

## DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Lotus corniculatus* DETERMINADA POR CARACTERES MORFOLÓGICOS Y RAPDs

### GENETIC DIVERSITY IN *Lotus corniculatus* DETERMINED BY MORPHOLOGIC TRAITS AND RAPDs

Gabino García de los Santos<sup>1\*</sup> y Jeffrey J. Steiner<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Especialidad en Producción de Semillas, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. CP. 56230. Montecillo, Edo. de México. Tel: 01 (595) 952-0200 Ext. 1555. Correo electrónico: garciag@colpos.mx. <sup>2</sup> National Forage Seed Production Research Center. USDA-ARS. 3450 SW Campus Way, Corvallis, OR 97331-7102

\* Autor responsable

#### RESUMEN

El trébol “pata de pájaro” (*Lotus corniculatus* L.) es una leguminosa perenne con amplia distribución en las regiones templadas de Europa, Asia Menor, Norte de África y Norte de Sudamérica, y forma parte de las más de 100 especies que componen el complejo género *Lotus*. Su calidad nutritiva es comparable a la de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) y el trébol blanco (*Trifolium repens* L.), y su consumo en fresco no produce timpanismo en el ganado; además es resistente a sequía y a salinidad. El conocimiento de los patrones de variación existentes en esta especie es importante para un mejor aprovechamiento de las colecciones en los bancos de germoplasma. En esta investigación se hizo la caracterización y comparación por morfología y por análisis de polimorfismos aleatorios amplificados de ADN (RAPDs) de 28 colectas de *Lotus corniculatus* L., y la determinación de las relaciones filogenéticas entre las clasificaciones morfológicas, ecológicas, por RAPDs, y por distancias geográficas de los sitios de colecta. Los genotipos se clasificaron en cinco grupos formados por 18 caracteres morfológicos y en cuatro grupos obtenidos con 130 bandas polimórficas RAPDs. La similitud morfológica entre los genotipos se relacionó con las distancias geográficas de los sitios de colecta, y con las características ecológicas de los sitios de origen de las colectas. La similitud entre las clasificaciones genéticas y ecológicas sugiere que los genotipos adaptados a hábitats similares, aunque geográficamente distantes, han adquirido fenotipos similares. Por ello se recomienda que las clasificaciones de *L. corniculatus* se hagan con base en características ecogeográficas y morfológicas.

**Palabras clave:** *Lotus corniculatus* L., germoplasma, RAPDs, morfología, caracteres ecológicos, taxonomía.

#### SUMMARY

Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) is a widely distributed perennial forage legume species found in temperate regions of Europe, Asia Minor, North Africa, and North and South America. It is one of the 100 species composing the complex genus of *Lotus*. Its nutritious quality is compared to alfalfa (*Medicago sativa* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.), and consumed in fresh do not produce meteorism in livestock; it resists drought and saline soils. An efficient utilization of germplasm collections requires an un-

derstanding about range of the variation present. The objectives of this research were to characterize and compare morphological and RAPD classifications of 28 ecologically diverse genotypes from the birdsfoot trefoil collection, and determine the phylogenetic relationship between RAPD and morphological descriptors with ecologic traits of the sites where the genotypes were collected. The genotypes were polymorphic and classified into five groups by using 18 morphologic traits, and into four groups by using 130 polymorphic random amplified polymorphic DNA bands. Morphological similarities among genotypes were related to the general geographic proximities of their collection sites and also with the ecological characteristics of their origin sites. The similarity between their genetic and ecologic classifications suggests that genotypes adapted to similar habitats, even if geographically distant, have acquired similar phenotypes. Therefore, classifications of *L. corniculatus* L. should rely on both ecogeographic and morphologic characteristics.

**Index words:** *Lotus corniculatus* L., germplasm, RAPDs, morphology, ecologic descriptors, taxonomy.

#### INTRODUCCIÓN

El trébol pata de pájaro (*Lotus corniculatus* L.) es una leguminosa forrajera perenne, alógama, que se distribuye a lo largo de las regiones templadas de Europa, Asia Menor, Norte de África y Norte de Sudamérica (Gunn *et al.*, 1992). Pertenece a la familia Fabaceae con  $2n = 4X = 24$  cromosomas, y es una de las 100 especies diferentes que componen al complejo género *Lotus*. La especie *L. corniculatus* se compone tanto de genotipos diploides como tetraploides (Ball y Chrtková-Zertová, 1968) muy emparentados, que forman grupos genéticos complejos y difíciles de reconocer tanto morfológica como bioquímicamente (Steiner y Poklemba, 1994).

Esta especie produce forraje de alta calidad que se utiliza para ensilado, producción de paja y consumo directo en verde. Debido a que no produce timpanismo en el ganado, su calidad nutritiva es comparable a la de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) y a la del trébol blanco (*Trifolium repens* L.). Además, resiste la sequía y los suelos salinos (Beuselink y Grant, 1995).

Los bancos de germoplasma han contribuido sustancialmente al desarrollo de cultivares resistentes a enfermedades, plagas, etc., a la vez que han ayudado a preservar la variación genética (Astley, 1987).

Varios tipos de descriptores se han usado en la caracterización de genotipos, sin embargo, se han enfatizado los caracteres cualitativos y cuantitativos de fácil medición (Stuessy, 1990). Los marcadores moleculares, como los derivados de la amplificación aleatoria de fragmentos de ADN (RAPDs), también se han utilizado para este propósito y han cobrado popularidad por su poder para detectar variación intraespecífica en especies complejas como *Lotus corniculatus* L.

En la medida en que en la descripción de genotipos se combinan diferentes tipos de caracteres, como isoenzimas, características morfológicas de la planta, marcadores moleculares y otros, la caracterización puede ser más confiable (Paterson *et al.*, 1991), al poderse identificar mejor los patrones de variación genética, lo que permite una mejor utilización del germoplasma (Beer *et al.*, 1993).

En las colecciones de *L. corniculatus* L. de los bancos de germoplasma de United States Department of Agriculture-Agriculture Research Service-National Plant Germplasm System, existe una amplia variabilidad genética que requiere ser evaluada para su mejor utilización en los programas de mejoramiento (Beuselink y Steiner, 1992).

Esta investigación tuvo los objetivos siguientes: caracterizar y comparar 28 genotipos de *L. corniculatus* L. mediante caracteres morfológicos y RAPDs, y determinar las relaciones filogenéticas existentes entre ambos tipos de clasificación con las características ecológicas y geográficas obtenidas de los sitios de colecta de los genotipos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material genético

El material genético estuvo constituido por 28 genotipos de *L. corniculatus* L., provenientes del Centro de Introducción de Plantas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica, ubicado en Pullman,

Washington. Las colectas se seleccionaron por su diversidad geográfica y ecológica (Cuadro 1), y se usaron los descriptores ecológicos y ambientales del pasaporte de las colectas (Cuadro 2) (Steiner y Greene, 1996).

Cuadro 1. Relación de genotipos de *Lotus corniculatus* L. y su origen geográfico.

Colecta	País	Ciudad	Clave	Latitud (°/min)	Longitud (°/min)
PI 31276	Marruecos	Sefrou	MOR	33.63 N	04.87 W
PI 180171	Checoslov.	Tabor	CZE	49.25 N	14.41 E
PI 227512	Irán	Komkun	IRA1	29.00 N	53.00 E
PI 234670	Francia	Montombam	FRA1	48.05 N	01.41 E
PI 234811	Suiza	Chur	SWI	46.87 N	09.53 E
PI 235525	Francia	Montepl.	FRA2	43.36 N	03.53 E
PI 251143	Macedonia	Skopje	MAC	41.59 N	21.26 E
PI 260268	Etiopía	DireDawa	ETH	09.37 N	41.52 E
PI 260692	Italia	Perugia	ITA1	42.50 N	12.50 E
PI 267060	Polonia	Warsaw	POL	52.15 N	21.00 E
PI 290717	Reino Unido	Reading	UK	51.70 N	00.98 W
PI 93-94	Georgia	Kasbegi	GEO2	41.43 N	44.49 E
PI 315082	Kasakstán	Alma-Ata	KAZ	48.00 N	68.00 E
PI 315454	Rusia	St.Petersb.	RUS1	59.92 N	30.25 E
PI 319021	España	La Ercin	SPA	43.53 N	05.34 W
PI 319822	Noruega	Oppland	NOR1	61.10 N	09.40 E
PI 319823	Noruega	Rosendal	NOR2	59.59 N	06.01 E
PI 325369	Rusia	Stavrop	RUS2	45.02 N	45.59 E
PI 325379	Ukrania	Yalta	UKR	44.30 N	34.10 E
PI 369278	Rusia	Novo-Sibers.	RUS3	55.02 N	82.55 E
PI 464682	Turquía	Akdagma	TUR	36.60 N	29.90 E
PI 384882	Irán	Parvar	IRA2	35.30 N	53.25 E
PI 419228	Grecia	Nikitas	GRE1	40.14 N	23.39 E
PI 419233	Grecia	Kastaneai	GRE2	41.38 N	26.28 E
PI 430546	Rusia	Dedinovski	RUS4	55.03 N	39.07 E
PI 93-21	Georgia	Khalo	GEO1	41.41 N	42.18 E
PI 485601	Italia	Abbadia	ITA2	45.23 N	11.41 E
PI 494653	Rumania	Gheorghe	ROM	46.14 N	26.44 E

Las distancias ecológicas ( $D_{eco}$ ) entre genotipos se calcularon con los descriptores del Cuadro 2, y se construyó una matriz binaria para calcular las distancias euclidianas. Las distancias geográficas se estimaron con base en las coordenadas de latitud y longitud mediante la ecuación de Afonin (Comunicación personal, 1996)<sup>1</sup>.

$$(D_{geog}) = \sqrt{\{(Long_a - Long_b) \times (\pi r / 360) \times [\cos(Lat_a) + \cos(Lat_b)]\}^2 + \{(\pi r / 180) \times [\cos(Lat_a) + \cos(Lat_b)]\}^2}$$

donde:  $Long_a$  y  $Long_b$  son las longitudes de los sitios de colecta de los genotipos a y b que están siendo comparados, respectivamente;  $\cos(Lat_a)$  y  $\cos(Lat_b)$  son el coseno de las latitudes de los sitios de colecta a y b comparados, respectivamente; y r es el radio de la tierra (6378 km).

Previo a la germinación, las semillas se escarificaron con nitrógeno líquido, al sumergirlas tres veces durante 1 min, con reposo de 3 min entre cada inmersión;

<sup>1</sup> Vavilov Research Institute, St. Petersburg, Rusia.

luego se inocularon con una cepa específica de *Rhizobium* y se germinaron a 20 °C en cajas de plástico, con papel filtro como sustrato. Las plántulas se transplantaron en macetas de plástico de 1 L, en invernadero. Para evaluar la morfología de la planta y para el análisis de RAPDs se usaron 20 plantas por colección.

Cuadro 2. Descripción ecolimática de los sitios de las colecciones de *Lotus corniculatus* L.

Clave	Ecorregión†		Elev. (m)	Precip. (mm)	Nieve (cm)	Temperatura			Rad. Solar (%)
	Dom.‡	Div.§				Prom.	Mín.	Máx.	
MOR	TEH	ME	1680	770	0.0	11.4	3.6	22.0	72.1
CZE	TEH	CC	460	581	35.3	6.9	-2.8	17.1	36.7
IRA-1	S	TSE	1980	298	0.0	15.3	4.8	25.4	68.4
FRA-1	TEH	MA	90	696	2.5	10.5	4.2	17.4	37.6
SWI	TEH	MAM	1580	1075	124.3	-1.8	-11.2	7.0	39.4
FRA-2	S	TSE	30	146	0.0	19.0	10.4	28.8	69.7
MAC	TEH	MEM	910	496	16.2	5.4	-5.6	16.5	46.4
ETH	TRH	SAM	2130	685	0.0	16.8	12.9	18.8	67.1
ITA-1	TEH	ME	300	949	9.3	13.5	4.1	23.2	52.5
POL	TEH	CC	90	484	35.1	7.9	-3.5	19.2	34.2
UK	TEH	MA	90	645	0.0	9.7	3.8	16.5	31.7
GEO-2	TEH	MEM	800	1695	75.5	-0.1	-11.0	10.5	42.7
KAZ	S	TED	370	245	104.2	4.3	-14.0	22.0	58.6
RUS-1	TEH	COC	100	466	45.1	3.6	-8.3	17.2	30.2
SPA	TEH	MAM	700	909	0.0	8.2	2.5	14.6	43.0
NOR-1	TEH	MA	910	515	156.2	0.6	-9.5	11.9	29.7
NOR-2	TEH	MA	760	2532	17.2	1.3	-7.0	10.4	26.3
RUS-2	S	TED	30	267	5.5	9.8	-6.2	25.5	42.4
UKR	TEH	P	60	452	1.1	8.3	-1.9	20.1	53.6
RUS-3	P	SU	120	388	195.4	0.7	-18.0	18.5	41.5
TUR	TEH	MEM	1290	333	38.8	7.8	-6.6	19.8	55.4
IRA-2	S	TSE	910	842	0.0	13.4	3.6	24.0	69.1
GRE-1	TEH	ME	460	513	6.4	14.5	4.4	25.4	58.1
GRE-2	TEH	ME	150	580	0.0	13.1	2.6	23.7	52.2
RUS-4	TEH	COC	150	533	69.1	3.7	-13.0	17.9	36.0
GEO-1	TEH	MEM	900	637	109.1	2.8	-9.0	14.1	48.7
ITA-2	TEH	MA	60	751	8.0	12.6	1.1	24.2	43.2
ROM	TEH	P	910	525	27.6	6.2	-5.2	16.4	41.5

† Fuente: Bayley, (1989).

‡ Dominio: TEH=Templado húmedo; S=Seco; TRH=Tropical húmedo; P=Polar.

§ División: ME=Mediterráneo; CC=Continental caliente; TSE=Tropical subtropical/estepario; MA=Marino; MAM = Marino/montañoso; ME= Mediterráneo/montañoso; SAM=Savana/montañoso; TED=Templado desértico; COC=Continental cálido; P=Pradera; SU = Subártico.

### Descripción morfológica

Se midieron 18 caracteres morfológicos (Cuadro 3), de los que 12 fueron de tipo cualitativo y seis de tipo cuantitativo (Chrtková-Zertová, 1973), mismos que se utilizaron para cuantificar el rango de variación morfológica entre y dentro de colecciones. Para cada carácter se hicieron 10 mediciones, excepto para el número de flores por umbela en la que se hicieron 20.

Con los datos se construyó una matriz binaria, con un total de 71 niveles, al considerar la codificación de cada carácter. Las distancias morfológicas ( $D_{\text{morfo}}$ ) entre genoti-

pos se determinaron mediante la ecuación de Swofford (1993):

$$D_{\text{morfo}} = 1 - ab^{-1}$$

Donde: a es el número de caracteres compartidos, y b es el número total de caracteres codificados.

Cuadro 3. Caracteres morfológicos evaluados en las colectas de *Lotus corniculatus* L.

Carácter†	Código	Escala y unidades
<b>Planta completa</b>		
Hábito de crecimiento	HAC	Ordinal; 0: erecto (E), 1: semirrecto (SE), 2: postrado (P).
Rizomas	RIZ	Ordinal; 0: presente (P), 1: ausente (A).
Color de planta	COP	Ordinal; 0: verde claro (VC), 1: verde brillante (VB), 2: verde oscuro (VO), 3: café verdoso (CV).
<b>Tallo</b>		
Firmeza de tallo	FIT	Ordinal; 0: sólido (S), 1: hueco (H) (por cortes transversales).
Longitud de pedúnculo	LOP	mm; ramas secundarias bien desarrolladas.
<b>Hojas</b>		
Forma de folíolo central	FFC	Ordinal; 0: oblancoado angosto (OA), 1: oblancoado (OL), 2: obovado (AB), 3: redondo (R), 4: obcordado (OC).
Grosor de folíolo central	GFC	Ordinal; 0: delgado (D), 1: ligeramente carnoso (LC), 2: carnoso (C).
Pubescencia de folíolo	PDF	Ordinal; 0: liso(L), 1: semipubescente(SP), 2: pubescente (P).
Long. de folíolo central	LFC	mm; hoja central ramas secundarias bien desarrolladas.
Anchura de folíolo central	AFC	mm; hoja central, ramas secundarias bien desarrolladas.
<b>Flor</b>		
Flores por umbela	FPU	Numérica: en 20 umbelas al azar intactas.
Posición de infloresc.	POI	Ordinal; 0: en la axila de todas las hojas (TH), 1: en axila de hojas superiores (HS).
Tamaño de flor	TAF	mm; distancia de la base del cáliz a la punta de la corona.
Tamaño de cáliz	TAC	mm; umbelas al azar intactas, incluyendo el pedicelo.
Relación cáliz total/tubo de cáliz	RTT	Ordinal; 0: más corto (MC), 1: de la misma longitud (MI), 2: más largo (ML).
Forma de los dientes del cáliz	FDC	Ordinal; 0: afilado(A), 1: lanceolada(L), 2: triangular angosta (TN), 3: triangular ancha (TA).
Vellosidad del cáliz	VDC	Ordinal; 0: liso (L), 1: semipubescente (SP), 2: pubescente (P).
Color de corolla	COC	Ordinal; 0: amarillo pálido (AP), 1: amarillo brillante (AB), 2: amarillo oscuro (AO).

† Fuente: Chrtková-Zertková (1973).

### Descripción molecular

El ADN se purificó de acuerdo con la metodología de Steiner *et al.* (1995), a partir de fragmentos de hojas

jóvenes de aproximadamente 3 cm<sup>2</sup>, de cada genotipo. El material vegetal se colocó en tubos eppendorf de 1.1 mL que contenían entre 5 y 6 esferas pequeñas de plástico de 3.0 mm de diámetro, y se congeló con nitrógeno líquido; luego se molieron finamente al colocar los tubos en un agitador eléctrico.

Se usaron dos repeticiones de 30 a 40 mg de material pulverizado, a los que se agregó 1.0 mL de solución Tris-HCL 100 mM de pH 8.0, cloruro de sodio 1.4 M, EDTA 20 mM 20 g L<sup>-1</sup> de CTAB, 10 g L<sup>-1</sup> de PVP-40, y 20 mL L<sup>-1</sup> de mercaptoetanol a 60 ° C por 30 a 40 min. Posteriormente, a cada muestra se añadieron 800 µl de cloroformo y se centrifugó a 11 000 g durante 2 min. El sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf nuevo, y lentamente se le añadieron 750 µL de isopropanol, mismo que se incubó por 15 min a -20 ° C. Se hizo otra centrifugación a 11 000 por 10 min. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se lavó en 700 µL de etanol; luego se diluyó en 125 µL de Tris-HCl 10 mM a pH 8.0 y 1 mM de EDTA. La cantidad, pureza e integridad del ADN genómico obtenido se cuantificó por electroforesis con cantidades conocidas de ADN marcador, en agarosa Seakem® a una concentración de 7 g L<sup>-1</sup>. La dilución final para los posteriores análisis RAPDs fue de 1 mg mL<sup>-1</sup>.

**Análisis RAPDs**

Del ADN extraído, 10 µL se diluyeron en 1690 µL de agua (10 ng/µL), y se tomaron 3 µL para la mezcla total de reacción de 15 µL, que consistió en mezclar 50 mM de Tris-HCl a pH 9, sulfato de amonio 45 mM, cloruro de magnesio 1.5 mM, dinucleótidos dNTP's 100 mM, 0.2 mM de cada uno de los iniciadores de diez pares de bases (Cuadro 4), y una unidad de *Taq* polimerasa. La mezcla se cubrió con 50 µL de aceite mineral. Los iniciadores fueron seleccionados a partir de un estudio previo por su capacidad para detectar polimorfismo en *L. corniculatus* L. (Steiner y Pocklemba, 1994). Las reacciones de los análisis RAPDs se hicieron en un termociclador de 96 pozos con el siguiente ciclo de temperaturas: un ciclo a 95 ° C por 2.5 min. 46 ° C por 40 s; 72 ° C por 1 min, y finalmente un ciclo de 9 min a 72 ° C.

Cuadro 4. Lista de iniciadores, y sus secuencias, número y longitud de bandas RAPDs detectadas en la amplificación de ADN en los 28 genotipos de *Lotus corniculatus* L.

Iniciador†	Secuencia	Bandas (núm.)	Longitud (pares de bases)
OPA-8	5'-GTGACGTAGG-3'	31	293-1773
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	27	469-1720
OPA-6	5'-TGGTCTGCCC-3'	21	499-1423
OPA-7	5'-GGTGACGCAG-3'	18	346-1710
OPA-8	5'-GTCCACACGG-3'	15	431-1144
OPA-13	5'-TTCCCCGCT-3'	19	443-1880

† Operon, Alameda, Cal. E.U.A.

Las bandas se separaron por electroforesis con 11 µL de la mezcla de reacción, en 17.5 g L<sup>-1</sup> de agarosa Nusieve® 3:1, con amperaje constante de 90 mA, y éstas en los geles se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio, y se fotografiaron bajo un transiluminador de luz ultravioleta. La selección de las bandas se hizo con base en los siguientes tres criterios: 1) Si hubo una banda intensa y única en al menos un genotipo; 2) Si la banda no ocurrió en todos los genotipos; y 3) Si la banda fue repetible en todos los genotipos.

Las fotografías de los geles se procesaron con un escáner Epson ES-1200C y una computadora Power Macintosh 7200, con el programa NIH (National Institute of Health (2003) disponible en Internet.

Las distancias genéticas (D<sub>genét</sub>) con los datos de RAPDs se estimaron mediante la ecuación:

$$D_{genét} = 1 - ab^{-1}$$

donde *a* es el número de bandas RAPD (ausentes o presentes), y *b* es el total de bandas evaluadas.

**Análisis estadístico**

Con los datos de morfología de la planta y los datos de los RAPDs, se realizó un análisis de conglomerados mediante el método de Ward (1963), que se basa en distancias euclidianas.

La congruencia de los dendrogramas obtenidos con los diferentes conjuntos de datos se determinó mediante la prueba de Mantel (1967), mediante el comando MXCOMP del programa NTSYS versión 1.8 (Rohlf, 1993), y por cálculo de las matrices simétricas de distancias para cada conjunto de datos. La coincidencia entre pares de matrices se determinó con un valor de correlación o valor Z, que fue estimado mediante una distribución de permutaciones obtenida de 500 muestras aleatorias de todas las permutaciones posibles de matrices (Smouse *et al.*, 1986), mediante la ecuación siguiente:

$$Z = \sum_{i < j}^n X_{ij} Y_{ij}$$

donde: *X<sub>ij</sub>* y *Y<sub>ij</sub>* son dos medidas diferentes que relacionan el *i*-ésimo elemento de una muestra con el *j*-ésimo elemento, en ambas matrices.

Las relaciones entre los caracteres individuales fueron determinadas mediante los coeficientes de correlación de

Pearson (Snedecor y Cochran, 1980). La ubicación correcta de los genotipos en los grupos de los dendrogramas, se validó mediante un análisis discriminante con el número de conglomerados provenientes del análisis RAPD como el factor de clasificación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Descripción morfológica

Los 28 genotipos mostraron polimorfismo tanto en caracteres cualitativos (Cuadro 5) como en cuantitativos (Cuadro 6). En general, las plantas tuvieron un hábito de crecimiento (HAC) balanceado, aunque predominaron las de porte semierecto (SE) (39.3 %), y erecto (E) (35.7 %). En lo referente al color general de las plantas (COP), predominó el verde brillante (VB) (53.6 %). La mayoría de las colectas no presentaron rizomas (RIZ) (92.8 %), lo que coincide con lo reportado por Li y Beuselink (1996). La firmeza de tallo (FIT) fue sólida (S) (82.1 %). En su mayoría, las colectas tuvieron el foliolo central (GFC) delgado (D) (82.1 %). La pubescencia de los foliolos (PDF) fue mayormente semipubescente (SP) (67.8 %), y la forma del cáliz (FDC) fue descripción triangular angosta (TN), con una frecuencia de 71.4 %.

La clasificación morfológica de las 28 colectas con caracteres cualitativos (Cuadro 5) y cuantitativos (Cuadro 6), generó un dendrograma de cinco grupos (Figura 1), en donde se evidenció la afinidad de las diferentes colectas por su origen.

La similitud morfológica entre las colecciones correlacionó con las distancias de los sitios geográficos de colecta (Cuadro 7), ya que entre más cercanos fueron estos sitios,

más similares fueron las colecciones. De igual forma, entre más parecidas fueron las condiciones ecológicas de los lugares de colecta, los genotipos fueron más similares en su morfología.

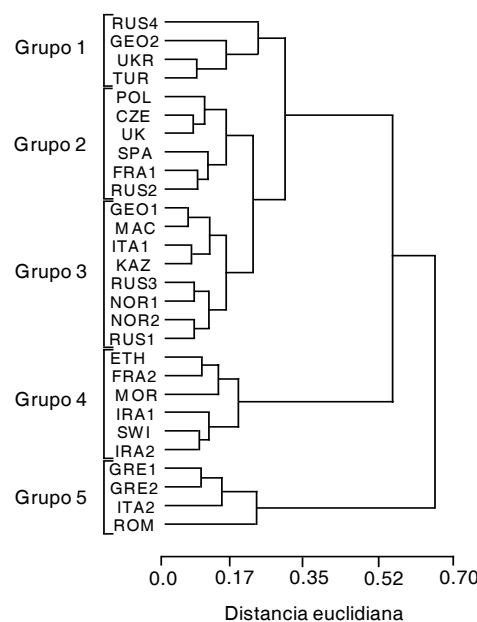


Figura 1. Agrupamiento de las 28 colecciones de *Lotus corniculatus* L. por la similitud de sus caracteres morfológicos.

Las distancias geográficas ( $D_{geog}$ ) y los sitios ecológicos estuvieron altamente correlacionados ( $Z = 4.2$ ;  $P \leq 0.001$ ) (Cuadro 7). El único descriptor ecológico que no correlacionó con las distancias geográficas fue la precipitación pluvial (Cuadro 8). Las similitudes observadas en términos de morfología de la planta se atribuyeron a baja temperatura, radiación solar, elevación y latitud del lugar.

Cuadro 5. Frecuencias observadas de los descriptores morfológicos cualitativos en la descripción de las 28 colecciones de *Lotus corniculatus* L.

Variables													
HAC	RIZ	COP		FIT		FFC	GFC	PDF	POI	RTT	FDC	VDC	COC
E	P	VC	S	OA	D	L	TH	MC	A	L	AP		
(35.7)	(7.1)	(7.1)	(82.1)	(17.8)	(82.1)	(25.0)	(21.4)	(21.4)	(10.7)	(14.3)	(21.4)		
SE	A	VB	H	OL	LC	SP	HS	MI	L	SP	AB		
(39.3)	(92.8)	(53.6)	(17.8)	(46.4)	(10.7)	(67.8)	(78.6)	(46.4)	(10.7)	(50.0)	(57.1)		
P		VO		AB	C	P		ML	TN	P	AO		
(25.0)		(39.3)		(3.6)	(7.2)	(7.2)		(32.1)	(71.4)	(35.7)	(21.4)		
		CV		R					TA				
		(0.0)		(25.0)					(7.2)				
				OC									
				(7.2)									

HAC = Hábito de crecimiento; E = Erecto; SE = Semierecto; P = Postrada; RIZ = Rizomas; COP = Color de planta; FIT = Firmeza de tallo; FFC = Forma de foliolo central; GFC = Grosor de foliolo central; PDF = Pubescencia de foliolo; POI = Posición de inflorescencia; RTT = Relación cáliz total/tubo del cáliz; FDC = Forma de los dientes del cáliz; VDC = Vellosidad del cáliz; COC = Color de corola.

Cuadro 6. Descripción morfológica de los 28 genotipos de *L. corniculatus* con seis caracteres cuantitativos.

Clave	Carácter					
	AFC (mm)	LFC (mm)	FPU (Núm)	LOP (mm)	TAF(mm)	TAC (mm)
MOR	2.5 ± 0.3	6.4 ± 0.2	1.7 ± 0.1	30.3 ± 13	11.5 ± 0.2	5.6 ± 0.1
CZE	3.7 ± 0.6	8.4 ± 0.4	4.6 ± 0.3	24.2 ± 12	13.2 ± 0.2	6.8 ± 0.1
IRA-1	2.5 ± 0.2	7.6 ± 0.1	1.8 ± 0.2	48.5 ± 10	10.6 ± 0.2	5.7 ± 0.2
FRA-1	3.5 ± 0.4	5.8 ± 0.1	3.6 ± 0.2	52.8 ± 11	13.6 ± 0.2	6.1 ± 0.2
SWE	3.8 ± 0.3	7.2 ± 0.1	2.4 ± 0.2	33.8 ± 8	13.8 ± 0.2	6.4 ± 0.1
FRA-2	3.7 ± 0.4	9.1 ± 0.3	2.0 ± 0.2	36.5 ± 5	12.3 ± 0.1	8.4 ± 0.3
MAC	3.4 ± 0.2	7.3 ± 0.2	3.9 ± 0.3	48.2 ± 7	13.0 ± 0.2	9.2 ± 0.1
ETH	5.2 ± 0.3	10.2 ± 0.3	1.6 ± 0.1	32.7 ± 8	11.4 ± 0.2	9.8 ± 0.1
ITA-1	2.8 ± 0.2	7.0 ± 0.2	4.1 ± 0.1	77.8 ± 9	14.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1
POL	4.1 ± 0.6	8.7 ± 0.3	4.7 ± 0.2	46.5 ± 13	11.6 ± 0.1	6.5 ± 0.1
UK	4.0 ± 0.6	8.1 ± 0.6	3.4 ± 0.2	49.3 ± 6	12.8 ± 0.2	7.6 ± 0.1
GEO-2	4.2 ± 0.5	7.8 ± 0.2	5.0 ± 0.2	72.1 ± 7	15.0 ± 0.1	8.8 ± 0.2
KAZ	7.1 ± 0.7	12.1 ± 0.3	4.3 ± 0.1	81.8 ± 15	14.0 ± 0.2	7.9 ± 0.2
RUS-1	3.9 ± 0.4	9.0 ± 0.2	4.7 ± 0.4	33.8 ± 7	13.0 ± 0.2	8.5 ± 0.1
SPA	2.4 ± 0.3	5.9 ± 0.1	3.2 ± 0.1	40.6 ± 7	12.2 ± 0.1	7.8 ± 0.2
NOR-1	3.9 ± 0.4	8.8 ± 0.2	5.5 ± 0.2	52.3 ± 7	14.5 ± 0.1	7.9 ± 0.2
NOR-2	3.6 ± 0.4	8.6 ± 0.2	4.8 ± 0.2	63.6 ± 7	15.0 ± 0.1	7.6 ± 0.2
RUS-2	4.1 ± 0.6	9.0 ± 0.2	3.6 ± 0.3	63.4 ± 6	12.6 ± 0.3	7.3 ± 0.1
UKR	4.2 ± 0.8	7.6 ± 0.2	2.8 ± 0.3	91.1 ± 14	10.0 ± 1.5	6.7 ± 0.2
RUS-3	3.5 ± 0.6	8.3 ± 0.4	5.8 ± 0.3	51.5 ± 7	13.8 ± 0.2	7.1 ± 0.2
TUR	4.6 ± 0.6	7.3 ± 0.3	3.9 ± 0.2	46.1 ± 8	10.9 ± 0.2	6.1 ± 0.1
IRA-2	3.1 ± 0.6	7.9 ± 0.1	2.1 ± 0.1	42.2 ± 6	12.9 ± 0.3	7.0 ± 0.1
GRE-1	3.1 ± 0.6	8.8 ± 0.4	3.1 ± 0.2	51.9 ± 5	14.5 ± 0.3	6.9 ± 0.2
GRE-2	3.7 ± 0.4	8.8 ± 0.3	3.3 ± 0.2	46.6 ± 6	14.8 ± 0.1	9.2 ± 0.1
RUS-4	4.5 ± 0.6	12.2 ± 0.3	5.4 ± 0.2	52.2 ± 4	14.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1
GEO-1	5.1 ± 0.8	7.6 ± 0.1	4.1 ± 0.2	63.7 ± 5	15.5 ± 0.1	8.2 ± 0.2
ITA-2	3.4 ± 0.3	7.4 ± 0.2	3.1 ± 0.2	58.3 ± 3	11.9 ± 1.6	9.5 ± 0.1
ROM	2.7 ± 0.3	7.0 ± 0.1	4.3 ± 0.2	53.9 ± 4	14.2 ± 0.1	8.6 ± 0.1

AFC = Anchura de foliolo central; LFC = Longitud de foliolo central; FPU = Flores por umbela; LOP = Longitud de pedúnculo; TAF = Tamaño de flor; TAC = Tamaño de cáliz.

Cuadro 7. Estadísticas de la prueba normalizada de Mantel (valores de Z) provenientes de las diferentes comparaciones entre matrices de distancias de diferentes conjuntos de datos.

Descriptores	Genéticos†	Geográficos‡	Ecológicos§
Morfológicos¶	0.9 ns	1.6 *	1.9 **
Genéticos	-	0.8 ns	1.5 *
Geográficos		-	4.2 ***

† Matriz de distancias genéticas con 130 bandas polimórficas RAPDs.

‡ Distancias geográficas.

§ Matriz de distancias euclidianas (Swofford, 1993) con seis descriptores ecológicos.

¶ Matriz calculada con 18 caracteres morfológicos (Chrtková-Zertová, 1973).

ns, \*, \*\*, \*\*\* no significativo y significativo a probabilidades de  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.01$  y  $P \leq 0.001$ , respectivamente.

Algunos caracteres morfológicos cuantitativos (Cuadro 6), como el número de flores por umbela (FPU), fueron drásticamente influenciados por los factores ambientales predominantes en los sitios donde fueron colectadas (Cuadro 9). Otra característica fue la longitud de foliolo central (LFC), que se asoció con la longitud del lugar, ya que a medida que las colecciones fueron originarias del este, las hojas fueron más grandes ( $r = 0.42$ ) (Cuadro 9).

Cuadro 8. Asociaciones entre agrupamientos provenientes de datos genéticos, morfológicos, y geográficos en las 28 colectas de *Lotus corniculatus* L.

Clasificación	Nieve	Radiación solar	Temperatura			Precipitación	Geográficos		
			$\bar{x}$	Mínima	Máxima		Elevación	Latitud	Longitud
Genética §	-1.4	1.2	1.8 *	0.5	2.2**	0.6	0.8	1.1	0.1
Morfológica ¶	-0.1	4.4***	4.1***	1.8*	5.6***	0.3	3.2***	3.3***	0.5
Geográfica ‡	2.6**	2.8**	5.2***	-0.5	3.9***	0.2	3.0**	4.6***	7.8***

† Matrices construidas con caracteres ecológicos individuales.

‡ \*, \*\*, \*\*\* significativo prueba de Mantel, a  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.01$  y  $P \leq 0.001$ , respectivamente.

§ Matriz de distancias (Swofford, 1993) construidas de 130 bandas de RAPDs.

¶ Matriz calculada con 18 caracteres morfológicos (Chrtková-Zertová, 1973).

‡ Matrices construidas con las distancias geográficas.

Cuadro 9. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre cuatro caracteres morfológicos cuantitativos y nueve descriptores ecológicos de *L. corniculatus*.

Carácter	Descriptores morfológicos			
	LFC	AFC	TAC	FPU
Nieve	0.28	0.36	0.04	0.62 ***
Temp. promedio	-0.11	-0.26	0.01	-0.71 ***
Temperatura mín.	-0.29	-0.37	0.01	-0.74 ***
Temperatura máx.	0.10	-0.11	-0.04	-0.45 **
Rad. solar	-0.05	-0.05	-0.06	-0.76 ***
Precipitación	-0.20	-0.16	0.09	0.14
Elevación	-0.16	-0.04	-0.14	-0.44 **
Latitud	0.11	-0.01	-0.10	0.75 ***
Longitud	0.42*	0.36	0.07	0.16

\*, \*\* y \*\*\* significativo a  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.01$  y  $P \leq 0.001$ , respectivamente.

LFC = Longitud de foliolo central; AFC = Anchura de foliolo central;

TAC = Tamaño de cáliz; FPU = Flores por umbela.

Cuadro 10. Coeficientes de correlación† de Pearson (r) entre 10 caracteres morfológicos cualitativos y nueve descriptores ecológicos de *L. corniculatus*.

Descriptor	Descriptores morfológicos cualitativos						
	HAC	COP	FFC	PDF	GFC	POI	FDC
Nieve	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Temp.prom.	ns	ns	ns	ns	*	****	ns
Temp mín.	ns	ns	ns	ns	**	***	ns
Temp máx.	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns
Rad. solar	*	*	ns	ns	*	ns	**
Precipitación	ns	ns	****	*	ns	ns	ns
Elevación	*	*	ns	ns	ns	ns	ns
Latitud	*	ns	ns	ns	*	*	ns
Longitud	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

† \*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\* Significativo al  $P \leq 0.05$ , 0.01, 0.001, y 0.0001, respectivamente.

HAC = Hábito de crecimiento; COP = Color de planta; FFC = Forma de foliolo central; PDF = Pubescencia de foliolo; GFC = Grosor de foliolo central; POI = Posición de inflorescencia; FDC = Forma de los dientes del cáliz.

Por la posición de las inflorescencias (POI), las colecciones provenientes de las latitudes más bajas tendieron a presentar umbelas en las axilas de las hojas superiores y correlacionaron entre sí, mientras que las colectadas en latitudes superiores presentaron las inflorescencias a lo largo de todos los tallos ( $37^\circ$  vs  $46^\circ$  LN, respectivamente (Cuadros 1 y 10). Esta tendencia puede constituir una característica adaptativa hacia climas más fríos en donde el número de grados calor por día es restringido pero el fotoperiodo es mayor durante la etapa reproductiva. Es decir, los procesos reproductivos se modifican para producir un determinado número de semillas en las inflorescencias distribuidas a lo largo de los tallos (Clements y Cowlings, 1994).

Las plantas con hábito de crecimiento postrado (HAC) tendieron a localizarse en las altitudes menores de 233 m, mientras que las de hábito de crecimiento erecto (E) se localizaron en altitudes mayores de 926 m, y las plantas postradas fueron más frecuentes en las latitudes más altas ( $59.2^\circ$  N). Además, las plantas con hojas más pubescentes correspondieron a las regiones con bajas precipitaciones y

con mayor promedio de temperatura (523 mm y  $20.9^\circ\text{C}$ , respectivamente) (Cuadros 2 y 10).

Las asociaciones entre los caracteres individuales de la morfología de las plantas y las descripciones ecológicas de los sitios de colecta, son coincidentes con lo reportado por otros investigadores. Por ejemplo, entre la altitud y la morfología (Small *et al.*, 1984), entre los caracteres de calidad del forraje y el origen geográfico (McGraw *et al.*, 1989), y entre las proteínas de las semillas (Steiner y Po-klembra, 1994).

### Caracteres genéticos

La clasificación genética de las colectas a partir de las 130 bandas polimórficas generó cuatro grupos (Figura 2). Se observaron varias bandas polimórficas para cada uno de los iniciadores, y la mayoría originaron tamaños de bandas entre 293 y 1880 pares de bases (pb) (Cuadro 4). Los cuatro grupos identificados se usaron como clases en un análisis discriminante para validar el agrupamiento de las colecciones. Diecinueve de las 130 bandas se identificaron como descriptores significativos ( $P \leq 0.05$ .) lo que permitió clasificar las colecciones. Con el análisis discriminante se ubicó correctamente a las colecciones en los cuatro grupos.

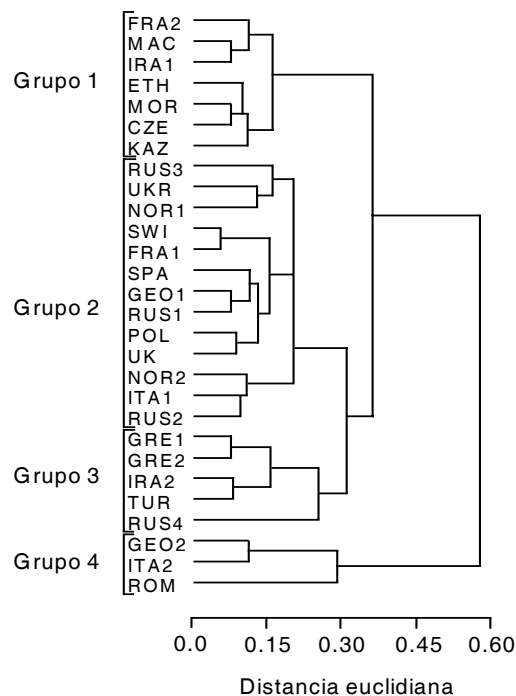


Figura 2. Agrupamiento de 28 colecciones de *Lotus corniculatus* L., por la similitud de su ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs).

### Comparación de clasificaciones

No se encontró relación alguna entre las distancias genéticas y las geográficas (Cuadro 7). Esto significa que las menores distancias geográficas entre los sitios de colección no asegura similitud genética entre los genotipos, según el análisis de los RAPDs. Sin embargo, las distancias genéticas (RAPDs) sí se asociaron con las distancias ecológicas de los sitios de colecta. Esto probablemente se debe a que los sitios de colecta más separados geográficamente y que poseen condiciones ecológicas similares, quizá tienen parientes cercanos con antecedentes genéticos similares.

Por ejemplo, las colecciones del Grupo 1 (Figura 2 y Cuadro 1), se colectaron en un amplio rango geográfico pero provienen de la más baja latitud promedio (36.3° LN) de todos los sitios de colección y con la más alta radiación solar promedio (60 %), de los cuatro grupos identificados mediante RAPDs. Dichos genotipos se localizaban principalmente cerca del Mar Mediterráneo o en Asia Menor. En contraste, las colecciones del Grupo 2 provienen de las latitudes promedio más grandes (50.1° LN) y tuvieron la menor cantidad de radiación solar promedio (39 %) de todos los grupos. Estos sitios de colecta variaron ampliamente a lo largo de la mayor parte del Norte de Europa Continental, pero tienen influencias ecogeográficas similares.

Por otro lado, las colecciones del Grupo 3 provenientes del sureste de Europa y Asia Menor, se caracterizaron por un limitado rango geográfico comparados con las colecciones de los Grupos 1 y 2. Las colecciones del Grupo 4 fueron las más divergentes genéticamente, comparadas con las de los otros tres grupos y son originarias del sureste de Europa.

El hecho de que la clasificación genética (RAPDs) se haya asociado con la clasificación ecológica pero no con las distancias geográficas de los sitios de colecta (Cuadro 7), indica que las caracterizaciones de germoplasma deben basarse en más de un tipo de descriptores. No obstante, la temperatura baja y la radiación solar como caracteres individuales se asociaron con descriptores genéticos, lo que indica que estos caracteres ecológicos en particular pueden ser un criterio importante cuando se seleccione germoplasma adaptado a ambientes específicos. Al respecto, se ha observado que algunos caracteres en particular se asocian con condiciones específicas de hábitat, lo que ha permitido un mayor entendimiento de los mecanismos adaptativos importantes en el mejoramiento genético (Rick, 1973). También es posible identificar germoplasma útil en regiones que son ecológicamente distintas de aquellas donde el germoplasma ha sido previamente obtenido (Steiner y Poklemba, 1994; Von Bothmer y Severg, 1995).

La asociación significativa entre la distancia geográfica de los sitios de colecta con la morfología de los genotipos y la ecología de los sitios de colección con la morfología (Cuadro 7), sugiere que los genotipos similares de un progenitor común emigraron de grandes distancias y se establecieron en hábitats con condiciones climáticas similares, y también que las características con cierto valor adaptativo para algunos hábitats fueron seleccionándose de manera natural de una población progenitora diversa de *Lotus* a medida que éstas migraron. Ejemplos similares se han presentado en otras especies (Sauer, 1988). La ausencia de correlación entre la morfología de planta y la genética indica, por otro lado, que caracteres específicos con cierto valor adaptativo pudieron haberse acumulado en hábitats sujetos a condiciones ecológicas similares, con menos intensidad que para los orígenes genéticos de los progenitores.

La desviación observada entre las clasificaciones morfológica y genética, pudo deberse a la conservación de caracteres morfológicos bajo selección natural en ambientes similares, a pesar de la ocurrencia de mutaciones aleatorias que eventualmente pudieron haber ocasionado diferencias entre poblaciones geográficamente distantes (Johns *et al.*, 1997). Se considera entonces necesario hacer más investigación para determinar si las bases genéticas de los caracteres adaptados a ambientes específicos se debió a fenotipos convergentes, lo que pudo haberse probado mediante cruzamientos individuales de genotipos morfológicamente similares, pero genéticamente divergentes. Existen evidencias donde se muestra que la presencia de poblaciones con composición molecular similar pero diferente morfología, se debe a recientes presiones de selección con poco cambio en los genes (Crawford, 1990). En adición, algunos genes simples pueden tener un efecto significativo en la expresión morfológica de varios caracteres (Beer *et al.*, 1993), lo cual puede ocurrir a pesar de la naturaleza o de la diversidad genética presente y susceptible de ser seleccionada debido al ambiente. Es posible que las diferencias que presentaron los genotipos a causa de caracteres simples y que afectaron la morfología, no haya sido detectada por los RAPDs.

En general, se aprecia que la combinación de métodos de caracterización dio la oportunidad de descubrir patrones de variación interesantes entre los genotipos estudiados de *Lotus corniculatus* L., que no hubieran sido descubiertos mediante la utilización de sólo un grupo de caracteres. Esta combinación permitió una mejor cuantificación de la diversidad presente en las poblaciones de *Lotus*, dado que se trata de una especie altamente variable, al proporcionar información más confiable para el aprovechamiento de este



germoplasma en investigaciones futuras o para su utilización en programas de mejoramiento genético.

### CONCLUSIONES

Los 28 genotipos mostraron polimorfismo y se clasificaron en cinco grupos formados con 18 caracteres morfológicos, y en cuatro grupos generados mediante 130 bandas polimórficas de RAPDs.

La similitud morfológica entre los genotipos correlacionó con las distancias geográficas de los sitios de colecta, y también con la ecología predominante de los sitios de colecta; hubo, además, asociaciones específicas contundentes, como el número de flores por umbela con la mayoría de los caracteres ecológicos, excepto con la precipitación y la longitud; la forma del folíolo central con la precipitación, y la posición de la inflorescencia con la temperatura promedio.

En virtud de que los descriptores provenientes de los RAPDs se asociaron con la ecología de los sitios de colecta de los genotipos pero no con la distancia geográfica, las clasificaciones de *L. corniculatus* deben hacerse con base en características tanto ecogeográficas como morfológicas, para identificar de manera más precisa a los genotipos.

### BIBLIOGRAFÍA

- Astley D (1987) Genetic resource conservation. *Expl. Agric.* 23:245-257.
- Ball P W, A Chrtková-Zertová (1968) *Lotus corniculatus* group. In: Flora Europaea, T.G. Tutin, P W Ball, J C Avise y W F Grant (eds). Vol. 2. University Press, Cambridge, UK. pp: 173-176.
- Bailey R G (1989) Explanatory supplement to ecoregions map of the continents. *Environ. Conserv.* 16:307-310.
- Beer S C, J Goffreda, T D Phillips, J P Murphy, M E Sorrells (1993) Assessment of genetic variation in *Avena sterilis* using morphological traits, isozymes, and RFLPs. *Crop Sci.* 33:1386-1393.
- Beuselink P R, J J Steiner (1992) A proposed framework for identifying, quantifying, and utilizing plant germplasm resources. *Field Crops Res.* 29:261-272.
- Beuselink P R, W F Grant (1995) Birdsfoot trefoil. In: Forages, An Introduction to Grassland Agriculture. R F Barnes, A H Brown, D J Crawford (eds). Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. 5th Ed. Vol. 1 pp:237-248.
- Chrtková-Zertová A (1973) A monographic study of *Lotus corniculatus* L. I Central and Northern Europe. *Rozpravy Československé Akademie Ved.* 83:1-94.
- Clements J C, W A Cowlings (1994) Patterns of morphological diversity in relation to geographical origins of wild *Lupinus angustifolius* from the Aegean region. *Genet. Res. Crop Evol.* 41:109-122.
- Crawford D J (1990) *Plant Molecular Systematics*. John Wiley and Sons, New York.
- Gunn C R, J H Wiersema, C A Ritchie, J H Kirkbride Jr. (1992) Families and general of spermatophytes recognized by the Agricultural Research Service. USDA-ARS, Tech. Bull. 1796. 43 p.
- Johns M A, P W Skroch, J Nienhuis, P Hinrichsen, G Bascur, C Muñoz-Schick (1997) Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Sci.* 37:605-613.
- Li B, P R Beuselink (1996) Rhizomatous *Lotus corniculatus* L.: II. Morphology and anatomy. *Crop Sci.* 36: 407-477.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209-220.
- McGraw R L, P R Beuselink, G C Marten. (1989). Agronomic and forage quality attributes of diverse entries of birdsfoot trefoil. *Crop Sci.* 29:1160-1164.
- National Institute of Health (2003) NIH Image program. Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>
- Paterson A H, S D Tanksley, M S Sorrells (1991) DNA markers in plant improvement. *Adv. Agron.* 46:39-90.
- Rick C M (1973) Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats. In: Genes, enzymes and population. A M Soreb (ed). Basic Life Sciences. Vol. 2. Plenum Press, New York. pp:255-270.
- Rohlf F J (1993) NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.80. Applied Biostatistics Inc., N.Y.
- Sauer J D (1988) *Plant Migration*. University of California Press, Berkeley, CA.
- Small E, W F Grant, C W Crompton (1984) A taxonomic study of the *Lotus corniculatus* complex in Turkey. *Can. J. Bot.* 62:1044-1053.
- Smouse P E, J C Long, R R Sokal (1986) Multiple regression and correlation extensions of the Mantel's test of matrix correspondence. *Syst. Zool.* 35:627-632.
- Snedecor G W, W G Cochran (1980) *Statistical Methods*. Iowa State University Press. Ames, IA. 248 p.
- Steiner J J, C J Poklemba (1994) *Lotus corniculatus* classification by seed globulin polypeptides and relationships to accession pedigrees and geographic origin. *Crop Sci.* 34:255-260.
- Steiner J J, C J Poklemba R G Fjellstrom, L F Elliot (1995) A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analysis. *Nucleic Ac. Res.* 23:2569-2570.
- Steiner J J, S L Greene (1996) Proposed ecological descriptors and their utility for plant germplasm collections. *Crop Sci.* 36:439-451.
- Stuessy T F (1990) *Plant Taxonomy*. Columbia University Press. New York. 178 p.
- Swofford D L (1993) PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1. Illinois. Natural History Survey, Champaign, IL.
- Von Bothmer R, O Seberg (1995) Strategies for the collecting of wild species. In: *Collecting Plant Diversity*. L Guarino, V Ramanatha Rao, R Reid (eds). CAB Intern. Wallingford, UK. pp: 93-111.
- Ward J H (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.* 58:236-244.