

COMPARACIÓN DE PROCEDIMIENTOS PARA ELABORAR COLECCIONES NÚCLEO EN ACCESIONES DE RAIGRÁS INGLÉS E ITALIANO DEL NORTE DE ESPAÑA

J. E. LÓPEZ¹ Y J.A. OLIVEIRA^{1,2}.

¹ Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM). Apartado 10, 15080 A Coruña (España). Correo-e: ciala036@igatel.igape.es. ² Departamento de Producción vegetal, EPS, 27002 Lugo. Universidad de Santiago de Compostela. (España). Correo-e: oliveira_ciam@igatel.igape.es

RESUMEN

Durante dos años se caracterizaron agromorfológicamente 74 accesiones de raigrás inglés y 43 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. Basándose en tamaños de colecciones núcleo del 12% y 16% respectivamente para raigrás inglés e italiano sobre las colecciones base, se compararon diversas estrategias para crear dichas colecciones núcleo (“core collection”). 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. Las colecciones núcleo seleccionadas en la estrategia de mayor contribución a la varianza fueron las que presentaron un mayor porcentaje de retención de los rangos de variación, por lo que se consideran la más adecuadas para el mantenimiento de la diversidad de las colecciones base.

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

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el incremento en el número de accesiones conservadas en los bancos de germoplasma ha motivado un creciente interés por el desarrollo de métodos de conservación de la diversidad almacenada en los mismos. Los objetivos son facilitar el acceso de los recursos fitogenéticos a los mejoradores y hacer más manejable el uso de tales recursos. 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, y casi siempre el proceso de regeneración es el factor más limitante, siendo éste más costoso en los ecotipos silvestres que en los cultivados (Brown *et al.*, 1997). Por estas razones, algunos autores han propuesto el concepto de colección núcleo (Frankel, 1984; Brown, 1989b), que consiste en una fracción manejable de accesiones, seleccionadas por conservar la mayor parte de la diversidad 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 accesiones, eliminando la redundancia producida por genotipos semejantes. Brown (1989b) sugirió que una muestra al azar del 10% de la colección base conservaría un 70% de la variación total. No obstante, según Brown, (1989a), sería más efectivo organizar la colección base 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 y 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 accesiones 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 accesiones 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 accesiones en cruzamientos. En los últimos 10 años se ha comparado la efectividad de los métodos multivariantes frente a los métodos aleatorios para crear colecciones núcleo en diferentes

cultivos (Spagnoletti y Qualset, 1993; Basigalup *et al.*, 1995; Bisht *et al.*, 1999), y en el desarrollo de colecciones núcleo de raigrás inglés por diferentes autores (Casler, 1995; Balfourier *et al.*, 1999). Una revisión puede observarse en Hamon *et al.* (1998) y en Ortiz *et al.* (1998). Casi todos los estudios citados se refieren a colecciones de tamaño considerable, y debido a la amplia distribución de las accesiones, suelen tener en cuenta el origen geográfico del germoplasma. Sin embargo no existen muchos datos en colecciones reducidas de cultivos locales. 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 núcleo. Según Balfourier *et al.*, (1998 y 1999) las estructuras espaciales identificadas por procedimientos geoestadísticos en *L. perenne* son el resultado de una presión selectiva del ambiente. Monestiez *et al.*, (1994) encontraron estructuras espaciales en, al menos 6 variables agronómicas de *L. perenne* en dimensiones de 120-300 km de distancia. En nuestro caso casi todas las accesiones que componen ambas colecciones base se distribuyen por el norte de España. El objetivo de este trabajo es comparar la eficacia de técnicas utilizadas habitualmente en el muestreo de accesiones para crear colecciones núcleo de raigrás inglés e italiano en germoplasma recogido principalmente en el norte de España.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante dos años se evaluaron un total de 74 accesiones de raigrás inglés y 42 de *Lolium multiflorum* 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 sus posibles interacciones con las accesiones 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 8 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% CaCO₃, 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 accesión y

bloque separados en líneas de 50 cm de distancia. Como testigos se introdujeron en el ensayo de raigrás inglés las variedades comerciales ‘Brigantia’, ‘Arion’, ‘Vigor’, ‘Talbot’, ‘Cropper’ y la experimental ‘Ciam1’, creada a partir de ecotipos locales. En el 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): 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 medida en cm), *lhb* (longitud de la hoja bandera en cm), *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 ensayo, 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 μ es la media general, α_i es el efecto del año, β_j es el efecto del bloque, $(\alpha\beta)_{ij}$ es la interacción entre año y bloque, γ_k es el efecto de la accesión, $\beta(\alpha)_{ij}$ es el efecto del bloque jerarquizado a año, y finalmente ε_{ijk} es el error. Los datos cualitativos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Todos los datos se analizaron mediante el programa informático SAS (SAS Institute, 1994).

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 clusters y las maximiza entre los clusters, y ha sido aplicado en el desarrollo de otras colecciones núcleo (Johnson *et al.*, 1999; Bisht *et al.*, 1999). Debido a que la zona de recolección es relativamente pequeña, no se tuvo en cuenta el origen geográfico de cada accesión en la clasificación. Como tamaño de la colección núcleo (CN), se fijó el 12% de la colección base (CB) para raigrás inglés y el 16% para raigrás italiano, en exceso del 10% propuesto como mínimo por Brown (1989b). Por tanto se estableció el número de grupos de la clasificación

jerárquica en 9 en el caso de raigrás inglés y en 7 en el caso del raigrás italiano. Basándose en este tamaño de muestra y para cada CN se diseñaron seis métodos de selección de poblaciones (Figura 2). Los métodos seleccionados fueron:

MÉTODO 1, muestreo al azar: se generaron 200 muestras independientes de tamaños 9 y 7, respectivamente para raigrás inglés e italiano, a partir de las CB, mediante un generador de números aleatorios que sigue una distribución uniforme (0-1).

MÉTODO 2, criterio de máxima diversidad: se seleccionaron las poblaciones con mayor diversidad media en la CB (Bekele y Bekele, 1996; Bisht *et al.*, 1999). La medida de la diversidad se calculó como la media del índice H de Shannon-Weaver en cada variable según la expresión:

$$H_j = -\sum_{i=1}^n P_i \log_2 P_i, \text{ (Shannon y Weaver, 1963)}$$

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.

MÉTODO 3, azar dentro de cada clúster: se generaron 200 muestras independientes de tamaño 1 en cada clúster, mediante un generador de números aleatorios que sigue una distribución uniforme (0-1).

MÉTODO 4, mayor similaridad 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.

MÉTODO 5, criterio de máxima diversidad dentro del clúster: se selecciona la población con mayor diversidad media de entre las posibles dentro de cada clúster, utilizando el índice H del método 2.

METODO 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 x 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:

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

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 accesiones se van a seleccionar según los datos de evaluación agronómica. Para cada método se obtuvo la media, varianza y rango de las 10 variables agronómicas medidas para comparar cada CN con la CB. Las comparaciones de medias y varianzas se realizaron mediante el test no paramétrico de Wilcoxon, mediante el procedimiento NPAR1WAY del programa estadístico SAS (SAS Institute, 1994). Adicionalmente se obtuvo una medida del porcentaje de retención de los rangos de variación de las variables para cada método, 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, mayores varianzas y mayores porcentajes de retención (Malosetti *et al.*, 2000)

RESULTADOS

Raigrás inglés

El ANOVA para cada variable 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 CB 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. La clasificación ascendente jerárquica basada en las componentes estableció nueve grupos de accesiones explicando un 76% de la varianza (Figura 3a). En la figura 3b se representan las accesiones con un símbolo de pertenencia a sus grupos respectivos, en el espacio factorial del ACP.

Las medias y varianzas para cada método de muestreo se pueden observar en la Tabla 2. En dicha tabla se resaltan las varianzas que han resultado mayores en las CN formadas que en la CB. Los métodos basados en selección por diversidad (2 y 5) extraen accesiones con alta dispersión en los datos. Debido a esto, las colecciones creadas presentan la mayor parte de sus varianzas superiores a las de la CB, ya que contribuyen en mayor proporción a la CN que a la colección total. El método 6 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 1 y 3) y el método 4, extraen accesiones con menor número de varianzas superiores. El test de comparación de Wilcoxon (Tabla 7) no reveló diferencias significativas para medias y varianzas en ningún método, sin embargo los coeficientes de retención fueron notablemente inferiores en los métodos de selección al azar (métodos 1 y 3), que alcanzaron sólo el 34 y 23% respectivamente, y resultó máximo en el método 6 (87%). El resto de métodos mantuvieron coeficientes de retención aceptables. En la Figura 4a se puede observar las distribuciones de los rangos 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 rangos. La Figura 4b muestra las varianzas medias expresadas como % de las varianzas de la colección base. Los métodos 2 y 6 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 se observaron mayores varianzas medias en los procedimientos multivariantes.

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 CB explicó un 82% de la varianza con tres componentes extraídas de autovalor mayor que 1 (Figura 5b). La Tabla 5 muestra las correlaciones entre las variables agronómicas y las componentes extraídas en el ACP. La clasificación ascendente jerárquica basada en las componentes estableció siete grupos de accesiones explicando un 78% de la varianza (Figura 5a). En la Tabla 6 se muestran las medias y varianzas para cada método. De nuevo los métodos basados en diversidad (métodos 2 y 5) y el método 6 seleccionan colecciones con varianzas más altas. Nuevamente se observa una mayor eficacia de los métodos multivariantes en general en la conservación de los rangos (Figura 6a). Los métodos de selección al azar

obtuvieron los coeficientes más bajos de retención (46 y 22% respectivamente), mientras que el método más conservativo volvió a ser el método 6. En cuanto a las varianzas, los métodos basados en diversidad (métodos 2 y 5) y el método 6 son los que más incrementaron las varianzas en las colecciones núcleo creadas (Figura 6b). El test de Wilcoxon (Tabla 7) no mostró diferencias significativas en ninguna comparación.

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 CB, aunque sí pueden utilizarse cuando no se dispone de datos de evaluación/caracterización. La mayor efectividad de los métodos multivariantes en la creación de colecciones núcleo 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 aleatoria por los bajos coeficientes de retención de los rangos. 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 las CN frente a las CB (en nuestro caso un 12% y un 16%, frente a un 19,5% seleccionado sobre la colección de cebada). Si se representa la contribución acumulada relativa de cada accesión a la inercia de la nube de puntos en el ACP (Fig. 7), 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 CB, mientras que en *L. multiflorum* el incremento es mayor en el origen, alcanzando con sólo un 16% de la CB la mitad de la inercia de la nube de puntos. 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 base dependen del propio cultivo. En el caso de *L. multiflorum* el incremento rápido en el origen parece motivado por una distribución bimodal de los datos, provocado por una clara distinción de la colección base en dos grupos de precocidad: un grupo precoz, con altas producciones concentradas en fechas tempranas, y un grupo tardío, con producciones concentradas en fechas más tardías. La figura 8 muestra la distribución de frecuencias de las fechas de espigado para cada especie. Como se puede observar, en *L.*

multiflorum tanto la colección base como la colección núcleo seleccionada por el método 6 presentan una distribución bimodal, y tal distribución contribuye a aumentar las varianzas de manera sustancial. La figura 9 muestra la disposición de las accesiones seleccionadas por éste método en la Península Ibérica.

Si el propósito de una colección núcleo es conservar la diversidad de una colección de germoplasma, el uso de métodos basados en selección al azar aumenta el riesgo de pérdida de genotipos poco representados. El método 6 parece ser el más indicado para la formación de colecciones núcleo con base en la caracterización agromorfológica realizada en las accesiones de raigrases del CIAM. Las razones de ello son el no alterar las medias y varianzas de la colección base y conservar un porcentaje elevado de los rangos de variación en las variables estudiadas.

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

- 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.

- 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. Hintum; E.A.V. Morales. John Wiley & Sons. Baffins Lane. Chinchester, (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.
- 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).
- HAMON, S.; HODGKIN, T.; DUSSERT, S.; ANTHONY, F.; NOIROT, M., 1994. Core collection: theoretical and applied aspects. En: *Proceedings of the Genetic Resources Section Meeting of Eucarpia*, 78-82. Clermont-Ferrand, (France).
- 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.I), 237-258.
- 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 inglés e italiano de la Península Ibérica desprovistas de hongos endofitos. En: *Actas III Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes*, 199-204. Xunta de Galicia. La Coruña, (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.
- 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.

- 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 westerworld ryegrass lanraces 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 collecions. *Theoretical and Applied Genetics*, **78**, 42-48.
- ROMERSBURG, H.C., 1984. Cluster analysis for researchers. Lifetime Learning Publications. Belmont, California, (Estados Unidos).
- SAS INSTITUTE, 1994. SAS/STAT procedures. 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).
- 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.

COMPARISON AMONG PROCEDURES TO ELABORATE CORE COLLECTIONS IN PERENNIAL AND ITALIAN RYEGRASS ACCESIONS OF THE NORTH OF SPAIN

ABSTRACT

Seventy-four accessions of perennial ryegrass and 43 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 Research Agrarian 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, with samples of 12% and 16% respectively in perennial and Italian ryegrass. These methods included stratified and random samplings based on the hierarchical classification, in the Shannon diversity index and in the maximum contribution to the variance in a principal component analysis. Wilcoxon test did not show significant differences in the means and variances among cores and base collections. 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 base collection.

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

TABLAS

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; Acc: accesión; 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: n° inflorescencias; *: significativo al nivel 0,05; **: significativo al nivel 0,01.

Table 1. 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; Acc: 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: longitude 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	Acc 73	Acc*Año 73
<i>Cuantitativas</i>					
fes	82172,79**	78,02	190,98*	1864,56**	193,23**
cri	23485,94**	1921,04**	992,08*	857,19**	613,04**
crp	46221,98**	3092,51	52,64	5496,46**	2603,07**
cre	14998511,85**	32928,88*	24587,77	43513,98**	35935,21**
alp	379806,14**	755,36	44,64	1696,99**	1076,49**
lhb	4580,57**	110,94**	0,02	55,22**	44,29**
ahb	248,63**	57,14**	33,53**	5,90**	2,60**
ain	---	117,08	---	5046,87**	---
<i>Cualitativas</i>					
	X ²				
enf	314,63**				
hcr	190,18**				

Tabla 2. Correlaciones entre las variables agronómicas y las componentes extraídas del análisis de componentes principales en *L. perenne*; 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: n° inflorescencias; % var. acum.: % de varianza acumulada; *: significativo al nivel 0,05; **: significativo al nivel 0,01.

Table 2. Correlations between agronomic traits and the components extracted in the principal component analysis in *L. perenne*; 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: longitude and width of the flag leaf; hcr: habit of growth; ain: number of inflorescences; % var. acum.: % of cumulative variance; *: significant at 0,05 level. **: significant at 0,01 level.

	FACTOR 1	FACTOR 2	FACTOR 3
fes	0,547(**)	-0,592(**)	-0,119
cri	0,875(**)	0,032	-0,026
crp	0,901(**)	0,177	0,122
cre	0,849(**)	0,209	-0,059
alp	0,240(*)	0,665(**)	0,519(**)
enf	0,716(**)	-0,097	0,074
lhb	0,026	0,902(**)	-0,059
ahb	0,1	0,871(**)	-0,09
hcr	-0,088	0,018	0,904(**)
ain	0,477(**)	-0,178	0,438(**)
Autovalor	3,482	2,483	1,261
% Var. acum.	34,82	59,65	72,26

Tabla 3. Medias, varianzas y rangos 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 base; 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: n° inflorescencias.

Table 3. Means, variances and ranges of the traits studied for each sampling method, base collection, and the control ‘Brigantia’ in *L. perenne*. In bold letter are marked the variances that have been bigger than in the base collection; 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: longitude and width of the flag leaf; hcr: habit of growth; ain: number of inflorescences.

		fes	cri	crp	cre	alp	enf	lhb	ahb	hcr	ain
Brigantia	Media	140,13	18,53	48,42	150,89	91,95	3,40	13,48	5,17	2,80	121,34
	Varianza	43,75	222,27	940,41	12305,88	559,15	0,88	18,91	2,64	0,89	5105,25
Colección Base	Media	135,89	16,03	41,14	141,18	84,46	3,42	14,12	5,08	2,97	104,09
	Varianza	91,91	194,14	1019,41	16109,80	476,31	1,18	18,29	1,37	0,78	2275,63
	Rango	38,43	26,63	68,16	261,66	40,13	2,27	9,43	2,89	2,07	100,09
Metodo 1	Media	136,03	15,96	41,14	141,05	84,22	3,41	14,09	5,06	2,97	103,95
	Varianza	91,39	191,38	1016,54	16241,88	481,32	1,20	18,35	1,37	0,78	2319,02
	Rango	13,66	9,09	23,81	64,25	14,34	0,73	3,73	1,10	0,72	37,49
Metodo 2	Media	134,34	17,60	43,87	139,72	85,69	3,45	14,96	5,24	2,80	92,719
	Varianza	110,29	228,5	1118,06	17118,77	495,80	1,38	23,37	1,79	1,01	1491,97
	Rango	24,67	11,01	38,20	92,49	22,68	0,97	7,76	2,46	0,81	27,09
Metodo 3	Media	137,82	16,49	41,80	145,61	82,36	3,46	13,90	5,02	2,88	103,94
	Varianza	86,75	208,08	1023,31	17301,92	465,68	1,18	17,64	1,30	0,79	2236,25
	Rango	9,64	5,10	15,49	52,99	8,35	0,69	2,10	0,65	0,45	27,99
Metodo 4	Media	138,92	17,99	44,01	150,58	83,24	3,34	14,04	4,91	2,93	100,05
	Varianza	88,46	295,93	1164,85	17995,86	516,37	1,19	16,95	1,14	0,66	1852,75
	Rango	32,00	19,34	44,35	91,32	29,26	1,40	5,86	1,33	1,13	54,61
Metodo 5	Media	139,36	17,79	40,70	137,52	81,68	3,37	13,78	4,88	2,94	96,07
	Varianza	91,67	250,29	947,55	16997,33	497,51	1,32	20,12	1,49	0,98	1817,51
	Rango	10,67	13,69	33,53	114,13	28,35	1,77	5,37	2,29	1,40	47,44
Metodo 6	Media	138,84	18,35	47,06	165,29	80,52	3,58	14,86	5,29	2,57	102,90
	Varianza	97,15	258,49	1160,82	21132,91	553,16	1,32	19,35	1,47	0,99	2210,81
	Rango	30,79	26,63	68,16	261,66	34,16	2,21	7,84	2,28	1,36	82,87

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; Acc: accesión; 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.

Table 4. 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; Acc: 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: longitude 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	Año	Blq(Año)	Acc	Acc*Año
GL	1	1	42	42
<i>Cuantitativas</i>				
fes	24318,93**	361,64**	17032,92**	182,56**
crp	559973,94**	8972,67**	2379,36**	2382,69**
cre	573160,06**	33418,53**	45143,78**	8610,61**
crv	5283,26**	6208,62**	10641,24**	1143,27**
ahb	329,51**	12,29**	38,23**	6,58**
lhb	3541,02**	12,64	487,35**	80,35**
ain	925,80	136389**	8745,78**	5066,97
alp	4592,43**	61,75	18757,80**	1997,47**
<i>Cualitativas</i>				
	X²			
enf	192,66**			
hcr	222,77**			

Tabla 5. Correlaciones entre las variables agronómicas y las componentes extraídas del análisis de componentes principales en *L. multiflorum*; 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: nº inflorescencias; % var. acum.: % de varianza acumulada; *: significativo al nivel 0,05; **: significativo al nivel 0,01.

Table 5. Correlations between agronomic traits and the components extracted in the principal component analysis in *L. multiflorum*; 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: longitude and width of the flag leaf; hcr: habit of growth; ain: number of inflorescences; % var. acum.: % of cumulative variance; *: significant at 0,05 level. **: significant at 0,01 level.

	FACTOR 1	FACTOR 2	FACTOR 3
fes	0,935(**)	-0,005	0,064
crp	0,493(**)	0,582(**)	0,053
cre	0,892(**)	0,277	0,253
crv	0,870(**)	0,241	0,248
ahb	0,316(*)	0,788(**)	-0,274
lhb	0,777(**)	0,531(**)	0,052
ain	0,777(**)	0,011	0,336(*)
alp	0,875(**)	0,326(*)	0,018
enf	0,308(*)	0,054	0,883(**)
hcr	-0,078	0,861(**)	0,310(*)
Autovalor	5,85	1,49	0,97
% Var. acum.	58,58	73,50	82,65

Tabla 6. Medias, varianzas y rangos 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 base; 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.

Table 6. 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 base collection; 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: longitude and width of the flag leaf; hcr: habit of growth; ain: number of inflorescences.

		fes	crp	cre	crv	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr
Vitesse	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
Colección Base	Media	112,36	20,00	67,14	17,74	7,96	17,19	72,63	84,64	3,30	3,02
	Varianza	74,64	925,90	3022,53	382,23	2,52	23,31	2134,07	346,36	1,27	1,24
	Rango	63,40	37,54	142,57	60,69	6,55	18,06	89,49	69,13	2,28	2,34
Metodo 1	Media	111,93	20,06	66,83	17,58	7,96	17,14	72,54	84,32	3,30	3,02
	Varianza	74,12	926,82	3006,53	382,81	2,54	23,31	2138,33	343,99	1,27	1,24
	Rango	42,52	17,26	66,25	35,50	2,11	7,39	32,89	44,38	0,94	0,77
Metodo 2	Media	129,53	26,35	106,84	36,96	8,08	19,73	84,03	100,68	3,51	2,98
	Varianza	100,93	1386,19	7421,18	1043,01	3,31	34,39	2781,06	603,75	1,25	1,44
	Rango	21,94	30,71	90,51	39,54	1,32	5,69	61,97	32,19	0,59	1,29
Metodo 3	Media	116,32	21,66	70,34	18,08	8,46	18,31	72,19	89,96	3,16	2,98
	Varianza	65,21	1042,96	3086,95	364,08	2,50	21,90	2146,20	342,37	1,23	1,25
	Rango	13,85	10,98	27,71	13,92	1,19	3,85	22,87	15,67	0,62	0,44
Metodo 4	Media	113,86	21,33	78,07	17,27	8,29	18,35	71,56	91,48	3,24	3,02
	Varianza	60,98	941,82	2789,80	218,96	2,70	24,60	2218,39	276,84	1,43	1,19
	Rango	61,03	20,45	99,44	33,88	4,49	16,78	33,38	67,73	1,54	1,84
Metodo 5	Media	118,47	19,88	70,69	16,03	8,33	18,56	73,09	87,15	3,24	2,94
	Varianza	98,00	795,30	2882,45	370,37	3,52	27,10	2709,35	488,24	1,44	1,61
	Rango	37,32	20,46	89,98	35,06	4,39	15,03	21,86	59,20	1,54	1,84
Metodo 6	Media	118,26	24,96	86,96	26,29	8,68	19,73	73,31	91,51	3,38	3,35
	Varianza	54,97	1499,80	6026,97	690,99	3,08	21,92	2304,39	360,35	1,14	1,08
	Rango	62,10	37,54	142,57	60,69	6,55	16,11	89,49	64,78	1,08	2,34

Tabla 7. Test de Wilcoxon y porcentajes de retención para los métodos comparados. P: probabilidad; SIG: significación; ns: no significativo.

Table 7. Wilcoxon test and retention percentages for the compared methods. P: probability; SIG: significance; ns: not significant.

METODO	COMPARACION	<i>L. perenne</i>		<i>L. multiflorum</i>	
		P	SIG.	P	SIG.
1	Medias	0,8501	ns	0,8501	ns
	Varianzas	1,0000	ns	1,0000	ns
	% retencion		34,69%		46,62%
2	Medias	0,9698	ns	0,9698	ns
	Varianzas	0,7337	ns	0,7337	ns
	% retencion		52,98%		49,35%
3	Medias	1,0000	ns	0,9698	ns
	Varianzas	0,9698	ns	0,9698	ns
	% retencion		23,29%		22,72%
4	Medias	0,9698	ns	0,8501	ns
	Varianzas	0,9698	ns	0,9097	ns
	% retencion		60,78%		71,92%
5	Medias	0,8501	ns	0,9698	ns
	Varianzas	0,9097	ns	0,8501	ns
	% retencion		57,18%		64,07%
6	Medias	0,9097	ns	0,002	ns
	Varianzas	0,7913	ns	0,160	ns
	% retencion		87,31%		92,82%

Figura 1. Distribución de los puntos de muestreo de las accesiones de raigrás inglés e italiano (74 y 43 respectivamente). Los círculos corresponden al raigrás inglés y los triángulos al raigrás italiano.

Figure 1. Distribution of the sampling points of perennial and Italian ryegrass accessions (74 and 43 respectively). Circles correspond to the perennial ryegrass and the triangles to the Italian ryegrass.



Figura 2. Esquema de las metodologías de muestreo empleadas en la formación de las colecciones núcleo.

Figure 2. Diagram of the sampling methodologies used in the formation of the core collections.

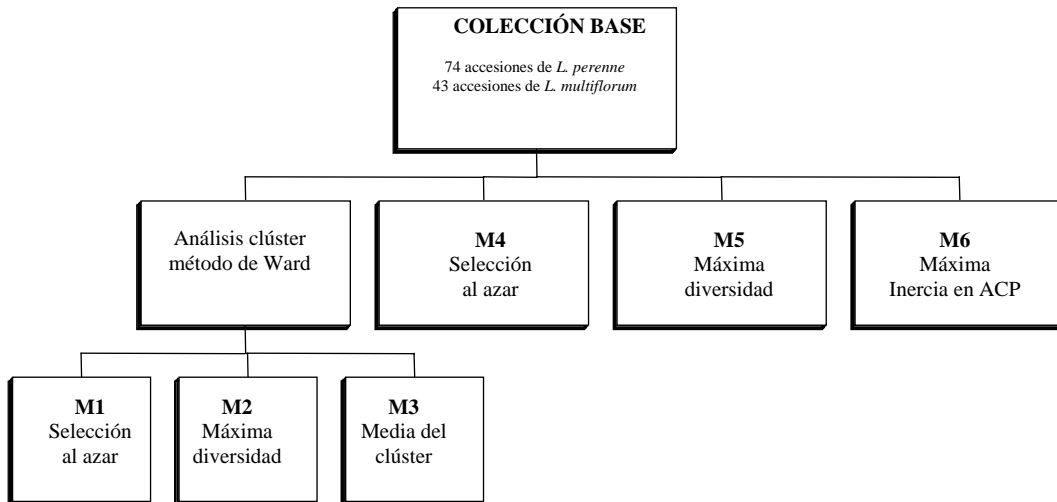


Figura 3. Encima (3a): diagrama de la clasificación ascendente jerárquica en 74 accesiones de *Lolium perenne*, utilizando el método de agregación de Ward sobre las tres primeras componentes. Debajo (3b): representación factorial de la clasificación ascendente jerárquica sobre las tres primeras componentes.

Figure 3. Upper (3a): diagram of hierarchical cluster analysis in 74 accessions of *Lolium perenne*, using the Ward aggregation method with the first three components. Below (3b): factorial representation of the hierarchical classification of the first three components.

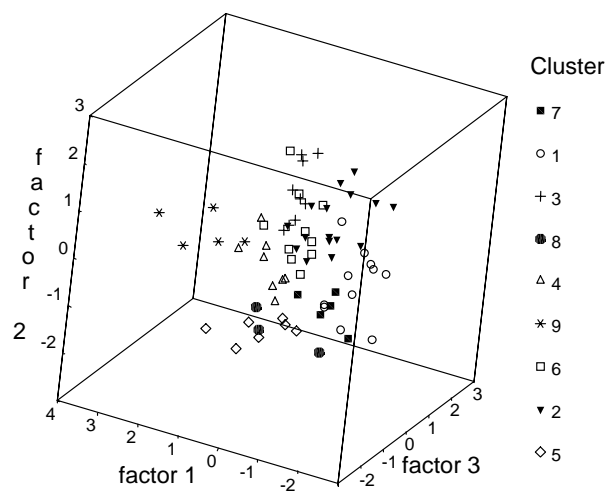
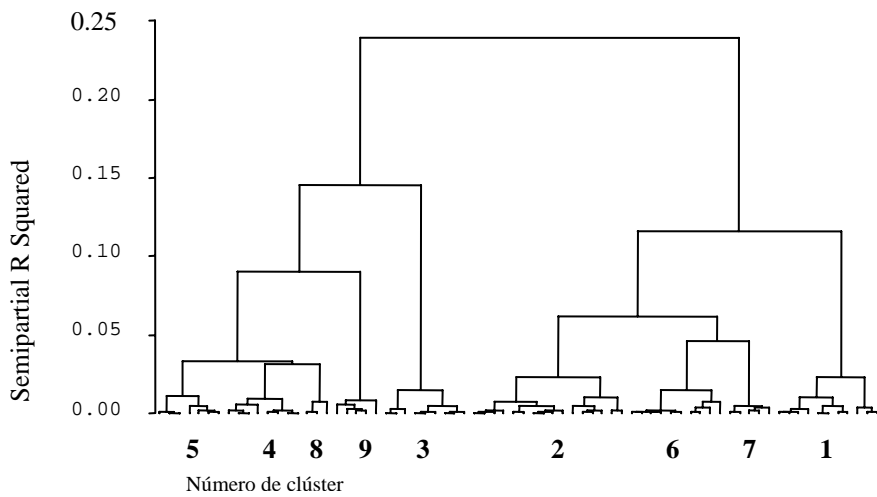


Fig. 4. *Lolium perenne*. Izquierda (4a): rangos medios para las 10 variables agronómicas, expresados como % del rango de la colección total. Derecha (4b): varianzas medias para las 10 variables agronómicas, expresados como % de la varianza de la colección total.

Las barras de error representan intervalos de confianza al 95%.

Fig. 4. *Lolium 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%.

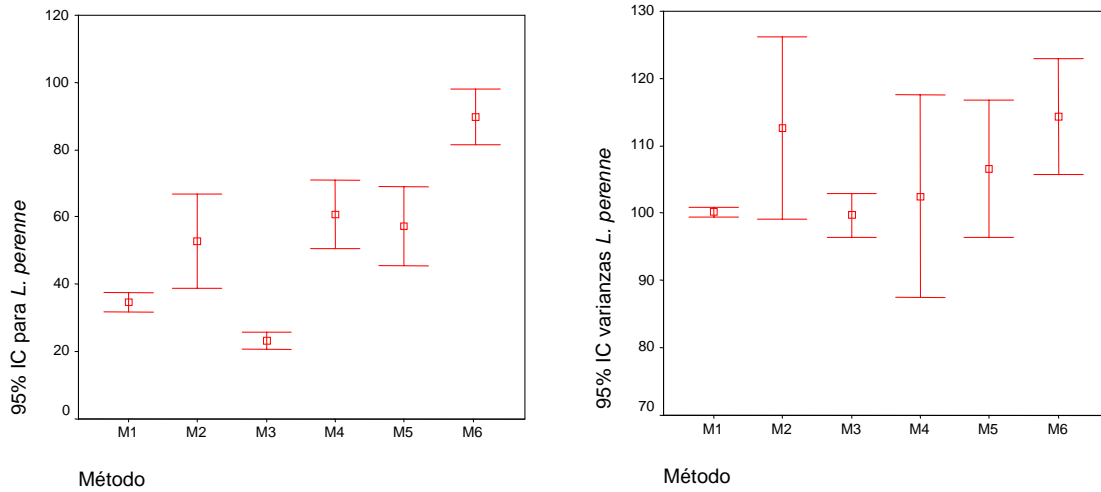


Fig. 5. Encima (5a): diagrama de clasificación ascendente jerárquica en 43 accesiones de *Lolium multiflorum* utilizando el método de Ward basado en las 3 primeras componentes. Debajo (5b): representación factorial de la clasificación ascendente jerárquica de las tres primeras componentes.

Figure 5. Upper (5a): diagram of hierarchical cluster analysis in 74 accessions of *Lolium multiflorum*, using the Ward aggregation method. Below (5b): factorial representation of the hierarchical classification of the first three components.

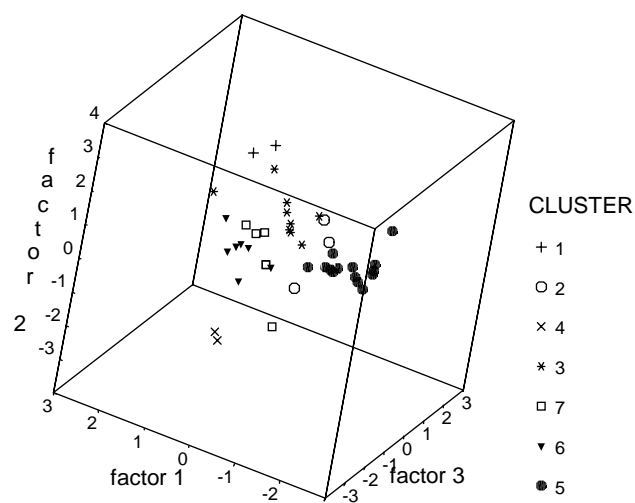
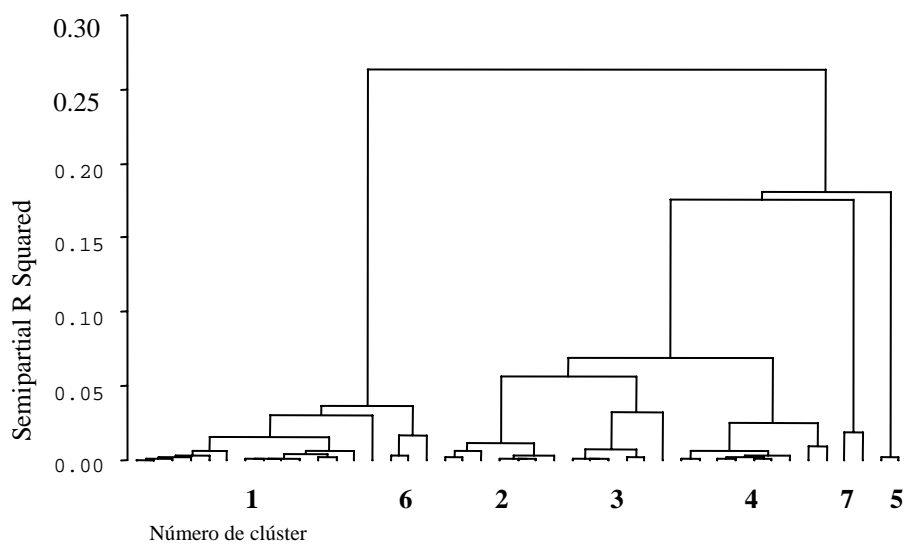


Fig. 6. *Lolium multiflorum*. Izquierda (6a): rangos medios para las 10 variables agronómicas, expresados como % del rango de la colección total. Derecha (6b): varianzas medias para las 10 variables agronómicas, expresados como % de la varianza de la colección total. Las barras de error representan intervalos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

Fig. 6. *Lolium 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%.

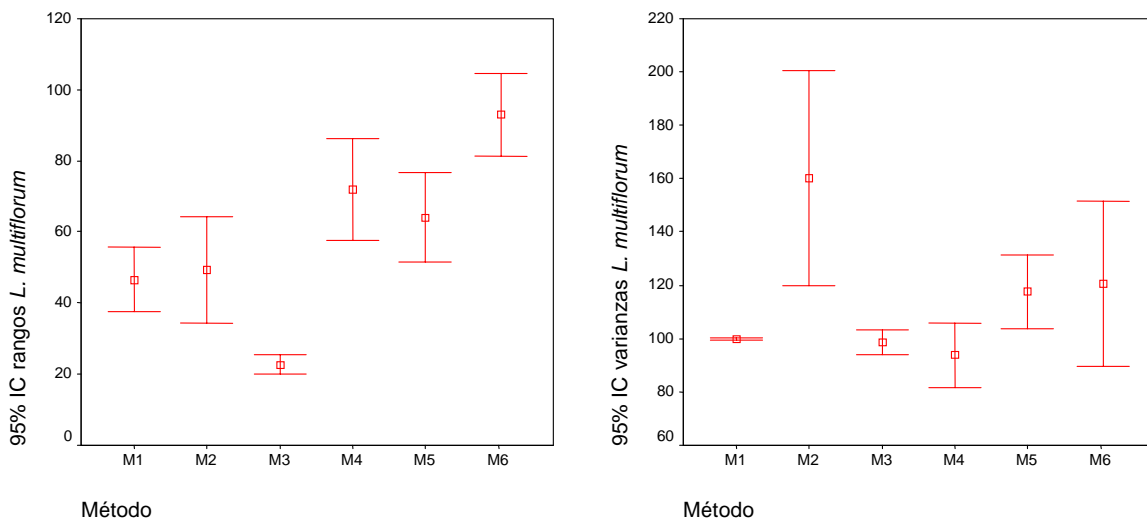


Figura 7. Curva de contribución relativa (CR_i) de cada accesión a la varianza total de la nube de puntos en el análisis de componentes principales.

Figure 7. Curve of relative contribution (CR_i) of each accession to the total variance of the cloud of points in the principal component analysis.

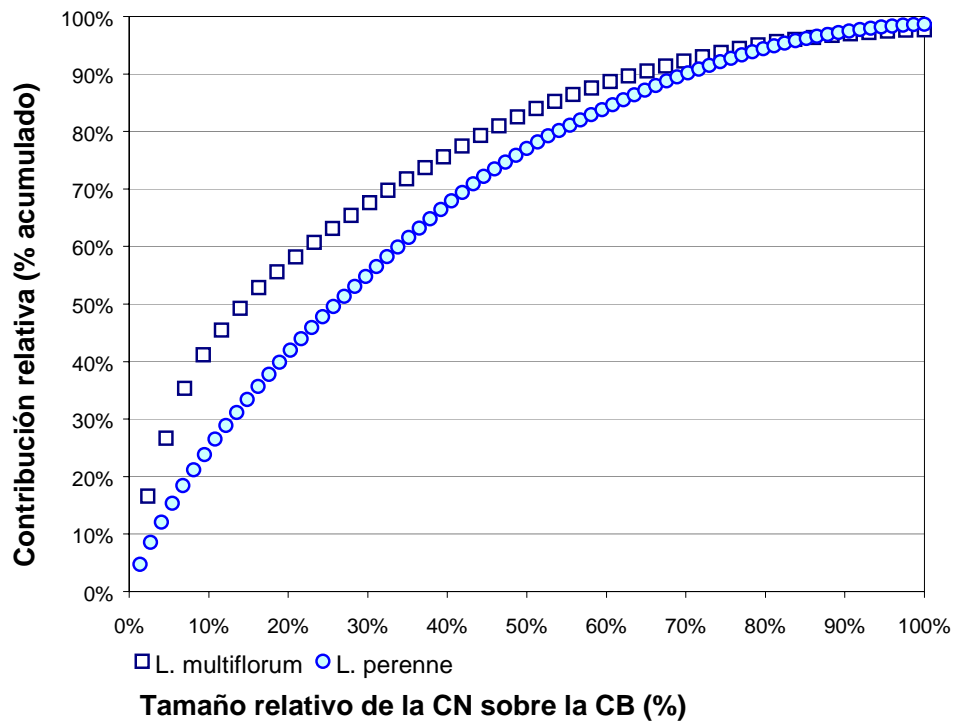


Figura 8. Distribución de frecuencias de la variable fecha de espigado (fes) en *Lolium perenne* (izquierda) y en *Lolium multiflorum* (derecha). CB: distribución de frecuencias en la colección base. M6: distribución de frecuencias en la colección núcleo seleccionada por el método 6. El eje de abscisas representa el número de días desde el 1 de enero.

Figure 8. Distribution of frequencies of the variable heading date (fes) in *Lolium perenne* (left) and *Lolium multiflorum* (right). CB: distribution of frequencies in the base collection. M6: distribution of frequencies in the core collection selected by method 6. The X axis represents the number of days from January 1.

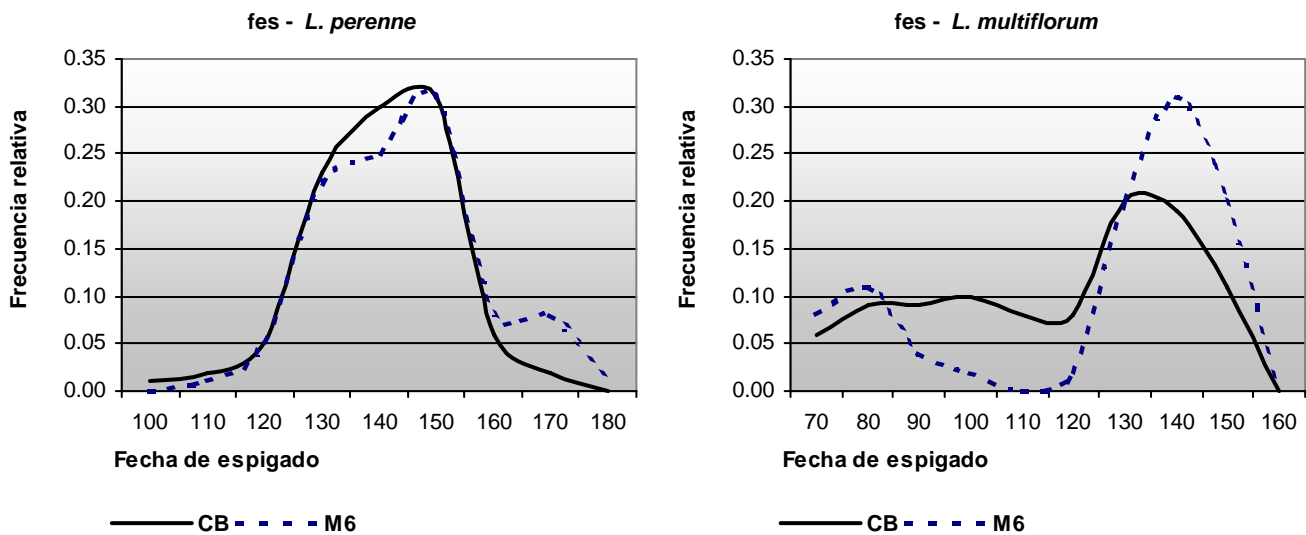


Figura 9. Distribución de las accesiones seleccionadas por el método 6 en la Península Ibérica. Los círculos corresponden al raigrás inglés y los triángulos al raigrás italiano.

Figure 9. Distribution of the selected accessions by method 6 in the Iberian Peninsula.

Circles correspond to the perennial ryegrass and triangles to the Italian ryegrass.

