

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA**

ESCOLA POLITÉCNICA SUPERIOR

**DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO
VEGETAL**



Estudio de los recursos fitogenéticos del complejo *Festuca – Lolium*

Tesis Doctoral



Julio Enrique López Díaz

Lugo, 2009

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESCOLA POLITÉCNICA SUPERIOR

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEXETAL

**Estudio de los recursos fitogenéticos del complejo
*Festuca – Lolium***

Tesis Doctoral

Julio Enrique López Díaz

**Director:
Dr. Jose Alberto Oliveira Prendes**

LUGO, 2009

D. Jose Alberto Oliveira Prendes, Dr. Ingeniero Agrónomo, Profesor Titular del Área de Producción Vegetal de la Universidad de Oviedo, como director de la Tesis Doctoral: "Estudio de los recursos fitogenéticos del complejo *Festuca-Lolium*", con D. Antonio Rigueiro Rodríguez como tutor.

Realizada en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM) - Instituto Galego de Calidade Alimentaria (INGACAL) de la Xunta de Galicia.

AUTORIZA:

La presentación de la citada Tesis Doctoral, realizada por D. Julio Enrique López Díaz, dado que considero que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Y, para que así conste, a los efectos oportunos, expide el siguiente certificado en Mieres a 30 de octubre de 2009.

Fdo: Jose Alberto Oliveira Prendes

El Tutor del Departamento de Producción Vegetal
Antonio Rigueiro Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las instituciones y organismos que han contribuido a la realización de este trabajo aportando financiación y medios para la elaboración de esta tesis:

Al Instituto Nacional de Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la financiación de la beca predoctoral que dio lugar a esta tesis doctoral.

Al Centro de Investigaciones Agrarias (CIAM – INGACAL), por haberme proporcionado los medios técnicos y humanos necesarios para el trabajo de campo y de laboratorio.

Al Dpto. de Producción Vegetal de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), por acoger este trabajo.

También deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que de distintas formas han colaborado en este trabajo:

Al Dr. Jose Alberto Oliveira Prendes, por haberme iniciado hace años en la Investigación Científica y por su inestimable ayuda e invaluable apoyo en todo momento en la dirección de esta tesis.

Al Dr. Antonio Riqueiro Rodríguez, por la tutoría de este trabajo

A la Dra. Rosa Mosquera Losada por acoger este trabajo en el Dpto de Producción Vegetal de la USC.

Al D. Juan Castro Insua, Director del CIAM, por haberme animado continuamente a finalizar el trabajo, proporcionándome siempre medios y tiempo.

A D. Juan Piñeiro Andiñ, Director del Dpto de Pastos y Cultivos del CIAM, por su apoyo y orientaciones en el trabajo de campo.

A todo el personal de campo del CIAM que trabajó en la implantación y mantenimiento de los ensayos, así como a todo el personal de laboratorio por la ayuda con los equipos.

DEDICATORIA

A mi familia, especialmente a mi madre quien tanto hubiera disfrutado con este trabajo, y a mis hermanas por su apoyo.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.....	11
INDICE DE TABLAS.....	13
INDICE DE FIGURAS.....	15
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	16
ESTRUCTURA DE ESTA TESIS DOCTORAL	17
RESUMEN.....	19

CAPÍTULO I: Evaluación agronómica de las colecciones de partida de raigrás inglés, raigrás italiano y festuca alta.

1. INTRODUCCIÓN.....	23
1. 1. SISTEMÁTICA DE LOS GÉNEROS <i>LOLIUM</i> Y <i>FESTUCA</i>	31
1. 2. FITOSOCIOLOGÍA	35
1. 3. UTILIZACIÓN AGRONÓMICA DEL, RAIGRÁS INGLÉS, ITALIANO Y <i>FESTUCA</i> ALTA.....	35
1.3.1. Raigrás italiano (<i>Lolium multiflorum</i> Lam.).....	36
1.3.2. Raigrás inglés (<i>Lolium perenne</i> L.).....	37
1.3.3. Festuca alta (<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.).....	38
1.3.4. Utilización agronómica de híbridos interespecíficos e intergenéricos.....	40
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
2.1. DISEÑO DE CAMPO	43
2.2. ESTUDIO ESTADÍSTICO	50
3. RESULTADOS.....	50
3.1. RAIGRÁS INGLÉS	50
3.2. RAIGRÁS ITALIANO.....	59
3.3. <i>FESTUCA</i> ALTA.....	64
4. DISCUSIÓN.....	69
5. CONCLUSIÓN.....	73

CAPÍTULO II: Comparación de procedimientos para crear colecciones nucleares en accesiones de raigrás inglés e italiano.

RESUMEN.....	77
1. INTRODUCCIÓN.....	77
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
3. RESULTADOS.....	89

3.1. RAIGRÁS INGLÉS.....	89
3.2. RAIGRÁS ITALIANO.....	92
4. DISCUSIÓN.....	97
5. CONCLUSIÓN.....	107

CAPÍTULO III: Estudio de la conservación de la diversidad genética en poblaciones experimentales de *L. multiflorum* mediante caracteres agronómicos e isoenzimáticos.

RESUMEN.....	111
1. INTRODUCCIÓN.....	112
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	115
2.1. ESTUDIO AGRONÓMICO.....	115
2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	119
2.3. ANÁLISIS DE ISOENZIMAS.....	120
3. RESULTADOS.....	125
3.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO AGRONÓMICO.....	125
3.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO ISOENZIMÁTICO.....	134
4. DISCUSIÓN.....	139
5. CONCLUSIÓN.....	143
REFERENCIAS.....	145

INDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

Tabla 1. Datos de pasaporte de las 74 poblaciones evaluadas de <i>L. perenne</i>	46
Tabla 2. Datos de pasaporte de las 42 poblaciones evaluadas de <i>L. multiflorum</i>	47
Tabla 3. Datos de pasaporte de las 24 poblaciones evaluadas de <i>F. arundinacea</i>	54
Tabla 4. Variables agronómicas utilizadas en la caracterización de las colecciones de <i>L. perenne</i> , <i>L. multiflorum</i> y <i>F. arundinacea</i>	50
Tabla 5. Medias de los dos años de evaluación de las variables agronómicas utilizadas en la caracterización de la colección de <i>L. perenne</i>	54
Tabla 6. División por grupos de precocidad de las poblaciones de <i>Lolium perenne</i>	55
Tabla 7. Cuadrados medios del análisis de varianza y test de Kruskal-Wallis para variables cualitativas en <i>Lolium perenne</i>	56
Tabla 8. Correlaciones entre las variables agronómicas y las componentes extraídas del análisis de componentes principales en <i>L. perenne</i>	57
Tabla 9. Medias de los dos años de evaluación de las variables agronómicas utilizadas en la caracterización de la colección de <i>L. multiflorum</i>	59
Tabla 10. División por grupos de precocidad (<i>Prec</i>) de las poblaciones de <i>Lolium multiflorum</i>	60
Tabla 11. Cuadrados medios del análisis de varianza y test de Kruskal-Wallis para variables cualitativas en <i>L. multiflorum</i>	61
Tabla 12. Correlaciones entre las variables agronómicas y las componentes extraídas del análisis de componentes principales en <i>L. multiflorum</i>	62
Tabla 13. Medias de los dos años de evaluación de las variables agronómicas utilizadas en la caracterización de la colección de <i>F. arundinacea</i>	64
Tabla 14. División por grupos de precocidad (<i>Prec</i>) de las poblaciones de <i>Festuca arundinacea</i> . Entre paréntesis se muestra el número de genotipos de cada grupo.	65
Tabla 15. Cuadrados medios del análisis de varianza y test de Kruskal-Wallis para variables cualitativas en <i>Festuca arundinacea</i>	65
Tabla 16. Correlaciones entre las variables agronómicas y las componentes extraídas del análisis de componentes principales en <i>F. arundinacea</i>	66

CAPÍTULO II

Tabla 17. Medias, varianzas e intervalos de variación (rango) de las variables estudiadas para cada método de muestreo, en la colección de partida de <i>L. perenne</i>	90
Tabla 18. Test de Wilcoxon y porcentajes de retención para los métodos comparados en <i>L. perenne</i>	92
Tabla 19. Medias, varianzas e intervalos de variación de las variables estudiadas para cada método de muestreo, en la colección de partida de <i>L. multiflorum</i>	93
Tabla 20. Test de Wilcoxon y porcentajes de retención para los métodos comparados en <i>L. multiflorum</i> ..	95
Tabla 21. Índices de diversidad de Shannon-Weaver para las colecciones nucleares creadas en cada método de muestreo y en las colecciones totales.	102
Tabla 22. Valores medios de las variables agronómicas en las poblaciones seleccionadas por el M6 en <i>L. perenne</i> y <i>L. multiflorum</i>	104

CAPÍTULO III

Tabla 23. Poblaciones estudiadas en el ensayo de conservación de diversidad genética mediante la creación de poblaciones experimentales o “ <i>pools</i> ” genéticos.	117
Tabla 24. Alelos estudiados para cada sistema enzimático.	122
Tabla 25. Reactivos y técnicas de revelado de los sistemas enzimáticos.	123
Tabla 26. Resultados medios en los dos años de evaluación para las 8 variables agronómicas estudiadas, comparados con el cultivar comercial ‘ <i>Vitesse</i> ’.	126
Tabla 27. Correlaciones entre las variables agronómicas y las dos componentes principales de autovalor mayor que 1.....	127

Tabla 28. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables agromorfológicas comparando las cinco poblaciones originales frente a las cinco multiplicadas.....	130
Tabla 29. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables agromorfológicas comparando las tres poblaciones originales del Grupo agronómico 1 frente a la población experimental.....	131
Tabla 30. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables agromorfológicas comparando las dos poblaciones originales del Grupo agronómico 2 frente a la población experimental.....	132
Tabla 31. Test de Wilcoxon para las poblaciones del Grupo agronómico 1.....	133
Tabla 32. Test de Wilcoxon para las poblaciones del Grupo agronómico 2.....	133
Tabla 33. Frecuencias alélicas en cinco <i>loci</i> , para las poblaciones del Grupo agronómico 1 (Luarca, Pravia, Prendes) y las mismas poblaciones multiplicadas (Luarca_M, Pravia_M y Prendes_M).	136
Tabla 34. Frecuencias alélicas en cinco <i>loci</i> , para las poblaciones del Grupo agronómico 2 (Ordenes y Padrón) y la mismas poblaciones multiplicadas (Ordenes_M y Padrón_M).....	137
Tabla 35. Resumen de la variabilidad genética en las poblaciones originales y multiplicadas	138
Tabla 36. Test χ^2 de equilibrio de Hardy-Weinberg en las poblaciones originales, y multiplicadas para cada uno de los <i>loci</i>	138

INDICE DE FIGURAS

PORTADA: Superior izquierda: detalle de un campo de ensayo de *Lolium multiflorum*. **Superior derecha:** *Lolium perenne*. **Centro:** electroforesis de los sistemas *Pgm-1* y *Pgi-2* en *L. multiflorum*. **Inferior derecha:** detalles de una de las cámaras del Banco de Germoplasma del CIAM.

CAPÍTULO I

Portada. Lámina original de <i>Festuca arundinacea</i> Schreb. según Stebler <i>et al.</i> , 1894a.....	21
Figura 1. Detalle de los campos de ensayo de plantas aisladas.....	44
Figura 2. Distribución de las 140 accesiones de raigrás inglés, raigrás italiano y festuca alta estudiadas en este trabajo.....	45
Figura 3. representación factorial de la clasificación ascendente jerárquica sobre las tres primeras componentes en 74 accesiones de <i>Lolium perenne</i>	58
Figura 4. representación factorial de la clasificación ascendente jerárquica sobre las tres primeras componentes en 42 accesiones de <i>Lolium multiflorum</i>	63
Figura 5. representación factorial de la clasificación ascendente jerárquica sobre las tres primeras componentes en 24 accesiones de <i>Festuca arundinacea</i>	67

CAPITULO II

Portada. Lámina original de <i>Lolium perenne</i> L. según Stebler <i>et al.</i> , 1894c.....	75
Figura 6. Esquema de las seis estrategias comparadas para la creación de colecciones nucleares en raigrás inglés y raigrás italiano.....	88
Figura 7. Rangos y varianzas en <i>Lolium perenne</i>	91
Figura 8. Rangos y varianzas en <i>Lolium multiflorum</i>	94
Figura 9a. Curvas de distribución de frecuencias en las poblaciones seleccionadas por los métodos determinísticos para las variables <i>fes</i> , <i>cre</i> , <i>ahb</i>	99
Figura 9b. Curvas de distribución de frecuencias en las poblaciones seleccionadas por los métodos determinísticos para las variables <i>hcr</i> , <i>ain</i> , <i>alp</i>	100
Figura 10. Curva de contribución relativa (CRi) acumulada de las accesiones a la varianza total de la nube de puntos en el análisis de componentes principales en las colecciones de <i>L. perenne</i> y <i>L. multiflorum</i>	101
Figura 11. Contribución individual relativa (CRi) de cada accesión a la varianza total de la nube de puntos en el análisis de componentes principales en raigrás inglés (11a) y raigrás italiano (11b).	103
Figura 12. Esquema de la distribución geográfica de las accesiones seleccionadas para las colecciones nucleares en <i>L. perenne</i> y <i>L. multiflorum</i>	105

CAPÍTULO III

Portada. Lámina original de <i>Lolium multiflorum</i> Lam. según Stebler <i>et al.</i> , 1894b.....	109
Figura 13. Detalle de los campos de multiplicación establecidos en el CIAM. Superior (13a): labores de preparación del terreno. Inferior (13b): embolsado de las plantas individuales para la obtención de semilla una vez madurada ésta.	116
Figura 14. Detalle de los campos de caracterización individual de las 12 poblaciones y la variedad ‘Vitesse’ establecidos en el CIAM.....	119
Figura 15. Diagrama de dispersión de las dos primeras componentes principales del ACP.....	128
Figura 16. Diagrama de la clasificación ascendente jerárquica basada en las componentes principales del ACP.....	129
Figura 17. Fotografías digitales de los sistemas enzimáticos estudiados	135

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

*****, ******, *******: significativo al nivel 5, 1 y 0,1% respectivamente

A: número medio de alelos por locus

ACP: análisis de componentes principales

Acp-1: fosfatasa ácida

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

ahb: anchura de la hoja bandera

ain: abundancia de inflorescencias

alp: altura de la planta

alt: alternatividad

ANOVA: análisis de varianza

Blq: bloque

χ^2 : test chi-cuadrado

CIAM: Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo

clu: clúster

cre: crecimiento en espigado

cri: crecimiento de invierno

CR_i: contribución relativa a la inercia de puntos

crp: crecimiento de primavera

crt: crecimiento total

crv: crecimiento de verano

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CT: colección total

DST: diversidad genética entre subpoblaciones

enf: tolerancia a enfermedades

FAO: Food and Agriculture Organization

Fec. Rec.: fecha de recolección

fes: fecha de espigado

F_{IS}: déficit relativo de heterocigotos en relación con cada sub-población

F_{IT}: déficit de heterocigotos relativo en la población total

F_{ST}: índice de fijación

FV: fuente de variación

GL: grados de libertad

hcr: hábito de crecimiento

H_o: heterocigosidad media observada

H_p: heterocigosidad media esperada en panmixia

H_e: heterocigosidad media esperada

IBPGR: International Board for Plant Genetic Resources

INGACAL: Instituto Galego de Calidade Alimentaria

INIA: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

IPGRI: International Plant Genetic Resources Institute

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat

Lat.: latitud

lhb: longitud de la hoja bandera

Long.: longitud

M1: método 1

M2: método 2

M3: método 3

M4: método 4

M5: método 5

M6: método 6

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

MBG: Misión Biológica de Galicia

ns: no significativo

PAC: Política Agraria Comunitaria

Pex-1: peroxidasa

Pgi-2: fosfogluco-isomerasa

Pgm-1: fosfogluco-mutasa

Pobl.: población

prec: precocidad

res: reespigado

Sdh-1: shikimato deshidrogenasa

Sig.: significación

SPR: semipartial R square

USC: Universidade de Santiago de Compostela

Var. acum.: varianza acumulada

ESTRUCTURA DE ESTA TESIS DOCTORAL

En el presente trabajo se investigan cuestiones prácticas de manejo en los bancos de germoplasma, mediante estudios agronómicos, técnicas estadísticas y marcadores isoenzimáticos.

En el **CAPÍTULO I** se realiza una caracterización agronómica de accesiones de tres especies forrajeras de gramíneas que se conservan en el Banco de Gramíneas pratenses del CIAM – INGACAL. Se trata de un trabajo agronómico descriptivo sobre un total de 74 accesiones de raigrás inglés, 42 de raigrás italiano, y 24 de festuca alta, junto a diversos cultivares comerciales.

En el **CAPÍTULO II** se comparan diversos procedimientos matemáticos para la creación de colecciones nucleares representativas de las colecciones anteriormente estudiadas en el capítulo anterior, mediante técnicas multivariantes, métodos aleatorios e índices de diversidad.

Finalmente en el **CAPÍTULO III** se investiga la conservación de la diversidad genética mediante la creación de poblaciones heterogéneas o “pools” por cruzamiento de grupos agronómicamente similares en una selección de poblaciones de raigrás italiano.

RESUMEN

Entre los años 1985 y 1997 se llevó a cabo una recolección de gramíneas pratenses de las especies de raigrás inglés (*Lolium perenne* L.), raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam.) y festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) realizada principalmente en la España húmeda. Se obtuvieron 140 poblaciones viables de un total de 187 recolectadas, y que actualmente se conservan en el banco de germoplasma de especies pratenses del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM – INGACAL). Las 140 entradas fueron evaluadas agronómicamente mediante 13 descriptores agronómicos y el índice de diversidad de Shanon-Weaver durante los años 1998-2000. Se evaluaron en total 74 poblaciones de raigrás inglés, 42 de raigrás italiano y 24 de festuca alta, junto con algunos cultivares comerciales de las tres especies. Con los datos obtenidos, sobre las colecciones base se compararon seis métodos para crear colecciones nucleares.

También se realizó un estudio sobre la conservación de la diversidad mediante la creación de poblaciones heterogéneas o *pools genéticos* respecto a la multiplicación individual de muestras. Para ello se multiplicaron en panmixia dos grupos de características agronómicas similares de *L. multiflorum* y se analizaron las descendencias resultantes mediante caracteres agronómicos y análisis de isoenzimas mediante técnicas de electroforesis en gel de almidón.

Las colecciones de partida presentaron una gran variabilidad agromorfológica, y varias poblaciones tuvieron un mejor comportamiento agronómico que las variedades comerciales, tanto en rendimientos como en resistencia a enfermedades. Los cultivares de raigrás inglés creados a partir de material autóctono de Galicia, superaron al resto de variedades. En las colecciones de raigrases, las poblaciones más productivas fueron las más tardías, provenientes de zonas similares a la localidad de ensayo, mayoritariamente gallegas. En festuca alta las más productivas fueron las más precoces.

Para la creación de colecciones nucleares, los métodos multivariantes mostraron ser más eficaces que los de selección al azar. El método que mejor conservó la diversidad en ambas colecciones nucleares fue el de mayor contribución a la inercia de la nube de puntos, conservando respectivamente para el raigrás inglés y raigrás italiano un 87% y un 93% de los coeficientes de retención sobre las colecciones de partida.

Las poblaciones heterogéneas creadas por multiplicación en panmixia conservaron en general la diversidad agronómica de las poblaciones originales, sin embargo se observó la pérdida de algún alelo raro.

El material estudiado se considera interesante tanto para la preservación de la diversidad autóctona almacenada, como para el uso de estas colecciones en futuros programas de mejora genética para la creación de cultivares adaptados a las localidades de origen.

CAPÍTULO I

Evaluación agronómica de las colecciones de partida de raigrás inglés, raigrás italiano y festuca alta.



Lámina original de *Festuca arundinacea* Schreb. según Stebler *et al.*, 1894a.

CAPÍTULO I: Evaluación agronómica de las colecciones de partida de raigrás inglés, raigrás italiano y festuca alta

1. INTRODUCCIÓN

La existencia de la vida en la Tierra fue confirmada por Hoashi *et al.*, (2009), hace 3.460 millones de años, en rocas del Cratón de Pilbara (Australia), 800 millones de años antes de lo que se pensaba a principios de este siglo. Desde entonces, los procesos de la evolución han originado una compleja pluralidad de formas de vida, que fueron adaptándose a las diferentes condiciones de su medio ambiente. Esta variabilidad genética acumulada se ha ido extendiendo y equilibrando en el planeta, y constituye nuestra actual diversidad biológica o biodiversidad, término acuñado por primera vez en 1986, durante el Foro Nacional sobre Biodiversidad de Washington.

Los homínidos hicieron su aparición en un momento muy reciente en términos geológicos, hace unos seis millones de años. Según el registro fósil, el hombre de Neandertal se extinguió hace unos 25.000 años, con lo que el *Homo sapiens sapiens* pasó a ser la única especie humana, y ya podemos referirnos a él simplemente como "el hombre". No supuso una gran influencia en la evolución del resto de seres vivos, pero cuando hace unos 10.000 años, el hombre descubre la agricultura, comienza a contribuir de manera decisiva en la evolución de las especies que cultiva y del medio ambiente en que vive. El proceso de colonización humana en la Tierra extendió la agricultura, y muchos genes, genotipos y poblaciones de plantas cultivadas, se difundieron por los cinco continentes desde la antigüedad. A partir de las primitivas zonas de origen, los cultivos fueron expandiéndose, y evolucionaron en los distintos ambientes por la presión de la selección natural y por el desarrollo de las prácticas agrarias. Más tarde las rutas

comerciales y la diversificación de las culturas, originaron innumerables razas o poblaciones locales que sirven como base genética de la agricultura moderna.

La expresión *biodiversidad agrícola* tiene un amplio significado, que contiene todos los aspectos de la biodiversidad relativos a la alimentación y la agricultura, así como los demás componentes que constituyen un agroecosistema. Es decir, que comprende las variedades y la variabilidad de animales, plantas y microorganismos, que son necesarios para mantener la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. Dentro de este conjunto, los "*recursos fitogenéticos*" comprenden la diversidad genética correspondiente al mundo vegetal que se considera poseedora de un valor real, o potencial, para el presente o el futuro. La pérdida de estos recursos se considera un proceso irreversible que supone una grave amenaza para la seguridad alimentaria con posibles repercusiones a escala mundial (Martín, 2001).

La diversidad que contienen los recursos fitogenéticos suministra la base para adaptar los cultivos a ambientes diferentes y a los requerimientos de la agricultura moderna. Por eso, los esfuerzos de conservación y mejora pueden contribuir a hacer frente a algunos retos de sostenibilidad ambiental relacionados con la agricultura. Pero hasta las últimas décadas, no se había reconocido en los foros internacionales el valor intrínseco de tal diversidad biológica y de sus componentes, valores que comprenden aspectos ecológicos, genéticos, socioeconómicos, científicos, culturales, recreativos y estéticos. Por tanto se originó una preocupación internacional por la conservación de tales recursos como consecuencia de la degradación que estaban sufriendo por las actividades antrópicas y sus repercusiones en el medio ambiente. No obstante, en los últimos 200 años la homogeneización de los hábitos alimenticios y la simplificación de los sistemas agrícolas han reducido el número de cultivos y también la heterogeneidad de los mismos, tanto que, a finales de siglo XX, se estimó que a nivel mundial el 90% de la alimentación estaba basada en tan solo unas 30 especies vegetales (FAO, 1996).

La utilización de un estrecho abanico de cultivares, más productivos y adaptados a las condiciones de comercialización de la sociedad actual, ha ido desplazando paulatinamente a muchos cultivares tradicionales, menos productivos, pero más adaptados a su ambiente y poseedores de una gran diversidad genética. Como consecuencia, los nuevos materiales vegetales suministrados por la agricultura moderna, destruyen la propia fuente de diversidad genética que utilizan los fitomejoradores (Martín, 2001), existiendo un mayor riesgo de *erosión genética*, definida como la pérdida de diversidad, incluyendo la pérdida individual de genes, y un mayor riesgo de *vulnerabilidad genética*, definida como la condición de un cultivo cuando es uniformemente susceptible a un patógeno o plaga (National Research Council, 1972). Según Iriondo, (2001), la principal causa de erosión genética es la sustitución de las variedades tradicionales por cultivares modernos, seguida de la degradación de los ecosistemas.

A pesar de los progresivos esfuerzos de conservación iniciados durante los últimos años, el creciente deterioro de los espacios naturales ha ocasionado que a escala mundial se encuentren actualmente amenazadas el 12,5% de las más de 250.000 especies vegetales conocidas (Walter y Gillett, 1998). En España en la década de los 80, Barreno *et al.*, (1984) constataron que 1.095 taxones de la flora vascular española estaban amenazados o extintos. En el año 2000, según datos del Ministerio de Medio Ambiente (Ministerio de Medio Ambiente, 1999; VV.AA., 2000), de las casi 10.000 especies y subespecies inventariadas, un total de 1.149 se consideraron amenazadas, más otras 265 que hubieron de dejarse dentro de la categoría DD (Datos Insuficientes). En 2008 se publicó la *Lista Roja de Especies Amenazadas* (Moreno, 2008), que ampliaba a 1.221 el número de especies en peligro o de interés especial. En esta lista Galicia figuraba con 117 taxones amenazados.

Hasta bien entrado el siglo XX no se tuvo conciencia del estrechamiento que estaba sufriendo la base genética de las especies cultivadas. Fue a partir de los años sesenta, cuando la comunidad científica reconoció que todos los cultivos

tradicionales y la flora silvestre constituían recursos fitogenéticos que debían preservarse, por lo que se iniciaron los esfuerzos de conservación para evitar, en la medida de lo posible, el proceso de *erosión genética*. Bajo el concepto de *recursos fitogenéticos* se incluyen: i) las variedades de especies cultivadas (tanto tradicionales como comerciales), ii) especies silvestres o asilvestradas afines a las cultivadas y iii) materiales obtenidos en trabajos de mejora genética (Esquinas-Alcázar, 1993). Las modalidades de conservación iniciadas se centraron en dos líneas concretas: conservación *in situ*: espacios naturales gestionados y protegidos integralmente, y conservación *ex situ*: colecciones de plantas y bancos de germoplasma.

Las colecciones de germoplasma se han definido como colecciones de muestras de genotipos de especies domesticadas y de sus formas silvestres, que se mantienen en forma de semillas, de plantas, *in vitro*, etc., y que sirven como material de partida a los mejoradores genéticos e investigadores. La evaluación y caracterización de las colecciones de germoplasma es uno de los principales aspectos de la gestión de los recursos genéticos (Bretting y Widrlechner, 1995; Clark *et al.*, 1997).

La primera colección sustancial de germoplasma en un cultivo fue llevada a cabo por Philippe de Vilmorin, en Verrières (Francia), hacia la segunda mitad del s. XIX. Tal colección consistía esencialmente en genotipos de trigo silvestres (Frankel *et al.*, 1995). Sin embargo, hasta la segunda década del s. XX, no se obtuvieron las primeras colecciones sistemáticamente recopiladas a cargo del científico N.I. Vavilov, cuyo objetivo era obtener una representación mundial de la diversidad genética de los principales cultivos (Vavilov, 1949-50). Sus más de 100 expediciones de recolección de recursos fitogenéticos por todo el mundo resultaron finalmente en una colección de 1.373 muestras, esencialmente formada por leguminosas. Actualmente ésta colección consiste en unas 43.000 entradas pertenecientes a 160 especies, que se conservan en el *Vavilov Institute of Plant Industry* de Rusia (Kurlovich *et al.*, 2000). A partir de aquellos trabajos, y con motivo de preservar la variabilidad genética de las poblaciones naturales, se inició

por parte de diversas instituciones nacionales e internacionales, un importante movimiento conservacionista, que pretendía concentrar la mayor parte de la diversidad posible de especies de interés en centros especiales de almacenamiento. Entre los años 1940 y 1950 se inicia en EE.UU. la creación de una serie de centros de conservación en Ames (Iowa, 1947), Geneva (Nueva York, 1948), Experiment (Georgia, 1949) y Pullman (Washington, 1949), los cuales conservaban el material a temperatura ambiente. Hasta 1958 no se inicia la conservación del material a bajas temperaturas (2 °C), a cargo del *National Seed Storage Laboratory* (Colorado, EE.UU.), que conservaba colecciones de los principales cultivos americanos (Pita y Martínez, 2001). En 1974 se crea el *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), actualmente el IPGRI (*Internacional Plant Genetic Resources Institute*) cuya labor era coordinar una red internacional de conservación y mantenimiento de recursos fitogenéticos. Estas iniciativas derivaron en la aprobación en 1983 del *Compromiso Internacional sobre Recursos Filogenéticos*, por los Países Miembros de la FAO, en el cual diversas instituciones coordinadas internacionalmente asumieron la responsabilidad de conservar y mantener colecciones de recursos fitogenéticos de especies de interés, para el beneficio de la comunidad mundial.

En 1979 en virtud del acuerdo de colaboración establecido entre el *Instituto Nacional de Tecnología Agraria y alimentaria* (INIA) y el IBPGR, fue creado en España el primer banco de germoplasma nacional conservado en forma de semillas. Posteriormente en 1981, por Orden del *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación* (MAPA) sobre conservación y utilización del patrimonio genético vegetal nacional, el INIA asumió la coordinación de las actividades de gestión de recursos fitogenéticos en los centros de investigación agraria dependientes. Como consecuencia, se crearon diversas colecciones de germoplasma en las distintas Comunidades Autónomas. Con la rápida intensificación a principios de los 80 de las actividades de recolección y conservación, fue necesario la construcción en 1986 de un nuevo banco de semillas con capacidad de almacenamiento para muestras de todo el material recolectado en los bancos a nivel autonómico, y la

creación en 1993 de un organismo coordinador: el *Centro de Recursos Fitogenéticos del INIA*, el cual a través del Programa de Conservación y Utilización de Recursos Fitogenéticos del MAPA, gestiona numerosas actividades de recolección, (Ruiz *et al.*, 1997; 1999). Este programa está dirigido fundamentalmente a la conservación *ex situ* de tales recursos y a evitar la pérdida de diversidad como consecuencia de los logros de la mejora vegetal y la disminución de la superficie de los espacios naturales.

En 1994, y con motivo de promover una utilización más eficiente de los recursos genéticos en el sector agrícola, la Comisión Europea presentó al Parlamento Europeo un informe sobre la aplicación del programa relativo a la conservación caracterización, recolección, multiplicación y utilización de los recursos genéticos en virtud del reglamento CE nº 1467/94 (Comisión Europea, 1999), aprobándose una declaración en la que se esgrimía la necesidad de conceder más recursos financieros a dicho programa. Desde los años 70, el número de muestras conservadas en colecciones de germoplasma en todo el mundo se ha multiplicado por diez. Según datos de la FAO (FAO, 1995) se calculó que existían almacenadas *ex situ* seis millones de entradas en cerca de 1.300 colecciones de germoplasma, de las cuales el 91% se conservan en forma de semilla, el 8% se conservan *in vivo* en jardines botánicos y sólo un 1% se conservan *in vitro*. A principios de 2008 se anunció la construcción de la Bóveda Global de Semillas de Svalbard, en el Círculo Polar Ártico. En la ceremonia inaugural se depositaron 100 millones de semillas procedentes de un centenar de países de todo el mundo. El proyecto impulsado por el Gobierno Noruego, el Fondo Mundial para la Diversidad de Cultivos y el Banco Genético Nórdico, permitió la creación de un depósito seguro de bancos de duplicados de semillas de los principales cultivos del mundo, asegurando su supervivencia frente a fenómenos como el cambio climático y catástrofes naturales (<http://www.croptrust.org>).

Actualmente existen en España colecciones de germoplasma bastante representativas de la variabilidad autóctona de algunos cultivos, como es el caso de los cereales de grano y de algunas leguminosas. Pero existen especies poco representadas en las que las poblaciones naturales corren un riesgo de *erosión genética* como consecuencia de la expansión de la agricultura, el uso de variedades comerciales o de la disminución de los espacios naturales derivada de la urbanización y las actividades humanas. En otros casos, la gran variedad agrícola y climática existente en la Península Ibérica, genera una gran diversidad genética que hace necesario intensificar los esfuerzos de recolección para una mejor representación de los ecotipos silvestres. Otras veces el carácter minifundista de algunos territorios (como es el caso de Galicia), promueve la capacidad de crear razas locales con interés de conservación, ya que algunas prácticas culturales concretas delimitan estructuras genéticas, sobre todo en especies hortícolas, que urge conservar. Diversos autores han puesto de manifiesto que el uso continuado de unos pocos cultivares entraña un peligro de alteración en los recursos genéticos que puede dar lugar a consecuencias impredecibles.

En el caso de Galicia, en los años 80 se iniciaron trabajos de recolección de ecotipos de gramíneas y otras especies pratenses (Vivero, 1979; Piñeiro y Pérez, 1986), continuados por Oliveira y Charmet (1988a, 1988b). Parte de este material fue evaluado por Arbones y Oliveira (1995), Oliveira *et al.*, (1997a; 1997b), López y Oliveira (2000a; 2000b), Costal *et al.*, (2005), y recientemente por López *et al.*, (2009). Los estudios incluyeron técnicas de laboratorio (electroforesis de isoenzimas) y ensayos de campo (caracterización agronómica, selección y cruzamiento). Esta colección de gramíneas se completó durante los años 1999 y 2000 con nuevas recolecciones de especies poco representadas en el banco del CIAM (Oliveira *et al.*, 2001), entre las que destacan géneros como *Agrostis*, *Poa*, y festucas finas (*Festuca rubra* y *Festuca ovina*), mediante la financiación aportada en el proyecto "*Recolección, multiplicación y caracterización de recursos fitogenéticos de gramíneas de la Cordillera Cantábrica*" (RF99-018) y financiado

por el Ministerio de Agricultura, el cual aportó hasta hoy varias publicaciones científicas, la variedad comercial de raigrás inglés 'CiamI', (BOE núm. 179, 27 de julio 2001), la de raigrás italiano 'Pomba' (BOE núm. 72 de 25 de marzo de 2003), y el trabajo de investigación de tres tesis doctorales y una máster, incluida la presente. Los últimos trabajos de recolección de especies pratenses se financiaron mediante la aportación del proyecto "*Prospección y recolección de recursos fitogenéticos autóctonos de leguminosas de la Cordillera Cantábrica y caracterización primaria de los géneros Agrostis, Lolium y Festuca*" (RF2006-00012-C02-02), con lo que se amplió la colección con especies de trébol blanco (*Trifolium repens* L.), trébol violeta (*Trifolium pratense* Lam.) y loto (*Lotus corniculatus* L.), y que actualmente están en fase de caracterización y multiplicación (López *et al.*, 2009)

Hoy en día se conserva en el CIAM una colección de ecotipos de más de 1300 entradas de especies pratenses (*Lolium, Festuca, Dactylis, Poa, Agrostis, Trifolium*, etc.). Dicha colección se completó en 2005 con 971 ecotipos de *Dactylis* procedentes de la colección de la MBG (Misión Biológica de Galicia) por imposibilidad de conservación de este organismo dependiente del CSIC (Ron *et al.*, 1991; 1997). Por tanto el CIAM conserva actualmente la única colección de referencia en zonas húmedas de España de tales especies. Además también cuenta con una selección de cereales entre los cuales están 750 ecotipos de maíz (500 de ellos gallegos), trigo del país (87 entradas), y centeno (53 entradas). Además también mantiene una colección de ecotipos de manzanos (408 entradas), perales (240), y también varios ecotipos de especies hortícolas de pimientos (12 gallegos y 15 vascos), cebollas autóctonas (20), repollos autóctonos (10) y grelos. Este material se mantiene con miras a crear variedades locales bien adaptadas a las condiciones del norte de España, y contribuir al cumplimiento de la Política Agraria Comunitaria (PAC) mediante el suministro de material vegetal para la creación de nuevas variedades.

1. 1. SISTEMÁTICA DE LOS GÉNEROS LOLIUM Y FESTUCA

Las gramíneas, con más de 670 géneros y cerca de 10.000 especies descritas, constituyen la cuarta familia con mayor número de especies, después de las compuestas (*Asteraceae*), las orquídeas (*Orchidaceae*) y las leguminosas (*Fabaceae*). Sin embargo a nivel alimentario global, es la familia con mayor importancia económica. De hecho, la mayor parte de la dieta de los seres humanos proviene de las gramíneas, tanto en consumo directo, como de productos transformados.

El complejo *Festuca-Lolium* integra parte de las gramíneas más ampliamente utilizadas en la implantación de praderas de las zonas templado-húmedas. Ambos géneros se clasifican en la subfamilia *Pooideae*, tribu *Poeae*. Tanto en *Lolium* como en *Festuca* el número cromosómico básico (x) es 7. El género *Lolium* comprende en estado natural especies diploides con $2n = 2x = 14$. En la naturaleza no se encuentran poliploides. Sin embargo en *Festuca*, la poliploidia ha sido el patrón evolutivo que ha caracterizado el género, no solo en la diversificación de especies sino en colonizar nuevos territorios y ambientes. En *Festuca arundinacea* Schreb., el número básico es $x = 7$ con $2n = 6x = 42$.

Desde los primeros trabajos de Dumortier (1823), el género *Lolium* ha sufrido numerosas modificaciones en su taxonomía, durante los dos últimos siglos se han publicado más de 480 taxones distintos, creándose una gran tendencia a formar divisiones y subdivisiones, debidas en gran parte a la adaptabilidad que presentan al medio ambiente, lo cual causa una gran variedad de formas, y a que las especies pueden cruzarse y dar lugar a híbridos en la naturaleza (Inda Aramendía, 2005). Actualmente la mayor parte del conocimiento del género se debe a Terrel (1966, 1968), quien puso orden en este género reconociendo sinonimias y nombres superfluos y contempló únicamente ocho especies:

Lolium multiflorum Lam.
Lolium perenne L.
Lolium rigidum Gaud.
Lolium temulentum L.
Lolium remotum Scrank.
Lolium canariense Steud.
Lolium persicum Boiss. & Hohen. ex Boiss.
Lolium subulatum Vis.

Otras especies descritas en los últimos años dentro del género son: *Lolium grandispicum* Fei, descrita como nueva especie en Hubei (China) por Fei (1999), *L. edwardii* Scholz, endémica de las Islas Canarias (Scholz *et al.*, 2000), *L. loweii* Menezes, descrito en Madeira como *Arthrochortus loliaceus* Lowe. Para Terrel (1968) es sinónima de *L. rigidum* y semejante a *L. subulatum* y *L. grandispicum*. Y por último la recientemente descrita *Lolium saxatile* Scholz, endémica de Fuerteventura (Islas Canarias) y semejante a *L. multiflorum* (Scholz y Scholz, 2005).

Las ocho especies citadas por Terrel son diploides ($2n = 14$). *L. multiflorum*, *L. perenne* y *L. rigidum* son alógamas autoincompatibles, el resto son autógamas. Las especies alógamas son interfértiles entre sí, por lo que Naylor (1960), y posteriormente Bulinska-Radomska y Lester (1986), propusieron que deberían estar agrupadas en una única especie y ser consideradas como subespecies, sugerencia también propuesta por Jauzein (1995). Las especies *L. perenne* y *L. multiflorum* presentan una gran variabilidad de formas, debido principalmente a que se cultivan en todo el mundo, y a que su distribución natural es prácticamente cosmopolita. El área de expansión natural de *L. rigidum* corresponde a zonas mediterráneas con un largo periodo de sequía estival, y es utilizada para pastoreo invernal en zonas de clima mediterráneo, y también en zonas del sur de Australia. La distribución natural de *L. persicum* se encuentra restringida al sudeste asiático, *L. subulatum* se localiza en la zona este del

Mediterráneo y *L. canariense* es exclusivo de algunas islas del Atlántico (Canarias, Madeira y Cabo Verde). El hábitat natural de *L. temulentum* y *L. remotum* es más restringido y únicamente se suelen encontrar como malas hierbas de cultivos de cereales y de lino.

Las especies del género *Festuca* presentan un mayor rango de ploidía que los raigrases, apareciendo en la naturaleza desde especies diploides hasta decaploides, siendo la mayoría de ellas alógamas y perennes. Es uno de los mayores géneros de la familia *Poaceae*, con más de 400 especies (Clayton y Renvoise, 1986; Watson y Dallwitz, 1992). El trabajo clásico sobre *Festuca* en Europa es el de Hackel (1882) en el cual se presenta también una propuesta de clasificación subgenérica. Markgraf-Dannenberg (1980), reconoció en Europa 170 especies y 219 taxones. Algunos estudios posteriores de referencia en Europa se deben a Kerguelén y Plonka (1989), Portal (1999), y Foggi *et al.*, (2003), entre otros. En España actualmente está sufriendo una profunda revisión dentro del proyecto "*Flora Ibérica*" (<http://www.floraiberica.org>). Según Cebolla y Rivas (2003), se reconocen 105 taxones y 76 especies para toda la Península Ibérica. Debido a su adaptabilidad a distintos medios es un género que frecuentemente tiende a formar endemismos. En Galicia, Gutiérrez *et al.*, (1997), citaron una especie endémica: *Festuca brigantina* subsp. *actiophyta* Gutiérrez Villarías, catalogada actualmente como *vulnerable* en el Libro Rojo de Especies Amenazadas (Moreno, 2008). Otro endemismo gallego: *F. summilusitanica* Franco & R. Afonso, fue separada de *F. gredensis* Fuente & Ortúñez, por De la Fuente y Ortúñez (2000), quedando incluida en el Catálogo de Plantas Endémicas y Subendémicas de Galicia (Silva-Pando, 2008).

Existen muchas similitudes entre los géneros *Lolium* y *Festuca*, que han sido ampliamente comentadas por muchos autores (Borrill, 1976; Stebbins, 1956; Terrel, 1966, Momotaz *et al.*, 2004). Estudios inmunológicos confirmaron la proximidad entre el género *Lolium* con *F. altissima*, *F. gigantea* y *F. pratensis* (Butkute y Konarev, 1980). Diversos estudios del ADN cloroplástico (Lehvaslaiho

et al., 1987; Darbyshire y Warwick, 1992) encontraron grandes similitudes entre *L. multiflorum*, *F. arundinacea* y *F. pratensis*, estas dos últimas clasificadas en el grupo *bovinae* del género *Festuca*. Dichos estudios sugieren que filogenéticamente el grupo alógamo de *Lolium* es muy próximo a la sección *bovinae* del género *Festuca*, de hecho los híbridos interespecíficos entre *L. perenne* L., *L. multiflorum* Lam., y *Festuca pratensis* Huds., se encuentran con relativa facilidad en la naturaleza, y se producen fácilmente siendo indiferente el pie de planta parental (Jauhar, 1976). Bulinska-Radomska y Lester (1986) encontraron estrechas relaciones en ambos géneros mediante estudios morfológicos y proteínicos, y propusieron que el antecesor común sería muy cercano a *L. perenne* y *F. pratensis*. Dentro del género *Lolium*, diversos estudios han puesto de manifiesto la mayor diversidad genética de *L. rigidum* frente a otras especies (Charmet y Balfourier, 1994, Balfourier *et al.*, 1998b), lo cual sugiere que podría ser el antepasado común del género.

Dada la proximidad genética entre las especies de ambos géneros, los híbridos entre *Festuca* y *Lolium* ocurren con relativa frecuencia en la naturaleza en aquellas localidades donde conviven ambos géneros. En el caso de *Lolium*, el híbrido más frecuente es *Lolium x hybridum* Hausskn. (*L. perenne* x *L. multiflorum*), que reúne características intermedias entre ambas especies. Se han descrito otros híbridos entre *Lolium* y *Festuca* que reciben el nombre de *x Festulolium* (Asch. & Graebn):

x Festulolium braunii (Richt.) Camus. = *F. pratensis* x *L. multiflorum*.

x Festulolium loliaceum (Huds.) P. Fourn. = *F. pratensis* x *L. perenne*.

x Festulolium holmberg (Dörfl) P. Fourn. = *F. arundinacea* x *L. perenne*.

Tales híbridos tienen interés en el uso agrícola, ya que combinan las buenas características nutritivas, de digestibilidad y de rendimiento de los raigrases, con la mayor persistencia y habilidad de las festucas para soportar condiciones extremas.

1. 2. FITOSOCIOLOGÍA

Fitosociológicamente las especies *L. perenne* y *L. multiflorum* y *F. arundinacea* son representativas de la clase *Molinio-Arrhenatheretea* Tüxen 1937. Su presencia en Galicia es extraordinariamente abundante desde la costa hasta la alta montaña. Por esta misma razón el deslinde en asociaciones falta por estudiar en detalle para la mayor parte del territorio (Izco *et al.*, 2000).

1.3. UTILIZACIÓN AGRONÓMICA DEL RAIGRÁS ITALIANO, RAIGRÁS INGLÉS Y FESTUCA ALTA

Los géneros *Lolium* y *Festuca* tienen una amplia utilización forrajera en la agricultura moderna. El raigrás italiano y el raigrás inglés son las especies más utilizadas en las zonas templado-húmedas de Europa y Nueva Zelanda, aprovechadas para siega (ensilado y aprovechamiento en verde), en pastoreo y también como césped. Las variedades de festuca alta, además del aprovechamiento forrajero, también tienen una amplia utilización en la implantación de céspedes, cubiertas vegetales, y otras aplicaciones no forrajeras.

En Galicia, la superficie de prados naturales y pastizales es de 449.161 has, de las cuales 289.081 pertenecen a cultivos de maíz forrajero, praderas polifitas y raigrás italiano, (Consellería do Medio Rural, Xunta de Galicia, 2005). De las 6.000 t de semillas de gramíneas pratenses consumidas en España cada año, 5.000 t corresponden a los raigrases (raigrás inglés e italiano) siendo las gramíneas más utilizadas en el Norte de España para la implantación de praderas artificiales (Piñeiro y Pérez, 1992). Casi todas las semillas de gramíneas pratenses consumidas en España se importan, con la excepción del raigrás italiano, del que se produce en España algo más de la mitad de la semilla que se consume. En los últimos años la caída de los precios de la leche y la subida de los costes de fertilizantes y carburantes, han hecho que muchas explotaciones agrarias se hayan planteado una utilización más eficiente de los recursos propios para garantizar la rentabilidad agraria. Esto implica la utilización de material genético

bien adaptado a las condiciones locales, por tanto los mejoradores genéticos y los bancos de germoplasma desenvuelven un papel fundamental para contribuir a la estabilidad de la renta agraria y garantizar la competitividad de las explotaciones.

1.3.1. Raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam.)

El raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam.) es un terófito/hemicriptófito cuyo cultivo está ampliamente distribuido en el mundo. Actualmente se distribuye en regiones templadas y subtropicales. Crece espontáneamente en el norte de África, oeste de Asia y sur de Europa, y ha sido domesticada desde su cultivo inicial, en la antigua región de Lombardía (Italia), en el s. XIII. En España es la gramínea forrajera más utilizada. Es una planta vigorosa, anual o bianual, habitualmente usada en praderas, principalmente para siega y también para pastoreo, tanto para la alimentación en fresco como para ensilado. Debido a su gran vigor en el periodo de establecimiento, no se combina bien con otras gramíneas, pero a bajas densidades de siembra se combina bien con algunas leguminosas como el trébol violeta, produciendo una buena masa de forraje temprana. Los cultivares alternativos de esta especie, denominados de tipo 'Westerwold' o 'Westerwoldicum' se seleccionaron en Holanda en la región Westerwolde (Terrel, 1968). Estos cultivares son de crecimiento más rápido que los cultivares no alternativos, ya sean diploides o tetraploides. Al no necesitar periodo de vernalización son estrictamente anuales y florecen en el año de su establecimiento, pudiéndose combinar rotacionalmente con otros cultivos. En Galicia, la alimentación forrajera de muchas explotaciones intensivas está basada en el cultivo rotacional del raigrás italiano alternativo con otras especies forrajeras como maíz, cebada, centeno y nabos. También se han investigado algunas rotaciones con híbrido sorgo x pasto del Sudán (Piñeiro y Pérez, 2003). Los cultivares tipo 'Westerworld' sembrados a finales de verano o incluso antes pueden proporcionar una buena producción de forraje durante el otoño e invierno, siempre y cuando la fertilidad del suelo sea elevada. Los cultivares no alternativos se usan para la implantación de praderas de más larga duración, sembrándose a veces variedades tetraploides. Las variedades tetraploides son más productivas, presentan una mayor agresividad inicial y más resistencia a

enfermedades, pero por su mayor contenido en agua son más difíciles de ensilar que los diploides. Tales variedades tetraploides presentan también un mayor tamaño de semilla, son menos persistentes en pastoreo en siembras puras, presentan una mayor palatabilidad para el ganado y una mayor resistencia a royas. Para alimentación en fresco y para henificación se suelen recomendar las variedades tetraploides. Para ensilar, se recomiendan las variedades diploides, con menor contenido acuoso, ya que permiten el ensilado sin necesidad de aditivos. Debido a su gran vigor de establecimiento, al raigrás italiano se le puede considerar un buen herbicida al eliminar las malas hierbas espontáneas que emergen tras la siembra (Piñeiro y Pérez, 1992). No obstante este vigor de establecimiento puede resultar un inconveniente para siembras en mezcla con otras especies, ya que al cabo de dos años éstas desaparecerán en su mayoría, dejando un hueco que ocuparán malas hierbas, al haber eliminado el raigrás italiano la competencia de las otras especies de la mezcla (Muslera y Ratera, 1983).

1.3.2. Raigrás inglés (*Lolium perenne* L.)

El raigrás inglés (*Lolium perenne* L.) es una especie perenne, que forma densos cepellones, y por su mayor resistencia al pisoteo, menos crecimiento en altura, y por su gran capacidad de ahijamiento es la gramínea más utilizada en zonas templadas para el establecimiento de praderas de larga duración, resultando ideal para utilización en pastoreo. Es originaria de las zonas templadas de Europa, África del Norte y Asia. Junto con el raigrás italiano, es el principal cultivo para pastoreo y ensilado en las zonas de climas suaves templado-húmedos de la Europa Occidental. Se cultivan algunos híbridos con raigrás italiano, los cuales tienen vida más larga y se utilizan para aumentar los rendimientos. También existen ecotipos mediterráneos de latencia estival. En el norte de España es una especie muy apreciada en praderas, ya que mantiene una vida productiva mayor que el raigrás italiano (cuatro o cinco años) y presenta unos buenos valores nutritivos de digestibilidad e ingestibilidad. Sin embargo el principal inconveniente del raigrás inglés es su sensibilidad a la sequía. En general en el Norte de España las temperaturas y el período estival seco afectan a la producción de materia seca,

a su distribución a lo largo del año y a su persistencia, por eso no es una especie muy cultivada en las zonas mediterráneas de la España seca. El desarrollo de variedades sintéticas tetraploides, teniendo una mayor adaptación y tolerancia a esos factores limitantes, así como una estación de crecimiento amplia, buenos rendimientos y valor nutritivo, son objetivos importantes en la mejora genética de esta especie. En Galicia su utilización agronómica es principalmente en praderas bífitas y polífitas de secano, asociándose frecuentemente con trébol blanco en las praderas bífitas (Vidal Galego *et al.*, 2009). En la naturaleza el raigrás inglés se asocia con hongos endofitos de los géneros *Epichloë* y *Neotyphodium*. La relación se considera mutualista, y se ha demostrado que el hongo puede proporcionar ventajas adaptativas a la planta infectada al tolerar ésta mejor la sequía y presentar una mayor resistencia ante insectos y nemátodos (Latch, 1993; West *et al.*, 1993). Sin embargo, como consecuencia de la asociación se pueden sintetizar diversos metabolitos secundarios que incluyen algunos alcaloides tóxicos como lolitreno B y ergovalina, que pueden producir intoxicaciones en el ganado en pastoreo como la llamada *parálisis del raigrás* (Fletcher *et al.*, 1993). Por éstas razones en los últimos años se han realizado diversos trabajos para estudiar los efectos de la asociación del raigrás inglés con hongos endofitos sobre material autóctono para mejorar el cultivo sin afectar a la calidad del forraje (Oliveira *et al.*, 2002a, 2002b). Además de su utilización forrajera, los raigrases ingleses tienen una amplia aplicación en el establecimiento de céspedes en mezcla con otras gramíneas, principalmente festucas finas y poas. Este tipo de variedades suelen ser diploides y producen un mayor ahijamiento, más adecuado para la formación de céspedes. Algunas variedades también se utilizan en otros usos como la recuperación de espacios degradados, taludes, en viñedos, implantación de cubiertas vegetales, etc.

1.3.3. Festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.)

La festuca alta es un hemicriptófito perenne de larga vida, de porte alto, que forma macollas o es cespitosa cuando es pastoreada. Es originaria de Eurasia, ocurre naturalmente en Europa, África del Norte y en las zonas templadas de Asia.

Ha sido ampliamente difundida en otras zonas templadas, jugando un papel importante en los pastizales y estepas xero/mesofíticas del mundo. Su cultivo se ha extendido a otros continentes como América y Australia. En la Península Ibérica se puede cultivar prácticamente en todo el territorio. Se puede asociar bien con leguminosas y producir pastos de alta calidad, sin embargo por su mayor lentitud y dificultad de establecimiento no se combina bien con otras gramíneas. Por su menor crecimiento inicial es vulnerable a la competencia de especies más agresivas, como los raigrases, por ello se recomienda mezclarlo únicamente con dactilo, alfalfa o trébol blanco. Presenta un gran número de ecotipos que se adaptan bien a una gran variedad de suelos. Si bien su establecimiento es más lento, está bien adaptada a la sequía y puede sobrevivir en regiones con menos de 400 mm/año de precipitación y prosperar en suelos secos calcáreos. Entre las gramíneas de larga duración es la más temprana en iniciar el crecimiento primaveral, produce en verano, rebrota en otoño y dilata su ciclo hasta bien iniciado el invierno. En utilización forrajera presenta el inconveniente de una menor palatabilidad, ya que el ganado selecciona otras especies más apetecibles, produciéndose un efecto de rechazo que perjudica el rebrote de la pradera tras el pastoreo. A pesar de tolerar bien el pisoteo del ganado, su manejo pastoral es complicado, dada su tendencia a formar macollas. No se aconseja mezclarla con gramíneas más palatables si se desea realizar una explotación en régimen exclusivo de pastoreo. Debido a su rápido rebrote y a su pérdida de digestibilidad en el espigado, se recomiendan aprovechamientos intensivos y frecuentes que mantengan la planta joven.

Al igual que en el caso del raigrás inglés, se ha encontrado que algunas líneas hospedan hongos endofitos que pueden proporcionar ventajas adaptativas pero que también pueden producir micotoxinas. Algunos de estos efectos en el ganado incluyen una disminución de la ganancia de peso y problemas reproductivos. Este conjunto de síntomas se denomina «festucosis» por haberse detectado primero en ganado pastando plantas de festuca infectadas por hongos endofitos (Oliveira *et al.*, 2002b). Diversos estudios en poblaciones de festucas

recolectadas en la Cordillera Cantábrica, mostraron unos porcentajes de infección moderados de en torno al 50% (Oliveira *et al.*, 2000). Además de la utilización forrajera, el segundo principal uso de la festuca alta es para la formación de céspedes en combinación con otras especies, ya que su capacidad de tolerar la sequía hace que se mantenga un césped verde en condiciones hídricas limitantes.

Además de estos usos tradicionales, los cultivares de festuca alta, dada su variabilidad morfológica y amplitud del periodo de espigado, son poseedores de una gran diversidad genética que proporciona muchas posibilidades para otros usos no forrajeros u ornamentales como son la extensificación, diversificación y protección del medio ambiente. Algunos de estas aplicaciones son la estabilización de taludes en autopistas, vías férreas, cauces hidráulicos, la implantación de cubiertas vegetales, la cubrición de vertederos y bocas de mina, la revegetación de espacios naturales deteriorados, etc.

1.3.4. Utilización agronómica de híbridos interespecíficos e intergenéricos

Los híbridos entre raigrás inglés y raigrás italiano se encuentran de forma espontánea en la naturaleza cuando ambas especies conviven, presentando características intermedias, a veces no muy bien definidas, pues dependen de la combinación de los caracteres parentales. Se han creado algunas variedades de raigrás híbrido que reúnen la persistencia y densidad del raigrás inglés con los buenos crecimientos y palatabilidad del raigrás italiano. Dependiendo del tipo de combinación existen diferencias varietales, encontrándose cultivares más bianuales y otros más perennes, en función de los retrocruces realizados. Al igual que en el caso de los raigrases anuales y perennes, los hay diploides y tetraploides. Su precocidad es también intermedia, con una producción de primer año superior a la del raigrás inglés, e inferior a la de los raigrases anuales. Los raigrases híbridos tienen un menor rendimiento invernal que el raigrás italiano, en Galicia, si se siembran en las fechas habituales, después de recoger el maíz, y a menos que las condiciones climáticas sean excepcionales para el crecimiento vegetativo, (temperaturas suaves y

pluviometría moderada) no ofrecerá aprovechamiento hasta el mes de marzo, época en la que puede ser ensilado con ciertas garantías (Vidal Galego *et al.*, 2009).

Los híbridos de *Festuca* y *Lolium* tienen interés agrícola al combinar las características de ambos géneros. Los mejoradores han combinado la mayor persistencia y tolerancia de las festucas con los buenos caracteres de palatabilidad, digestibilidad y rapidez de establecimiento de los raigrases (Thomas y Humphreys, 1991). En su estado natural estos híbridos son estériles, por lo que los programas de mejora han estado dirigidos a eliminar la esterilidad. Los híbridos más utilizados son tetraploides derivados de *L. multiflorum* (4x) x *F. pratensis* (4x), los cuales son perennes y presentan buenos rendimientos en mezcla con raigrás italiano para utilización en praderas (Kopecký *et al.*, 2006). Otro grupo de híbridos incluyen cultivares creados a partir de *L. multiflorum* (2x) x *F. arundinacea* (6x). La F1 resultante es tetraploide y se retrocruza en programas de mejora con los parentales para la obtención de nuevas variedades. En el caso de retrocruces con *F. arundinacea* el resultado son plantas semejantes a ésta y dan lugar a variedades más productivas y de mejores características de digestibilidad que la festuca, pudiendo ser utilizados tanto en praderas en mezcla con otras gramíneas o tréboles, como en recuperación de espacios degradados, soportando muy bien el encharcamiento (Buckner *et al.*, 1977; Fojtík, 1994). Los retrocruces con *L. multiflorum* son utilizados principalmente para ensilado por su gran capacidad de rebrote y altos rendimientos (Fojtík, 1994).

Los objetivos de este trabajo fueron:

- 1) El estudio de la diversidad genética de las tres colecciones de raigrás inglés, raigrás italiano y festuca alta conservadas en el CIAM mediante el estudio de caracteres agronómicos durante dos años de evaluación.
- 2) La clasificación de este material genético en grupos de valor agronómico similar para aprovechamiento en posibles programas de mejora utilizando material vegetal autóctono.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. DISEÑO DE CAMPO

Entre los años 1985 y 1997 se recolectaron en forma de semilla una serie de poblaciones naturales de *Lolium perenne* L., *Lolium multiflorum* Lam., y *Festuca arundinacea* Schreb., en diversas localidades de España, principalmente en la mitad norte. Esta colección se conserva actualmente en el banco de germoplasma de gramíneas pratenses del CIAM, y ya ha sido objeto de varios estudios (Oliveira *et al.*, 1997a; 1997b; López y Oliveira, 2000a; 2000b; López y Oliveira, 2001). Una vez realizada la evaluación de la viabilidad de la semilla, se seleccionaron 74 poblaciones de raigrás inglés, 42 de raigrás italiano y 24 de festuca alta.

Las semillas seleccionadas 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, posteriormente se sembraron en condiciones de invernadero en bandejas de alvéolos independientes. Finalmente al cabo de 10 semanas de crecimiento se transplantaron al campo.

En la **Figura 1** se muestra un detalle de los campos de ensayo. La distribución geográfica del material seleccionado para el estudio agronómico se representa en la **Figura 2**. Los datos de pasaporte de las poblaciones se muestran en las **Tablas 1, 2 y 3**.



Figura 1. Detalle de los campos de ensayo de plantas aisladas. *Superior izquierda:* raigrás italiano. *Inferior izquierda:* raigrás inglés. *Superior derecha:* detalle del control de malas hierbas y detalle de la implatación de los ensayos.

Diseño en bloques completos al azar con dos repeticiones y 10 plantas por bloque. En las especies perennes (raigrás inglés y festuca alta) se mantuvieron las plantas durante los dos años de evaluación. El ensayo de raigrás italiano se repitió por completo el segundo año de evaluación utilizando plantas nuevas.



Leyenda de colores:

- *Festuca arundinacea* (24)
- *Lolium multiflorum* (42)
- *Lolium perenne* (74)

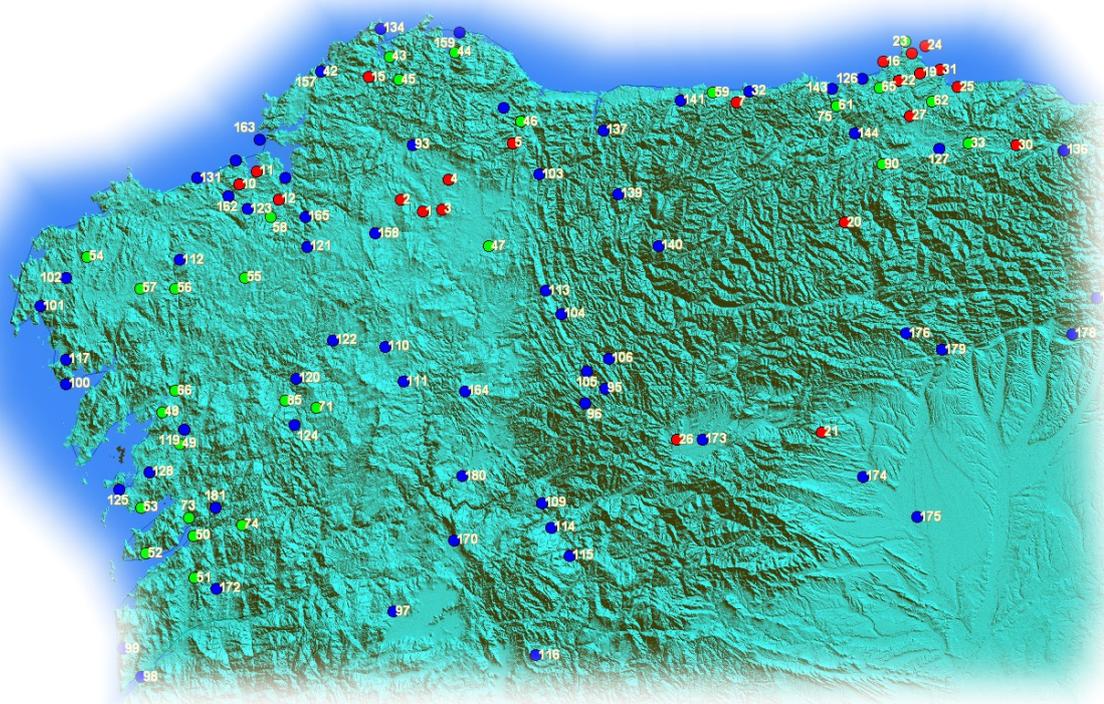


Figura 2. Distribución de las 140 accesiones de raigrás inglés, raigrás italiano y festuca alta estudiadas en este trabajo. En la parte inferior se muestra un detalle de las poblaciones recolectadas en el norte de España, que es donde se concentra la mayor parte del muestreo.

Tabla 1. Datos de pasaporte de las 74 poblaciones evaluadas de *L. perenne*. **Fec. Rec.:** fecha de recolección; **Lat:** latitud; **Long:** longitud.

Codigo	Población	Fec. Rec.	Provincia	Lat	Long	Altitud
93	ROUPAR	01/07/1985	Lugo	43°25' N	7°45' O	520
95	PIEDRAFITA	01/07/1985	Lugo	42°43' N	7°02' O	1050
96	CEBREROS	01/07/1985	Lugo	42°43' N	7°03' O	1150
97	LAMPAZA	01/07/1985	Ourense	42°06' N	7°51' O	670
98	SMIGUELDETABAGON	01/07/1985	Pontevedra	41°55' N	8°48' O	20
99	SANTAMARIADEOYA	01/07/1985	Pontevedra	42°00' N	8°52' O	30
100	LOURO	01/07/1985	A Coruña	42°45' N	9°05' O	40
101	LOBELOS	01/07/1985	A Coruña	42°58' N	9°11' O	90
102	BERDOYAS	01/07/1985	A Coruña	43°03' N	9°05' O	240
103	VALVERDERIOTORTO	01/07/1985	Lugo	43°20' N	7°16' O	180
104	AIREJE	01/07/1985	Lugo	42°58' N	7°14' O	700
105	DONCOS	01/07/1985	Lugo	42°46' N	7°06' O	660
106	NOCEDA	01/07/1985	Lugo	42°45' N	7°04' O	800
109	SANFITORIO	01/07/1985	Ourense	42°24' N	7°17' O	925
110	RUMIN	01/07/1985	Lugo	42°51' N	7°52' O	550
111	BALBOA	01/07/1985	Lugo	42°45' N	7°48' O	620
112	ANGERIZ	01/07/1985	A Coruña	43°06' N	8°39' O	420
113	FONTEO	01/07/1985	Lugo	43°00' N	7°15' O	550
114	PUEBLADETRIVES	01/07/1985	Ourense	42°20' N	7°15' O	750
115	SANMIGUEL	01/07/1985	Ourense	42°15' N	7°11' O	880
116	ATREPA	01/07/1985	Ourense	41°58' N	7°19' O	870
117	CARNOTA	01/07/1985	A Coruña	42°49' N	9°05' O	10
119	CALDASDEREIS	01/07/1986	Pontevedra	42°37' N	8°38' O	30
120	SILLEDALP	01/07/1986	Pontevedra	42°42' N	8°14' O	500
121	COIROAREGUEIRA	01/07/1986	A Coruña	43°11' N	8°10' O	240
122	BORRAXEIOS	01/07/1986	A Coruña	42°52' N	8°04' O	540
123	CERCEDA	01/07/1986	A Coruña	43°17' N	8°22' O	30
124	LAROLP	01/07/1986	Pontevedra	42°38' N	8°13' O	500
125	LALANZADAplaya	01/07/1995	Pontevedra	42°27' N	8°53' O	1580
126	AVILES	01/07/1986	Oviedo	43°34' N	5°54' O	20
127	MARCENADO	01/07/1986	Oviedo	43°23' N	5°38' O	200
128	RIBADUMIA	01/07/1990	Pontevedra	42°30' N	8°46' O	30
131	SANANTON	01/07/1990	A Coruña	43°21' N	8°27' O	30
132	LATORRE	01/07/1990	A Coruña	43°24' N	8°27' O	30
133	RIAZOR	01/07/1995	A Coruña	43°22' N	8°22' O	30
134	CARIÑO	01/07/1991	A Coruña	43°45' N	7°52' O	40
135	FERREIRA	01/07/1991	Lugo	43°31' N	7°24' O	50
136	SOTODEDUENAS	01/07/1990	Oviedo	43°21' N	5°15' O	100
137	VEGADEO	01/07/1990	Oviedo	43°27' N	7°01' O	70
139	SANMARTINDEOSCOS	01/07/1990	Oviedo	43°16' N	6°58' O	760
140	BOAL	01/07/1990	Oviedo	43°07' N	6°49' O	480
141	NAVIA	01/07/1990	Oviedo	43°32' N	6°43' O	20
142	BUSTOLP	01/07/1990	Oviedo	43°33' N	6°27' O	60
143	CUDILLERO	01/07/1990	Oviedo	43°33' N	6°08' O	60
144	SANDICHEGRADO	01/07/1990	Oviedo	43°25' N	6°03' O	60
147	LIANDRES	01/07/1990	Santander	43°23' N	4°15' O	40
149	SAMANO	01/07/1990	Santander	43°21' N	3°06' O	40
155	IGUELDO	01/07/1990	Guipuzcoa	43°18' N	2°02' O	300
157	PANTINLP	01/07/1990	A Coruña	43°38' N	8°06' O	20
158	TRASPARGA	01/07/1991	Lugo	43°10' N	7°54' O	440
159	VIVERO	01/07/1990	Lugo	43°40' N	7°35' O	20
162	VENTORRILLO	01/07/1995	A Coruña	43°21' N	8°25' O	30

Código	Población	Fec. Rec.	Provincia	Lat	Long	Altitud
163	RONDADENELLE	01/07/1995	A Coruña	43°21' N	8°24' O	30
164	PACIOS	01/07/1991	Lugo	42°43' N	7°34' O	600
165	OZADELOSRIOS	01/07/1991	A Coruña	43°13' N	8°10' O	180
168	LASVIBORAS	01/07/1992	Granada	37°07' N	3°27' O	1600
169	ALGAIDA	01/07/1992	Baleares	39°34' N	2°53' W	200
170	RODICIO	01/07/1995	Ourense	42°18' N	7°37' O	950
172	PONTEAREAS	01/08/1996	Pontevedra	42°10' N	8°31' W	100
173	PONFERRADALP	01/08/1996	Leon	42°34' N	6°40' W	400
174	ASTORGA	01/08/1996	Leon	42°27' N	6°04' W	600
175	LA BAÑEZA	01/08/1996	Leon	42°20' N	5°52' W	760
176	BARRIOSDELUNA	01/08/1996	Leon	42°51' N	5°53' W	1050
177	SALAMON	01/08/1996	Leon	42°56' N	5°09' W	1050
178	FELECHAS	01/08/1996	Leon	42°50' N	5°15' W	1250
179	LAMAGDALENA	01/08/1996	Leon	42°48' N	5°45' W	1150
180	CANABAL	01/08/1996	Lugo	42°29' N	7°35' W	400
181	TOURON	01/08/1996	Pontevedra	42°24' N	8°31' W	500
182	LAJUNQUERAMURCIA	01/07/1991	Murcia	38°00' N	1°40' O	1000
183	SEGOVIA	01/06/1975	Segovia	41°00' N	4°00' W	1097
184	JACA	01/08/1997	Huesca	42°36' N	0°33' W	700
185	SEODEURGELL	01/08/1997	Lerida	42°21' N	1°49' W	700
186	ARGELAGUER	01/08/1997	Gerona	42°13' N	2°38' W	150
187	VITORIA	01/08/1997	Alava	42°49' N	2°48' W	500
Cultivares comerciales						
188	'Cropper'					
189	'Talbot'					
190	'Vigor'					
191	'Arion'					
192	'Brigantia'					
193	'Ciam1'					

Tabla 2. Datos de pasaporte de las 42 poblaciones evaluadas de *L. multiflorum*. **Fec. Rec.:** fecha de recolección; **Lat:** latitud; **Long:** longitud.

Código	Población	Fec. Rec.	Provincia	Lat	Long	Altitud
32	BUSTOLM	01/06/1990	Oviedo	43°33' N	6°27' O	60
33	POLADESIERO	01/06/1990	Oviedo	43°23' N	5°37' O	250
34	LANUEVA	01/06/1990	Oviedo	43°26' N	4°56' O	100
35	UNQUERALM	01/06/1990	Santander	43°24' N	4°32' O	80
36	COMILLAS	01/06/1990	Santander	43°23' N	4°17' O	20
37	SOLARES	01/06/1990	Santander	43°23' N	3°44' O	70
38	HERAS	01/06/1990	Santander	43°24' N	3°46' O	30
39	LEKEITIO	01/06/1990	Guipúzcoa	43°22' N	2°29' O	30
40	IZIAR	01/06/1990	Guipúzcoa	43°17' N	2°20' O	40
41	AYA	01/06/1990	Guipúzcoa	43°14' N	2°10' O	300
42	PANTINLM	01/06/1990	A Coruña	43°38' N	8°06' O	100
43	ORTIGUEIRA1LM	01/06/1990	A Coruña	43°40' N	7°50' O	20
44	VIVEIRO	01/06/1991	Lugo	43°41' N	7°35' O	10
45	ORTIGUEIRA2LM	01/06/1991	A Coruña	43°40' N	7°51' O	20
46	CAZALGA	01/06/1991	Lugo	43°29' N	7°20' O	100
47	CASTRO	01/06/1991	Lugo	43°08' N	7°28' O	400
48	CORDEIRO	01/06/1993	Pontevedra	42°40' N	8°43' O	20
49	PORTAS	01/06/1993	Pontevedra	42°35' N	8°39' O	40
50	REDONDELA	01/06/1993	Pontevedra	42°19' N	8°36' O	100
51	MOS	01/06/1993	Pontevedra	42°12' N	8°36' O	80
52	CANGASDEMORRAZO	01/06/1993	Pontevedra	42°16' N	8°47' O	20

Código	Población	Fec. Rec.	Provincia	Lat	Long	Altitud
53	SANJENJO	01/06/1993	Pontevedra	42°24' N	8°48' O	20
54	VIMIANZO	01/06/1993	A Coruña	43°04' N	9°02' O	140
55	ORDENES	01/06/1993	A Coruña	43°03' N	8°24' O	260
56	RIAL	01/06/1993	A Coruña	43°01' N	8°40' O	220
57	SANTACOMBALM	01/06/1993	A Coruña	43°01' N	8°48' O	380
58	ABEGONDO	01/06/1993	A Coruña	43°13' N	8°18' O	175
59	LUARCA	01/06/1993	Oviedo	43°32' N	6°32' O	60
61	PRAVIA1	01/06/1993	Oviedo	43°30' N	6°07' O	40
62	PRENDES	01/06/1993	Oviedo	43°34' N	5°45' O	140
63	BAÑUGUES	01/06/1991	Oviedo	43°38' N	5°49' O	20
65	CANDAS	01/06/1991	Oviedo	43°35' N	5°48' O	90
66	PADRON1	01/06/1991	A Coruña	42°44' N	8°40' O	20
71	FILGUEIRA	01/06/1991	Pontevedra	42°41' N	8°08' O	590
73	CANICOUVA2	01/06/1991	Pontevedra	42°22' N	8°37' O	180
74	BERDUCIDO	01/06/1991	Pontevedra	42°21' N	8°25' O	470
75	PRAVIA2	01/06/1991	Oviedo	43°30' N	6°07' O	40
85	SILLEDALM	01/06/1986	Pontevedra	42°42' N	8°15' O	500
86	SAUZAL	01/05/1995	Sta.Cruz Tenerife	28°28' N	16°26' O	320
88	LAVEGA	01/05/1995	Sta.Cruz Tenerife	28°03' N	17°12' O	60
90	GODOS	01/06/1990	Oviedo	43°20' N	5°57' O	280
91	RIGORTIA	01/06/1990	Vizcaya	43°19' N	2°44' O	60
Cultivares comerciales						
197	'Vallicoportugal'					
198	'Vitesse'					
199	'FinulNinak'					
200	'Exalta'					
201	'Promenade'					

Tabla 3. Datos de pasaporte de las 24 poblaciones evaluadas de *F. arundinacea*. **Fec. Rec.:** fecha de recolección; **Lat:** latitud; **Long:** longitud.

Código	Población	Fec. Rec.	Provincia	Lat	Long	Altitud
1	INSUA	01/07/1993	Lugo	43°14' N	7°43' O	300
2	TORRE1	01/07/1993	Lugo	43°15' N	7°43' O	380
3	TORRE2	01/07/1993	Lugo	43°15' N	7°43' O	380
4	GOIRIZ	01/07/1993	Lugo	43°19' N	7°37' O	475
5	MONDOÑEDO	01/07/1993	Lugo	43°25' N	7°22' O	70
7	BARCIA	01/07/1993	Oviedo	43°31' N	6°30' O	100
10	INESPAL	01/07/1993	A Coruna	43°21' N	8°25' O	75
11	MERA	01/07/1993	A Coruna	43°22' N	8°21' O	75
12	CECEBRE	01/07/1993	A Coruna	43°16' N	8°16' O	100
14	UNQUERA	01/06/1986	Santander	43°22' N	4°31' O	20
15	ORTIGUEIRACFA	01/06/1986	A Coruna	43°39' N	7°52' O	20
16	AVILES	01/06/1986	Oviedo	43°37' N	5°56' O	20
18	BOLTAÑA	01/08/1997	Huesca	42°26' N	0°04' O	550
19	REGUERAL	01/08/1997	Oviedo	43°34' N	5°47' O	90
20	QUIROS	01/08/1997	Oviedo	43°10' N	6°06' O	800
21	MANZANAL	01/08/1997	León	42°35' N	6°13' O	1225
22	PEVIDAL	01/08/1997	Oviedo	43°35' N	5°47' O	60
23	ANTROMERO	01/08/1997	Oviedo	43°36' N	5°48' O	50
24	SALINES	01/08/1997	Oviedo	43°37' N	5°48' O	100
25	CAMPADETORRES	01/08/1997	Oviedo	43°34' N	5°42' O	200
26	PONFERRADA	01/08/1997	León	42°34' N	6°46' O	400
27	PIEDELORO	01/08/1997	Oviedo	43°33' N	5°48' O	150

Código	Población	Fec. Rec.	Provincia	Lat	Long	Altitud
30	NAVA	01/08/1997	Oviedo	43°22' N	5°26' O	175
31	PERAN	01/08/1997	Oviedo	43°35' N	5°44' O	20
Cultivares comerciales						
194	'Tima'					
195	'Mariskasba'					
196	'Fawn'					

En la primavera del año 1998 comenzó el establecimiento del ensayo, transplantando al campo 20 plantas aisladas de cada población. Se establecieron tres campos de ensayo independientes: uno de raigrás inglés, en el que se evaluaron 74 poblaciones, otro de raigrás italiano, en el que se evaluaron 42 poblaciones, y un tercer ensayo de festuca alta, en el que se evaluaron 24 poblaciones. Como abono se aplicaron 800 kg/ha de 8:15:15 y previamente se aplicaron 1.500 kg/ha de cal a la superficie del ensayo (90% CaCO₃, 45% CaO). El diseño experimental consistió en bloques completos al azar con dos repeticiones, transplantando 10 plantas por población y bloque con 50 cm de separación entre cada línea y planta. El control pre-emergente de malas hierbas se efectuó con herbicida GOAL al 3% y el desarrollo estacional de malas hierbas se controló con ROUNDUP al 3%, protegiendo las plantas individuales con cubos para evitar el contacto con el herbicida (**Figura 1**) Se instaló una barrera externa de raigrás inglés 'Brigantia' y se cerraron los campos con malla protectora de plástico para evitar la entrada de herbívoros. En todos los ensayos se incluyeron cultivares comerciales como testigos: seis en *L. perenne* ('Arion', 'Brigantia', 'Cropper', 'Talbot', 'Vigor' y la variedad experimental 'CiamI'), cinco en *L. multiflorum* ('Exalta', 'Finul', 'Promenade', 'Vallico' y 'Vitesse'), y tres en *F. arundinacea* ('Fawn', 'Tima' y 'Mariskasba'). Durante dos años consecutivos se midieron independientemente en cada ensayo las variables agronómicas detalladas en la **Tabla 4**. Posteriormente a cada anotación de crecimiento (*cri*, *crp*, *cre*, *crv*) se hizo un corte con motosegadora a 5 cm del suelo. En las variables de crecimiento se utilizó una escala de 1 a 5. Posteriormente a cada anotación se cortaron 30 plantas (seis de cada valor de la escala) y se pesó su materia seca. Con estos datos se calculó una ecuación de regresión con objeto de saber el valor cuantitativo en g de materia seca para cada

uno de los valores de la escala. Se aplicó la misma técnica estadística para la variable *fes* pero contando el número de espigas en cada planta en escala de 1 a 7.

En el otoño de 1998 se repusieron aquellas plantas de las dos especies perennes (*L. perenne* y *F. arundinacea*) que durante ese año se habían perdido por diferentes causas, se utilizaron plantas de la misma población para cubrir los huecos vacíos con objeto de que hicieran competencia a las plantas vecinas y no interferir así en la evaluación del siguiente año. Estas nuevas plantas no fueron tenidas en cuenta en las medias ni en los análisis.

Tabla 4. Variables agronómicas utilizadas en la caracterización de las colecciones de *L. perenne*, *L. multiflorum* y *F. arundinacea*. Los puntos indican las variables que han sido consideradas en cada especie. **fes:** fecha espigado (número de días a partir del uno de enero); **cri, crp, cre, crv:** crecimientos en invierno, primavera, en espigado y en verano (g de materia seca por planta individual); **alp:** altura de la planta en espigado (altura total en cm); **ain:** nº inflorescencias (nº de espigas por planta individual); **res:** reespigado (0 = no reespiga, 1 = reespiga); **lhb** y **ahb:** longitud y anchura máximas de la hoja bandera (medidas en cm y en mm, respectivamente); **enf:** tolerancia a enfermedades (medido en escala desde 1 = sensible, hasta 5 = tolerante); **hcr:** hábito de crecimiento (medido en escala desde 1 = porte rastrero, hasta 5= porte erecto); **alt:** alternatividad (0 = no alternativa, 1 = alternativa).

	Variable agronómica												
	<i>fes</i>	<i>cri</i>	<i>crp</i>	<i>cre</i>	<i>crv</i>	<i>alp</i>	<i>ain</i>	<i>res</i>	<i>lhb</i>	<i>ahb</i>	<i>enf</i>	<i>hcr</i>	<i>alt</i>
<i>L. perenne</i>	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	
<i>L. multiflorum</i>	•		•	•	•	•	•		•	•	•	•	
<i>F. arundinacea</i>	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•

2.2. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para cada accesión se calculó la diversidad como la media del índice *H* de Shannon-Weaver en cada variable según la expresión, (Shannon y Weaver, 1963).

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

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 (Jain *et al.*, 1975; Bekele y Bekele, 1996; Bisht *et al.*, 1999; Polignano *et al.*, 1999; Grenier *et al.*, 2000a; 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):

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

Los datos medios de las poblaciones se emplearon en ANOVA y en métodos estadísticos multivariantes (análisis de componentes principales, clasificación ascendente jerárquica), con el fin de identificar grupos de valor agronómico similar. Debido al carácter anual del raigrás italiano, el ensayo se repitió completamente en el segundo año, mientras que en raigrás inglés y festuca alta 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 festuca alta:

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

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, $(\alpha\gamma)_{ik}$ es la interacción entre año y población, γ_k es el efecto de la población, $\beta(\alpha)_{ij}$ es el efecto del bloque

jerarquizado a año, y finalmente ε_{ijkl} es el error. Las variables cualitativas *enf* y *hcr* se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Breslow, 1970). Todos los datos se analizaron mediante el paquete estadístico 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.

3. RESULTADOS

En conjunto las poblaciones resultaron muy variables, las variedades comerciales se comportaron más uniformemente. Los índices de diversidad medios fueron muy similares en las colecciones de raigrás inglés e italiano (2,25 y 2,24 respectivamente). La colección de festuca fue la menos diversa con un valor medio de 2,17.

3.1. RAIGRÁS INGLÉS

En la **Tabla 5** se muestran los datos medios de caracterización de las variables estudiadas en los dos años de ensayo. Las poblaciones en conjunto mostraron una mayor variabilidad agromorfológica que las variedades comerciales usadas como testigo. Algunas poblaciones mostraron un mejor comportamiento agronómico que las variedades comerciales. El 56% de las poblaciones tuvieron mayores crecimientos que la media de las variedades. Las poblaciones en conjunto fueron más productivas que los cultivares estudiados, y no se diferenciaron mucho en cuanto a la altura media, longitud y anchura de la hoja bandera. En general las poblaciones fueron más tolerantes a enfermedades de hoja y tuvieron más capacidad de producción de espigas. Las más productivas fueron las provenientes de A Coruña, Pontevedra, Lugo y Asturias. La variedad experimental 'CiamI', creada a partir de ecotipos locales, fue el testigo que tuvo un mejor comportamiento agronómico, seguido de la variedad comercial 'Brigantia', también originada a partir de ecotipos gallegos. Mediante la variable fecha de espigado (*fes*) se dividieron las poblaciones en dos grupos de precocidad: 1) precoz (fecha de espigado anterior al 15 de marzo) y 2) tardío (posterior al 15 de marzo). Las medias de cada grupo se muestran en la **Tabla 6**. Las poblaciones del grupo tardío fueron más productivas que las del grupo precoz, no diferenciándose mucho en los caracteres morfológicos estudiados (altura, longitud y anchura de la hoja bandera, hábito de crecimiento). Las poblaciones del grupo precoz tuvieron un mejor comportamiento agronómico que los cultivares precoces, mientras que en el grupo tardío no hubo prácticamente diferencias entre poblaciones y cultivares.

Tabla 5. Medias de los dos años de evaluación de las variables agronómicas utilizadas en la caracterización de la colección de *L. perenne*; **crt:** crecimiento total (**cri** + **crp** + **cre**). **H:** índice de diversidad medio de Shanon-Weaver; **prec:** grupo de precocidad asignado en función de la fecha de espigado; **clu:** grupo de pertenencia después de aplicar la clasificación ascendente jerárquica. El resto de variables están explicadas en la **Tabla 4.**

COD	fes	cri	crp	cre	crt	alp	res	enf	lhb	ahb	ain	hcr	H	prec	clu
93	146,78	14,36	33,58	86,22	134,16	74,84	0,15	3,30	13,07	4,75	140,14	2,33	2,11	2	5
95	136,08	19,56	45,78	157,81	223,15	90,23	0,00	2,36	13,60	4,77	86,38	3,63	2,22	2	2
96	131,43	12,80	25,42	104,65	142,87	87,58	0,30	3,24	14,32	5,03	126,84	3,33	2,29	1	2
97	142,49	16,88	41,88	161,45	220,21	81,09	0,16	3,51	12,83	4,79	133,33	3,33	2,17	2	6
98	147,83	31,19	68,28	216,99	316,47	82,61	0,84	4,59	13,84	5,20	155,61	2,72	2,14	2	9
99	137,22	16,96	63,12	198,03	278,11	89,71	0,50	3,72	15,37	5,13	96,67	2,88	2,49	2	4
100	136,62	16,16	35,01	111,17	162,34	86,38	0,63	3,95	15,57	4,53	166,01	2,91	2,36	2	6
101	150,23	19,14	34,18	127,71	181,02	66,37	0,24	2,86	14,05	4,92	71,39	2,55	1,99	2	8
102	151,30	25,39	56,29	167,87	249,55	74,62	0,10	4,14	11,64	4,30	104,78	2,53	2,23	2	5
103	132,93	17,88	49,20	146,08	213,17	99,65	0,79	4,18	13,56	5,08	124,04	3,58	2,22	1	6
104	134,18	13,35	38,35	156,48	208,18	99,37	0,25	2,55	19,48	6,35	92,85	2,33	1,89	1	3
105	134,86	19,62	34,15	131,21	184,98	84,16	0,25	3,45	13,70	4,66	84,72	2,54	2,38	1	4
106	134,51	12,46	24,92	105,54	142,92	82,43	0,10	3,14	14,51	4,57	78,84	3,27	2,42	1	1
109	141,97	15,23	42,49	139,75	197,47	67,05	0,00	3,20	12,18	4,62	109,58	2,32	2,27	2	5
110	144,31	14,46	44,16	163,83	222,44	78,55	0,05	3,47	13,49	4,92	98,65	2,78	2,24	2	4
111	139,12	14,21	34,54	119,96	168,70	83,66	0,16	3,62	16,79	4,85	110,00	3,43	2,29	2	2
112	131,62	13,30	44,80	124,16	182,26	87,29	0,26	3,49	13,51	4,85	90,25	2,73	2,36	1	2
113	139,46	16,92	39,18	145,90	202,01	81,01	0,24	3,83	10,90	4,13	90,32	2,86	2,20	2	5
114	138,33	12,92	37,04	154,42	204,38	91,51	0,00	2,82	13,43	4,70	90,04	3,18	2,09	2	2
115	138,72	12,17	27,53	96,09	135,79	75,47	0,00	3,08	12,63	4,95	102,28	2,88	2,24	2	1
116	135,99	11,08	44,93	124,21	180,22	83,17	0,00	3,80	11,29	4,19	116,97	3,50	2,10	2	7
117	142,73	12,58	33,89	141,98	188,44	76,88	0,32	2,77	12,36	4,44	100,22	3,38	2,33	2	7
119	140,52	22,77	54,13	142,02	218,92	90,94	0,61	3,26	13,42	5,13	115,73	3,53	2,23	2	6
120	145,22	16,62	42,51	186,14	245,27	78,04	0,07	3,74	15,40	6,08	89,08	2,50	2,22	2	4
121	145,18	23,47	42,66	148,66	214,78	70,94	0,16	3,68	11,05	4,12	88,83	2,53	2,50	2	5
122	142,44	17,81	44,69	120,54	183,03	80,50	0,39	3,40	11,75	4,75	123,80	3,06	2,32	2	7
123	138,47	21,67	38,46	109,32	169,45	93,62	1,00	3,97	16,42	6,41	83,40	3,07	2,27	2	3
124	139,71	18,90	64,43	165,65	248,97	89,06	0,53	3,29	11,67	4,58	125,68	3,29	2,19	2	6
125	140,10	16,91	27,34	106,50	150,75	73,95	0,33	3,29	10,64	4,79	148,61	2,58	2,24	2	5
126	112,87	11,72	34,43	124,92	171,07	82,70	0,21	3,06	14,00	5,92	65,92	2,82	2,29	1	1
127	116,45	8,51	27,09	122,88	158,48	88,84	0,23	3,06	15,31	5,34	69,26	3,64	2,41	1	2
128	144,79	29,64	69,27	196,86	295,78	87,71	0,63	4,26	16,27	5,36	123,00	3,00	2,33	2	9
131	137,64	18,28	36,24	124,14	178,67	87,18	0,60	3,70	12,85	4,80	93,30	2,60	2,26	2	4
132	141,72	16,50	36,31	145,47	198,29	76,93	0,15	3,26	10,76	4,22	126,00	3,50	2,30	2	7
133	140,98	23,49	58,01	192,09	273,58	88,09	0,80	4,15	14,70	5,08	122,32	2,38	2,20	2	9
134	147,82	23,57	81,23	315,96	420,76	84,19	0,00	4,09	13,88	6,11	115,23	2,57	2,15	2	9
135	134,96	13,33	41,98	165,66	220,98	94,43	0,00	3,96	14,06	4,81	90,18	3,07	2,15	1	2
136	133,10	16,64	52,41	157,24	226,30	95,84	0,47	3,20	15,08	5,61	109,90	3,82	2,42	1	2
137	132,96	16,90	62,41	221,70	301,01	105,34	0,41	3,65	16,13	5,67	115,23	3,23	2,36	1	6
139	120,51	16,22	42,63	135,06	193,91	91,53	0,26	3,34	18,81	6,58	100,63	2,46	2,53	1	3
140	118,06	12,92	43,51	106,87	163,30	90,77	0,42	3,25	16,25	5,48	103,08	3,06	2,41	1	2
141	130,48	19,51	51,78	152,24	223,54	100,28	0,63	2,96	14,38	5,11	117,90	2,92	2,18	1	2
142	126,32	15,62	31,40	143,09	190,11	88,25	0,00	3,54	18,65	6,96	117,64	3,00	2,27	1	3
143	127,41	16,91	47,75	129,01	193,68	81,90	0,00	3,00	16,60	5,65	105,20	2,58	2,51	1	3
144	137,70	18,33	50,06	152,63	221,02	87,28	0,37	4,19	12,94	5,00	115,64	3,27	2,22	2	6
147	123,14	20,75	43,42	135,68	199,85	85,08	0,05	3,42	16,57	4,95	72,63	2,50	2,51	1	3
149	132,13	20,93	50,34	150,88	222,15	85,65	0,05	3,75	14,03	5,10	104,87	2,63	2,39	1	4
155	118,23	14,34	41,13	173,42	228,89	89,01	0,00	3,10	16,62	5,55	96,95	2,40	2,07	1	3
157	145,50	18,87	45,97	163,58	228,43	73,50	0,45	3,45	12,09	4,50	110,46	2,56	2,05	2	5

COD	fes	cri	crp	cre	crt	alp	res	enf	lhb	ahb	ain	hcr	H	prec	clu
158	131,65	16,49	35,08	180,53	232,10	96,08	0,05	2,96	16,13	5,43	97,97	2,73	2,49	1	3
159	121,58	17,84	42,65	111,49	171,98	91,63	0,35	3,18	15,68	5,31	115,08	2,81	2,49	1	2
162	137,85	23,95	65,47	200,49	289,91	88,97	0,53	3,88	13,51	4,92	134,61	3,36	2,29	2	6
163	141,12	23,34	61,69	188,58	273,61	83,97	0,72	3,98	14,27	5,06	108,30	3,06	2,26	2	9
164	141,67	13,11	42,67	165,74	221,52	90,17	0,05	4,02	14,48	4,82	98,85	3,14	2,09	2	2
165	141,81	17,91	50,35	152,83	221,08	86,68	0,21	3,63	14,49	5,00	88,89	2,64	2,39	2	4
168	132,63	11,40	29,92	166,14	207,47	74,14	0,00	3,63	14,26	4,70	84,76	1,86	1,95	1	8
169	114,63	11,59	22,10	108,71	142,41	76,64	0,08	3,16	13,07	4,72	83,27	3,33	1,92	1	1
170	139,30	17,83	56,35	176,46	250,64	89,66	0,22	3,24	14,71	5,18	105,93	3,15	2,35	2	2
172	144,76	13,22	27,24	150,80	191,27	75,88	0,10	3,60	13,69	5,08	86,94	2,58	2,13	2	4
173	129,35	8,21	25,54	88,32	122,08	82,49	0,06	3,85	12,83	4,32	89,31	3,08	2,11	1	1
174	132,37	7,65	16,91	84,95	109,51	83,33	0,00	3,29	13,53	4,78	98,19	3,56	1,95	1	1
175	146,80	16,22	46,40	193,79	256,41	87,56	0,06	4,23	17,62	5,48	121,18	3,93	2,22	2	6
176	132,49	4,56	13,07	54,30	71,93	65,21	0,00	3,27	12,75	4,50	72,74	3,22	1,97	1	1
177	140,30	19,17	53,34	154,43	226,94	84,08	0,55	3,53	13,76	4,95	123,92	3,78	2,41	2	6
178	126,49	7,55	19,36	65,07	91,99	78,53	0,06	2,95	15,84	5,62	96,56	2,82	2,04	1	1
179	133,62	13,30	37,32	108,52	159,14	96,04	0,19	2,80	14,72	5,52	117,99	3,71	2,19	1	2
180	142,11	13,46	24,65	83,26	121,37	80,12	0,00	3,12	10,05	4,07	95,31	3,31	2,05	2	7
181	141,23	17,97	42,05	135,10	195,12	85,91	0,95	3,61	14,49	6,26	82,08	3,08	2,31	2	3
182	137,99	9,80	24,48	77,96	112,24	65,27	0,00	2,38	12,81	4,55	76,48	2,40	2,27	2	8
183	132,50	11,49	30,00	113,10	154,60	84,53	0,06	3,24	11,55	4,44	91,21	2,65	2,17	1	1
184	132,99	10,30	39,86	147,82	197,98	95,63	0,19	3,13	14,15	4,93	89,19	2,89	2,38	1	2
185	124,94	18,47	42,52	112,56	173,56	89,42	0,16	3,26	16,34	6,22	96,82	3,78	2,52	1	2
186	140,04	5,29	14,55	86,30	106,14	77,00	0,06	2,93	12,49	4,67	108,70	2,50	2,16	2	1
187	132,83	6,39	20,34	70,16	96,90	75,85	0,10	2,32	15,53	5,67	118,35	2,90	2,07	1	1
Varietades comerciales															
‘Cropper’	129,61	16,61	24,95	106,18	147,74	88,01	0,00	3,33	15,67	5,39	104,71	2,35		1	
‘Talbot’	147,09	11,61	33,30	124,18	169,09	81,02	0,00	2,59	16,40	5,47	129,90	3,00		2	
‘Vigor’	169,40	13,22	33,92	126,12	173,26	65,25	0,00	3,26	15,64	5,40	59,38	2,58		2	
‘Arion’	112,31	17,77	30,13	88,06	135,96	80,98	0,00	2,98	14,36	5,09	52,92	2,79		1	
‘Brigantia’	140,13	18,53	48,42	150,89	217,84	91,95	0,32	3,40	13,48	5,17	121,34	2,80		2	
‘CiamI’	147,64	29,25	70,71	218,09	318,05	83,06	0,78	4,05	13,16	4,78	154,73	2,88		2	
Media total	136,28	16,17	41,07	140,76	198,00	84,25	0,25	3,41	14,17	5,09	104,07	2,95			
Media (74 Pobl.)	135,89	16,03	41,14	141,18	198,35	84,46	0,26	3,42	14,12	5,08	104,09	2,97	2,25		
Media (6 Varied.)	141,03	17,83	40,24	135,59	193,66	81,71	0,18	3,27	14,79	5,22	103,83	2,73			

Tabla 6. División por grupos de precocidad de las poblaciones de *Lolium perenne*. Entre paréntesis se muestra el número de poblaciones de cada grupo.

Precocidad	GRUPO	fes	cri	crp	cre	crt	alp	enf	lhb	ahb	hcr	ain
1	Poblaciones (32)	128,38	13,98	37,04	127,92	178,94	87,86	3,28	15,26	5,35	2,99	97,30
	Varietades (2)	120,49	17,21	27,58	96,63	141,42	84,21	3,14	15,00	5,23	2,58	82,80
2	Poblaciones (42)	141,72	17,93	45,37	151,38	214,68	82,01	3,56	13,44	4,89	2,99	110,23
	Varietades (4)	151,52	17,89	46,08	154,81	218,78	81,14	3,34	14,69	5,21	2,81	125,29

Los datos del análisis de varianza se muestran en la **Tabla 7**. El ANOVA para cada variable agronómica mostró diferencias significativas en todos los casos. El test de Kruskal-Wallis también mostró diferencias significativas para las dos variables cualitativas. El efecto año fue significativo 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).

Tabla 7. Cuadrados medios del análisis de varianza y test de Kruskal-Wallis para variables cualitativas en *Lolium perenne*; **FV**: fuente de variación; **GL**: grados de libertad; **Blq**: bloque; **Pobl**: población; **X²**: valor del test chi-cuadrado; *: significativo al nivel 0,05; **: significativo al nivel 0,01.

Nota: en la variable *ain* no hubo anotación durante el primer año.

FV GL	Año 1	Blq 1	Año*Blq 1	Pobl 73	Pobl*Año 73
Cuantitativas					
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**
ahb	248,63**	57,14**	33,53**	5,90**	2,60**
lhb	4580,57**	110,94**	0,02	55,22**	44,29**
ain	---	117,08	---	2,62**	---
alp	379806,14**	755,36	44,64	1696,99**	1076,49**
Cualitativas					
	X²				
enf	314,63**				
hcr	190,18**				

Al resultar significativas las 10 variables, se emplearon todas en un análisis de componentes principales (ACP) sobre la colección total sin considerar los cultivares comerciales. El ACP explicó un 72% de la varianza, con tres componentes extraídas de autovalor mayor que 1. En la **Tabla 8** 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 (*ahb* y *lhb*), altura de la planta (*alp*), y también la fecha de espigado (*fes*). El *Factor 3* se relaciona con las variables hábito de crecimiento (*hcr*) y número de inflorescencias (*ain*). Con la clasificación ascendente jerárquica basada en las componentes se establecieron nueve grupos de poblaciones explicando un 76% de la varianza (**Figura 3**). También se representan las poblaciones en el espacio factorial del ACP, marcadas mediante colores que indican el grupo de la clasificación jerárquica al que pertenecen. Es de destacar el clúster 9, que integra las poblaciones más productivas y de mayor tolerancia a enfermedades, gran número de inflorescencias y buena capacidad de respigado, lo cual resulta interesante para la resiembra de la pradera. Todas las accesiones de este grupo provienen de las provincias de A Coruña y Pontevedra. Las poblaciones menos productivas y con menor tolerancia a enfermedades quedaron agrupadas en el clúster 1, estas poblaciones también se caracterizan por una mayor precocidad y un menor tamaño de hoja, y provienen en su mayoría de zonas más mediterráneas (Ourense, León, Cataluña y Baleares)

Tabla 8. Correlaciones entre las variables agronómicas y las componentes extraídas del análisis de componentes principales en *L. perenne*. Para la descripción de variables ver **Tabla 4.** *% var. acum.*: % de varianza acumulada; *: significativo al nivel 0,05; **: significativo al nivel 0,01.

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

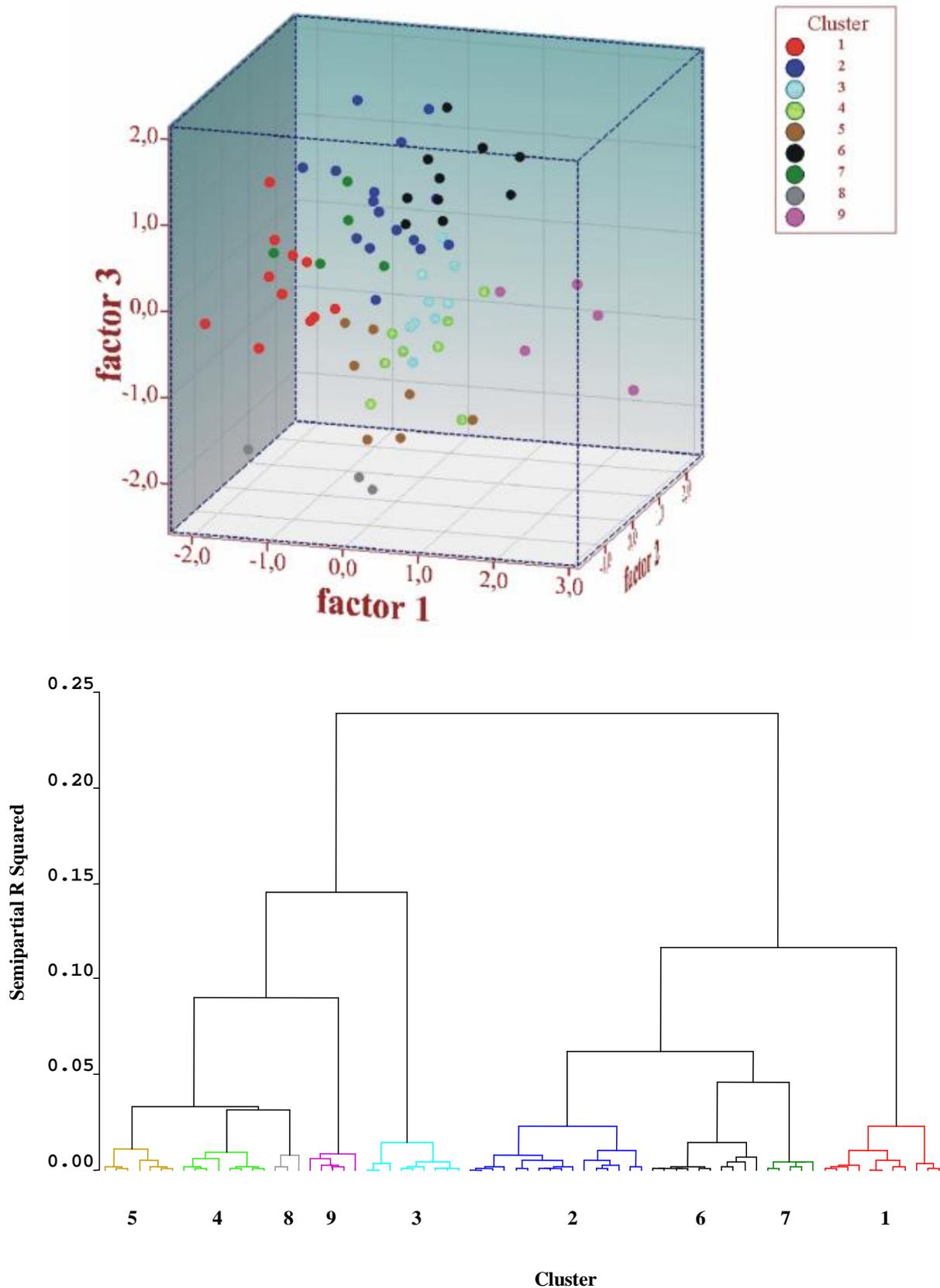


Figura 3. Superior: representación factorial de la clasificación ascendente jerárquica sobre las tres primeras componentes en 74 accesiones de *Lolium perenne*. Los colores representan los conglomerados del análisis clúster. **Inferior:** diagrama de la clasificación ascendente jerárquica, utilizando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

3.2. RAIGRÁS ITALIANO

Las medias de las variables estudiadas se muestran en la **Tabla 9**. En conjunto mostraron una gran variabilidad comparando con los cultivares comerciales. El 20% de las poblaciones tuvieron un mejor comportamiento que la media de las cinco variedades, sin embargo considerando todo el conjunto las variedades tuvieron una mayor producción de materia seca, aunque una menor tolerancia a enfermedades de hoja, principalmente royas. Las poblaciones de mejor comportamiento agronómico nuevamente fueron las que habían sido recolectadas en zonas húmedas, de características similares a la localidad de ensayo. Es de destacar el buen comportamiento de las poblaciones cántabras. La poblaciones del sur de Pontevedra fueron las menos productivas y de menor tamaño. En cuanto a los grupos de precocidad, se dividió la colección en dos grupos: 1) precoz: fecha de espigado anterior al 20 de marzo, y 2) tardío: fecha de espigado posterior al 20 de marzo). La división por precocidad originó dos grupos de 17 y 25 accesiones respectivamente para las precocidades 1 y 2.

Tabla 9. Medias de los dos años de evaluación de las variables agronómicas utilizadas en la caracterización de la colección de *L. multiflorum*; **crt**: crecimiento total (**crp** + **cre** + **crv**), **H**: índice de diversidad medio de Shannon-Weaver; **prec**: grupo de precocidad asignado en función de la fecha de espigado; **clu**: grupo de pertenencia después de aplicar la clasificación ascendente jerárquica. El resto de variables están explicadas en la **Tabla 4**.

COD	fes	crp	cre	crv	crt	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr	H	prec	clu
32	103,85	13,08	41,83	0,00	54,91	7,58	14,90	71,65	58,89	3,07	3,08	2,33	1	1
33	127,98	21,71	72,83	26,54	121,08	7,95	19,06	77,83	102,29	2,78	3,22	2,29	2	2
34	117,75	13,06	69,08	23,37	105,51	7,28	16,31	82,57	90,98	3,45	3,33	2,20	2	3
35	135,90	9,38	76,64	27,28	113,30	8,18	19,44	73,20	109,99	3,87	3,23	2,15	2	3
36	132,42	24,61	110,97	43,39	178,97	8,07	20,12	96,03	112,64	3,75	2,94	2,13	2	2
37	133,78	44,81	161,95	55,03	261,79	8,57	23,22	128,22	106,42	3,65	2,92	2,27	2	2
38	134,03	36,65	137,68	60,69	235,02	8,58	22,04	83,33	114,91	3,78	3,74	2,28	2	3
39	136,79	14,26	104,46	48,73	167,45	7,58	20,21	84,04	101,39	3,62	3,15	2,21	2	3
40	129,70	14,84	92,59	25,16	132,59	6,90	17,08	81,75	92,10	3,81	2,61	2,34	2	5
41	132,60	16,77	80,57	24,51	121,85	7,61	21,51	66,77	102,64	3,40	3,58	2,07	2	3
42	132,74	25,68	98,45	36,42	160,55	8,06	18,90	86,86	103,72	3,19	2,69	2,31	2	2
43	133,06	35,44	109,10	41,16	185,70	8,29	20,23	105,61	115,81	3,32	2,99	2,21	2	2
44	134,84	14,10	71,44	21,15	106,69	7,63	19,72	67,66	90,20	3,19	2,45	2,35	2	5
45	132,61	27,32	95,55	29,27	152,14	7,81	18,48	91,08	105,61	3,85	2,81	2,22	2	2
46	132,49	17,05	81,09	22,12	120,26	7,26	17,53	75,07	95,29	3,67	2,58	2,28	2	5
47	134,90	29,65	127,05	33,88	190,58	11,20	28,08	71,72	120,80	3,78	3,92	2,28	2	3
48	75,29	23,64	27,61	0,00	51,25	6,86	12,14	56,59	53,07	3,03	2,93	2,37	1	1
49	81,32	8,23	22,00	0,00	30,23	6,82	13,27	48,85	51,67	2,95	3,13	2,30	1	1
50	74,63	7,80	18,99	0,00	26,79	7,02	11,81	37,64	55,38	2,79	3,58	2,19	1	1
51	83,54	30,17	42,07	0,00	72,24	8,61	14,91	64,77	69,43	2,94	3,17	2,36	1	6

COD	fes	crp	cre	crv	crt	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr	H	prec	clu
52	81,34	9,81	19,44	0,00	29,25	7,08	11,78	57,97	55,76	3,40	3,06	2,22	1	1
53	79,59	16,95	29,04	0,00	45,99	7,82	12,97	57,26	57,12	3,19	2,97	2,32	1	1
54	88,74	19,41	34,13	0,00	53,54	7,90	14,41	65,97	57,34	3,22	2,76	2,44	1	1
55	112,90	17,32	92,03	35,06	144,41	8,36	18,06	80,79	82,72	3,40	3,18	2,51	2	3
56	120,26	12,77	56,12	19,77	88,66	7,49	16,35	54,46	105,20	2,93	3,01	2,08	2	1
57	125,91	28,12	105,25	28,24	161,61	8,16	19,31	66,25	111,48	3,68	3,30	2,32	2	3
58	97,58	19,09	37,07	0,00	56,16	6,81	13,05	68,94	61,60	3,00	3,14	2,32	1	1
59	97,06	15,94	36,89	0,00	52,83	8,59	15,52	70,93	58,29	3,16	2,80	2,21	1	1
61	95,83	17,14	37,50	0,00	54,64	7,68	14,71	74,79	54,78	3,66	2,66	2,07	1	1
62	97,47	12,71	27,16	0,00	39,87	8,27	17,29	65,61	53,22	4,39	3,10	1,93	1	1
63	99,09	30,24	43,17	0,00	73,41	9,28	18,70	84,66	74,57	3,43	3,21	2,38	1	6
65	115,27	25,62	91,39	27,03	144,04	7,13	15,07	75,17	99,97	3,38	3,78	2,27	2	3
66	120,59	22,05	119,85	29,42	171,32	8,33	20,46	74,46	114,28	3,50	3,56	2,25	2	3
71	78,53	11,82	23,96	0,00	35,78	7,24	12,07	50,15	58,40	3,19	3,30	2,21	1	1
73	74,33	12,46	21,96	0,00	34,42	6,50	10,02	50,74	54,35	2,97	3,02	2,26	1	1
74	76,87	23,93	31,04	0,00	54,97	8,38	13,40	63,19	56,73	2,53	2,57	2,35	1	6
75	98,88	10,64	35,45	0,00	46,09	8,39	16,49	69,31	72,24	3,54	2,95	2,32	1	1
85	134,39	22,50	85,75	35,14	143,39	8,80	19,68	85,25	100,04	3,50	2,58	2,18	2	2
86	111,65	9,91	30,42	0,00	40,33	8,03	14,39	47,71	77,30	2,11	1,91	1,98	2	4
88	117,51	10,19	43,00	0,00	53,19	7,77	14,80	62,80	84,87	2,20	2,08	2,05	2	4
90	136,90	7,11	50,80	5,05	62,96	5,72	14,02	72,02	64,78	3,79	1,81	1,93	2	5
91	136,16	12,13	83,75	31,99	127,87	8,68	21,52	76,59	100,31	3,58	2,78	2,14	2	2
Variedades comerciales														
‘Vallicoportugal’	120,98	13,83	64,13	20,13	98,09	8,81	18,75	74,23	101,02	2,97	3,35		2	1
‘Vitesse’	135,41	28,47	105,20	32,01	165,68	8,40	24,03	80,33	105,45	3,03	3,06		2	2
‘FinulNinak’	132,32	19,98	119,47	33,97	173,42	10,10	25,27	72,36	108,11	3,19	3,91		2	3
‘Exalta’	137,40	40,07	127,16	48,65	215,88	8,41	24,41	90,04	108,23	3,18	3,07		2	3
‘Promenade’	136,16	30,39	110,75	28,23	169,37	10,96	28,31	55,54	117,11	2,91	4,45		2	2
Media	115,66	19,62	72,92	20,24	112,78	8,15	18,16	73,08	87,97	3,28	3,09			
Media (42 pobl.)	112,38	19,30	67,15	17,68	104,12	7,97	17,21	71,91	84,37	3,31	3,02	2,24		
Media (5 varied.)	132,45	26,55	105,34	32,60	164,49	9,34	24,15	74,50	107,98	3,06	3,57			

Tabla 10. División por grupos de precocidad (*Prec*) de las poblaciones de *Lolium multiflorum*. Entre paréntesis se muestra el número de poblaciones de cada grupo. No hubo variedades dentro del grupo de precocidad 1.

Prec	Grupo	fes	crp	cre	crv	crt	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr
1	Poblaciones (17)	87,29	16,65	31,14	0,00	47,79	7,70	13,97	62,30	58,99	3,20	3,03
2	Poblaciones (25)	128,53	20,52	89,91	29,22	139,65	7,98	19,02	78,69	100,23	3,41	2,97
	Variedades (5)	132,45	26,55	105,34	32,60	164,49	9,34	24,15	74,50	107,98	3,06	3,57

Tabla 11. 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; *: significativo al nivel 0,05; **: significativo al nivel 0,01.

FV GL	Año 1	Blq(Año) 1	Pobl 41	Pobl*Año 41
Cuantitativas				
fes	23782,32**	356,09**	16997,09**	196,95**
crp	525563,42**	8180,29**	2221,12**	2235,73**
cre	521771,63**	33622,75**	45749,33**	8121,89**
crv	6407,05**	6455,94**	10797,09**	1094,72**
ahb	335,61**	14,13**	25,04**	6,61**
lhb	3372,89**	12,09	423,17**	81,73**
ain	237,50	135087,84**	8923,54**	4935,28
alp	3236,90**	68,12	18094,45**	1933,08**
Cualitativas				
	X²			
enf	185,12**			
hcr	194,26**			

El ANOVA mostró diferencias significativas en todas las variables (**Tabla 11**). En éste caso el efecto año en el ANOVA resultó más significativo que para el raigrás inglés. Esto se puede explicar porque en el segundo año de establecimiento del ensayo el clima durante los primeros meses fue mucho más seco, afectando al desarrollo de las plantas recién transplantadas. 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 al igual que en el ensayo anterior, el año 2000 fue sensiblemente menos productivo que 1999, causando un importante efecto año en el análisis de varianza.

El test de Kruskal-Wallis también fue significativo para las dos variables cualitativas (**Tabla 11**). El ACP sobre la colección total con las 10 variables explicó un 82% de la varianza con tres componentes extraídas (**Figura 4**). La **Tabla 12** muestra las correlaciones entre las variables agronómicas y las tres componentes extraídas en el ACP.

Tabla 12. Correlaciones entre las variables agronómicas y las componentes extraídas del análisis de componentes principales en *L. multiflorum*. **% var. acum.:** % de varianza acumulada; *: significativo al nivel 0,05; **: significativo al nivel 0,01.

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

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 4**). Es de destacar el *clúster 1*, en el cual se agruparon las poblaciones de tipo 'Westerworld', muy precoces y sin crecimiento en verano, provenientes en su mayoría de Pontevedra y Asturias. Este grupo tiene interés por su posible utilización en mejora para uso forrajero en rotación con maíz. Otro clúster de interés es el *cluster 2*, en el que se agruparon las poblaciones más tardías, de mayor producción y tamaño de hoja, provenientes de A Coruña, Pontevedra, Asturias y Cantabria.

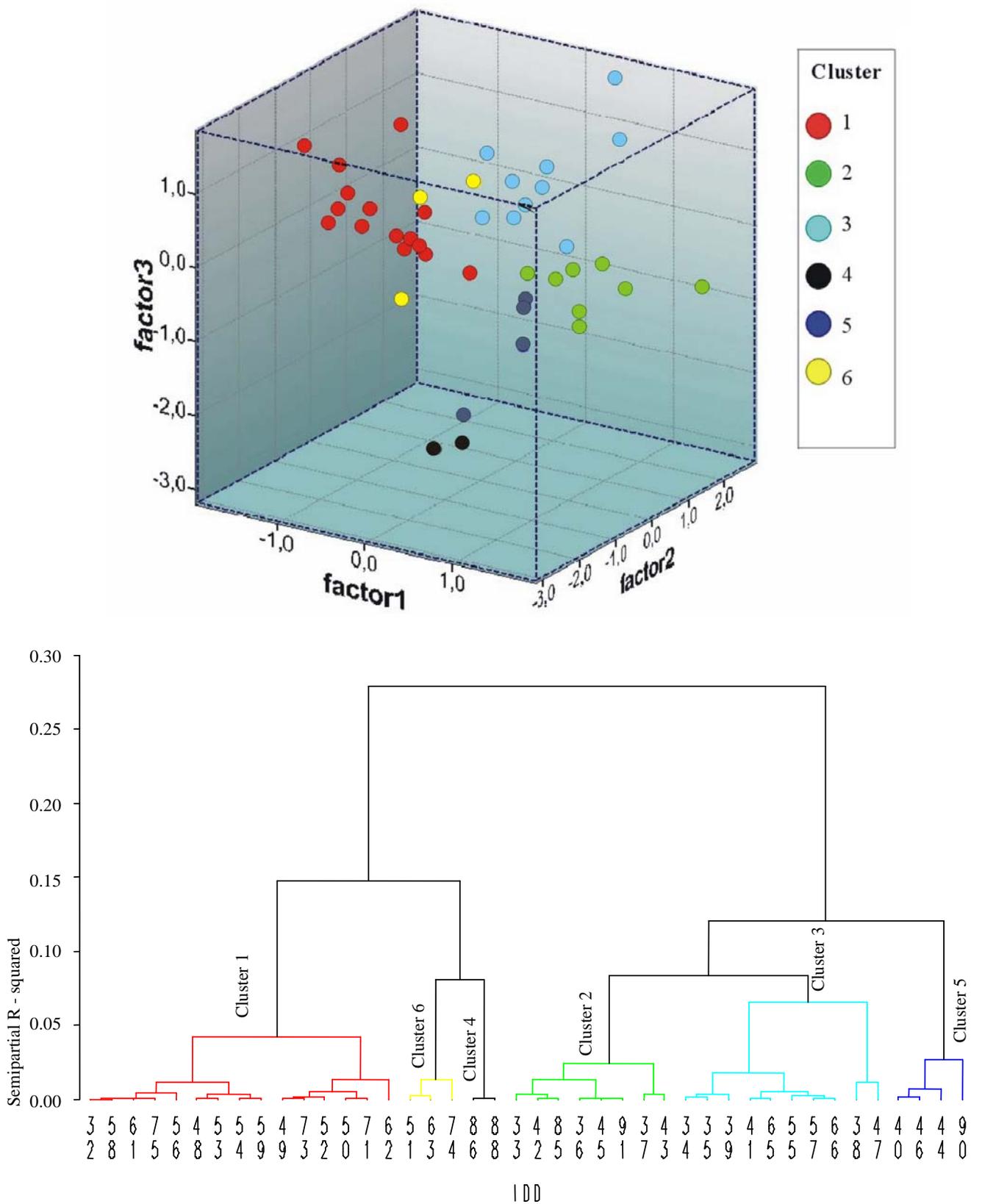


Figura 4. Superior: representación factorial de la clasificación ascendente jerárquica sobre las tres primeras componentes en 42 accesiones de *Lolium multiflorum*. Los colores representan los conglomerados del análisis clúster. **Inferior:** diagrama de la clasificación ascendente jerárquica, utilizando el método de agregación de Ward sobre las tres primeras componentes del ACP.

3.3. FESTUCA ALTA

Los Datos medios de evaluación se muestran en la **Tabla 13**. Las poblaciones resultaron ser muy variables. Las fechas de espigado fueron en términos medios más tempranas que las de los raigrases, y además fue la especie que más dilató el período de producción de flores, llegando desde principios de febrero hasta finales de junio. La división en grupos de precocidad mostró dos grupos de 11 poblaciones precoces (anteriores al 15 de mayo) y 13 tardías (posteriores al 15 de mayo). El grupo precoz fue más productivo, presentó un mayor tamaño de planta y más reespigado, pero una menor tolerancia a enfermedades (**Tabla 14**). Todas las variables estudiadas mostraron diferencias significativas en el ANOVA, las variables cualitativas analizadas mediante el test de Kruskal-Wallis también mostraron diferencias significativas (**Tabla 15**).

Tabla 13. Medias de los dos años de evaluación de las variables agronómicas utilizadas en la caracterización de la colección de *F. arundinacea*. *crt*: crecimiento total (*cri* + *crp* + *cre*), *prec*: grupo de precocidad asignado en función de la fecha de espigado. El resto de variables están explicadas en la **Tabla 4**.

COD	fes	cri	cre	crp	crt	alt	ain	enf	res	alp	lhb	ahb	hcr	H	prec	clu
1	107,76	41,36	226,08	88,25	355,69	1,00	125,69	3,62	0,30	152,61	17,36	8,17	3,42	2,22	2	3
2	112,14	57,23	243,12	102,52	402,87	1,38	125,79	3,67	0,62	156,04	21,49	9,93	2,87	2,25	2	1
3	84,56	34,65	159,83	71,54	266,02	1,00	52,28	2,55	0,60	148,52	20,82	7,94	4,00	2,00	1	2
4	70,14	82,93	292,10	164,58	539,61	1,71	116,92	3,62	0,29	133,85	16,82	7,33	2,62	2,08	1	5
5	96,50	72,69	302,77	143,84	519,3	1,59	98,23	4,44	0,50	156,11	24,95	11,34	3,57	2,06	1	1
7	109,08	45,90	213,09	110,93	369,92	1,13	131,39	3,29	0,33	142,58	17,80	7,36	3,50	2,32	2	3
10	72,43	63,46	186,79	130,77	381,02	1,36	92,63	3,15	0,70	117,22	16,12	6,81	2,15	2,09	1	5
11	121,67	32,57	134,04	71,45	238,06	1,33	105,56	4,00	0,00	104,99	16,09	5,97	3,36	2,17	2	4
12	125,21	18,98	125,77	56,96	201,71	1,00	95,86	3,90	0,00	103,00	14,29	8,29	3,70	1,55	2	4
14	100,52	44,96	154,71	125,93	325,6	1,67	112,32	3,25	0,50	127,56	23,77	9,46	2,50	2,19	1	1
15	114,00	56,74	191,83	136,11	384,68	1,53	110,80	4,14	0,33	130,30	19,45	7,66	3,76	1,97	2	4
16	108,06	61,28	212,70	106,57	380,55	1,00	121,08	3,63	0,25	157,38	18,17	8,55	2,75	2,17	2	3
18	123,79	12,95	140,21	63,46	216,62	1,00	53,80	3,61	0,25	136,46	18,21	8,77	2,51	2,12	2	2
19	106,37	69,65	302,12	154,46	526,23	2,23	141,71	3,35	0,46	155,47	23,24	9,32	2,85	2,41	1	1
20	112,37	23,28	83,43	64,42	171,13	1,00	58,26	2,67	0,50	121,93	15,03	6,31	2,84	2,02	2	2
21	104,85	54,04	132,94	122,13	309,11	1,71	87,10	3,33	0,63	119,79	20,95	9,52	2,94	2,40	1	1
22	121,95	45,26	183,27	91,77	320,3	2,09	96,70	3,84	0,25	135,98	17,08	6,94	3,31	2,19	2	4
23	110,49	50,32	145,38	96,01	291,71	1,17	77,21	2,95	0,20	143,02	21,55	9,17	3,03	2,29	2	2
24	115,22	45,15	222,56	112,27	379,98	1,46	111,35	3,74	0,27	126,42	22,07	8,84	1,98	2,31	2	1
25	102,11	66,07	229,63	141,84	437,54	1,67	134,10	3,69	0,38	146,28	23,46	9,48	2,22	2,17	1	1
26	95,94	51,93	141,99	102,82	296,74	1,22	65,97	3,02	0,60	134,96	19,81	9,36	3,55	2,41	1	2
27	103,37	92,62	282,42	152,53	527,57	1,00	124,65	2,88	0,13	159,78	19,44	7,68	2,94	2,13	1	3
30	106,22	63,48	210,52	97,92	371,92	1,00	127,45	3,50	0,10	151,98	16,05	7,43	3,35	2,12	1	3

COD	fes	cri	cre	crp	crt	alt	ain	enf	res	alp	lhb	ahb	hcr	H	prec	clu
31	108,06	43,45	185,41	121,07	349,93	2,06	87,00	3,54	0,57	130,33	22,62	8,68	2,79	2,36	2	1
Variedades comerciales																
'Tima'	112,66	53,89	232,76	113,05	399,7	1,90	126,01	3,06	0,28	153,98	20,43	8,02	3,86		2	3
'Marisc.'	121,34	32,14	155,66	67,99	255,79	1,00	82,04	3,09	0,18	151,64	17,86	8,02	3,86		2	1
'Fawn'	88,66	48,84	221,40	132,66	402,9	1,90	109,16	2,79	0,70	148,58	18,10	8,66	4,08		1	2
Media total	105,76	50,59	196,76			1,41	102,63	3,42	0,37	138,77	19,37	8,33	3,12			
Media (24 Pobl.)	105,53	51,29	195,95			1,39	102,24	3,47	0,37	137,19	19,44	8,34	3,02	2,17		
Media (6 varied.)	107,55	44,96	203,27			1,60	105,74	2,98	0,39	151,40	18,79	8,23	3,93			

Tabla 14. División por grupos de precocidad (**Prec**) de las poblaciones de *Festuca arundinacea*. Entre paréntesis se muestra el número de accesiones de cada grupo.

Prec	GRUPO	fes	cri	crp	cre	crt	alt	ain	enf	alp	lhb	ahb	hcr
1	Poblaciones (11)	94,82	63,32	128,03	217,80	409,15	1,47	104,84	3,50	141,19	20,50	8,70	2,97
	Variedades (1)	88,66	48,84	132,66	221,40	402,90	1,90	109,16	2,63	148,57	18,10	8,66	4,08
2	Poblaciones (13)	114,58	41,11	93,98	177,45	312,55	1,32	100,69	3,69	133,50	18,56	8,05	3,06
	Variedades (2)	117,00	43,02	90,52	194,21	327,75	1,45	104,03	2,98	152,81	19,14	8,01	3,85

Tabla 15. Cuadrados medios del análisis de varianza y test de Kruskal-Wallis para variables cualitativas en *Festuca arundinacea*; **FV**: fuente de variación; **GL**: grados de libertad; **Blq**: bloque; **Pobl**: población; **X²**: valor del test chi-cuadrado; *: significativo al nivel 0,05; **: significativo al nivel 0,01. **NOTA**: en el segundo año no hubo anotación de la variable **crp**, por lo que el término de error utilizado fue **Pobl*Blq**.

FV GL	Año 1	Blq 1	Año*Blq 1	Pobl 23	Pobl*Año 23
Cuantitativas					
fes	1429,66**	0,19	104,42	4276,45**	150,28
cri	4109,32	10056,28**	11,59	6841,04**	2263,53
crp	---	1276,46	---	9412,57**	---
cre	5780,58	75161,49	29754,14	77658,90**	22414,92
ahb	0,93	0,07	9,11*	31,38**	0,47
lhb	5,74	169,56	61,04	172,40**	4,59
ain	846,04	10622,43	65,95	12704,05**	10174,21
alp	16814,65**	3280,01	9514,24	4526,13**	874,56
Cualitativas					
X²					
enf	92,68**				
hcr	164,21**				

El ACP sobre la colección total explicó un 81% de la varianza con cuatro componentes. El *Factor 1* se relaciona con todas las variables de producción, n^o de

inflorescencias y altura total (*cri*, *crp*, *cre*, *ain* y *alp*). El *Factor 2* se relaciona con las variables de forma de hoja (*ahb* y *lhb*). El *Factor 3* se relaciona con la fecha de espigado y tolerancia a enfermedades (*fes* y *enf*) y finalmente el *Factor 4* se relaciona con el hábito de crecimiento y la alternitud (*hcr* y *alt*). Las poblaciones de mayor precocidad de espigado fueron las más productivas. En la **Tabla 16** se muestran las correlaciones entre las variables y cada una de las componentes. La clasificación ascendente jerárquica basada en las componentes principales estableció cinco grupos explicando un 67% de la varianza. (**Figura 5**). Los *clúster 1*, *3* y *5* agruparon poblaciones más precoces y más productivas. En los *clúster 2* y *4* se agruparon las más tardías y de menor producción.

Tabla 16. Correlaciones entre las variables agronómicas y las componentes extraídas del análisis de componentes principales en *F. arundinacea*. **% var. acum.:** % de varianza acumulada; *: significativo al nivel 0,05; **: significativo al nivel 0,01.

Variable	Componente del ACP			
	FACTOR 1	FACTOR 2	FACTOR 3	FACTOR 4
fes	-0,40	0,02	0,77(**)	-0,16
cri	0,90(**)	0,12	-0,25	0,13
crp	0,80(**)	0,23	-0,18	0,44
cre	0,93(**)	0,23	0,05	0,02
alt	0,25	0,29	0,21	0,74(**)
ain	0,78(**)	-0,10	0,35	0,11
enf	0,17	0,03	0,87(**)	0,04
alp	0,61(**)	0,45(*)	-0,15	-0,48(*)
lhb	0,20	0,90(**)	-0,06	0,26
ahb	0,12	0,93(**)	0,10	0,03
hcr	-0,09	-0,03	0,20	-0,69(**)
Autovalor	5,32	1,72	1,55	1,34
% Var. acum.	44,34	58,69	71,65	82,85

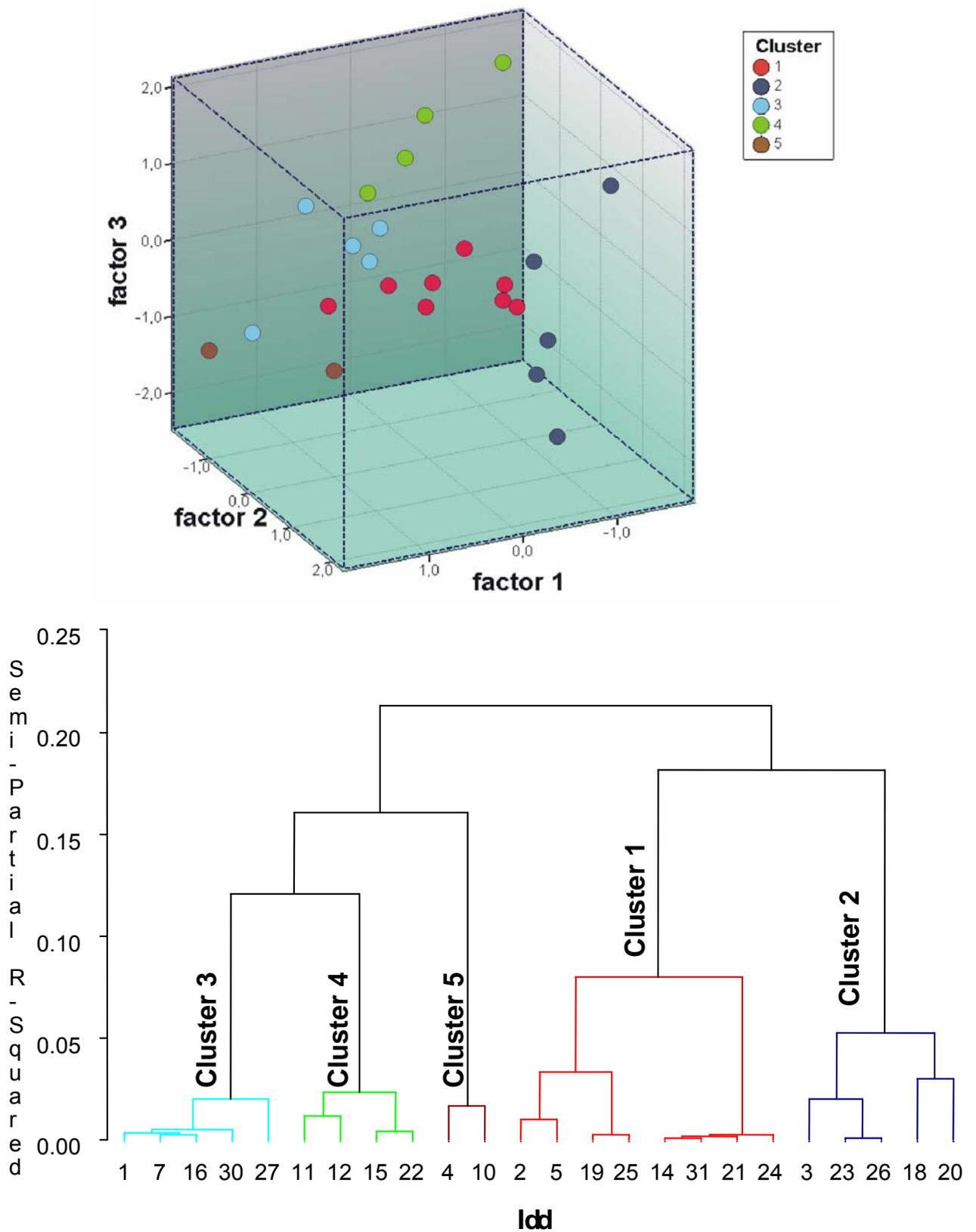


Figura 5. Superior: representación factorial de la clasificación ascendente jerárquica sobre las tres primeras componentes en 24 accesiones de *Festuca arundinacea*. Los colores representan los conglomerados del análisis clúster. **Inferior:** diagrama de la clasificación ascendente jerárquica, utilizando el método de agregación de Ward sobre las tres primeras componentes del ACP.

4. DISCUSIÓN

Si bien es cierto que la mayor parte de las accesiones estudiadas pertenecen al norte de España, es de destacar el buen comportamiento agronómico de muchas de las poblaciones gallegas en las tres colecciones, siendo las más productivas las pertenecientes a las provincias de A Coruña, Pontevedra, Asturias y Cantabria, recolectadas mayoritariamente en zonas húmedas. Las poblaciones de menores producciones proceden de localidades de condiciones más mediterráneas. Estos datos corroboran otros trabajos anteriores que indican una mayor adaptación local de las poblaciones autóctonas de gramíneas pratenses (Oliveira y López, 1999). En general se puede decir que las poblaciones tuvieron un mejor comportamiento agronómico medio que los cultivares comerciales empleados como testigo. Es de destacar el caso del raigrás inglés, donde los dos cultivares creados a partir de ecotipos autóctonos gallegos mostraron un mejor resultado que el resto de cultivares. Este mejor comportamiento implica una mayor tolerancia a enfermedades y unos mejores rendimientos, que ya había sido observado por Oliveira *et al.*, (1997a, 1997b) en poblaciones locales de gramíneas, lo cual según Piñeiro y Pérez (1986), frecuentemente es debido a la presencia de características especiales de adaptación a una región determinada. Estos resultados son exactamente lo que se esperaría de la influencia de la selección natural, es decir, las poblaciones presentan mejores resultados cuando se evalúan en localidades con condiciones ecológicas similares a sus lugares de origen (Balfourier *et al.*, 1997, Oliveira y González, 2000).

Los análisis multivariantes revelaron una correlación positiva del primer factor (*Factor 1*) con todas las variables de producción tanto en los raigrases como en festuca. A la misma conclusión llegaron Oliveira y González (2000) en un estudio sobre 152 poblaciones naturales de raigrás inglés procedentes de 15 países europeos. Se puede decir que constituye un eje de crecimiento. Las variables morfológicas y de resistencia a enfermedades se correlacionaron más con los

siguientes factores, repitiéndose en las tres colecciones las correlaciones positivas de las variables de hoja bandera (*ahb* y *lhb*) con el *Factor 2*. Las fechas de espigado se correlacionaron con el *Factor 1*, excepto en el caso de festuca, que se correlacionaron con el *Factor 3*, esto es debido a que la fecha de espigado y los crecimientos en festuca correlacionan negativamente, es decir, las mayores producciones se dieron en las poblaciones más precoces.

En el caso del raigrás italiano las poblaciones del *Grupo 2* fueron más productivas que las del *Grupo 1*, teniendo también mayor altura, longitud y anchura de la hoja bandera. No presentaron diferencias en cuanto a tolerancia a enfermedades, ni en hábito de crecimiento. Las poblaciones pertenecientes al *Grupo 1* no presentaron crecimiento en verano, y mayoritariamente proceden de las provincias de Pontevedra y Asturias. El interés de las poblaciones de este grupo es el hecho de que su precocidad les permita su inclusión como cultivo forrajero de invierno en rotación con el maíz. En el *Grupo 2* es de destacar el buen comportamiento de las poblaciones de Cantabria, que superaron al mejor cultivar comercial ('Exalta'), seguidas de algunas poblaciones de A Coruña, Lugo y Asturias. Considerando valores medios totales, los cultivares comerciales evaluados en el ensayo resultaron más productivos que las poblaciones, aunque presentaron una menor tolerancia a enfermedades de hoja, no obstante hay que tener en cuenta que en las fechas de anotación de los crecimientos de verano hay 17 poblaciones de tipo 'westerworld' clasificados en el *Grupo 1* (precoz) que no tuvieron crecimiento alguno, por lo tanto influyen en la media general con valores cero. Ninguna de las variedades comerciales de raigrás italiano presentó crecimiento nulo en verano y todas se incluyeron en el *Grupo 2* (tardío).

En el caso de *Festuca arundinacea*, el hecho de que las poblaciones más precoces de espigado fuesen las más productivas, está de acuerdo con los datos obtenidos por Díaz *et al.*, (1999) en un estudio realizado en el norte de España sobre 13 variedades comerciales, donde las más precoces resultaron ser algo más productivas. La misma conclusión fue observada por Rosso *et al.*, (2008) en un

estudio de 34 accesiones, sin embargo, Paredes *et al.*, (1986) obtuvieron las mayores productividades en variedades tardías en una evaluación realizada en el sur de España. De las tres variedades estudiadas en este trabajo 'MarisKasba' (la más tardía) fue la de menor producción y 'Tima' (de espigado intermedio) la de mayor. Según Bertín (1988), la producción total y estacional de forraje de esta especie es diferente según se consideren materiales provenientes del norte de Europa, mediterráneos, o intermedios entre estos dos. Dado que la especie no está específicamente mejorada para zonas húmedas los datos indican que en tales zonas las variedades citadas pueden tener un comportamiento agronómico diferente del obtenido en el Sur de España, pudiendo resultar adecuado el uso de variedades creadas a partir de germoplasma autóctono (Piñeiro y Pérez, 1986).

Dada la heterogeneidad climática entre los dos años de evaluación, (el primer año fue muy lluvioso y el segundo anormalmente seco), el efecto año fue significativo sobre todo en los raigrases, a los cuales afectan más los periodos secos que a las festucas. Tal efecto se observó especialmente en el raigrás italiano, ya que al implantar completamente el ensayo con plantas nuevas, la sequía del segundo año afectó a la implantación y crecimientos iniciales. En las festucas el efecto año fue en general menos significativo que en los raigrases, lo cual coincide con las observaciones de numerosos autores de una mayor tolerancia a la sequía de las festucas frente a los raigrases una vez establecidas las plantas.

5. CONCLUSIÓN

Las tres colecciones de gramíneas mostraron una gran diversidad y variabilidad agronómica comparando con los cultivares comerciales.

En raigrás inglés la media de los rendimientos y tolerancia a enfermedades de las poblaciones naturales superó a las seis variedades comerciales, 41 de las 74 tuvieron mejores crecimientos que la media de las variedades, provenientes en su mayoría de Galicia y Asturias. Los cultivares creados a partir de genotipos autóctonos fueron los de mejor comportamiento agronómico de los utilizados como testigo.

En raigrás italiano seis de las 42 poblaciones tuvieron mejores crecimientos que la media de las variedades comerciales, todas ellas provenientes de zonas húmedas de Cantabria y Galicia. En términos globales las variedades comerciales tuvieron mejores rendimientos pero fueron más sensibles a enfermedades.

En festuca alta 16 de las 24 poblaciones tuvieron mejores rendimientos que la media de las variedades. En términos globales tanto poblaciones como variedades tuvieron rendimientos similares, pero éstas últimas fueron más sensibles a enfermedades. A diferencia de los raigrases las poblaciones más productivas fueron las más precoces.

Las variables agronómicas estudiadas en las tres colecciones presentaron un patrón similar en los análisis multivariantes, apareciendo un primer factor con el que se relacionan las variables de producción y dos factores con los que se relacionan las variables morfológicas.

El material estudiado presenta un alto interés para la creación de variedades basadas en material genético autóctono. Hasta ahora las mayores aplicaciones de

los bancos de germoplasma habían sido la obtención de variedades para una agricultura intensiva, y la preservación de la diversidad. Pero en la actualidad, hay una intensa demanda de material genético apropiado a los diferentes manejos y usos, y que al mismo tiempo no requieran tanta energía por estar ya adaptado a las localidades de empleo, cumpliendo así los compromisos del Protocolo de Kioto sobre el cambio climático, disminuyendo las emisiones de gases de efecto invernadero, y al mismo tiempo, contribuyendo al compromiso de preservación de la diversidad genética mediante el uso de material vegetal autóctono.

CAPÍTULO II

Comparación de procedimientos para crear colecciones nucleares en accesiones de raigrás inglés e italiano.

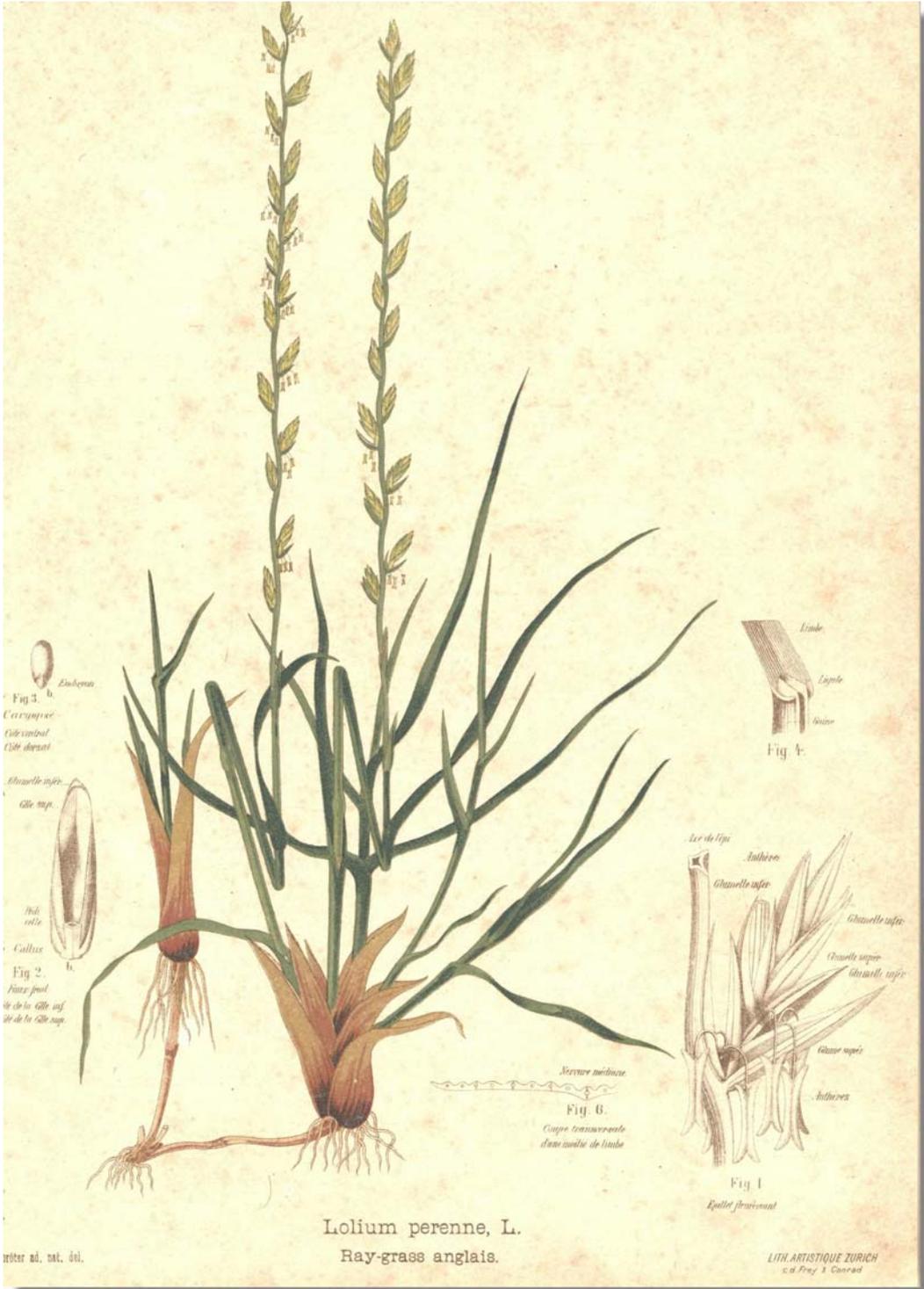


Lámina original de *Lolium perenne* L. según Stebler *et al.*, 1894c.

CAPÍTULO II: Comparación de procedimientos para crear colecciones nucleares en accesiones de raigrás inglés e italiano.

RESUMEN

Las colecciones de raigrás inglés e italiano estudiadas en el capítulo anterior se utilizaron para comparar diversas estrategias habitualmente utilizadas en la elaboración de colecciones nucleares, ("core collection"). Dado que la colección de festuca es relativamente pequeña no se incluyó en este estudio. Las estrategias empleadas incluyeron muestreos aleatorios, muestreos estratificados basados en la clasificación ascendente jerárquica, muestreos basados en el índice de diversidad de Shannon-Weaver y muestreos basados en la máxima contribución a la varianza en el análisis de componentes principales. 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. Ninguna de las dos colecciones nucleares creadas por este método mostró diferencias en las medias y en las varianzas frente a las colecciones de partida mediante el test de Wilcoxon, por lo que dicha estrategia se considera la más adecuada para el mantenimiento de la diversidad de las colecciones de partida.

1. INTRODUCCIÓN

Los estudios de diversidad de las colecciones de germoplasma usando métodos cuantitativos, pueden ser un camino para la aplicabilidad de estas colecciones en mejora genética (Frankel y Brown, 1984; Harch *et al.*, 1995). Estos estudios se basan en el hecho de que la diversidad de las especies no está distribuída de forma aleatoria, y que se pueden identificar patrones de variación

que permitan a los mejoradores utilizarlos para la selección de muestras interesantes (Van Hinthum, 1995). Los dos ejes principales de distribución de la diversidad genética son la distribución geográfica y la composición genotípica (Brown, 1989b; Crossa *et al.*, 1995).

Para la mayor parte de las colecciones se dispone de datos de pasaporte, e información acerca de los descriptores (FAO, 1996), que proporcionan a los mejoradores datos sobre los patrones de evolución del cultivo, derivados de la selección impuesta por los agricultores y la selección natural.

Según Hodgkin (1997), el origen geográfico es frecuentemente un buen indicador de la divergencia entre poblaciones, y es un criterio simple y efectivo para clasificar germoplasma. Los patrones de distribución geográfica observados en especies cultivadas reflejan la adaptación ecogeográfica y las preferencias de los agricultores. En varias especies se ha encontrado evidencia de diferenciación geográfica, a través del estudio de datos de caracterización y evaluación (Spagnoletti y Qualset, 1987; Jana *et al.*, 1993; Cordeiro *et al.*, 1995; Abadie *et al.*, 1998, 1999; Damania *et al.*, 1999; Dwivedi *et al.*, 2005), y de datos moleculares (Doebley *et al.*, 1985; Gepts, 1998). Los sistemas de información geográfica (SIG) son una poderosa herramienta para el estudio de los recursos fitogenéticos. Han sido ampliamente utilizados para la exploración, muestreo y conservación de biodiversidad (Tohme, *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Balfourier *et al.*, 1998a).

La diversidad genética almacenada en los bancos de germoplasma conlleva a una dificultad de manejo directamente proporcional a la cantidad de muestras conservadas. En los últimos años, el incremento en el número de muestras mantenidas, ha motivado una creciente preocupación por racionalizar la diversidad genética almacenada. Los objetivos son facilitar el acceso de los recursos fitogenéticos a los mejoradores, y hacer así 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. También se señalan como limitantes los problemas en la gestión de los bancos de germoplasma (Marshall, 1989), la escasa difusión de la información existente (Mackay, 1995), o la falta de cooperación entre curadores de bancos de germoplasma y mejoradores (Morales *et al.*, 1997). No obstante en los últimos años se ha hecho un notable esfuerzo en la difusión de información a través de las tecnologías de Internet y los programas de cooperación nacionales e internacionales.

La redundancia o las repeticiones en la diversidad almacenada en las colecciones de germoplasma también se han señalado como un factor a tener en cuenta. Cubero Salmerón *et al.*, (2006) elaboraron un resumen de las principales colecciones actuales almacenadas en el mundo, a continuación se muestra un resumen de este estudio:

	Entradas (miles)	% de duplicación
• Cereales	2550	63%
• Leguminosas	877	57%
• Tuberosas	3427	60%
• Hortícolas	313	54%
• Frutales	4617	Sin determinar
• Forrajeras	593	Sin determinar

Como se puede observar el nivel de diversidad duplicada supera el 50% en la mayoría de los cultivos importantes a escala mundial.

Por todas estas razones, algunos autores han propuesto el concepto de *colección nuclear* o "*core collection*" (Frankel, 1984; Brown, 1989a; 1989b), que consiste en una fracción manejable de muestras, seleccionadas por conservar la mayor diversidad posible del conjunto. Las muestras que no son incluidas en la colección nuclear pasan a componer una *colección de reserva*. 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. Todo el proceso de elaboración de una colección nuclear determina un conocimiento más detallado de toda la

colección. De esta manera no sólo se logra un manejo más ágil del germoplasma almacenado, sino que también se obtiene información adicional que puede tener una gran importancia estratégica en los programas de mejora genética (Brown y Spillane, 1999). No obstante, hay que tener en cuenta que, aunque la creación de una colección nuclear aumente el valor añadido de la colección base, sin embargo no la sustituye, y no justifica el hecho de que se desatienda la conservación de la colección total, simplemente constituye una herramienta para hacer más práctico el manejo del germoplasma y para conservar la máxima diversidad posible con pocas muestras.

Brown (1989b) sugirió que una muestra al azar del 10% de la colección total conservaría un 70% de la variación total (estrategia R). Pero 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 también de 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 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 o región como fuente de variación genética en la creación de colecciones nucleares. Según Balfourier *et al.*, (1998a, 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.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Con los datos de caracterización agronómica estudiados en el Capítulo I, se utilizaron las colecciones de raigrás inglés y de raigrás italiano para comparar diversas estrategias de creación de colecciones nucleares. No se utilizó la colección de festuca alta por tener un número reducido de accesiones.

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 apropiado 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 6**). Los métodos utilizados fueron:

M1) Muestreo al azar: se generaron 200 muestras independientes de tamaños 9 y 6, 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.

M2) Criterio de máxima diversidad: se seleccionaron las poblaciones con mayor diversidad intrapoblacional en cada colección de partida, utilizando los caracteres agronómicos estudiados en el Capítulo I. 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):

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

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

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):

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

M3) 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.

M4) Mayor similaridad media en el clúster: se calculó 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.

M5) 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_j del Método 2.

M6) 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 *M2*, *M4*, *M5* y *M6* 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 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)

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

donde $R_n CN$ es el intervalo de variación de la variable n en la colección nuclear, $R_n CB$ 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.*, 1998a):

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

Donde $\overline{H}(CC)$ es la diversidad media de las poblaciones que componen cada colección nuclear para todas las variables agronómicas y $\overline{H}(CT)$ 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.*, 1998a, 1999).

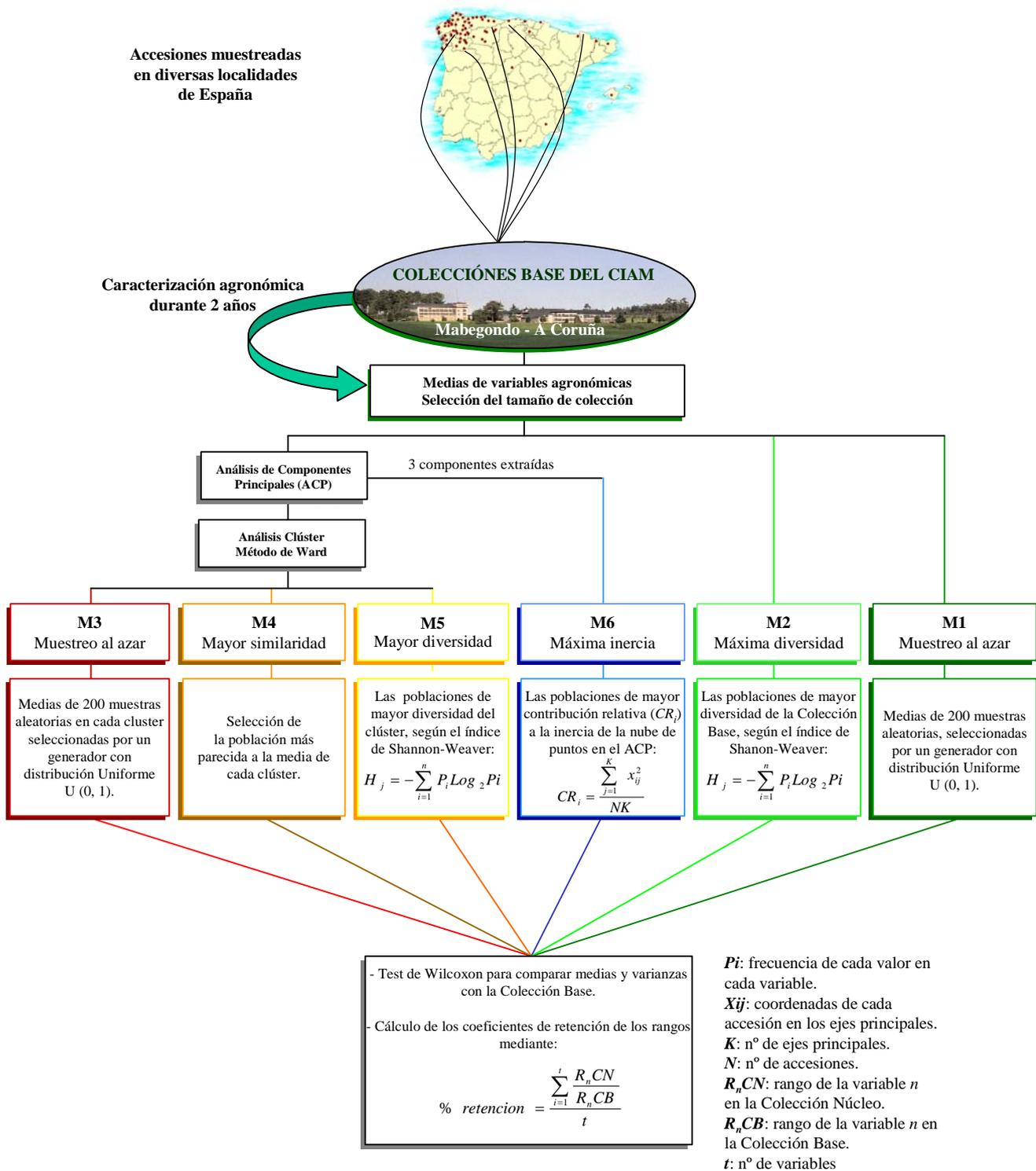


Figura 6. Esquema de las seis estrategias comparadas para la creación de colecciones nucleares en raigrás inglés y raigrás italiano.

3. RESULTADOS

3.1. Raigrás inglés

Las medias y varianzas para cada método de muestreo se pueden observar en la **Tabla 17**. 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 (*M2* y *M5*), 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 (*M6*) 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 (*M1* y *M3*), y el *M4*, extraen poblaciones con varianzas muy similares a la colección de partida. El test de comparación de Wilcoxon (**Tabla 18**) 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 (*M1* y *M3*), que alcanzó sólo el 34 y 23% respectivamente, y resultó máximo en el *M6* (87%). El resto de métodos mantuvieron coeficientes de retención aceptables.

Tabla 17. Medias, varianzas e intervalos de variación (rango) de las variables estudiadas para cada método de muestreo y para la colección de partida en *L. perenne*. Se muestran los datos medios del testigo 'Brigantia'. En negrita se resaltan aquellas varianzas superiores a las de la colección de partida. Para la descripción de variables ver **Tabla 4** del Capítulo I.

<i>Lolium perenne</i>		Variable agronómica									
		fes	cri	crp	cre	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr
'Brigantia'	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
Colección total	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	29	74,45	111,23	322,74	5	13	285	83	4	3
		Variable agronómica									
Método		fes	cri	crp	cre	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr
Método 1	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	16241,88	1,37	18,35	2319,02	481,32	1,20	0,78
	Rango	13,66	9,09	23,81	64,25	1,10	3,73	37,49	14,34	0,73	0,72
Método 2	Media	131,85	17,13	41,22	138,01	5,15	14,97	96,38	86,18	3,28	2,76
	Varianza	134,26	183,09	1022,16	16711,94	1,55	23,76	1873,65	486,10	1,37	0,99
	Rango	24,67	11,01	31,43	74,99	2,46	7,76	36,24	25,14	0,72	0,81
Método 3	Media	138,10	16,76	42,62	145,82	5,04	13,98	105,62	82,49	3,47	2,92
	Varianza	86,75	208,08	1023,31	17301,92	1,30	17,64	2236,25	465,68	1,18	0,80
	Rango	9,64	5,10	15,49	52,99	0,65	2,10	27,99	8,35	0,69	0,45
Método 4	Media	138,92	17,99	44,01	150,58	4,91	14,04	100,05	83,24	3,34	2,93
	Varianza	88,46	295,93	1164,85	17995,86	1,14	16,95	1852,75	516,37	1,19	0,66
	Rango	32,00	19,34	44,35	91,32	1,33	5,86	54,61	29,26	1,40	1,13
Método 5	Media	136,46	16,65	41,11	135,81	4,82	13,68	96,44	81,74	3,30	2,78
	Varianza	94,48	163,03	936,34	17055,18	1,35	19,20	2002,91	491,12	1,45	0,97
	Rango	24,67	13,68	39,95	114,12	2,46	7,76	49,20	26,26	1,77	1,00
Método 6	Media	138,84	18,35	47,06	165,29	5,29	14,86	102,90	80,52	3,58	2,57
	Varianza	97,15	258,49	1160,82	21132,91	1,47	19,35	2210,81	553,16	1,32	0,99
	Rango	30,79	26,63	68,16	261,66	2,28	7,84	82,87	34,16	2,21	1,36

En la **Figura 7a** se pueden 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 7b** muestra las varianzas medias expresadas como porcentaje de las varianzas de la colección total. Los métodos *M2* y *M6* son los que presentan varianzas medias relativas más altas.

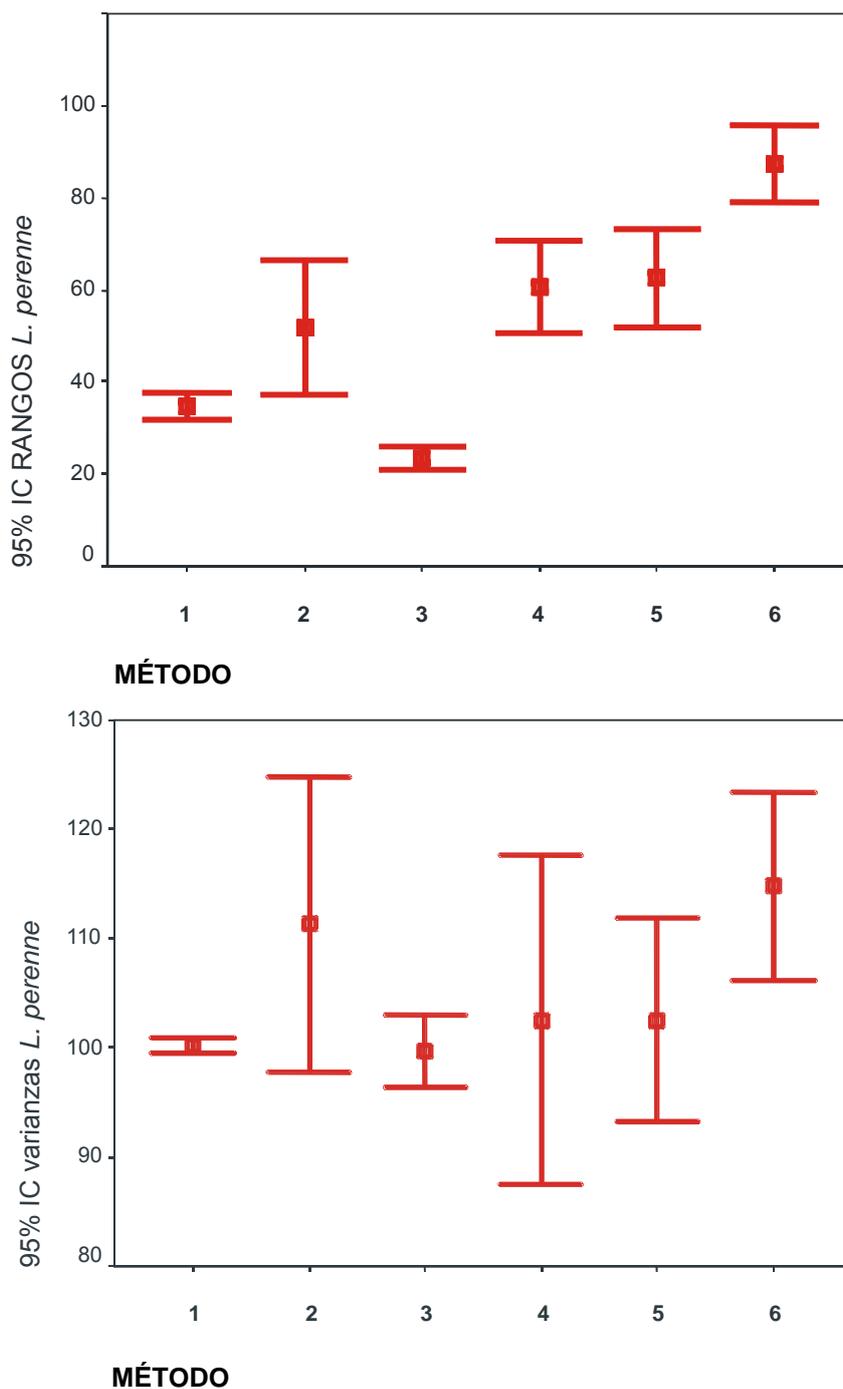


Figura 7. Rangos y varianzas en *Lolium perenne*. Superior (**7a**): rangos medios para las 10 variables agronómicas, expresados como % del rango de la colección total. Inferior (**7b**): varianzas medias para las 10 variables agronómicas, expresados como % de la varianza de la colección total. Las barras de error representan intervalos de confianza al 95%.

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.

Tabla 18. Test de Wilcoxon y porcentajes de retención para los métodos comparados en *L. perenne*. *P*: probabilidad; *SIG*: significación; *ns*: no significativo.

<i>Lolium perenne</i>			
MÉTODO	COMPARACION	P	SIG
M1	Medias	0,8205	ns
	Varianzas	1,0000	ns
	% retención		34,69%
M2	Medias	1,0000	ns
	Varianzas	0,7913	ns
	% retención		51,71%
M3	Medias	0,9698	ns
	Varianzas	0,9698	ns
	% retención		23,29%
M4	Medias	0,9698	ns
	Varianzas	0,9698	ns
	% retención		60,78%
M5	Medias	0,7913	ns
	Varianzas	0,9097	ns
	% retención		62,58%
M6	Medias	0,9097	ns
	Varianzas	0,7913	ns
	% retención		87,31%

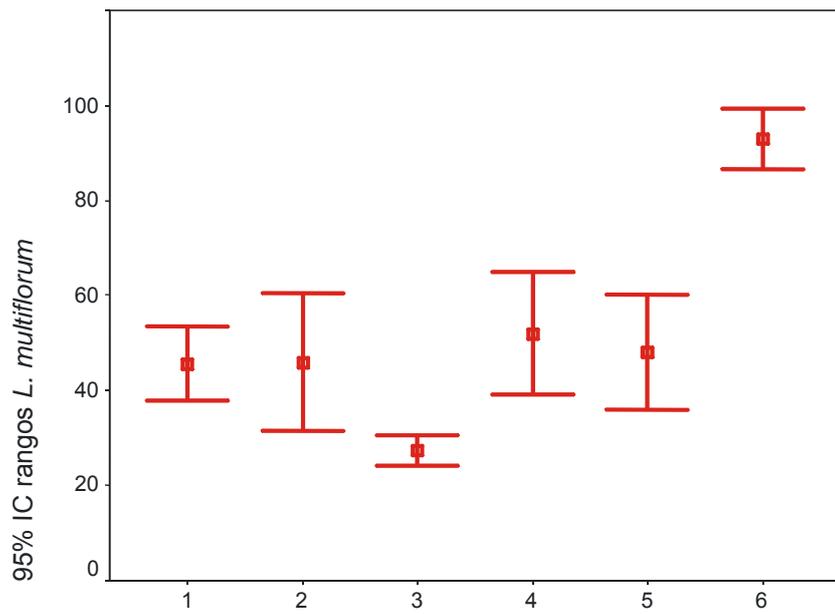
3.2. Raigrás italiano

En la **Tabla 19** se muestran las medias y varianzas para cada método. De nuevo los métodos basados en diversidad (*M2* y *M5*), y el *M6*, 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 8a**). Los métodos de

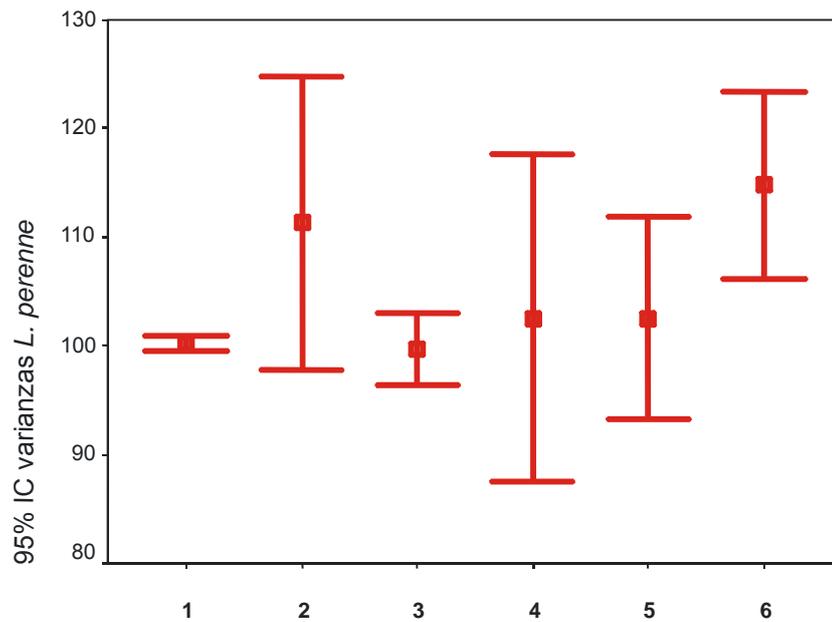
selección al azar (*M1* y *M3*) obtuvieron los coeficientes más bajos de retención (45 y 26%, respectivamente), mientras que el método más conservativo volvió a ser el *M6* (93%). En cuanto a las varianzas, los métodos basados en diversidad (*M2* y *M5*) y el *M6* son los que más incrementaron las varianzas en las colecciones nucleares creadas (**Figura 8b**). El test de Wilcoxon (**Tabla 20**) no mostró diferencias significativas en ninguna comparación.

Tabla 19. Medias, varianzas e intervalos de variación de las variables estudiadas para cada método de muestreo y para la colección base en *L. multiflorum*. Se muestran los datos medios del testigo 'Vitesse'. En negrita se resaltan aquellas varianzas superiores a las de la colección total. Para descripción de variables ver **Tabla 4** del Capítulo I.

<i>Lolium multiflorum</i>		Variable agronómica									
		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 total	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	136,90	44,81	161,95	60,69	12,30	28,08	128,22	120,80	4,39	4,18
		Variable agronómica									
Método		fes	crp	cre	crv	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr
Método 1	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	2163,90	345,52	1,28	1,25
	Rango	38,20	18,96	67,04	32,05	1,84	6,23	35,36	42,40	0,97	0,94
Método 2	Media	99,07	21,35	51,74	9,37	8,11	16,32	70,07	71,22	3,20	2,95
	Varianza	99,51	957,21	2161,65	283,90	4,17	38,99	2750,57	456,18	1,35	1,73
	Rango	59,55	16,80	64,42	35,06	2,42	7,58	28,07	37,13	0,49	0,76
Método 3	Media	114,61	18,75	63,62	15,13	7,94	17,03	71,56	84,76	3,18	2,79
	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
Método 4	Media	115,24	21,19	65,71	14,25	7,90	16,55	70,51	87,12	3,16	2,81
	Varianza	70,98	1036,02	2658,43	311,84	2,64	21,25	2213,51	377,90	1,38	1,52
	Rango	50,85	19,98	68,19	35,14	2,00	6,62	22,45	49,88	1,48	1,22
Método 5	Media	114,30	19,49	63,70	15,44	8,16	17,43	74,79	82,24	3,10	2,73
	Varianza	100,94	752,56	2877,00	449,71	3,49	33,93	2987,40	543,80	1,26	1,66
	Rango	46,10	20,05	64,32	36,42	1,65	5,32	24,06	46,37	1,24	1,13
Método 6	Media	120,98	22,66	87,82	25,78	8,19	18,93	73,44	89,93	3,32	2,98
	Varianza	58,26	1316,66	6068,50	754,23	2,99	21,54	2446,29	374,88	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



MÉTODO



MÉTODO

Figura 8. Rangos e variâncias em *Lolium multiflorum*. Superior (**8a**): rangos médios para as 10 variáveis agronômicas, expressos como % do rango da coleção total. Inferior (**8b**): variâncias médias para as 10 variáveis agronômicas, expressos como % da variância da coleção total. Las barras de error representan intervalos de confianza al 95%.

Tabla 20. Test de Wilcoxon y porcentajes de retención para los métodos comparados en *L. multiflorum*. *P*: probabilidad; *SIG*: significación; *ns*: no significativo.

<i>Lolium multiflorum</i>			
MÉTODO	COMPARACION	P	SIG
M1	Medias	0,7942	ns
	Varianzas	0,9109	ns
	% retención		45,62%
M2	Medias	0,7375	ns
	Varianzas	0,7942	ns
	% retención		45,96%
M3	Medias	0,7942	ns
	Varianzas	0,7942	ns
	% retención		26,51%
M4	Medias	0,8521	ns
	Varianzas	0,9702	ns
	% retención		52,03%
M5	Medias	0,9702	ns
	Varianzas	0,7375	ns
	% retención		48,20%
M6	Medias	0,5774	ns
	Varianzas	1,0000	ns
	% retención		93,00%

4. 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, hecho también observado por 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.*, (1998a). 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 (**Figuras 7 y 8**). 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 M6 (87% y 93%, respectivamente para raigrás inglés e italiano, **Tablas 18 y 20**). 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 (Shing *et al.*, 1991).

En las **Figuras 9a** y **9b** 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 6** del Capítulo I), 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 colección total es la del *M6*. 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.

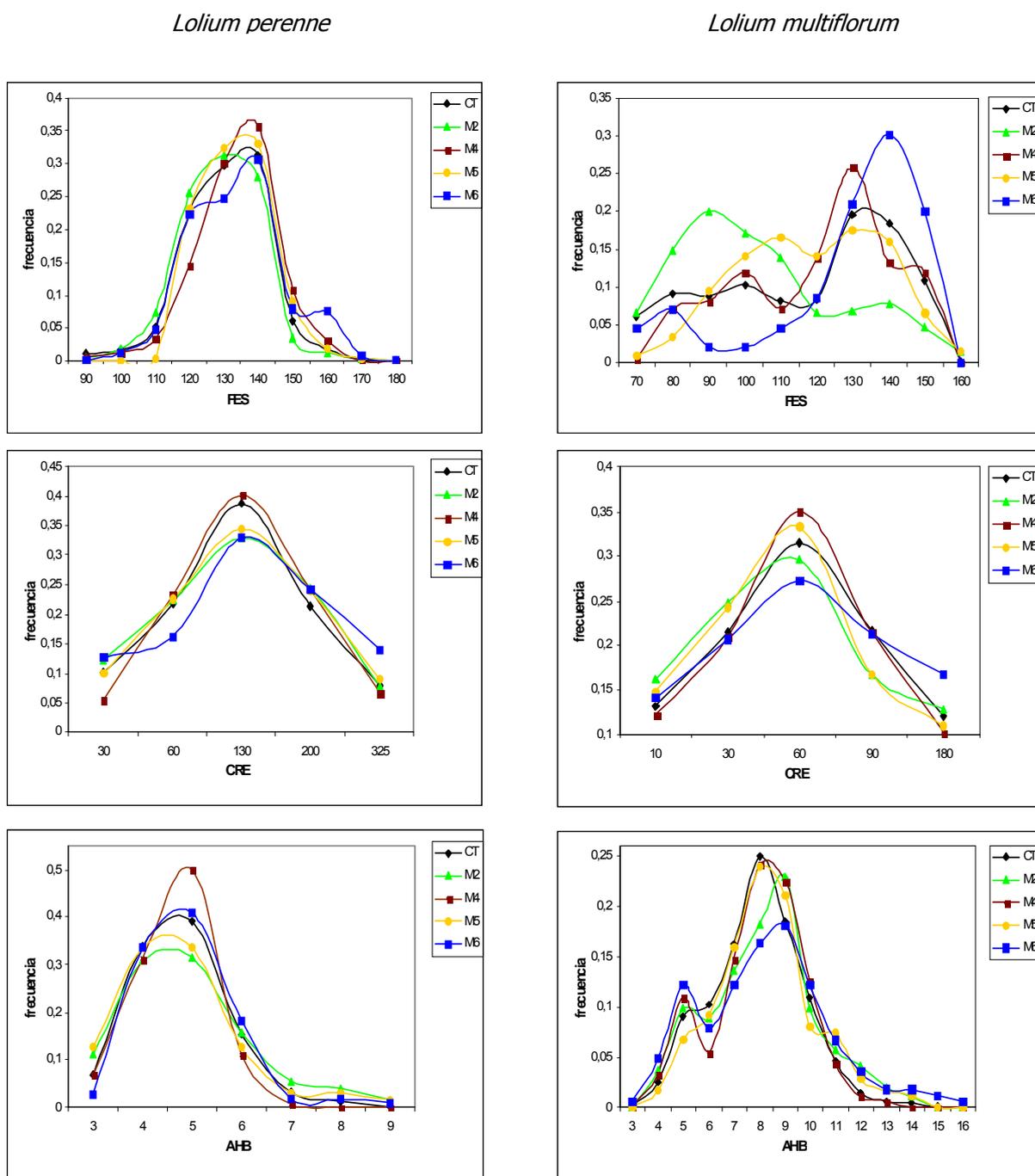


Figura 9a. Curvas de distribución de frecuencias en las poblaciones seleccionadas por los métodos determinísticos para las variables *fes*, *cre*, *ahb*. La columna de la izquierda corresponde a la colección de *L. perenne* y la de la derecha a *L. multiflorum*. **CT:** colección total.

Lolium perenne

Lolium multiflorum

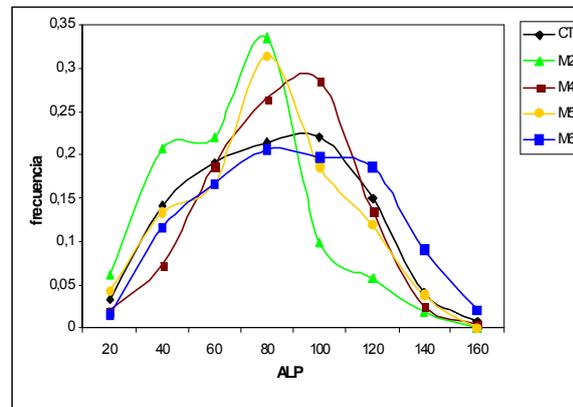
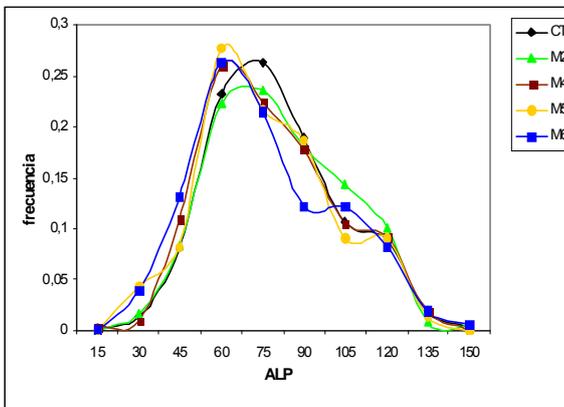
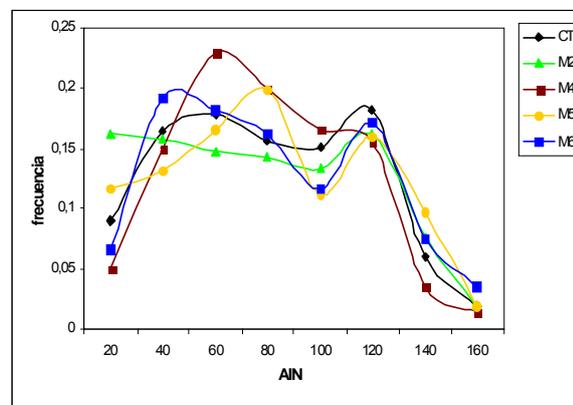
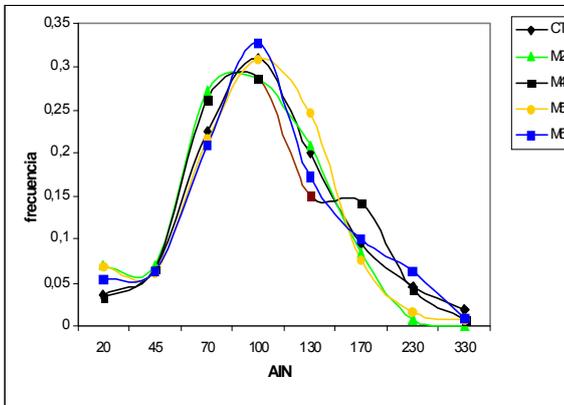
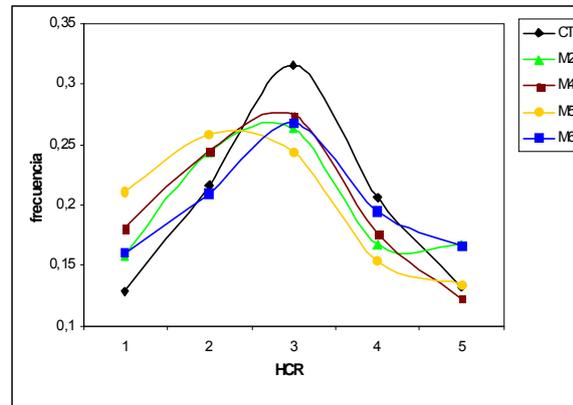
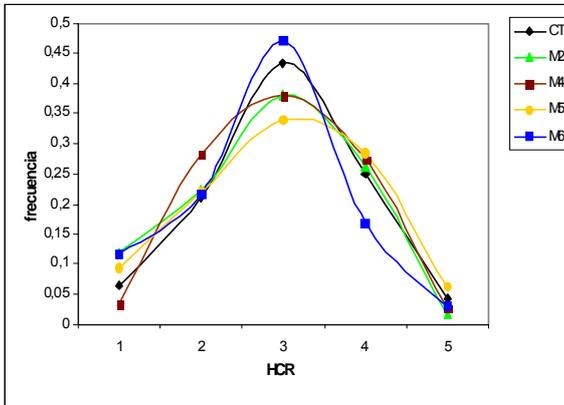


Figura 9b. Curvas de distribución de frecuencias en las poblaciones seleccionadas por los métodos determinísticos para las variables *hcr*, *ain*, *alp*. La columna de la izquierda corresponde a la colección de *L. perenne* y la de la derecha a *L. multiflorum*. **CT:** colección total.

Si se representa la contribución relativa acumulada de cada accesión a la inercia de la nube de puntos en el ACP (**Figura 10**), 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 de muestreo (**Tabla 21**). En dicha tabla se puede comprobar que el *M6* es el que más diversidad conserva (8 variables para *L. multiflorum* y 6 variables para *L. perenne*). Es de destacar que en *L. multiflorum* el segundo método más conservativo fue el *M2* con 2 variables, y en *L. perenne* el segundo método más conservativo fue el *M5* con 4 variables. Ambos métodos están basados en el índice de diversidad de Shannon-Weaver, por lo tanto esta estrategia podría ser tenida en cuenta como alternativa al *M6*.

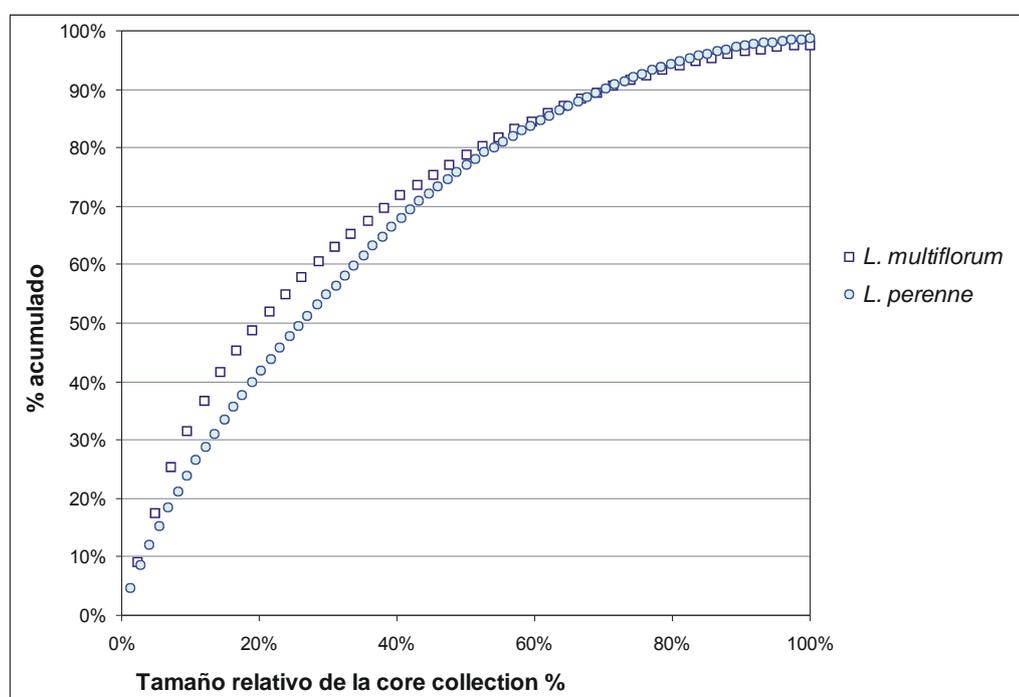


Figura 10. Curva de contribución relativa (CRI) acumulada de las accesiones a la varianza total de la nube de puntos en el análisis de componentes principales en las colecciones de *L. perenne* y *L. multiflorum*

Tabla 21. Índices de diversidad de Shannon-Weaver para las colecciones nucleares creadas en cada método y en las colecciones de partida (**CT**). En negrita se resaltan los valores máximos para cada método. La descripción de variables se especifica en la **Tabla 4** del Capítulo I.

<i>Lolium multiflorum</i>												
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%
<i>Lolium perenne</i>												
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 diversidad media calculada en la colección de *L. multiflorum* (2,705), es mayor que en *L. perenne* (2,527). El *M4* 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 *M2*, *M5* y *M6*. En dichos métodos se alcanzan retenciones superiores al 100%, (*M6* en *L. multiflorum* y *M2*, *M5* 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.*, 1998a, 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). La contribución relativa a la inercia de la nube de puntos se representa en la **Figura 11**, 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.

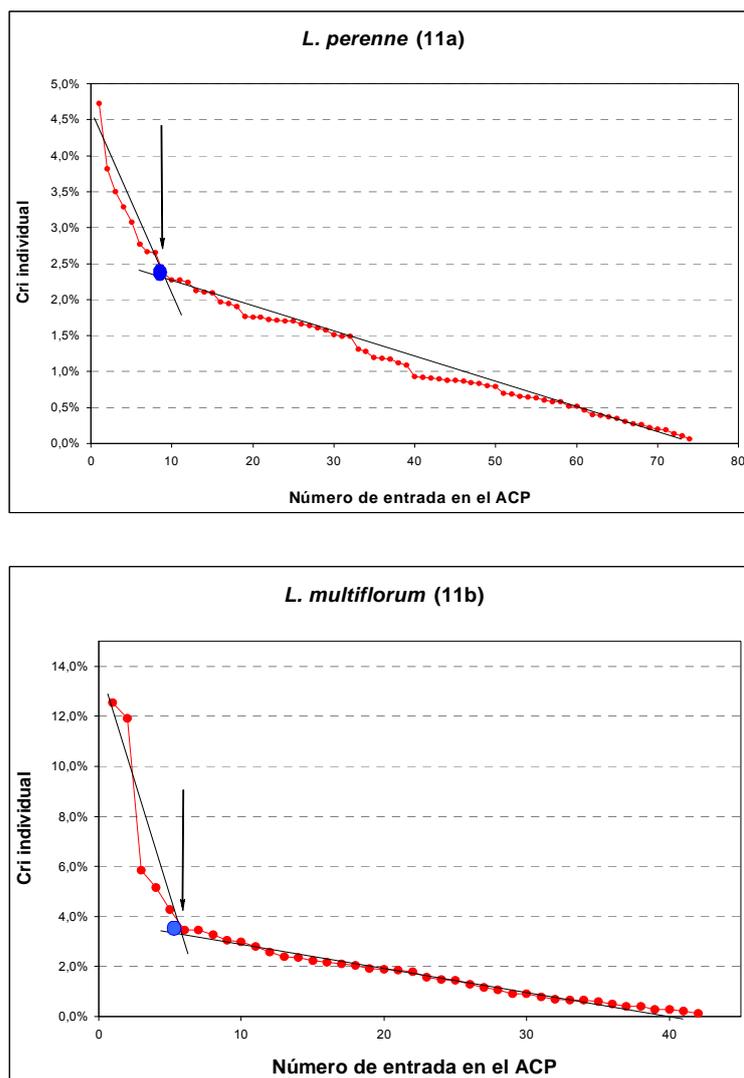


Figura 11. Contribución individual relativa (CRi) de cada accesión a la varianza total de la nube de puntos en el análisis de componentes principales en raigrás inglés (**11a**) y raigrás italiano (**11b**). El punto señalado delimita las poblaciones seleccionadas para la colección nuclear.

Finalmente se muestra en la **Tabla 22** los valores medios de las variables agronómicas y lugar de procedencia de las poblaciones seleccionadas por el *M6*.

En la **Figura 12** se muestra la distribución geográfica de las accesiones seleccionadas en las dos colecciones nucleares.

Tabla 22. Valores medios de las variables agronómicas en las poblaciones seleccionadas por el M6 en *L. perenne* y *L. multiflorum*. Se muestran los valores medios de las colecciones de partida.

<i>Lolium perenne</i>											
Provincia	COD	fes	cri	crp	cre	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr
ASTURIAS	139	120,51	16,22	42,63	135,06	6,58	18,81	100,63	91,53	3,34	2,46
GRANADA	168	132,63	11,40	29,92	166,14	4,70	14,26	84,76	74,14	3,63	1,86
LA CORUNA	134	147,82	23,57	81,23	315,96	6,11	13,88	115,23	84,19	4,09	2,57
LA CORUNA	102	151,30	25,39	56,29	167,87	4,30	11,64	104,78	74,62	4,14	2,53
LEON	176	132,49	4,56	13,07	54,30	4,50	12,75	72,74	65,21	3,27	3,22
LUGO	104	134,18	13,35	38,35	156,48	6,35	19,48	92,85	99,37	2,55	2,33
MURCIA	182	137,99	9,80	24,48	77,96	4,55	12,81	76,48	65,27	2,38	2,40
PONTEVEDRA	128	144,79	29,64	69,27	196,86	5,36	16,27	123,00	87,71	4,26	3,00
PONTEVEDRA	98	147,83	31,19	68,28	216,99	5,20	13,84	155,61	82,61	4,59	2,72
Media		138,84	18,35	47,06	165,29	5,29	14,86	102,90	80,52	3,58	2,57
Colección total		135,89	16,03	41,14	141,18	5,08	14,12	104,09	84,46	3,42	2,97
<i>Lolium multiflorum</i>											
Provincia	COD	fes	crp	cre	crv	ahb	lhb	ain	alp	enf	hcr
LUGO	47	134,90	29,65	127,0	33,88	11,2	28,08	71,72	120,8	3,78	3,92
OVIEDO	90	136,90	7,11	50,80	5,05	5,72	14,02	72,02	64,78	3,79	1,81
PONTEVEDRA	50	74,63	7,80	18,99	0,00	7,02	11,81	37,64	55,38	2,79	3,58
STA. CRUZ	86	111,65	9,91	30,42	0,00	8,03	14,39	47,71	77,30	2,11	1,91
SANTANDER	37	133,78	44,81	161,9	55,03	8,57	23,22	128,22	106,4	3,65	2,92
SANTANDER	38	134,03	36,65	137,6	60,69	8,58	22,04	83,33	114,9	3,78	3,74
Media		120,98	22,66	87,82	25,78	8,19	18,93	73,44	89,93	3,32	2,98
Colección total		112,38	19,30	67,15	17,68	7,97	17,21	71,91	84,37	3,31	3,02

ESPECIE

 *Lolium multiflorum* (6)

 *Lolium perenne* (9)

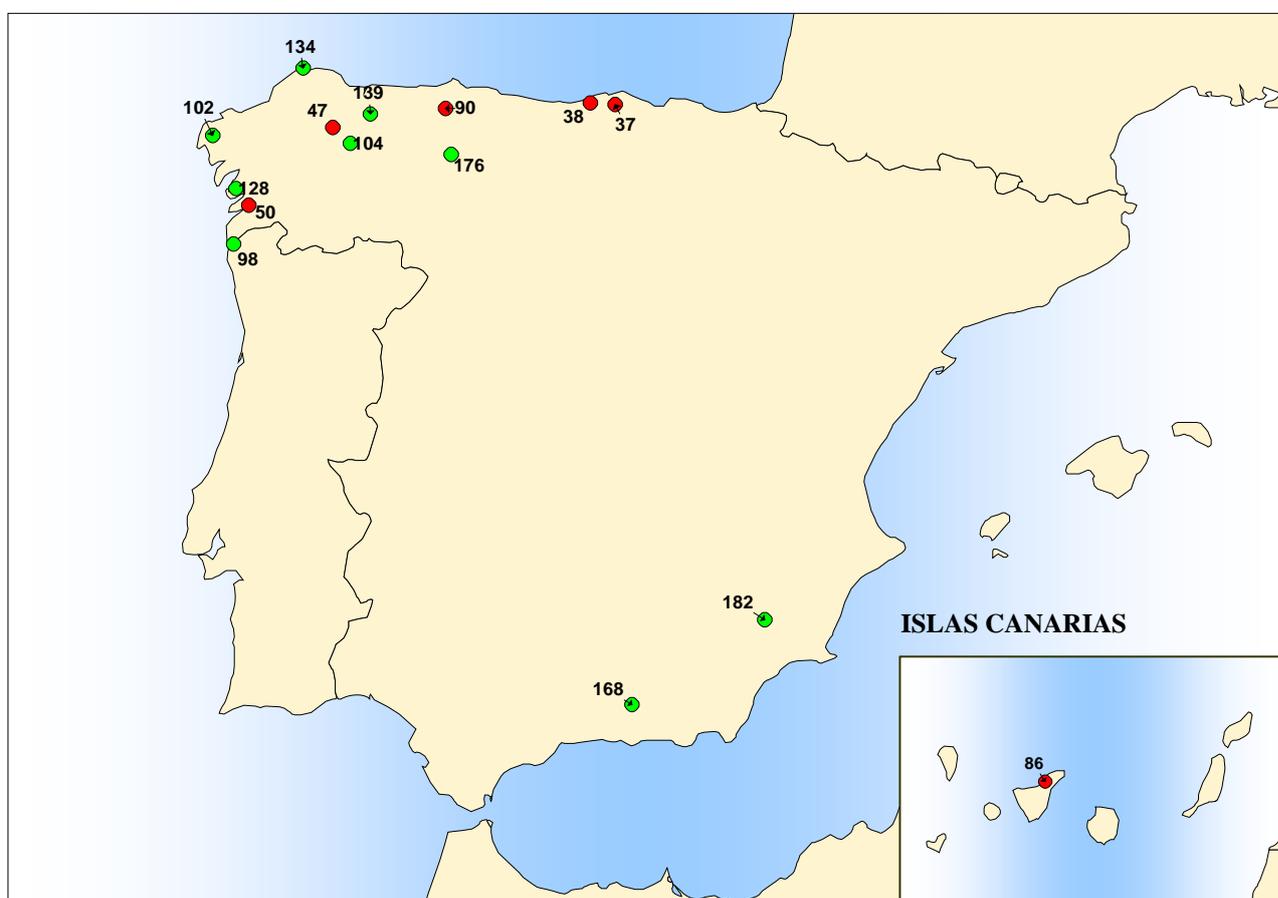


Figura 12. Esquema de la distribución geográfica de las accesiones seleccionadas para las colecciones nucleares en *L. perenne* y *L. multiflorum*.

5. 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 infrarepresentación 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.

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 (*M6*) 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 permite la obtención de una suficiente cantidad de semilla seleccionada, optimizando el empleo de los recursos fitogenéticos del CIAM para su uso en mejora.

CAPÍTULO III: Estudio de la conservación de la diversidad genética en poblaciones experimentales de *L. multiflorum* mediante caracteres agronómicos e isoenzimáticos

RESUMEN

Una alternativa a la creación de colecciones nucleares para facilitar la conservación de la diversidad genética es el crear poblaciones heterogéneas o “pools” mediante multiplicación en panmixia de poblaciones seleccionadas en grupos agronómicamente similares. Se crearon dos poblaciones heterogéneas a partir de cinco poblaciones originales de raigrás italiano. El primer pool, de fecha de espigado intermedia (finales de marzo a principios de abril), se creó mediante multiplicación en panmixia de tres accesiones. El otro pool, de fecha de espigado tardía (segunda quincena de abril), se creó mediante multiplicación en panmixia de dos accesiones. Se multiplicaron también las cinco accesiones originales aisladamente. Se analizó la descendencia resultante y las poblaciones originales mediante caracteres agromorfológicos y marcadores isoenzimáticos. La creación de pools permitió en general una conservación eficaz de la expresión fenotípica de los caracteres agronómicos de las poblaciones originales en los pool, si bien se observaron diferencias significativas en alguna variable en las poblaciones multiplicadas independientemente. El análisis isoenzimático mostró la pérdida de algún alelo raro, sin embargo no se observó la pérdida de ningún alelo común (frecuencias alélicas mayores del 5%). Los componentes claves de la diversidad, la heterocigosidad y el número medio de alelos por *locus* se mantuvieron después de un ciclo de multiplicación.

1. INTRODUCCIÓN

Los principales objetivos de los recursos genéticos y las colecciones de germoplasma son la mejora genética y la conservación de importantes, pero a menudo desconocidas características para el futuro (Guy *et al.*, 1989). Sin embargo, el mantenimiento de un elevado número de accesiones en tales colecciones plantea dificultades de manejo y conservación, pudiendo ser un obstáculo para su evaluación y utilización (Holden, 1984). La multiplicación de las accesiones individuales en colecciones grandes es, a menudo, costosa y resulta viable sólo con un número limitado de las mismas. De los diversos pasos implicados en la operación de conservación (recolección, multiplicación y almacenamiento), el factor más limitante es siempre la multiplicación. En especies autógamas es relativamente fácil el mantenimiento de las accesiones individuales. En especies alógamas anemófilas la necesidad de aislamiento restringe el número de accesiones que pueden ser multiplicadas en el mismo área, mientras que en especies entomófilas es prácticamente imposible el control estricto de la polinización (Guy *et al.*, 1989). La multiplicación es uno de los procesos más cruciales en el mantenimiento de los bancos de germoplasma, y es un paso en el que las accesiones son particularmente vulnerables a la pérdida de diversidad (Breese, 1989). Para evitar los problemas inherentes a la regeneración de entradas en colecciones grandes se ha propuesto que un número limitado y representativo de accesiones, elegidas por presentar una alta diversidad genética, pueda ser mantenido y utilizado como muestra de la colección completa. Este grupo sería denominado *core collection* (colección nuclear), concepto introducido por Frankel (1984), y ya discutido en el Capítulo II de éste trabajo). Sin embargo, si el propósito es utilizar los recursos genéticos directamente en mejora, el uso de poblaciones heterogéneas puede ser una alternativa para proporcionar germoplasma adaptado a los mejoradores genéticos.

Este trabajo, trata de comparar la estrategia de multiplicar individualmente las poblaciones seleccionadas dentro de grupos agronómicamente similares, con la

estrategia de reagrupar dichas poblaciones por multiplicación en panmixia, con el fin de constituir unos *pools* con características agronómicas definidas y fácilmente utilizables en un programa de selección.

Los objetivos de este trabajo fueron:

- 1) La creación de dos poblaciones experimentales mediante cruce en panmixia de dos grupos de accesiones agronómicamente similares.
- 2) La multiplicación en panmixia de las accesiones originales.
- 3) La comparación entre las poblaciones originales, las multiplicadas y las poblaciones experimentales mediante dos años de caracterización agronómica y mediante estudios isoenzimáticos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Estudio agronómico

Con el fin de evaluar posibles cambios en la diversidad genética mediante marcadores agromorfológicos e isoenzimáticos en variedades locales de raigrás italiano anual, en un primer ciclo de multiplicación se escogieron cinco poblaciones pertenecientes a dos clases agronómicas creadas mediante la aplicación de métodos multivariantes a una caracterización agromorfológica realizada por Oliveira *et al.*, (1997b). Se seleccionaron las poblaciones 59 (Luarca), 61 (Pravia) y 62 (Prendes) pertenecientes al *Grupo agronómico 1*, con una fecha de espigado intermedia (finales de marzo a principios de abril, y también se seleccionaron las poblaciones 55 (Ordenes) y 66 (Padrón), pertenecen al *Grupo agronómico 2*, con una fecha de espigado tardío (segunda quincena de abril). Con objeto de obtener semilla multiplicada en el otoño de 1999, las cinco poblaciones originales se sembraron en condiciones de invernadero y se transplantaron al campo en el invierno de 1998 utilizando 100 plantas por genotipo.

Se usaron mallas de plástico negro para evitar malas hierbas (**Figura 13a**). Debido a que el raigrás italiano es una especie alógama y con polinización anemófila, las parcelas de multiplicación se aislaron mediante un cultivo de trigo autóctono gallego de caña alta, separándolas 20 metros de cualquier fuente de polen contaminante (otra parcela de multiplicación, cultivo, población natural, etc.). Al finalizar el periodo de floración, las espigas se cerraron en bolsas de papel para recoger la semilla resultante (**Figura 13b**), y posteriormente se guardó en cámaras de conservación con condiciones controladas de humedad y temperatura. La semilla así recolectada se etiquetó con los nombres de las poblaciones originales seguidos del sufijo “_M”, (Luarca_M, Pravia_M, Prendes_M, Ordenes_M y Padrón_M). Dentro de cada población, hay a menudo grandes diferencias en el rendimiento en semilla por planta, por lo que se suele recomendar recoger igual cantidad de semilla de cada

planta para tratar de evitar cambios genéticos y posibles pérdidas de alelos adaptativos (Breese y Tyler, 1981). Este método requiere unas necesidades grandes de mano de obra y debido a las limitaciones en recursos no siempre es el más utilizado. En general, la semilla se recoge en conjunto en 90-100 plantas por población. De esta manera, tras la multiplicación, la cantidad de semilla disponible por población varía de 100 a 800 gramos. En nuestro caso la semilla se recogió individualmente en todas las plantas de cada población, realizándose una mezcla equilibrada, y pesando posteriormente la misma cantidad de semilla por cada planta para que cada genotipo contribuyera con igual peso a la mezcla total.



Figura 13. Detalle de los campos de multiplicación establecidos en el CIAM. Superior (**13a**): labores de preparación del terreno. Inferior (**13b**): embolsado de las plantas individuales para la obtención de semilla una vez madurada ésta.

Al mismo tiempo se establecieron dos campos más de multiplicación aislados para crear dos poblaciones experimentales mediante cruzamiento de las tres poblaciones del *Grupo agronómico 1* (34 plantas por población) y las dos poblaciones del *Grupo agronómico 2* (51 plantas por población). La semilla resultante se recolectó individualmente en cada una de las plantas madre y se efectuó una mezcla equilibrada, para crear los dos *pools* genéticos, denominados "Pool 1" (mezcla de las poblaciones del *Grupo agronómico 1*) y "Pool 2" (mezcla de las poblaciones del *Grupo agronómico 2*).

De esta forma a finales del año 1999 se obtuvieron un total de 12 poblaciones para el estudio de la conservación de la diversidad genética (**Tabla 23**).

Tabla 23. Poblaciones estudiadas en el ensayo de conservación de diversidad genética mediante la creación de poblaciones experimentales o "pools" genéticos.

COD	POBLACIÓN	TIPO	GRUPO
Poblaciones originales			
55	ORDENES	Población original	2
59	LUARCA	Población original	1
61	PRAVIA1	Población original	1
62	PRENDES	Población original	1
66	PADRON1	Población original	2
Poblaciones multiplicadas			
218	ORDENES_M	Población multiplicada	2
219	LUARCA_M	Población multiplicada	1
220	PRAVIA1_M	Población multiplicada	1
221	PRENDES_M	Población multiplicada	1
222	PADRON1_M	Población multiplicada	2
Pools genéticos			
216	POOL1 medio	Población experimental	1
217	POOL2 tardío	Población experimental	2

Durante el invierno de 1999-00 se sembraron bajo condiciones de invernadero las cinco poblaciones originales, las cinco poblaciones multiplicadas, los dos pools y la variedad 'Vitesse' como testigo. Las plantas se transplantaron al campo a los dos meses y se estableció un diseño en bloques completos al azar con cinco repeticiones utilizando 10 plantas por cada población y bloque. De esta manera, se instalaron 10 plantas x 5 repeticiones x 12 poblaciones (5 originales + 5 multiplicadas + 2

poblaciones experimentales) = 600 plantas en un campo de plantas aisladas, más el testigo 'Vitesse' con cinco repeticiones. Las plantas individuales se transplantaron a una distancia de 0,5 m entre líneas y a 0,5 m entre plantas (**Figura 14**). Como abonado de fondo se aplicó 8:15:15 (1000 kg de abono/ha). Debido al carácter individual de las anotaciones, el control de malas hierbas tuvo que ser muy exhaustivo para tener una mayor precisión en las anotaciones. Se practicaron varias aplicaciones de herbicida, utilizando Gramoxone al 2% y cubriendo las plantas con envases para protegerlas de la posible deriva del herbicida (**Figura 1** del Capítulo I). El ensayo de campo se realizó en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (43° 15' N, 8° 18' O) en A Coruña, a 100 m de altitud y cercano a la costa. Debido al carácter anual del raigrás italiano, el ensayo se repitió completamente al año siguiente (2001), transplantado de nuevo las 12 poblaciones. Durante los años 2000-2001 se observaron los caracteres agronómicos detallados en la **Tabla 4** del Capítulo I (*fes, ain, alp, hcr, enf, lhb, ahb*) y el crecimiento total anual (*crt*: g de materia seca). Posteriormente a cada anotación de crecimiento se efectuó un corte con motosegadora a unos 5 cm del suelo. En la variable de crecimiento (*crt*) se utilizó una escala cualitativa de 1 a 5 y en la fecha de espigado (*fes*) se utilizó una escala cualitativa de 1 a 7. Posteriormente a cada anotación se cortaron 30 plantas (seis de cada valor de la escala) y se pesó su materia seca. Con estos datos se calculó una ecuación de regresión con objeto de saber el valor cuantitativo en g de materia seca para cada uno de los valores de la escala. Se aplicó la misma técnica estadística para la variable *fes* pero contando el número de espigas en cada planta.



Figura 14. Detalle de los campos de caracterización individual de las 12 poblaciones y la variedad 'Vitesse' establecidos en el CIAM.

2.2. Análisis estadísticos

Los datos medios de la evaluación agronómica se analizaron mediante métodos estadísticos multivariantes (análisis de componentes principales, clasificación ascendente jerárquica) para identificar grupos de valor agronómico similar. El efecto multiplicación se evaluó mediante un análisis de varianza a un factor (factor multiplicación con dos tratamientos: sin multiplicación y con multiplicación), y se aplicó de manera independiente a los datos de cada año para cada variable. El modelo de análisis de varianza usado para los datos obtenidos en las plantas aisladas fue el siguiente:

$$X_{ijk} = \mu + b_i + M_j + (b*M)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: X_{ijk} es el valor fenotípico, μ es la media general, b_i es el efecto bloque, M_j es el efecto multiplicación, $(b*M)_{ij}$ es la interacción bloque x multiplicación y ε_{ijk} es el error. El efecto bloque se consideró aleatorio. Se evaluó la significación del factor

multiplicación respecto a la interacción bloque x multiplicación. Las comparaciones efectuadas fueron entre:

- a) Las cinco poblaciones originales frente a las cinco multiplicadas (**Tabla 28**)
- b) Las poblaciones originales con sus respectivos *pools* (**Tablas 29 y 30**).

Los valores medios de las variables fueron seleccionados para efectuar un test de Wilcoxon, que calcula la diferencia entre dos muestras mediante el procedimiento *univariate* del paquete informático SAS (SAS Institute, 1999). En este test se compararon:

- a) Las poblaciones originales con sus respectivos *pools* (**Tablas 31 y 32**).
- b) Las cinco poblaciones originales individualmente frente a las cinco multiplicadas (**Tablas 31 y 32**).

Con las variables cualitativas *hcr* y *enf* se efectuó un test de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952) para detectar diferencias significativas en las comparaciones anteriores.

Todos los análisis estadísticos se efectuaron con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

2.3. Análisis de isoenzimas

En genética de poblaciones es esencial un estudio de las causas y los efectos de la variación genética dentro y entre las poblaciones, y a pesar de que ya han sido ampliamente superados por otros enfoques más informativos basados en el ADN (como la secuenciación directa del ADN, polimorfismos de un solo nucleótido y microsatélites), aún están entre los sistemas de marcadores más rápidos y más baratos de desarrollar, y son una excelente elección de para proyectos que sólo necesitan identificar bajos niveles de variación genética (Medina *et al.*, 2005, Rodríguez *et al.*, 2009). Virk *et al.*, (2000) compararon experimentalmente la

capacidad de discriminación de cuatro estrategias de identificación en variedades de arroz (isoenzimas, AFLP, microsatélites e ISSR) considerando un número similar de marcadores para cada una. Ellos reportaron que a excepción de ISSR, las demás técnicas clasificaban bien las variedades de arroz, siendo las isoenzimas y los AFLP los más eficientes. Los marcadores AFLP tienen un alto poder de discriminación debido a que generan un considerable número de bandas que pueden analizarse en un único gel, sin embargo, son técnicas que incluyen mayor número de etapas y la exigencia de un alto nivel de pureza del ADN que implica un mayor consumo de tiempo y mayores costos operativos (Ferreira y Grattapaglia 1998; Lee y Henry, 2001).

Para el estudio de electroforesis de isoenzimas se utilizaron entre 75 y 150 plantas de cada una de las 10 poblaciones (cinco originales y cinco multiplicadas) y de cada uno de los dos *pools* genéticos. Se sembraron las 12 poblaciones en bandejas de alvéolos y se mantuvieron en condiciones de invernadero. Las plantas se analizaron cuando tenían entre tres y cuatro hojas bien formadas. Se utilizaron las técnicas estándar de electroforesis en gel de almidón según Hayward y McAdam (1977), Ostergaard *et al.*, (1985), Oliveira y Charmet (1988a, 1988b), Greneche *et al.*, (1991) y Hayward *et al.*, (1995). Se utilizó un tampón histidina/citrato lo que permitió estudiar cinco sistemas enzimáticos: *fosfogluco-isomerasa* (PGI-2, E.C. 5.3.1.9.), *fosfogluco-mutasa* (PGM-1, E.C. 2.7.5.1.), *fosfatasa ácida* (ACP-1, E.C. 3.1.3.2), *shikimato deshidrogenasa* (SDH-1, E.C. 1.1.1.25) y *peroxidasa* (PEX-1, E.C. 1.11.1.7). La nomenclatura alélica y los procedimientos isoenzimáticos fueron los de Hayward *et al.*, (1995). En **la Tabla 24** se muestran los alelos estudiados para cada *locus*. Las hojas cortadas se trituraron en frío entre 0° y 2°C. Como solución de extracción se usó Tris-HCl 0,7M a pH 7,2 y mercaptoethanol al 1%. El extracto resultante se absorbió con tiras de papel Whatman nº 3, y éstas se dispusieron en soportes de tipo Bio-Rad que contenían el gel de almidón. Como marcador genético se usaron 2 líneas de *Lolium temulentum*, ya que es una especie homocigota para todos los sistemas (líneas 1 y 15, de 30 en total por gel). Como tampón de migración se utilizó histidina-citrato. Los geles, preparados con 30 líneas de migración, se

sometieron a tensiones de 300-320V durante 18 horas y posteriormente se cortaron en lonchas de unos 2 mm de grosor. Para el revelado se dispusieron las lonchas en bandejas de plástico con las soluciones apropiadas para cada isoenzima según indica la **Tabla 25**.

Tabla 24. Alelos estudiados para cada sistema enzimático. Los geles se evaluaron etiquetando los alelos en un determinado *locus* como "a", "b", "c", etc., siendo "a" el alelo más rápido. Cuando se observó un nuevo alelo, se denominó "a+" si migra más que el "a" o "c*" si migra menos que el "c" y más que el "d"

SISTEMA	TIPO	ALELOS
<i>Pgm-1</i>	Monomérico	<i>a b c d</i>
<i>Pgi-2</i>	Dimérico	<i>a a⁺ b c c[*] d e</i>
<i>Sdh-1</i>	Monomérico	<i>a b c</i>
<i>Acp-1</i>	Dimérico	<i>a b c d</i>
<i>Pex-1</i>	Monomérico	<i>a b c d</i>

Las frecuencias alélicas se determinaron por conteo directo o bien se guardaba una fotografía digital de cada sistema para su posterior interpretación. Se estimaron estadísticas estándar para caracterizar la variabilidad genética de las poblaciones usando el programa BIOSYS 1 (Swofford y Selander, 1981). Se calcularon las siguientes estadísticas: número medio de alelos por *locus* (**A**), heterocigosidad media observada (**H_o**) y la heterocigosidad media esperada en panmixia (**H_p**). Se calcularon los índices de fijación de Wright (1965) siguientes: **F_{IT}** representa el déficit de heterocigotos relativo en la población total (las 10 poblaciones combinadas); **F_{IS}** que da el déficit relativo de heterocigotos en relación con cada sub-población (promediado en las 10 poblaciones). Ambos parámetros, cuando hay un exceso de heterocigotos se vuelven negativos; **F_{ST}** es el índice de fijación que representa el nivel de diferenciación de las poblaciones y es equivalente al **D_{ST}** de Nei (1973).

Tabla 25. Reactivos y técnicas de revelado de los sistemas enzimáticos

Sistema enzimático	Tampón de revelado	Reactivos	Cantidad	Condiciones
<i>Pgm-1</i> E.C.2.7.5.1 <i>Pgi-2</i> E.C.5.3.1.9	Tris-HCl 0,1M pH 8,0	α -D-fructosa-6P	15 mg	37°C Oscuridad 30 minutos
		Disodio α -D-glucosa-1P	60 mg	
		NADP	10 mg	
		MTT	20 mg	
		PMS	3 mg	
		MgCl ₂ 1M	2 ml	
		Glucosa-6P-deshidrogenasa	50 Ud	
<i>Sdh-1</i> E.C. 1.1.1.25	Tris-HCl 0,1M pH 8,0	Acido shikímico	75 mg	37°C Oscuridad 30 minutos
		NADP	20 mg	
		MTT	25 mg	
		MgCl ₂ 1M	5 ml	
		PMS	3 mg	
<i>Acp-1</i> E.C. 3.1.3.2	Acet. Sódico 0,2M pH 5,5	β -naphtyl-acid-phosphate	100 mg	37°C Oscuridad 45 minutos
		Fast Garmet GBC salt	75 mg	
		Acetona	1 ml	
		MgCl ₂ 1M	2 ml	
<i>Pex-1</i> E.C. 1.11.1.7	Acet. Sódico 0,05M pH 5,5	3-amino-9-ethylcarbazol	80 mg	T ^a ambiente Oscuridad 2 horas
		N-N-dimethyl formamida	5 ml	
		CaCl ₂	3 ml	
		H ₂ O ₂	5 ml	

3. RESULTADOS

3.1. Resultados del estudio agronómico

Las medias de las 8 variables agronómicas en los dos años de evaluación se muestran en la **Tabla 26**. En dicha Tabla se muestran los valores medios de la evaluación agronómica para las poblaciones originales, las poblaciones multiplicadas, los dos pools y la variedad 'Vitesse' utilizada como testigo. La población más productiva fue Ordenes, que estuvo en valores semejantes a la variedad comercial 'Vitesse'. Las poblaciones del *Grupo agronómico 2* fueron más tardías y más productivas que las poblaciones del *Grupo agronómico 1*. Comparando las poblaciones originales con las multiplicadas, éstas últimas se comportaron como ligeramente más tardías y más productivas frente a las originales.

Tabla 26. Resultados medios en los dos años de evaluación para las 8 variables agronómicas estudiadas, comparados con el cultivar comercial 'Vitesse'.

AÑO	COD	Población	fes	crt	alp	ain	ahb	lhb	enf	hcr	
Año 2000	198	'Vitesse'	134,45	90,91	115,45	140,49	8,5	25,09	3,61	3,77	
	Poblaciones originales Pool1										
	59	LUARCA	101,32	30,34	64,44	77,07	8,04	14,14	3,36	2,86	
	61	PRAVIA1	99,8	31,88	62,32	79,24	7,21	13,43	3,75	2,74	
	62	PRENDES	101,8	25,38	61,36	76,7	7,73	15,77	4,29	3,04	
		Media	100,97	29,2	62,71	77,67	7,66	14,45	3,8	2,88	
	Poblaciones originales Pool2										
	55	ORDENES	124,09	76,16	102,21	95,68	8,79	20,79	3,88	3,45	
	66	PADRON1	128,19	79,34	106,7	112,74	8,77	21,4	4,13	3,45	
		Media	126,14	77,75	104,46	104,21	8,78	21,1	4	3,45	
	Poblaciones multiplicadas Pool1										
	219	LUARCA_M	103,43	25,24	74,38	47,7	7,83	13,13	3,38	3,08	
	220	PRAVIA1_M	109,4	34,13	74,2	79,55	7,05	13,65	3,77	3,18	
	221	PRENDES_M	103,33	32,72	82,16	65,09	7,73	14,22	3,29	3,36	
		Media	105,39	30,7	76,91	64,11	7,54	13,67	3,48	3,2	
	Poblaciones multiplicadas Pool2										
	218	ORDENES_M	131,57	92,46	109,47	127,46	13,3	22,21	4,21	3,47	
	222	PADRON1_M	123,92	65,78	104,8	105,92	8,16	18,66	4,12	3,2	
		Media	127,74	79,12	107,13	116,69	10,73	20,44	4,16	3,33	
	Poblaciones experimentales										
216	POOL1medio	106,92	39,16	82,83	78,4	7,43	14,21	3,33	3,02		
217	POOL2tardio	125,06	83,27	104,56	112,83	8,59	20,59	3,56	3,21		
Año 2001	198	'Vitesse'	139,7	118,9	111	154,67	7,83	16,71	3,42	3,94	
	Poblaciones originales Pool1										
	59	LUARCA	100,96	24,51	67,2	58,82	8,52	13,86	3,53	3,74	
	61	PRAVIA1	103,98	35,86	72,92	86,97	7,54	14,23	4,08	3,27	
	62	PRENDES	100,06	29,62	70,52	60,11	8,4	14,73	4,04	3,65	
		Media	101,67	30	70,21	68,63	8,15	14,27	3,89	3,55	
	Poblaciones originales Pool2										
	55	ORDENES	120,3	100,6	94,79	92,01	8,95	18,03	3,31	3,81	
	66	PADRON1	128,72	86,31	99,29	103,63	8,38	16,77	4,18	2,92	
		Media	124,51	93,43	97,04	97,82	8,67	17,4	3,75	3,37	
	Poblaciones multiplicadas Pool1										
	219	LUARCA_M	103,79	25,47	66,77	50,21	7,88	12,85	3,44	3,63	
	220	PRAVIA1_M	114,73	18,96	64	40,92	7,08	13,2	3,38	2,8	
	221	PRENDES_M	112,89	24,18	68,07	52,96	8,14	13,75	3,84	3,07	
		Media	110,47	22,87	66,28	48,03	7,7	13,27	3,55	3,17	
	Poblaciones multiplicadas Pool2										
	218	ORDENES_M	141,82	115,4	100,56	92,91	9,68	19,51	3,33	4,31	
	222	PADRON1_M	129,98	89,85	98,09	106,21	7,96	15,49	4,1	3,38	
		Media	135,9	102,6	99,32	99,56	8,82	17,5	3,72	3,84	
	Poblaciones experimentales										
216	POOL1medio	106,31	32,08	72,4	56,93	8,33	15,38	3,81	3,08		
217	POOL2tardio	134,13	81	89,67	74,59	7,58	14,76	4,09	3,17		

El análisis de componentes principales (ACP) con las cinco poblaciones originales, las cinco poblaciones multiplicadas y las dos poblaciones experimentales explicó un 89% de la varianza total con dos componentes extraídas. La **Tabla 27** muestra las correlaciones de las componentes con las variables.

Tabla 27. Correlaciones entre las variables agronómicas y las dos componentes principales de autovalor mayor que 1. *: significativo al 5%; **: significativo al 1%.

		Correlaciones									
		fes	crt	alp	ain	ahb	lhb	enf	hcr	factor 1	factor 2
fes	Pearson	1	,944(**)	,956(**)	,841(**)	,610(*)	,877(**)	0,359	0,393	,826(**)	0,429
	Sig.		0	0	0,001	0,035	0	0,252	0,206	0,001	0,164
crt	Pearson		1	,970(**)	,913(**)	,684(*)	,964(**)	0,391	0,535	,832(**)	0,521
	Sig.			0	0	0,014	0	0,209	0,073	0,001	0,083
alp	Pearson			1	,889(**)	,607(*)	,921(**)	0,400	0,430	,855(**)	0,434
	Sig.				0	0,036	0	0,198	0,163	0	0,159
ain	Pearson				1	,587(*)	,890(**)	,625(*)	0,371	,922(**)	0,295
	Sig.					0,045	0	0,03	0,235	0	0,353
ahb	Pearson					1	,780(**)	0,076	,865(**)	0,335	,881(**)
	Sig.						0,003	0,815	0	0,287	0
lhb	Pearson						1	0,408	,629(*)	,781(**)	,597(*)
	Sig.							0,188	0,028	0,003	0,041
enf	Pearson							1	-0,074	,776(**)	-0,334
	Sig.								0,818	0,003	0,288
hcr	Pearson								1	0,098	,929(**)
	Sig.									0,761	0
Factor 1	Pearson									1	0
	Sig.										1
Factor 2	Pearson										1
	Sig.										

El *Factor 1* correlaciona con todas las variables excepto con *ahb* y *hcr*. La clasificación ascendente jerárquica delimitó dos grupos de poblaciones que coincide con la clasificación agronómica inicial: en el *clúster 1* se agruparon las poblaciones originales, multiplicadas y la experimental pertenecientes al *Grupo agronómico 2* (55, 66, 217, 218 y 222); en el *clúster 2* se agruparon las poblaciones originales, multiplicadas y experimental del *Grupo agronómico 1* (59, 61, 62, 219, 220, 221 Y 216). En la **Figura 15** se muestra el diagrama de dispersión del ACP, en dicha Figura se observa que las poblaciones originales tienden a mantenerse cerca de su respectiva multiplicada, mientras que las poblaciones experimentales se sitúan en el centro de cada nube de puntos (señaladas con un círculo).

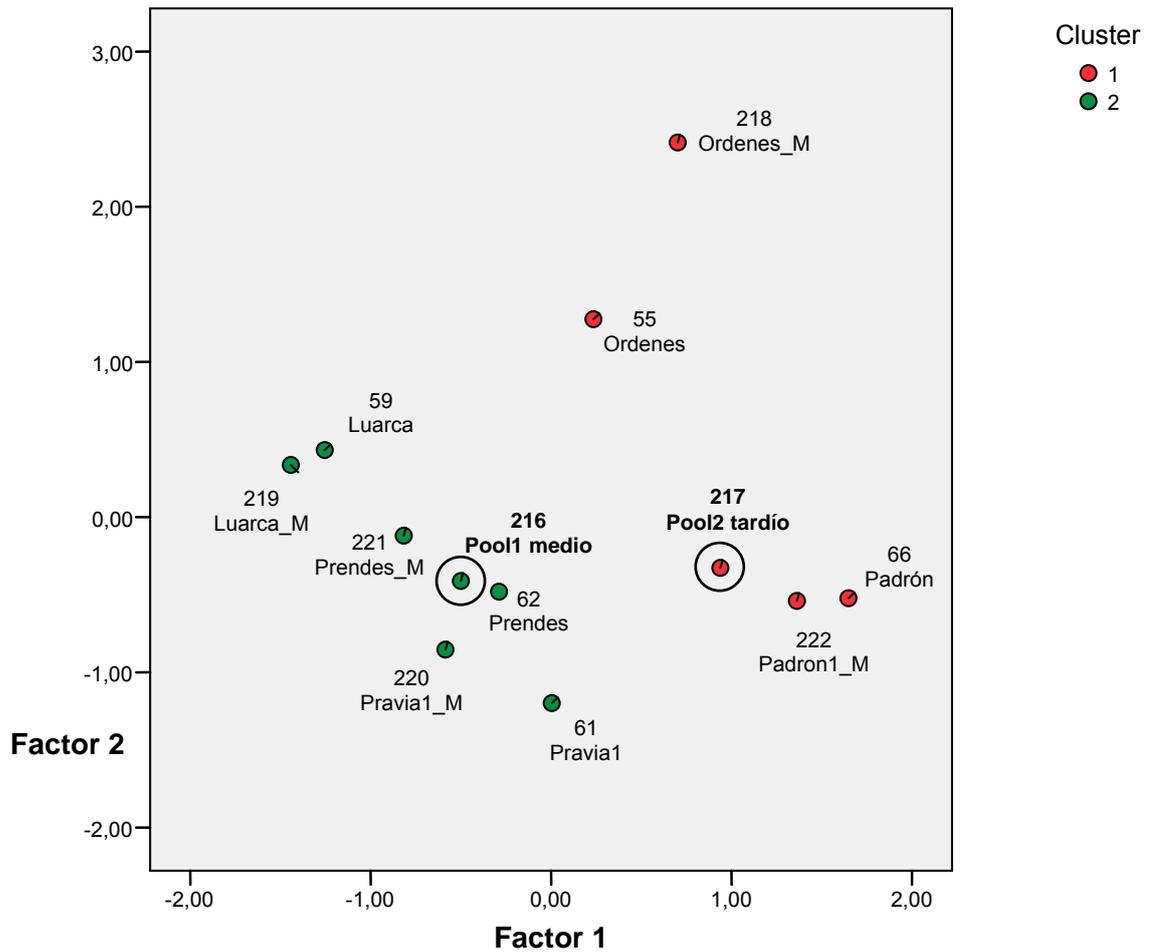


Figura 15. Diagrama de dispersión de las dos primeras componentes principales del ACP. En colores se representan los dos clúster de la clasificación ascendente jerárquica, los cuales coinciden con la clasificación agronómica inicial. Se resaltan con un círculo las dos poblaciones experimentales, que ocupan una posición intermedia entre ambas nubes de puntos.

El diagrama de la clasificación ascendente jerárquica explicó un 67,05% de la varianza. En la **Figura 16** se puede ver la clara separación entre los dos grupos agronómicos. Las poblaciones experimentales ocupan posiciones intermedias en ambos grupos

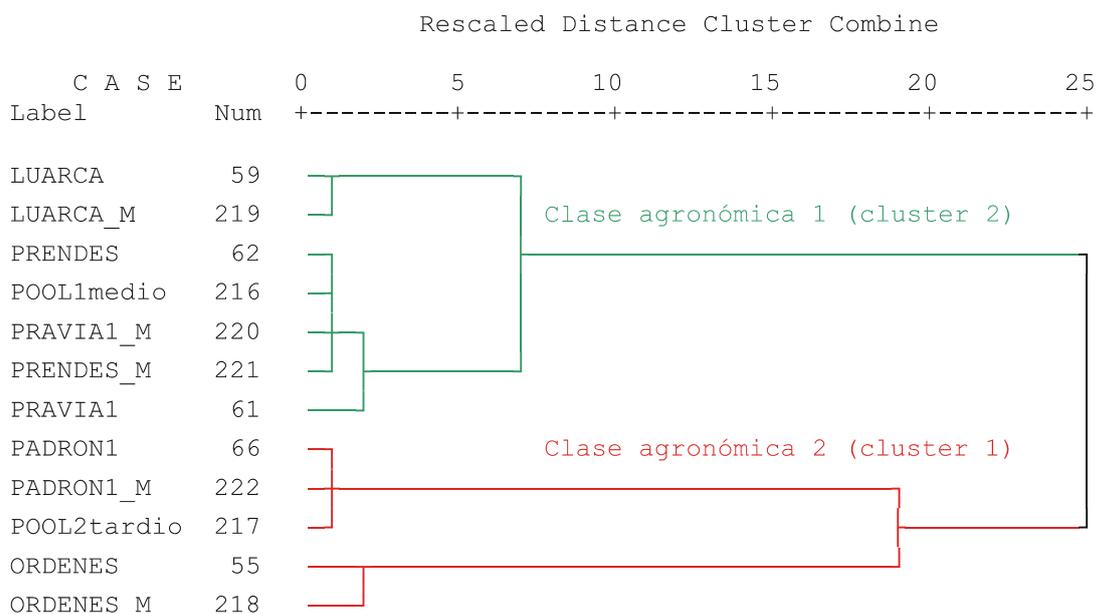


Figura 16. Diagrama de la clasificación ascendente jerárquica basada en las componentes del análisis de componentes principales.

El análisis de varianza de las cinco poblaciones originales frente a las cinco multiplicadas mostró diferencias significativas solamente para la variable *fes* durante el segundo año de evaluación (**Tabla 28**). El resto de variables no mostraron diferencias. Las dos variables cualitativas *enf* y *hcr* fueron significativas durante los dos años de evaluación. Comparando las poblaciones del *Grupo agronómico 1* con su respectivo pool, las variables *fes* y *alp* fueron significativas, el efecto bloque fue significativo en casi todas las variables (**Tabla 29**). Este efecto fue menos acusado en el *Grupo agronómico 2*, en este grupo únicamente se mostraron diferencias en las variables *fes* y *ain* durante el segundo año (**Tabla 30**). En ambos grupos el test de Kruskal Wallis fue significativo para las dos variables cualitativas.

Tabla 28. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables agromorfológicas comparando las cinco poblaciones originales frente a las cinco multiplicadas. **FV:** fuente de variación; **GL:** grados de libertad; *, **: significativo al nivel 5, y 1% respectivamente. El resto de variables se explican en la **Tabla 4** del Capítulo I.

AÑO 2000– COMPARACIÓN DE TODAS LAS POBLACIONES				
FV	BLQ	MULT	BLQ*MULT	ERROR
GL	4	1	4	(GL)
fes	397,57	442,52	79,12	210,96 (412)
crt	3035,93	255,46	1025,03	1420,62 (421)
alp	1540,79	5078,31	856,51	596,43 (402)
ain	937,11	1488,85	2990,03	1995,71 (404)
lhb	150,05	97,91	22,02	40,39 (397)
ahb	63,64	76,44	74,05 **	10,27 (397)
Cualitativas	X²			
enf	67,85 ** (9)			
hcr	57,46 ** (9)			
AÑO 2001 – COMPARACIÓN DE TODAS LAS POBLACIONES				
FV	BLQ	MULT	BLQ*MULT	ERROR
GL	4	1	4	(GL)
fes	273,94	10666,52 **	17,83	257,59 (463)
crt	2970,82	124,98	7445,87	1870,29 (460)
alp	727,77	89,41	472,01	375,01 (457)
ain	2919,23	12955,41	5530,96	2516,73 (456)
lhb	75,70 **	22,68	26,85	19,11 (440)
ahb	2,91	3,92	3,73	2,38 (440)
Cualitativas	X²			
enf	48,23 ** (9)			
hcr	87,04 ** (9)			

Tabla 29. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables agromorfológicas comparando las tres poblaciones originales del *Grupo agronómico 1* frente a la población experimental. **FV:** fuente de variación; **GL:** grados de libertad; *, **: significativo al nivel 5, y 1% respectivamente. El resto de variables se explican en la **Tabla 4** del Capítulo I.

AÑO 2000 – GRUPO AGRONÓMICO 1				
FV	BLQ	MULT	BLQ*MULT	ERROR
GL	4	1	4	(GL)
fes	93,26 **	1193,11 *	91,68 **	13,55 (143)
crt	977,02**	3935,60	482,36	198,43 (145)
alp	115,83 **	12391,71 **	108,55 *	32,28 (133)
ain	908,62	51,17	905,09	520,55 (138)
lhb	28,31 **	1,35	31,02 **	3,54 (138)
ahb	2,83 **	1,82	2,84 **	0,53 (138)
Cualitativas	X²			
enf	75,52 ** (3)			
hcr	60,49 ** (3)			
AÑO 2001 - GRUPO AGRONÓMICO 1				
FV	BLQ	MULT	BLQ*MULT	ERROR
GL	4	1	4	(GL)
fes	53,47	792,86 *	48,08	76,65 (184)
crt	1213,37 *	146,21	667,84	275,04 (184)
alp	426,521 **	147,08	467,69 **	101,74 (184)
ain	4070,87 *	5109,68	1904,76	1497,36 (184)
lhb	48,47 **	46,36	38,56 **	9,61 (184)
ahb	2,58	1,09	3,92	1,56 (184)
Cualitativas	X²			
enf	9,23 * (3)			
hcr	16,92 ** (3)			

Tabla 30. Cuadrados medios del análisis de varianza para las variables agromorfológicas comparando las dos poblaciones originales del *Grupo agronómico 2* frente a la población experimental. **FV:** fuente de variación; **GL:** grados de libertad; *, **: significativo al nivel 5, y 1% respectivamente. El resto de variables se explican en la **Tabla 4** del Capítulo I.

AÑO 2000 - GRUPO AGRONÓMICO 2				
FV	BLQ	MULT	BLQ*MULT	ERROR
GL	4	1	4	(GL)
fes	130,62	25,60	92,72	116,95 (115)
crt	3306,99	729,93	1152,01	1682,10 (116)
alp	603,01	10,71	188,41	373,09 (114)
ain	1863,15	641,61	3142,49	2375,59 (108)
lhb	80,27	12,79	13,48	52,56 (111)
ahb	6,07	1,39	2,44	4,97 (111)
Cualitativas	X²			
enf	3,49 (2)			
hcr	1,05 (2)			
AÑO 2001 - GRUPO AGRONÓMICO 2				
FV	BLQ	MULT	BLQ*MULT	ERROR
GL	4	1	4	(GL)
fes	434,55 **	3041,19 **	73,87	157,64 (136)
crt	1347,70	4693,36	3797,99	1748,47 (134)
alp	507,61	1683,35	406,18	243,34 (133)
ain	1766,28	17528,18 **	128,41	2602,78 (131)
lhb	41,98	153,24	62,10 **	17,71 (121)
ahb	5,65 *	18,81	5,22	2,22 (121)
Cualitativas	X²			
enf	21,29 ** (2)			
hcr	26,34 ** (2)			

El test de Wilcoxon no mostró diferencias en ninguna de las comparaciones del *Grupo agronómico 1* (**Tabla 31**). Sin embargo en el *Grupo agronómico 2* se mostraron diferencias significativas entre las dos poblaciones originales y sus respectivas multiplicadas, pero no entre su respectivo *pool* o población experimental (**Tabla 32**).

Tabla 31. Test de Wilcoxon para las poblaciones del *Grupo agronómico 1*. *, **: Significativo al nivel 5, y 1% respectivamente.

Test de Wilcoxon – Grupo agronómico 1	
Originales versus Pool1	Originales versus Multiplicadas
Luarca versus Pool 1	Luarca versus Luarca_M
Signed Rank: -13 Pr >= S 0.0781	Signed Rank: 5 Pr >= S 0.5469
Pravia versus Pool 1	Pravia versus Pravia_M
Signed Rank: -6 Pr >= S 0.3750	Signed Rank: 6 Pr >= S 0.4609
Prendes versus Pool 1	Prendes versus Prendes_M
Signed Rank: -8 Pr >= S 0.3125	Signed Rank: 3 Pr >= S 0.7422

Tabla 32. Test de Wilcoxon para las poblaciones del *Grupo agronómico 2*. *, **: Significativo al nivel 5, y 1% respectivamente.

Test de Wilcoxon – Grupo agronómico 2	
Originales versus Pool2	Originales versus Multiplicadas
Ordenes versus Pool 2	Ordenes versus Ordenes_M
Signed Rank: 9 Pr >= S 0.2500	Signed Rank: -18 Pr >= S 0.0078 **
Padron versus Pool 2	Padron versus Padron_M
Signed Rank: 12 Pr >= S 0.1094	Signed Rank: 16 Pr >= S 0.0234 *

3.2. Resultados del estudio isoenzimático

Cada uno de los cinco sistemas enzimáticos reveló un *locus* polimórfico: PGI-2, PGM-1, ACP-1, PRX-1 y SDH-1. El patrón *Lolium temulentum* resultó monomórfico y homocigótico con los siguientes alelos fijados: PGI-2a, PGM-1a, ACP-1d, PRX-1d y SDH-1b.

Las frecuencias alélicas de las poblaciones multiplicadas difirieron significativamente de las frecuencias de las poblaciones originales en cuatro de 15 *loci* polimórficos en las poblaciones del *Grupo agronómico 1* y en cuatro de 10 *loci* polimórficos en las poblaciones del *Grupo agronómico 2* (**Tablas 33 y 34**). Se produjo también la pérdida de los siguientes alelos raros (frecuencia < 0,05), según la clasificación de Brown (1978): el alelo "a" del *locus* PGI-2 de la población Padrón, el alelo "c*" del *locus* PGI-2 presente en la población Pravia y el alelo "d" del *locus* SDH-1 presente en la población Luarca y que desapareció al multiplicarla.

En la **Figura 17** se muestran ejemplos de algunas fotografías digitales tomadas de los sistemas enzimáticos estudiados para algunas poblaciones. Las calles número 15 y 30 siempre corresponden a la especie *Lolium temulentum* utilizada como marcador por ser homocigoto para todos los sistemas.

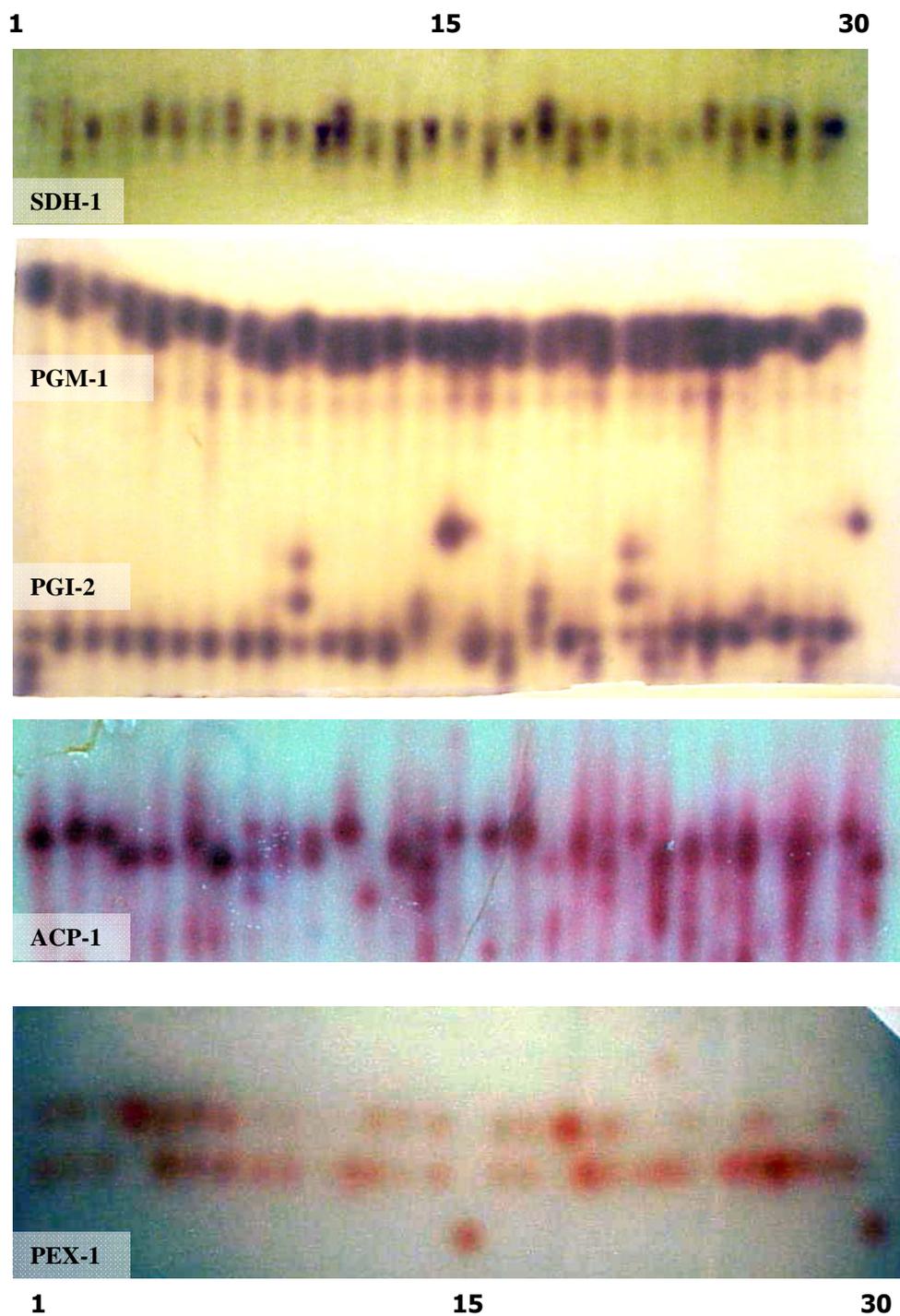


Figura 17. Fotografías digitales de los sistemas enzimáticos estudiados

Tabla 33. Frecuencias alélicas en cinco *loci*, para las poblaciones del *Grupo agronómico 1* (Luarca, Pravia, Prendes) y las mismas poblaciones multiplicadas (Luarca_M, Pravia_M y Prendes_M). El valor χ^2 compara la proporción de alelos en las poblaciones originales con los de las poblaciones multiplicadas. *, **, ***: significativo al nivel 5, 1 y 0,1% respectivamente; **N**: Número de datos.

<i>Locus</i>	Alelo	Poblaciones					
		Luarca N	Luarca_M N	Pravia N	Pravia_M N	Prendes N	Prendes_M N
PGI-2		98	135	111	106	103	109
	A	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000
	B	0,041	0,026	0,068	0,057	0,024	0,032
	C	0,098	0,085	0,072	0,094	0,068	0,087
	D	0,827	0,833	0,779	0,802	0,830	0,849
	E	0,036	0,056	0,059	0,033	0,078	0,032
	A ⁺	0,000	0,000	0,009	0,009	0,000	0,000
	C*	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000
χ^2		7,83		4,44		3,87	
PGM-1		99	139	111	105	103	86
	A	0,778	0,824	0,752	0,619	0,782	0,756
	B	0,222	0,176	0,230	0,333	0,218	0,244
	C	0,000	0,000	0,018	0,048	0,000	0,000
χ^2		1,71		12,56**		0,33	
ACP-1		99	133	114	106	102	109
	A	0,081	0,004	0,039	0,024	0,078	0,060
	B	0,667	0,639	0,667	0,627	0,662	0,583
	C	0,187	0,293	0,259	0,288	0,230	0,344
	D	0,066	0,064	0,035	0,061	0,029	0,014
χ^2		17,89**		3,25		8,49*	
PEX-1		100	102	113	96	100	113
	A	0,060	0,034	0,080	0,083	0,100	0,062
	B	0,555	0,500	0,345	0,427	0,570	0,434
	C	0,385	0,466	0,527	0,484	0,325	0,491
	D	0,000	0,000	0,049	0,005	0,005	0,013
χ^2		3,44		6,00		16,34**	
SDH-1		96	109	78	78	96	84
	A	0,036	0,060	0,045	0,077	0,083	0,113
	B	0,760	0,821	0,821	0,788	0,703	0,673
	C	0,193	0,128	0,119	0,128	0,214	0,214
	D	0,010	0,000	0,006	0,006	0,000	0,000
	χ^2		4,67		1,93		1,02

Tabla 34. Frecuencias alélicas en cinco *loci*, para las poblaciones del *Grupo agronómico 2* (Ordenes y Padrón) y la mismas poblaciones multiplicadas (Ordenes_M y Padrón_M). El valor χ^2 compara la proporción de alelos en las poblaciones originales con los de las poblaciones multiplicadas. *, **, ***: significativo al nivel 5, 1 y 0,1% respectivamente; **N**: número de datos.

<i>Locus</i>	Alelo	Poblaciones			
		Ordenes	Ordenes_M	Padrón	Padrón_M
		N	N	N	N
PGI-2		140	140	142	143
	a	0,014	0,061	0,039	0,000
	b	0,157	0,186	0,190	0,147
	c	0,211	0,179	0,127	0,059
	d	0,593	0,543	0,609	0,738
	e	0,021	0,021	0,032	0,052
	a ⁺	0,000	0,000	0,004	0,003
	c*	0,004	0,011	0,000	0,000
	χ^2		25,92**		12,31
PGM-1		145	153	142	119
	a	0,810	0,876	0,796	0,702
	b	0,190	0,124	0,204	0,298
	χ^2		4,25*		6,48*
ACP-1		111	136	143	123
	a	0,072	0,059	0,101	0,098
	b	0,649	0,699	0,692	0,691
	c	0,239	0,210	0,196	0,195
	d	0,041	0,033	0,010	0,016
	χ^2		1,53		0,45
PRX-1		107	148	142	147
	a	0,042	0,020	0,035	0,075
	b	0,379	0,345	0,356	0,367
	c	0,579	0,635	0,609	0,558
	χ^2		2,95		7,41*
SDH-1		112	123	110	113
	a	0,125	0,150	0,086	0,080
	b	0,683	0,683	0,655	0,633
	c	0,192	0,167	0,259	0,288
	χ^2		1,02		0,49

El número medio de alelos por *locus*, el porcentaje de *loci* polimórficos y las heterocigosidades medias resultaron muy similares en las diferentes poblaciones (**Tabla 35**). Las comparaciones entre las heterocigosidades medias por *locus*, observadas y esperadas asumiendo la distribución de Hardy-Weinberg (Nei, 1973) mostraron ligeras diferencias a favor de las heterocigosidades esperadas (errores estándar entre paréntesis). Por este motivo, puede haber un ligero déficit de heterocigotos en las poblaciones originales y multiplicadas.

Tabla 35. Resumen de la variabilidad genética en las poblaciones originales y multiplicadas (los errores estándar se dan entre paréntesis), Ho: heterocigosidad observada, Hs: heterocigosidad esperada por Hardy-Weinberg.

Poblaciones	Tamaño medio por <i>locus</i>	Nº medio de alelos por <i>locus</i>	Porcentaje de loci polimórficos	Heterocigosidad media	
				Ho	Hs
Poblaciones originales					
Luarca	98,4 (0,7)	3,4 (0,4)	100	0,355 (0,024)	0,373 (0,046)
Pravia	105,4 (6,9)	4,4 (0,7)	100	0,381 (0,044)	0,432 (0,050)
Prendes	100,8 (1,3)	3,4 (0,4)	100	0,386 (0,031)	0,433 (0,049)
Ordenes	123,0 (8,0)	3,6 (0,7)	100	0,415 (0,060)	0,482 (0,046)
Padrón	135,8 (6,5)	3,6 (0,7)	100	0,329 (0,056)	0,476 (0,041)
Media	112,7 (4,7)	3,7 (0,6)	100	0,359 (0,043)	0,448 (0,046)
Poblaciones multiplicadas					
Luarca_M	123,6 (7,5)	3,2 (0,4)	100	0,366 (0,042)	0,387 (0,054)
Pravia_M	98,2 (5,4)	4,2 (0,5)	100	0,398 (0,045)	0,462 (0,047)
Prendes_M	100,2 (6,3)	3,4 (0,4)	100	0,376 (0,035)	0,449 (0,056)
Ordenes_M	140,0 (5,2)	3,6 (0,7)	100	0,411 (0,077)	0,457 (0,067)
Padron_M	129,0 (6,8)	3,4 (0,5)	100	0,399 (0,054)	0,478 (0,025)
Media	118,2 (6,2)	3,6 (0,5)	100	0,366 (0,051)	0,447 (0,049)

Según los tests χ^2 , la mayoría de los loci no estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg (**Tabla 36**). De los 25 *loci* polimórficos observados en las poblaciones originales, 12 estuvieron en equilibrio ($p > 0,05$). En el caso de las poblaciones multiplicadas, 11 estuvieron en equilibrio ($p > 0,05$). Debido a que, al no tener equilibrio de Hardy-Weinberg, los cruzamientos no son en panmixia, se pueden esperar cambios en las frecuencias genotípicas de una generación a la siguiente.

Tabla 36. Test χ^2 de equilibrio de Hardy-Weinberg en las poblaciones originales, y multiplicadas para cada uno de los *loci*. *, **, ***: significativo al nivel 5, 1 y 0,1% respectivamente.

	PGI-2	PGM-1	ACP-1	PEX-1	SDH-1
Poblaciones originales					
Luarca	0,72	0,42	37,78***	6,72*	2,31
Pravia	1,51	4,90*	15,58***	7,99**	13,60***
Prendes	0,98	1,45	2,67	8,66**	0,18
Ordenes	0,05	13,44***	18,35***	1,35	0,23
Padrón	2,19	17,40***	62,21***	21,72***	15,87***
Poblaciones multiplicadas					
Luarca_M	0,10	0,16	8,10**	3,58	17,14***
Pravia_M	0,36	35,33***	0,23	12,60***	5,80*
Prendes_M	0,07	8,10**	6,37*	13,06***	14,39***
Ordenes_M	2,86	3,85*	34,41***	5,11*	1,22
Padrón_M	0,26	0,49	81,58***	2,41	3,85*

4. DISCUSIÓN

Los valores medios de las accesiones originales resultaron similares por término medio, a las accesiones multiplicadas y a su respectivo pool. Todas las poblaciones fueron recolectadas en sus localidades de origen tomando una muestra equilibrada de al menos 50 plantas. De acuerdo con Yonezawa (1985), ésta técnica es adecuada para detectar la mayor parte de la variabilidad genética. Sin embargo, se corre el riesgo de perder parte de tal variabilidad en los procesos de multiplicación de las accesiones. Balfourier *et al.* (1994) observaron en *Lolium perenne* una pérdida de alelos raros al utilizar 16-25 plantas en policruzamiento, pero ésta pérdida era compensada por un incremento aleatorio en la frecuencia con que aparecían en las otras accesiones del mismo grupo de cruzamiento, produciendo así un efecto “buffer”.

El hecho de que las poblaciones experimentales mantuvieran valores fenotípicos intermedios entre las poblaciones de partida se puede observar en la **Figura 15**, donde las poblaciones heterogéneas se sitúan más o menos en el centro de cada nube de puntos del ACP. En general el efecto multiplicación fue menos significativo en las poblaciones del *Grupo agronómico 2*, este hecho se puede explicar porque este grupo tiene una población de menos o por un fallo en la barrera de aislamiento en el *Grupo agronómico 1*, ya que al ser más precoz es posible que la barrera no estuviera totalmente formada en el momento del espigado de estas poblaciones. Respecto a las comparaciones entre cada una de las poblaciones experimentales con sus respectivas originales no hubo diferencias, aunque en el *Grupo agronómico 2* las dos poblaciones originales difirieron estadísticamente de las multiplicadas, siendo en este caso más efectiva la conservación de la diversidad genética en el pool que en las poblaciones individuales. Los resultados muestran que en las poblaciones heterogéneas no hubo grandes cambios en la conservación de los caracteres fenotípicos de las poblaciones originales.

Una de las decisiones importantes que hay que tomar cuando se va a multiplicar una población es la de decidir el número de individuos a multiplicar. Lawrence *et al.*, (1995) recomiendan que al muestrear una población en el campo se mantengan los alelos con frecuencia de 0,05 y superior. Este tipo de alelos son los que Brown (1978) denomina comunes y son los que se consideran adaptativos y que es necesario mantener en una población. Según Frankel *et al.*, (1995), en la conservación de recursos fitogenéticos para la agricultura, el mantenimiento de los alelos (n° medio de alelos/*locus*) es más importante que el mantenimiento exacto de unas frecuencias alélicas. A pesar de que las frecuencias alélicas en las poblaciones multiplicadas se desviaron de las obtenidas en las poblaciones originales en el 32% de los *loci* polimórficos y de la pérdida de tres alelos raros, el método de multiplicación empleado con mezcla equilibrada de la semilla, no condujo a una pérdida de alelos comunes.

Una consideración más importante quizás, es la pérdida potencial de diversidad asociada con la multiplicación de muestras previamente multiplicadas. Brown *et al.*, (1997) mostraron que el muestreo sucesivo en una muestra previa, como se hace en las multiplicaciones de semillas de poblaciones, resulta en un aumento del tamaño de la población en progresión geométrica, para mantener un porcentaje determinado del número total de alelos presentes inicialmente a una frecuencia determinada. Esto haría impracticable la multiplicación de muestras de especies alógamas en los bancos de germoplasma.

Quizás se debería dedicar más esfuerzo en la conservación de alelos raros mediante la recogida de muestras que poseen dichos alelos a frecuencias relativamente altas. Dichas entradas deberían contener alelos que son raros en el pool genético de la especie, pero estarían a frecuencias relativamente altas.

Tanto la heterocigosidad media como el número de alelos por *locus* representan componentes claves de la diversidad genética (Brown, 1978). Una

reducción en la heterocigosidad podría sugerir una pérdida en la diversidad y una posible tendencia hacia la fijación (homocigosis) y a la pérdida de alelos en un *locus* determinado. En este trabajo no se observó una reducción clara en la heterocigosidad ni en el nº de alelos por *locus* en las poblaciones multiplicadas.

En el estudio isoenzimático se encontró un déficit de heterocigotos para la mayoría de los *loci* a excepción del PGI-2 en el que hay una selección a favor de los heterocigotos. Según Fearon *et al.*, (1983) esto se explica por la existencia de un sistema de autoincompatibilidad gametofítica de dos *loci* S y Z multialélicos. Ambos *loci* están ligados con el locus PGI-2 que situaron conjuntamente en el cromosoma 6. Este déficit puede ser debido al pequeño tamaño de la unidad panmíctica y al efecto Wahlund, como indican Charmet *et al.*, (1993). La población recogida en una parcela determinada puede contener círculos de individuos (vecindarios) que están en media más relacionados genéticamente que dos individuos tomados al azar en la población total. El cruzamiento sería panmíctico sólo dentro de cada vecindario.

Aunque el estudio isoenzimático suministra datos interesantes de cómo los procedimientos de multiplicación afectan a la estructura genética de las poblaciones, la mayoría de los caracteres importantes en los recursos genéticos son agromorfológicos y/o cuantitativos, y los datos isoenzimáticos pueden no predecir cambios genéticos en estos caracteres. Breese y Tyler (1981) observaron una deriva hacia una floración y producción de semillas más precoz por espiga en raigrás inglés (especie perenne) asociada a la multiplicación. En nuestro trabajo, no se encontraron diferencias significativas en la fecha de espigado ni en los otros caracteres agromorfológicos cuantitativos estudiados en el raigrás italiano anual salvo para la variable *fes* durante el segundo año (**Tabla 28**), como también observó Breese (1973), en especies anuales. No obstante en las variables cualitativas *enf hcr* si hubo diferencias en los dos años de evaluación.

Según (Hamon *et al.*, 1994), el mantenimiento, accesibilidad, y calidad de información de las accesiones en colecciones de germoplasma, es un pre-requisito para optimizar la efectividad de los recursos genéticos. Sin embargo tal efectividad puede verse mermada por un elevado número de entradas en las colecciones. La conservación de la diversidad mediante la creación de poblaciones experimentales es una alternativa a tener en cuenta, resultando menos costosa y más rápida que la conservación por multiplicación individual, lo cual es una opción a considerar en el manejo efectivo de las colecciones de germoplasma.

5. CONCLUSIONES

Las poblaciones experimentales conservaron los caracteres fenotípicos de las poblaciones originales, ocupando lugares intermedios en el espacio factorial del ACP, aunque el ANOVA comparando todas las poblaciones reveló diferencias significativas para la variable *fes* y comparando las poblaciones con su respectivo pool para las variables *fes* y *alp* en el *Grupo agronómico 1*, y para las variables *fes* y *ain* en el *Grupo agronómico 2*. No obstante el test de Wilcoxon no mostró diferencias para esta comparación.

Las poblaciones originales comparadas frente a las multiplicadas mediante el test de Wilcoxon mostraron diferencias significativas en las dos poblaciones del *Grupo agronómico 2*. No fueron distintas frente a sus respectivas poblaciones heterogéneas o "pools".

Al nivel de resolución de los marcadores isoenzimáticos, este trabajo mostró que la multiplicación de entradas de raigrás italiano con mezcla equilibrada de las semillas recogidas, conduce a pocos cambios en las frecuencias alélicas y a la pérdida de algún alelo raro. No se observó la pérdida de ningún alelo común (frecuencias alélicas mayores del 5%). Sin embargo, los componentes claves de la diversidad, la heterocigosidad y el número medio de alelos por *locus* se mantuvieron después de un ciclo de multiplicación. Los resultados obtenidos son, sin embargo, limitados por el número reducido de *loci* evaluados.

La creación de poblaciones heterogéneas (pools) podría ser una alternativa más rápida y barata en el mantenimiento y uso de las colecciones cuando en éstas se conocen los datos de pasaporte de las accesiones. Hasta la fecha no existen datos concretos sobre la conservación de caracteres fenotípicos en la creación de poblaciones sintéticas. Tal método de policruzamiento en panmixia es una opción a tener en cuenta frente a la conservación individual en especies forrajeras alógamas.

REFERENCIAS

- ABADIE, T.; MAGALHAES, J.R.; CORDEIRO, C.T.; PARENTONI, S.; DE ANDRADE, R., 1998. A classification for Brazilian maize landraces. *Plant Genetic Resources Newsletter*, **114**, 43-44.
- ABADIE, T.; MAGALHAES, J.R.; PARENTONI, S.N.; CORDEIRO, C.; ANDRADE, R.V., 1999. The core collection of maize germplasm of Brazil. *Plant Genetic Resources Newsletter*, **117**, 55-56.
- ARBONES, E.; OLIVEIRA, J.A., 1995. Relaciones entre características agronómicas y factores ecogeográficos en poblaciones naturales de raigrás inglés del Norte de España. *Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetales*, **10 (3)**, 325-340.
- 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., 1998a. 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.; CHARMET, G.; RAVEL, C., 1994. Conservation of allelic multiplicity and genotypic frequency by pooling wild populations of perennial ryegrass. *Heredity*, **73**, 386-396.
- BALFOURIER, F.; CHARMET, G.; RAVEL, C., 1998b. Genetic differentiation within and between natural populations of perennial and annual ryegrass (*Lolium perenne* and *L. rigidum*). *Heredity*, **81**, 100-110.
- BALFOURIER F.; OLIVEIRA J.A.; CHARMET G., ARBONES E., 1997. Factorial regression analysis of genotype by environment interaction in ryegrass populations, using both isozyme and climatic data as covariates. *Euphytica*, **98**, 37-46.
- BALFOURIER, F.; PROSPERI, J.M.; CHARMET, G.; GOULARD, M.; MONESTIEZ, P., 1999. Using spatial patterns of diversity to develop core collections. *In: Core Collections for Today and Tomorrow*, 37-48. R.C. Johnson; T. Hodgkin. IPGRI. (Eds.). Rome (Italy).
- BARRENO, E.; BRAMWELL, D.; CABEZUDO, B.; CARDONA, M.A; COSTA, M; FERNÁNDEZ CASAS, F.J.; FERNÁNDEZ-GALIANO, E.; FERNÁNDEZ PRIETO, J.A.; GÓMEZ CAMPO, C.; HERNÁNDEZ BERMEJO, E.; HEYWOOD, V.H.; IZCO, J.; LLORENS, L.; MOLERO MESA, J.; MONTSERRAT RECODER, P.; RIVAS-

- MARTÍNEZ, S.; SÁENZ LAÍN, C.; SANTOS GUERRA, A.; VALDÉS CASTRILLÓN, B.; WILDPRET DE LA TORRE, W., 1984. Listado de plantas endémicas, raras o amenazadas de España. *Información Ambiental*, **3**, 1-24.
- BASIGALUP, D.H.; BARNES, D.K.; STUCKER, R.E., 1995. Development of a core collection for perennial *Medicago* introductions. *Crop Sci.*, **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 Sci.*, **36**, 57-64.
- BERTÍN, O.D., 1988. Características agronómicas de los principales grupos de cultivares de festuca alta. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino. Carpeta sobre forrajeras y producción bovina. Inf. General nº 145. 3 p.
- 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**, 35-46.
- BISHT, I.S.; MAHAJAN, 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**, 127-133.
- BORRILL, M., 1976. Temperate Grasses. *In: Evolution of Crop Plants*. N.W.SIMMONS (Ed.), 137-142. Longman, London (UK).
- 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.
- BREESE, E.L., 1973. Genetic architecture and adaptation in grasses with special reference to *Lolium*. International Meeting on Quantitative Inheritance, Polymorphisms, Selection and Environment, 73-81. University of Bologna, 1972. Italia.
- BREESE, E. L., 1989. Regeneration and Multiplication of Germplasm Resources in Seed Genebanks: the Scientific Background. International Board for Plant Genetic Resources, Rome (Italy).
- BREESE, E.L.; TYLER, B.F., 1981., Regeneration of germplasm collections of forage grasses and legumes. *In: Seed regeneration in cross-pollinated species*, 45-67. E. Porceddu, G. Jenquins, A.A. Bulkema (Eds.). Rotterdam (Holanda).
- BRESLOW, N. E., 1970. A generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal pattern of censorship. *Biometrika*, **57**, 579-594.
- BRETTING, P.K.; WIDRLECHNER, M.P., 1995. Genetic markers and plant genetic resources management. *Plant Breed Rev.*, **31**, 11-86.
- BROWN, A.H.D., 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics*. **52**, 145-157.
- 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. *In: The Use Of Plant Genetic Resources*, 136-156. A.H.D. Brown, O.H. Frankel, D.R. Marshall, J.T. Williams. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge (UK).
- BROWN, A.H.D., 1995. The core collection at the crossroads. *In: Core Collections of plant Genetic Resources*, 3-19. T. Hodgkin, A.H.D. Brown, T.J.L. Van Hintum, E. A. V. Morales (Eds.). John Wiley & Sons. Chichester (UK).
- BROWN, A.H.D.; BRUBAKER, C.L.; GRACE, J.P., 1997. Regeneration of germplasm samples: wild versus cultivated species. *Crop Sci.*, **37**, 7-13.
- BROWN, A.H.D.; SPILLANE, C., 1999. Implementing core collections – principles, procedures, progress, problems and promise. *In: Core Collections for Today and Tomorrow*, 1-17. R.C. Johnson, T. Hodgkin (Eds.). IPGRI. Rome, (Italy).
- BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S., 1983. Measuring genetic variability in plant populations. *In: Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*, 219-238. A. Tanksley, T.J. Orton (Eds.). Elsevier, Amsterdam (Netherlands).
- BUCKNER, R.C.; BURRUS, P.B.; BUSH, L.P., 1977. Registration of Kenhy tall fescue. *Crop Sci.*, **17**, 672–673.
- BULINSKA-RADOMSKA, Z.; LESTER, R.N., 1986. Intergeneric relationships of *Lolium*, *Festuca* and *Vulpia* (Poaceae) and their phylogeny. *Plant Syst. Evol.*, **159**, 217-227.
- BUTKUTE, B.L.; KONAREV, A.U., 1980. Inmunochemical study of *Lolium* in relation to the phylogeny of the genus. *Bot. Zhurnal.*, **65**, 1453-1458.
- CASLER, M.D., 1995. Patterns of variation in a collection of Perennial Ryegrass accessions. *Crop Sci.*, **35**, 1169-1177.
- CEBOLLA, C.; RIVAS, M.A., 2003. Catálogo del género *Festuca* L. (Poaceae) en la Peninsula Iberica. *Candollea*, **58**, 189-213.
- CHARMET, G.; BALFOURIER, F., 1994. Isozyme variation and species relationships in the genus *Lolium* L. (ryegrasses, Graminaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, **87**, 641-649.
- CHARMET, G.; BALFOURIER, F.; RAVEL, C., 1993. Isozyme polymorphism and geographic differentiation in a collection of French perennial ryegrass populations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **40**, 77-89.
- CLARK, R.L.; SHANDS, H.L.; BRETTING, P.K.; EBERHART, S.A., 1997. Germplasm regeneration: developments in population genetics and their implications. Managing large diverse germplasm collections. *Crop Sci.*, **37** (1), 1-6.
- CLAYTON, W.D.; RENVOICE, S.A., 1986. *Genera Graminum*. Grasses of the world. *Kew.Bull. Addit. Ser.*, **13**.
- COMISIÓN EUROPEA, 1999. La situación de la agricultura en la Unión Europea. Informe 1998. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, Bruselas, Luxemburgo, 535 pp.

- CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL, XUNTA DE GALICIA (Ed.), 2005. Anuario de Estadística Agraria. 243 pp. Santiago de Compostela (España).
- CORDEIRO, C.M.T.; MORALES, E.A.V.; FERREIRA, P.; ROCHA, D.M.S.; COSTA, I.R.S.; VALOIS, A.C.C.; SILVA, S., 1995. Towards a Brazilian core collection of cassava. *In: Core collections of plant genetic resources*. T. Hodking, A.H.D. Brown, T.J.L van Hintum, E.A.V. Morales, 155-167. John Wiley and sons, New York (EE.UU.).
- COSTAL ANDRADE, L., GONZÁLEZ ARRÁEZ, E., OLIVEIRA PRENDES, J.A., 2005. Resultados medios de la caracterización agronómica de gramíneas pratenses de la Cordillera Cantábrica. Producciones agroganaderas. Gestión eficiente y conservación del medio natural (Volumen II). XLV Reunión Científica de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP). Gijón (Asturias), 28 de mayo al 30 de junio 2005, 473-480.
- CROSSA, J.; DELACY, I.H.; TABA, S., 1995. The use of multivariate methods in developing a Core Collection. *In: Core collections of plant genetic resources*. 77-89. T. Hodking, A.H.D. Brown, T.J.L van Hintum, E.A.V. Morales, (Eds.). John Wiley and sons, New York (EE.UU.).
- CUBERO SALMERÓN, J.I.; NADAL MOYANO, S.; MORENO YANGÜELA, M.T., 2006. Las Colecciones Actuales. *En: Recursos Fitogenéticos*. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (Ed.). 143-154. Madrid (España).
- DAMANIA, A.B.; PECETTI, L.; QUALSET, C.O.; HUMEID, B.O., 1999. Diversity and geographic distribution of adaptive traits in *Triticum turgidum* L. (durum group), wheat landraces from Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **43**, 409-422.
- DARBYSHIRE, S.J.; WARWICK, S.I., 1992. Phylogeny of North American *Festuca* (*Poaceae*) and related genera using chloroplast DNA restriction site variation. *Canadian Journal of Botany*, **70**, 2415-2429.
- DE LA FUENTE, V.; ORTÚÑEZ E., 2000. Nueva especie de *Festuca* L., sección *Festuca* (*Poaceae*) en la Península Ibérica. *Lazaroa*, **21**, 3-6.
- DÍAZ, N.; PIÑEIRO, J.; AYUSO, C., 1999. Valor agronómico de variedades comerciales de gramíneas pratenses. CIAM memoria 1997. Consellería Agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria, 49-60. Xunta De Galicia. Santiago de Compostela (España).
- 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.
- DOEBLEY, J.F.; GOODMAN, M.M.; STUBER, C.W., 1985. Isozyme variation in the races of maize of Mexico. *American Journal of Botany*, **72**, 629-39.
- DUMORTIER B.C.J., 1823. Observations sur les graminees de la Flore belgeque. Tournay.

- DWIVEDI, S.L.; UPADHYAYA, H D.; HEDGE, D.M., 2005. Developing of core collection using geographic information and morphological descriptors in sunflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Genetic Resources And Crop Evolution*, **52**, 821-830.
- ESQUINAS-ALCÁZAR, J.T., 1993. La diversidad genética como material básico para el desarrollo agrícola. *En: La Agricultura del Siglo XX*, 3-19. J.I. Cubero, M.T. Moreno (Coords.). Mundiprensa, Madrid (España).
- F.A.O., 1995. Survey of existing data on *ex situ* collections of plant genetic resources for food and agriculture. CPGR 6/95/8 Annex of the Sixth Session of the FAO Commission on Plant Genetic Resources, 19-30 June 1995. Rome (Italy).
- F.A.O., 1996. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Background documentation prepared for the International Technical Conference on Plant Genetic Resources, Leipzig, Germany, 17-23 June, 1996. FAO. Rome (Italy).
- FEARON, C.H.; HAYWARD, M.D.; LAWRENCE, M.J., 1983. Self incompatibility in ryegrass. V. Genetic control in diploid *Lolium multiflorum*. *Heredity*, **50**, 35-45.
- FEI, Y.J., 1999. A new species of the genus *Lolium* L. (*Poaceae*) from Hubei (China). *Guihaia*, **19**, 205-206.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D., 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN Documento 20. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia (Brasil).
- FLETCHER L.R.; GARTHWAITE I.; TOWERS N.R., 1993. Ryegrass staggers in the absence of lolitrem B. *Proceedings of the Second International Symposium on Acremonium/Grass Interactions, Palmerston North, New Zealand*, 119-121.
- FOGGI B.; SIGNORINI M.A.; ROSSI G., 2003. The genus *Festuca* in Italy. *Bocconea*, **16 (1)**, 55-64.
- FOJTÍK, A., 1994. Methods of grass improvement used at the plant breeding station Hladké Livotice. *Genet. Pol.*, **35A**, 25-31.
- FRANKEL, O.H., 1984. Genetic perspectives in germplasm conservation. *In: Genetic Manipulation: Impact on Man and Society*, 161-170. W. Arber, K. Llimensee, W.J. Peacock, P. Sterlinger (Eds.). Cambridge University Press. Cambridge (UK).
- FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D., 1984. Current plant genetic resources – A critical appraisal. *In: Genetics: New Frontiers, Proceedings of the 15th International Congress of Genetics, Vol 4*, 3-13. Oxford and IBH Publishing (Ed.). Oxford (UK).
- FRANKEL, O.H.; BROWN, A.H.D.; BURDON, J.J., 1995. The Conservation of cultivated plants. *In: The Conservation of Plant Biodiversity*, 79-117. Cambridge University Press (Ed.). Cambridge (UK).

- FURMAN, B.J.; QUALSET, C.O.; SKOVMAND, J.H.; CORKE, H.; WESEBERG, D., 1997. Characterisation and analysis of North American triticale genetic resources. *Crop Sci.*, **37**, 1951-1959.
- GEPTS, P., 1998. What can molecular markers tell us about the process of domestication in common bean. *In: The origins of crop adaptation*. 198-209. A.B. Damania, J. Valkoun, G. Willcox, C.O. Qualset (Eds.). ICARDA Aleppo Syria (Syria).
- GRENECHE, M.; LALLEMAND, J.; MICHAUD, O., 1991. Comparison of different enzyme *loci* as a means of distinguishing ryegrass varieties by electrophoresis. *Seed Science Technology*, **19**, 147-158.
- GRENIER, C.; BRAMEL-COX, P.J.; HAMON, S., 2000a. Assessment 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**, 190-96.
- GRENIER, C.; DEU, M.; KRESOVICH, S.; BRAMEL-COX, P.J.; HAMON, S., 2000b. Assessment 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.
- GUTIERREZ, I.; ROMERO, M I.; SONORA, X.; HOMET, J., 1997. A new subspecies of *Festuca brigantina* (Markgr.-Dann.) Markgr. Dann. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **123 (3)**, 249-256.
- GUY, P.; GHESQUIÈRE, M.; CHARMET, G.; PROSPERI, J. M. 1989. Pooling accessions: advantages and disadvantages. Report of a Working Group on Forages, (third meeting), 9-12 January 1989. ECP/GR/IBPGR, Rome, 1989, 35-49.
- HACKEL, E. 1882. Monografía *Festucarum Europaeorum*. Berlin.
- 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.
- HAMON, S.; HODGKIN, T.; DISSERT, S.; ANTHONY, F.; NOIROT, M., 1994. Core collection: theoretical and applied aspects. *In: Proceedings of the Genetic Resources Section Meeting of Eucarpia*, 78-82. Clermont-Ferrand (France).
- HAMON, S.; NOIROT, M.; ANTHONY, F., 1995. Developing coffee core collection using the principal component score strategy with quantitative data. *In: Core Collections of Plant Genetic Resources*, 173-196. T. Hodgkin, A.H.D. Brown, T.J.L. Van Hintum, E.A.V. Morales (Eds.). John Wiley & Sons. Chichester (UK).
- HARCH, B.D.; BRASFORD, K.E.; DELACY, I.H.; LAWRENCE, P.K.; CRUICKSHANK, A., 1995. Patterns of diversity in fatty acid composition in the Australian

- groundnut germplasm collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **42**, 243-256
- HAYWARD, M. D.; MCADAM, N. J., 1977. Isozyme polymorphism as a measure of distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne*. *Z. Pflanzenzucht*, **79**, 59-68.
- HAYWARD M.D.; DEGENNARS G.H.; BALFOURIER F.; EICKMEYER F., 1995. Isozyme procedures for the characterisation of germplasm, exemplified by the collection of *Lolium perenne* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **42**, 327-337.
- HOASHI, M.; BEVACQUA, D.C.; OTAKE, T.; WATANABE, Y.; HICKMAN, A.H.; UTSUNOMIYA, S.; OHMOTO, H., 2009. Primary haematite formation in an oxygenated sea 3.46 billion years ago. *Nature Geoscience*, **2**, 301-306.
- HODGKIN, T., 1997. Some current issues in the conservation and use of plant genetic resources. *In: Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGR Workshop 9-11 October 1995. 3-10.* W.G. Ayad, T. Hodgkin, A. Jaradat, V.R. Rao (Eds.). Rome (Italy).
- HOLDEN, J. H. W., 1984. The second ten years. *In: Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation.* 277-285. J.H.W. Holden, J. Williams (Eds.). London (UK).
- INDA ARAMENDÍA, L.A., 2005. El género *Lolium*. Claves dicotómicas. *Rev. Real Academia Ciencias de Zaragoza*, **60**, 143-155.
- IRIONDO, J.M., 2001. Conservación de especies raras y amenazadas. (Revisión). *Investigación Agraria, Producción y Protección vegetales*, **16 (1)**, 5-24.
- IZCO, J.; AMIGO, J.; GARCÍA-SAN LEÓN, D., 2000. LAZAROA 21: 25-50. 2000. Análisis y clasificación de la vegetación de Galicia (España), II. La vegetación herbácea. *Lazaroa*, **21**, 25-50.
- 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 Sci.*, **15**, 700-704.
- JANA, S.; SINGH, K., 1993. Evidence of geographical divergence in Kabuli Chickpea from germplasm evaluation data. *Crop Sci.*, **33**, 626-632.
- JAUHAR, P.P., 1976. Chromosome pairing in some triploid and trispecific hybrids in *Lolium/Festuca* and its phylogenetic implications. *Chromosomes Today*, **5**, 165-177.
- JAUZEIN, P., 1995. Flore des champs cultivés. SOPRA-INRA Editions. 898 pp. París (France).
- 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. *In: Core Collections for Today and Tomorrow*, 49-60. R.C. Johnson, T. Hodgkin. IPGRI. (Eds.). Rome (Italy).

- JONES, P.G.; BEEBE, S.E.; TOHME, J.; GALWEY, N.W., 1997. The use of geographical information Systems. *Biodiversity and Conservation*, **6**, 947-958.
- KERGUÉLEN, M.; PLONKA, F., 1989. Les Festuca de la flore de France (Corse comprise). Bull. Soc. Bot. Centre- Ouest, nouvelle serie, **10**, 3-368.
- KOPECKÝ, D.; LOUREIRO, J.; ZWIERZYKOWSKY, Z., 2006. Genome constitution and evolution in *Lolium x Festuca* Irbid cultivars (*Festulolium*). *Theor. Appl. Genet.*, **113**, 731-742.
- KRUSKAL, W.H.; WALLIS, W.A., 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, **47 (260)**, 583-621.
- KURLOVICH, B.S.; REPEV, S.I.; PETROVA, M.V.; BURAVTSEVA, T.V.; KARTUZOVA, L.T.; VOLUZNEVA, T.A., 2000. The significance of Vavilov's scientific expeditions and ideas for development and use of legume genetic resources. *Plant Genetic Resources Newsletter*, **124**, 23-32.
- LATCH G.C.M., 1993. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance of endophyte-infected grasses. *Agric. Ecosystems Environ.*, **44**, 143-156.
- LAWRENCE, M.J.; MARSHALL, D.F.; DAVIES, P., 1995. Genetics of conservation. I. Sample size when collecting germplasm. *Euphytica*, **84**, 89-99.
- LEE, L.S.; HENRY, R.J., 2001. Commercial applications of plant genotyping. *In: Plant Genotyping: the DNA fingerprinting of plants*. CAB International. R.J. Henry (Ed.). 265-273. Wallingford (UK).
- LEHVASLAIHO, H.; SAURA, A.; LOKKI, J., 1987. Chloroplast DNA variation in the grass tribe *Festuceae*. *Theoretical and Applied Genetics*, **74**, 294-302.
- LÓPEZ, J.E.; GONZÁLEZ, E.; OLIVEIRA, J.A., 2009. Variabilidad cianogénica y agronómica en poblaciones naturales de trébol blanco recolectadas en la Cordillera Cantábrica. *En: La multifuncionalidad de los pastos: producción ganadera sostenible y gestión de los ecosistemas*. Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP), 177-183. R. Reiné, O. Barrantes, A. Broca, C. Ferrer, (Eds.). Huesca (España).
- LÓPEZ, J.E.; OLIVEIRA, J.A., 2000a. Comparación de procedimientos para elaborar colecciones núcleo en accesiones españolas de raigrás inglés e italiano. *Pastos*, **XXX(1)**, 71-102.
- LÓPEZ, J.E.; OLIVEIRA, J.A., 2000b. 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. A Coruña (España).
- LÓPEZ, J.E.; OLIVEIRA, J.A., 2001. Comparación de procedimientos para elaborar una colección núcleo en accesiones de raigrás inglés. *En: Biodiversidad en Pastos. XLI Reunión Científica de la S.E.E.P. I Foro Iberoamericano de Pastos CIBIO* (Ed.), 189-192. Alicante (España).

- MACKAY, M.C., 1995. One core collection or many? *In: Core collections of plant genetic resources*, 99-210. T. Hodking, A.H.D. Brown, T.J.L van Hintum, E.A.V. Morales (Eds.). John Wiley and sons, New York (EE.UU.).
- 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.
- 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.
- MARKGRAF-DANNENBERG I., 1980. Gen. *Festuca*. *In: Flora Europaea*. T.G. Tutin *et al.* (Eds.), **5**, 125-153, Cambridge University Press. London (UK).
- MARSHALL, D.R., 1989. Limitations to the use of germplasm collections. *In: The use of Plant Genetic Resources*. Brown, A.H.D., Marshall, D.R., Frankel, O.H. and Williams, J.T. (Eds). Cambridge University Press. Cambridge (UK).
- MARTÍN, I, 2001. Conservación de recursos fitogenéticos. Hojas Divulgadoras INIA, 2114 HD. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid (España).
- MEDINA, R.D.; FALOCI, M.M.; MARASSI, M.A.; MROGINSKI, L.A., 2005. Identificación de variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivadas en Argentina mediante marcadores bioquímicos: su utilidad potencial para el registro de cultivares. *Plant Genetic Resources Newsletter*, **143**, 1-7.
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, 1999. Estrategia Española Para la Conservación y el Uso Sostenible de la Diversidad Biológica. Ministerio de Medio Ambiente, 160 pp. Madrid (España).
- MOMOTAZ A.; FORSTER J. W.; YAMADA T., 2004. Identification of cultivars and accessions of *Lolium*, *Festuca* and *Festulolium*. *Plant Breeding*, **123 (4)**, 370-376.
- 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.
- MORALES, E.A.V.; VALOIS, A.C.; NASS, L.L., 1997. Recursos Genéticos Vegetales. 78 pp. Brasilia: Embrapa - SPI. EMBRAPA, CENARGEN (Brasil).
- MORENO, J.C., (coord.), 2008. Lista Roja 2008 de la flora vascular española. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas), 86 pp. Madrid (España).
- MOSQUERA, M.R.; GONZÁLEZ, A.; RIGUEIRO, A., 1999. Ecología y manejo de praderas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. INIA. 213 pp. Madrid (España).

- MUSLERA, E.; RATERA, M., 1983. Praderas y Forrajes. Producción y aprovechamiento. Ed. Mundiprensa. 706 pp., Madrid (España).
- NAYLOR, B., 1960. Species differentiation in the genus *Lolium*. *Heredity*, **15**, 219-233.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1972. Genetic vulnerability of major crops. National Academy of Sciences. NAS. Washington DC.
- NEI, M., 1973. Analisis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 3321-3323.
- 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. *In: Proceedings of the Second International Symposium on Acremonium/Grass Interactions*, 14-15. Palmerston North, (New Zealand).
- 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.; CHARMET, G., 1988a. Characterization of wild perennial ryegrass populations from Galicia (Spain). *Pastos*, **18-19 (1-2)**, 51-68.
- OLIVEIRA, J. A.; CHARMET, G., 1988b. Polimorfismo isoenzimático de seis poblaciones naturales de raigrás inglés de Galicia. *Pastos*, **18-19 (1-2)**, 69-85.
- OLIVEIRA, J. A.; GONZÁLEZ, A., 2000. Recursos fitogenéticos de raigrás inglés europeos: valor agronómico en condiciones de bajo mantenimiento. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, **15 (1-2)**, 67-78.
- 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.
- OLIVEIRA, J.A.; LÓPEZ, J.E., 1999. Caracterización de poblaciones españolas de *Lolium rigidum* Gaud., para caracteres agro-morfológicos e isoenzimáticos. *Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetales*, **14 (3)**, 453-464.
- OLIVEIRA, J.A.; MAYOR, M.; CASTRO, P.; COSTAL, L., 2002a. Producción de materia seca y calidad nutritiva de dos genotipos de raigrás inglés infectados con una cepa de hongo endófito en el tercer año de ensayo en Galicia. *Actas de la XLII Reunión Científica de la S.E.E.P.*, 321-325, 6-10 de mayo, LLeida (España).
- OLIVEIRA, J.A.; MAYOR, M.; GONZÁLEZ, A., 2000. Infección de festucas finas por hongos endofitos *Epichloë* en la Cordillera Cantábrica. *Pastos*, **XXX(2)**, 195-203.
- OLIVEIRA, J. A.; MAYOR, M.; GONZÁLEZ, E., 2001. Poas, agrostis y festucas finas. *Agricultura*, **828**, 432-436.

- OLIVEIRA, J.A.; ROTTINGHAUS, G.E.; PREGO, C.; GONZÁLEZ, A., 2002b. Contenido en alcaloides en semillas de poblaciones naturales de raigrás inglés del norte de España infectadas con los hongos endofitos *Neotyphodium*. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, **17 (2)**, 247-256.
- 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.
- ORTIZ, R.; STOLEN, L., 1997. Diversity and a core collection of Peruvian quinoa germplasm. *In: Crop development for the cool and wet regions of Europe*, 117-124. Ed. R. Ortiz. Spelt and quinoa. Working group meeting , 24-25 October 1997. Wageningen (Netherlands).
- OSTERGAARD, H.; NIELSEN, G.; JOHANSEN, H., 1985. Genetic variation in Cultivars of diploid ryegrass, *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum*, at five enzyme systems. *Theoretical and Applied Genetics*, **69**, 409-421.
- PAREDES, J.; OLEA, L.; VERDASCO, P., 1986. Estudio de variedades de festuca alta para su utilización en praderas de regadío del S.O. de España. *Pastos*, **16**, 151-161.
- 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 (EE.UU.).
- PIÑEIRO, J., 1994. Especies y mezclas pratenses en la España húmeda. *En: Actas XXXIV Reunión Científica de la SEEP, Soria, 1994*. 199-204. SEEP (Ed.). Madrid (España).
- PIÑEIRO J., PÉREZ M., 1986. El interés agronómico de ecotipos españoles de plantas pratenses. *Pastos*, **44 (1)**, 103-118.
- PIÑEIRO, J., PÉREZ, M., 1992. Mezclas pratenses para la España Húmeda. *Hoja Divulgadora Núm. 8/92*, p. 47. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid (España).
- PIÑEIRO, J.; PÉREZ, M., 2003. Rotaciones de maíz forrajero o híbrido de sorgo x pasto del Sudán con raigrás italiano alternativo en Galicia. *En: Proyectos de Investigación, resultados parciales. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo*, 54-58. Xunta de Galicia (Ed.). 185 pp. Santiago de Compostela (España).
- PITA, J.M.; MARTÍNEZ, J.B., 2001. Bancos de Semillas. Hojas Divulgadoras, 2109HD. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid (España).
- 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.
- PORTAL, R. 1999. Festuca de France. Vals près Le Puy. France, 371 pp.
- RODRÍGUEZ, N.N.; FUENTES, J.L.; COTO, O.; FUENTES, V.; RAMÍREZ, I.M.; BECKER, D.; RODRÍGUEZ, I.; GONZÁLEZ, C.; XONIA X.; ROMÁN, M.I.; VELÁZQUEZ B.; ROHDE, W., 2009. Agro-morphologic traits, isoenzyme and DNA markers for estimating the polymorphism levels, discriminating capacity and informativeness in avocado. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, **40 (1)**, 63-74.
- ROMERSBURG, H.C., 1984. Cluster analysis for researchers. Lifetime Learning Publications. Belmont, California, (Estados Unidos).
- RON, A.M.DE; LINDNER, R.; MALVAR, R.A.; ORDÁS, A., 1991 Germplasm collecting and characterization in the North of the Iberian Peninsula. *Plant Genetics Resources Newsletter*, **87**, 17-19.
- RON, A.M.DE; SANTALLA, M.; BARCALA, N.; RODIÑO, A.P.; CASQUERO, P.A.; MENENDEZ, M.C., 1997. *Phaseolus spp.* at the Misión Biológica de Galicia, Spain. *Plant Genetics Resources Newsletter*, **112**, 100.
- ROSSO, B.; RIMIERI, P.; CARRETE, J.; CATTONI, M.L.; BIAGIOLI, C.; CUEYU, A.R.; PAGANO, E.M.; RIOS, R.D., 2008. Evaluación de la variabilidad agronómica de una colección núcleo de festuca alta (*Festuca arundinacea Schreb*). 31º Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal. Octubre 15 al 18 San Luis, 2008.
- RUIZ, M.; PELUZZO, A.; PASCUAL, H.; VARELA, F., 1997. Collecting germplasm in the Cáceres Administrative Province in Spain. *Plant Genetic Resources Newsletter*, **112**, 101-104.
- RUIZ, M.; PELUZZO, A.; PASCUAL, H.; VARELA, F., 1999. Collecting germplasm in Spain by the CRF-INIA during 1986-96. *Plant Genetic Resources Newsletter*, **118**, 53-55.
- SAS INSTITUTE, 1999. SAS/STAT User's Guide, Version 8. SAS Technical Report. SAS Institute Inc, Carry, NC. (EE.UU.).
- 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. *In: 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 (UK).
- SCHOLZ, S.; SCHOLZ, H., 2005. A new species of *Lolium (Gramineae)* from Fuerteventura and Lanzarote (Canary Islands, Spain). *Willdenowia*, **35**, 281-286.

- SCHOLZ, H.; STIERSTORFER, CH.; GAISBERG, M. V., 2000. *Lolium edwardii* sp. nova (Gramineae) and its relationship with *Schedonorus* sect. *Plantynia* Dumort. *Feddes Repertorium*, **111 (7-8)**, 561-565.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, V., 1963. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press. Urbana, (EE.UU.).
- SHING, P.S.; NODARI, R.; GEPTS, P., 1991. Genetic diversity in cultivated common bean. *Crop Sci.*, **31 (1)**, 19-23.
- SILVA-PANDO, F.J., 2008. Las plantas endémicas y subendémicas de Galicia. *Bol. BIGA*, **3**, 9-150.
- SPAGNOLETI, P.L.; QUALSET C.O., 1987. Geographical diversity for quantitative spike characters in a world collection of durum wheat. *Crop Sci.* **27**, 235-241.
- 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.
- STEBBINS, G.L., 1956. Taxonomy and evolution of genera, with special reference to the family Gramineae. *Evolution*, **10**, 235-545.
- STEBLER, F.G.; SCROETER, C.; WELTER, M.H., 1894a. *Festuca arundinacea*. In: Les meilleures plantes fourragères. Descriptors et Figures. 2^{me} Partie. K.J. WYSS, (Ed.). 100 pp. Paris (France).
- STEBLER, F.G.; SCROETER, C.; WELTER, M.H., 1894b. *Lolium italicum*. In: Les meilleures plantes fourragères. Descriptors et Figures. 1^{ère} Partie. K.J. WYSS, (Ed.). 152 pp. Paris (France).
- STEBLER, F.G.; SCROETER, C.; WELTER, M.H., 1894c. *Lolium perenne*. In: Les meilleures plantes fourragères. Descriptors et Figures. 1^{ère} Partie. K.J. WYSS, (Ed.). 152 pp. Paris (France).
- SWOFFORD D.L.; SELANDER R.B., 1981. BIOSYS 1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. of Heredity*, **72**, 281-283.
- TERREL, E.E., 1966. Taxonomic implications of genetics in ryegrasses. *Bot Rev.*, **66**, 138-164.
- TERREL, E.E., 1968. A taxonomic revision of the genus *Lolium*. *Tech. Bull. US. Dept. Agric.*, **1392**, 1-65.
- THOMAS, H.; HUMPHREYS, M.O., 1991. Review: progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*. *J. Agric. Sci.*, **117**, 1-8.
- TOHME, J.; JONES, P.; BEEBE, S.; IWANGA, M., 1995. The combined use of agroecological and characterization data to establish the CIAT *Phaseolus vulgaris* core collection. In: Core collections of plant genetic resources. T. Hodgkin, A.H.D. Brown, T.J.L. van Hintum, E.A.V. Morales (Eds.), 95-107. John Wiley and Sons, New York (EE.UU).

- TOOLBERT, D.M.; QUALSET, C.O.; JAIN, S.K.; CRADDOCK, J.C., 1979. A diversity analysis of a World Collection of Barley. *Crop Sci.*, **19**, 789-794.
- VAN HINTUM, T.J.L., 1995. Hierarchical approaches to the analysis of genetic diversity in crop plants. *In: Core collections of plant genetic resources.* 23-34. T. Hodking, A.H.D. Brown, T.J.L van Hintum, E.A.V. Morales (Eds.). John Wiley and sons, New York. (EE.UU.).
- VAN HINTUM, T.J.L., 1999. Status of and perspectives for core collections. *In: Implementation of the Global Plan of Action in Europe – Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Proceedings of the European Symposium, 30 June – 3 July 1998, Braunschweig, Germany.* IPGRI. 187-190. T. Gass, L. Frese, F. Begemann, E. Lipman. Rome (Italy).
- VAN HINTUM, T.J.L.; BROWN, A.H.D.; SPILANE, C.; HODGKIN, T., 2000. Core Collections of Plant Genetic Resources. IPGRI Technical Bulletin nº3. 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.
- VAVILOV, N.I., 1949-50. The Origin, variation, immunity, and breeding of cultivated plants. *Chronica Botanica*, **13**, 1-66.
- VIDAL GALEGO, L.; GARCÍA LARA, I.; SOTO ARROJO, M., 2009. Implantación e produción das pradeiras para a produción forraxeira. *Afriga*, **82**, 38-54.
- VIRK, P.S.; ZHU, J.; NEWBURY, H.J.; BRYAN, G.J.; JACKSON, M.T.; FORD-LLOYD, B.V., 2000. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica*, **112**, 275–284.
- VIVERO, J.L., 1979. Iniciación a la mejora genética de raigrás italiano (*Lolium multiflorum* Lam.) para crecimiento invernal. *Anales INIA. Serie Producción Vegetal*, **10**, 23-37
- VV.AA., 2000. Lista Roja de Flora Vasculare Española (valoración según categorías UICN). Conservación Vegetal 6 (extra), 44 pp. Madrid (España).
- WALTER, K.S.; GILLETT, H.J., 1998. 1997 IUCN Red List of Threatened Plants. Compiled by the World Conservation Monitoring Center. IUCN – The World Conservation Union, Gland, Switzerland, 862 pp. Cambridge (UK).
- WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. 1992. The Grass Genera of the World. 1036 pp. Cambridge Univ. Press. Cambridge (UK).
- WEST C.P., IZEKOR E., TURNER K.E., ELMI A.A., 1993. Endophyte effects on growth and persistence of tall fescue along a water supply gradient. *Agron. J.*, **85**, 264-270.

- WILCOXON, F., 1945. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics*, **1**, 80-83.
- WRIGHT S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution*, **19**, 395.
- YONEZAWA, K.; NOMURA, T.; MORISHIMA, H., 1995. Sampling strategies for use in stratified germplasm collections. *In: Core Collections of Plant Genetic Resources*, 35-54. T. Hodgkin; A.H.D. Brown; T.J.L. Van Hintum; E.A.V. Morales, (Eds.). John Wiley and Sons. New York (EE.UU.).
- 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.