

IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES DE TRÉBOL BLANCO (*TRIFOLIUM REPENS* L.) MEDIANTE SSR

Randazzo C.P.¹, Rosso B.S.², Pagano E.M.¹

¹Instituto de Genética "Ewald A. Favret" INTA Castelar.

²EEA INTA Pergamino.

epagano@cni.inta.gov.ar

ABSTRACT

White clover (*Trifolium repens* L.) is a forage legume of high nutritive value. It is a very efficient species for nitrogen soil fixation through symbiosis. In Argentina, it has widely spread in humid and sub-humid regions. The aim of this work was to evaluate SSR molecular markers for genetic differentiation and identification of white clover cultivars. Relationships among cultivars were established and cultivars were grouped on the basis of molecular markers and morpho-agronomic characters. Twenty-four white clover cultivars and two red clover cultivars from different origins were evaluated. Fifteen SSR fluorescence markers were employed. PCR products were separated using ABI PRISM 3100 genetic analyzer. A total of 114 amplification products were obtained, with 99 % polymorphism. Average number of bands per SSR was 8.66. Cultivar similarity ranged from 15 % to 85 %, being Haifa and Zapicán the most similar. Cultivars from New Zealand were genetically more distant, with similarity values lower than 50 %. Correlation between morphological and genetic matrixes was significant ($r= 0.48$). All cultivars clustered in three groups, following a pattern which corresponded mainly to white clover leaflet type.

Key words: molecular markers, microsatellites, white clover, cultivars.

RESUMEN

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) es una leguminosa forrajera de gran valor nutritivo y muy eficiente en la incorporación de nitrógeno (N) al suelo mediante fijación simbiótica. En Argentina se ha difundido ampliamente en las regiones húmeda y subhúmeda. Los objetivos del presente trabajo fueron i) detectar la capacidad de marcadores moleculares microsatélites (SSR) para la diferenciación genética e identificación de cultivares de trébol blanco y ii) determinar la relación entre los agrupamientos de los cultivares basados en marcadores moleculares y caracteres agronómicos. Se analizaron 24 cultivares de trébol blanco y dos de trébol rojo de diversos orígenes. Se utilizaron 15 SSR marcados con fluorescencia. Los productos de PCR fueron separados en analizador genético ABI PRISM 3100. Se obtuvieron un total de 114 productos de amplificación, con 99 % de polimorfismo. El promedio de bandas por SSR fue de 8,66. En el dendograma obtenido de la clasificación de los 24 cultivares de trébol blanco se observó que los cultivares se distribuyen entre un 15 % y 85 % de similitud. Los cultivares de origen neozelandés fueron genéticamente los más distantes, con valores de similitud inferiores a 50 %. La correlación de matrices morfológica y genética fue significativa ($r= 0,48$). Los 15 cultivares de trébol blanco se clasificaron en tres grupos, que correspondieron principalmente a los tipos de trébol según el tamaño de folíolo.

Palabras clave: marcadores moleculares, microsatélites, trébol blanco, cultivares.

INTRODUCCIÓN

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) es una leguminosa forrajera perenne que se utiliza como componente de las pasturas cultivadas en las regiones de clima templado de muchos países del mundo, y es la especie de mayor importancia agronómica entre las casi 300 especies del género *Trifolium*. Es nativa del Mediterráneo; en Argentina está naturalizada y se ha propagado ampliamente en la región pampeana húmeda y subhúmeda.

Es una especie de polinización cruzada, con un número cromosómico de $2n = 4x = 32$, de naturaleza alotetraploide, con herencia disómica (Voisey *et al.*, 1994). Posee un mecanismo de autoincompatibilidad gametofítica y por ello la autofecundación es infrecuente. El tamaño de 1C de su genoma es de 956 Mbp (Leitch y Bennet, 2004).

El mejoramiento de trébol blanco en el mundo data de alrededor de 100 años, con la liberación de un número de cultivares que ya supera los 300 y que se encuentran registrados en OECD (Caradus y Woodfield, 1997). De acuerdo a la información actual del Instituto Nacional de Semillas (INASE), en la Argentina se encuentran registrados 33 cultivares de trébol blanco, de los cuales 16 son de origen nacional.

Las poblaciones de trébol blanco se clasifican de acuerdo a la morfología. Específicamente el tamaño del folíolo ha permitido diferenciar distintos tipos denominados: pequeño, intermedio, grande y gigante o ladino. El cultivar El Lucero MAG, uno de los más difundidos por su amplia adaptación y utilizado durante décadas en las pasturas cultivadas en Argentina, pertenece al tipo de folíolo grande (Scheneiter y Pagano, 1995).

En los programas tradicionales de mejoramiento genético los estudios de variabilidad de *T. repens* se han concentrado básicamente en caracteres morfofisiológicos y agronómicos (Pagano, 1995; Annicchiarico, 2003; Bouton *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Los atributos morfológicos han sido utilizados para la caracterización de germoplasma (Rosso y Pagano, 2001) y sobre la base de aspectos cualitativos como manchas blancas, presencia de antocianinas y liberación de ácido cianhídrico (HCN), se han caracterizado cultivares de diferentes orígenes conservados en el Banco de Germoplasma de INTA (Rosso *et al.*, 2001).

Sin embargo, en algunos casos, los caracteres morfofisiológicos no proporcionan una cuantificación adecuada de la variabilidad genética, la que puede ser sobrestimada debido a la plasticidad fenotípica (Novoplansky, 2002) generalmente presente en las especies forrajeras.

Históricamente, la descripción de cultivares y la protección de los derechos de propiedad se han basado en caracteres morfológicos, pero actualmente los marcadores moleculares son una herramienta importante para complementar la caracterización fenotípica (Karp *et al.*, 1997; Aman, 2002), ya que permiten estudiar de forma directa la variación presente en el ADN sin la influencia del ambiente.

Los marcadores moleculares permiten la selección de caracteres basados en el genotipo y, en consecuencia, pueden acortar etapas en los programas de mejoramiento genético. Pueden ser utilizados en la selección temprana en fase de plántula, cuando caracteres como persistencia vegetativa o rendimiento de semilla no se expresan aún (Kölliker *et al.*, 2001a).

Un importante número de marcadores de ADN fueron desarrollados en las últimas décadas, lo que permite evaluar con precisión la variación genética a nivel inter- e intra-específico de esta especie. Entre ellos se pueden mencionar polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) (Hughes *et al.*, 1990), ADN polimórfico amplificado al azar (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) (Gustine *et al.*, 2002; Bortolini *et al.*, 2006), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*, AFLP) (Kölliker *et al.*, 2001b) e intrasecuencias simples repetidas (*Inter-Simple Sequence Repeats*, ISSR) (Dalla Rizza *et al.*, 2007).

De los marcadores moleculares disponibles en la actualidad, los microsatélites o secuencias simples repetidas (*Simple Sequence Repeats*, SSR) son secuencias cortas de ADN de 1 a 6 nucleótidos repetidos, ampliamente dispersas en los genomas eucariontes y altamente variables entre individuos. Los altos índices de heterocigosis para estos marcadores, su naturaleza codominante, y el hecho de que la técnica está basada en la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), hace que los SSR sean generalmente elegidos en programas de selección asistida por marcadores moleculares, en estudios de mapeo genético y de diversidad.

En la última década se han desarrollado y caracterizado exitosamente alrededor de 100 SSR en trébol blanco (Kölliker *et al.*, 2001a). Sin embargo, Dolanská y Curn (2004) indicaron que los SSR desarrollados por Kölliker *et al.* (2001a) mostraron bajo polimorfismo en esta especie, mientras que George *et al.* (2006) detectaron un amplio polimorfismo para estos mismos marcadores. Una com-

paración del mapa de localización de marcadores procedentes de trébol blanco, trébol rojo y alfalfa reveló una posible macrocolinealidad entre las tres especies trifoliáceas (Zhang *et al.*, 2007).

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) detectar la capacidad de los marcadores SSR en la diferenciación genética e identificación de cultivares de trébol blanco, ii) determinar la relación entre los agrupamientos de cultivares basados en marcadores moleculares y caracteres morfoagronómicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los cultivares seleccionados para este estudio provienen de diversos orígenes del mundo (Tabla 1) y son conservados en forma de semilla en el Banco de Germoplasma de la EEA INTA Pergamino (BAP).

Además de los cultivares de trébol blanco, se incluyeron en el análisis dos cultivares de trébol rojo de diferente ciclo vegetativo: El Sureño MAG (Argentina) y Redland II (EUA).

Aproximadamente cuatro semanas después de la germinación de las semillas, se cosecharon hojas jóvenes de 30 plántulas de cada cultivar, y se compuso una muestra de aproximadamente 200 mg. Cada muestra fue liofilizada y molida en un homogeneizador de tejidos (*Tissue lyser*, Qiagen). Para la extracción de ADN genómico se siguió el protocolo de Puecher *et al.* (2001). El ADN fue disuelto en agua HPLC y la concentración final se estimó mediante gel de agarosa 0,8 % (p/v) por comparación de la intensidad de fluorescencia de bromuro de etidio con concentraciones conocidas del bacteriófago lambda DNA (Promega, Madison, WI).

Quince pares de cebadores genómicos (Kölliker *et al.*, 2001a) fueron marcados con un fluorocromo en su extremo 5' (FAM; HEX (*Alpha DNA*) o NED (*Applied Biosystems*) y utilizados para las reacciones de PCR (Tabla 2).

La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 20ml compuesto por: 75ng/ml ADN, 1X PCR *buffer* *Invitrogen*, 2,5mM de Cl_2Mg , 0,125mM de cada uno de los cebadores SSR, 0,15mM de dNTP, 0,5 U de la enzima Taq ADN polimerasa, utilizando un termociclador *Mastercycler Eppgradient S*, *Eppendorf*. El ciclado fue de 10 min a 94°C, seguidos de 30 ciclos de 1 min para desnaturalizar el ADN a 94°C, 30 s para la hibridación de los cebadores a 55°C, 1 min a 72°C bajando 1°C hasta llegar a los 45°C para la amplificación, y un paso de extensión final de 10

min a 72°C.

Los productos de amplificación fueron sembrados en geles de agarosa *Metaphor* 2%, utilizando 1X *orange green buffer*, en TBE 1X, con bromuro de etidio (0,5 g/l). La corrida electroforética se realizó a 50V durante 40 min. Para estimar los tamaños de los productos amplificados se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen*).

Los productos de amplificación fueron separados en el analizador genético ABI PRISM 3100, de *Applied Biosystems*. Mediante el *software* GeneMapper se analizaron los picos correspondientes a los distintos alelos, utilizando GeneScan 500 (-250) ROX (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) como estándar de peso.

Se utilizaron caracteres morfoagronómicos de 15 cultivares obtenidos de la base de datos del BAP, que se habían originado en un ensayo previo realizado en la EEA Pergamino (Rosso *et al.*, 2001). Los caracteres evaluados fueron: número de hojas a inicio de estolonización, vigor de plántula, fecha de inicio de estolonización primaria (días desde germinación), fecha de inicio de estolonización secundaria (días desde germinación), número de estolones primarios antes del trasplante, longitud total de estolones primarios (cm), número de estolones secundarios antes del trasplante, longitud total de estolones secundarios (cm), diámetro del estolón en invernáculo (mm), mancha blanca (Brewbaker y Carnahan, 1956), longitud del pecíolo (mm), longitud del folíolo (mm), ancho del folíolo (mm), longitud del estolón a campo (cm), diámetro del estolón a campo (mm), diámetro de la planta (cm), número de inflorescencia/estolón, número de folíolos/estolón, tamaño del folíolo, forma como la relación largo/ancho y total de inflorescencias/m².

Análisis estadístico

El trébol blanco es un tetraploide con cuatro juegos de cromosomas y por lo tanto, puede tener hasta cuatro alelos diferentes en un determinado locus. Debido a esto, las bandas polimórficas SSR de cada muestra fueron evaluadas como dosis únicas.

Los alelos de cada SSR fueron transformados en datos de presencia (1) y ausencia (0) e incorporados a una matriz binaria con filas (cultivares) y columnas (tamaños de los alelos). Dicha matriz se utilizó para calcular los valores de similitud genética mediante el índice de Dice y para determinar la relación se aplicó el método de asociación UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using an arithmetic Average*). La agrupación resultante se graficó como un

dendrograma. El coeficiente de correlación cofenética fue calculado por comparación entre la matriz de distancia genética original y la matriz cofenética.

Para la comparación de las matrices morfológicas y moleculares de los 15 cultivares evaluados en el campo, se utilizó el Test de Mantel (Mantel, 1967). Para la agrupación de cultivares en base a los 21 caracteres morfoagronómicos, se aplicó el índice de distancia euclídea y UPGMA. El agrupamiento fue representado gráficamente mediante un dendrograma.

Los programas estadísticos utilizados en los distintos análisis de este trabajo fueron: INFOGEN/P versión 2006i.1 (Balzarini *et al.*, 2003) y NTSYS pc versión 2.0 (Rohlf, 1998). Se utilizó el programa estadístico *Winboot* (Yap y Nelson, 1996) para obtener en porcentaje la probabilidad de ocurrencia de agrupamiento.

RESULTADOS

Los resultados corresponden por una parte al análisis molecular de 24 cultivares de trébol blanco y dos cultivares de trébol rojo y por otra al análisis molecular y morfológico de los 15 cultivares de trébol blanco.

Análisis molecular de 24 cultivares de trébol blanco

Se obtuvieron un total de 114 alelos, con un porcentaje de bandas polimórficas de 99,24 % con 14 SSR, ya que el cebador B01B05 no presentó bandas definidas. El promedio de bandas por SSR fue de 8,66.

Los cultivares se agruparon entre 14 % y 83 % de similitud. Los cultivares más similares fueron Zapicán y Haifa, obtenidos respectivamente en Uruguay y Australia, a partir de poblaciones aparentemente de distinto origen, pero que comparten caracteres de alta cianogénesis y tamaño de planta. Los cultivares más distantes fueron de origen neozelandés, con una similitud menor a 50 %. En este grupo se determinó que los más cercanos fueron G. Sustain y G. Demand. El cultivar G. Prestige mostró una gran separación del resto de los cultivares, tal como ocurrió con los cultivares de trébol rojo.

Se observó que los dos cultivares de trébol rojo, Redland y El Sureño MAG se unieron en un grupo pero en un nivel de similitud menor de 50 %. Los valores de probabilidad de agrupamiento fueron elevados en términos generales, confirmando así la consistencia de los agrupamientos observados en el dendrograma (Figura 1). La co-

rrelación cofenética fue de 0,959.

Análisis morfológico y molecular en 15 cultivares de trébol blanco

El análisis estadístico de los datos moleculares se realizó sobre los 15 cultivares para los que se contaba con datos morfológicos previos (Rosso *et al.*, 2001). Los resultados de la clasificación de los cultivares basados en los caracteres antes indicados se muestran por medio del dendrograma correspondiente de la Figura 2. Se puede observar que los cultivares se dividieron en dos grupos, diferenciándose según el tipo foliar (foliolo grandes o pequeños).

Cuando los 15 cultivares fueron agrupados mediante la información proveniente de los marcadores SSR, se mantuvo una tendencia de agrupamiento de acuerdo a los tipos foliares, aunque no fue tan discriminadora como el agrupamiento basado en la morfología. La correlación entre matrices fue significativa con un valor intermedio ($r=0,48$).

DISCUSIÓN

En el análisis molecular, el tamaño del fragmento de los SSR amplificados osciló en un rango de 82 a 270 pb, en coincidencia con lo informado por George *et al.* (2006), quienes obtuvieron un rango de 89 a 308 pb utilizando los mismos cebadores. De los 15 cebadores probados en el presente trabajo, solamente B01B05 no fue utilizado para el análisis, debido a que no hubo amplificación ni en geles de agarosa *methaphor* ni en las corridas en el analizador genético, en contraste con los resultados reportados por George *et al.* (2006).

Los loci SSR que amplificaron en trébol blanco, *T. repens*, también lo hicieron en trébol rojo, *T. pratense*, confirmando la potencialidad de amplificación cruzada de estos marcadores. Además, pudo determinarse que cinco de estos SSR presentaron amplificación en alfalfa, *Medicago sativa* (datos no mostrados).

Kölliker *et al.* (2001b) diseñaron cebadores y los analizaron con distintas especies de *Trifolium*. En siete genotipos de *T. repens* provenientes de los cultivares Dusi, Haifa y Prop y las líneas I5J y I4R, dichos investigadores encontraron un promedio de 4,8 fragmentos amplificados por SSR. Si realizamos la comparación con nuestros resultados, el promedio de 8,66 fragmentos amplificados que obtuvimos por SSR representa aproximadamente el doble del valor obtenido por Kölliker *et al.* (2001a). No obstante, se debe

considerar que en el presente trabajo se utilizaron conjuntos (*bulks*) de ADN de 25 a 30 genotipos por cultivar y que, finalmente, se analizaron 24 cultivares en los que estaban incluidos los tres cultivares estudiados por Kölliker *et al.* (2001a). Los conjuntos podrían explicar el aumento en la cantidad de fragmentos amplificadas en el presente estudio. En el mismo sentido se podría explicar el alto grado de polimorfismo (99 %) que detectamos al considerar los 14 SSR y todos los cultivares, en comparación con lo informado por Kölliker *et al.* (2001a) en los siete genotipos de trébol blanco: 88 % de polimorfismo pero utilizando un número mayor de SSR. George *et al.* (2006) hallaron un alto grado de polimorfismo con los mismos 15 SSR (datos no informados) utilizados en el presente trabajo.

Estudios realizados en el IGEEF INTA en otras forrajeras alógamas han mostrado altos porcentajes de polimorfismos. Por ejemplo en el análisis molecular de más de una centena de introducciones de festuca alta se encontraron valores cercanos a 100 % de polimorfismo (Cuyeu *et al.*, 2010). Campos de Quiroz y Ortega-Klose (2001) también han expresado que las plantas forrajeras alógamas presentan un elevado nivel de diversidad genética y que la misma puede ser eficientemente determinada mediante este tipo de marcadores genéticos.

Los resultados de la correlación cofenética mostraron la existencia de un buen ajuste entre la matriz de similitud y el agrupamiento posterior. En la Figura 1 se observa que los 24 cultivares de *T. repens* se agruparon entre un 14 y 83 % de similitud, mientras que Bortolini *et al.* (2006), al evaluar 78 introducciones de 50 países, conservadas por el USDA, encontraron que los materiales se agruparon entre un 18 y 58 % de similitud mediante RAPD. El mayor rango de distribución de los agrupamientos de los 24 cultivares podría deberse a la aplicación del conjunto de SSR polimórficos según mencionan otros autores (George *et al.*, 2006). En este análisis se observó que los cultivares con mayor similitud fueron Zapicán (Uruguay) y Haifa (Australia), mientras que los cultivares que más se separaron fueron los de origen neozelandés. El cv. Grassland Prestige

presentó el nivel más alto de divergencia respecto de los restantes cultivares, similarmente a lo obtenido por George *et al.* (2006).

En el estudio morfológico realizado con 15 cultivares de trébol blanco (Figura 2) se observó que los mismos formaron tres grupos bien definidos, que corresponden principalmente a los tipos de trébol según tamaño de folíolo. Además, ello fue consistente con la información bibliográfica sobre los cultivares utilizados en este estudio (Caradus *et al.*, 1989; Caradus y Woodfield, 1997). Así, se conformaron grupos de acuerdo a tamaño de folíolo, a saber: grandes a gigantes (el más numeroso) con ocho cultivares; pequeños (Nora y S184); y medianos, que incluyó a los restantes cultivares. Esto concuerda con la bibliografía en la que se indica que los caracteres foliares son los de mayor incidencia en la clasificación de materiales de la especie. Estos caracteres están asociados al tamaño de planta y a la adaptación a distintas condiciones ambientales. En la clasificación de los mismos cultivares basada en los datos moleculares se observó que, aunque no se formaron grupos definidos como en la clasificación a partir de caracteres fenotípicos, hubo una tendencia en la distribución grupal de los cultivares de acuerdo al tamaño foliar. Así, el cultivar S184 que corresponde al tipo de folíolos más pequeños presentó el menor porcentaje de similitud, diferenciándose del resto, en tanto que los cultivares de folíolos grandes a gigantes tendieron a agruparse entre sí.

Por el contrario, otros autores como Gustine *et al.* (2002) detectaron agrupamientos conformados por poblaciones de folíolos grandes y pequeños mediante RAPD. Es posible que las poblaciones analizadas por esos autores tuvieran mayor variabilidad intrapoblacional para el carácter foliar, mientras que en los cultivares del presente trabajo es altamente probable que la selección de los genotipos paternos se haya realizado sobre un mismo tipo foliar. Esto explicaría la detección de correlación positiva entre las matrices morfológica y genética y, como consecuencia, la obtención de una clasificación similar con datos morfológicos y moleculares.

Tabla 1. Cultivares de trébol blanco, orígenes y características.

S184	Reino Unido	Foliolos muy pequeños y estolones delgados. Baja producción de ácido cianhídrico.
Dubrava	Rep. Checa	Foliolo intermedio, escasa presencia de mancha foliar blanca. Floración tardía.
Blanca	Bélgica	Foliolo mediano a grande, de floración intermedia y alto contenido de ácido cianhídrico.
Dusi	Sudáfrica	Acianogenético. Raíces gruesas. Seleccionado sobre 78 cultivares en suelos ácidos y sequía.
Haifa	Australia	Deriva de poblaciones israelitas. Hábito erecto. Cianogenético y mancha foliar blanca intensa.
Sonja	Suecia	Foliolos intermedios a grandes. Cianogénesis baja. Floración intermedia y alta persistencia.
Nora	Suecia	Foliolo pequeño, sin macula y acianogenético. Floración abundante. Tolerante a sequía.
Grassland Prestige	Nueva Zelanda	Foliolos pequeños a mediano. 69 % cianogénicas. Deriva de ecotipos neocelandeses.
Estanzuela Zapican	Uruguay	Foliolos medianos a grandes. 90 % cianogénicas. Floración temprana y profusa.
Merwi	Bélgica	Foliolo intermedio. Cianogenético. Alta producción de semilla y buena persistencia.
El Lucero MAG	Argentina	Foliolos grandes. Amplia adaptación y productivo
Lucero Plus INTA	Argentina	Deriva de El Lucero MAG. Se diferencia por ausencia de mácula blanca y mayor persistencia.
Grassland Sustain	Nueva Zelanda	Foliolos medianos a grandes y de alta densidad de puntos de crecimiento.
Espanso	Italia	Foliolos gigantes. Bajo a nulo contenido de ácido cianhídrico. Buena resistencia a sequía.
Churinche	Argentina	Foliolos medianos a grandes y peciolo largo. 73 % cianogénicos. Resistente a sequía.
California	EE.UU.	Foliolos grandes, baja concentración de ácido cianhídrico en solo el 10 % de las plantas.
Bayucua	Uruguay	Seleccionado de población Argentina. 85 % cianogenético. Alta densidad de floración.
Grasland Demand	Nueva Zelanda	Hojas pequeñas a medianas y estolones finos. Deriva de ecotipos de N. Z. y del Mediterráneo.
Susi	Irlanda	Seleccionado de un ecotipo iraní. Foliolos medianos a pequeño. 83 % cianogenético.
Waverley	Australia	Foliolos grandes. Floración temprana. Cianogenético. Deriva de Haifa y Tamar.
Grassland Pitau	Nueva Zelanda	Foliolos medianos a grandes, pocos estolones. Deriva de G. Huia y una población de España.
Omega INTA	Argentina	Seleccionado sobre poblaciones de Oriente Medio. Ciclo reproductivo tardío.
Simone	Italia	Desarrollado sobre ecotipos Italianos. Presenta foliolos medianos a grandes.
Prop	Nueva Zelanda	Deriva de ecotipos naturalizados de Waikato. Hábito postrado. Floración temprana.

BIBLIOGRAFÍA

- Aman R.A. (2002) A comparative assessment of molecular techniques employed in genetic diversity studies (and their suitability in resource-limited settings). National Museums of Kenya, Nairobi, Kenya. IPGRI.
- Annicchiarico P. (2003) Breeding white clover for increased ability to compete with associated grasses. *J. Agric. Sci.* 140: 255-266.
- Balzarini M., Di Rienzo J. (2003) Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Bortolini F., Dall'Agnol M., Schifino-Wittmann M.T. (2006) Molecular characterization of the USDA white clover (*Trifolium repens* L.) core collection by RAPD markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 53: 1081-1087.
- Bouton J.H., Woodfield D.R., Hoveland C.S., McCann M.A., Caradus J.R. (2005) Enhanced survival and animal performance from ecotype derived white clover cultivars. *Crop Sci.* 45: 1596-1602.
- Brewbaker J.L., Carnahan H.L. (1956) Leaf-marking alleles in white clover. *J. Hered.* 47: 103-104.
- Campos de Quiroz H., Ortega-Klose F. (2001) Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers. *Euphytica* 122: 61-67.
- Caradus J., Mackay A., Woodfield D., Van Den Bosch J., Wewala S. (1989) Classification of a world collection of white clover cultivars. *Euphytica* 42: 83-196.
- Caradus J.R., Woodfield D.R. (1997) World checklist of white clover varieties New Zealand *J. Agric. Res.* 40: 115-206.
- Cuyeu A.R., Pagano E.M., Rosso B.S., Biagioli C.A., Cattoni M.I., Schrauf G.E., Carrete J.R., Rimieri P., Ríos R.D. (2010) Genetic characterization of the Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb) collection from the Pergamino Active Forage Bank using SSR markers. 6th Intern. Symp. Molecular Breeding of Forage and Turf, Buenos Aires Argentina. INTA.
- Dalla Rizza M., Real D., Reyno R., Porro V., Burgueño J., Errico E., Quesenberry K. (2007) Genetic diversity and DNA content of three South American and three Eurasiatic *Trifolium* species. *Genet. Mol. Biol.* 30: 1118-1124.
- Dolanská I., Curn V. (2004) Identification of white clover (*Trifolium repens* L.) cultivars using molecular markers. *Plant Soil Environ.* 50 (3): 95-100.
- George J., Dobrowolski M.P., Zijl de Jong E., Cogan N.O.I., Smith K.F., Forster J.W. (2006) Assessment of genetic diversity in cultivars of white clover (*Trifolium repens* L.) detected by SSR polymorphisms. *Genome* 49: 919-930.
- Gustine D., Voigt P., Brummer C., Papadopoulos Y. (2002) Genetic Variation of RAPD Markers for North American White Clover Collections and Cultivars. *Crop Sci.* 42: 343-347.
- Hughes M.A., Sharif A.L., Dunn M.A., Oxtobi E., Pancoro A. (1990) Restriction fragment length polymorphism segregation analysis of the *Li* locus in *Trifolium repens* L. *Plant Mol. Biol.* 14: 407-414.
- Karp A., Kresovich S., Bhat K.V., Ayad W.G., Hodgkin T. (1997) Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies (IPGRI technical bulletin #2). Intern. Plant Genet. Res. Inst., Rome.
- Kölliker R., Jones E.S., Drayton M.C., Dupal M.P., Forster J.W. (2001a) Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for white clover (*Trifolium repens* L.). *Theor. Appl. Genet.* 102: 416-424.
- Kölliker R., Jones E., Jahufer M., Forster J.W. (2001b) Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white. *Euphytica* 121: 305-315.
- Leitch I.J., Bennett M.D. (2004) Genome downsizing in polyploidy plants. *Biol. J. Linnean Soc.* 82: 651-663.

- Mantel N. (1967) The detection of diseases clustering and generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.
- Novoplansky A. (2002) Developmental plasticity in plants: implications of noncognitive behavior. *Evol. Ecol.* 16: 177-188.
- Pagano E.M. (1995) Variabilidad genética en la población de trébol blanco *Trifolium repens* L. "El Lucero MAG". Tesis de Magister Scientiae. INTA-UNR.
- Puecher D., Robredo C., Rios R., Rimieri P. (2001) Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. populations and cultivars with RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 121: 229-236.
- Rohlf F. (1998) NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system versión 2.0. Department of Ecology and Evolution State University of New York. Stony Brook. NY.
- Rosso B., Pagano E. (2001) Collection and characterization of naturalized populations of white clover in Argentina. *Genet. Res. Crop Evol.* 48: 513-517.
- Rosso B., Pagano E., Rimieri P. (2001) Caracteres que permiten la diferenciación de cultivares de trébol blanco (*Trifolium repens* L.). Actas III Simposio de Recursos Genéticos de América Latina y el Caribe, Brazil, pp. 406-408.
- Scheneiter O., Pagano E.M. (1995) Crecimiento estacional de estolones de trébol blanco (*Trifolium repens* L.). En: Memorias XIV Reunión Latinoamericana de Producción Animal y 10º Congreso Argentino de Producción Animal. Mar del Plata 26/11-1/12, pp. 40-42.
- Voisey C.R., White D.W.R., Mc Gregor P.G., Wingley P.J., Chilcott C.N. (1994) Release of transgenic white clover plant sexpressing *Bacillus thuringiensis* genes -an ecological perspective. *Biocontrol Sci. Technol.* 4: 475-481.
- Yap V.I., Nelson J.R. (1996) WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. IRRI (Int. Rice Res. Inst.) Res. Pap. Ser. No. 14, 6.
- Zhang Y., Sledge M.K., Bouton J.H. (2007) Genome mapping of white clover (*Trifolium repens* L.) and comparative analysis within the Trifolieae using cross-species SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 114:1367-1378.
- Zhang Y., Ji H., Zhao P.X., Bouton J.H., Monteros M.J. (2008) Genome-wide identification of microsatellites in white clover (*Trifolium repens* L.) using FIASCO and phpSSRMiner. *Plant Methods* 4:19.