

COMPARACIÓN DE PROCEDIMIENTOS PARA ELABORAR UNA COLECCIÓN NÚCLEO EN ACCESIONES DE RAIGRÁS INGLÉS

J. E. LÓPEZ¹ Y J.A. OLIVEIRA^{1 2}

¹ Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM). Apdo. 10. 15080 A Coruña (España). E-mail: juliolopezdiaz@yahoo.es. ² Dpto. de Producción Vexetal. Escola Politécnica Superior, Universidad de Santiago, 27002 Lugo (España). E-mail: oliveira_ciam@igatel.igape.es

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar agromorfológicamente la colección de raigrás inglés (74 accesiones) del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM) y crear una colección núcleo “*core collection*” basada en esta caracterización. Con este fin se estudiaron mediante 10 caracteres las 74 accesiones (20 plantas por accesión) en los años 1999 y 2000 en el CIAM. La clasificación ascendente jerárquica fue útil en la identificación de nueve grupos de accesiones al explicar un 76% de la variabilidad total. Con el fin de seleccionar nueve accesiones como integrantes de la colección núcleo se compararon seis métodos de muestreo. Estos métodos incluyeron muestreos estratificados y aleatorios basados en la clasificación jerárquica, en el índice de diversidad de Shannon y en la máxima contribución a la varianza en un análisis de componentes principales. Ninguna de las colecciones núcleo creadas mostró diferencias en las medias y en las varianzas mediante el test de Wilcoxon. La colección núcleo basada en la estrategia de mayor contribución a la varianza fue la que presentó un mayor porcentaje de retención de los rangos de variación, por lo que se considera la más adecuada.

Palabras clave: bancos de germoplasma, colección núcleo, *Lolium perenne*, recursos genéticos.

INTRODUCCIÓN

En las dos últimas décadas, en los Bancos de Germoplasma ha suscitado interés el desarrollo de técnicas que permitan la creación efectiva de colecciones núcleo sin pérdida de la diversidad genética. Según las recomendaciones de Frankel (1984), la estrategia de muestreo debería maximizar la diversidad de la colección núcleo con un

mínimo de accesiones, eliminando la redundancia producida por genotipos semejantes. Brown (1989b) sugirió que una muestra del 10% de una colección base conservaría un 70% de la diversidad total. El muestreo jerarquizado (Brown, 1989a), conlleva la agrupación de las accesiones en base a descriptores de pasaporte, datos ecogeográficos y geoestadísticos, marcadores moleculares e isoenzimáticos, y caracteres fenotípicos, y ha sido aplicado en el desarrollo de colecciones núcleo de diferentes cultivos. Sin embargo la elección del mejor criterio para la creación de colecciones núcleo esta siendo objeto de análisis por los mejoradores en diferentes especies. El objetivo de este trabajo es comparar la efectividad de técnicas habitualmente utilizadas en el muestreo de accesiones para crear una colección núcleo de raigrás inglés.

MATERIAL Y METODOS

En 1998, 1999 y 2000 se evaluaron un total de 74 accesiones de raigrás inglés pertenecientes a la colección de gramíneas pratenses del CIAM empleando 10 caracteres agronómicos y siguiendo la metodología descrita por López y Oliveira (2000). El diseño experimental consistió en dos bloques completos al azar con 10 individuos por población y bloque separados en líneas de 80 cm. En cada planta individual se midieron parámetros cuantitativos y cualitativos. Los caracteres cuantitativos fueron: fecha de espigado (*fes*, = nº días a partir del 1 de enero), producción en g de materia seca durante los periodos de invierno (*cri*), primavera (*crp*) y en espigado (*cre*), nº de inflorescencias (*ain*), altura en espigado (*alp*, en cm), longitud de la hoja bandera (*lhb*, en cm) y anchura de la hoja bandera (*ahb*, en mm). Los caracteres cualitativos estudiados fueron: tolerancia a enfermedades (*enf*, desde 1 = sensible, hasta 5 = resistente), y hábito de crecimiento (*hcr*, desde 1 = postrado, hasta 5 = erecto). Los valores medios de las variables se utilizaron en un análisis de componentes principales (ACP) basado en una matriz de correlaciones. Con las tres componentes de autovalor mayor que 1, se realizó una clasificación ascendente jerárquica según el método de agregación de Ward (varianzas mínimas) basado en el cuadrado de la distancia euclídea entre las accesiones. A la vista del árbol jerárquico se obtuvo una división de la colección base (CB) en nueve grupos, por lo que el tamaño de la colección núcleo (CN) se estableció como nueve, lo que representa un 12% de la CB. De este modo se fijó un porcentaje superior al 10% aconsejado por Brown (1989a)

para el establecimiento de colecciones núcleo. Basándose en este tamaño de muestra se diseñaron seis métodos de muestreo basados en la clasificación jerárquica obtenida:

MÉTODO 1, azar dentro de cada clúster: se generaron 200 muestras independientes de tamaño 1 en cada cluster, mediante un generador de números aleatorios que sigue una distribución uniforme (0-1).

MÉTODO 2, mayor similitud en cada 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 respecto a la “población” de valores medios, determinada por el valor SPR (semipartial R-squared) de la clasificación ascendente jerárquica (método de Ward).

MÉTODO 3, máxima diversidad en el clúster: se selecciona la población con mayor diversidad media en cada uno de los nueve grupos. La medida de la diversidad se calculó como la media del índice H de Shannon-Weaver (1963) en cada variable según la expresión:

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

donde j es la variable agronómica, P_i es la frecuencia de aparición de cada valor en cada variable, i es el número de valores que toma dicha variable.

Además se incluyen otros tres métodos que no tienen en cuenta la estructuración en grupos de la análisis clúster. Son los siguientes:

MÉTODO 4, muestreo al azar: se generaron 200 muestras independientes de tamaño 9 a partir de la CB, mediante un generador de números aleatorios que sigue una distribución uniforme (0-1).

MÉTODO 5, máxima diversidad: se seleccionan las nueve poblaciones con mayor diversidad media de entre las posibles en la CB, utilizando el índice H del método 3.

MÉTODO 6: máxima contribución a la varianza en el análisis de componentes principales: se calcula inicialmente la contribución de cada individuo a la nube de puntos del ACP, mediante la expresión:

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

siendo x_{ij} la coordenada de los individuos en los ejes principales con autovalor mayor que 1. Finalmente la contribución relativa CR_i de cada individuo a la nube de puntos es dada por:

$$CR_i = \frac{P_i}{NK}, \text{ (Noirot } et al., 1996; \text{ Hamon } et al., 1998)$$

siendo N el número de accesiones, K el número de ejes principales con autovalor mayor que 1. Se seleccionan las accesiones con mayor contribución relativa.

Para cada método se obtuvo la media, varianza y rango de las 10 variables agronómicas medidas con el fin de comparar cada CN con la CB. Las comparaciones de medias y varianzas se realizaron mediante el test no paramétrico de Wilcoxon (SAS Institute, 1994). Adicionalmente se obtuvo una medida del porcentaje de retención de cada método para todas las variables, según la expresión:

$$\% \text{ retencion} = \frac{\sum_{i=1}^t \frac{R_n CN}{R_n CB}}{t}, \text{ (Diwan } et al., 1995)$$

donde $R_n CN$ es el rango de la variable n en la CN, $R_n CB$ es el rango de la variable n en la CB, y t es el número de variables comparadas.

La CN más representativa de la colección base se podría considerar aquella con medias inalteradas, mayor varianza y mayor porcentaje de retención (Malosetti *et al.*, 2000)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ACP sobre la CB (Fig. 1), explicó un 72% de la varianza con tres componentes extraídas con autovalor mayor que 1. La clasificación ascendente jerárquica basada en las tres componentes estableció nueve grupos de accesiones explicando un 76% de la varianza (datos no mostrados). El test de comparación de Wilcoxon (Tabla 1) no reveló diferencias significativas para medias y varianzas en ningún método. Como era de esperar, ninguna de las colecciones núcleo extraídas llegan al 100% de retención en los rangos. Los coeficientes de retención fueron notablemente inferiores en los métodos de selección al azar (métodos 1 y 3, con un 34% y 23% respectivamente), resultó máximo en el método 6 (un 87%), y aceptable en el resto de métodos (Fig. 2). La mayor efectividad de los métodos multivariantes en la creación de colecciones núcleo también ha sido observada por Casler (1995) y por Balfourier *et al.*, (1998). Las retenciones observadas en los rangos son, por término medio, inferiores a

las observados por Malosetti *et al.* (2000) en un estudio de cebada, debido probablemente al menor tamaño relativo de la CN frente a la CB (en nuestro caso un 12%, frente a un 19,5% seleccionado sobre la colección de cebada). Según Brown (1989a), la diversidad de las colecciones de germoplasma no está distribuida al azar, por lo que los métodos de selección aleatoria no son adecuados cuando se conocen datos de la CB.

CONCLUSIONES

El objetivo de algunas colecciones es conservar algunas características concretas para suministrar material adecuado a los mejoradores genéticos. Sin embargo, si el propósito de una colección núcleo es preservar la diversidad de una especie, almacenada en Bancos de Germoplasma, los métodos basados en selección al azar aumentan el riesgo de pérdida de genotipos poco representados. A pesar de no existir diferencias significativas para las comparaciones de medias y varianzas, el coeficiente de retención de los rangos es superior en el método basado en seleccionar las poblaciones que más contribuyen a la varianza en el análisis de componentes principales.

REFERENCIAS

- 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.
- 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*, Ed. T. Hodgkin; A.H.D. Brown; O.H. Frankel; T.J.L. Hintum; E.A.V. Morales. John Wiley & Sons. Baffins Lane. Chichester, (Reino Unido).
- 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*, 161-170. Ed. W. Arber; K. Llimensee; W.J.K Peacock; P. Sterlinger. Cambridge University Press, Cambridge. (Reino Unido).
- HAMON, S.; DUSSERT, 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.I), 237-258.
- LÓPEZ, J.E.; OLIVEIRA, J.A., 2000. Evaluación agronómica de accesiones de raigrás inglés e italiano de la Península Ibérica desprovistas de hongos endofitos. En: *Actas III Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes*, 199-204. Conselleria de Agricultura, Ganderia e Política Agroalimentaria. Xunta de Galicia. (España).
- MALOSETTI, 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.
- 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.
- SAS INSTITUTE, 1994. *SAS/STAT procedures*. SAS Technical Report. SAS Institute Inc, Carry, NC.(E.E.U.U).
- SHANNON, C.E.; WEAVER, V., 1963. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana. (E.E.U.U).

COMPARISON OF DIFFERENT PROCEDURES TO CREATE A CORE COLLECTION IN PERENNIAL RYEGRASS ACCESIONS

SUMMARY

The objectives of this work were the agromorphologic characterisation of the collection of perennial ryegrass (74 accessions) of the Agricultural Research Center of Mabegondo (CIAM) and the creation of a core collection based on this characterisation.

With this purpose, 74 accessions were characterised by means of 10 characters (20 plants by accession) in 1999 and 2000 in the CIAM. The hierarchical cluster classification was useful in the identification of nine groups of accessions explaining 76% of the total variability. With the purpose of selecting nine accessions to create a core, six sampling methods were compared. These methods included stratified and random samplings based on the hierarchical classification, in the Shannon index diversity and in the maximum contribution to the variance in a principal component analysis. Wilcoxon test did not show significant differences in means and variances in none of the core collections created. The core based on the strategy of maximum contribution to the variance was the one that presented a bigger percentage of retention in the ranges, and it was considered the most appropriate.

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

Tabla 1: Test de Wilcoxon y porcentajes de retención para cada uno de los métodos comparados; P: probabilidad; SIG: significación, siendo Ns no significativo.

METODO	COMPARACION	P	SIG.
1	Medias	1,0000	Ns
	Varianzas	0,9698	Ns
	% retención		23,29%
2	Medias	0,9698	Ns
	Varianzas	0,9698	Ns
	% retención		60,78%
3	Medias	0,8501	Ns
	Varianzas	0,9097	Ns
	% retención		57,18%
4	Medias	0,8501	Ns
	Varianzas	1,0000	Ns
	% retención		34,69%
5	Medias	0,9698	Ns
	Varianzas	0,7337	Ns
	% retención		52,98%
6	Medias	0,9097	Ns
	Varianzas	0,7913	Ns
	% retención		87,31%

Figura 1: Diagrama de las tres primeras componentes en el análisis de componentes principales sobre 10 variables agronómicas en *L. perenne*. Cada grupo es el clúster de pertenencia mediante el método de Ward.

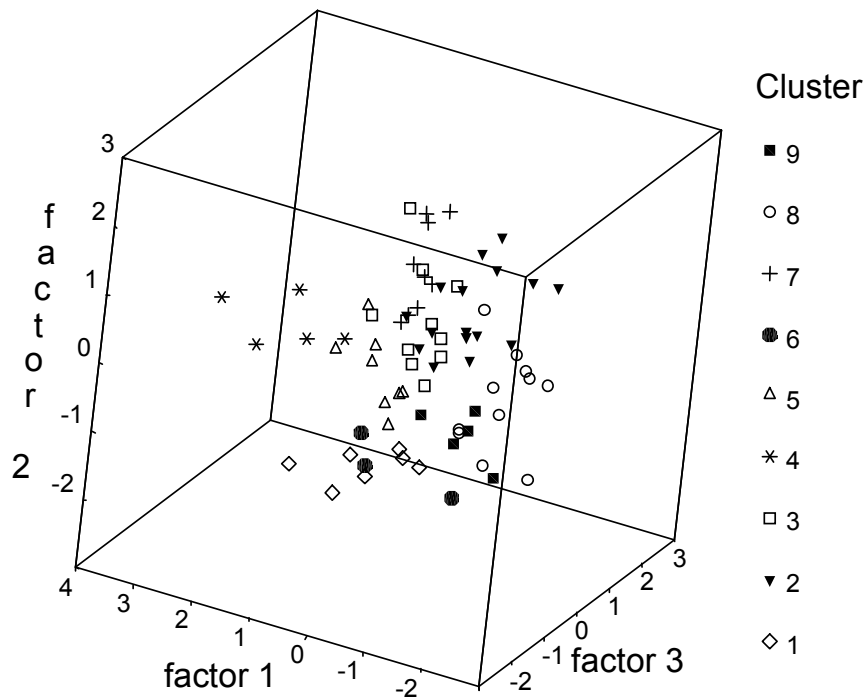


Fig. 2: Rangos medios para las 10 variables agronómicas, expresados como % del rango de la colección total. Las barras de error representan intervalos de confianza al 95%.

