja bandera en mm). También se tomaron dos caracteres cualitativos: *enf* (tolerancia a enfermedades, desde 1 = sensible, hasta 5 = resistente) y *hcr* (hábito de crecimiento desde 1 = postrado, hasta 5 = erecto). Debido al carácter anual del raigrás italiano, el ensayo se repitió completamente en el segundo año, mientras que en raigrás inglés las plantas permanecieron en el campo

durante los dos años de evaluación. Por esta razón el modelo de análisis de varianza (ANOVA), siguiendo un modelo de efectos fijos fue distinto en cada especie, siendo en el raigrás inglés:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

y en el raigrás italiano:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta(\alpha)_{ij} + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  es el efecto del año,  $\beta_j$  es el efecto del bloque,  $(\alpha\beta)_{ij}$  es la interacción entre año y bloque,  $\gamma_k$  es el efecto de la población,  $\beta(\alpha)_{ij}$  es el efecto del bloque jerarquizado a año, y finalmente  $\varepsilon_{ijk}$  es el error. Los datos cualitativos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Breslow, 1970). Todos los datos se analizaron mediante el programa informático SAS (SAS Institute, 1999).

Los valores medios de variables significativas en el ANOVA se utilizaron en un análisis de componentes principales (ACP). Con las componentes de autovalor mayor que 1, se realizó una clasificación ascendente jerárquica utilizando el método de agregación de Ward (Romersburg, 1984). Éste método minimiza las varianzas dentro de los conglomerados y las maximiza entre ellos, y ha sido el procedimiento de agregación más utilizado en colecciones de germoplasma (Johnson *et al.*, 1999). Debido a que la zona de recolección es relativamente pequeña, no se tuvo en cuenta el origen geográfico de cada población en la clasificación. Para fijar el tamaño de las colecciones nucleares se tuvo en cuenta la capacidad del CIAM para la multiplicación de poblaciones, y que al mismo tiempo se obtuviera una proporción relativa suficiente sobre las colecciones de partida. Actualmente la capacidad del CIAM para realizar el proceso de multiplicación en campos aislados, oscila entre 15 y 20 genotipos por año. El proceso de multiplicación es, precisamente, la limitación práctica más frecuente a la que se enfrentan la mayoría de las colecciones, siendo éste más costoso en los ecotipos silvestres que en los cultivados (Brown *et al.*, 1997). También se tuvo en cuenta la importancia del cultivo en la zona y la oferta de variedades comerciales en el mercado para ambas especies. Según Van Hintum (1999), la proporción de entradas en la colección nuclear es una decisión arbitraria que depende del propósito de la misma, oscilando normalmente entre el 5 y 20% en la mayoría de los casos. Brown y Spillane (1999), compararon 63 colecciones nucleares registradas en el IPGRI frente a sus colecciones de reserva, encontrando correlaciones negativas ( $r = -0.42$ ,  $p < 0,01$ ) para los tamaños relativos. Es decir, en general, en colecciones pequeñas se admite una mayor proporción de entradas en la colección nuclear. Considerando sobre todo el objetivo prioritario de mantener colecciones manejables y dinámicas, en lugar de colecciones estáticas (Brown, 1989a, 1995), se estimó oportuno fijar el número más adecuado de entradas para cumplir dicho

objetivo sobre ambas colecciones de partida. Por tanto, se consideró adecuado establecer el número de poblaciones de la colección nuclear en nueve para el raigrás y seis para el raigrás italiano. Con objeto de considerar al menos una población de cada grupo, se estableció el número de grupos de la clasificación jerárquica también en nueve y seis, respectivamente para raigrás inglés y raigrás italiano. Basándose en este tamaño de muestra y para cada colección nuclear, se diseñaron seis métodos de selección de poblaciones (Figura 2). Los métodos utilizados fueron:

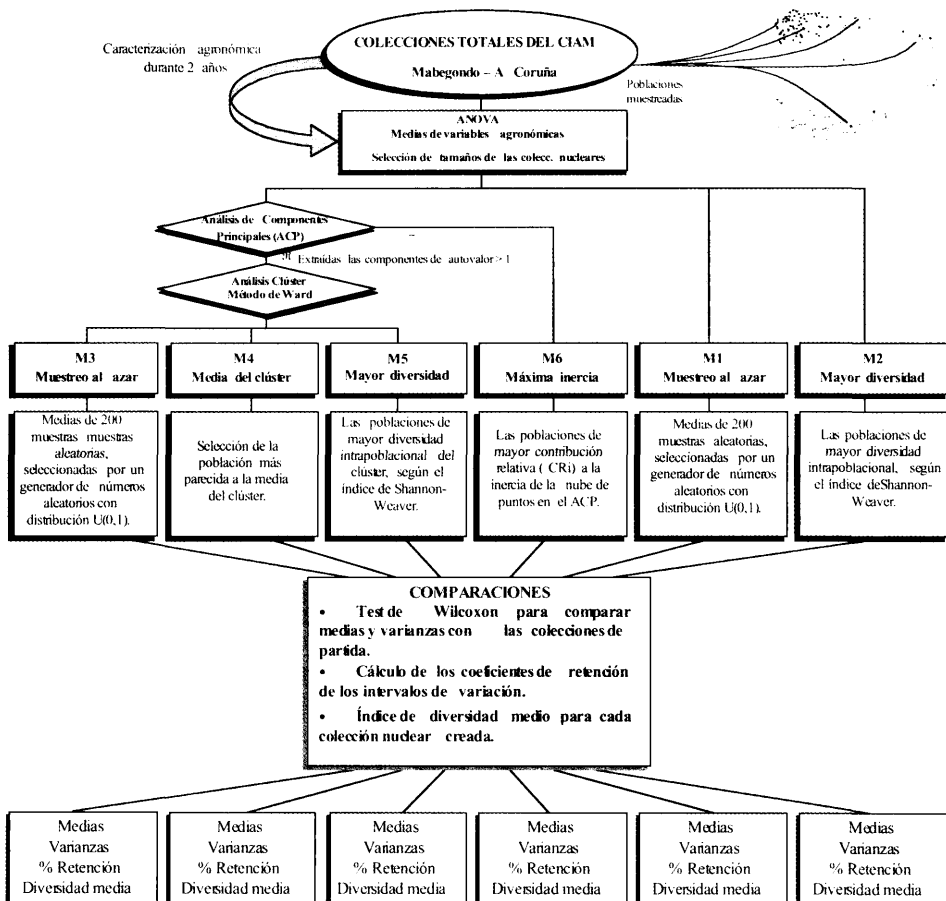


FIGURA 2

Esquema de las metodologías de muestreo empleadas en la formación de las colecciones nucleares.

*Diagram of the sampling methodologies used in the formation of the core collections*

**1) Muestreo al azar:** se generaron 200 muestras independientes de tamaños 9 y 7, respectivamente para raigrás inglés y raigrás italiano, mediante un generador de números aleatorios que sigue una distribución uniforme (0-1). Por muestra se entiende cada uno de los grupos de entradas seleccionados aleatoriamente por el generador. Cada muestra se consideró como una colección nuclear independiente de la cual se calculó la media, varianza e intervalo de variación en cada una de las variables.

**2) Criterio de máxima diversidad:** se seleccionaron las poblaciones con mayor diversidad intrapoblacional en cada colección de partida. La medida de la diversidad se calculó como la media del índice  $H$  de Shannon-Weaver en cada variable según la expresión, (Shannon y Weaver, 1963).

$$H_j = - \sum_{i=1}^n P_{ij} \log_2 P_{ij}$$

Donde  $j$  es la variable agronómica,  $P_{ij}$  es la frecuencia de aparición de cada clase agronómica  $i$  para la variable  $j$ .

Este índice ha sido ampliamente utilizado en ecología como medida de la diversidad de comunidades, no obstante también puede ser utilizado para estudiar la distribución de categorías de una variable (Pielou, 1969; Jain *et al.*, 1975). Bowman *et al.* (1973) observaron que este índice seguía una distribución normal en muestras grandes, y en los últimos años ha sido cada vez más empleado en el cálculo de la diversidad de entradas en colecciones de germoplasma (Bekele y Bekele, 1996; Bisht *et al.*, 1999; Grenier *et al.*, 2000a; Jain *et al.*, 1975; Polignano *et al.*, 1999; Van Raamsdonk y Wijnker, 2000; Zeng *et al.*, 2001), pudiendo ser empleado tanto para variables fenotípicas como para marcadores genéticos (Brown y Weir, 1983)

El cómputo de la diversidad media de cada entrada se calculó como la media del índice  $H$  de las  $k$  variables estudiadas, (Furman *et al.*, 1997):

$$\overline{H}_j = \frac{\sum_{i=1}^k H_j}{k}$$

**3) Selección al azar dentro de cada clúster:** se seleccionó una población al azar en cada clúster, y se repitió el proceso 200 veces para obtener 200 muestras de las colecciones totales. La selección se realizó mediante un generador de números aleatorios que sigue una distribución uniforme (0-1) en cada clúster. Para cada muestra se calculó la media varianza e intervalo de variación de las variables. Por muestra se entiende en este caso el conjunto de entradas seleccionadas por tantos generadores como conglomerados haya en la clasificación jerárquica de las colecciones de partida.

**4) Mayor similitud media en el clúster:** se calcula la media de cada clúster para cada una de las variables. Los valores medios así obtenidos se consideran como si fuera una nueva población y se repite el análisis de componentes principales y el análisis clúster. Se selecciona la población que presente una mayor proximidad con respecto a la "población" de valores medios, determinada por el valor SPR (*semipartial R-square*) de la clasificación ascendente jerárquica mediante el método de Ward.

**5) Criterio de máxima diversidad dentro del clúster:** se selecciona la población con mayor diversidad intrapoblacional de entre las posibles dentro de cada clúster, utilizando el índice medio  $H$  del Método 2.

**6) Máxima contribución a la inercia de la nube de puntos en el espacio factorial del ACP:** la suma generalizada de cuadrados de un grupo de  $N$  individuos en un espacio factorial de  $K$  variables estandarizadas (media=0, varianza=1) e independientes (coeficiente de correlación=0) es igual al producto  $N \times K$ . La contribución  $P_i$  de cada individuo a la inercia de la nube de puntos es:

$$P_i = \sum_{j=1}^K x_{ij}^2$$

y la contribución relativa  $CR_i$  de cada individuo  $i$  a la inercia de la nube de puntos está dada por (Noirot *et al.*, 1996; Hamon *et al.*, 1998):

$$CR_i = \frac{P_i}{NK}$$

Los individuos con mayor  $CR_i$  son los que más contribuyen a la inercia de la nube de puntos. Seleccionando estos individuos se obtiene una subcolección con varianzas elevadas.

Los métodos 2, 4, 5 y 6 son determinísticos, ya que la metodología empleada especifica qué entradas se van a seleccionar según los datos de evaluación agronómica. Para cada método se obtuvo la media, varianza e intervalo de variación de las 10 variables agronómicas medidas para comparar cada colección nuclear con la colección de partida. Las comparaciones de medias y varianzas se realizaron mediante el test no paramétrico de Wilcoxon (Wilcoxon, 1945), mediante el procedimiento NPAR1WAY del programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

También se obtuvo una medida del porcentaje de retención de los intervalos de variación de las variables para cada método, según la expresión: (Diwan *et al.*, 1995)

$$\% \text{ retencion} = \frac{\sum_{i=1}^t \frac{R_n \text{ CN}}{R_n \text{ CB}}}{t}$$



donde  $R_nCN$  es el intervalo de variación de la variable  $n$  en la colección nuclear,  $R_nCB$  es el intervalo de variación de la variable  $n$  en la colección total, y  $t$  es el número de variables comparadas.

La colección nuclear más representativa de la colección total se podría considerar aquella con medias inalteradas, mayores varianzas y mayores porcentajes de retención (Malosetti *et al.*, 2000).

Las propiedades aditivas del índice  $H$  de Shannon-Weaver permiten hacer comparaciones entre distintos niveles de agrupación (Toolbert *et al.*, 1979), de modo que adicionalmente los seis métodos fueron comparados por su capacidad para capturar la diversidad de las colecciones iniciales. Dicha comparación se realizó mediante el cálculo del índice  $H$  en cada colección nuclear creada con respecto a la colección total sobre todas las variables, obteniéndose un índice de diversidad relativo ( $HR$ ) calculado de la siguiente forma (Balfourier *et al.*, 1998):

$$HR = \frac{\overline{H}_j(CC)}{\overline{H}_j(CT)}$$

Donde  $\overline{H}_j(CC)$  es la diversidad media de las poblaciones que componen cada colección nuclear para todas las variables agronómicas y  $\overline{H}_j(CT)$  es la diversidad media de las poblaciones de la colección total para todas las variables agronómicas. Para cada método determinístico se calculó la diversidad media de las poblaciones de cada colección nuclear. Para los métodos no determinísticos se calculó la diversidad en cada una de las 200 muestras y después se consideró el mínimo del intervalo de confianza de la distribución del índice (Balfourier *et al.*, 1998, 1999).

## RESULTADOS

Las poblaciones en conjunto mostraron una gran variabilidad agromorfológica para las variables estudiadas. Algunas poblaciones mostraron un mejor comportamiento agronómico que las variedades comerciales usadas como testigo. En raigrás inglés el 56% de las poblaciones tuvieron mayores crecimientos que la media de las variedades. La variedad experimental 'Ciam 1', creada a partir de ecotipos locales, fue la que tuvo un mejor comportamiento agronómico, seguido de la variedad comercial 'Brigantia', también originada a partir de ecotipos gallegos (datos no mostrados). En raigrás italiano el 20% de las poblaciones tuvieron un mejor comportamiento que la media de las cinco variedades. Este mejor comportamiento en las poblaciones locales de gramíneas, ya ha

sido observado por Oliveira *et al.* (1997a, 1997b) y frecuentemente es debido a la presencia de características especiales de adaptación a una región determinada (Piñeiro y Pérez, 1986). Los análisis de varianza fueron significativos en ambas colecciones para el efecto *población* (Tablas 1 y 4). El efecto *año* fue significativo en ambas colecciones para todas las variables. Estas diferencias estuvieron principalmente marcadas por la heterogeneidad climatológica entre los años de evaluación 1999 y 2000 en la localidad de ensayo, ya que mientras el año 1999 puede calificarse como un año de precipitaciones invernales normales (345 mm desde enero a marzo), el año 2000 presentó una anormal sequía durante el mismo periodo (106 mm). Estos meses son cruciales para el establecimiento del raigrás italiano, por tanto la sequía produjo un retraso en el establecimiento y un menor tamaño medio de planta durante el segundo año. En el ensayo de raigrás inglés, los crecimientos medios observados también fueron inferiores que en el año anterior por la misma razón. En definitiva se puede decir que el año 2000 fue sensiblemente menos productivo que 1999, causando un importante efecto *año* en el análisis de varianza.

### **Raigrás inglés**

El ANOVA para cada variable agronómica mostró diferencias significativas en todos los casos (Tabla 1). El test de Kruskal-Wallis también mostró diferencias significativas para las dos variables cualitativas. Por lo tanto las 10 variables se utilizaron para el análisis multivariante.

El ACP sobre la colección total explicó un 72% de la varianza con tres componentes extraídas de autovalor mayor que 1. En la Tabla 2 se muestran las correlaciones de las variables con cada una de las componentes extraídas del ACP. El *Factor 1* se relaciona con todas las variables de producción (*cri*, *crp* y *cre*), la fecha de espigado y tolerancia a enfermedades. El *Factor 2* se puede definir como un eje morfológico, con el que correlacionan las variables de tamaño de la hoja bandera y altura de la planta. El *Factor 3* se relaciona con las variables hábito de crecimiento y número de inflorescencias. La clasificación ascendente jerárquica basada en las componentes estableció nueve grupos de poblaciones explicando un 76% de la varianza (Figura 3a). En la Figura 3b se representan las poblaciones en el espacio factorial del ACP, marcadas mediante símbolos que indican el grupo de la clasificación jerárquica al que pertenecen.

Las medias y varianzas para cada método de muestreo se pueden observar en la Tabla 3. En dicha Tabla se resaltan las varianzas que han resultado mayores en las colecciones nucleares formadas que en la colección de partida. Los métodos basados en selección por diversidad (métodos dos y cinco), extraen poblaciones que presentan una

distribución más equitativa de las frecuencias de clase de las variables agronómicas, y dentro de éstas las que presentan un mayor intervalo de variación. Debido a esto, las poblaciones extraídas presentan varianzas altas. En consecuencia el conjunto seleccionado tiene una varianza media también alta, y generalmente superior a la varianza media de la colección total, ya que las varianzas individuales de las entradas seleccionadas contribuyen en mayor proporción en la colección nuclear que en la colección total. El método seis extrae las accesiones que más contribuyen a la inercia de la nube de puntos en el ACP, y por eso casi todas las varianzas son superiores a la colección total. Los métodos basados en extracción al azar (métodos uno y tres), y el método cuatro, extraen poblaciones con varianzas muy similares a la colección de

TABLA 1

**Cuadrados medios del análisis de varianza y test de Kruskal-Wallis para variables cualitativas en *L. perenne*; FV: fuente de variación; GL: grados de libertad; Blq: bloque; Pobl: población; X2: valor del test chi-cuadrado; fes: fecha espigado; cri, crp, cre: crecimientos en invierno, primavera y en espigado; alp: altura de la planta; enf: tolerancia a enfermedades; lhb y ahb: longitud y anchura de la hoja bandera; hcr: hábito de crecimiento; ain: nº inflorescencias; \*: significativo al nivel 0,05; \*\*: significativo al nivel 0,01.**

*Mean squares of the analysis of variance and test of Kruskal-Wallis for qualitative variables in L. perenne; FV: source of variation; GL: degrees of freedom; Blq: block; Pobl: accession; X2: chi-squared value; fes: heading date; cri, crp, cre: growths in winter, spring and in heading; alp: height of the plant; enf: tolerance to diseases; lhb and ahb: length and width of the flag leaf; hcr: habit of growth; ain: number of inflorescences; \*: significant at 0.05 level; \*\*: significant at 0.01 level.*

FV GL	Año 1	Blq 1	Año*Blq 1	Pobl 73	Pobl*Año 73
<i>Cuantitativas</i>					
<b>fes</b>	82172,79**	78,02	190,98*	1864,56**	193,23**
<b>cri</b>	23485,94**	1921,04**	992,08*	857,19**	613,04**
<b>crp</b>	46221,98**	3092,51	52,64	5496,46**	2603,07**
<b>cre</b>	14998511,85**	32928,88*	24587,77	43513,98**	35935,21**
<b>ahb</b>	248,63**	57,14**	33,53**	5,90**	2,60**
<b>lhb</b>	4580,57**	110,94**	0,02	55,22**	44,29**
<b>ain</b>	---	117,08	---	2,62**	6854,44**
<b>alp</b>	379806,14**	755,36	44,64	1696,99**	1076,49**
<i>Cualitativas</i>					
	<b>X<sup>2</sup></b>				
<b>enf</b>	314,63**				
<b>hcr</b>	190,18**				

TABLA 2

**Correlaciones entre las variables agronómicas y las componentes extraídas del análisis de componentes principales en *L. perenne*. Para la descripción de variables ver Tabla 1; % var. acum.: % de varianza acumulada; \*: significativo al nivel 0,05; \*\*: significativo al nivel 0,01.**

*Correlations between agronomic traits and the components extracted in the principal component analysis in *L. perenne*. See Table 1 for a description of variables; % var. acum.: % of cumulative variance; \*: significant at 0.05 level. \*\*: significant at 0.01 level.*

Variable	Componente del ACP		
	FACTOR 1	FACTOR 2	FACTOR 3
<b>fes</b>	0,55(**)	-0,59(**)	-0,12
<b>cri</b>	0,88(**)	0,03	-0,03
<b>crp</b>	0,90(**)	0,18	0,12
<b>cre</b>	0,85(**)	0,21	-0,06
<b>ahb</b>	0,10	0,87(**)	-0,09
<b>lhb</b>	0,03	0,90(**)	-0,06
<b>ain</b>	0,48(**)	-0,18	0,44(**)
<b>alp</b>	0,24(*)	0,66(**)	0,52(**)
<b>enf</b>	0,72(**)	-0,01	0,07
<b>hcr</b>	-0,09	0,02	0,90(**)
<b>Autovalor</b>	3,48	2,48	1,26
<b>% Var. acum.</b>	34,82	59,65	72,26

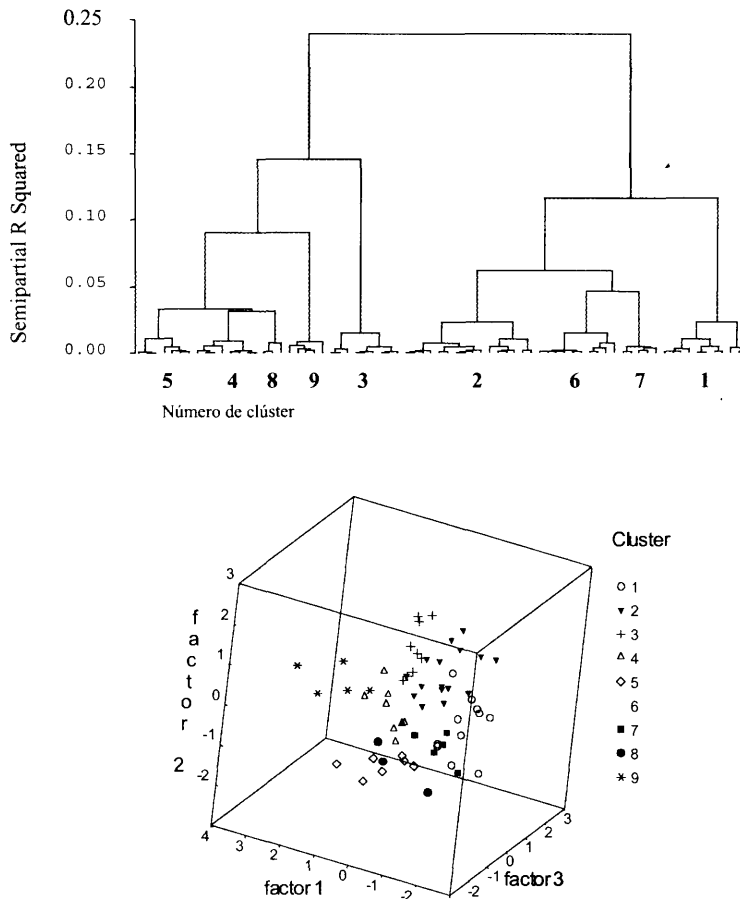


FIGURA 3

Superior (3a): diagrama de la clasificación ascendente jerárquica en 74 accesiones de *L. perenne*, utilizando el método de agregación de Ward sobre las tres primeras componentes del ACP. Inferior (3b): representación factorial de la clasificación ascendente jerárquica sobre las tres primeras componentes. Los símbolos representan los conglomerados del análisis clúster.

*Above (3a): diagram of hierarchical cluster analysis in 74 accessions of L. perenne, using the Ward aggregation method with the first three components.*

*Below (3b): factorial representation of the hierarchical classification of the first three components. Symbols represent the clusters.*

TABLA 3

**Medias, varianzas e intervalos de variación de las variables estudiadas para cada método de muestreo, colección base, y para el testigo 'Brigantia' en *L. perenne*. En negrita se resaltan aquellas varianzas superiores a las de la colección total. Para la descripción de variables ver Tabla 1.**

*Means, variances and ranges of the traits studied for each sampling method, total collection, and the control 'Brigantia' in *L. perenne*. In bold letter are marked the variances that have been bigger than in the base collection. See Table 1 for a description of variables.*

		VARIABLE AGRONÓMICA									
		fes	crí	crp	cre	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr
<b>Brigantia</b>	Media	140,13	18,53	48,42	150,89	5,17	13,48	121,34	91,95	3,40	2,80
	Varianza	43,75	222,27	940,41	12305,88	2,64	18,91	5105,25	559,15	0,88	0,89
<b>Colección total</b>	Media	135,89	16,03	41,14	141,18	5,08	14,12	104,09	84,46	3,42	2,97
	Varianza	91,91	194,14	1019,41	16109,80	1,37	18,29	2275,63	476,31	1,19	0,78
	Rango	38,43	26,63	68,16	261,66	2,89	9,43	100,09	40,13	2,27	2,07
<b>Método 1</b>	Media	136,31	16,21	41,81	141,41	5,08	14,21	105,01	84,21	3,43	2,98
	Varianza	91,39	191,38	1016,54	<b>16241,88</b>	1,37	<b>18,35</b>	<b>2319,02</b>	<b>481,32</b>	<b>1,20</b>	0,78
	Rango	13,66	9,09	23,81	64,25	1,10	3,73	37,49	14,34	0,73	0,72
<b>Método 2</b>	Media	131,85	17,13	41,22	138,01	5,15	14,97	96,38	86,18	3,28	2,76
	Varianza	<b>134,26</b>	183,09	<b>1022,16</b>	<b>16711,94</b>	<b>1,55</b>	<b>23,76</b>	1873,65	<b>486,10</b>	<b>1,37</b>	<b>0,99</b>
	Rango	24,67	11,01	31,43	74,99	2,46	7,76	36,24	25,14	0,72	0,81
<b>Método 3</b>	Media	138,10	16,76	42,62	145,82	5,04	13,98	105,62	82,49	3,47	2,92
	Varianza	86,75	<b>208,08</b>	<b>1023,31</b>	<b>17301,92</b>	1,30	17,64	2236,25	465,68	1,18	<b>0,80</b>
	Rango	9,64	5,10	15,49	52,99	0,65	2,10	27,99	8,35	0,69	0,45
<b>Método 4</b>	Media	138,92	17,99	44,01	150,58	4,91	14,04	100,05	83,24	3,34	2,93
	Varianza	88,46	<b>295,93</b>	<b>1164,85</b>	<b>17995,86</b>	1,14	16,95	1852,75	<b>516,37</b>	<b>1,19</b>	0,66
	Rango	32,00	19,34	44,35	91,32	1,33	5,86	54,61	29,26	1,40	1,13
<b>Método 5</b>	Media	136,46	16,65	41,11	135,81	4,82	13,68	96,44	81,74	3,30	2,78
	Varianza	<b>94,48</b>	163,03	936,34	<b>17055,18</b>	1,35	<b>19,20</b>	2002,91	<b>491,12</b>	<b>1,45</b>	<b>0,97</b>
	Rango	24,67	13,68	39,95	114,12	2,46	7,76	49,20	26,26	1,77	1,00
<b>Método 6</b>	Media	138,84	18,35	47,06	165,29	5,29	14,86	102,90	80,52	3,58	2,57
	Varianza	<b>97,15</b>	<b>258,49</b>	<b>1160,82</b>	<b>21132,91</b>	<b>1,47</b>	<b>19,35</b>	2210,81	<b>553,16</b>	<b>1,32</b>	<b>0,99</b>
	Rango	30,79	26,63	68,16	261,66	2,28	7,84	82,87	34,16	2,21	1,36

partida. El test de comparación de Wilcoxon (Tabla 7) no reveló diferencias significativas para medias y varianzas en ningún método; sin embargo, el coeficiente de retención de los intervalos de variación fue notablemente inferior en los métodos de selección al azar (métodos uno y tres), que alcanzó sólo el 34 y 23% respectivamente, y resultó máximo en el método seis (87%). El resto de métodos mantuvieron coeficientes de retención aceptables.

En la Figura 4a se puede observar las distribuciones de los intervalos de variación para cada método. Como era de esperar, ninguna de las colecciones extraídas llega al 100% de retención, y se puede observar una mayor efectividad de los métodos multivariantes, en general, en la conservación de los intervalos de variación. La Figura

4b muestra las varianzas medias expresadas como porcentaje de las varianzas de la colección total. Los métodos dos y seis son los que presentan varianzas medias relativas más altas.

Los métodos de selección al azar se mantienen en porcentajes cercanos al 100% y con intervalos de confianza cortos. En general, y de acuerdo con la bibliografía, se observaron mayores varianzas medias en los procedimientos multivariantes.

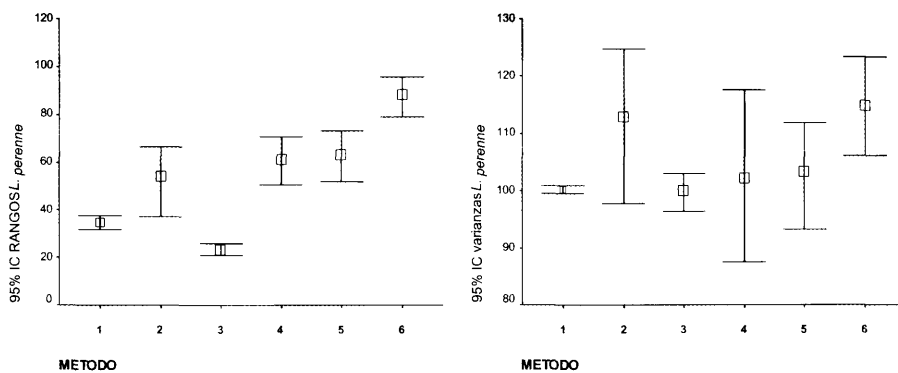


FIGURA 4

***L. perenne*. Izquierda (4a): rangos medios para las 10 variables agronómicas, expresados como % del rango de la colección total. Derecha (4b): varianzas medias para las 10 variables agronómicas, expresados como % de la varianza de la colección total. Las barras de error representan intervalos de confianza al 95%.**

*L. perenne*. Left (4a): mean ranges for the 10 agronomic traits, expressed as % of the range of the total collection. Right (4b): mean variances for the 10 agronomic traits, expressed as % of the variance of the total collection. The error bars represent confidence intervals of 95%

### Raigrás italiano

El ANOVA mostró diferencias significativas en todas las variables. El test de Kruskal-Wallis también fue significativo para las dos variables cualitativas (Tabla 4). El ACP sobre la colección total explicó un 82% de la varianza con tres componentes extraídas (Figura 5b). La Tabla 5 muestra las correlaciones entre las variables agronómicas y las tres componentes extraídas en el ACP. El *Factor 1* se relaciona con casi todas las variables de espigado y de crecimiento tardío (*fes, cre, crv, ain* y *alp*). El *Factor 2* correlaciona con las variables de forma de la hoja (*ahb* y *lhb*) y el crecimiento de primavera (*crp*). El *Factor 3* se relaciona con las variables cualitativas (*enf* y *hcr*). La

clasificación ascendente jerárquica basada en las componentes principales estableció seis grupos de accesiones, explicando un 71% de la varianza (Figura 5a).

TABLA 4

**Cuadrados medios del análisis de varianza y test de Kruskal-Wallis para variables cualitativas en *L. multiflorum*. FV: fuente de variación; GL: grados de libertad; Blq: bloque; Pobl: población; X2: valor del test chi-cuadrado; fes: fecha espigado; crp, cre, crv: crecimientos en primavera, en espigado y en verano; alp: altura de la planta; enf: tolerancia a enfermedades; lhb y ahb: longitud y anchura de la hoja bandera; hcr: hábito de crecimiento; ain: n° inflorescencias; \*: significativo al nivel 0,05; \*\*: significativo al nivel 0,01.**

*Mean squares of the analysis of variance and test of Kruskal-Wallis for qualitative variables in *L. multiflorum*; FV: source of variation; GL: degrees of freedom; Blq: Block; Pobl: accession; X2: chi-squared value. fes: heading date; crp, cre, crv: growths in spring, in heading and in summer; alp: height of the plant; enf: tolerance to diseases; lhb and ahb: length and width of the flag leaf; hcr: habit of growth; ain: number of inflorescences; \*: significant at 0.05 level; \*\*: significant at 0.01 level.*

FV GL	Año 1	Blq(Año) 1	Pobl 41	Pobl*Año 41
<i>Cuantitativas</i>				
<b>fes</b>	23782,3293**	356,09**	16997,09**	196,95**
<b>crp</b>	525563,42**	8180,29**	2221,12**	2235,73**
<b>cre</b>	521771,63**	33622,75**	45749,33**	8121,89**
<b>crv</b>	6407,05**	6455,94**	10797,09**	1094,72**
<b>ahb</b>	335,61**	14,13**	25,04**	6,61**
<b>lhb</b>	3372,89**	12,09	423,17**	81,73**
<b>ain</b>	237,50	135087,84**	8923,54**	4935,28
<b>alp</b>	3236,90**	68,12	18094,45**	1933,08**
<i>Cualitativas</i>				
	X <sup>2</sup>			
<b>enf</b>	185,12**			
<b>hcr</b>	194,26**			



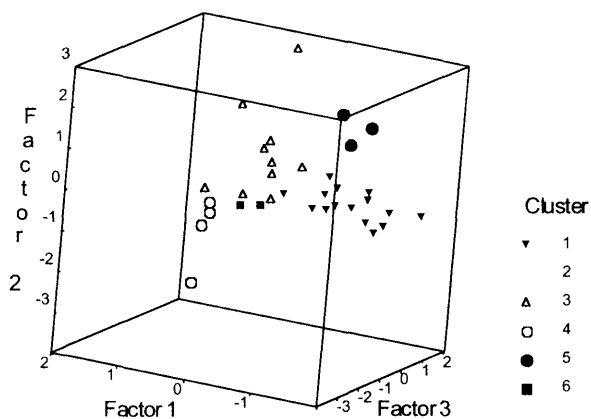
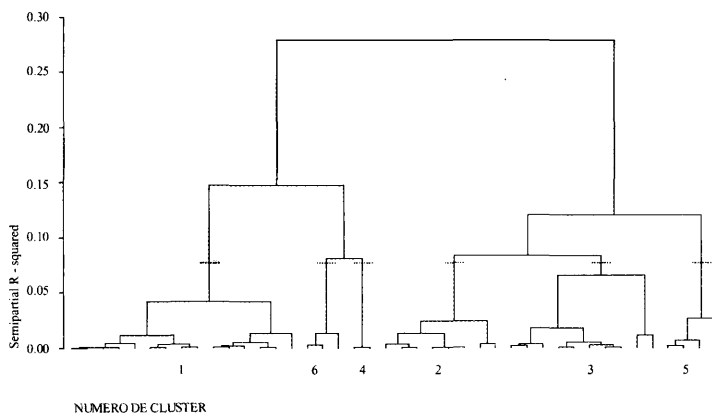


FIGURA 5

Encima (5a): diagrama de clasificación ascendente jerárquica en 42 accesiones de *L. multiflorum* utilizando el método de Ward basado en las tres primeras componentes del ACP. Debajo (5b): representación factorial de la clasificación ascendente jerárquica de las tres primeras componentes. Los símbolos representan los conglomerados del análisis clúster.

Above (5a): diagram of hierarchical cluster analysis in 42 accessions of *L. multiflorum*, using the Ward aggregation method. Below (5b): factorial representation of the hierarchical classification of the first three components. Symbols represent the clusters.

TABLA 5

**Correlaciones entre las variables agronómicas y las componentes extraídas del análisis de componentes principales en *L. multiflorum*. Para descripción de variables ver Tabla 4; % var. acum.: % de varianza acumulada; \*: significativo al nivel 0,05; \*\*: significativo al nivel 0,01.**

*Correlations between agronomic traits and the components extracted in the principal component analysis in *L. multiflorum*. See Table 4 for a description of variables. % var. acum.: % of cumulative variance; \*: significant at 0.05 level. \*\*: significant at 0.01 level.*

Variable	Componente del ACP		
	FACTOR 1	FACTOR 2	FACTOR 3
<b>fes</b>	0,96(**)	0,02	-0,06
<b>crp</b>	0,36(*)	0,76(**)	0,09
<b>cre</b>	0,87(**)	0,37(*)	0,19
<b>crv</b>	0,87(**)	0,27	0,21
<b>ahb</b>	0,20	0,82(**)	0,13
<b>lhb</b>	0,77(**)	0,47(**)	0,22
<b>ain</b>	0,77(**)	0,32(*)	-0,01
<b>alp</b>	0,84(**)	0,32(*)	0,12
<b>enf</b>	0,54(**)	-0,16	0,63(**)
<b>hcr</b>	-0,07	0,35(*)	0,87(**)
<b>Autovalor</b>	5,95	1,31	0,93
<b>% Var. acum.</b>	59,55	72,63	81,94

En la Tabla 6 se muestran las medias y varianzas para cada método. De nuevo los métodos basados en diversidad (métodos dos y cinco) y el método seis, seleccionan colecciones con varianzas medias más altas que las de la colección total. En general, también se observa una mayor eficacia de los métodos multivariantes en la conservación de los intervalos de variación (Figura 6a). Los métodos de selección al azar obtuvieron los coeficientes más bajos de retención (45 y 26%, respectivamente), mientras que el método más conservativo volvió a ser el método seis (93%). En cuanto a las varianzas, los métodos basados en diversidad (métodos dos y cinco) y el método seis son los que más incrementaron las varianzas en las colecciones nucleares creadas (Figura 6b). El test de Wilcoxon (Tabla 7) no mostró diferencias significativas en ninguna comparación.

TABLA 6

Medias, varianzas e intervalos de variación de las variables estudiadas para cada método de muestreo, colección base, y para el testigo 'Vitesse' en *L. multiflorum*. En negrita se resaltan aquellas varianzas superiores a las de la colección total. Para descripción de variables ver Tabla 4.

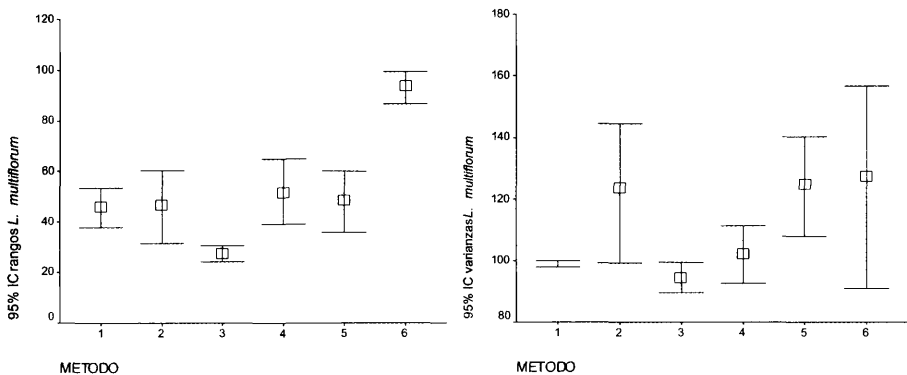
*Means, variances and ranges of the traits studied for each sampling method, base collection, and the control 'Vitesse' in L. multiflorum. In bold letter are marked the variances that have been bigger than in the total collection. See Table 4 for a description of variables*

		VARIABLE AGRONÓMICA									
		fes	crp	cre	crv	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr
<b>Vitesse</b>	Media	132.32	19.98	119.47	33.97	10.10	25.27	72.36	108.11	3.19	3.91
	Varianza	63.80	1213.87	8858.65	686.93	1.25	22.46	2607.50	173.20	1.28	1.02
<b>Colección total</b>	Media	112,38	19,30	67,15	17,68	7,97	17,21	71,91	84,37	3,31	3,02
	Varianza	75,89	864,76	2956,40	382,83	2,56	23,64	2161,28	351,57	1,28	1,25
	Rango	136,00	44,81	161,95	60,69	12,30	28,08	128,22	120,80	4,39	4,18
<b>Método 1</b>	Media	112,12	17,94	66,01	17,07	7,85	16,93	72,49	83,28	3,32	2,96
	Varianza	73,40	847,99	2923,09	366,83	2,55	23,64	<b>2163,90</b>	345,52	<b>1,28</b>	<b>1,25</b>
	Rango	38,20	18,96	67,04	32,05	1,84	6,23	35,36	42,40	0,97	0,94
<b>Método 2</b>	Media	99,07	21,35	51,74	9,37	8,11	16,32	70,07	71,22	3,20	2,95
	Varianza	<b>99,51</b>	<b>957,21</b>	2161,65	283,90	<b>4,17</b>	<b>38,99</b>	<b>2750,57</b>	<b>456,18</b>	<b>1,35</b>	<b>1,73</b>
	Rango	59,55	16,80	64,42	35,06	2,42	7,58	28,07	37,13	0,49	0,76
<b>Método 3</b>	Media	114,61	18,75	63,62	15,13	7,94	17,03	<b>71,56</b>	84,76	3,18	<b>2,79</b>
	Varianza	68,73	826,67	2663,80	300,46	2,44	22,30	2185,88	349,82	1,23	1,29
	Rango	16,65	12,64	33,52	14,95	1,47	5,03	19,63	23,41	0,68	0,51
<b>Método 4</b>	Media	115,24	21,19	65,71	14,25	7,90	16,55	70,51	87,12	3,16	2,81
	Varianza	70,98	<b>1036,02</b>	2658,43	311,84	<b>2,64</b>	21,25	<b>2213,51</b>	<b>377,90</b>	<b>1,38</b>	<b>1,52</b>
	Rango	50,85	19,98	68,19	35,14	2,00	6,62	22,45	49,88	1,48	1,22
<b>Método 5</b>	Media	114,30	19,49	63,70	15,44	8,16	17,43	74,79	82,24	3,10	2,73
	Varianza	<b>100,94</b>	752,56	2877,00	<b>449,71</b>	<b>3,49</b>	<b>33,93</b>	<b>2987,40</b>	<b>543,80</b>	1,26	<b>1,66</b>
	Rango	46,10	20,05	64,32	36,42	1,65	5,32	24,06	46,37	1,24	1,13
<b>Método 6</b>	Media	120,98	22,66	87,82	25,78	8,19	18,93	73,44	89,93	3,32	2,98
	Varianza	58,26	<b>1316,66</b>	<b>6068,50</b>	<b>754,23</b>	<b>2,99</b>	21,54	<b>2446,29</b>	<b>374,88</b>	1,15	1,11
	Rango	62,27	37,70	142,96	60,69	5,48	16,27	90,58	65,42	1,68	2,11

FIGURA 6

*L. multiflorum*. Izquierda (6a): rangos medios para las 10 variables agronómicas, expresados como % del rango de la colección total. Derecha (6b): varianzas medias para las 10 variables agronómicas, expresados como % de la varianza de la colección total. Las barras de error representan intervalos de confianza al 95%.

*L. multiflorum*. Left (6a): mean ranges for the 10 agronomic traits, expressed as % of the range of the total collection. Right (6b): mean variances for the 10 agronomic traits, expressed as % of the variance of the total collection. The error bars represent confidence intervals of 95%.



## DISCUSIÓN

Según Brown (1989b), la diversidad de las colecciones de germoplasma no está distribuida al azar y dicha diversidad presenta una estructura que puede ser representada por un modelo jerárquico (Hamon *et al.*, 1994). Por tanto, los métodos de selección aleatoria no parecen ser adecuados cuando se conocen datos cuantitativos de la colección de partida, aunque sí pueden utilizarse cuando no se dispone de datos de evaluación/caracterización. La mayor efectividad de los métodos multivariantes en la caracterización de colecciones de germoplasma de raigrás inglés también ha sido observada por Casler (1995) y por Balfourier *et al.* (1998). En nuestro caso, aunque las comparaciones de medias y varianzas no hayan sido significativas para ningún método de muestreo, parece obvio descartar los métodos de selección al azar por los bajos coeficientes de retención observados en los intervalos de variación. Las retenciones observadas en los intervalos son, por término medio, inferiores a las observadas por Malosetti *et al.* (2000) en un estudio de cebada, debido probablemente al menor tamaño relativo de las colecciones nucleares frente a las colecciones de partida (en nuestro caso un 12% y un 14%, frente a un 19,5% seleccionado sobre la colección de cebada). En

ambas especies el máximo porcentaje de retención en los intervalos de variación se produce en el método seis (87% y 93%, respectivamente para raigrás inglés e italiano, Tabla 7). Según Van Hintum *et al.* (2000) la mayor conservación de los intervalos por esta estrategia es debida a la selección de entradas que presentan valores cercanos a los extremos en alguno de los caracteres considerados. Esta estrategia ha sido utilizada en el desarrollo de colecciones nucleares de *Vigna radiata* L. (Bisht *et al.*, 1998), de caña de azúcar (Balakrishnan *et al.*, 2000), de sorgo (Grenier *et al.*, 2000a, 2000b), de café (Hamon *et al.*, 1995, 1998), de *Abelmoschus esculentus* L. (Mahajan *et al.*, 1996), y de guisante (Singh *et al.*, 1991).

TABLA 7

**Test de Wilcoxon y porcentajes de retención para los métodos comparados. P: probabilidad; SIG: significación; ns: no significativo.**

*Wilcoxon test and retention percentages for the compared methods. P: probability; SIG: significance; ns: not significant.*

MÉTODO	COMPARACIÓN	<i>L. perenne</i>		<i>L. multiflorum</i>	
		P	SIG.	P	SIG.
1	Medias	0,8205	ns	0,7942	ns
	Varianzas	1,0000	ns	0,9109	ns
	% retención		<b>34,69%</b>		<b>45,62%</b>
2	Medias	1,0000	ns	0,7375	ns
	Varianzas	0,7913	ns	0,7942	ns
	% retención		<b>51,71%</b>		<b>45,96%</b>
3	Medias	0,9698	ns	0,7942	ns
	Varianzas	0,9698	ns	0,7942	ns
	% retención		<b>23,29%</b>		<b>26,51%</b>
4	Medias	0,9698	ns	0,8521	ns
	Varianzas	0,9698	ns	0,9702	ns
	% retención		<b>60,78%</b>		<b>52,03%</b>
5	Medias	0,7913	ns	0,9702	ns
	Varianzas	0,9097	ns	0,7375	ns
	% retención		<b>62,58%</b>		<b>48,20%</b>
6	Medias	0,9097	ns	0,5774	ns
	Varianzas	0,7913	ns	1,0000	ns
	% retención		<b>87,31%</b>		<b>93,00%</b>

En la Figura 7 se pueden observar las curvas de distribución de frecuencias en las poblaciones seleccionadas por los métodos determinísticos para algunas variables. En general, se observa un mejor ajuste de las curvas en la colección de raigrás inglés que en la de raigrás italiano. El motivo parece ser la existencia en raigrás italiano de una clara distinción de la colección de partida en dos grupos de precocidad: un grupo precoz, caracterizado por altas producciones concentradas en fechas tempranas (clúster 1, 4 y 6 de la Figura 5), y un grupo tardío, con producciones concentradas en fechas más tardías (clúster 2, 3 y 5). La fecha de espigado es crucial en el desarrollo de las plantas e influye notablemente en los caracteres de espigado medidos. La curva que mejor se ajusta a la

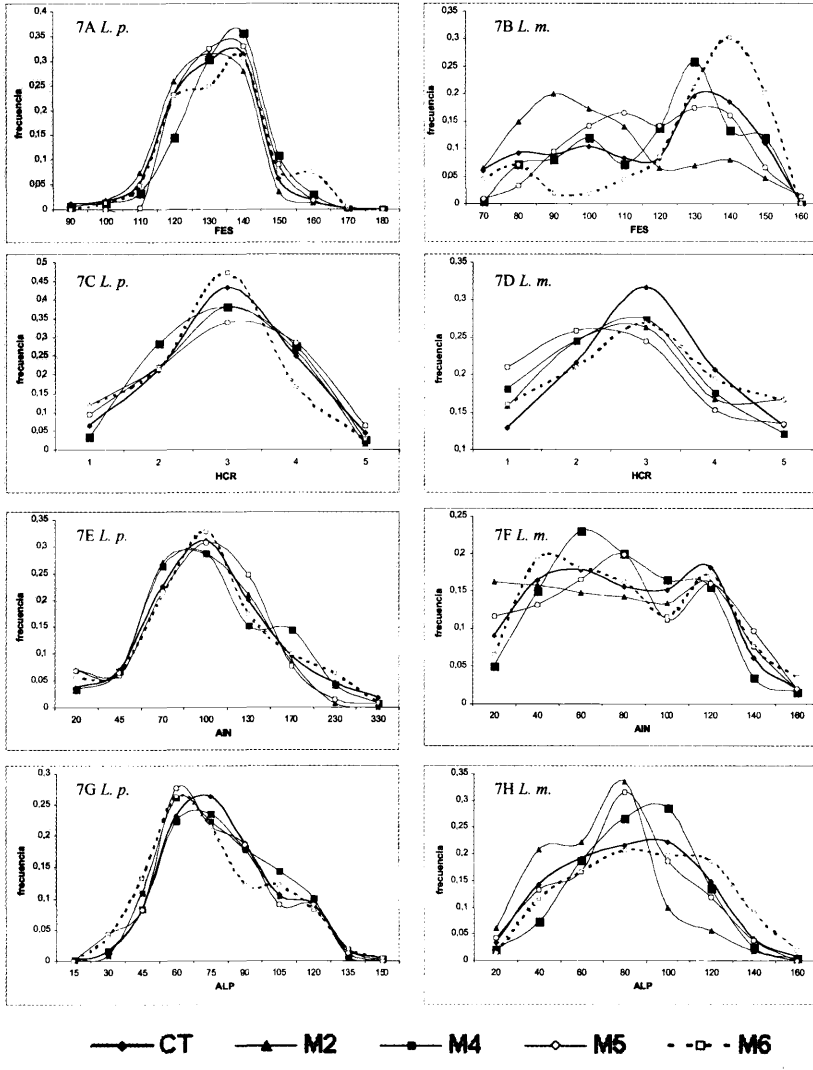


FIGURA 7

Distribución de frecuencias de las colecciones totales y las colecciones nucleares seleccionadas por los métodos determinísticos para las variables *fes*, *hcr*, *ain* y *alp*. L.p.: *L. perenne*; L.m.: *L. multiflorum*; CT: colección total; M2, M4, M5 y M6: métodos 2, 4, 5 y 6 respectivamente.

*Distribution of frequencies of the total collections and of the selected core collections by deterministic methods in the variables fes, hcr, ain and alp. L.p.: L. perenne; L.m.: L. multiflorum; CT: total collection; M2, M4, M5 and M6: methods 2, 4, 5 and 6 respectively.*

colección total es la del método seis. Tal distinción no se aprecia tan claramente en la colección de raigrás inglés, adoptando todas las curvas una forma similar. Hamon *et al.* (1998) obtuvieron curvas distintas en colecciones núcleo de cuatro cultivos diferentes, mostrando que la complejidad y la organización de las estructuras genéticas en las colecciones de partida dependen del propio cultivo. Para ambas colecciones seleccionadas por dicho método, se aprecia una mayor representación de los valores cercanos a los extremos y una menor representación de los valores cercanos a la media, debido a la presencia de menores redundancias. Grenier *et al.* (2000a) también observaron este efecto, concluyendo que dicha estrategia no solo permite una mayor retención de la diversidad de la colección de partida, sino que además contribuye a eliminar redundancias en la colección nuclear. Si se representa la contribución relativa acumulada de cada accesión a la inercia de la nube de puntos en el ACP (Figura 8), se observa cómo al aumentar el tamaño de la colección núcleo se obtienen dos patrones distintos para cada especie. En *L. perenne* el incremento es gradual y se alcanza el 50% de la varianza total con un 27% de la colección total, mientras que en *L. multiflorum* el incremento es mayor en el origen, alcanzando con sólo un 19% de la colección de partida, la mitad de la inercia de la nube de puntos. En otras palabras, la diversidad de la colección de *L. multiflorum* es mayor que en *L. perenne*. Este hecho se puede comprobar observando los índices *HR* calculados para la colección total y para cada método (Tabla 8). La diversidad media calculada en la colección de *L. multiflorum* (2,705), es mayor que en *L. perenne* (2,527). El método cuatro es el que menos diversidad relativa retiene en ambas colecciones (95 y 96%), seguido de los métodos de selección al azar (96 y 97% en *L. multiflorum*, y 97% en *L. perenne*). Las mejores retenciones se producen en los métodos dos, cinco y seis. En dichos métodos se alcanzan retenciones superiores al 100%, (método seis en *L. multiflorum* y métodos dos y cinco en *L. perenne*), ello es debido a la selección de entradas con una distribución de frecuencias menos concentrada en valores próximos a la media, debido a esto la diversidad relativa es incluso mayor que en la colección de partida. Este hecho, observado por algunos autores (Balfourier *et al.*, 1998, 1999; Polignano *et al.*, 2001), es debido a una nueva organización en las frecuencias de clase por la eliminación de las repeticiones producidas por genotipos semejantes. Según Frankel y Brown (1984), la colección nuclear debe conservar la máxima diversidad con un mínimo de redundancias y el menor tamaño posible. Consecuentemente no debe ser una copia reducida de la colección total, sino contener una nueva organización que disminuya las redundancias (Hamon *et al.*, 1998).

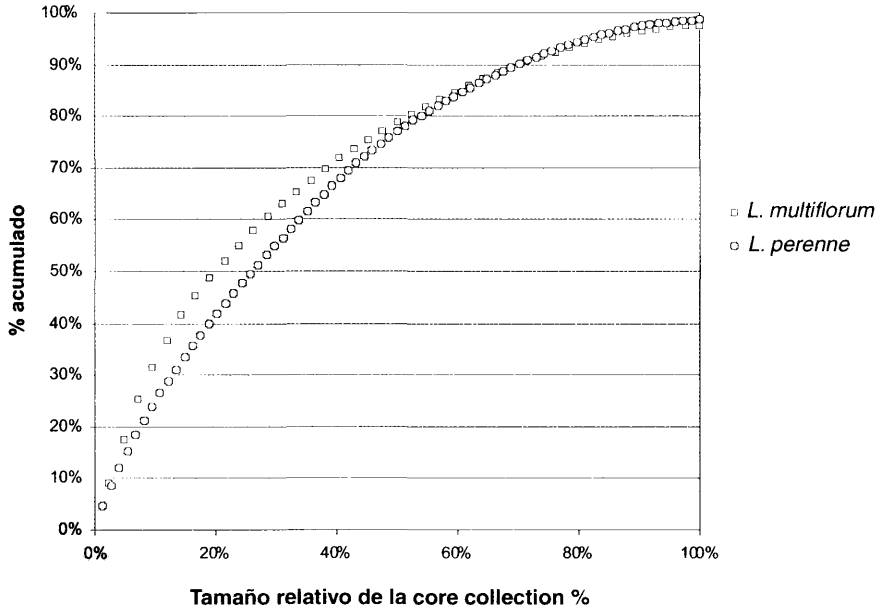


FIGURA 8

**Curva de contribución relativa (CRi) acumulada de las accesiones a la varianza total de la nube de puntos en el análisis de componentes principales para *L. perenne* y *L. multiflorum*.**

*Curve of accumulated relative contribution (CRi) of accessions to the total variance of the cloud of points in the principal component analysis in *L. perenne* and *L. multiflorum*.*



TABLA 8

**Índices de diversidad de Shannon-Weaver para las colecciones nucleares creadas en cada método y en la colección total.**

*Shannon-Weaver diversity index in the core collections selected by each method and in the whole collection.*

*Lolium multiflorum*

METODO	fes	crp	cre	crv	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr	MEDIA	HR (%)
CT	3,081	2,193	2,234	2,131	2,918	2,354	4,071	3,604	2,221	2,240	2,705	100,00%
M1	2,823	2,168	2,186	2,050	2,820	2,254	3,939	3,426	2,192	2,210	2,607	96,38%
M2	3,069	2,206	2,255	2,059	3,082	2,413	4,141	3,285	2,166	2,287	2,696	99,69%
M3	2,922	2,168	2,199	2,092	2,827	2,219	3,928	3,394	2,229	2,240	2,622	96,94%
M4	2,898	2,184	2,186	1,946	2,818	2,188	3,758	3,406	2,255	2,269	2,591	95,80%
M5	2,984	2,171	2,212	2,092	2,963	2,237	4,074	3,425	2,202	2,277	2,664	98,49%
M6	2,664	2,239	2,286	2,269	3,293	2,552	3,916	3,662	2,214	2,296	2,739	101,28%

*Lolium perenne*

METODO	fes	crp	cre	cri	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr	MEDIA	HR (%)
CT	2,289	2,171	2,109	2,199	1,997	3,743	2,547	4,133	2,131	1,947	2,527	100,00%
M1	2,189	2,142	2,078	2,171	1,919	3,599	2,495	4,030	2,100	1,891	2,462	97,43%
M2	2,249	2,165	2,166	2,212	2,327	3,913	2,393	4,086	2,168	1,979	2,566	101,56%
M3	2,165	2,154	2,088	2,180	1,913	3,601	2,479	4,034	2,100	1,921	2,463	97,50%
M4	2,259	2,210	2,003	2,192	1,697	3,442	2,521	4,128	2,118	1,867	2,444	96,72%
M5	2,015	2,135	2,151	2,182	2,214	3,865	2,444	4,082	2,209	2,098	2,540	100,51%
M6	2,420	2,239	2,223	2,264	1,859	3,478	2,566	4,159	2,119	1,896	2,522	99,83%

La contribución relativa a la inercia de la nube de puntos se representa en la Figura 9, individualmente para cada población en orden decreciente. En ambas colecciones se observa un punto de inflexión en la curva a partir del cual dicha contribución relativa comienza a decaer notablemente. Balakrishnan *et al.* (2000), utilizaron este punto como referencia para determinar el tamaño ideal de una colección nuclear en caña de azúcar. Dicho punto coincide con los tamaños de muestra seleccionados para ambas colecciones en este trabajo. Finalmente se muestra en la Tabla 9 los valores medios de las variables agronómicas y lugar de procedencia de las poblaciones seleccionadas por el método seis.

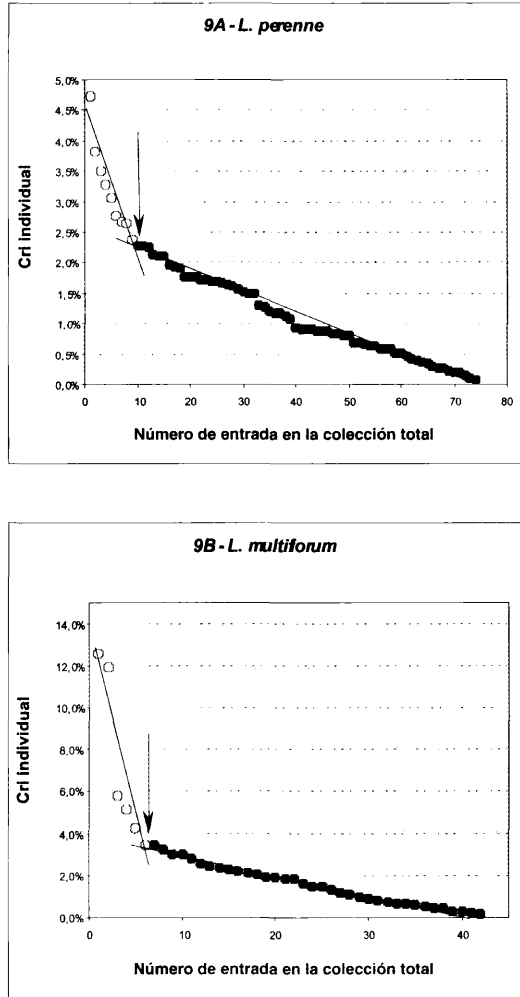


FIGURA 9

**Contribución individual relativa (CRI) de cada entrada a la varianza total de la nube de puntos en el análisis de componentes principales en raigrás inglés (9a) y raigrás italiano (9b). El punto de inflexión señalado delimita las poblaciones seleccionadas para la colección nuclear.**

*Single contribution of each accession to the total variance of the cloud of points in the principal component analysis in perennial ryegrass (9a) and Italian ryegrass (9b). The inflexion point marked defines the selected accessions in the core subset.*

TABLA 9

Valores medios de las variables agronómicas en las poblaciones seleccionadas por el método seis en *L. perenne* y *L. multiflorum*.

Mean values of agronomic traits in selected populations by method six in *L. perenne* and *L. multiflorum*.

*Lolium perenne*

PROVINCIA	POBLACIÓN	fes	cri	crp	cre	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr
ASTURIAS	SAN MARTIN	120,51	16,22	42,63	135,06	6,58	18,81	100,63	91,53	3,34	2,46
GRANADA	LAS VIBORAS	132,63	11,40	29,92	166,14	4,70	14,26	84,76	74,14	3,63	1,86
LA CORUNA	CARIÑO	147,82	23,57	81,23	315,96	6,11	13,88	115,23	84,19	4,09	2,57
LA CORUNA	BERDOYAS	151,30	25,39	56,29	167,87	4,30	11,64	104,78	74,62	4,14	2,53
LEON	BARRIOS DE LUNA	132,49	4,56	13,07	54,30	4,50	12,75	72,74	65,21	3,27	3,22
LUGO	AIREJE	134,18	13,35	38,35	156,48	6,35	19,48	92,85	99,37	2,55	2,33
MURCIA	LA JUNQUERA	137,99	9,80	24,48	77,96	4,55	12,81	76,48	65,27	2,38	2,40
PONTEVEDRA	RIBADUMIA	144,79	29,64	69,27	196,86	5,36	16,27	123,00	87,71	4,26	3,00
PONTEVEDRA	SMIGUEL	147,83	31,19	68,28	216,99	5,20	13,84	155,61	82,61	4,59	2,72

*Lolium multiflorum*

PROVINCIA	POBLACIÓN	fes	crp	cre	crv	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr
LUGO	CASTRO	134,90	29,65	127,05	33,88	11,20	28,08	71,72	120,80	3,78	3,92
OVIEDO	GODOS	136,90	7,11	50,80	5,05	5,72	14,02	72,02	64,78	3,79	1,81
PONTEVEDRA	REDONDELA	74,63	7,80	18,99	0,00	7,02	11,81	37,64	55,38	2,79	3,58
STA. CRUZ TEN.	SAUZAL	111,65	9,91	30,42	0,00	8,03	14,39	47,71	77,30	2,11	1,91
SANTANDER	SOLARES	133,78	44,81	161,95	55,03	8,57	23,22	128,22	106,42	3,65	2,92
SANTANDER	HERAS	134,03	36,65	137,68	60,69	8,58	22,04	83,33	114,91	3,78	3,74

## CONCLUSIÓN

Una colección de recursos fitogenéticos suele ser el resultado de eventos históricos y decisiones arbitrarias en los programas de recolección. La caracterización del germoplasma recolectado, frecuentemente pone de manifiesto la existencia de material duplicado en las colecciones. En otras ocasiones son los propios objetivos de los proyectos de mejora los que producen redundancias de determinados genotipos e infrarrepresentación de otros. El concepto de colección nuclear proporciona un mejor acceso a las colecciones de germoplasma, no obstante las metodologías empleadas en su creación difieren ampliamente, estando actualmente en fase de investigación y mejora (Van Hintum, 1999).

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, el uso de métodos basados en selección al azar aumenta el riesgo de pérdida de genotipos poco representados. Las estrategias multivariantes producen colecciones nucleares más efectivas. El método seis parece ser el más indicado para la formación de colecciones nucleares según la caracterización agromorfológica realizada en las poblaciones de raigrases del CIAM. Las razones de ello son: i) el no alterar significativamente los valores medios de las colecciones de partida e incrementar las varianzas, ii) conservar un porcentaje elevado

de los intervalos de variación en las variables estudiadas, iii) preservar la diversidad genética de ambas colecciones de partida.

La multiplicación de las entradas seleccionadas en cada colección nuclear permitirá la obtención de una suficiente cantidad de semilla, optimizando el empleo de los recursos fitogenéticos del CIAM para su uso en mejora.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado mediante la financiación aportada en el proyecto RF 99-018-C1 del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

## REFERENCIAS

- BALAKRISHNAN, R.; NAIR, N.V.; SREENIVASAN, T.V., 2000. A method for establishing a core collection of *Saccharum officinarum* L. germplasm based on quantitative-morphological data. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **47** (1), 1-9.
- BALFOURIER, F.; CHARMET, G.; PROSPERI, J.M.; GOULARD, M.; MONESTIEZ, P., 1998. Comparison of different spatial strategies for sampling a core collection of natural populations of fodder crops. *Genetics, Selection, Evolution*, **30** (Suppl. 1), 215-235.
- BALFOURIER, F.; PROSPERI, J.M.; CHARMET, G.; GOULARD, M.; MONESTIEZ, P., 1999. Using spatial patterns of diversity to develop core collections. En: *Core Collections for Today and Tomorrow*, 37-48. Ed. R.C. JOHNSON; T. HODGKIN. IPGRI. Rome (Italy).
- BASIGALUP, D.H.; BARNES, D.K.; STUCKER, R.E., 1995. Development of a core collection for perennial *Medicago* introductions. *Crop Science*, **35**, 1163-1168.
- BEKELE, F.; BEKELE, I., 1996. A sampling of the phenetic diversity of cacao in the international Cocoa Gene Bank of Trinidad. *Crop Science*, **36**, 57-64.
- BISHT, I.S.; MAHAJAN, R.K.; LOKNATHAN, T.R.; GAUTAM, P.L.; MATHUR, P.N.; HODGKIN, T., 1999. Assessment of genetic diversity, stratification of germplasm accessions in diversity groups and sampling strategies for establishing a core collection of indian sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Genetic Resources Newsletter*, **119** (Suppl.), 35-46.
- BISHT, I.S.; R.K.; PATEL, D.P., 1998. The use of characterisation data to establish the Indian mungbean core collection and assessment of genetic diversity. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **45** (2), 127-133.
- BOWMAN, K.O.; HUTCHESON, K.; ODUM, E.P.; SCHENTON, L.R., 1973. Comments on the distribution of indices of diversity. *Statistical Ecology*, **3**, 315-366.
- BRESLOW, N. E. (1970). A generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal pattern of censorship. *Biometrika*, **57**, 579-594.
- BROWN, A.H.D., 1989a. Core collections: a practical approach to genetic resources management. *Genome*, **31**, 818-824.
- BROWN, A.H.D., 1989b. The case for core collection. En: *The Use Of Plant Genetic Resources*, 136-156. Ed. T. HODGKIN; A.H.D. BROWN; O.H. FRANKEL; T.J.L. VAN HINTUM; E.A.V. MORALES. John Wiley & Sons. Baffins Lane. Chichester (Reino Unido).

- BROWN, A.H.D., 1995. The core collection at the crossroads. En: *Core Collections of Plant Genetic Resources*, 136-156. Ed. T. HODGKIN; A.H.D. BROWN; T.J.L. VAN HINTUM; E. A. V. MORALES. John Wiley & Sons. Chichester (Reino Unido).
- BROWN, A.H.D.; BRUBAKER, C.L.; GRACE, J.P., 1997. Regeneration of germplasm samples: wild versus cultivated species. *Crop Science*, **37**, 7-13.
- BROWN, A.H.D.; SPILLANE, C., 1999. Implementing core collections - principles, procedures, progress, problems and promise. En: *Core Collections for Today and Tomorrow*, 1-17. Ed. R.C. JOHNSON; T. HODGKIN. IPGRI. Roma (Italia).
- BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S., 1983. Measuring genetic variability in plant populations. En: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*, 219-238. Ed. A. TANKSLEY, T.J. ORTON. Elsevier, Amsterdam (Países Bajos).
- CASLER, M.D., 1995. Patterns of variation in a collection of perennial ryegrass accessions. *Crop Science*, **35**, 1169-1177.
- DIWAN, N.; McINTOSH, M.S.; BAUCHAN, G.R., 1995. Methods of developing a core collection of annual *Medicago* species. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**, 755-761.
- FRANKEL, O. H., 1984. Genetic perspectives in germplasm conservation. En: *Genetic Manipulation: Impact on Man and Society*. Ed. W. ARBER; K. LLIMENSEE; W.J. PEACOCK; P. STERLINGER. Cambridge University Press. Cambridge (Reino Unido).
- FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D., 1984. Current plant genetic resources - A critical appraisal. En: *Genetics: New Frontiers, Proceedings of the 15th International Congress of Genetics*, Vol 4, 3-13. Co. Oxford and IBH Publishing (Reino Unido).
- FURMAN, B.J.; QUALSET, C.O.; SKOVMAND, J.H.; CORKE, H.; WESENBERG, D., 1997. Characterisation and analysis of North American triticale genetic resources. *Crop Science*, **37**, 1951-1959.
- GRENIER, C.; BRAMEL-COX, P.J.; HAMON, S., 2000a. Assesment of genetic diversity in three subsets constituted from the ICRISAT sorghum collection using random vs non-random sampling procedures. A. Using morpho-agronomical and passport data. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, 190-196.
- GRENIER, C.; DEU, M.; KRESOVICH, S.; BRAMEL-COX, P.J.; HAMON, S., 2000b. Assesment of genetic diversity in three subsets constituted from the ICRISAT sorghum collection using random vs non-random sampling procedures. B. Using molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, 197-202.
- HAMON, S.; DISSERT, S.; DEU, M.; HAMON, P.; SEGUIN, M.; GLASZMANN, J.C.; GRIVET, L.; CHANTEREAU, J.; CHEVALLIER, M.H.; FLORI, A.; LASHERMES, P.; LEGNATE, H.; NOIROT, M., 1998. Effects of quantitative and qualitative principal component score strategies on the structure of coffee, rubber tree, rice and sorghum core collections. *Genetics, Selection, Evolution*, **30** (suppl.1), 237-258.
- HAMON, S.; HODGKIN, T.; DUSSERT, S.; ANTHONY, F.; NOIROT, M., 1994. Core collection: theoretical and applied aspects. En: *Evaluation and Exploitation of Genetic Resources: Pre-breeding*, 78-82. Proceedings of the Genetic Resources Section Meeting of Eucarpia. Clermont-Ferrand (France).
- HAMON, S.; NOIROT, M.; ANTHONY, F., 1995. Developing coffee core collection using the principal component score strategy with quantitative data. En: *Core Collections of Plant Genetic Resources*, 173-196, Ed. T. HODGKIN; A.H.D. BROWN; T.J.L. VAN HINTUM; E. A. V. MORALES. John Wiley & Sons. Chichester (Reino Unido).
- JAIN, S.K.; QUALSET, C.O.; BHATT, G.M.; WU, K.K., 1975. Geographical patterns of phenotypic diversity in a World Collection of Durum Wheats. *Crop Science*, **15**, 700-704.

- JOHNSON, R.C.; JOHNSTON, W.J.; NELSON, M.C.; SIMON, C.J.; GOLOB, C.T., 1999. Core utilization and development - an example with *Poa pratensis* L. En: *Core Collections for Today and Tomorrow*, 49-60, Ed. R.C. JOHNSON; T. HODGKIN. IPGRI. Roma (Italia).
- LÓPEZ, J.E.; OLIVEIRA, J.A., 2000. Evaluación agronómica de accesiones de raigrás ingles e italiano de la Península Ibérica desprovistas de hongos endofitos. *Actas III Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes*, 199-204.
- MAHAJAN, R.K.; BISHT, I.S.; AGRAWAL, R.C.; RANA, R.S., 1996. Studies on South Asian okra collection: methodology for establishing a representative core set using characterization data. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **43** (3), 249-255.
- MALOSSETTI, M.; ABADIÉ, T.; GERMÁN, S., 2000. Comparing strategies for selecting a core subset from the Uruguayan barley collection. *Plant Genetics Resources Newsletter*, **121**, 20-26.
- MONESTIEZ, P.; GOULARD, M.; CHARMET, G., 1994. Geostatistics for spatial genetic structures: study of wild populations of perennial ryegrass. *Theoretical and Applied Genetics*, **88**, 33-41.
- MOSQUERA, M.R.; GONZÁLEZ, A.; RIGUEIRO, A., 1999. *Ecología y manejo de praderas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. INIA, 213 pp. Madrid (España).
- NOIROT, M.; HAMON, S.; ANTHONY, F., 1996. The principal component scoring: a new method of constituting a core collection using quantitative data. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **43**, 1-6.
- NOTT H.M.; LATCH G.C.M., 1993. A simple method of killing endophyte in ryegrass seed. En: *Proceedings of the Second International Symposium on Acremonium/Grass Interactions*, 14-15. Palmerston North (Nueva Zelanda).
- OLIVEIRA, J.A.; BALFOURIER, F.; CHARMET, G.; ARBONES, E., 1997a. Isozyme polymorphism in a collection of Spanish and French perennial ryegrass populations. *Agronomie*, **17**, 335-342.
- OLIVEIRA, J.A.; LINDNER, R.; BREGU, R.; GARCÍA, A.; GONZÁLEZ, A., 1997b. Genetic diversity of westernworld ryegrass landraces in Northwest Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **44**, 479-487.
- ORTIZ, R.; RUIZ-TAPIA, E.N.; MUJICA-SANCHEZ, A., 1998. Sampling strategy for a core collection of Peruvian quinoa germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**, 475-483.
- PETERS, J.P.; MARTINELLI, J.A., 1989. Hierarchical cluster analysis as a tool to manage variation in germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*, **78**, 42-48.
- PIELOU, E.C., 1969. *An introduction to mathematical ecology*. J. Wiley & Sons. New York (Estados Unidos)
- PIÑEIRO, J., 1994. Especies y mezclas pratenses en la España húmeda. En: *Actas XXXIV Reunión Científica de la SEEP*, 145-160.
- PIÑEIRO J., PÉREZ M., 1986. El interés agronómico de ecotipos españoles de plantas pratenses. *Pastos*, **44** (1), 103-118.
- POLIGNANO, G.B.; ALBA, E.; UGGENTI, P.; SCIPPA, G., 1999. Geographical patterns of variation in Bari faba bean germplasm collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **46**, 183-192.
- POLIGNANO, G.B.; ALBA, E.; UGGENTI, P.; SCIPPA, G., 2001. Diversity analysis and core collection in Bari faba bean germplasm. *Plant Genetics Resources Newsletter*, **125**, 33-38.
- ROMERSBURG, H.C., 1984. *Cluster analysis for researchers*. Lifetime Learning Publications. Belmont, California (Estados Unidos).
- SAS INSTITUTE, 1999. *SAS/STAT User's Guide, Version 8. SAS Technical Report*. SAS Institute Inc. Carry, NC (Estados Unidos).
- SCHOEN, D.J.; BROWN, A.H.D., 1993. Conservation of allelic richness in wild crop relatives is aided by

- assessment of genetic markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10.623-10.627.
- SCHOEN, D.J.; BROWN, A.H.D., 1995. Maximising genetic diversity in core collections of wild relatives of crop species. En: *Core Collection of Plant genetic Resources*, 55-77, Ed. T. HODGKIN; A.H.D. BROWN; T.J.L. VAN HINTUM; E. A. V. MORALES. John Wiley & Sons. Chichester (Reino Unido).
- SHANNON, C.E.; WEAVER, V., 1963. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press. Urbana (Estados Unidos).
- SHING, P.S.; NODARI, R.; GEPTS, P., 1991. Genetic diversity in cultivated common bean. *Crop Science*, **31** (1), 19-23.
- SPAGNOLETI, P.L.; QUALSET, C.O., 1993. Evaluation of five strategies for obtaining a core subset from a large genetic resource collection of durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**, 295-304.
- TOOLBERT, D.M.; QUALSET, C.O.; JAIN, S.K.; CRADDOCK, J.C., A diversity analysis of a World Collection of Barley. *Crop Science*, **19**, 789-794.
- VAN HINTUM, T.J.L., 1999. Status of, and perspectives for, core collections. En: *Implementation of the Global Plan of Action in Europe - Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*, 187-190. Co. T. GASS, L. FRESE, F. BEGEMANN, E. LIPMAN. Proceedings of the European Symposium, 30 June - 3 July 1998, Braunschweig, Germany. IPGRI. Roma (Italia).
- VAN HINTUM, T.J.L.; BROWN, A.H.D.; SPILANE, C.; HODGKIN, T., 2000. *Core Collections of Plant Genetic Resources*. IPGRI Technical Bulletin n°3. IPGRI. Rome (Italy).
- VAN RAAMSDONK, L.W.D.; WIJNKER, J., 2000. The development of a new approach for establishing a core collection using multivariate analyses with tulip as case. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **47**(4), 403-416.
- WILCOXON, F., 1945. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics*, **1**, 80-83.
- ZENG, Y.; LI, Z.; YANG, Z.; WANG, X.; SHEN, S.; ZHANG, H., 2001. Ecological and genetic diversity of rice germplasm in Yunnan, China. *Plant Genetics Resources Newsletter*, **125**, 24-28.

## COMPARISON AMONG PROCEDURES TO ELABORATE CORE COLLECTIONS IN PERENNIAL AND ITALIAN RYEGRASS ACCESSIONS COLLECTED IN SPAIN

### SUMMARY

Seventy-four accessions of perennial ryegrass and 42 of Italian ryegrass were characterised by agronomic traits during a two-year period. The accessions are conserved into the Germplasm Bank of forage grasses in the Agrarian Research Center

of Mabegondo (CIAM). The significant variables in the ANOVA were used for a hierarchical cluster classification using the Ward method. Diverse strategies were compared to create a core collection in each species. These methods included stratified and random samplings based on the hierarchical classification, in the Shannon-Weaver diversity index and in the maximum contribution to the variance in a principal component analysis. Wilcoxon test did not show significative differences in the means and variances among cores and total collection. Core collections selected by the strategy of the highest contribution to the variance in the principal component analysis presented the best percentage of retention in ranges of variation, and it was considered the most appropriate method for the maintenance of diversity in the total collections.

**Keywords:** core collection, *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, genetic resources, germplasm banks.