



CARACTERIZACIÓN DE GERMOPLASMA DE AGROSTIS Y FESTUCAS DE LOS GRUPOS RUBRA Y OVINA DEL NORTE DE ESPAÑA

José Alberto Oliveira Prendes*¹, Pedro Palencia García¹, Juan Manuel González Triguero²

¹ Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Área de Producción Vegetal. Universidad de Oviedo. C/ Gonzalo Gutiérrez Quirós. 33600 Mieres (España)

² Departamento de Biomedicina y Biotecnología. Área de Genética. Universidad de Alcalá. Campus Universitario. 28871Alcalá de Henares (España)

GERMPLASM CHARACTERIZATION OF AGROSTIS AND FESTUCA RUBRA AND OVINA GROUPS IN NORTHERN SPAIN

Historial del artículo:

Recibido: 21/09/2016

Revisado: 20/02/2017

Aceptado: 10/03/2017

Disponible online: 08/11/2017

* Autor para correspondencia:

oliveira@uniovi.es

ISSN: 2340-1672

Disponible en: <http://polired.upm.es/index.php/pastos>

Palabras clave:

Anatomía foliar, césped, citometría de flujo, inoculación artificial, ploidía.

Keywords:

Artificial inoculation, flow cytometry, leaf anatomy, ploidy, turf.

RESUMEN

Este trabajo es una revisión sobre la caracterización fenotípica y genética de accesiones de agrostis (*Agrostis* sp. pl.) y festucas de hojas estrechas (*Festuca* gr. *rubra* y *F.* gr. *ovina*) del Norte de España. Los resultados de la caracterización fenotípica y genética de este material vegetal son útiles, entre otros aspectos, para conocer el potencial de algunas accesiones para su uso en mejora de céspedes. Se muestran los principales resultados obtenidos en 28 accesiones de *Agrostis*, 15 de *F. rubra* y nueve de *F. ovina* mediante caracteres de anatomía foliar, morfología floral, caracterización agronómica, tolerancia al hongo de la mancha del dólar mediante inoculación artificial y caracterización genética mediante marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Se destaca la selección y multiplicación de tres accesiones de *A. capillaris*, una de *F. rubra* y una de *F. ovina*, con el fin de su utilización en la creación de variedades cespitosas.

ABSTRACT

This article is a review of the phenotypic and genetic characterization of bentgrass (*Agrostis* sp. pl.) and fine-leaved fescues (*Festuca* gr. *rubra* and *F.* gr. *ovina*) accessions from northern Spain. The results of phenotypic and genetic characterization of this plant material are useful to know the potential of some accessions for use in turf breeding. We show the main results of leaf anatomy, floral morphology, agronomic characterization, tolerance to dollar spot fungus by artificial inoculation and genetic characterization by amplified fragment length polymorphism markers (AFLP) in 28 bentgrass, 15 *F. rubra* and nine *F. ovina* accessions. We also highlight the selection and multiplication of three *A. capillaris*, one *F. rubra* and one *F. ovina* accessions of interest in creating turfgrass varieties.

INTRODUCCIÓN

Junto a los usos tradicionales de las especies pratenses en la siembra de praderas, las condiciones climáticas cambiantes (calentamiento global, variación de temperaturas, incidencia de condiciones extremas, etc.) están promoviendo la necesidad de reducir el consumo de agua y el interés por la selección de especies y cultivares para la implantación de céspedes que presenten una calidad aceptable (Svobodová *et al.*, 2013).

Estas nuevas condiciones pueden incrementar el interés de gramineas cespitosas como los agrostis (*Agrostis* sp. pl.) y las festucas de hojas estrechas (*Festuca* grupo *rubra* y *ovina*), especialmente para su uso en implantación de cubiertas vegetales en zonas con riesgo de erosión, recuperación de terrenos degradados, céspedes, etc. (Fernández de Gorostiza, 1996).

En la Península Ibérica se considera que hay más de 100 taxones del género *Festuca* (De Nova *et al.*, 2006). Las festucas se dividen en dos tipos principales en base a la anchura de sus hojas: las festucas de hoja ancha como, por ejemplo: *Festuca arundinacea* Schreb. y *Festuca pratensis* Huds. y las festucas de hoja estrecha (Torrecilla y Catalán, 2002; Catalán *et al.*, 2004). Aunque la taxonomía de las festucas de hoja estrecha o festucas finas es a menudo difícil, la mayoría de las especies usadas en céspedes se pueden dividir en dos grandes grupos: *Festuca* gr. *rubra* (Sección *Aulaxyper*) y *F.* gr. *ovina* (Sección *Festuca*) (Huff y Palazzo, 1998). Las diferencias medibles entre estos dos grupos se pueden basar en la anatomía de la hoja, morfología de la vaina y la fluorescencia de las raíces (Hubbard, 1984; Wilkinson y Stace, 1991).

La clasificación de especies del género *Festuca* basada únicamente en su anatomía foliar y morfología es complicada por la variabilidad de ciertos caracteres (Šmarda *et al.*, 2005). El nivel de ploidía y la determinación del número de cromosomas (número básico de cromosomas 7 y $2n=14, 28, 42, 56$ y 70) son muy importantes para la determinación taxonómica dentro de dicho género (Wilkinson y Stace, 1991).

Las festucas de hoja estrecha, desde un punto de vista comercial, se clasifican en cinco tipos: la festuca roja o rubra rastrera o reptante (*F. rubra* subsp. *rubra*), la festuca roja semirastrera o semireptante (*F. rubra* subsp. *trichophylla*), la festuca roja encespantede (*F. rubra* subsp. *commutata*=*F. nigrescens* subsp. *nigrescens*), la festuca ovina de hojas duras o duriuscula (*F. stricta* subsp. *trachyphylla*) y la festuca ovina (*F. ovina* subsp. *tennifolia*).

Las festucas rojas rastreras producen rizomas y céspedes menos densos que las encespantedes, con una mayor tolerancia a la sequía y a situaciones de sombreo. Las festucas del grupo *ovina* se suelen usar habitualmente en restauración paisajística y en céspedes de bajo mantenimiento (poco crecimiento), con una buena tolerancia a la sequía (Turgeon, 2005).

En el caso del grupo *F. ovina*, Galli *et al.* (2006) observaron en varios taxones escasa variabilidad en los valores de dos marcadores moleculares, uno nuclear (espaciadores entre genes ribosómicos o ITSs) y otro citoplásmico (intrón del gen cloroplastidial *trnL*), lo que parece indicar que las especies con un mayor nivel de ploidía probablemente se han producido por autopoliploidía (poliploides que reúnen en su genoma, tres o más juegos completos de cromosomas de la misma especie). En cambio, las festucas del grupo *rubra* hexaploides se consideran alopoliploides (poliploides que reúnen en su genoma tres o más juegos completos de cromosomas de al menos dos especies diferentes; Jauhar, 1975; Kerguelén y Plonka, 1989).

El género *Agrostis* (familia *Poaceae*) en la Península Ibérica incluye 18 especies anuales y perennes con un elevado grado de alogamia e hibridación (Bradshaw, 1957; Romero García *et al.*, 1988; Wipff y Fricker, 2000). Algunas de ellas son usadas comercialmente en céspedes y campos de golf (Turgeon, 2005; Oliveira *et al.*, 2010b), entre ellas *A. stolonifera* ($2n = 4x = 28, A2A2A3A3$), *A. capillaris* ($2n = 4x = 28, A1A1A2A2$) y *A. castellana* ($2n=4x=28, A1A1A2A2$ y $2n=6x=42, A1A1A1A2A2A2$) (Jones 1956a,b,c; McBryde, 2006). Evidencias citológicas y moleculares sugieren la naturaleza alopoliploide de estas especies del género *Agrostis* (Jones, 1956a,b,c; Wipff y Fricker, 2000; Vergara y Bughrara, 2003).

A. stolonifera es la especie preferida para los "greens" (zona donde está el hoyo), calles ("fairways") y lugares donde se comienza el juego en cada hoyo ("tee") de los campos de golf, debido a su excelente tolerancia a las alturas bajas de siega y a un hábito de crecimiento rastrero y estolonífero que ofrece una rápida recuperación de los daños (Warnke *et al.* 1997; Funk, 1998; Bonos y Huff, 2013).

Últimamente existe un interés en el desarrollo de cultivares de agrostis común (*A. capillaris*) para las calles y las zonas donde se comienza el juego en cada hoyo de los campos de golf, debido a su hábito de crecimiento más erecto, menor tendencia a la formación de fieltro y mayor tolerancia a la enfermedad de la mancha del dólar (*Sclerotinia homoeocarpa* F.T. Bennet) que *A. stolonifera* (Bonos y Huff, 2013). Esta enfermedad se manifiesta como manchas de lejía aproximadamente del tamaño de una moneda de un dólar de plata, que se pueden superponer dando lugar a zonas irregulares de césped quemado y muerto (Walsh *et al.*, 1999). El desarrollo de cultivares de especies cespitosas resistentes a esta enfermedad podría reducir el coste y el impacto ambiental de las aplicaciones de fungicida (Bonos *et al.*, 2003).

La clasificación de las especies basada únicamente en caracteres de anatomía foliar y morfológicos es complicada por la variabilidad en ciertos caracteres; en gran parte, debido a la existencia de híbridos (Romero García *et al.*, 1988; Bonos *et al.*, 2002). Por otro lado, el nivel de ploidía se ha usado frecuentemente para la discriminación de especies dentro del

Con la colaboración de:



© José Alberto Oliveira Prendes

Producción de semilla prebase de *Festuca rubra* cultivar Moraima en Candás (Asturias).

Red fescue pre-base seed production cultivar Moraima in Candás (Asturias).

género. Así, el número cromosómico básico de *Agrostis* es $x=7$, habiendo especies diploides, tetraploides y hexaploides (e.g., *A. curtisii*, $2n=2x=14$; *A. capillaris*, $2n=4x=28$ y *A. castellana*, $2n=6x=42$, respectivamente) (Bonos *et al.*, 2002). La determinación del nivel de ploidía se ha realizado tradicionalmente mediante el recuento de cromosomas en metafase mitótica. Sin embargo, este procedimiento es lento y dependiente de obtener células en división, que no siempre es fácil. Hay otras alternativas al recuento cromosómico que también se emplean y que no dependen de disponer de células en división. Entre estas técnicas se encuentra el estudio del tamaño y densidad de los estomas (van Duren *et al.*, 1996) o el tamaño de las células (Hao *et al.*, 2002), pero no son tan exactas como el propio recuento cromosómico. Más recientemente se han puesto a punto otros procedimientos en los que se emplea la citometría de flujo y que se fundamentan en la existencia de una correlación muy alta entre el contenido en ADN nuclear y el nivel de ploidía (Dolezel *et al.*, 2007). Aunque esta técnica es la que mejor y más rápidamente permite

determinar el nivel de ploidía, el recuento de los cromosomas sigue siendo el método que da unos resultados más fiables.

El principal objetivo de la recolección de recursos fitogenéticos de especies pratenses es el disponer de una base genética amplia para poder trabajar en programas de mejora genética. Tras la recolección, la caracterización inicial de recursos genéticos en ensayos de campo está sujeta a variaciones anuales del clima. Los resultados obtenidos se deben interpretar teniendo en cuenta estas variaciones y son útiles en programas de mejora en ambientes similares a donde se realizaron los ensayos de campo (Tyler *et al.*, 1987). La caracterización de plantas aisladas (UPOV, 1990, 2006; NTEP, 1998) tiene un valor limitado, dado que los rendimientos estacionales en estas plantas no están bien correlacionados con los rendimientos en parcelas de cultivo (Lazenby y Rogers, 1964). Su uso principal es la determinación de las características florales, de las que la fecha de espigado es probablemente el carácter más importante para determinar el ritmo de crecimiento. La ventaja de la caracterización en plantas

Con la colaboración de:

aisladas es que la caracterización inicial se puede hacer con la siembra de un número pequeño de semillas. El análisis multi-variante de los datos obtenidos en la caracterización se ha usado por muchos autores (Hayward *et al.*, 1982; Charmet *et al.*, 1989; Oliveira y González, 2000) para obtener índices de valor agronómico para cada accesión y establecer una clasificación estable de las accesiones (Charmet *et al.*, 1989).

Aunque la caracterización agronómica de las accesiones es útil en la evaluación del comportamiento agronómico y en mejora de plantas (Rao *et al.*, 1996), con el fin de evitar problemas como la interferencia de factores ambientales con los caracteres agronómicos y de anatomía foliar de hoja usados en las clasificaciones (De Nova *et al.*, 2006), se suelen usar marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificadas (AFLP) para determinar la diversidad genética en plantas forrajeras y cespitosas (Zhao *et al.*, 2006). Mian *et al.* (2002) usaron marcadores AFLP para determinar la diversidad genética en 18 poblaciones de festuca alta de Estados Unidos, mediante la estrategia de mezcla de ADN de varios individuos de una población. Majidi *et al.* (2006) usaron la misma técnica para analizar la variación y las relaciones genéticas en 34 accesiones de festucas iraníes.

Se ha observado una reducción importante de la severidad de la enfermedad de la mancha del dólar en diversas variedades de *F. rubra* infectadas por el hongo endófito *Epichloë festucae* en ensayos de campo (Clarke *et al.*, 2006). La determinación

de la presencia de hongos endófitos en el germoplasma es importante, con el fin de poder separar las posibles interacciones de dicha simbiosis en la expresión de los caracteres de la planta huésped (Kindler *et al.*, 1991). Es importante destacar que el análisis de la presencia de hongos endófitos en semillas solo indica su presencia, siendo necesaria su identificación en las plantas para confirmar su viabilidad.

FESTUCAS DE LOS GRUPOS RUBRA Y OVINA

Anatomía foliar, morfología y ploidía

Oliveira-Prendes y Fernández Casado (2014), en un estudio realizado sobre 15 accesiones de *Festuca gr. rubra* y nueve *F. gr. ovina* recogidas en diferentes localidades de Asturias y zonas limítrofes (Tabla 1), mostraron que todas las accesiones de *F. gr. rubra* presentaron vainas soldadas hasta el ápice y pubescentes, esclerénquima en macizos (más de tres) (Figura 1), sin acúleos abaxiales (hojas lisas), salvo las accesiones 7 y 8 que presentaron acúleos.

Con el fin de identificar los diferentes taxones de *F. gr. rubra*, se consideró inicialmente la presencia o ausencia de rizomas. Dos taxones no presentaron rizomas: 1) *F. nigrescens* subsp. *nigrescens*, que incluyó al cultivar control 'Wilma' y 2) *F. nigrescens* subsp. *microphylla* que incluyó los números 16 y 21

TABLA 1. Accesiones de *Festuca rubra* (Fr, 15) y *Festuca ovina* (Fo, nueve). Nº de inventario en la colección del Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos de España (CRF), nº de accesión en la colección del Área de Producción Vegetal de la Universidad de Oviedo y origen de las accesiones (Oliveira-Prendes y Fernández-Casado, 2014). *La columna Código indica el número de las accesiones en Oliveira *et al.* (2010a).

Inventario	Número	Código*	Provincia	Localidad	Hábitat	Lat	Long	Alt(m)
NC074773	1(1259)Fo		Asturias	Niserías	Camino	43°20'N	04°45'O	400
NC074817	2(1305)Fr	5	Asturias	Folgueiras	Borde ruta	43°25'N	07°10'O	300
NC074814	3(1302)Fr	2	Asturias	Armada	Baldío	43°07'N	05°51'O	1100
NC074813	4(1301)Fr	1	Asturias	Villanueva de Oscos	Borde ruta	43°18'N	06°59'O	650
NC074768	5(1254)Fo		Asturias	Grandas de Salime	Baldío	43°15'N	06°55'O	300
NC074815	7(1303)Fr	3	León	Puerto de Tarna	Baldío	43°07'N	05°14'O	1490
NC074816	8(1304)Fr	4	Asturias	Tanes	Camino	43°15'N	05°25'O	495
NC074812	9(1300)Fo		Asturias	Pesoz	Baldío	43°16'N	06°52'O	350
NC074818	11(1306)Fr	6	Asturias	Alto de Cobertoria	Baldío	43°10'N	05°58'O	1179
NC074819	13(1307)Fr	7	Asturias	Paramios	Baldío	43°22'N	07°01'O	500
NC074823	14(1311)Fr	11	León	Carande	Baldío	42°50'N	04°50'O	1000
NC074821	15(1309)Fr	9	León	Acebedo	Baldío	43°03'N	05°07'O	1180
NC074822	16(1310)Fr	10	Asturias	Sta. Eulalia de Oscos	Baldío	43°15'N	07°01'O	560
NC074744	18(1262)Fo		Cantabria	La Fuente	Baldío	43°15'N	04°30'O	650
NC074826	19(1314)Fr	14	Asturias	Penarronda	Acantilado	43°32'N	06°59'O	3
NC074825	20(1313)Fr	13	Asturias	Navía	Playa	43°33'N	06°43'O	6
NC074820	21(1308)Fr	8	León	La Uña	Baldío	43°03'N	05°07'O	1250
NC074769	22(1255)Fo		Asturias	Villanueva de Oscos	Borde ruta	43°18'N	06°59'O	650
NC074775	24(1263)Fo		Asturias	Merodio	Baldío	43°19'N	04°45'O	400
NC074771	25(1257)Fo		Cantabria	Lebeña	Camino	43°15'N	04°35'O	210
NC074770	26(1256)Fo		Cantabria	Vega de Liébana	Borde ruta	43°05'N	04°45'O	460
NC074824	27(1312)Fr	12	Asturias	Playa de Pormenande	Acantilado	43°32'N	06°49'O	3
NC074772	28(1258)Fo		Cantabria	Pto de San Glorio	Borde ruta	43°05'N	04°45'O	1600
NC074828	29(1316)Fr	16	Lugo	Faro de Ribadeo	Acantilado	43°33'N	07°02'O	9

TABLE 1. Accessions of *Festuca rubra* (Fr, 15) and *Festuca ovina* (Fo, nine). Inventory number in the collection of the Spanish National Phylogenetic Resources Centre (CRF), accession number in the collection of the Plant Production Area of the University of Oviedo and origin of the accessions (Oliveira-Prendes and Fernández-Casado, 2014). *The column Código indicate the accession number in Oliveira *et al.* (2010a).

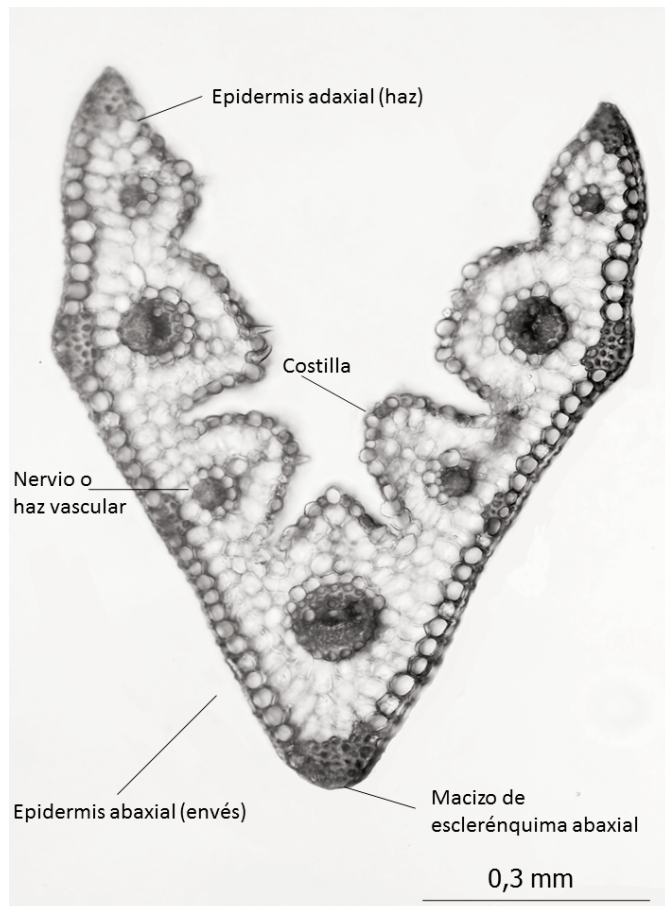


FIGURA 1. Sección transversal del limbo foliar de *Festuca* grupo *rubra* (*Festuca heteromalla*, $2n=6x=42$) (Fernández-Campos, 2008).

FIGURE 1. Leaf blade cross section of *Festuca* group *rubra* (*Festuca heteromalla*, $2n=6x=42$) (Fernández-Campos, 2008).

(Tabla 2). Las plantas con rizomas, sección foliar carenada y sin acúleos abaxiales pertenecen al taxón *Festuca heteromalla* (Números: 2, 3, 4, 11, 13, 14 y 15). Las plantas con rizomas, sección foliar poligonal y con acúleos en la superficie del haz se identificaron como *F. trichophylla* subsp. *asperifolia* (Números: 7 y 8). Las plantas de sección no carenada o poligonal y sin acúleos en la superficie del haz se identificaron como *F. rubra* subsp. *pruinosa* (Números: 19, 20, 27 y 29).

TABLA 2. Caracteres principales en los taxones identificados dentro del grupo *Festuca rubra* (Tabla 1). Dos plantas por accesión. El coeficiente de variación (%) o los valores mínimo y máximo se ponen entre paréntesis.

Accesiones	2, 3, 4, 11, 13, 14, 15	7, 8	19, 20, 27, 29	16, 21	Wilma
Pubescencia vaina	+	+	+	+	+
Rizomas	presencia	presencia	presencia	ausencia	ausencia
Acúleos abaxiales	ausencia	presencia	ausencia	ausencia	ausencia
Sección foliar	carenada	poligonal	elíptica	poligonal	poligonal
Anchura hoja (mm)	0,36 (11,1)	0,31 (1,8)	0,39 (8,4)	0,30 (6,0)	0,32 (0,31-0,33)
Diámetro foliar (mm)	0,90 (5,8)	0,71 (19,9)	0,74 (8,9)	0,63 (0,9)	0,74 (0,73-0,75)
Nº de nervios	7-8	5-6	5-7	5	5
Nº de costillas adaxiales	4-6	3	3	3	3
Nº de macizos de esclerénquima abaxial	6-8	5	5-8	7	7
Nº de cromosomas (2n)	42	42	42	42	42

En las *F. gr. rubra*, el número de cromosomas fue de $2n=6x=42$, para todas las accesiones y para el cultivar 'Wilma' de *F. nigrescens* subsp. *nigrescens*. Estas características son típicas de las *F. gr. rubra* cespitosas y semirastreras o semirepantes (Turgeon, 2005). En cuanto al contenido en ADN nuclear (valor 2C), Oliveira et al. (2010a) encontraron diferencias significativas ($P<0,01$) entre las 15 accesiones de *F. gr. rubra*. El contenido medio de ADN nuclear entre las accesiones fue de 11,04 picogramos (pg) y varió de 10,12 a 11,99. El análisis de citometría de flujo de los núcleos aislados de las hojas de las distintas accesiones de festuca mostró solo un pico en los histogramas. Estos representan el nº de células teñidas en

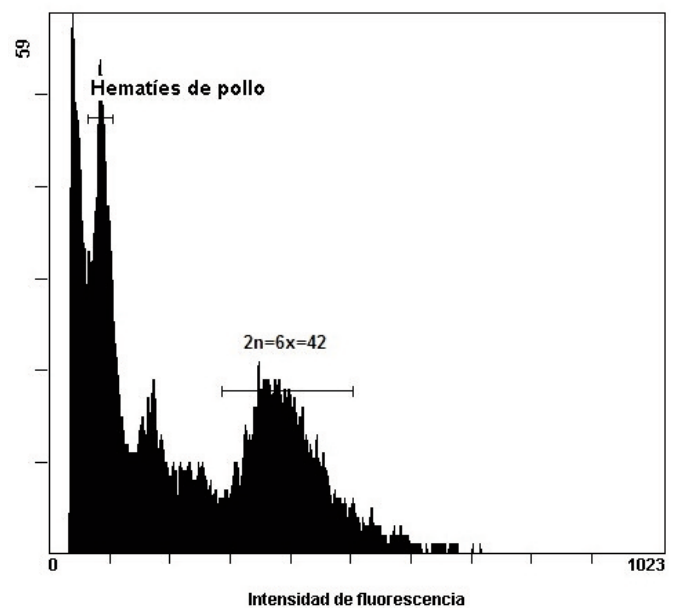


FIGURA 2. Histograma del número de células en función de la intensidad de la fluorescencia del tejido vegetal en especies del género *Festuca* grupo *rubra*, indicando las diferencias relativas de la intensidad de la señal ($2n=6x$) comparado con la señal de los hematíes de pollo usados como control.

FIGURE 2. Histogram of the number of cells depending on the intensity of fluorescence of plant tissue in species of the genus *Festuca* group *rubra*, indicating the relative differences in signal intensity ($2n=6x$) compared to the signal of the chicken red blood cells used as control.

TABLA 2. Principal characters of the taxa identified within the *Festuca* group *rubra* (Tabla 1). Two plants per accesión. The coefficient of variation or the minimum and maximum values are shown in brackets.

función de la intensidad de la fluorescencia, comparado con la intensidad en el control compuesto de células de hematíes de pollo (Figura 2). La desviación estándar media del contenido de ADN entre las accesiones fue solo de 0,64 pg y varió de 0,05 a 1,23 pg.

En el caso de las accesiones de *F. gr. ovina* y el cultivar control 'Ridu' (Tabla 3), ninguna presentó rizomas, pudiéndose diferenciar un grupo mayoritario (accesiones 1, 18, 22, 24, 25 y 26) con esclerénquima continuo, vainas abiertas y glabras, con presencia de acúleos, con sección foliar en forma elíptica y una costilla (Figura 3). Todas las accesiones de este grupo presentaron una ploidía $2n=8x=56$ (Figura 4). Debido a que sus caracteres anatómicos y morfológicos no coinciden con otras especies conocidas hasta la fecha (Díaz *et al.*, 1994), podrían corresponder a una especie aún no descrita y que merecería la pena estudiar en más profundidad.

TABLA 3. Caracteres principales en los taxones identificados dentro del grupo *Festuca ovina* (Tabla 1). Dos plantas por accesión. El coeficiente de variación (%) o los valores mínimo y máximo se ponen entre paréntesis.

TABLE 3. Principal characters of the taxa identified within the *Festuca* group *ovina* (Table 1). Two plants per accesión. Coefficient of variation or minimum and maximum values are shown in brackets.

Accesiones	1,18,22,24,25,26	5,9	28	Ridu
Pubescencia vaina	-	+	-	+
Rizomas	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia
Acúleos abaxiales	presencia	presencia	ausencia	presencia
Sección foliar	oboval-elíptica	oboval	oboval	oboval-elíptica
Anchura hoja (mm)	0,40 (15,7)	0,38 (18,5)	0,36 (0,33-0,39)	0,39 (0,38-0,40)
Diámetro foliar (mm)	0,78 (12,7)	0,67 (22,7)	1,0 (0,90-1,10)	0,85 (0,79-0,92)
Nº de nervios	5-7	5-6	7	7
Nº de costillas adaxiales	1	1	5	3
Nº de macizos de esclerénquima abaxial	-	-	3	3
Nº de cromosomas (2n)	56	70	28	42

Las accesiones 5 y 9 presentaron vainas abiertas, pubescentes y el resto de características de anatomía foliar y morfología igual que el grupo anterior de accesiones, con un nº de cromosomas de 70 ($2n=10x$). Según Ferrero Lomas (1999), el taxón *F. summilusitana* engloba dos citotipos fenotípicamente muy semejantes, uno hexaploide de distribución gredense y otro decaploide distribuido por los macizos montañosos del occidente peninsular. Estos dos citotipos se diferencian en la apertura de la vaina y en el número de nervios y de costillas adaxiales. Debido a la gran variabilidad en ese taxón (De la Fuente y Ortúñez, 2000) y la ploidía $10x$ encontrada en las accesiones 5 y 9, éstas se podrían clasificar como una especie afín a *F. summilusitana*.

Por otra parte, la accesión 28 presentó vainas abiertas y glabras, con sección foliar en forma oboval, ausencia de acúleos, tres macizos de esclerénquima y cinco costillas (Figura 5). Su número de cromosomas fue de 28 ($2n=4x$). Dicha accesión se clasificó como *F. rivas-martinezii* (Ferrero Lomas, 1999).

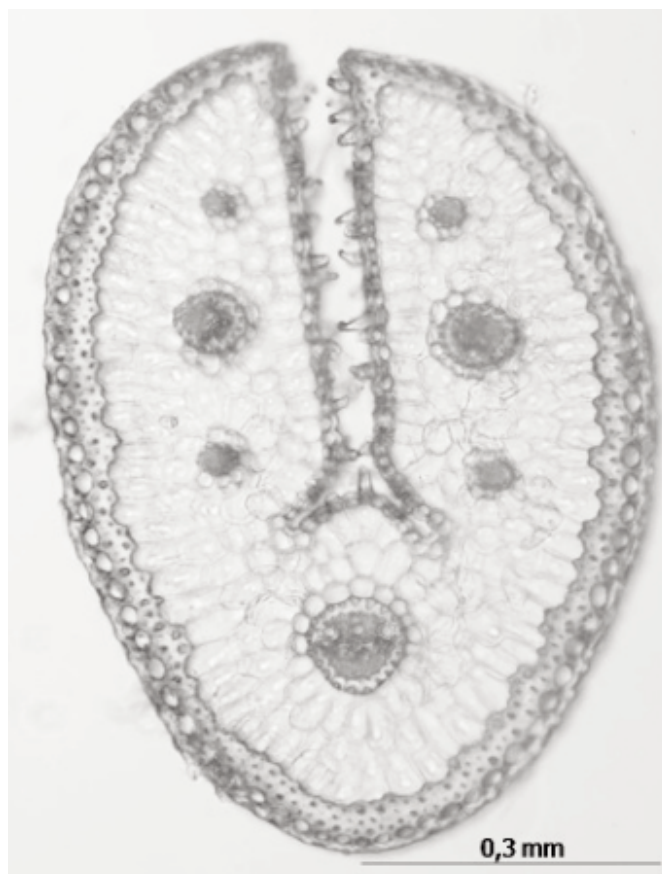


FIGURA 3. Sección transversal del limbo foliar de *Festuca* grupo *ovina* ($2n=8x=56$) (Fernández-Campos, 2008).

FIGURE 3. Leaf blade cross section of *Festuca* group *ovina* ($2n=8x=56$) (Fernández-Campos, 2008).



FIGURA 4. Cromosomas en *Festuca* grupo *ovina* ($2n=8x=56$). Tinción Feulgen. 1000X.

FIGURE 4. Chromosomes in *Festuca* group *ovina* ($2n=8x=56$). Feulgen Stain. 1000X.

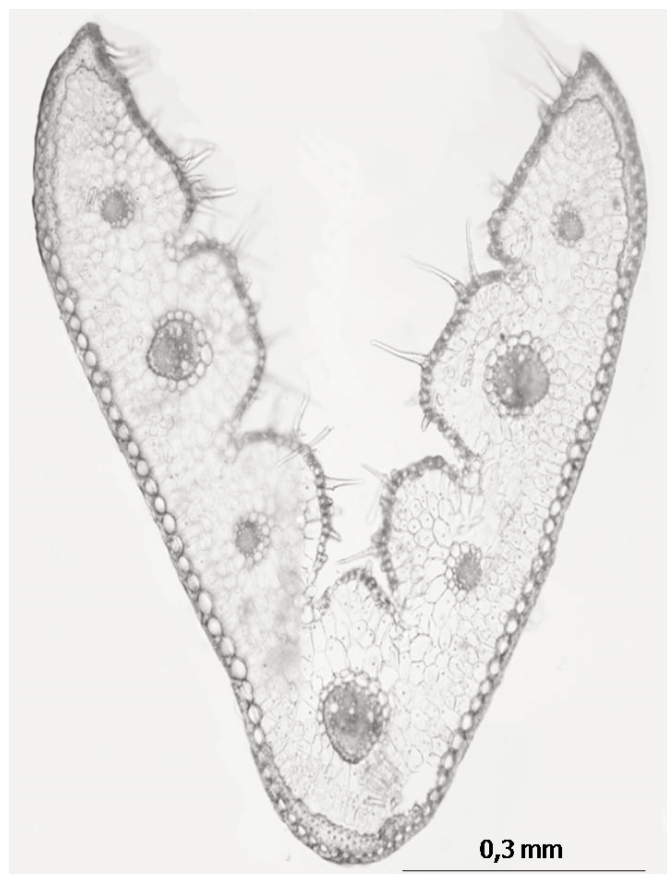


FIGURA 5. Sección transversal del limbo foliar de *Festuca* grupo *ovina* (*Festuca rivas-martinezii*, $2n=4x=28$) (Fernández-Campos, 2008).

FIGURE 5. Leaf blade cross section of *Festuca* group *ovina* (*Festuca rivas-martinezii*, $2n=4x=28$) (Fernández-Campos, 2008).

Tanto por los caracteres de anatomía foliar, morfológicos y número de cromosomas, ninguna de las accesiones estudiadas de *F. gr. ovina* se podría incluir en ninguno de los dos grupos comerciales de *F. ovina* (*F. stricta* subsp. *trachyphylla*, $2n=6x=42$ y *F. ovina* subsp. *tenuifolia*, $2n=4x=28$).

Caracterización agronómica y presencia de hongos endófitos

Festuca grupo *rubra*

Las mismas accesiones de *F. rubra* estudiadas por Oliveira-Prendes y Fernández Casado (2014) y el cultivar 'Wilma' se caracterizaron agronómicamente en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (A Coruña, Galicia), mediante un diseño en bloques completos al azar con tres réplicas de 10 plantas por accesión. Las plantas se caracterizaron agronómicamente mediante siete caracteres (color, crecimiento en otoño, primavera y verano, susceptibilidad a la roya coronada en otoño y primavera, y fecha de espigado) durante 2004 y 2005. El 86% de las accesiones estuvieron infectadas con hongos endófitos *Epichloë* (determinación realizada en 50 semillas por accesión), con un porcentaje de infección que varió entre el 2 y el 73% (Oliveira *et al.*, 2008). La alta proporción

de accesiones infectadas con hongos endófitos lleva a pensar que las mejores plantas seleccionadas en programas de mejora tienen una probabilidad alta de estar infectadas con hongos endófitos.

Mediante análisis estadísticos multivariantes se identificaron cuatro grupos que describieron el 66,5% de la variación fenotípica. El grupo 1 incluyó nueve accesiones con fecha de espigado temprana, valores intermedios de color verde, buena tolerancia a la enfermedad foliar roya coronada en el otoño y poca tolerancia en primavera, y los valores más altos de crecimiento estacional. El grupo 2 comprendió dos accesiones con valores intermedios de fecha de espigado y color verde, buenos valores de tolerancia a la roya coronada en el otoño y poca tolerancia en primavera, y valores intermedios de crecimiento estacional. El grupo 3 incluyó dos accesiones y, junto al cultivar 'Wilma', mostraron espigado precoz, color verde oscuro, buena tolerancia a la roya coronada en otoño y primavera y valores intermedios de crecimiento estacional. El grupo 4 incluyó las dos accesiones de espigado tardío, color verde oscuro, la mejor tolerancia a la roya coronada en otoño y primavera, y valores intermedios de crecimiento estacional. Los grupos 3 y 4 son los que presentan más interés con vistas a su utilización en mejora de céspedes.

Festuca gr. *ovina*

Las nueve accesiones de *F. gr. ovina* estudiadas por Oliveira-Prendes y Fernández Casado (2014) se caracterizaron agronómicamente junto con cuatro cultivares testigos (*F. ovina* 'Ridu', *F. rubra* subsp. *rubra* 'Commodore', *F. rubra* subsp. *commutata* 'Wilma' y *Poa pratensis* 'Compac'). La caracterización (Oliveira-Prendes *et al.*, 2004) se realizó desde el año 2001 al 2003 en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (A Coruña) mediante 14 caracteres agromorfológicos (fecha de espigado, longitud y anchura de la hoja bandera, altura en floración, longitud de inflorescencias, presencia o ausencia de rizomas, crecimiento en otoño, primavera y verano, enfermedades foliares en otoño y primavera, habito de crecimiento en otoño y anchura y color de hojas en primavera), mediante un diseño en bloques completos al azar con tres réplicas de 10 plantas por accesión. Se determinó también la presencia del hongo endófito *Epichloë* en una muestra de 50 semillas por accesión.

Se detectaron semillas infectadas en seis de las nueve accesiones de *F. ovina*, con un porcentaje de infección que varió entre el 6% y el 64%. La mayoría de las accesiones presentaron niveles de infección bajos a moderados (0% a 50%). No se observó un efecto significativo de la infección por hongos endófitos en caracteres observados en el ensayo de plantas aisladas, lo que coincide con los resultados de Ravel *et al.* (1995) y probablemente se deba a la reducida competencia por nutrientes o agua entre las plantas aisladas en relación a los ensayos en parcelas.

En general, las accesiones de *F. ovina* presentaron un menor crecimiento de primavera y verano, así como una menor altura en floración y una mejor tolerancia a enfermedades foliares en el otoño que las accesiones de *F. rubra* y *Poa*. Estas características parecen indicar un posible interés de alguna de estas accesiones de *F. ovina* (grupo octoploide) para su uso en céspedes de bajo mantenimiento y en restauración paisajística.

Tolerancia al hongo de la mancha del dólar en *F. rubra*

En el estudio de tolerancia al hongo *S. homoeocarpa* se utilizó la cepa SH01CIAM aislada y caracterizada genéticamente por Oliveira *et al.* (2010a) en muestras recogidas en plantas de rai-grás inglés infectadas y con síntomas de la enfermedad en un campo de golf de las Caldas (Oviedo, Asturias). Con el procedimiento de inoculación artificial indicado en Oliveira *et al.* (2010a), se identificaron dos accesiones de *F. rubra* pertenecientes al grupo 1 (13 y 16) y una incluida en el grupo 2 (6) (Tabla 1) con un nivel moderado de resistencia a dicha enfermedad (valor medio 5, 6 o mayor, escala de 1 = planta completamente afectada a 9 = planta sin síntomas). Los números 13 y 16 se clasificaron por Oliveira *et al.* (2008) como *F. rubra* subsp. *pruinosa*, siendo similares genéticamente según los cinco marcadores AFLP estudiados. Según los mismos autores la accesión número 6 pertenece al taxón *F. heteromalla* y, al estar incluida en el grupo 2, es diferente genéticamente a las accesiones 13 y 16.

Los ensayos en cámara de cultivo o en invernadero son diferentes de los ensayos de campo en varios aspectos, particularmente en el tipo y cantidad de inóculo, edad de las plantas y factores ambientales. Las limitaciones de los estudios en cámara de cultivo o en invernadero reducen el rango potencial de severidad de los ataques que se pueden observar en las accesiones. A pesar de estas limitaciones, los datos obtenidos en los ensayos de invernadero mostraron diferencias significativas entre las accesiones de *F. rubra* en su respuesta a la enfermedad de la mancha del dólar. Aunque algunos resultados sugieren una cierta resistencia de la planta huésped a algunas razas del hongo (Chakraborty *et al.*, 2006; Casler *et al.*, 2007), es importante evaluar cada enfermedad en un conjunto amplio de condiciones ambientales y en ausencia de otros patógenos. En base a estos resultados, el material seleccionado por su resistencia a esta enfermedad podría utilizarse en programas de creación de variedades de *F. rubra* que combinen una mayor tolerancia y un buen comportamiento cespitoso.

Caracterización genética de accesiones de *Festuca rubra*

Con el fin de caracterizar genéticamente 15 accesiones de *F. rubra* recogidas en el Norte de España, Oliveira *et al.* (2010a) utilizaron marcadores moleculares AFLP. Cinco combinaciones de cebadores *EcoRI*/*MseI* AFLP permitieron obtener 980

bandas, de las cuales el 82% fueron polimórficas. Un ejemplo de patrón de bandas se presenta en la Figura 6. La comparación de la semejanza genética por pares, reveló un nivel de diversidad medio entre las accesiones de *F. rubra* del norte de España. El coeficiente de semejanza genética (GSj de Jaccard) se situó entre 0,30 y 0,63, con una media de 0,55. Las accesiones más semejantes fueron las 11 y 13 (Tabla 1) (GSj = 0,63). En el otro extremo, las menos semejantes fueron la 2 y 12 (Tabla 1) (GSj = 0,30). Para estas combinaciones de cebadores AFLP, ninguna de las accesiones estudiadas compartieron el mismo perfil genético, indicando la ausencia de duplicaciones dentro de las 15 accesiones de *F. rubra*.

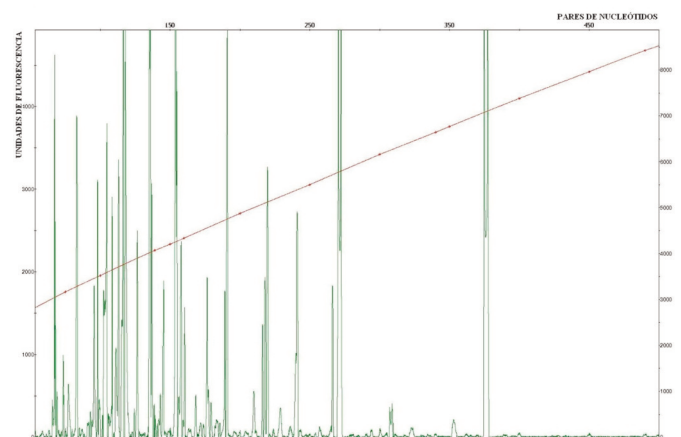


FIGURA 6. Patrón de bandas (electroferograma) generado por el marcador AFLP combinación del cebador *EcoRI* marcado con el fluorocromo verde y el *MseI* sin marcar (E-ACG+M-CAA), a partir del ADN de cinco muestras de *Festuca rubra* de la población 16 (Tabla 1) en un secuenciador ABI PRISM® 3100. La línea roja representa el patrón estándar de tamaños. En abscisas el número de pares de nucleótidos (~ longitud de los fragmentos) y en ordenadas unidades de fluorescencia (~ intensidad de fragmentos) (Labra Villar, 2008).

FIGURE 6. Banding pattern (electropherogram) generated by the AFLP marker primer combination *EcoRI* marked with a green fluorochrome and *MseI* unlabeled (E-ACG + M-CAA) from the DNA of five samples of *Festuca rubra* population 16 (Table 1) in a sequencer ABI PRISM® 3100. The red line represents the standard pattern sizes. In abscissa the number of pairs of nucleotides (~ fragment length) and in the ordinate the fluorescence units (~ fragment intensity) (Labra Villar, 2008).

El dendrograma y el análisis de componentes principales obtenidos permitieron diferenciar dos grupos principales de accesiones de *F. rubra*. El grupo más numeroso estuvo compuesto por las accesiones 1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 16 (Tabla 1), con un GSj de 0,54. El segundo grupo incluyó las accesiones 2, 3, 5 y 6 (Tabla 1), con un GSj de 0,51.

La comparación entre la matriz agronómica (distancias Euclídeas), obtenida por Oliveira *et al.* (2008), y los datos AFLP no mostraron una correlación significativa ($r = -0,04$, $P = 0,4011$) según la estadística Z de Mantel. Estos resultados sugieren que estos dos métodos de evaluación de la diversidad genética dan

diferentes estimaciones de las relaciones genéticas entre las accesiones de *F. rubra* del Norte de España, al igual que lo indicado por otros autores (Maric *et al.*, 2004; Tar'an *et al.*, 2005).

La diversidad genética obtenida en este trabajo se podría atribuir al hecho de que las accesiones de *F. rubra* son alógamas y se encuentran dentro del centro de diversidad de estas especies, incluyendo niveles de ploidía y tipos reproductivos en simpatria (Perring y Walters, 1976). Desde el punto de vista de la conservación del germoplasma, el cruzamiento de accesiones dentro de cada grupo agronómico no es aconsejable debido al riesgo de recombinación genética (Oliveira y Charmet, 1988-1989); por ese motivo, las accesiones se regeneraron individualmente en aislamiento.

La necesidad de establecer una colección núcleo (López y Oliveira, 2000), más pequeña y representativa que la colección total, se justifica por la necesidad de multiplicación de semilla para su distribución a bancos de germoplasma, o para una evaluación agronómica en parcelas experimentales. Con ese fin se seleccionaría una accesión representativa en cada grupo agronómico y se multiplicaría individualmente y en aislamiento como mejor estrategia para conservar la variabilidad existente. De esta manera se conservaría cada "fenotipo" de las accesiones de *F. rubra*.

AGROSTIS

Anatomía foliar, morfología y ploidía

En un estudio realizado sobre accesiones del género *Agrostis* (Tabla 4) recogidas en diferentes localidades de Asturias y zonas limítrofes, González-García (2006) mostró que los caracteres de anatomía foliar no resultaron muy discriminantes en la separación de las diferentes especies del género, siendo mejores los caracteres morfológicos y florales. Así, el número de nervios (haces vasculares) fue mayor de siete en todas las accesiones de *Agrostis* (Figura 7), salvo en *A. curtisii* (Figura 8; García-Suarez *et al.*, 1993).

Los principales caracteres morfológicos que nos permitieron diferenciar las especies de *Agrostis* se presentan en la Tabla 5. Es de destacar que *A. stolonifera* tiene las espiguillas distribuidas a lo largo de todas las ramas del nudo inferior de la panícula, mientras que el resto de las especies estudiadas solo lo tienen en la mitad superior. La longitud de la lígula es menor que su anchura en *A. capillaris* y mayor o igual en *A. stolonifera*. *A. durieui* presenta una mayor longitud de los pedúnculos de las espiguillas respecto a la longitud de las espiguillas, siendo lo contrario en el resto de especies estudiadas.

Oliveira-Prendes y Salas-Bustamante (2015) encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre las accesiones para el contenido en ADN nuclear. De las 20 accesiones, cuatro fueron diploides ($2x=14$), 13 tetraploides

($4x=28$) (Figura 9) y tres hexaploides ($6x=42$) (Tabla 6). El contenido de ADN nuclear medio de las diploides fue de 3,22 pg, 5,13 pg en las tetraploides y 7,93 pg en las hexaploides. Los resultados están en correspondencia con los indicados por Bonos *et al.* (2002) en especies de *Agrostis* del mismo nivel de ploidía. El contenido de ADN nuclear de los tetraploides no fue exactamente el doble del de los diploides, y el de los hexaploides fue menos de tres veces el de los diploides; esto puede ser debido a las diferencias en los genomas de las especies o a la delección (pérdida de bases) de ADN repetitivo en los niveles de ploidía superiores (Bonos *et al.*, 2002).



FIGURA 7. Sección transversal del limbo foliar de *Agrostis capillaris*, accesión 500 (González-García, 2006).

FIGURE 7. Leaf blade cross section of *Agrostis capillaris*, accession 500 (González-García, 2006).

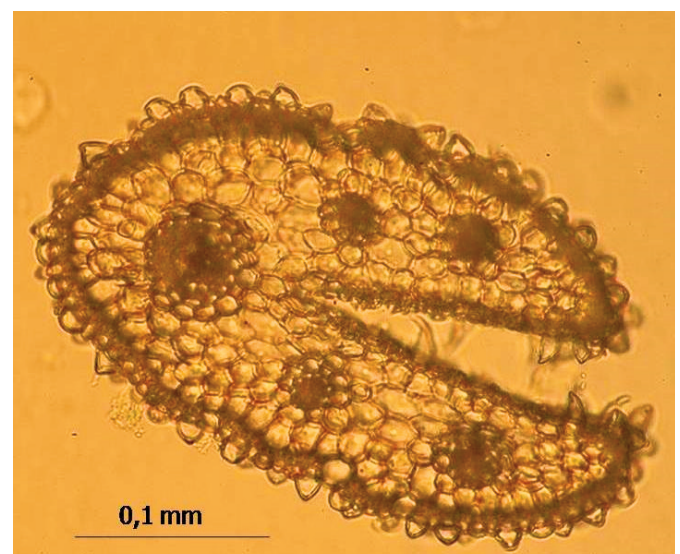


FIGURA 8. Sección transversal del limbo foliar de *Agrostis curtisii*, accesión 499 (González-García, 2006).

FIGURE 8. Leaf blade cross section of *Agrostis curtisii*, accession 499 (González-García, 2006).

Con la colaboración de:

TABLA 4. Accesiones de seis especies de *Agrostis*: una accesión de *A. durieui* (Adu), tres de *A. curtisii* (Acu), 19 de *A. capillaris* (Aca), una de *A. hesperica* (Ahes), tres de *A. stolonifera* (Asto) y una de *A. castellana* (Acas). Nº de inventario en la colección el Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos de España (CRF), nº de accesión en la colección del Área de Producción Vegetal de la Universidad de Oviedo y origen de las accesiones (Oliveira-Prendes y Salas-Bustamante, 2015). *La columna Código indica el número de las accesiones en Zhao *et al.* (2006).

TABLE 4. Accessions of six species of *Agrostis*: one accession of *A. durieui* (Adu), three of *A. curtisii* (Acu), 19 of *A. capillaris* (Aca), one of *A. hesperica* (Ahes), three of *A. stolonifera* (Asto) and one *A. castellana* (Acas) Inventory number in the collection of the Spanish National Phytogetic Resources Centre (CRF), accession number in the collection of the Plant Production Area of the University of Oviedo and origin of the accessions (Oliveira-Prendes and Salas-Bustamante, 2015). *The column Código indicate the accession number in Zhao *et al.* (2006).

Inventario	Número	Código*	Provincia	Localidad	Hábitat	Lat	Long	Alt (m)
	25Adu		Asturias	Puerto de Somiedo	Césped arenoso	43°02'N	06°13'O	1486
	167Acu		Asturias	Vegadeo	Brezal	43°21'N	07°01'O	900
NC074792	324Acu		Asturias	Pesoz	Camino	43°16'N	06°52'O	350
	499Acu		Asturias	Boal	Brezal	43°25'N	06°50'O	780
	302Aca		La Coruña	Pino	Prado higrófilo	42°54'N	08°22'O	400
	304Aca		Pontevedra	Duxame	Prado higrófilo	42°48'N	08°10'O	430
	2Aca	1265	Asturias	Pousadoiro	Prado	41°38'N	07°03'O	800
	3Aca	1266	Asturias	StaEulaliaOscos	Prado	43°15'N	07°01'O	560
	4Aca	1267	Asturias	Milladoira	Baldío	43°15'N	07°01'O	560
	5Aca	1268	Asturias	Sueiro	Prado	43°32'N	06°54'O	140
	6Aca	1269	Asturias	La Roda	Prado	43°32'N	06°58'O	100
NC074782	7Aca	1270	Asturias	El Franco	Baldío	43°32'N	06°52'O	150
	8Aca	1271	Asturias	Pilando	Prado	43°33'N	06°47'O	120
	10Aca	1273	Asturias	Miudes	Prado	43°33'N	06°47'O	90
NC074786	11Aca	1274	Asturias	La Colorada	Camino	43°33'N	06°40'O	90
NC074787	12Aca	1275	Lugo	Barbeitos	Baldío	43°09'N	07°01'O	900
	13Aca	1276	Asturias	Restrepo	Prado	43°25'N	07°59'O	600
	15Aca	1278	Asturias	Vivelez	Prado	43°34'N	06°50'O	50
	20Aca		Cantabria	Alto Campoo	Pasto de puerto	43°05'N	04°25'O	2100
	21Aca		Asturias	Alto de la Garganta	Borde carretera	43°20'N	07°00'O	896
NC074797	22Aca	1285	León	Riaño	Baldío	42°50'N	04°50'O	1000
NC074798	23Aca	1286	Asturias	Figaredo	Baldío	43°10'N	05°50'O	200
	500Aca		Asturias	Boal	<i>P. sylvestris</i>	43°25'N	06°50'O	780
	488Ahes		Asturias	Boal	Zona higrófila	43°25'N	06°49'O	800
	14Asto		Asturias	Penarronda	Playa	43°32'N	06°59'O	0
	17Asto		Asturias	Alto de la Garganta	Turberaoligotrofa	43°20'N	07°00'O	896
	18Asto		Asturias	Puerto de Somiedo	Turberaeutrofa	43°02'N	06°13'O	1486
	505Acas		León	Barrios de Luna	Pastizal	42°50'N	05°51'O	1039

TABLA 5. Caracteres de morfología floral usados para la determinación de las especies del género *Agrostis*. Tres plantas por accesión (Oliveira-Prendes y Salas-Bustamante, 2015).

TABLE 5. Floral morphology characters used for the determination of species of the genus *Agrostis*. Three plants per accession (Oliveira-Prendes and Salas-Bustamante, 2015).

	<i>A. durieui</i>	<i>A. curtisii</i>	<i>A. hesperica</i>	<i>A. capillaris</i>	<i>A. stolonifera</i>	<i>A. castellana</i>
Posición espiguillas en ramas nudo inferior panicula	mitad superior	mitad superior	mitad superior	mitad superior	toda la rama	mitad superior
Longitud espiguillas (mm)	1,2-1,7	3,1-3,2	2,4-2,6	2,0-2,4	2,0-2,6	2,0-2,2
Longitud pedúnculos espiguillas/longitud espiguillas	>	≤	≤	≤	≤	≤
Longitud palea/lema	>1/3	≤1/3	≤1/3	>1/3	>1/3	>1/3
Longitud lígula/anchura lígula	<	≥	<	<	≥	≥

Dentro de cada nivel de ploidía se incluyeron diferentes especies del género *Agrostis* en correspondencia con los resultados de otros autores (Romero García *et al.*, 1988; Bonos *et al.*, 2002). Aunque el contenido en ADN nuclear no permitió diferenciar especies dentro del mismo nivel de ploidía, la accesión 14 de *A. stolonifera* (tetraploide) presentó un valor significativamente mayor de ADN nuclear que el resto de accesiones tetraploides. Dentro de *A. stolonifera* se encontraron dos niveles de ploidía (4x y 6x) que, aunque morfológicamente similares (Tabla 5), correspondieron a dos especies diferentes. La especie tetraploide se denomina habitualmente *A. stolonifera* var. *pseudopungens*, y está ligada a sustratos salinos (Romero Gar-

cía *et al.*, 1988). Por su parte, las accesiones de la especie hexaploide se caracterizan por ser plantas de lugares húmedos no halófilos (turberas). La accesión 17 al estar compuesta por plantas robustas, con panículas de gran tamaño y hojas planas de 4-8 mm de anchura, se correspondería, según Romero García *et al.* (1988), con *A. stolonifera* var. *scabriglumis*. La accesión 18, por el contrario, estaba compuesta de plantas menos robustas, con hojas planas de 2-4 mm de anchura y según Romero García *et al.* (1988) se podría corresponder con la variedad típica *A. stolonifera* var. *stolonifera*. Los tres taxones están descritos en el Principado de Asturias (Fernández Prieto *et al.*, 2014).

Con la colaboración de:



TABLA 6. Medias \pm desviación estándar para el contenido en ADN (valor 2C) en pg en 20 accesiones del género *Agrostis* y el cultivar de *Agrostis capillaris* 'Golfin'. LSD (Mínima diferencia significativa al nivel del 5%). Diferencias significativas entre cualquiera de dos medias se indican por diferentes letras en la misma columna (Oliveira-Prendes y Salas-Bustamante, 2015).

TABLE 6. Means \pm standard deviation for the DNA content (2C value) in pg in 20 accessions of the genus *Agrostis* and the cultivar of *Agrostis capillaris* 'Golfin'. LSD (Least significant difference at 5%). Significant differences between any two means are indicated with different letters in the same column (Oliveira-Prendes and Salas-Bustamante, 2015).

Número	Especie	ADN (pg)	Ploidía
25	<i>A. durieui</i>	3,23 \pm 0,14e	2x
167	<i>A. curtisii</i>	3,24 \pm 0,04e	2x
324	<i>A. curtisii</i>	3,12 \pm 0,05e	2x
499	<i>A. curtisii</i>	3,30 \pm 0,01e	2x
7	<i>A. capillaris</i>	4,83 \pm 0,43d	4x
23	<i>A. capillaris</i>	4,83 \pm 0,43d	4x
302	<i>A. hesperica</i>	5,17 \pm 0,35cd	4x
304	<i>A. hesperica</i>	5,30 \pm 0,46cd	4x
11	<i>A. capillaris</i>	5,07 \pm 0,14cd	4x
12	<i>A. capillaris</i>	5,07 \pm 0,14cd	4x
20	<i>A. capillaris</i>	4,96 \pm 0,26cd	4x
21	<i>A. capillaris</i>	5,07 \pm 0,14cd	4x
22	<i>A. capillaris</i>	5,04 \pm 0,09cd	4x
500	<i>A. capillaris</i>	5,07 \pm 0,14cd	4x
Golfin	<i>A. capillaris</i>	4,90 \pm 0,21cd	4x
488	<i>A. hesperica</i>	5,32 \pm 0,05c	4x
14	<i>A. stolonifera</i>	5,76 \pm 0,30b	4x
17	<i>A. stolonifera</i>	7,85 \pm 0,32a	6x
18	<i>A. stolonifera</i>	7,96 \pm 0,23a	6x
505	<i>A. castellana</i>	7,96 \pm 0,08a	6x
LSD ($p=0,05$)		0,40	

Caracterización agronómica y tolerancia al hongo de la mancha del dólar en *A. capillaris*

Oliveira *et al.* (2010b) caracterizaron catorce accesiones de *A. capillaris* (accesiones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 22 y 23 de la Tabla 4) procedentes del norte de España en un régimen de baja fertilización durante dos años (2004 y 2005), usando un diseño de bloques completos al azar con dos repeticiones de 15 plantas por accesión (en total 30 plantas por accesión). El cultivar 'Golfin' se incluyó como control en el estudio. Todas las accesiones y el cultivar 'Golfin' se evaluaron cada año mediante 11 caracteres agromorfológicos (fecha de espigado, longitud y anchura de la hoja bandera, altura en floración, longitud de inflorescencias, longitud del entrenudo superior, calidad visual en otoño e invierno, hábito de crecimiento en otoño y anchura y color de hojas en primavera) y la susceptibilidad a la cepa SH01CIAM de *S. homoeocarpa*, en una cámara de crecimiento. Se obtuvieron correlaciones altamente significativas para los datos morfológicos evaluados en dos años ($r=0,78$, $p<0,01$), incluyendo correlaciones positivas entre algunos caracteres, como por ejemplo entre la longitud de la hoja bandera y la longitud de la inflorescencia ($r=0,93$, $p<0,01$). Los datos obtenidos se redujeron a cinco componentes principales que explicaron el 85,4%

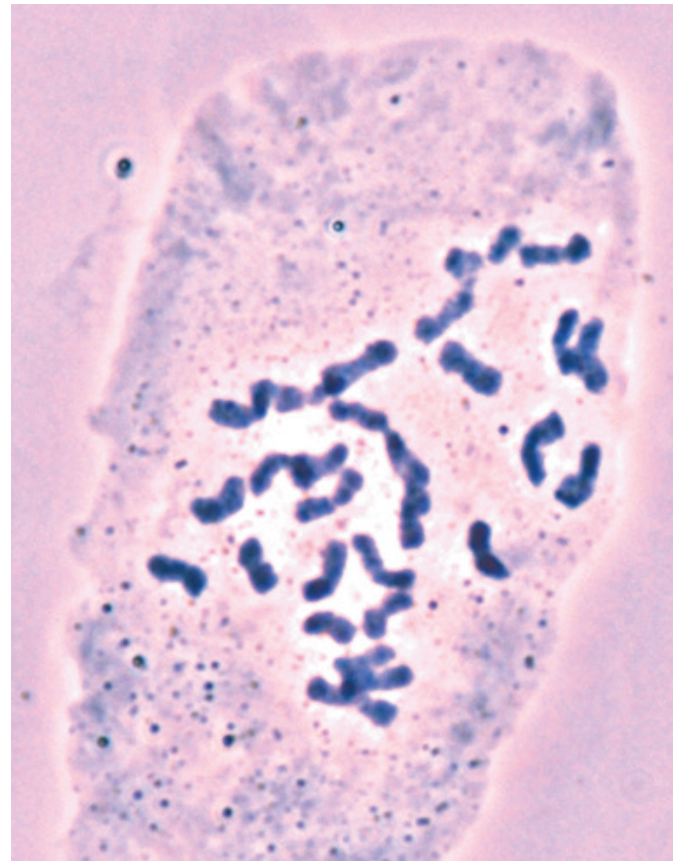


FIGURA 9. Cromosomas en *Agrostis capillaris* ($2n=4x=28$). Microscopía de contraste de fases. 1250X.

FIGURE 9. Chromosomes in *Agrostis capillaris* ($2n=4x=28$). Phase contrast microscopy. 1250X.

de la varianza total. Mediante una clasificación jerárquica, se identificaron cuatro grupos que describen el 50% de la variación fenotípica entre las accesiones. El grupo 1 incluyó cuatro accesiones con la mayor resistencia a la enfermedad de la mancha del dólar, color verde oscuro, espigado tardío y muy buena calidad de césped en el otoño. El grupo 2 incluyó las dos accesiones más precoces de espigado, tolerancia intermedia a la mancha del dólar y mala calidad de césped en el otoño. El grupo 3 comprendió seis accesiones tardías de espigado, color verde oscuro y baja tolerancia a la mancha del dólar. El grupo 4 incluyó dos accesiones y el cultivar 'Golfin' con color verde más claro, baja calidad otoñal de césped y la menor tolerancia a la mancha del dólar.

Teniendo en cuenta que 'Golfin' es un cultivar rústico que requiere poco mantenimiento y las accesiones del grupo 1 mostraron mejor comportamiento cespitoso que 'Golfin', se seleccionaron las plantas con mejores valores de tolerancia a la enfermedad en tres accesiones de este grupo con el fin de obtener una variedad experimental que presente un buen comportamiento cespitoso y tolerancia a esta enfermedad ya que hay autores que indican que es posible una mejora en la tolerancia a esta enfermedad en *Agrostis* (Bonos *et al.*, 2003).



Caracterización agromorfológica de accesiones del Norte de España de agrostis común (*Agrostis capillaris* L.), en Candás (Asturias).

Agromorphological characterization of common bent or browntop (*Agrostis capillaris* L.) accessions collected in northern Spain, in Candás (Asturias).

Caracterización genética de accesiones de *A. capillaris*

Las accesiones de *A. capillaris* son una fuente potencial de genes de interés para la mejora genética de la resistencia a diversos tipos de estrés ambiental y enfermedades en otras especies de *Agrostis*, en particular en *A. stolonifera* usado en los campos de golf. Con el fin de conservar y completar la caracterización agronómica de las accesiones de *Agrostis* del Norte de España (Oliveira *et al.*, 2010b), se estudió la diversidad genética de 14 accesiones de *A. capillaris* de esta región junto con 22 accesiones del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) mediante marcadores AFLP. Diez combinaciones de cebadores *EcoRI/MseI* y seis *PstI/MseI*, revelaron 181 y 128 bandas polimórficas, respectivamente (Zhao *et al.*, 2006).

La clasificación jerárquica sobre las estimaciones de similitud genética (GS_j) obtenidas de los marcadores AFLP reveló un nivel alto de diversidad, con valores medios de 0,51 (*EcoRI/MseI*) y 0,63 (*PstI/MseI*). La mayor diversidad se obtuvo con los marcadores *EcoRI/MseI*. Las plantas forrajeras y cespitosas son habitualmente alógamas, lo que es una característica que incrementa la diversidad de la base genética (Renganayaki *et al.*, 2001). Por su parte, la accesión 7 (Sp1270 en el trabajo de Zhao

et al., 2006) resultó diferente del resto de accesiones españolas. Esta accesión estuvo incluida en el grupo 3 obtenido mediante la clasificación agronómica y presentó un color verde oscuro, espigado precoz, gran longitud de inflorescencia y hoja bandera, poca calidad visual en otoño y poca tolerancia a la enfermedad de la mancha del dólar (valor medio 3,2).

Igual que en el estudio de las accesiones de *F. rubra*, la comparación entre la matriz agronómica (distancias Euclídeas) obtenida por Oliveira *et al.* (2010a) y los datos AFLP no mostraron una correlación significativa ($r=-0.12$ para *EcoRI/MseI*, y $r=-0.18$ para *PstI/MseI*), sugiriendo que estos dos métodos de evaluación de la diversidad genética dan diferentes estimaciones de las relaciones genéticas entre las accesiones de agrostis común. Esto puede deberse a que el estudio de los datos morfológicos se basó en sólo 11 caracteres y cada uno de ellos podría estar controlado por un pequeño número de loci de caracteres cuantitativos (QTL), que incluso podrían influir en más de uno de los caracteres morfológicos. Por tanto, la región del genoma analizada sería pequeña, a lo que habría que añadir que el ambiente también contribuye a la variación detectada en dichos caracteres. En el caso de los AFLP, aunque el número de fragmentos analizados es relativamente alto, se desconoce su localización cromosómica, por lo que podrían estar ubicados en regiones muy distantes de los QTL

Con la colaboración de:

que controlan los caracteres morfológicos estudiados, con la consiguiente falta de ligamiento y de correlación entre ellos. De hecho, una medida absoluta de la diferencia genética no es técnicamente viable, lo que requeriría una comparación de las secuencias completas del genoma. En consecuencia, cualquier marcador molecular usado para estudiar las diferencias resulta ser una estrategia de muestreo de la variación genómica total.

Por otra parte, se asume que los fragmentos AFLP de igual tamaño son homólogos, es decir, proceden de un mismo locus, cuando puede haber una minoría de bandas de igual tamaño que podría proceder de diferentes loci (Martínez, 1997). Un enfoque para superar los problemas anteriores podría basarse en el uso de marcadores moleculares como los polimorfismos de nucleótido único (SNPs), dado su gran potencial para la detección de asociaciones entre las formas alélicas de un gen y los fenotipos (Rafalski, 2002). Los AFLP son útiles para estudios taxonómicos universales porque la metodología AFLP permite detectar un gran número de loci anónimos, siendo así capaz de clasificar accesiones independientemente de las condiciones ambientales y la etapa de crecimiento de la planta. Sin embargo, como la mayoría de los caracteres deseables en mejora genética suelen ser agronómicos cuantitativos y con influencia ambiental, los estudios agro-morfológicos siguen siendo críticos en la descripción de germoplasma, y pueden servir como una herramienta eficaz para la selección de parentales agro-morfológicamente diversos en los programas de mejora. Por lo tanto, la determinación de la diversidad molecular debe ser vista como un complemento de la caracterización agro-morfológica.

CONCLUSIONES

Se caracterizaron seis especies de *Agrostis* en las 28 accesiones de la colección, mediante el uso de atributos de morfología floral y nivel de ploidía (2x, 4x y 6x). Asimismo se caracterizaron cuatro taxones de *F. rubra* en 15 accesiones y tres taxones de *F. ovina* dentro de las nueve accesiones de la colección mediante caracteres de anatomía foliar y nivel de ploidía. En *F. rubra* todas las accesiones estudiadas fueron hexaploides (6x), en cambio, en *F. ovina* se encontraron tres niveles de ploidía (4x, 8x y 10x). El 86% de las accesiones de *F. rubra* se encontraron infectadas con hongos endófitos *Epichloë* con un porcentaje de infección que varió entre el 2% y el 73%. También se detectaron semillas infectadas en seis de las nueve accesiones de *F. ovina* con un porcentaje de infección que varió entre el 6% y el 64%.

La caracterización agronómica, genética y la tasa de tolerancia al hongo de la mancha del dólar permitió la selección positiva de una accesión de *F. rubra*, una de *F. ovina* y tres accesiones de *A. capillaris*, que se multiplicaron con el fin de su utilización potencial en la creación de nuevos cultivares para céspedes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado gracias al proyecto INIA-RF-025-C2-1. Agradecemos a todas las personas que han colaborado en los diferentes ensayos cuyos resultados se presentan aquí.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BONOS S.A., CASLER M.D. Y MEYER W.A. (2003) Inheritance of dollar spot resistance in creeping bentgrass. *Crop Science*, 43, 2189-2196.
- BONOS S.A. Y HUFF D.R. (2013) Cool-season grasses: biology and breeding. En: Stier J.C. et al. (Eds) *Turfgrass: biology, use and management. Agronomy Monograph*, 56, pp 591-660, Madison, WI, Estados Unidos: ASA, CSSA, and SSSA.
- BONOS S.A., PLUMLEY K.A. Y MEYER W.A. (2002) Ploidy determination in *Agrostis* using flow cytometry and morphological traits. *Crop Science*, 42(1), 192-196.
- BRADSHAW A.D. (1957) Natural hybridization of *Agrostis tenuis* Sibth. and *A. stolonifera* L. *The New Phytologist*, 57, 66-84.
- CASLER M.D., JUNG G., BUGHRARA S.S., HAMBLIN A., WILLIAMSON C. Y VOIGT T. (2007) *Development of creeping bentgrass with multiple pest resistance*. Alexandria, VA, Estados Unidos: USGA Green Section. Disponible en: <http://gsrpdf.lib.msu.edu/ticpdf.py?file=/2000s/2007/070115.pdf>. Consulta: 10 junio 2016.
- CATALÁN P., TORRECILLA P., LÓPEZ RODRÍGUEZ J.A. Y OLMSTEAD R.G. (2004) Phylogeny of festucoid grasses of subtribe *Loliinae* and allies (*Poeae*, *Pooideae*) inferred from ITS and trnL-F sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 517-541.
- CHAKRABORTY N., CHANG T., CASLER M.D., Y JUNG G. (2006) Response of bentgrass cultivars to *Sclerotinia homoeocarpa* isolates representing 10 vegetative compatibility groups. *Crop Science*, 46, 1237-1244.
- CHARMET G., BION A. Y BALFOURIER F. (1989) Agronomic evaluation of perennial ryegrass wild populations from Ireland for use in French plant breeding programmes. *Agronomie*, 9, 985-991.
- CLARKE B.B., WHITE J.F., HURLEY H., TORRES M.S., SUN S. Y HUFF D.R. (2006) Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease*, 90, 994-998.
- DE LA FUENTE V. Y ORTUÑEZ E. (2000). Nueva especie de *Festuca* L. sección *Festuca* (*Poaceae*) en la Península Ibérica. *Lazaroa*, 21, 3-6.
- DE NOVA P.J., DE LA CRUZ M., MONTE J.V. Y SOLER C. (2006) Genetic relationships within and among Iberian fescues (*Festuca* L.) based on PCR-amplified markers. *Genome* 49, 1170-1183.
- DÍAZ T.E., FERNÁNDEZ J.A., NAVA H.S. Y FERNÁNDEZ M.A. (1994) Catálogo de la flora vascular de Asturias. *Itinera Geobotánica*, 8, 529-600.

Con la colaboración de:



- DOLEZEL J., GREILHBER J. Y SUDA J. (2007) Flow cytometry with plants: an overview. En: Dolezel J. et al. (Eds) *Flow cytometry with plant cells. Analysis of genes, chromosomes and genomes*, pp. 41-65. Weinheim, Alemania: Wiley.
- FERNÁNDEZ DE GOROSTIZA M. (1996) Semillas de gramíneas para césped. En: De Liñán C. (Ed) *Áreas Verdes, Parques y Jardines*, pp. 229-288. Madrid, España: Ediciones Agro-técnicas S.L.
- FERNÁNDEZ-CAMPOS V. (2008) *Caracterización morfológica y anatomía foliar de festucas finas del Norte de España*. Proyecto Fin de Carrera de Ingeniería Técnica Forestal. Área de Producción Vegetal. Escuela Politécnica de Mieres. Universidad de Oviedo.
- FERNÁNDEZ PRIETO J.A., CIRES RODRIGUEZ E., BUENO SÁNCHEZ A., VÁZQUEZ V.M. Y NAVA FERNÁNDEZ H.S. (2014) *Catálogo de las plantas vasculares del Principado de Asturias*. Gijón, España: Ayuntamiento de Gijón y Jardín Botánico Atlántico. Disponible en: http://botanico.gijon.es/multimedia_objects/download?object_type=document&object_id=158674. Consulta: 12 mayo 2016.
- FERRERO LOMAS L.M^a. (1999) *Citogenética, evolución y biogeografía de las secciones Festuca L. (Intravaginales) y Esikia Willk., del género Festuca L. (Poaceae) en la Península Ibérica*. Tesis doctoral. Madrid, España: Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.
- FUNK C.R. (1998) *Opportunities for genetic improvement of underutilized plants for turf*. New Brunswick, NJ, Estados Unidos: Rutgers University. Disponible en: <https://turf.rutgers.edu/research/abstracts/symposium1998.pdf>. Consulta: 13 septiembre 2016.
- GALLI Z., PENKSZA K., KISS E., SÁGI L. Y HESZKY L.E. (2006) Low variability of internal transcribed spacer rDNA and trnL (UAA) intron sequences of several taxa in the *Festuca ovina* aggregate (Poaceae). *Acta Biologica Hungarica*, 57 (1), 57-69.
- GARCIA-SUAREZ R., FERNANDEZ-PRIETO J.A. Y FERNANDEZ-CARVAJAL ALVAREZ M^a.C. (1993) Clave para la identificación de gramíneas pratenses de Asturias. *Lagasalia*, 17(1), 37-57.
- GONZÁLEZ GARCÍA M. (2006) *Identificación de agrostis y festucas finas mediante caracteres de hoja morfológicos y anatómicos*. Proyecto Fin de Carrera de Ingeniería Técnica Forestal. Área de Producción Vegetal. Escuela Politécnica de Mieres. Universidad de Oviedo.
- HAO J., YOU C. Y DENG X. (2002) Cell size as a morphological marker to calculate the mitotic index and ploidy level of citrus callus. *Plant Cell Reports*, 20, 1123-1127.
- HAYWARD M.D., DE LACEY I.H., TYLER B.F. Y DRAKE D.W. (1982) The application of pattern analysis for the recognition of adaptation in a collection of *Lolium multiflorum* populations. *Euphytica*, 31, 383-396.
- HUBBARD C.E. (1984) *Grasses: a guide to their structure, identification, uses and distribution in the British Isles*. London, Reino Unido: Penguin Books.
- HUFF D.R. Y PALAZZO A.J. (1998) Fine fescue species determination by laser flow cytometry. *Crop Science*, 38, 445-450.
- JAUHAR P.P. (1975) Genetic regulation of diploid-like chromosome pairing in the hexaploid species *Festuca arundinacea* Schreb. and *F. rubra* L. (Gramineae). *Chromosoma*, 52(4), 363-382.
- JONES K. (1956a) Species differentiation in *Agrostis* I. Cytological relationships in *Agrostis canina* L. *Journal of Genetics*, 54, 370-376.
- JONES K. (1956b) Species differentiation in *Agrostis* II. The significance of chromosome pairing in the tetraploid hybrids of *Agrostis canina* subsp. *montana* Hartmn., *A. tenuis* Sibth. and *A. stolonifera* L. *Journal of Genetics*, 54, 377-393.
- JONES K. (1956c) Species differentiation in *Agrostis* III. *Agrostis gigantea* Roth. and its hybrids with *A. tenuis* Sibth. and *A. stolonifera* L. *Journal of Genetics*, 54, 394-399.
- KERGUÉLEN M. Y PLONKA F. (1989) Les *Festuca* de la Flore de France (Corse comprise). *Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest*, 10, 1-368.
- KINDLER S.D., BREEN J.P. Y SPRINGER T.L. (1991) Reproduction and damage by Russian wheat aphid (*Homoptera: Aphididae*) as influenced by fungal endophytes and cool season turfgrasses. *Journal of Economic Entomology*, 84, 685-692.
- LABRA VILLAR L. (2008) *Caracterización de festucas del grupo rubra mediante marcadores moleculares AFLP*. Proyecto Fin de Carrera de Ingeniería Técnica Forestal. Área de Producción Vegetal. Escuela Politécnica de Mieres. Universidad de Oviedo.
- LAZENBY A. Y ROGERS H.H. (1964) Selection criteria in grass breeding. II. Effect on *Lolium perenne* of differences in population density, variety and available moisture. *Journal of Agricultural Science*, 62, 285-298.
- LÓPEZ J.E. Y OLIVEIRA J.A. (2000) Comparación de procedimientos para elaborar colecciones nucleares en poblaciones españolas de raigrás inglés e italiano. *Pastos*, 30 (1), 71-102.
- MACBRYDE B. (2006) *White paper: Perspectives on creeping bentgrass, Agrostis stolonifera L.* Riverdale, Maryland, Estados Unidos: USDA/APHIS/BRS. Disponible en: https://www.aphis.usda.gov/peer_review/downloads/cbg-wpFinal.pdf. Consulta: 26 febrero 2017.
- MAJIDI M.M., MIRLOHI A.F. Y SAYED-TABATABAEI B.E. (2006) AFLP analyses of genetic variation in Iranian fescue accessions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9, 1869-1876.
- MARIC S., BOLARIC S., MARTINCIC J., PEJIC I. Y KOZUMPLIK V. (2004) Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers, morphological traits and coefficients of parentage. *Plant Breeding*, 123, 366-369.
- MARTINEZ M. (1997) Sistemática Molecular: Comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60, 123-136.

- MIAN M.A., HOPKINS A. Y ZWONITZER J. (2002) Determination of genetic diversity in tall fescue with AFLP markers. *Crop Science*, 42, 944-959.
- NTEP (1998) *National turfgrass evaluation workbook*. Maryland, Estados Unidos: National Turfgrass Evaluation Program.
- OLIVEIRA J.A. Y CHARMET G. (1988-1989) Polimorfismo isoenzimático de seis poblaciones naturales de raigrás inglés de Galicia. *Pastos*, XVIII-XIX:69-85.
- OLIVEIRA-PRENDES J.A., COSTAL ANDRADE L. Y GONZÁLEZ ARRÁEZ E. (2004) Análisis multivariante de la variabilidad agronómica de especies cespitosas en Galicia. En: García Criado B. et al. (Eds) *Pastos y Ganadería extensiva*, pp. 497-501. Salamanca, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.
- OLIVEIRA-PRENDES J.A. Y FERNÁNDEZ-CASADO M.A. (2014) Anatomía foliar, morfología y ploidía en festucas de hojas estrechas de los grupos rubra y ovina. En: Busqué J. et al. (Eds) *Pastos y PAC 2014-2020*, pp. 49-56. Potes, Cantabria: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.
- OLIVEIRA J.A. Y GONZÁLEZ A. (2000) Recursos fitogenéticos de raigrás inglés europeos: valor agronómico en condiciones de bajo mantenimiento. *Investigaciones Agrarias: Producción y Protección Vegetal*, 15(1-2), 67-78.
- OLIVEIRA J.A., GUTIÉRREZ-VILLARIAS M.I., FERNÁNDEZ-CASADO M.A., COSTAL-ANDRADE L., GONZÁLEZ-ARRÁEZ E., BUGHRARA S.S. Y AFIF E. (2008) Agronomic, leaf anatomy, morphology, endophyte presence and ploidy characterization of accessions of *Festuca* group rubra collected in northern Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6, 586-598.
- OLIVEIRA J.A., MONTEAGUDO A.B., BUGHRARA S.S., MARTINEZ J.L., SALAS A., NOVO-UZAL E. Y POMAR F. (2010a) Genetic characterization and Dollar spot fungus susceptibility in accessions of *Festuca rubra* from Northern Spain. *HortScience*, 45(6), 857-862.
- OLIVEIRA J.A., NOVO-UZAL E., POMAR F., BUGHRARA S.S. Y AFIF E. (2010b) Agromorphological characterization and dollar spot fungus susceptibility in accessions of common bent (*Agrostis capillaris* L.) collected in northern Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(1), 56-66.
- OLIVEIRA-PRENDES J.A. Y SALAS-BUSTAMANTE A. (2015) Ploidía y contenido en ADN nuclear en germoplasma de *Agrostis* mediante citometría de flujo. En: Cifre Llompert J. et al. (Eds) *Pastos y Forrajes en el siglo XXI*. pp. 177-184. Palma, Mallorca: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.
- PERRING F.H. Y WALTERS S.M. (1976). *Atlas of the British flora*. London. Reino Unido: Botanical Society of the British Isles.
- RAO S.A., RAO K.E.P., MENGESHA M.H. Y REDDY V.G. (1996) Morphological diversity in sorghum germplasm from India. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43, 559-567.
- RAFALSKI A. (2002) Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 94-100.
- RAVEL C., CHARMET G. Y BALFOURIER F. (1995) Influence of the fungal endophyte *Acremonium lolii* on agronomic traits of perennial ryegrass in France. *Grass and Forage Science*, 50, 75-80.
- RENGANAYAKI K., READ J.C. Y FRITZ A.K. (2001) Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theoretical & Applied Genetics* 102,1037-1045.
- ROMERO GARCIA A.T., BLANCA LÓPEZ G. Y MORALES TORRES C. (1988) *Revisión del género Agrostis L. (Poaceae) en la Península Ibérica*. Ruizia Tomo 7. Madrid, España: Editorial CSIC.
- ŠMARDÁ P., MÜLLER J., VRÁNA J. Y KOČI K. (2005) Ploidy level variability of some Central European fescues (*Festuca* subg. *Festuca*, *Poaceae*). *Biologia Bratislava*, 60(1), 25-36.
- SVOBODOVÁ M., MARTINEK J., KRÁLÍČKOVÁ T., NAŠINEC I. Y ŠANTRŮČEK J. (2013) Competition ability of selected amenity varieties of *Festuca rubra* in mixture with *Deschampsia cespitosa*. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 49, 70-76.
- TAR'AN B., ZHANG C., WARKENTIN T., TULLU A. Y VANDENBERG A. (2005) Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome*, 48, 257-272.
- TORRECILLA P. Y CATALAN P. (2002) Phylogeny of broad-leaved and fine-leaved *Festuca* lineages (*Poaceae*) based on nuclear ITS sequences. *Systematic Botany*, 27, 241-251.
- TURGEON A.J. (2005) *Turfgrass management*. New Jersey, Estados Unidos: Pearson Prentice Hall.
- TYLER B.F., CHORLTON K.H. Y THOMAS I.D. (1987) Preliminary screening of forage grasses. En: Tyler B.F. (Ed) *Collection, characterization and utilization of genetic resources of temperate forage grass and clover*, pp. 13-17, Rome, Italia: IBPGR.
- UPOV (1990) *Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability: Agrostis spp.* Geneve, Suiza: UPOV.
- UPOV (2006) *Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability: red fescue, sheep's fescue, hair fescue, reliant hard fescue, shade fescue, pseudovina*. Geneve, Suiza: UPOV.
- VAN DUREN M., MORPURGO R., DOLEZEL J. Y AFZA R. (1996) Induction and verification of autotetraploids and diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. *Euphytica*, 88, 25-34.
- VERGARA G.V. Y BUGHRARA S.S. (2003) AFLP analyses of genetic diversity in bentgrass. *Crop Science*, 43, 2162-2171.
- WALSH B., IKEDA S.S. Y BOLAND G.J. (1999) Biology and management of dollar spot (*Sclerotinia homoeocarpa*); an important disease of turfgrass. *HortScience*, 34, 13-21.

- WARNKE S.E., DOUCHES D.S. Y BRANHAM B.E. (1997) Relationships among creeping bentgrass cultivars based on isozyme polymorphisms. *Crop Science*, 37, 203–207.
- WILKINSON M.J. Y STACE C.A. (1991) A new taxonomic treatment of the *Festuca ovina* L. aggregate (*Poaceae*) in the British Isles. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 106, 347–397.
- WIPFF J.K. Y FRICKER C.R. (2000) Determining gene flow of transgenic creeping bentgrass and gene transfer to other bentgrass species. *Diversity*, 16 (1-2), 36-39.
- ZHAO H., BUGHRARA S. Y OLIVEIRA J.A. (2006) Genetic diversity in colonial bentgrass (*Agrostis capillaris* L.) revealed by *EcoRI-MseI* and *PstI-MseI* AFLP markers. *Genome*, 49, 328-335.