

**CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DE GERMOPLASMA DE
TRÉBOL BLANCO (*Trifolium repens* L.)**

Trabajo Final de Grado
del alumno



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Junín, 21 Diciembre 2023.

**CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DE GERMOPLASMA DE
TRÉBOL BLANCO (*Trifolium repens* L.)**

Trabajo Final de Grado
del alumno

ALDO NICOLÁS AROZAMENA

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador



Ing. Agr. MSc. PhD Adriana Andrés
Co-Director



Ing. Agr. MSc. Ivana Varea
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Junín, 21 Diciembre 2023.

ÍNDICE

RESUMEN	1
AGRADECIMIENTOS	3
INTRODUCCIÓN	4
Importancia del estudio	4
La especie: origen y distribución	5
Descripción botánica de la especie	6
Aspectos agronómicos y productivos de la especie	7
Variabilidad genética entre poblaciones y su caracterización	9
Mejoramiento genético de la especie en Argentina	11
OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Ubicación y caracterización del sitio experimental	13
Datos meteorológicos	15
El germoplasma estudiado	15
Diseño experimental	17
Caracteres evaluados	18
Análisis estadístico	23
Estadística descriptiva	24
Modelos lineales y generalizados	25
Análisis multivariados	26
Estimación de la heredabilidad en sentido amplio	26
RESULTADOS	28
Variables cualitativas	28
Variables cuantitativas	34
Estadística descriptiva	34
Modelos lineales y generalizados	37
Análisis de componentes principales	45
Análisis de clúster jerárquico	49
Estimación de parámetros genéticos	51
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIÓN	59
BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXO I	68

Resumen

La caracterización agronómica de germoplasma de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) es un paso crítico en la determinación del potencial productivo y genético de la especie para la obtención de cultivares superiores. Esta tesis subraya la importancia de dicha caracterización, proporcionando una base científica para la selección y mejora genética de esta especie. A través de la evaluación de variables morfofisiológicas de ocho poblaciones de trébol blanco, recolectadas en ambientes de pastura de la Provincia de Buenos Aires, se ha logrado identificar y describir la diversidad fenotípica y genética presente.

Durante 2022 y 2023 se condujo el estudio aplicando un diseño en bloques completos al azar con 3 repeticiones, en el que 720 genotipos (90 por población) fueron evaluados en condición de planta espaciada, en el campo Experimental Las Magnolias (UNNOBA). Para la caracterización fenotípica y genotípica se registraron 20 caracteres vegetativos y reproductivos por genotipo, tales como vigor y hábito de crecimiento en varias fechas de medición, altura, diámetro, peso verde y peso seco en varias fechas de medición, número de cabezuelas, peso de mil semillas y rendimiento total de semillas. Los datos fueron sometidos a análisis de la varianza a través del paquete estadístico Infostat en R. Se realizaron las estimaciones de los parámetros genéticos (varianza fenotípica y genética) para el cálculo de la heredabilidad en sentido amplio. Para determinar posibles asociaciones entre las variables se aplicó análisis multivariado (conglomerados y clúster jerárquico).

Los resultados indicaron diferencias significativas (p -valor $<0,05$) entre las ocho poblaciones para todos los caracteres evaluados, excepto el número de cabezuelas para la fecha de medición del 12-9-2022 (p -valor $>0,05$). Las poblaciones 1 y 8 se diferenciaron del resto por ser las de mayor crecimiento vegetativo y producción de materia seca, mientras que las poblaciones 3, 4 y 5 se destacaron por lograr el mayor número de cabezuelas, que se condice con un mayor rendimiento de semillas. La heredabilidad en sentido amplio fue elevada (0,915 – 0,455) para todos los caracteres.

Los análisis multivariados permitieron agrupar las poblaciones en 3 subgrupos de acuerdo a la productividad de biomasa y de rendimiento de semilla, subgrupo 1

(pob 3, 4 y 5), subgrupo 2 (pob 2, 6 y 7) y subgrupo 3 (pob 1 y 8), en este último subgrupo se agrupan las poblaciones más rendidoras en cuanto a productividad de biomasa y rendimiento de semilla.

La caracterización agronómica de germoplasma de trébol blanco realizada aportaría información valiosa que puede utilizarse para la selección de poblaciones de trébol blanco en futuros programas de mejoramiento genético.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la UNNOBA por darme el espacio y la posibilidad de estudiar en una universidad pública y de calidad la carrera que amo y formarme profesionalmente, a la ECANA por su apoyo durante el transcurso de la carrera, a la Secretaría de Investigación por la beca EVC-CIN que promovió mi vocación científica y colaboró con la realización de esta tesis.

A la EEA INTA Pergamino y al Sector Forrajeras por abrirme las puertas y darme la posibilidad de usar sus instalaciones y al grupo del Laboratorio de Semillas (Mariana y Lizzi) por brindar el apoyo y las herramientas del laboratorio para poder llevar a cabo la trilla.

A mi Directora de tesis Ivana Varea y mi Co-directora Adriana Andrés por estar siempre apoyándome, por su dedicación y predisposición en la elaboración de este trabajo.

Al Ingeniero Agrónomo Andrés Lapalma por el compañerismo que forjamos durante el ensayo, una persona muy valiosa de quien aprendí mucho profesionalmente y que junto con mi Directora y Co-directora formamos un gran equipo de trabajo.

A mis amigos, compañeros de facultad y aquellos que me aprecian por haberme acompañado durante este recorrido, me llevo grandes recuerdos de cursada, peñas y de jodas.

Y especialmente a mi familia, por el apoyo incondicional, el sacrificio que hicieron para que pueda estudiar, siempre bancándome y dándome impulso para seguir y lograr mi objetivo, eternamente agradecidos con ustedes. Quiero hacer una mención especial a mi viejo que ya no está, gracias por siempre insistirme en que siga y no abandone el barco, siempre apoyándome y dándome fuerzas para seguir. Espero que en algún lado donde estés puedas verme con “el cartoncito” que tanto deseabas que lograrse.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del estudio

Argentina es un país de tradición ganadera con pasturas cultivadas y pastizales naturales. No obstante, en las últimas décadas se ha producido un reordenamiento en el uso de la tierra como consecuencia del incremento de la superficie dedicada a la agricultura y la disminución de la superficie ganadera, debido a los precios crecientes de los granos a nivel internacional y la incorporación de tecnología en la producción de cultivos extensivos. En este escenario, la ganadería ha sido relocalizada en ambientes marginales de la región pampeana, caracterizados éstos por limitantes edáficas, como exceso de sales solubles, baja fertilidad física y/o química, anegamientos temporarios, y otros factores climáticos adversos que afectan la productividad de las pasturas (De León, 2004; Chiossone, 2006; Gregoret *et al.*, 2020). Esta situación, impulsó a que se revalorizaran aquellas leguminosas de adaptación productiva probada en estos ambientes, y se inicien programas de mejoramiento genético vegetal con el fin de obtener germoplasma forrajero superior en producción y calidad de forraje, como una posible solución al problema.

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) es una especie forrajera distribuida en todo el territorio argentino, debido a su gran plasticidad y adaptación en la mayoría de las provincias fitogeográficas del país. Es considerada una leguminosa de gran importancia por su gran aporte a los sistemas pastoriles y es altamente preferida por el ganado bovino y ovino. A escala de sistema de producción, las evidencias muestran que en el norte de la provincia de Buenos Aires la presencia del trébol blanco permite incrementar la carga animal comparada con pasturas sin fertilizar y equivalen a una fertilización anual de aproximadamente $100 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Bertín y Scheneiter, 2010).

En general los factores que afectan la abundancia de trébol blanco en las pasturas son ambientales y genéticos. Aspectos como la implantación y el manejo son importantes, pero dependen del fondo genético del cultivar utilizado (Barletta *et al.*, 2013). Surge entonces la importancia de realizar caracterizaciones agronómicas del germoplasma de la especie, como primera etapa en la determinación de la

presencia de variabilidad genética útil (Andrés y Rosso, 2007), para aportar a futuros programas de mejoramiento genético y obtención de nuevos cultivares.

1.2 La especie: origen y distribución

El trébol blanco (*Trifolium repens* L.) es una leguminosa forrajera perenne originaria de Europa, principalmente la región mediterránea, extendiéndose al resto de Europa y el oeste de Asia. Su dispersión global ha sido el resultado de múltiples factores, incluyendo la colonización europea y su uso en la agricultura y la ganadería. Se desarrolló principalmente en áreas de suelos fértiles, de buena humedad y con presencia de rumiantes en pastoreo. Los animales, desde los comienzos de la civilización han jugado un rol muy importante en la distribución de esta especie (Gibson y Cope, 1985). A lo largo de la historia, el trébol blanco se ha propagado a otras partes del mundo debido a su importancia como planta forrajera (Hulme, 2009). Ha sido introducido a América del Norte, América del Sur, Australia, Nueva Zelanda y otras regiones, donde se ha naturalizado y en algunos casos, se ha convertido en una planta invasora.

La distribución del trébol blanco en el mundo se ha visto fuertemente influenciada por la migración humana y la expansión agrícola, principalmente como alimentación animal. Una característica destacada del trébol blanco es su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones climáticas y tipos de suelos. Esta adaptabilidad le ha permitido establecerse y naturalizarse en ambientes muy diferentes de su lugar de origen, contribuyendo aún más a su expansión global.

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 (Randazzo *et al.*, 2003, Gallego *et al.*, 2011).

1.3 Descripción botánica de la especie

El trébol blanco es una especie herbácea, perenne y adventicia, de hábito rastrero y que alcanza aproximadamente 10 cm de altura. Se propaga tanto a través de semillas como de estolones. Esto último le permite colonizar rápidamente espacios vacíos en el lote cuando ocurren condiciones de humedad que lo permitan. Además, presenta raíces adventicias de carácter estolonífero, lo cual contribuye a la persistencia de dicha especie en el suelo. La perennidad de la especie depende de la capacidad de formación y enraizamiento de los estolones. Ésta persistencia vegetativa en el suelo se ve afectada por las altas temperaturas de verano combinado con un déficit hídrico que provoca la muerte de los estolones más jóvenes.

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 1 cromosoma (1C) de su genoma es de 956 Mbp (Leitch y Bennet, 2004).

Los cultivares han sido clasificados en base al tamaño del folíolo, estos son: folíolo pequeño, intermedio, grande y gigante o ladino (Woodfield y Caradus, 1994). Los cultivares de folíolo pequeño se caracterizan por ser plantas de hábito prostrado, estolones delgados y muy ramificados, adaptados a climas fríos y a sistemas intensivos con ovinos. Los cultivares de folíolos grandes y gigantes por su parte presentan porte erecto, estolones gruesos, un sistema radicular más desarrollado, son sensibles a bajas temperaturas y están más adaptados a pastoreo rotativo con vacunos y corte (Scheneiter *et al.*, 1998).

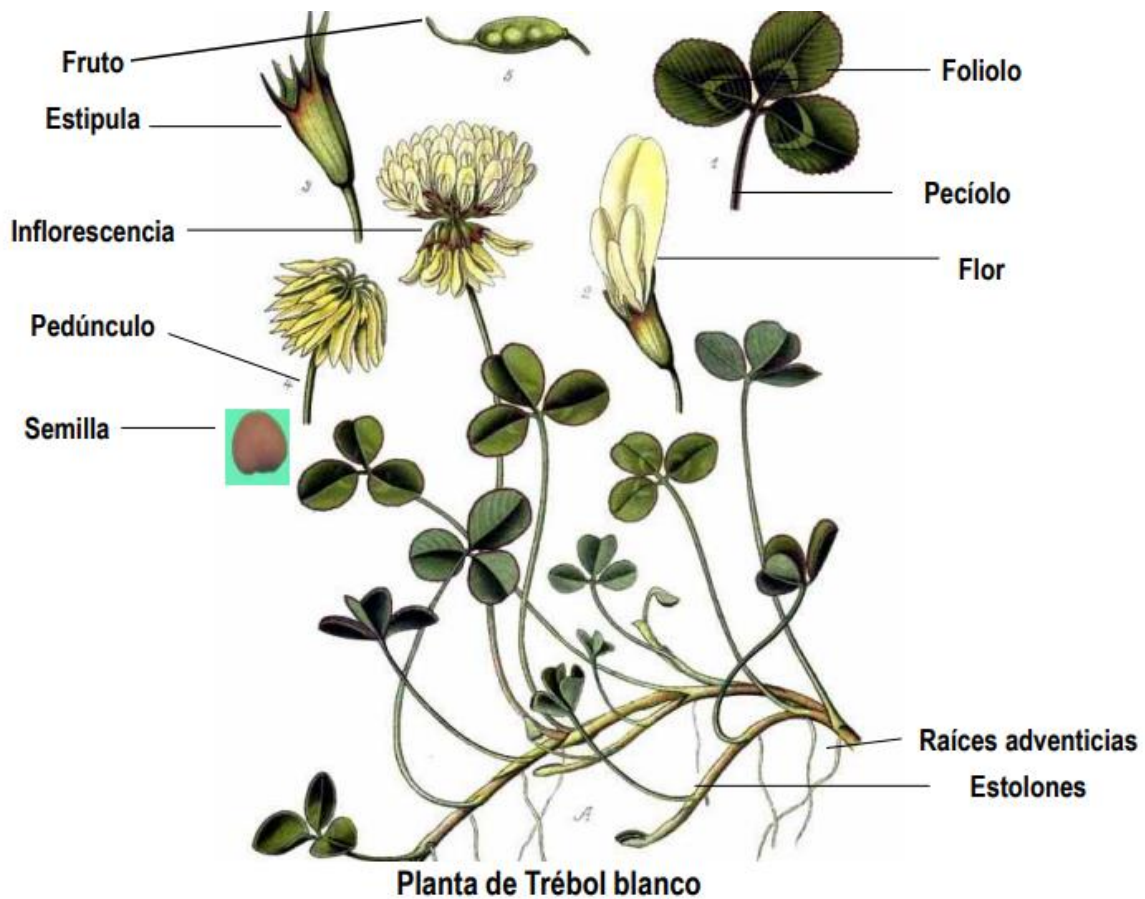


Figura 1. Descripción botánica del trébol blanco

1.4 Aspectos agronómicos y productivos de la especie

La importancia de utilizar mezclas de leguminosas con gramíneas en la siembra de pasturas, radica en que ésta especie realiza un gran aporte de nitrógeno (N) a través de la fijación simbiótica; esta fijación es favorecida por microorganismos del suelo que convierten el N atmosférico a N inorgánico dejándolo disponible para el crecimiento y desarrollo de las plantas. La cantidad de N fijado por unidad de superficie aumenta con el aumento del trébol blanco en la mezcla (Maddaloni y Ferrari, 2001).

Otro aspecto relevante es la producción y calidad de forraje; comparativamente el aporte al sistema pastoril que realiza el trébol blanco respecto al aporte de una gramínea templada de alta calidad, es mayor en concentración de Nitrógeno (N), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y la mayoría de los micronutrientes, lo que redundará en una producción forrajera de elevada calidad que se produce durante gran parte del

año, registrándose un pico máximo de producción en primavera y otro pico menos acentuado en otoño (Gutiérrez-Arenas *et al.*, 2018).

En general, el trébol mejora su competitividad con las gramíneas asociadas a medida que la fertilidad del suelo se incrementa, a excepción de altas dosis de fertilizante nitrogenado, donde se ve reducida su habilidad competitiva debido a que afecta directamente la fijación simbiótica, aumentando la habilidad competitiva de la gramínea. Esta habilidad competitiva se incrementa a medida que la concentración de fósforo (P) del suelo aumenta y la concentración de nitrógeno (N) disminuye (Maddaloni y Ferrari, 2001).

Desde el punto vista ecológico, las leguminosas mejoran la fertilidad del suelo al fijar nitrógeno atmosférico, reduciendo con ello el uso de fertilizantes químicos, así como una mejor interceptación de luz y distribución estacional de la producción de biomasa.

A diferencia de otras especies forrajeras, el crecimiento vegetativo del trébol blanco no se detiene con el pasaje al estado reproductivo (Maddaloni y Ferrari 2001). Bajo sistema de pastoreo y condiciones ambientales favorables, el trébol tiene la capacidad de rebrotar rápidamente debido a que las yemas activas son capaces de producir nuevos primordios de hojas y no son removidas por el animal por encontrarse a nivel de la superficie del suelo donde el animal no llega a pastorear.

Asimismo, cuanto más frecuente es la defoliación por pastoreo es posible esperar un aumento del contenido de trébol blanco en la pastura, debido a que esta defoliación intensa impide que las especies de porte más erectas puedan acumular biomasa aérea, mientras que el hábito de crecimiento postrado del trébol le permite conservar más biomasa aérea y competir de forma más eficiente con las gramíneas asociadas en la pastura (Miñón *et al.*, 2013; Sinavimo, 2021).

Las características estructurales que presenta el trébol blanco hacen que gran parte de su oferta forrajera a disposición del animal sean sólo hojas las que son muy palatable para el rodeo. Además, la capacidad de regenerar hojas y la calidad de forraje ofrecido por esta leguminosa la hacen una especie deseable de incorporar en el sistema productivo.

Desde el punto de vista de la digestibilidad del forraje, una dieta en base a trébol blanco da como resultado una mejor respuesta productiva animal, comparado con una gramínea perenne, debido principalmente a que su mayor palatabilidad y una mayor tasa de degradación ruminal (Anomale *et al.*, 2016; Gregoretti *et al.*, 2020;). Desde el punto de vista nutricional, la mezcla no debería superar el 30% de esta leguminosa, para evitar el riesgo de empaste por parte del animal cuando ingiere pasturas con alto contenido de trébol blanco (Maddaloni y Ferrari, 2001).

1.5. Variabilidad genética entre poblaciones y su caracterización

La colecta y caracterización de los recursos genéticos de especies forrajeras de importancia agronómica, ya sea nativas y/o naturalizadas, constituyen las etapas iniciales en los programas de mejoramiento genético, debido a que proveen de variabilidad genética actual y potencial, relacionada con el ambiente de adaptación. En particular, el germoplasma naturalizado es de gran importancia debido a que contiene suficiente variabilidad genética, como consecuencia de procesos de selección y adaptación a condiciones específicas del ambiente (Bradshaw, 1965; Briggs y Walters, 1984; Tanksley y Mc. Couch, 1997; Andrés, 2014). La adaptación a condiciones ambientales extremas, junto al sistema reproductivo de las especies en consideración, su nivel de ploidía, y los mecanismos de recombinación génica, determinan la magnitud de variabilidad fenotípica y genotípica presente en las colecciones y este es el sustento para la construcción de nuevos programas de mejoramiento (Andrés, 2014; Bennett, 1970; Bradshaw, 1965). Por lo tanto, en especies en las que no existe información confiable de la distribución de la variación en la naturaleza, las recolecciones deben representar un amplio rango de ambientes.

En programas de mejoramiento genético con objetivos de selección específicos, la colecta de poblaciones se puede realizar en microambientes caracterizados por situaciones ecológicas particulares, como suelos salinos, o con escasez de agua y temperaturas extremas, donde se asume que existen ecotipos adaptados, los que pueden ser la fuente que provea la variabilidad genética necesaria para iniciar selección. Este último aspecto también conduce a efectuar la

prospección y consideración de nuevas fuentes de germoplasma presentes en la naturaleza.

La estimación de la diversidad genética en el germoplasma colectado es crucial para la conservación y posterior utilización de las especies, ya sea con fines de preservación (Gowda *et al.*, 2012), o con fines de uso inmediato para la mejora productiva (Harlan, 1983; Sleper, 1987; Hallauer, 1988). En este sentido, Smith y Smith (1989) informaron que la caracterización agromorfológica es un primer paso en la descripción y clasificación del germoplasma.

Los niveles de análisis intra-específicos (Bradshaw, 1984; Briggs y Walters, 1984) pueden discriminar entre poblaciones y entre individuos dentro de la misma población, representando respuestas a procesos de selección determinados por varios factores tales como el rango ecológico de la especie, la localización geográfica, la heterogeneidad ambiental, el sistema reproductivo, la longevidad de la planta, entre otros. La heterogeneidad ambiental y el rango ecológico y geográfico toman gran importancia para determinar la magnitud de la variación interpoblacional, mientras que las variaciones ambientales presentes en pequeña escala y el sistema reproductivo ejercen mayor influencia en el polimorfismo intrapoblacional (Jain, 1975; Loveless y Hamrick, 1984). En particular, en los sistemas ganaderos ocurren presiones de selección a pequeña escala, producto de la interacción clima-planta, suelo-planta, planta-planta y planta-animal.

La existencia de variabilidad genética para el carácter objeto de mejora es indispensable en un programa de mejoramiento genético. Tal variación puede existir entre individuos, entre poblaciones, entre variedades o aún entre especies que tienen el mismo grado de compatibilidad sexual de manera que los genes puedan ser transferidos de un individuo a otro (Shannon, 1997).

La variabilidad genética y fenotípica presente en las poblaciones naturalizadas de especies forrajeras es el producto de la interacción entre factores ambientales (variables bioclimáticas, tipo de suelo, manejo, distribución geográfica, etc.) y genéticos (sistema reproductivo de la especie en estudio, fondo genético, etc.), los que determinan la adaptación al ambiente y la distribución de la especie. Esta variación puede ocurrir en caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y/o

moleculares, en cualquier etapa del ciclo de vida de un individuo (Primack y Kang, 1989).).

Existen numerosas investigaciones de estudios de caracterización en poblaciones naturalizadas de diferentes especies forrajeras, a nivel nacional e internacional (Borrajo *et al.*, 1997; Borrajo *et al.*, 1998; Alonso, 2004). En trébol blanco se ha detectado una elevada variabilidad en colecciones de germoplasma de origen diverso (Rosso *et al.*, 1997; Barletta *et al.*, 2013), producto de su alogamia y amplia plasticidad. Estudios genéticos realizados en poblaciones y cultivares de trébol blanco adaptado a condiciones de sequía en Australia, demostraron la importancia de variables como la longitud de los entrenudos, y tasa de elongación, para seleccionar y mejorar poblaciones experimentales con tolerancia incrementada al estrés hídrico (Caradus *et al.*, 1996).

En los programas tradicionales de mejoramiento genético de la especie los estudios de variabilidad se han concentrado básicamente en caracteres morfofisiológicos y agronómicos (Pagano, 1995; Annicchiarico, 2003; Bouton *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008). Algunos atributos cualitativos (Rosso y Pagano, 2001) como manchas blancas, presencia de antocianinas y liberación de ácido cianhídrico (HCN), se han utilizado para diferenciar cultivares de diferentes orígenes conservados en el Banco de Germoplasma de INTA Pergamino (Rosso *et al.*, 2001).

1.6. Mejoramiento genético de la especie en Argentina

Si bien el mejoramiento genético convencional ha tenido un gran impacto en el incremento del rendimiento, la calidad y la resistencia a plagas y enfermedades en cereales y oleaginosas (Evans, 1998), en las especies forrajeras los progresos han sido significativamente menores, especialmente en lo referido al rendimiento (Snaydon, 1985; Brummer, 1999). Esto se debe a varios factores, como un proceso más reciente de domesticación, la complejidad de objetivos, problemas reproductivos, de mercado y las menores inversiones realizadas en el área. Las herramientas biotecnológicas desarrolladas en los últimos 20 años ofrecen interesantes alternativas que pueden contribuir a mejorar esta situación.

En los últimos años la biotecnología ha aportado varias metodologías para complementar los programas de mejoramiento, como el cultivo de tejidos, la hibridación somática, la variación somaclonal y la transgénesis. Esta última resulta muy promisoría, especialmente para incrementar la calidad del forraje, persistencia, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a estreses abióticos y para manipular el crecimiento y desarrollo.

En Argentina, los estudios de caracterización genética y fenotípica de colecciones de trébol blanco fueron importantes (Pagano, 1993; Randazzo *et al.*, 2003; Lapalma *et al.*, 2022 a) y han aportado conocimientos y germoplasma para el desarrollo de cultivares como Lucero Plus INTA y Nazareno INTA (biliografía). Sin embargo, los estudios de variabilidad en la especie han sido escasos en los últimos años, los cultivares mencionados son relativamente viejos en el mercado y en la actualidad no se han desarrollado nuevas variedades que se adapten a ambientes con restricciones hídricas.

En Argentina, el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares del INASE registra 19 cultivares de trébol blanco (2023), la mayoría de ellos extranjeros y provenientes de climas con influencia oceánica, definidamente templados, sin amplitudes térmicas extremas y con precipitaciones elevadas y regularmente distribuidas. Este déficit de cultivares que se adapten a las condiciones climáticas imperantes en el norte de la Pcia de Buenos Aires, crea la necesidad de disponer de nuevo germoplasma que promueva una expansión ganadera sustentable a través del desarrollo de genética nacional.

Por lo mencionado anteriormente, se pretende a través de esta investigación caracterizar fenotípica y genéticamente ocho poblaciones de trébol blanco provenientes de colectas realizadas recientemente en diferentes ambientes de pasturas de la Provincia de Buenos Aires, en suelos halomórficos y con estrés térmico (Lapalma *et al.*, 2022, b y c), con el fin último de aportar conocimientos y germoplasma para desarrollar futuros programas de mejoramiento genético en la especie.

2. HIPÓTESIS

* Existe variabilidad fenotípica y genética diferenciable entre poblaciones naturalizadas de trébol blanco (*Trifolium repens*)

3. OBJETIVO GENERAL

* Determinar la existencia de variabilidad fenotípica y genética entre poblaciones naturalizadas de trébol blanco (*Trifolium repens*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

* Caracterizar fenotípicamente y genéticamente poblaciones de trébol blanco en condición de planta aislada en un suelo argiudol típico.

* Estimar los parámetros genéticos poblacionales (varianza genética, varianza ambiental, varianza fenotípica, heredabilidad en el sentido amplio).

* Identificar poblaciones para incorporar en futuros programas de mejoramiento genético de la especie.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación y caracterización del sitio experimental

El ensayo se llevó a cabo en el campo experimental “Las Magnolias” (34° 28'56,57" S 60° 52' 40,73" O), de la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA), ubicado en el kilómetro 146,5 de la Ruta Nacional 188 dentro del partido de Junín (Figura 2).

El tipo de suelo predominante es la serie Junín (Ju15), con un alto porcentaje de suelo Hapludol típico. Su capacidad de uso es IIIes con un índice de productividad del 62%_A. Es un suelo profundo y oscuro con aptitud agrícola que se encuentra en un paisaje ondulado, ocupando los sitios de lomas de la Subregión Pampa Arenosa, bien a algo excesivamente drenado, relativamente joven con escaso desarrollo, habiendo evolucionado sobre un sedimento eólico franco

arenoso, no alcalino, no salino con pendiente predominante de 0-1 %, hasta 3 % en pendientes muy cortas (Carta de Suelos de la Provincia de Buenos Aires, INTA).



Figura 2. A. Ubicación del Campo Experimental “Las Magnolias”.



Figura 2. B. Ubicación del ensayo dentro del Campo Experimental (Google Earth 2023).

4.2 Datos meteorológicos

En el siguiente cuadro (Cuadro 1.) se puede observar los datos meteorológicos promedio por mes de temperatura (°C), humedad relativa (%) y precipitaciones (mm) para el período Abril 2022 – Octubre 2022, que coincide con el inicio del ensayo a campo hasta la obtención del primer dato del número de cabezuelas.

Cuadro 1. Datos meteorológicos promedio por mes para el rango de fechas Abril 2022 – Octubre 2022.

Fecha	Temperatura (°C)	Humedad (%HR)	Precipitaciones (mm)
Abril	14,79	67,62	0,01
Mayo	10,03	71,55	0,00
Junio	6,64	71,97	0,00
Julio	9,27	73,84	0,00
Agosto	10,17	63,09	0,00
Septiembre	12,97	53,90	0,00
Octubre	16,13	55,10	0,01

4.3 El germoplasma estudiado

Se realizó la colecta de ocho poblaciones de trébol blanco en el noroeste de la Pcia de Buenos Aires, (Cuadro 2, Figura 3) durante los meses de diciembre 2021 y enero 2022. Los sitios de colecta fueron seleccionados a partir de variables ambientales como tipo de pastura, años de pastoreo, condiciones climáticas, especies acompañantes, y a partir de la frecuencia de aparición de genotipos por población. En cada sitio se recolectaron 90 plantas (1 planta = 1 genotipo; 90 genotipos = 1 población), siguiendo una transecta imaginaria que permitió recolectar genotipos distanciados a 3 metros uno de otro, para evitar repetir el mismo genotipo. La extracción de cada genotipo individual (mata) con raíces y tierra se realizó utilizando palas manuales. El aislamiento mínimo entre las nueve poblaciones fue de 30 km. En cada sitio de colecta, se registraron las coordenadas y la altura sobre el nivel del mar, y se referenció con la ciudad más cercana. Adicionalmente se describieron aspectos del paisaje de cada población, como tipo de suelo, especies acompañantes y manejo de los lotes de pastoreo (Cuadro 2). Los 720 genotipos fueron dispuestos en bolsas de nylon, con identificación del sitio de colecta y características propias de cada ambiente, y posteriormente trasladados al campo experimental Las Magnolias, para su acondicionamiento en macetas plásticas de 3L, conteniendo una mezcla de tierra y arena, en un patio al aire libre.

Cuadro 2. Ambientes de recolección del germoplasma (poblaciones=Pob) de trébol blanco.

Pob	Sitio	Coordenadas	ASNMM	Tipo de suelo	Especies acompañantes
1	General Villegas	S 34° 57'; O 62° 51'	116	Argiudol, ganadero	Festuca, Cardo Negro
2	General Villegas	S 35° 00'; O 62° 45'	112	Argiudol, ganadero	Festuca, Cardo Negro
3	General Villegas	S 35° 01'; O 63° 04'	113	Argiudol, ganadero	Festuca, Echinochloa, Cardo Negro
4	Carlos Tejedor	S 35° 25'; O 62° 21'	93	Hapludol típico, ganadero	Festuca, Lotus Tenuis, Distychlys Spicata
5	Timote	S 35° 16'; O 62° 12'	95	Argiudol, agrícola	Festuca, Lotus Tenuis, Lengua de vaca
6	Pergamino	S 33° 56'; O 60° 33'	63	Argiudol, agrícola	Festuca, Cardo Negro
7	Rojas	S 34° 14'; O 60° 41'	59	Argiudol, ganadero	Alfalfa, Cardo Negro, Hirschfeldia
8	Arrecifes	S 34° 10'; O 60° 10'	58	Argiudol, agrícola	Raigras, lotus cornilatus

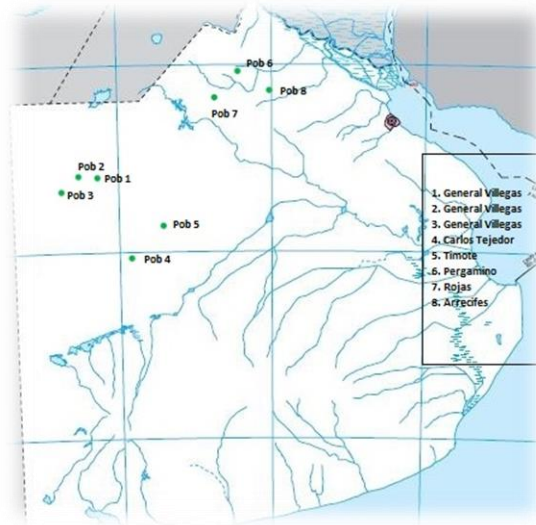


Figura 3. Sitios de colecta de las diferentes poblaciones de trébol blanco.

4.4 Diseño Experimental

Durante el mes de abril del 2022, se trasplantaron las 8 poblaciones (720 genotipos) en condición de planta aislada (0,60 m entre plantas), mediante la Técnica de Turesson (1922). Ésta técnica permite minimizar los efectos ambientales sobre los genotipos y que cada individuo exprese todo su potencial genético. El diseño experimental utilizado fue el de bloques completamente aleatorizados (DBCA), con tres repeticiones y 30 plantas por población y por repetición.

Se aplicó riego por goteo y se realizaron todas las labores culturales necesarias para mantener el ensayo libre de malezas (Figura 4 y 5).



Figura 4. Ensayo a campo de las 8 poblaciones de trébol blanco en etapa vegetativa.



Figura 5. Ensayo a campo de las 8 poblaciones de trébol blanco en etapa reproductiva.

4.5 Caracteres evaluados

Desde el trasplante a campo (04/04/2022) se midieron, sobre cada planta individual (genotipo) y acorde al estado fenológico, caracteres vegetativos y reproductivos (Cuadro 3 y 4). Los caracteres vegetativos se midieron a partir de los 3 meses desde su trasplante a campo hasta el corte de forraje primaveral, los mismos fueron: Altura de planta (cm) en diferentes fechas; Diámetro de planta (cm) en diferentes fechas; Vigor en diferentes fechas; Hábito de crecimiento y finalmente Peso fresco y Peso seco de la biomasa aérea (g). Los caracteres reproductivos, por su parte, se midieron antes del corte primaveral hasta la cosecha de la semilla, los mismos fueron: Número de cabezuelas por planta en diferentes fechas; Peso total de semillas (g) y Peso de mil semillas por planta (g).

4.5.1 Caracteres vegetativos

En cada planta individual se midió altura (cm) y diámetro de planta (cm) con una cinta métrica. Para altura de la planta, desde la base de la planta hasta el folíolo más alejado. En el caso del diámetro, se tomaron dos mediciones al azar por planta

y se promediaron. Para la variable vigor de crecimiento inicial se utilizó una escala visual (0=muy mala, 1=mala, 2=regular, 3=buena y 4=muy buena). El hábito de crecimiento también se obtuvo a partir de una escala visual (1=erecto, 2=semi-erecto y 3=postrado).

El corte de materia verde se realizó en primavera (19/10/2022), con tijeras manuales a una altura de 5 cm desde el suelo. La materia verde correspondiente a cada planta (genotipo) fue dispuesta en sobres de papel con su correspondiente identificación y posteriormente trasladada a gabinete para registrar el peso fresco (g) en una balanza electrónica (Kretz, Serie A-3000gx0,05g). Posteriormente los sobres fueron acondicionadas en una estufa eléctrica a 60°C durante 72 hs, hasta que las mismas llegaron a peso constante, y se registró el peso seco (g).

Cuadro 3. Caracteres vegetativos evaluados por fecha de medición.

CARACTERES VEGETATIVOS	
VARIABLE	FECHA
ALTURA DE PLANTA (cm)	12-07-2022
	29-08-2022
	12-09-2022
	17-10-2022
	31-10-2022
	14-11-2022
VIGOR DE CRECIMIENTO INICIAL (0....4)	12-07-2022
	29-08-2022
	12-09-2022
DIÁMETRO DE PLANTA (cm)	12-07-2022
	29-08-2022
	12-09-2022
HÁBITO DE CRECIMIENTO (1....3)	17-10-2022
PESO VERDE (g)	19-10-2022
PESO SECO (g)	24-10-2022

4.5.2 Caracteres reproductivos

A partir de la iniciación de la floración (31/10/2022) en cada planta individual se contó el número de cabezuelas a través de 5 fechas, considerando aquellas que estuvieran completamente desarrolladas en el momento de la medición.

La cosecha del ensayo se realizó a fines de diciembre del 2022 y principios de enero del 2023, en forma manual. Simultáneamente se contabilizó el número de cabezuelas por planta. Los sobres conteniendo las cabezuelas de cada genotipo fueron trasladados a gabinete, y posteriormente trilladas las cabezuelas en forma manual, en cajones de madera previstos para tal fin (Figura 6 y 7).



Figura 6. Separación de cabezuelas de forma manual.



Figura 7. Trilla manual en cajones de madera.

Posteriormente, los sobres conteniendo las semillas de cada genotipo se llevaron al laboratorio de semillas de la EEA INTA Pergamino, donde se preservaron en la cámara seca a 18°C para que las semillas no pierdan viabilidad (según normas del INASE). Luego se limpiaron por venteo forzado de aire. En éste método (Figura 8), la semilla pura se separa de las impurezas de la trilla, se gradúa la apertura de aire y por el peso se separan. Así, la semilla por su mayor peso queda en la parte

inferior del tubo y las impurezas (tierra, materia inerte, semillas chuzas, etc.) por su menor peso en la parte superior del mismo. Las impurezas se descartan y la semilla pura se coloca en sobres enumerados para posteriormente determinar el peso total de semillas por planta (RTO) y el peso de mil semillas (P1000).



Figura 8. Tubo de venteo de aire forzado de la EEA INTA Pergamino.

El peso total de semillas se realizó en una balanza de precisión con 3 decimales (modelo METTLER PM200). Por su parte, para el P1000 se hizo un conteo de 100 semillas por genotipo, se pesó en la misma balanza y se llevó a P1000 para cada genotipo.

Cuadro 4. Caracteres reproductivos evaluados por fecha de medición.

CARACTERES REPRODUCTIVOS	
VARIABLE	FECHA
NÚMERO DE CABEZUELAS	31-10-2022
	14-11-2022
	29-12-2022
RENDIMIENTO (g)	18-04-2023
P1000 (g)	18-04-2023

4.6 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos de los caracteres cuantitativos relevados, se aplicó un modelo estadístico lineal:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ij} \text{ con } i = 1, 2, \dots, 8; j = 1 \dots 3$$

Dónde:

Y_{ij} : respuesta observada en la j -ésima repetición de la i -ésima población evaluada.

μ : media general.

α_i : componente de la varianza debido a la población

β_j : componente de la varianza debido a las repeticiones

ϵ_{ij} : componentes de varianza debido al error. Los valores ϵ_{ij} se suponen normales, independientes, con esperanza cero y varianza común σ^2 .

ϵ_{ij} es el error aleatorio asociado a la ij -ésima observación.

Los datos obtenidos en la medición de los caracteres morfo-fisiológicos en etapas vegetativas y reproductivas fueron sometidos a distintos tipos de análisis mediante el uso del software estadístico Infostat ® (Di Rienzo et al., 2013).

En primer lugar, se realizó estadística descriptiva para obtener medidas de resumen y poder comparar en conjunto al total de las plantas evaluadas. Posteriormente se realizaron análisis correspondientes para corroborar los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia; se comprobó que los datos no cumplían con todos los supuestos por lo que se descartó realizar el análisis ANOVA y se procedió a realizar pruebas no paramétricas, modelos lineales (ML) y generalizados (MLG). Por último, se procedió a realizar análisis multivariados (componentes principales y clúster jerárquico) y estimación de parámetros genéticos (varianza genética, ambiental y heredabilidad en sentido amplio) a partir de la esperanza de los cuadrados medios.

4.6.1 Variables cualitativas

En el caso de las variables cualitativas (vigor y hábito de crecimiento) el análisis fue descriptivo, se analizaron las frecuencias relativas de las distintas clases para determinar, a partir de histogramas, la frecuencia de distribución de las 720 plantas. Además, a dichas variables se realizó una prueba no paramétrica de Friedman, para determinar las diferencias significativas entre poblaciones.

4.6.2 Variables cuantitativas

4.6.2.1 Estadística descriptiva

Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables cuantitativas mencionadas para determinar el comportamiento promedio de las 720 plantas de trébol blanco agrupadas en 8 poblaciones. Se determinó la media, desvío estándar (D.E.), coeficiente de variación (CV), mínimo (Mín), máximo (Máx) y valor de significancia (p-valor).

4.6.2.2 Supuestos de normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia

Para determinar si las variables presentaban una distribución normal se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk con los residuos. Se construyeron Q-Q plots normal para obtener un diagrama de dispersión de los residuos obtenidos versus los cuantiles teóricos de una distribución normal. Así, se alinearon sobre una recta a 45° cuando los residuos eran de distribución normal y no hay otros defectos del modelo.

Para corroborar el supuesto de homogeneidad de varianzas se realizó un gráfico de dispersión de residuos versus valores predichos. Para el cumplimiento del supuesto se debe observar una nube de puntos sin patrón alguno (patrón aleatorio).

Finalmente, para verificar el supuesto de independencia o errores independientes, se realizó un gráfico de dispersión de los residuos en función de la variable que se presume puede generar dependencias sobre las observaciones. En general, un buen proceso de aleatorización asegura el cumplimiento del supuesto de independencia.

4.6.2.3 ANAVA no paramétrica

Las variables cuantitativas mencionadas no presentaron uniformidad en el cumplimiento de dichos supuestos, a pesar de las transformaciones aplicadas, por lo que se procedió, en algunos casos, a hacer la prueba no paramétrica de Friedman.

4.6.2.4 Modelos lineales (ML) y generalizados (MLG).

Los modelos lineales son una herramienta estadística que se utiliza para predecir una variable continua en función de una o más variables predictoras. En los modelos lineales comunes se usan variables de efectos fijos porque se busca establecer una relación entre una variable dependiente y una o más variables independientes. Estas variables independientes se consideran fijas y se asume que no varían entre las observaciones, es decir, se asume que la relación entre la variable dependiente y las variables independientes es constante para todas las observaciones.

Los modelos lineales generalizados son una generalización de los modelos lineales que permiten la inclusión de variables respuesta que tienen modelos de distribución de errores distintos de una distribución normal. Esto quiere decir que estos modelos permiten incluir variables que no siguen una distribución normal y se relacionan con otras variables a través de una función de enlace. Los modelos lineales generalizados permiten hacer uso de diferentes tipos de distribuciones para la variable respuesta, lo que los hace más flexibles que los modelos lineales comunes. Se pueden utilizar diferentes tipos de distribuciones para la variable respuesta, como la distribución binomial, binomial negativa, de Poisson, gamma, entre otras. La elección de la distribución adecuada depende del tipo de datos y del objetivo del análisis. Los modelos lineales generalizados son muy útiles para hacer predicciones y explicar relaciones entre variables.

En el presente estudio se aplicaron ambos análisis a través de la función R en Infostat.

4.6.2.5 Análisis multivariados

El análisis multivariado es una técnica estadística que se utiliza para analizar múltiples variables simultáneamente y encontrar patrones, relaciones y asociaciones entre ellas. Dentro de las diferentes técnicas de análisis multivariados se realizó el Análisis de Componentes Principales (conglomerados) y Análisis Jerarquizado (Clúster).

El Análisis multivariado de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística que se utiliza para reducir la dimensionalidad de los datos, es decir, para simplificar la información contenida en un conjunto de variables. El objetivo del ACP es poder identificar las combinaciones lineales de las variables originales que expliquen la mayor variabilidad posible en los datos y agruparlas en unas pocas componentes principales. De esta manera, se pueden identificar las variables más importantes y eliminar aquellas que no aportan información relevante.

El análisis multivariado de clúster jerárquico es una técnica de agrupamiento que organiza las variables u observaciones en grupos o clústeres en función su similitud o divergencia entre ellos. En cada paso, las variables más similares se

agrupan hasta que se forman todos los grupos posibles. La estructura de clúster se puede visualizar en un dendrograma. El análisis multivariado de clúster jerárquico es útil cuando se quieren identificar patrones de similitud en una matriz de datos multivariados (Rencher y Christensen, 2012).

4.6.2.6 Estimación de la heredabilidad en sentido amplio

La heredabilidad expresa la porción de la variancia total que es atribuible a los efectos medios de los genes y esto es lo que determina el grado de parecido entre parientes. La heredabilidad posee un papel predictivo en el estudio genético ya que expresa la confiabilidad del valor fenotípico como indicación del valor reproductivo. El mejoramiento tradicional mide únicamente los valores fenotípicos de los individuos, pero es el valor reproductivo el que determina su influencia en la siguiente generación. Por tanto, si el mejorador selecciona individuos para que sean progenitores de acuerdo a sus valores fenotípicos, el éxito en cambiar las características de la población puede predecirse únicamente a partir del conocimiento del grado de correspondencia entre los 16 valores fenotípicos y los reproductivos. Este grado de correspondencia es medido a través de la heredabilidad (Falconer, 1989).

La heredabilidad en sentido amplio (H^2) es una medida estadística que indica la proporción de la variación fenotípica total de un carácter biológico en una población que se debe a la variación genotípica y ambiental entre individuos, es decir, mide la contribución de los factores genéticos y ambientales a la variación fenotípica total de un carácter.

En el presente estudio se estimó **la heredabilidad en sentido amplio calculada sobre la estimación de las varianzas genética y ambiental entre las 8 poblaciones investigadas**. La misma se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$H^2 = \frac{\sigma^2_g}{\sigma^2_f} = \frac{\sigma^2_g}{\sigma^2_g + \sigma^2_{amb}}$$

$$\sigma^2_g = \frac{CMp - CMe}{r}$$

$$\sigma^2_{\text{amb}} = CMe$$

Donde:

σ^2_g es la varianza genética que existe entre poblaciones.

σ^2_{amb} es la varianza que existe debido al ambiente.

σ^2_f es la varianza fenotípica que resulta de sumar la varianza genética y la ambiental.

r es el número de repeticiones dentro de cada población.

CMp cuadrados medios entre poblaciones.

CMe cuadrados medios del error.

5. RESULTADOS

Caracterización de la especie

La caracterización fenotípica y genotípica del trébol blanco se realizó sobre un total de 720 plantas pertenecientes a 8 poblaciones provenientes de una colecta previa en diferentes ambientes de uso de la Provincia de Buenos Aires. Se evaluaron un total de 20 variables vegetativas y reproductivas, en diferentes fechas, durante el primer año de establecimiento del trébol blanco en el campo experimental Las Magnolias de la UNNOBA.

5.1 Variables cualitativas

5.1.1 Vigor

El vigor de planta se refiere a la capacidad para crecer y desarrollarse. Una planta vigorosa tiene un crecimiento fuerte y constante, produce hojas y ramas sanas, y tiene una mayor resistencia a las enfermedades y al estrés ambiental. El vigor está influenciado por varios factores, como la genética de la planta, la calidad del suelo, el clima, la disponibilidad de nutrientes y agua, y la presencia o ausencia de enfermedades y plagas. Cuando estos factores son favorables para la planta, se puede esperar un mayor vigor y una mayor producción de frutos o flores.

El dato de esta variable se obtuvo a partir de la observación del estado general de cada planta, en varias fechas, confeccionando una escala visual (0-4) respecto a cómo se encontraba la misma. Un valor de 0 corresponde a un vigor muy malo, el valor 1 a un vigor malo, el valor 2 a un vigor regular, un valor de 3 a un vigor bueno y el 4 a un vigor muy bueno (Gráficos 1. A, B y C).

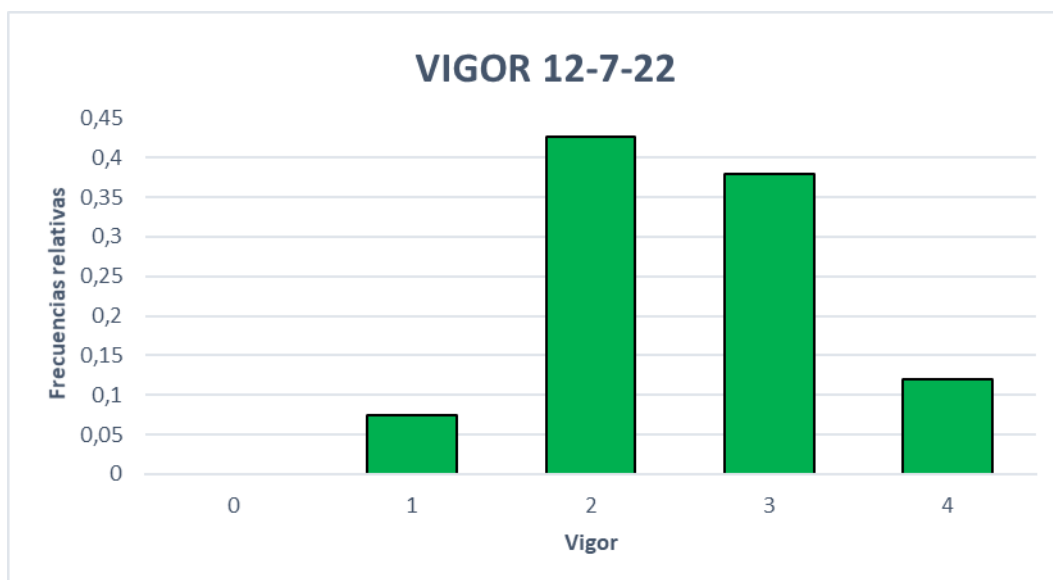


Gráfico 1. A. Frecuencias relativas de las distintas clases de vigor que presentaron las 720 plantas de trébol blanco, en la fecha observada. Vigor 0 (0%), Vigor 1 (7,5%), Vigor 2 (42,64%), Vigor 3 (37,92%) y Vigor 4 (11,94%).

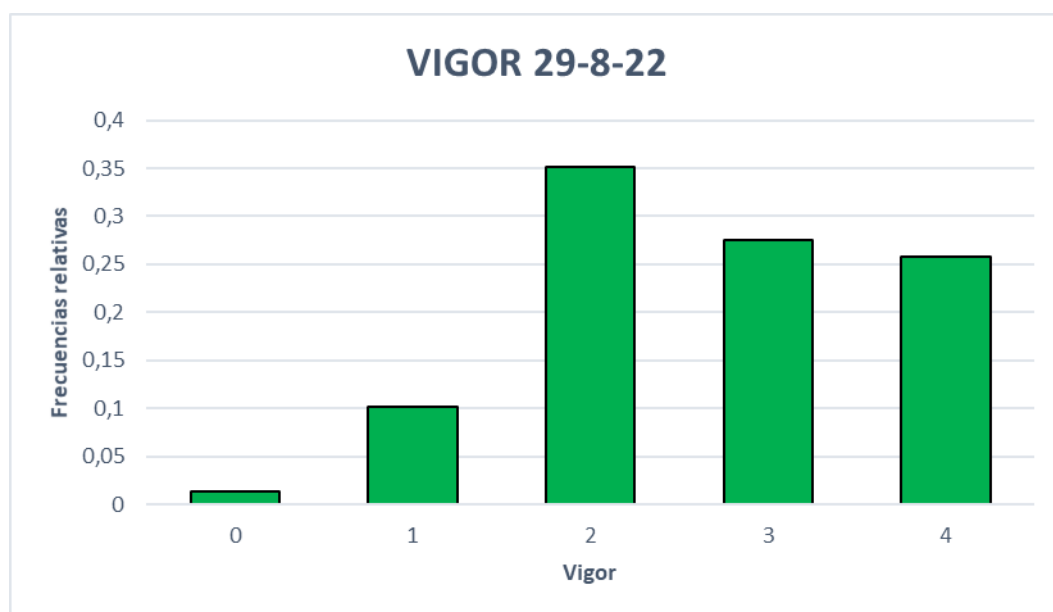


Gráfico 1. B. Frecuencias relativas de las distintas clases de vigor que presentaron las 720 plantas, en la fecha observada. Vigor 0 (1,39%), Vigor 1 (10,14%), Vigor 2 (35,14%), Vigor 3 (27,5%) y Vigor 4 (25,83%).

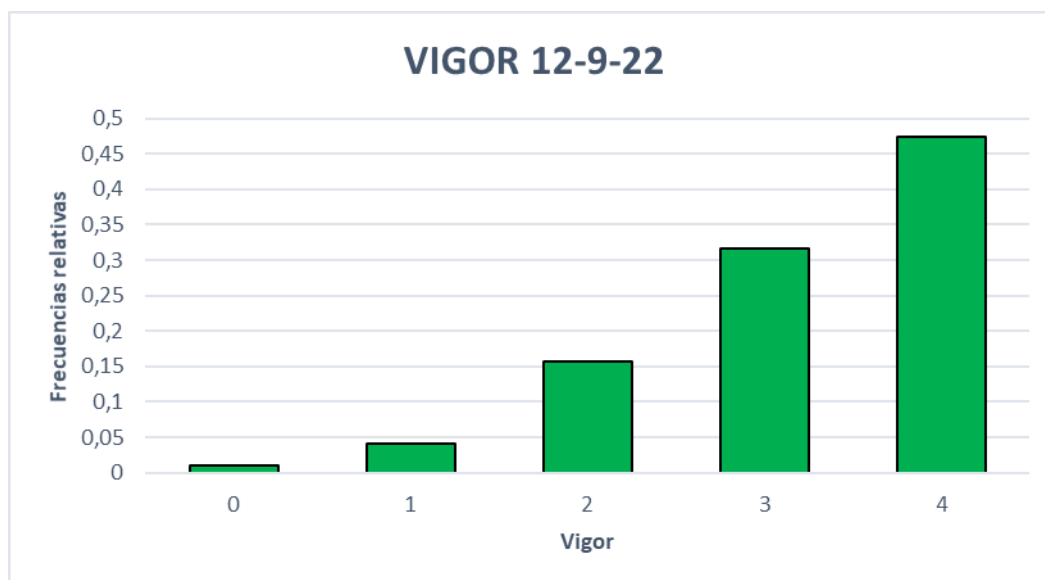


Gráfico 1. C. Frecuencias relativas de las distintas clases de vigor que presentaron las 720 plantas, en la fecha observada. Vigor 0 (1,11%), Vigor 1 (4,17%), Vigor 2 (15,69%), Vigor 3 (31,67%) y Vigor 4 (47,36%).

En los gráficos se puede observar que en la primera fecha de medición (12/7/2022) las plantas mostraron mayoritariamente un vigor que oscilo entre regular y bueno. Por su parte, en la segunda fecha de medición (29/8/2022), la mayoría de las plantas evidenció un vigor regular

Por último, para la tercera y última fecha de medición (12/9/2022), la plantas mostraron un muy buen vigor de crecimiento. Además, se puede observar, conforme avanza la fecha de medición, el aumento del porcentaje de frecuencia relativa de plantas que lograron muy buen vigor. También es oportuno destacar aquí que la variable fue medida previa al corte de forraje que ocurrió del 19 al 21/10/2022.

5.1.2 Hábito de crecimiento

El hábito de crecimiento de una planta se refiere a la forma en que esta se desarrolla y crece. Incluye la altura, la forma, la ramificación, la manera en que se extienden las hojas y las ramas, y la forma en que la planta se relaciona con su entorno. El hábito de crecimiento puede variar ampliamente entre diferentes especies de plantas, y puede ser influenciado por factores como la genética, la luz, el agua, los nutrientes y las condiciones ambientales.

Para el caso de trébol blanco el hábito de crecimiento es una característica muy importante, generalmente las plantas que tienen un crecimiento postrado se relaciona a una mayor persistencia en el suelo respecto a aquellas plantas con un crecimiento erecto. Esto se debe a que las plantas postradas tienen una mayor capacidad para cubrir el suelo, debido a la capacidad estolonífera de la especie, y protegerse a sí mismas de las condiciones ambientales adversas, como la sequía, el frío y el calor extremo.

En el presente estudio se confecciono una escala de 0 a 3, correspondiendo el valor 0 a aquellas plantas muertas (M), el valor 1 a aquellas plantas que presentaron un crecimiento erecto (E), el valor 2 a un crecimiento semi-erecto (SE) y el valor 3 a un crecimiento postrado (P). Como se puede observar en el Gráfico 2, la mayor frecuencia de plantas presentó un crecimiento erecto (51,81%), seguido por el crecimiento semi-erecto (25,14%) y el menor porcentaje le corresponde a un crecimiento postrado (21,11%).

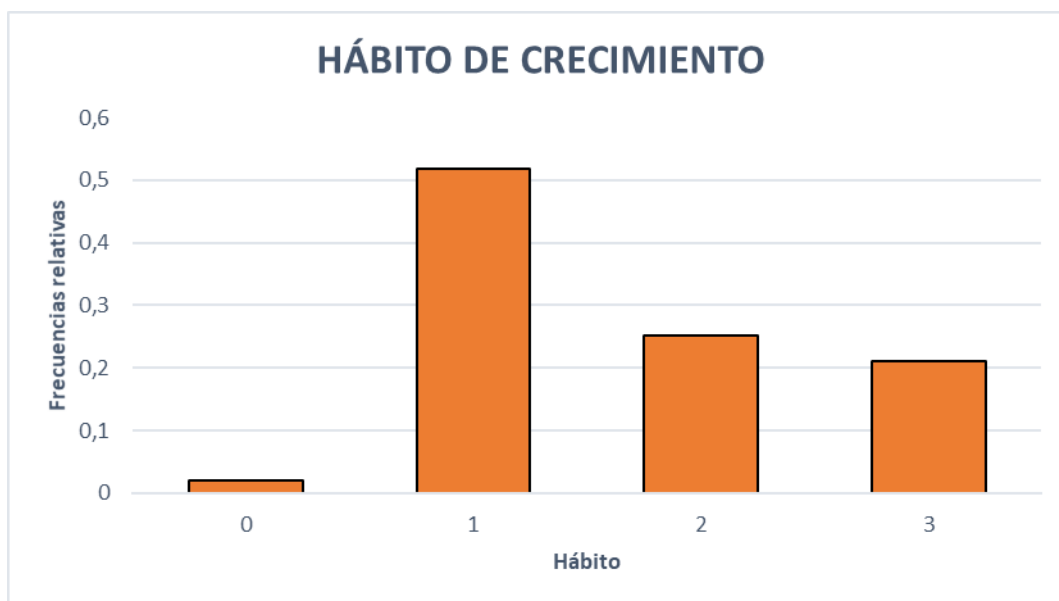


Gráfico 2. Frecuencias relativas de las distintas clases para la variable hábito de crecimiento que presentaron las 720 plantas, en la fecha observada (17-10-22).

5.1.3 Prueba de Friedman

Se realizó una prueba no paramétrica de Friedman porque era la que más se ajustaba al diseño experimental (DBCA) utilizado durante el ensayo. Las variables analizadas, como se mencionó anteriormente, fueron vigor (para las 3 fechas observadas) y hábito de crecimiento.

5.1.3.1 Vigor

En el caso de vigor, para la primera fecha de medición (12/7/2022), se observó que las poblaciones 1, 3, 4 y 8 fueron las que mejor se comportaron, diferenciándose significativamente del resto. Por su parte, la población 7 fue la que presentó un menor valor promedio de vigor que el resto (Gráfico 3).

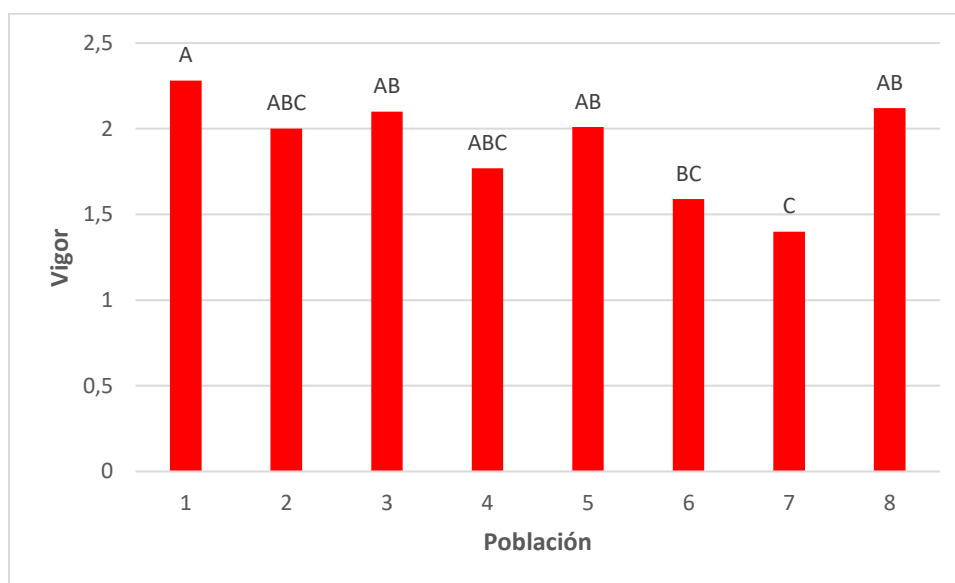


Gráfico 3. Vigor promedio que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco para la fecha observada (12/7/2022). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con diferencias de medias DGC.

Para la segunda fecha de medición (29/8/2022), se observó que la población 1 fue la que mayor valor promedio obtuvo, diferenciándose significativamente del resto. Por su parte, nuevamente la población 7 presentó el peor valor promedio de vigor (Gráfico 4).

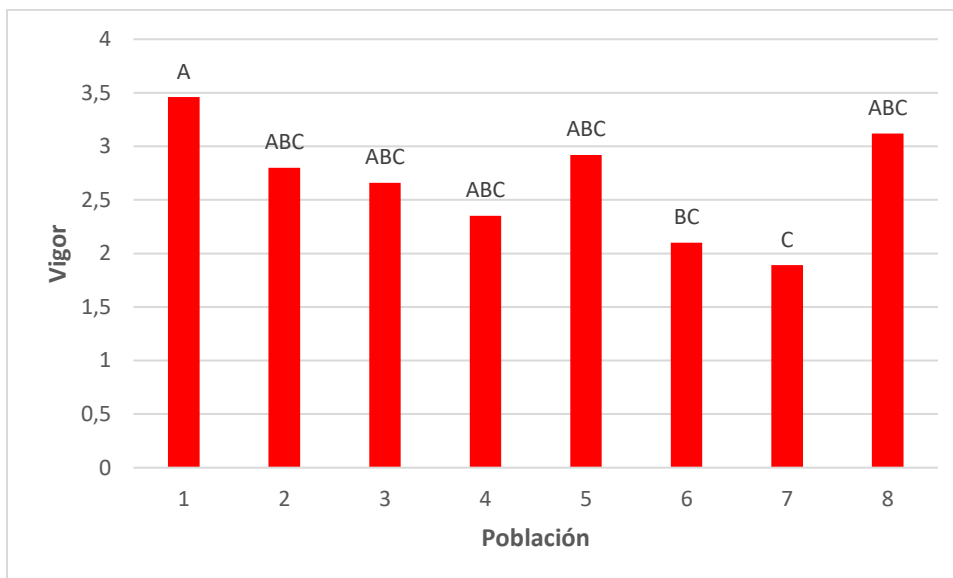


Gráfico 4. Vigor promedio que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco para la fecha observada (29/8/2022). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con diferencias de medias DGC.

En la última fecha de medición (12/9/2022), las poblaciones 1 y 8 fueron las que mayor valor promedio de vigor obtuvieron. Por su parte, nuevamente, la población 7 obtuvo el peor valor promedio (Gráfico 5).

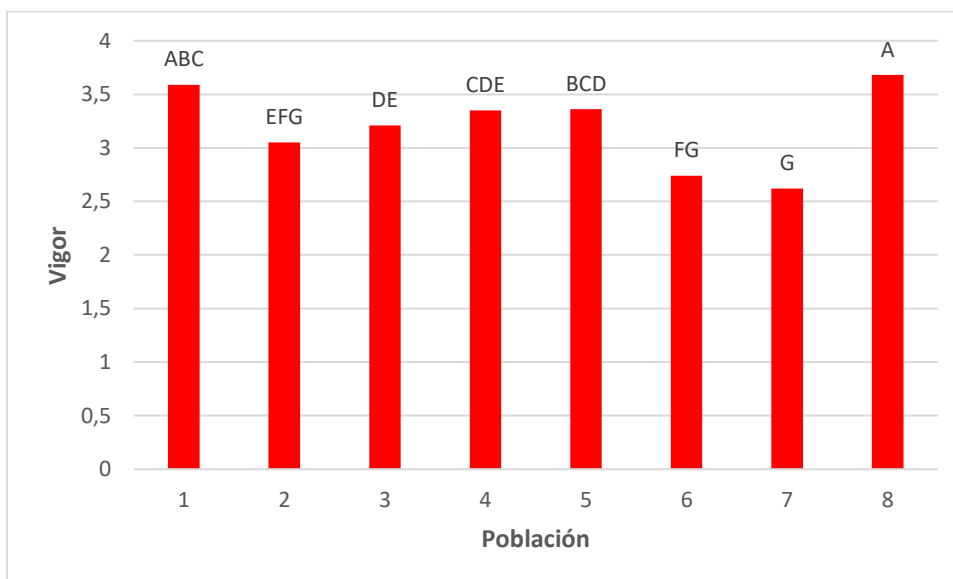


Gráfico 5. Vigor promedio que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco para la fecha observada (12/9/2022). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con diferencias de medias DGC.

5.1.3.2 Hábito de crecimiento

Para el caso de la variable hábito de crecimiento se puede observar que la población 2 presentó el mayor valor promedio, esto quiere decir que en dichas poblaciones la mayor cantidad de plantas tiene un hábito de crecimiento semi-erecto (2). Por su parte la población 8 presenta un peor valor promedio, resultante de que la mayor cantidad de plantas en dicha población tienen un hábito de crecimiento erecto (1) (Gráfico 6).

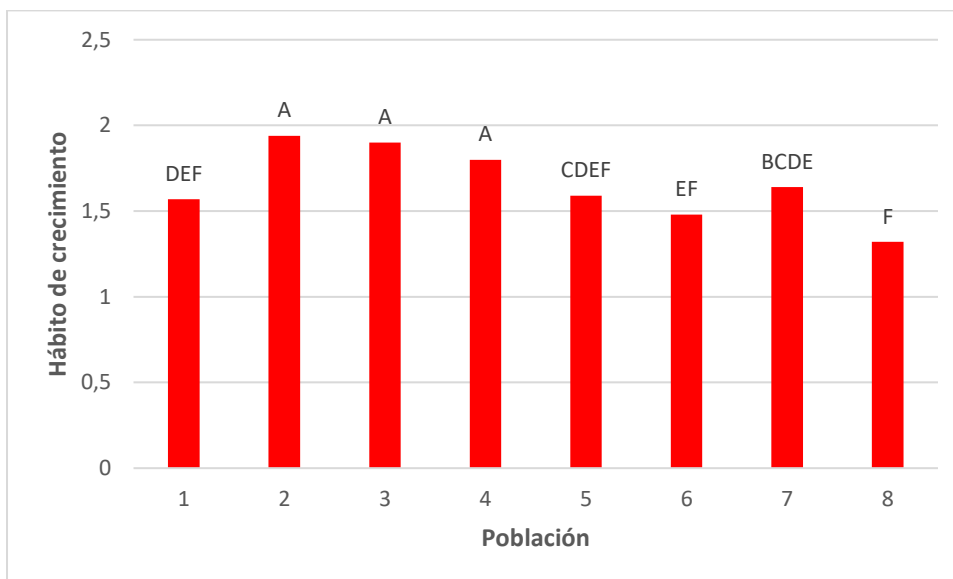


Gráfico 6. Valor promedio de hábito de crecimiento que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con diferencias de medias DGC.

5.2 Variables cuantitativas

5.2.1 Caracteres vegetativos

5.2.1.1 Estadística descriptiva

Los caracteres vegetativos evaluados durante este ensayo fueron altura de planta (cm) para 6 fechas diferentes, el diámetro de planta (cm) para 3 fechas diferentes, el peso verde (g) y peso seco (g). Se puede observar en el Cuadro 5, el comportamiento promedio en conjunto de las variables mencionadas, se analizó: media, desvío estándar, error experimental, coeficiente de variación, valor mínimo, valor máximo y valor de significancia. Para todos los caracteres evaluados se observa que existe diferencia significativa ($p\text{-valor} < 0,05$).

Cuadro 5. Comportamiento promedio en conjunto de las 720 plantas para los caracteres vegetativos mencionados en condición de planta aislada: media, desvío estándar (D.E.), coeficiente de variación (CV), mínimo (Mín), máximo (Máx) y valor de significancia (p-valor).

Variable	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	p-valor
ALTURA (cm) 12-7-22	2,81	1,55	55,22	0,5	11	<0,0001
ALTURA (cm) 29-8-22	8,93	4,1	45,89	0	21	<0,0001
ALTURA (cm) 12-9-22	8,49	4,08	48,13	0	24	<0,0001
ALTURA (cm) 17-10-22	15,04	7,39	49,17	0	35	<0,0001
ALTURA (cm) 31-10-22	8,96	4,03	44,96	0	21	<0,0001
ALTURA (cm) 14-11-22	11,72	4,95	42,28	0	24	<0,0001
DIÁMETRO (cm) 12-7-22	20,89	6,72	32,16	2,5	46,5	<0,0001
DIÁMETRO (cm) 29-8-22	29,45	10,8	36,66	0	64	<0,0001
DIÁMETRO (cm) 12-9-22	31,69	11,26	35,52	0	66,5	<0,0001
PESO VERDE (g)	205,11	156,52	76,31	0	1265	<0,0001
PESO SECO (g)	33,19	24,45	73,69	0	137,2	<0,0001

Referencias: Altura de planta (cm), diámetro de planta (cm), peso de materia verde (g) y peso de materia seca (g).

En el siguiente cuadro (Cuadro 6) se muestra el comportamiento promedio de las 720 plantas agrupadas por población para los caracteres vegetativos mencionados.

Cuadro 6. Medias aritméticas de las 720 plantas agrupadas por población para los caracteres vegetativos mencionados.

POB	ALT1 (cm)	ALT2 (cm)	ALT3 (cm)	ALT4 (cm)	ALT5 (cm)	ALT6 (cm)	DM1 (cm)	DM2 (cm)	DM3 (cm)	PV (g)	PS (g)
1	4,09	11,61	11,01	17,24	9,2	12,36	24,97	38,68	40,14	271,2	45,42
2	3,31	8,52	8,31	12,51	7,93	9,88	20,15	29,9	30,83	143,67	25,54
3	2,84	7,96	7,74	13,12	7,29	10,36	22,36	28,41	31,39	183,91	31,91
4	1,94	6,79	6,54	13,49	8,01	11,36	20,67	27,97	31,52	238,73	38,59
5	2,9	9,7	8,81	15,62	8,82	12,13	21,39	31,71	34,38	206,23	35,84
6	2,18	7,31	7,36	14,09	9,01	11,3	17,67	22,75	24,71	143,09	22,42
7	2,07	7,69	6,74	13,02	9,64	11,38	16,12	21,46	22,77	120,78	18,8
8	3,14	11,82	11,38	21,2	11,77	14,98	23,79	34,75	37,67	333,31	46,96

Referencias: **POB:** Población. **ALT1, ALT2, ALT3, ALT4, ALT5, ALT6:** Altura de cada planta para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta fecha de medición (cm). **DM1, DM2, DM3:** Diámetro de planta para la primera, segunda y tercera fecha de medición (cm). **PV:** Peso de la materia verde (g). **PS:** Peso de la materia seca (g).

5.2.2 Caracteres reproductivos

Los caracteres reproductivos evaluados durante el presente estudio fueron número de cabezuelas (cm) para 3 fechas diferentes, rendimiento (RTO) individual por planta (g) y peso de mil semillas (P1000) para cada planta individual (g). En el Cuadro 7, se presenta el comportamiento promedio de las variables mencionadas: media, desvío estándar, error experimental, coeficiente de variación, mínimo, máximo y valor de significancia. Para todos los caracteres evaluados se observa que existen diferencias significativas entre plantas (p -valor $<0,05$) a excepción del número de cabezuelas para la fecha de medición del 12-9-2022 (p -valor $>0,05$).

Cuadro 7. Comportamiento promedio en conjunto de las 720 plantas para los caracteres reproductivos mencionados en condición de planta aislada: media, desvío estándar (D.E.), coeficiente de variación (CV), mínimo (Mín), máximo (Máx) y valor de significancia (p-valor).

Variable	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	p-valor
NCBZ1 31-10-22	8,08	6,68	82,78	0	42	<0,0001
NCBZ2 14-11-22	34,73	21,02	60,55	0	124	<0,0001
NCBZ3 29-12-22	91,58	66,62	72,74	0	401	<0,0001
RTO (g)	2,19	1,99	91,08	0	14,22	<0,0001
P1000 (g)	0,56	0,15	27,56	0	1,13	0,0036

Referencias: **NCBZ 1 A 3:** Número de cabezuelas por planta individual en 3 fechas distintas. **RTO:** Rendimiento por planta individual (g). **P1000:** Peso de mil semillas por planta individual (g).

En el Cuadro 8 se muestra el comportamiento promedio por población.

Cuadro 8. Medias aritméticas de las 720 plantas agrupadas por población para los caracteres reproductivos mencionados.

POB	NCBZ1	NCBZ2	NCBZ3	RTO (g)	P1000 (g)
1	9,84	37,87	81,33	2,22	0,58
2	5,96	23,79	63,17	1,64	0,51
3	10,12	38,34	101,23	2,24	0,58
4	10,00	48,11	136,34	3,3	0,54
5	9,81	41,23	107,83	2,91	0,56
6	5,41	22,98	59,79	1,52	0,53
7	5,00	27,19	76,27	2,01	0,56
8	8,46	38,29	106,71	1,63	0,60

Referencias: **POB:** Población. **NCBZ1, NCBZ2, NCBZ3:** Número de cabezuelas de cada planta para la primera, segunda y tercera fecha de medición. **RTO:** Rendimiento por planta individual (g). **P1000:** Peso de mil semillas por planta individual (g).

5.2.3 Modelos lineales (ML) y generalizados (MLG)

Para el análisis de modelos lineales, mediante la función R, se analizaron 15 variables, 11 variables vegetativas y 4 reproductivas. Entre las variables vegetativas analizadas se encuentran: altura de planta (cm), diámetro de planta (cm), peso verde

(g) y peso seco (g). Dentro de las variables reproductivas se encuentran: número de cabezuelas y P1000 (g).

1. Altura de planta

Se graficó el comportamiento promedio en altura de las 8 poblaciones de trébol blanco en las 6 fechas observadas. La población 8 se diferenció significativamente del resto por presentar una altura promedio mayor, siguiéndole la población 1 y posteriormente la 5, por su parte las poblaciones 2, 3, 4, 6 y 7 fueron las que presentaron una altura promedio menor, no encontrándose diferencias significativas entre dichas poblaciones (Gráfico 7-A).

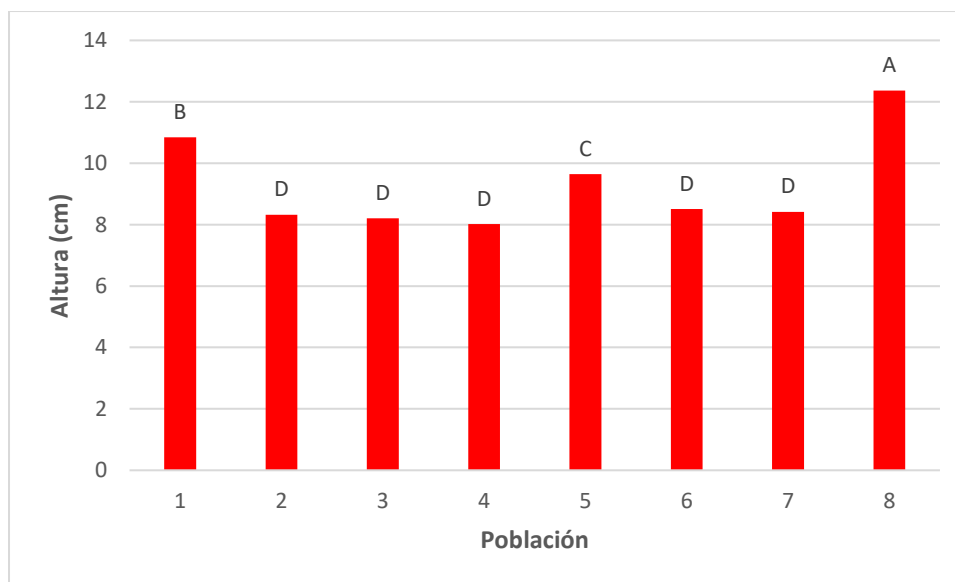


Gráfico 7-A. Valor promedio de altura de planta que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco en las 6 fechas observadas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con diferencias de medias DGC.

En el siguiente gráfico (Gráfico 7-B.) se observa la evolución promedio de altura de planta que tuvieron las 720 plantas en las fechas observadas.

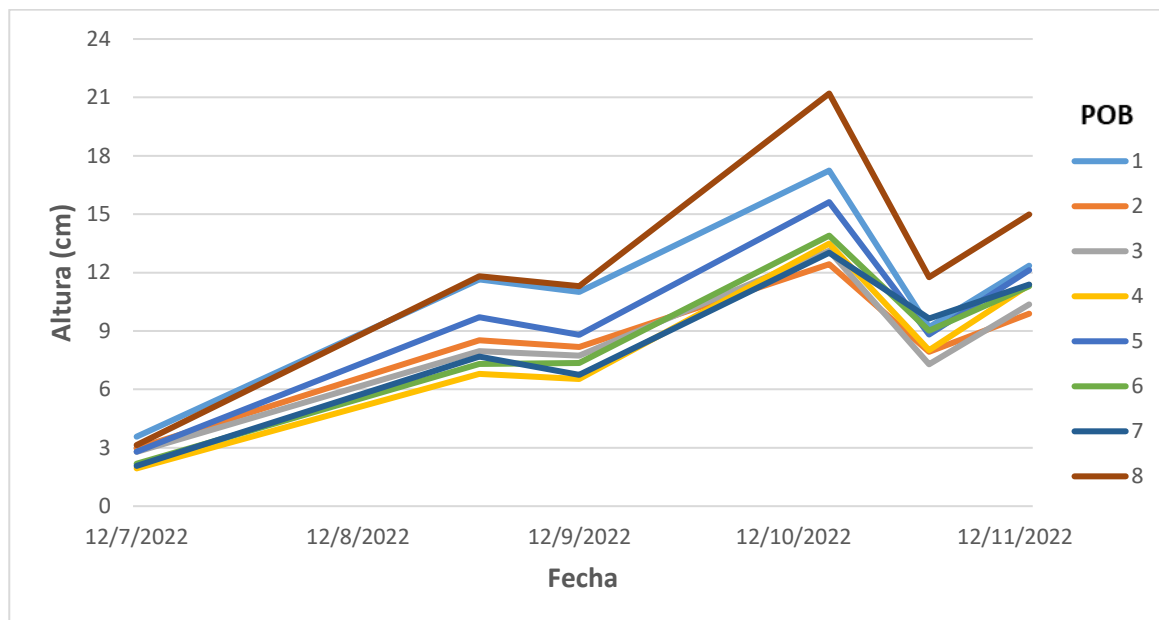


Gráfico 7-B. Evolución promedio de altura de planta que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco en las 6 fechas observadas.

A su vez, la variable altura es un buen indicador de la capacidad de rebrote que tuvieron las plantas. En el Gráfico 7-C., se puede ver que la población 8, luego del corte de forraje primaveral, tuvo una capacidad de rebrote superior al resto. Esto se puede deber a una mayor área fotosintética remanente luego del corte, favoreciendo la acumulación de biomasa más rápidamente.

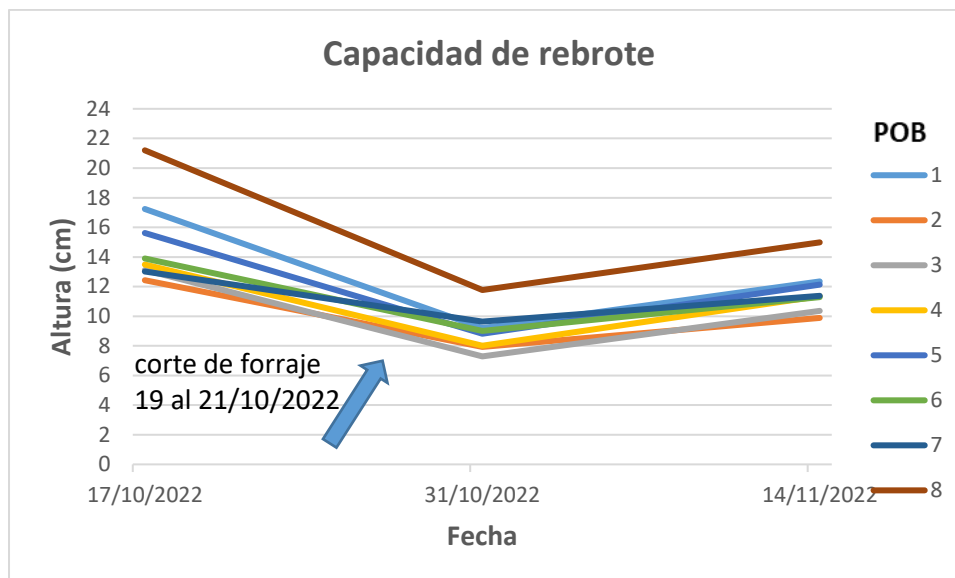


Gráfico 7-C. Capacidad de rebrote, luego del corte primaveral, que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco.

2. Diámetro de planta

Se graficó el crecimiento promedio del diámetro de planta de las 8 poblaciones en las 3 fechas observadas. La población 1 resultó tener un diámetro de planta promedio mayor, diferenciándose significativamente del resto. Por su parte, las poblaciones 6 y 7 obtuvieron el peor valor promedio de diámetro, sin encontrarse diferencias significativas entre ambas poblaciones (ver Gráfico 8-A).

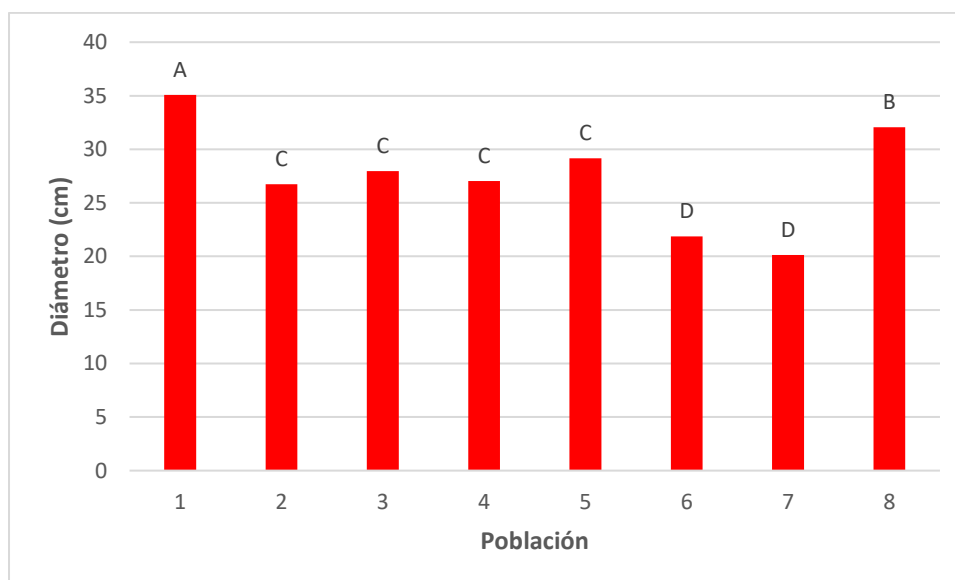


Gráfico 8-A. Valor promedio de diámetro de planta que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco en las 3 fechas observadas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con diferencias de medias DGC.

En el siguiente gráfico (Gráfico 8-B.) se observa la evolución promedio de diámetro de planta que tuvieron las 720 plantas en las fechas observadas.

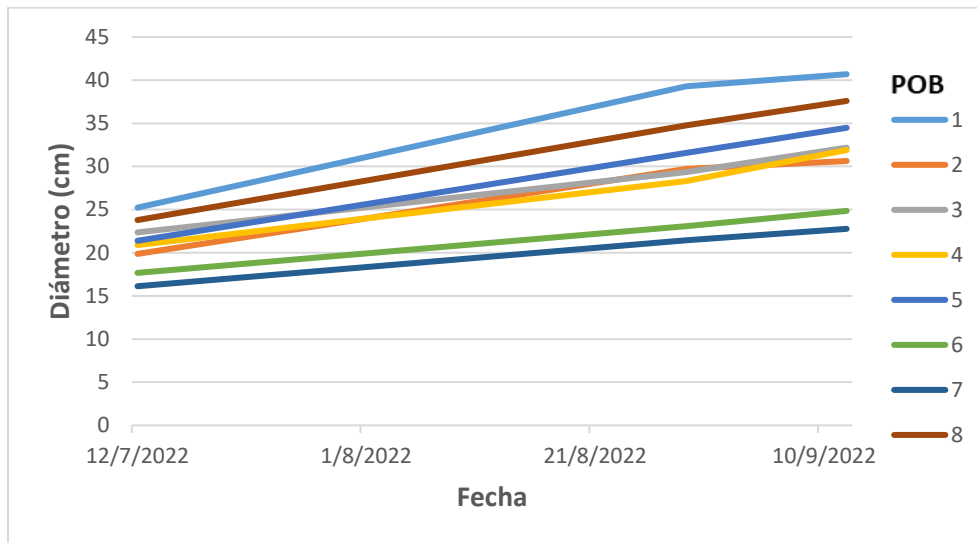


Gráfico 8-B. Evolución promedio de diámetro de planta que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco en las 3 fechas observadas.

3. Peso verde

Se analizó el peso de materia verde (g) que alcanzaron las 8 poblaciones luego de efectuado el corte de biomasa de cada planta. La población 8 fue la que presentó un mayor peso verde promedio, diferenciándose significativamente del resto de las poblaciones. Por su parte, las que peor comportamiento presentaron fueron las poblaciones 2, 6 y 7, sin encontrarse diferencias significativas entre dichas poblaciones (Gráfico 9).

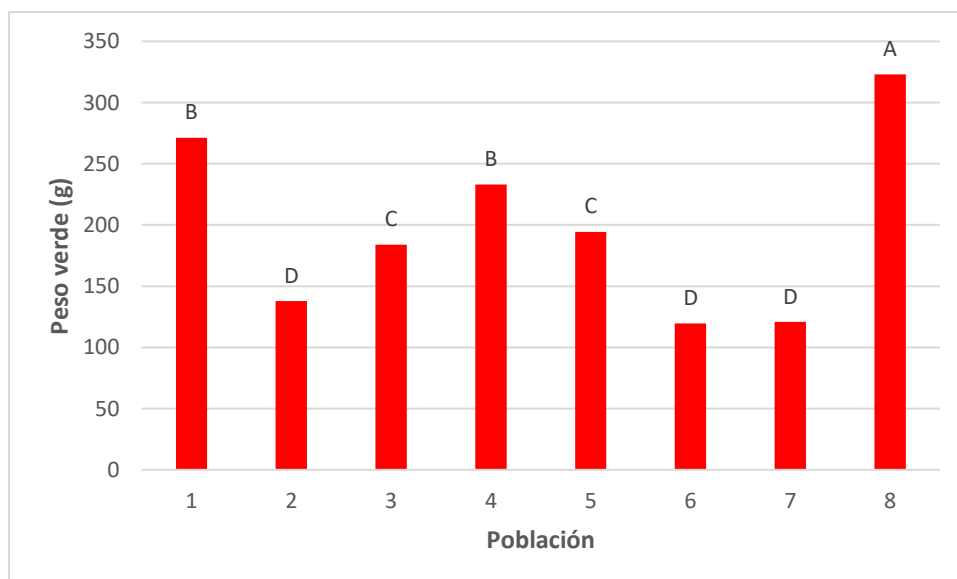


Gráfico 9. Valor promedio de peso verde (g) en las 8 poblaciones de trébol blanco evaluadas en Las Magnolias. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con diferencias de medias DGC.

4. Peso seco

El peso de materia seca promedio (g) que presentaron las 8 poblaciones luego de efectuado el corte de biomasa de cada planta, mostró que las poblaciones 1 y 8 fueron las de mayor peso seco promedio, diferenciándose significativamente del resto. Por su parte, al igual que el peso verde, las poblaciones 2, 6 y 7 fueron las que presentaron el peor valor promedio de peso seco, sin encontrarse diferencias significativas entre dichas poblaciones (Gráfico 10).

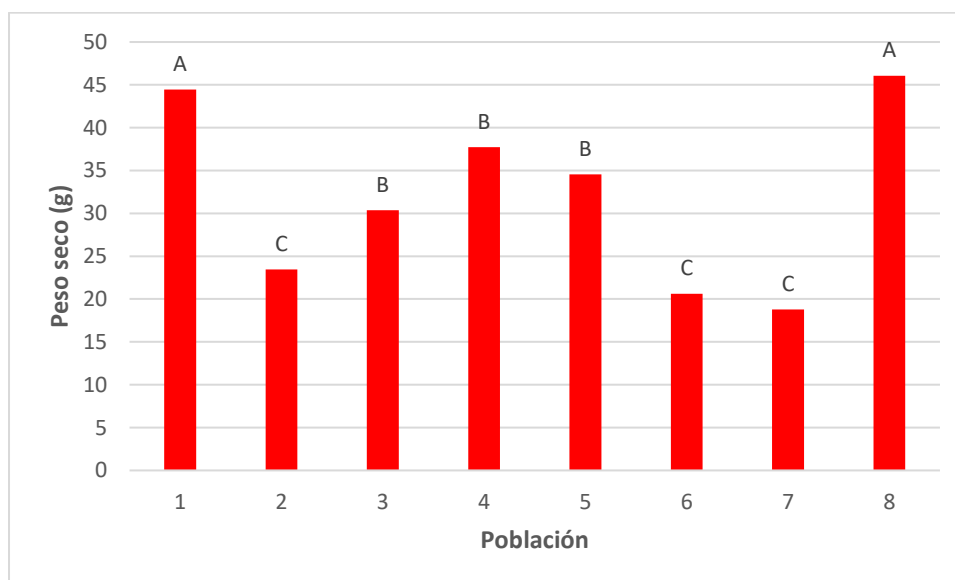


Gráfico 10. Valor promedio de peso seco (g) de las 8 poblaciones de trébol blanco evaluadas en Las Magnolias. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con diferencias de medias DGC.

5. Número de cabezuelas

Se analizó el comportamiento promedio de las 8 poblaciones de trébol blanco en las 3 fechas observadas, arrojando los siguientes resultados: La población 4 se destacó por presentar un mayor número de cabezuelas promedio por planta, diferenciándose significativamente del resto. Por su parte, las poblaciones 2, 6 y 7 arrojaron el menor número de cabezuelas promedio por planta, sin encontrarse diferencias significativas entre las poblaciones mencionadas (Gráfico 11-A).

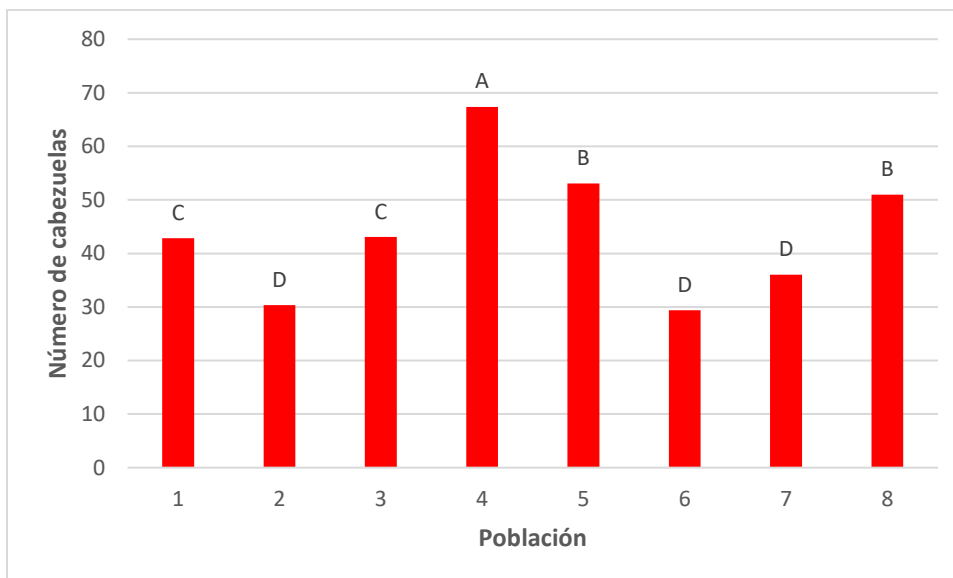


Gráfico 8-A. Valor promedio de número de cabezuelas que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco en las 3 fechas observadas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con diferencias de medias DGC.

En el siguiente gráfico (Gráfico 11-B.) se observa la evolución promedio de número de cabezuelas por planta que tuvieron las 720 plantas en las fechas observadas.

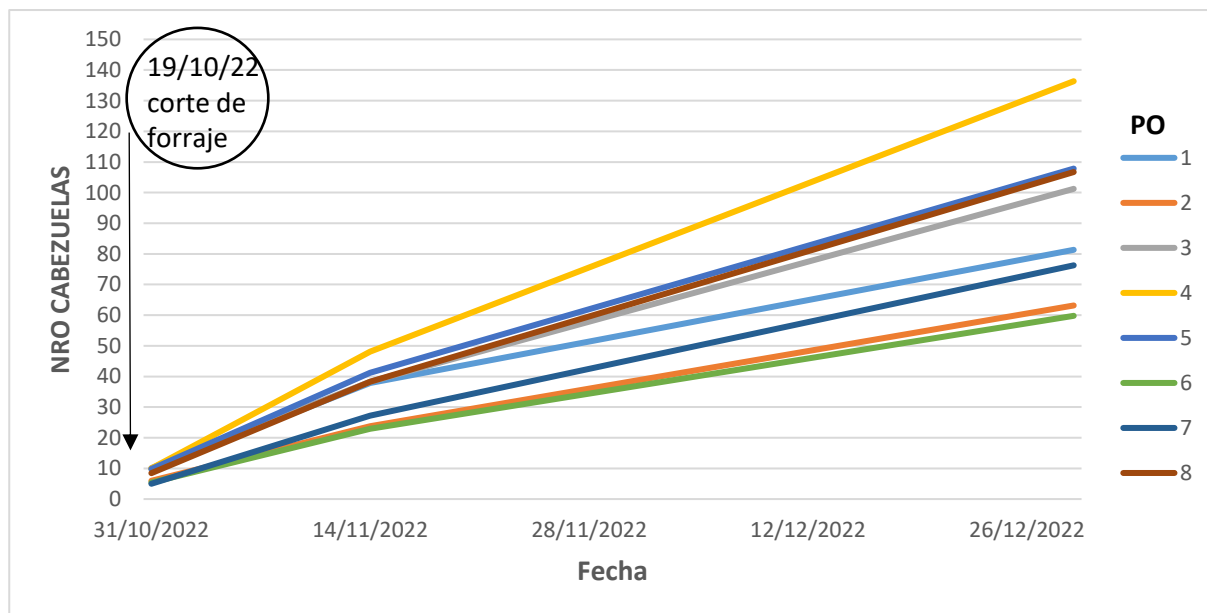


Gráfico 11. Evolución promedio de número de cabezuelas por planta que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco en las 3 fechas observadas.

La variable número de cabezuelas es un buen indicador de precocidad reproductiva, es decir, la capacidad de una planta para alcanzar la madurez sexual y producir semillas o esporas a una edad temprana en su ciclo de vida. En el Gráfico 11, se ve la formación de 4 grupos: uno precoz (población 4), otro intermedio (población 5, 8 y 3), otro tardío (población 1 y 7) y otro muy tardío (población 2 y 6).

6. Peso de mil semillas

El peso promedio de 1000 semillas (g) discriminó entre poblaciones. Las poblaciones 1, 3, 7 y 8 presentaron el mayor valor promedio, diferenciándose significativamente del resto. Las poblaciones 4 y 5 fueron intermedias; y las poblaciones 2 y 6 obtuvieron el menor peso sin encontrarse diferencias significativas entre ambas (Gráfico 12).

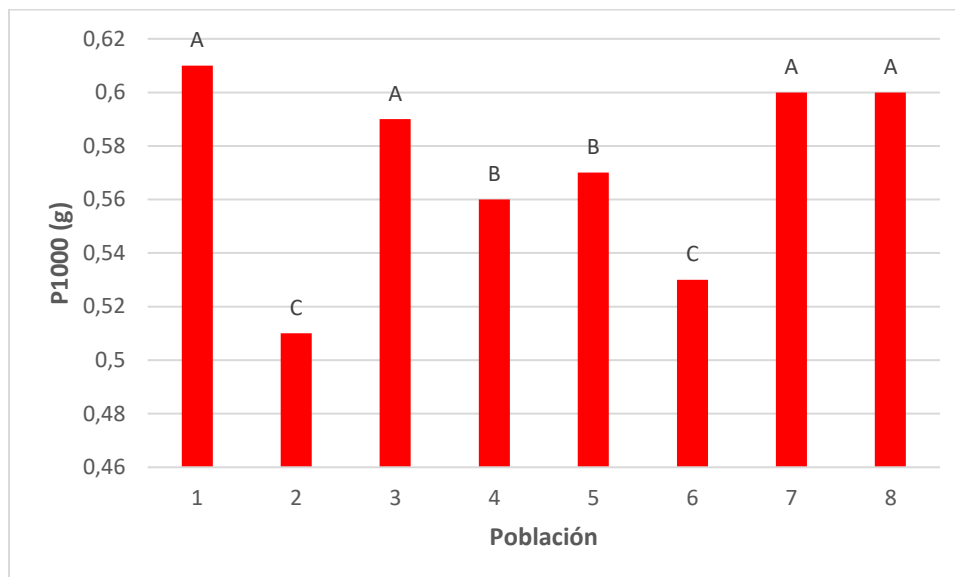


Gráfico 12. Valor promedio de peso de mil semillas/planta que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con diferencias de medias DGC.

7. Rendimiento

Para el análisis de modelos lineales generalizados, mediante la función R, se analizó la variable reproductiva de rendimiento (RTO). En este caso se analizó el comportamiento promedio del peso total (en gramos) que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco. Las poblaciones 4 y 5 se destacaron del resto por presentar un rendimiento promedio mayor, encontrándose diferencias significativas con el resto de las poblaciones. Por otro lado, las poblaciones 2, 6 y 8 fueron la que

presentaron un menor rendimiento promedio, sin encontrarse diferencias significativas entre las poblaciones mencionadas (Gráfico 13).

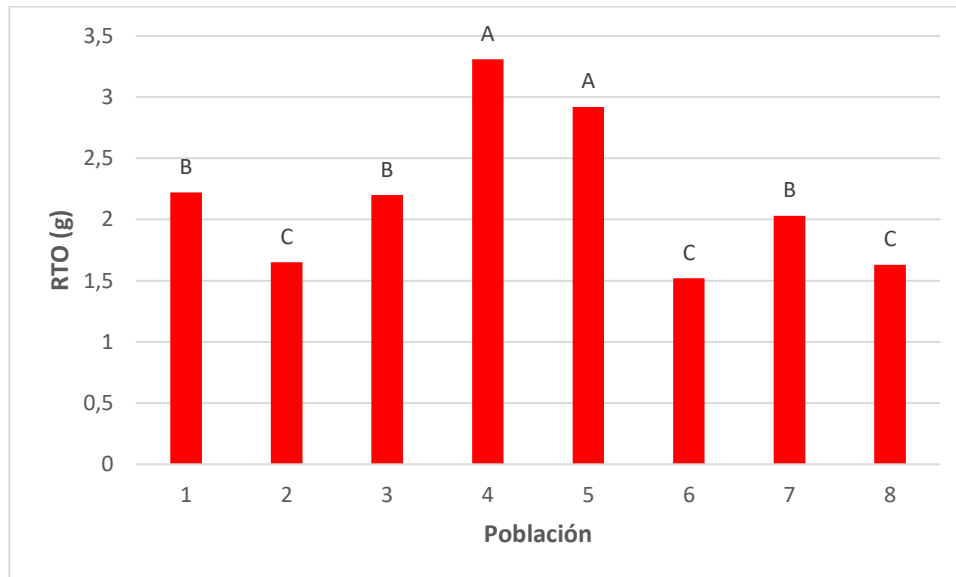


Gráfico 13. Valor promedio de rendimiento que presentaron las 8 poblaciones de trébol blanco. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con diferencias de medias DGC.

5.2.4 Análisis multivariados. Componentes principales

Para este análisis se consideraron un total de 16 variables cuantitativas. Entre dichas variables se encuentran: altura de planta (cm) para las seis fechas observadas, diámetro de planta (cm) para las tres fechas observadas, peso verde (g), peso seco (g), número de cabezuelas para las tres fechas observadas, rendimiento (g) y peso de mil semillas (g). En el Cuadro 9 se puede observar que en los dos primeros componentes principales (Lambda 2) producen una muy buena síntesis de los datos, dado que explicaron el 83% de la variabilidad total del germoplasma de trébol blanco evaluado.

Cuadro 9. Autovalores de la matriz de correlación, su proporción que explica cada autovalor y su proporción acumulada.

Lambda	Autovalor	Proporción	Prop Acum
1	9,6	0,6	0,6
2	3,65	0,23	0,83
3	1,96	0,12	0,95
4	0,45	0,03	0,98
5	0,25	0,02	0,99
6	0,05	3,40E-03	1

Además, a través de los autovectores, se observó que al construir la componente principal 1 (e1) ésta explica el 60% de la variabilidad mientras que la componente principal 2 (e2) explica el 23% de la variabilidad (Gráfico 14). Con respecto a la componente principal 1, las variables que explicaron principalmente su variabilidad fueron peso verde, peso seco, diámetro de planta en las tres fechas de medición y altura de planta en la segunda, tercera y cuarta fecha de medición. Con respecto a la componente principal 2, las variables que más explicaron su variabilidad fueron el rendimiento y el número de cabezuelas en las tres fechas de medición (Cuadro 10), siendo éstas últimas componentes del rendimiento de semilla.

Cuadro 10. Autovectores (e) correspondientes a la CP1 (e1) y la CP2 (e2) para las variables analizadas.

Variables	e1	e2
A1	0,21	-0,19
A2	0,28	-0,23
A3	0,28	-0,24
A4	0,28	-0,19
A5	0,16	-0,31
A6	0,25	-0,15
D1	0,3	0,06
D2	0,29	-0,02
D3	0,3	0,04
NC1	0,22	0,35
NC2	0,2	0,4
NC3	0,15	0,41
PV	0,31	3,00E-02
PS	0,31	0,1
RTO	0,05	0,48
P1000 (g)	0,24	-1,50E-04

Correlación cofenética= 0,967

Referencias: **A1, A2, A3, A4, A5 y A6:** altura de planta (cm) en la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta fecha de medición. **D1, D2 y D3:** diámetro de planta en la primera, segunda y tercera fecha de medición. **NC1, NC2 y NC3:** número de cabezuelas por planta en la primera, segunda y tercera fecha de medición. **PV:** peso de la materia verde. **PS:** peso de la materia seca. **RTO:** rendimiento total por planta. **P1000:** peso de mil semillas.

En el gráfico de análisis de componentes principales (Gráfico 14) se observó, por un lado, las asociaciones entre los caracteres evaluados, con correlaciones positivas entre:

- Rendimiento y número cabezuelas (primer, segundo y tercer recuento).
- Diámetro de planta (primera, segunda y tercera fecha de medición), peso seco, peso fresco y peso de mil semillas.
- Altura de planta (primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta fecha de medición).

En cuanto al comportamiento de las 8 poblaciones de trébol blanco, las poblaciones 1 y 8 fueron las de mayor producción de materia seca en contraste con las poblaciones 2, 6 y 7 que fueron las de menor producción. La población 5 tuvo un comportamiento intermedio respecto a la producción de materia seca y al número cabezuelas por planta. Las poblaciones 3 y 4, por su parte, tuvieron un buen comportamiento en cuanto al rendimiento total de semilla por planta, pero menor comportamiento para las demás variables analizadas.

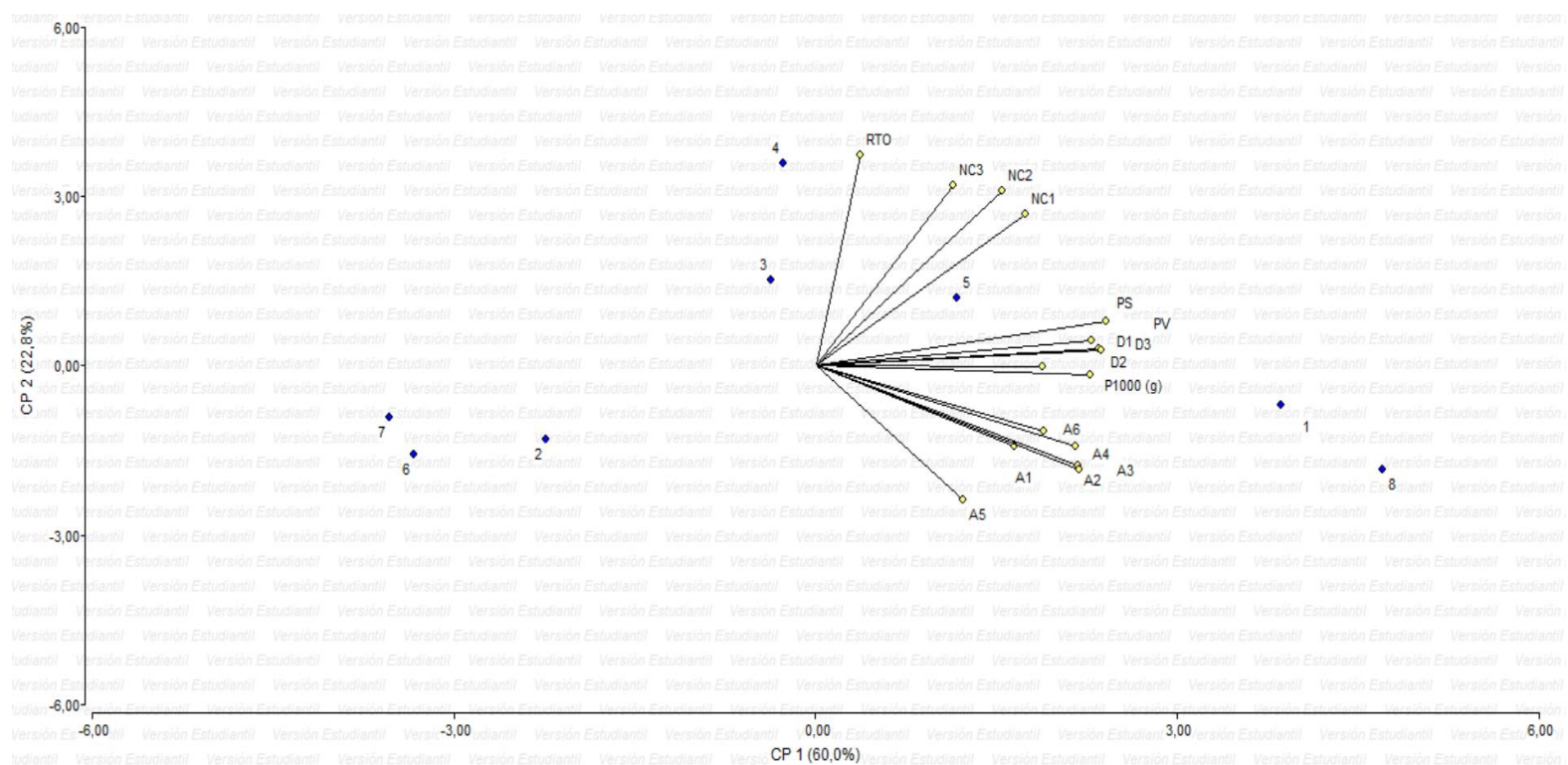


Gráfico 14. Análisis de componentes principales para 7 variables analizadas en trébol blanco en Las Magnolias, Junín, 2022.

5.2.5 Análisis multivariados. Clúster jerárquico

Se realizó un clúster, estandarizando los datos y utilizando distancia Euclídea. En dicho análisis, haciendo un corte arbitrario al 50% de la distancia planteada (3,84), se observa la formación de cinco grupos (Gráfico 15). Estos grupos están conformados por:

- Grupo 1: Poblaciones 3, 4 y 5.
- Grupo 2: Poblaciones 6 y 7.
- Grupo 3: Población 2.
- Grupo 4: Población 8.
- Grupo 5: Población 1.

En el grupo se 2 se encuentran las poblaciones que son las más parecidas entre sí, porque fueron las primeras que se unieron.

A un 75% de la distancia planteada (5,76), se observa la formación de tres subgrupos bien definidos.

- Subgrupo 1: 3, 4 y 5.
- Subgrupo 2: 2, 6 y 7.
- **Subgrupo 3: 1 y 8.**

El subgrupo 3 se destaca del resto por contener a las poblaciones más rendidoras en cuanto a materia seca.

El subgrupo 1 se destaca por contener a las poblaciones con mayor número de cabezuelas, que se condice con un mayor rendimiento total.

El subgrupo 2 contiene a las poblaciones que peor se comportaron, de forma general, para todas las variables analizadas.

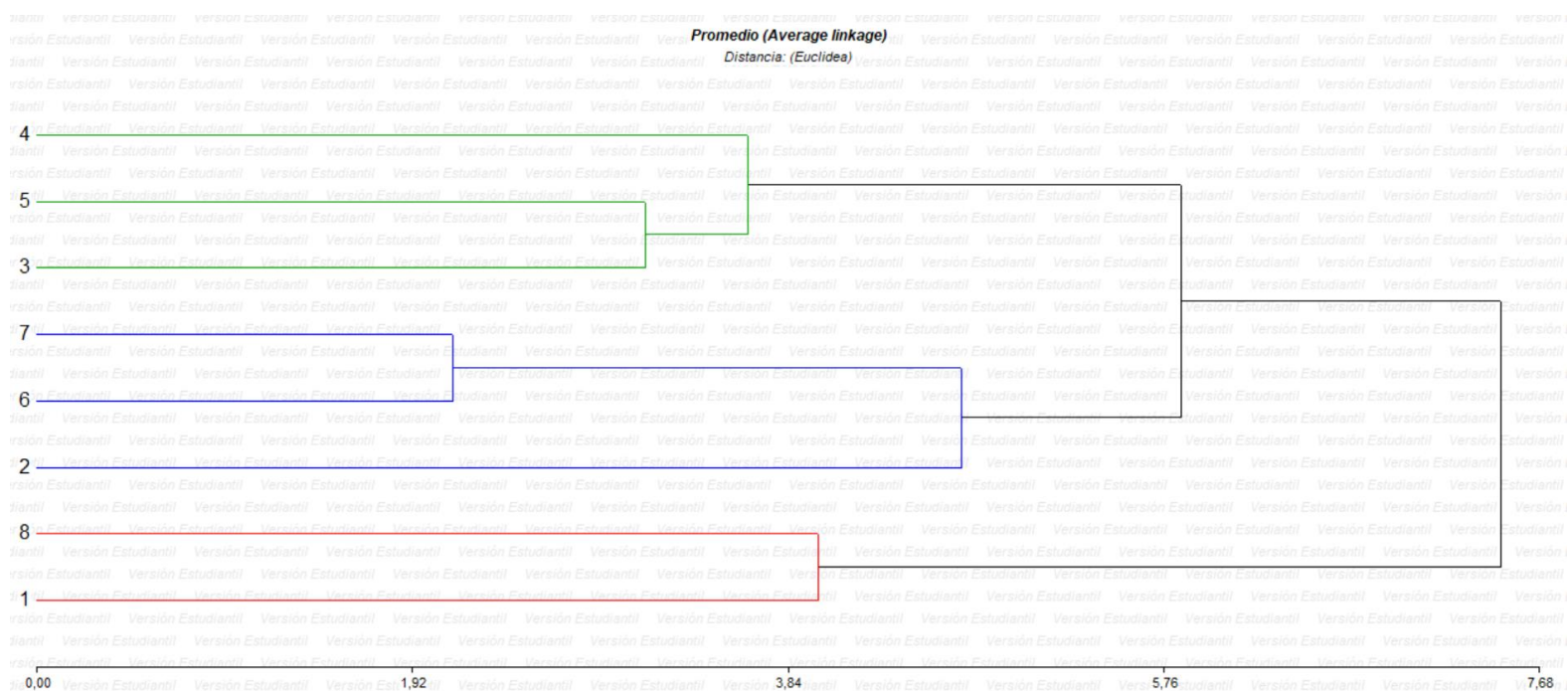


Gráfico 15. Análisis clúster mediante el método de Promedio (Average linkage) para las 9 variables analizadas en trébol blanco en Las Magnolias, Junín, 2022.

5.2.6 Estimación de parámetros genéticos

En el Cuadro 11 se presentan los componentes estimados de la Varianza (varianza genética, varianza ambiental y varianza fenotípica) y heredabilidad en sentido amplio para todas las variables medidas (20) con sus respectivas fechas de medición (ver Anexo I).

La heredabilidad en sentido amplio osciló, según lo estimado a partir de la fórmula mencionada anteriormente, entre 0,455 y 0,92 según el carácter analizado.

Cuadro 11. Estimaciones de Varianza genética (Vg), Varianza ambiental (Vamb), Varianza fenotípica (Vf) y Heredabilidad en sentido amplio (H²).

Variable	Vg	Vamb	Vf	H ²
ALT1	15,34	1,81	17,15	0,894
ALT2	107,15	12,93	120,08	0,892
ALT3	96,38	13,08	109,46	0,881
ALT4	244,41	45,89	290,30	0,842
ALT5	51,69	14,3	65,99	0,783
ALT6	64,94	22,09	87,03	0,746
VIG1	4,60	0,46	5,06	0,909
VIG2	8,04	0,76	8,80	0,914
VIG3	4,00	0,7	4,70	0,851
DIAM1	251,20	32,96	284,16	0,884
DIAM2	958,97	88,6	1.047,57	0,915
DIAM3	1.016,47	88,42	1.104,89	0,920
HAB	1,15	0,65	1,80	0,640
NCBZ1	138,06	38,79	176,85	0,781
NCBZ2	2.326,89	368,57	2.695,46	0,863
NCBZ3	19.061,78	3855,85	22.917,63	0,832
PV	152.823,85	18755,71	171.579,56	0,891
PS	3.092,48	479,69	3.572,17	0,866
RTO	10,98	3,64	14,62	0,751
P1000	0,016	0,02	0,036	0,455

Referencias: ALT1, ALT2, ALT3, ALT4, ALT5 y ALT6: altura de planta en la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta y sexta fecha de medición. VIG1, VIG2 y VIG3: vigor de planta en la primera, segunda y tercera fecha de medición. DIAM1, DIAM2 y DIAM3: diámetro de planta en la primera, segunda y tercera fecha de medición. HAB: hábito de crecimiento. NCBZ1, NCBZ2 y NCBZ3: número de cabezuelas por planta en la primera, segunda y tercera fecha de medición. PV: peso de la materia verde. PS: peso de la materia seca. RTO: rendimiento total por planta. P1000: peso de mil semillas.

En general todas las variables mostraron valores elevados de heredabilidad en sentido amplio (Cuadro 11). Las variables VIG1, VIG2, DIAM2 y DIAM3 presentaron los valores más altos de heredabilidad (H²≥0,90).

Las variables ALT1, ALT2, ALT3, ALT4, VIG3, DIAM1, NCBZ2, NCBZ3, PV y PS presentaron un valor de heredabilidad media ($H^2 < 0,90 \geq 0,80$).

Por último, las variables ALT5, ALT6, HAB, NCBZ1, RTO y P1000 presentaron el menor valor de heredabilidad ($H^2 < 0,80$)

6. DISCUSIÓN

El mejoramiento genético de cualquier especie forrajera requiere de la presencia de variabilidad genética en caracteres productivos que permita la selección y generación de nuevos cultivares. La colecta y caracterización fenotípica y genotípica de las ocho poblaciones de trébol blanco, constituyó el principal objetivo de la presente tesis, con el propósito de detectar la existencia de variabilidad genética.

Recolección de germoplasma y adaptación de las poblaciones

La recolección de germoplasma es una de las primeras etapas a realizar en la definición de un nuevo programa de mejoramiento genético de cualquier especie forrajera, debido a que se requiere de poblaciones adaptadas a diversos ambientes y altamente variables genéticamente, para realizar selección y generar nuevos cultivares (Abberton y Thomas, 2011).

En el presente estudio la recolección de plantas se realizó en ambientes de pasturas de trébol blanco bajo pastoreo y caracterizados por la presencia de estrés por sequía y salinidad, en el noroeste bonaerense (Lapalma *et al.* 2022c). Las poblaciones se delimitaron por la elevada frecuencia de genotipos dentro de cada ambiente y la colecta de cada genotipo se realizó considerando una distancia mínima de 5 metros, para evitar duplicación de genotipos.

Según algunos investigadores y botánicos, el trébol blanco se habría adaptado a diversos ambientes argentinos tras su introducción hace más de cien años (Serrano, 1953) a través de un proceso de selección natural, que permitió el desarrollo de poblaciones naturalizadas caracterizadas por cambios fenotípicos como respuestas a los efectos ambientales (Helgadóttir *et al.*, 2001).

Una población se define como un grupo de individuos, miembros de la misma especie, que están asociados geográficamente y constituye una unidad de evolución. Un fenómeno que afecta marcadamente la evolución de las poblaciones es la selección natural, lo que implica que los alelos que promueven mayor aptitud

tienden a aumentar su frecuencia de una generación a la otra, y el resultado final es que la población está cada vez más adaptada al medio, porque se va enriqueciendo con los mejores genotipos (Fontdevila y Moya, 2000).

La diferenciación poblacional detectada entre las ocho poblaciones estudiadas, pudo ser el producto de una posible adaptación a las condiciones ambientales predominantes en los ambientes de recolección, considerando especialmente los efectos producidos por los estreses abióticos como el pastoreo, la salinidad del suelo, la competencia con otras especies, el estrés por sequía y altas temperaturas, que limitan la expansión de la especie.

En el presente estudio algunas respuestas de las poblaciones pudieron ser consecuencia de procesos de selección y adaptación a condiciones específicas de cada lugar de colecta, junto al sistema reproductivo alógamo de la especie, su nivel de ploidía, y mecanismos de recombinación génica (Bradshaw, 1965; Briggs y Walters, 1984; Tanksley y Mc Couch, 1997; Andrés, 2014). Adicionalmente la propagación tanto a través de semillas como de estolones de la especie, podría haber permitido una rápida colonización en cada ambiente y las raíces adventicias de carácter estolonífero, pudieron contribuir a la persistencia de los individuos en el suelo. Por lo tanto, la recolección de plantas en estado vegetativo, tuvo como propósito identificar genotipos adaptados a las condiciones de estrés provocadas por la sequía, altas temperaturas y el pastoreo.

Variabilidad genética entre las poblaciones

El presente estudio determinó una importante variabilidad fenotípica y genotípica entre las ocho poblaciones en la mayoría de los caracteres evaluados.

La variación genética puede ocurrir en caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y/o moleculares, en cualquier etapa del ciclo de vida de un individuo (Primack y Kang, 1989). Desde el punto de vista genético, existen numerosos autores que han demostrado la existencia de variabilidad genética para la tolerancia

a diversos estreses (White *et al.*, 1992; White *et al.*, 1993; Carrow, 1996; Huang y Fry, 1998; Huang *et al.*, 1998; Huang y Gao, 2000; Lopes da Silva Santos Simões, 2015) y un componente genético altamente heredable (Hunt, 1965).

Se determinó una importante variabilidad fenotípica y genotípica entre las ocho poblaciones sobre un total de 20 caracteres evaluados. Si bien las poblaciones fueron recolectadas a una distancia mínima de 30 km entre ellas, la confirmación de una marcada diferenciación podría implicar escaso intercambio genético entre las mismas, y asumir que efectivamente constituían poblaciones aisladas geográficamente.

Numerosos autores han reportado amplias variaciones genéticas en trébol blanco, tanto dentro, como entre poblaciones; siendo la variación dentro de la población la más amplia ya que es una especie de polinización cruzada, con un número cromosómico de $2n = 4x = 32$, de naturaleza alotetraploide, con herencia disómica (Voisey *et al.*, 1994) y su mecanismo de autoincompatibilidad gametofítica es responsable de una muy baja autofecundación (Leitch y Bennet, 2004; Randazzo *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en la presente tesis son coincidentes con otras investigaciones de variabilidad enfocados hacia el mejoramiento de la especie. En Australia, el mejoramiento genético de trébol blanco se ha sustentado en la evaluación agronómica a campo (Caradus y Woodfield 1996), y posterior detección de poblaciones y ecotipos de interés agronómico. En Argentina, estudios similares de caracterizaron agronómica en 53 poblaciones naturalizadas de trébol provenientes de campos bajo pastoreo, determinaron diferencias fenotípicas y genéticas en largo de peciolo, ancho y largo de folíolo central, relación largo y ancho, altura, habito de crecimiento, marcadores foliares, densidad y grosor de estolones, días a floración, cianogénesis, rendimiento de semillas y rendimiento de forraje invernal. Estas diferencias entre poblaciones estuvieron asociadas a diferencias agroecológicas (Rosso *et al.*, 1997). En particular aquellas poblaciones provenientes de campos pastoreados tuvieron habito postrado y menor altura de canopeo comparadas con aquellas provenientes de sitios no pastoreados (Rosso

2001). Otros estudios han permitido clasificar las poblaciones de acuerdo a su morfología, específicamente el tamaño del folíolo ha permitido diferenciar distintos tipos denominados: pequeño, intermedio, grande y gigante o ladino (Randazzo 2013).

En el caso de los caracteres vegetativos investigados, como vigor de crecimiento inicial, hábito de crecimiento, altura de planta y diámetro de planta registrados en diferentes momentos del crecimiento del cultivo, al igual que el peso fresco y seco primaveral, evidenciaron diferencias significativas entre las poblaciones, destacándose las poblaciones 1 y 8 por mayor crecimiento, y consistencia en el tiempo. Por ejemplo, la altura de planta en seis fechas reflejó la capacidad de crecimiento de las distintas poblaciones; en el caso de la población 8 se diferenció significativamente del resto por presentar una altura promedio mayor en la mayoría de las fechas, siguiéndole la población 1 y posteriormente la 5. Luego del corte primaveral las poblaciones 8, 6, 4 y 1, fueron las que evidenciaron una capacidad de rebrote superior al resto. Esto fue coincidente con el crecimiento y producción de biomasa aérea primaveral. Las poblaciones de menor crecimiento fueron 2, 6 y 7. Las diferencias fueron consistentes en el peso seco por planta y población. Algunas investigaciones han demostrado que las adaptaciones morfológicas y fisiológicas de algunos caracteres vegetativos, como el tamaño del estolón, el número de puntos de crecimiento, el tamaño de las hojas, la longitud de los peciolo y el área foliar, fueron asociadas al origen del germoplasma (Collins *et al.*, 1991; Helgadóttir *et al.*, 2001). Por lo tanto, el mayor crecimiento de las poblaciones 8, 1 y 4, pudo deberse a un proceso de adaptación morfofisiológica particular (Harris *et al.* 1983; Collins *et al.* 1991), asociada al rebrote del trébol en primavera y a una mayor intercepción de radiación solar por parte de las hojas (Wachendorf *et al.*, 2001).

En el caso de los caracteres reproductivos estudiados, tuvieron como finalidad diferenciar poblaciones con mayor y menor rendimiento de semillas. El recuento de cabezuelas realizado a lo largo de diferentes fechas durante el experimento, fue indicador de la evolución de la floración. Se diferenció significativamente la población

4 por producir un mayor número de cabezuelas promedio por planta, diferenciándose del resto. Por su parte, las poblaciones 2, 6 y 7 arrojaron el menor número de cabezuelas promedio por planta. Luego del corte primaveral se diferenciaron las poblaciones en la velocidad de floración dada por las pendientes de las distintas curvas. Las poblaciones 4, 5 y 1 fueron las que lograron el mayor rendimiento de semillas (peso total de semillas). El rendimiento de semillas es uno de los aspectos más importantes en la selección de especies forrajeras, ya que es imprescindible para el éxito en la difusión de un nuevo cultivar. Diversos autores (Pagano y Rimieri, 2005; Andrés, 2014) indican que existe una considerable fluctuación en el rendimiento de semilla de especies forrajeras templadas, atribuible a condiciones climáticas variables durante período crítico de desarrollo reproductivo, y señalan que para aumentar los rendimientos se puede seleccionar por precocidad, adaptación al fotoperiodo, resistencia al frío, vigor de plántula, entre otros.

Al relacionar las variables vegetativas con las reproductivas, el análisis de componentes principales demostró correlaciones positivas entre el rendimiento de semillas y el número cabezuelas; el diámetro de planta en las diferentes fechas de medición se asoció positivamente con el peso seco, el peso fresco y el peso de mil semillas. Las poblaciones 1 y 8 fueron las de mayor producción de materia seca en contraste con las poblaciones 2, 6 y 7 que fueron las de menor producción. La población 5 tuvo un comportamiento intermedio respecto a la producción de materia seca y al número cabezuelas por planta. Las poblaciones 3 y 4, por su parte, tuvieron un buen comportamiento en cuanto al rendimiento total de semilla por planta. Por lo general la selección conjunta de caracteres vegetativos y reproductivos es un desafío, ya que son antagónicos, suelen no estar correlacionados genéticamente y hay un efecto de compensación (Acuña, 2008; Amorena, 2014).

El análisis de componentes principales y el de conglomerados mostraron tres grupos de poblaciones bien definidos. El primer grupo conformado por las poblaciones 3, 4 y 5, el segundo grupo formado por las poblaciones 2, 6 y 7, y un tercer grupo integrado por las poblaciones 1 y 8. El primer grupo se caracterizó por contener las poblaciones con mayor número de cabezuelas y mayor rendimiento total. El segundo grupo se caracterizó por reunir las poblaciones que menor

performance mostraron para todas las variables. El tercer grupo se destacó del resto por contener a las poblaciones más rendidoras en producción de biomasa aérea. Estos resultados, indicarían que si el objetivo de selección a nivel poblacional fuera obtener cultivares de mayor producción de forraje y elevada producción de semillas las poblaciones 1, 3, 4 y 8 serían promisorias para incorporar en el germoplasma base del programa de mejoramiento; adicionalmente estas poblaciones podrían aportar genes para el desarrollo de cultivares tolerantes a elevadas temperaturas.

Heredabilidad en sentido amplio

El grado de determinación genética (GDG), o heredabilidad en sentido amplio, es la proporción de variancia fenotípica del germoplasma causada por los factores genéticos (aditivos, dominancia e interacciones epistáticas) (Dudley y Moll, 1969). Se considera heredabilidad alta cuando es superior al 80%, moderadamente alta cuando varía entre 60-80%, heredabilidad media cuando se encuentra entre 40-60% y baja cuando es menor al 40% (Falconer y Mackay, 1996).

En general las heredabilidades de los caracteres estudiados fueron elevadas, y oscilaron entre 0,45 y 0,92 según el carácter considerado. Los valores más elevados fueron para las variables de vigor, altura de planta, diámetro de planta, número de cabezuelas, peso verde y peso seco. La heredabilidades más bajas fueron para el rendimiento de semillas y el peso de mil semillas. Estos elevados valores de heredabilidad, indicarían que existe una alta posibilidad de realizar selección para dichos caracteres.

Los caracteres cuantitativos pueden estar muy influenciados por el ambiente y consecuentemente tener bajas heredabilidades, en particular el rendimiento de forraje es un carácter cuantitativo complejo y de bajo control genético (Schiller y Lazenby, 1975, Fribourg *et al.*, 2009). Sin embargo, en el presente estudio el valor de ambos pesos seco y fresco fueron medios a elevados.

Estas estimaciones de heredabilidades permitirían definir cuáles serían las poblaciones que podrían aportar a la selección para diseñar un programa de

mejoramiento eficaz que maximice la mejora genética (Kearsey y Pooni 1996; Hallauer *et al.*, 2010) acorde al carácter analizado.

7. CONCLUSIONES

La caracterización agronómica de las 8 poblaciones de trébol blanco recolectadas en diferentes ambientes de uso de la región norte de la provincia de Buenos Aires, realizada a campo y en condición de planta espaciada, permitió detectar una importante variabilidad genética entre los mismos para la mayoría de los caracteres morfo-fisiológicos estudiados.

La presente tesis ha revelado la importancia de la caracterización agronómica en poblaciones naturalizadas de la Pcia. de Buenos Aires, provenientes de diferentes microambientes. Dicha caracterización agronómica de germoplasma de trébol blanco aporta información valiosa que puede utilizarse para la selección de poblaciones y de genotipos de trébol blanco en futuros programas de mejoramiento genético.

Los valores obtenidos en la estimación de heredabilidad en sentido amplio para la mayoría de las variables analizadas, señalan la existencia de un componente genético heredable medio a alto. En un programa de mejoramiento cuyo objetivo fuera la obtención de cultivares superiores en producción de forraje y de semilla, las poblaciones 1, 3, 4 y 8 serían las indicadas por sus elevadas productividades en peso seco (1 y 8) y producción total de semillas (3 y 4).

Los datos recopilados y analizados proporcionan una guía valiosa para la identificación de genotipos con alto potencial agronómico y adaptabilidad, para aportar al mejoramiento genético y el desarrollo de nuevas variedades de trébol blanco destinadas a los ambientes ganaderos.

8. BIBLIOGRAFÍA

-Abberton, M. T. y Thomas I. 2011. Genetic resources in *Trifolium* and their utilization in plant breeding. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* (2011) 9(1); 38–44doi:10.1017/S1479262110000341

-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.

-Andrés, A.; Rosso, B. 2007. Characterization of *Lotus glaber* germoplasm from Buenos Aires province – Argentina. *Lotus Newsletter*. 37(1):24.

-Annicchiarico, P. 2003. Breeding white clover for increased ability to compete with associated grasses. *J. Agric. Sci.* 140: 255-266.

-Anomale, M. V.; Peñafort, C.; Bocco, O.; Macor, L.; Bruno, M.; Bagnis, E. 2016. Recursos forrajeros. Cátedra Producción Bovina de Carne II, FAyV, UNRC. En:

https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pastoreo%20sistemas/210-Recursos_forrajeros_UNRC.pdf

-Alonso, S.I. 2004. Evaluation of Italian ryegrass populations naturalized in the flooding pampa of Argentina. I-Morphological and physiological characters at initial stage. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 51(7):747-758.

-Ayala Torales, A. T.; Deregibus, V. A.; Moauro, P. R. 2000. Differential response of forage legumes to phosphorus application. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 43: 473 – 480.

-Barletta, P.; Camarasa, J.; Carta, H.; De Andrés, A.; Méndez, D.; O’Gorman, J.M.; Ojuez, C.†; Pérez, G.; Scheneiter, O. y Varea, I. 2013. Abundancia de trébol rojo y trébol blanco en pasturas del centro y norte de la provincia de Buenos Aires. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 39 (1): 95-104.

-Bertín, O. D.; Scheneiter, J. O. 2010. White clover contribution to swards production in the north of Buenos Aires province. In *International Workshop: An overview of research on pastoral – based Systems*. Machado et al (Eds.). Tandil, 16-18 de junio. Pp. 106-08.

-Bordoli, J. M. 1998. Dinámica de nutrientes y fertilización en siembra directa. En: Curso de Actualización para Egresados de Manejo de la Fertilidad de Suelos en Sistemas Extensivos (Cultivos y Pasturas). Cerro Largo: E.E. de Bañado de Medina. pp. 41 - 46.

-Borrajo, C. I.; Alonso, S. I. y Monterubbianesi, G. 1997. Caracterización de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado. I Porte, color, y altura. Rev. Arg. Prod. Animal 17: 395-403.

-Borrajo, C. I.; Alonso, S. I.; Mazzanti, A.; Monterubbianesi, G. 1998. Caracterización de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado. I Macollaje y caracteres reproductivos. Rev. Arg. Prod. Animal 18:183-192.

-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.

-Bradshaw, A.D. 1965 Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity. Advances in Genetics, 13, 115-153.[http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60048-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60048-6)

-Briggs, D. y Walters, S. M. 1984. Plant variation and evolution. Cambridge University Press. ISBN 10: 0521276659 ISBN 13: 9780521276658.

-Brown, C. y Jain, S. 1979. Reproductive system and pattern of genetic variation in two *Limnanthes* species. Theory. Appl. Genetic 54, pp. 181-190.

-Brummer, E. C. 1999. Capturing heterosis in forage crop cultivar development. Crop Sci, 39:943-954.

-Caradus, J. R.; Hay, R. J. M.; Woodfield, D. R. 1996. The positioning of White clover cultivars in New Zealand. In Woodfield DR (ed.), White clover – New Zealand's competitive edge. Agronomy Society Special Publication No. 10.

-Caradus, J. R.; Woodfield, D. R. 1997. World checklist of white clover varieties New Zealand J. Agric. Res. 40: 115-206.

-Carámbula, M. 1996. Pasturas Naturales Mejoradas. 1ª ed. Montevideo: Editorial Hemisferio Sur. 524p.

-Carámbula, M. 2002. Pasturas y forrajes: insumos, implantación y manejo de pasturas. Vol. 2. Montevideo: Hemisferio Sur. 371p.

-Carrow, R. N. 1996. Drought avoidance characteristics of diverse tall fescue cultivars. *Crop Sc.* 36:371–377.

-Cartas de Suelos de la República Argentina – Provincia de Buenos Aires, INTA.

Consultado el 6 de abril del 2023.

<https://anterior.inta.gob.ar/suelos/cartas/index.htm>

-Chiossone, G. 2006. Sistemas de producción ganaderos del noreste Argentino. Situación actual y propuestas tecnológicas para mejorar su productividad. X Seminario de Pastos y Forrajes.

-Collins, R. P.; Glendining, M. J. y Rhodes I. 1991 The relationships between stolon characteristics, winter survival and annual yields in white clover (*Trifolium repens* L.). *Grass and Forage Science*, **46**, 51–61.

-de Diego, F.; Gaitan, J. 2018. Variabilidad morfológica y plasticidad fenotípica del trébol blanco (*Trifolium repens*) asociado a factores climáticos. Congreso Binacional de Investigación Científica Argentina-Chile.

-Díaz, M.; Echenique, V.; Schrauf, G.; Cardone, S.; Polci, P.; Lutz, E.; Spangenberg, G. 2004. Biotecnología y mejoramiento genético de especies forrajeras. INTA, Argentina. *RIA*, 33 (3): 77-104.

-Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. 2013. Infostat-Software estadístico. Córdoba, AR, Universidad Nacional de Córdoba. Retrieved from <http://www.infostat.com.ar/>

-Evans, L. T. 1998 *Feeding Ten Billion*. Cambridge. Univ. Press Cambridge. UK.

-Falconer, D. S. 1989. *Introducción a la genética cuantitativa*. Compañía Editorial Continental. México 383 pp.

-Fontdevila y Moya, 2000. *Introducción a la genética de poblaciones*. Ed. Síntesis. ISBN: 8477386919. pp. 320.

-Gallego, J. J.; Barbarossa, R. A. y Miñón, D. P. 2011. Comportamiento de variedades de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) en condiciones de riego en el noreste patagónico (Argentina). Memorias de la XXII Reunión ALPA. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol 19 Supl. 1: 69.

-García, J. A. 1996. Variedades de trébol blanco. INIA La Estanzuela. 12 p.

-Gibson, P. B. y Cope, W. A. 1985. White clover. In: N.L, Taylor. Clover Science and Technology. American Society of Agronomy, 471-490.

-Gregoretto, G.; Baudracco, J.; Dimundo, C.; Alesso, A.; Lazzarini, B.; Machado, C. 2020. Caracterización productiva de sistemas de cría bovina tecnificados de la región centro norte de Argentina. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 36(3), 233-243. Epub. <https://dx.doi.org/10.29393/chjaas36-22cpgg60022>

-Gutiérrez-Arenas, A.F.; Hernández-Garay, A.; Vaquera-Huerta, H.; Zaragoza-Ramírez, J. L.; Luna-Guerrero, M. J.; Reyes-Castro, S.; Gutiérrez-Arenas, D. A. 2018. Análisis de crecimiento estacional de Trébol blanco (*Trifolium repens* L.) Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 5. pp: 62-68.

-Grünwaldt, J. M.; Guevara, J. C.; Grünwaldt, E. G.; Martínez Carretero, E. 2015. Cacti (*Opuntia* spp.) as forage in Argentina dry lands. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina. 47(1): 263-282.

-Harris, W.; I. Rhodes and S.S. Mee. 1983. Observations on environmental and genotypic influences on the overwintering of white clover. J. Appl. Ecol. 20:609-624.

-Helgadottir, A.; Dalmannsdottir, S. and Collins, R. 2001. Adaptational Changes in White Clover Populations Selected Under Marginal Conditions. *Annals of Botany* **88** (Special Issue): 771-780. doi:10.1006/anbo.2001.1438, available online at <http://www.idealibrary.com>

-Huang, B. y Fry, J. D. 1998. Root anatomical, morphological, and physiological responses to drought stress for tall fescue cultivars. Crop Sci. 38:1017-1022.

-Huang, B. y Gao, H. 2000. Root physiological characteristics associated with drought resistance in tall fescue cultivars. Crop Science 40: 196-203.

-Huang, X. S.; Zheng, Z. D.; Fang, J. M.; Wu, J. C.; Fu, C. Z., 1998. Nutrition improvement for rabbits by feeding orchard-growing forage on hilly red soils. *J. Fujian Academy Agric. Sci.*, 13: 102-107.

-Hulme, P. E. 2009. *Invasive Species in a Globalized World*.

-Hunt, O. J. 1965. Salt tolerance in intermediate wheatgrass, *Crop Sci.*, 5, 407.

-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.

-Lapalma, A.; Arozamena, N.; Elustondo, L.; Affinito, A.; Guillén, R.; López Tesore, M.; Pacente, E.; Varea, I.; Scheneiter, O.; Andrés, A. 2022, a. Variabilidad genética en poblaciones naturalizadas de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) “La Universidad: ¿un articulador clave para el desarrollo sustentable?”. UNNOBA, Pergamino, 24 al 26 de agosto.

-Lapalma, A.; Arozamena, N.; Varea, I.; Andrés, A. 2022, b. Recolección de germoplasma de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) “La Universidad: ¿un articulador clave para el desarrollo sustentable?”. UNNOBA, Pergamino, 24 al 26 de agosto.

-Lapalma, A.; Varea, I.; Arozamena, N. y Andrés, A. 2022, c. Recolección de poblaciones naturalizadas de *Trifolium repens* L. en el norte de la Provincia de Buenos Aires. *Comunicación. Rev. Arg. de Prod. Animal. Vol 42 Supl. 1: 86-125. pp. 95.*

-Leitch, I. J.; Bennett, M. D. 2004. Genome downsizing in polyploidy plants. *Biol. J. Linnean Soc.* 82: 651-663.

-Lopes da Silva Santos Simões, N. M. 2015. Eficiencia del uso del agua y persistencia de gramíneas perennes en las condiciones de secano en el Mediterráneo. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura.

-Loveless, M. y Hamrick, J. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. (15), pp. 65- 95.

-Maddaloni, J. y Ferrari, L. 2001. Trébol blanco. En: Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. INTA. – Universidad Nacional de Lomas de Zamora. FCA. pp 261-287.

-Miñón, D. P.; Gallego, J. J. y Barbarossa, R. A. 2013. Producción de forraje de especies y cultivares de leguminosas en valles regados norpatagónicos. Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Valle Inferior - Convenio Provincia de Río Negro – INTA. p. 4-10.

-Nyfeler, D. 2009. Productivity and nitrogen utilization in productive agricultural grassland: effects of species combinations, species proportions and nitrogen fertilization. Ph.D. thesis ETH Zurich No. 18219, 179 pp.

-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.

-Primack, R. B. y Kang, H. 1989. Measuring Fitness and Natural Selection in Wild Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* Vol. 20:367-396.

-Randazzo, C. P.; Rosso, B. S. y Pagano, E. M. 2013. Identificación de cultivares de trébol blanco (*Trifolium repens* L) mediante SSR. *Journal of Basic and Applied genetics*. Vol 24, Issue 1, Article 3. pp 19-25. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/14228>
<https://sag.org.ar/jbag/project/vol-xxviii-issue-2-2017-3/>

-Randazzo, C. P.; Pagano, E. M.; Rosso, B. S.; Ríos, R. D. 2009 Variabilidad genética en cultivares de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) mediante marcadores moleculares. Publicado: La biotecnología y los futuros escenarios mundiales. 142 p, Ediciones INTA.

-Randazzo, C. P.; Pagano, E. M.; Rosso, B. S.; Ríos, R. D. 2009. Variabilidad genética en cultivares de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) mediante marcadores moleculares y caracteres morfofisiológicos. *Lilloa* Vol 45. ISSN 0075-9481. 51 p.

-Randazzo, C. P.; Rosso, B. S.; Pagano, E. M. 2012. Análisis Intrapoblacional de Trébol Blanco (*Trifolium repens* L.) mediante marcadores moleculares. XV Congreso Latinoamericano de Genética.

-Rencher, A. C.; Christensen, W. F. 2012. Methods of multivariate analysis (3rd ed.). p. 271.

-Rosso, B. S.; Pagano, E. M.; Frutos, E. 1997. Evaluación de una colección de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) [s.l.]: Informe técnico INTA, 12 p.

-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.

-Serrano, H. 1953. Report on the collection of forage species coming from England. Anales de la Sociedad Rural Argentina, 87, 26-29.

-Shannon, MC. 1997. Adaptation of plants to salinity. Advances in Agronomy, 60: 75-120.

-SINAVIMO - Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. Consultado el 28 de Octubre del 2021. <https://www.sinavimo.gob.ar/cultivo/trifolium-repens>.

-Scheneiter, O.; Pagano, E. 1998. Producción de forraje y composición botánica de pasturas mixtas de festuca y trébol blanco fertilizadas con nitrógeno. Rev. de Tecnología Agropecuaria. INTA EEA Pergamino. Vol III (9):10-14.

-Schiller, J. M.; Lazenby, A. 1975. Yield performance of tall fescue (*Festuca arundinacea*) populations on the Northern Tableland of New South Wales. Animal Production Science. 15(74):391 - 399.

-Snaydon, R. 1985. Aspects of the ecological genetics of pasture species. In : Structure and functioning of plant populations. Ed. J. Haeck and J. W. Woldendorp. N. Holl. Pub. Amsterdam.

-Tanksley, S. D. and McCouch, S. R. 1997 Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild, *Science*, 277, 1063-1066. <http://dx.doi.org/10.1126/science.277.5329.1063>

-Turesson, 1922. The genotypical response of the plant species to the habitat. *Heredities* (3), pp.211-350.

-Voisey, C. R.; White, D. W. R.; Mc Gregor, P. G.; Wingley, P. J.; Chilcott, C. N. 1994. Release of transgenic white clover plant expressing *Bacillus thuringiensis* genes -an ecological perspective. *Biocontrol Sci. Technol.* 4: 475- 481.

-Wachendorf, R. P.; Collins, J.; Connolly, A.; Elgersma, M.; Fothergill, B. E.; Frankow-Lindberg, A.; Ghesquiere, A.; Guckert, M. P.; Guinchard, A.; Helgadottir, A.; Luscher, T.; Nolan, P.; Nykanen-Kurki, J.; Nosberger, G.; Parente, S.; Puzio, I.; Rhodes, C.; Robin, A.; Ryan, B.; Staheli, S.; Stoffell, F. Taube. 2001. *Annals of Botany* 88 (Special Issue): 669-682. Overwintering of *Trifolium repens* L. and Succeeding Growth: Results from a Common Protocol carried out at Twelve European Sites doi:10.1006/anbo.2001.1486, available online at <http://www.idealibrary.com> on.

-Wedderburn, M. E.; Adam, K. D.; Greaves, L. A.; Carter, J. L. 1996. Effect of oversown ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens*) on the genetic structure of New Zealand hill pastures. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 39: 41 - 52.

-White, R. H.; Bruneau, A. H. y Cowett, T. J. 1993. Drought resistance of diverse tall fescue cultivars. *Intl. Turf. Soc. Res. J.* 7:607–613.

-White, R. H.; Engelke, M. C.; Morton, S. J. y Ruemmele, B. A. 1992. Competitive turgor maintenance in tall fescue. *Crop Sci.* 32:251–256.

-Woodfield, D. R.; Caradus, J. R. 1994. Genetic improvement in white clover representing six decades of plant improvement. *Crop Science* 34: 1205–1213.

-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.

ANEXO I

Extracto del análisis de varianza de las 20 variables evaluadas.

A1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
A1	720	0,26	0,25	47,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	445,25	9	49,47	27,34	<0,0001
POB	334,71	7	47,82	26,42	<0,0001
REP	110,54	2	55,27	30,54	<0,0001
Error	1284,74	710	1,81		
Total	1729,99	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,4075

Error: 1,8095 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
1	4,09	90	0,14	A
2	3,31	90	0,14	B
8	3,14	90	0,14	B
5	2,90	90	0,14	B
3	2,84	90	0,14	B
6	2,18	90	0,14	C
7	2,07	90	0,14	C
4	1,94	90	0,14	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

A2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
A2	720	0,24	0,23	40,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2879,92	9	319,99	24,74	<0,0001
POB	2340,66	7	334,38	25,86	<0,0001
REP	539,26	2	269,63	20,85	<0,0001
Error	9182,03	710	12,93		
Total	12061,95	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,0894

Error: 12,9324 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
8	11,82	90	0,38	A
1	11,61	90	0,38	A
5	9,70	90	0,38	B
2	8,52	90	0,38	C
3	7,96	90	0,38	C
7	7,69	90	0,38	C
6	7,31	90	0,38	C
4	6,79	90	0,38	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

A3

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
A3	720	0,23	0,22	42,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2707,88	9	300,88	23,00	<0,0001
POB	2115,48	7	302,21	23,10	<0,0001
REP	592,41	2	296,20	22,64	<0,0001
Error	9288,00	710	13,08		
Total	11995,89	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,0957

Error: 13,0817 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
8	11,38	90	0,38	A
1	11,01	90	0,38	A
5	8,81	90	0,38	B
2	8,31	90	0,38	B
3	7,74	90	0,38	C
6	7,36	90	0,38	C
7	6,74	90	0,38	C
4	6,54	90	0,38	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

A4

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
A4	720	0,17	0,16	45,05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6723,49	9	747,05	16,28	<0,0001
POB	5453,93	7	779,13	16,98	<0,0001
REP	1269,56	2	634,78	13,83	<0,0001
Error	32578,50	710	45,89		
Total	39301,99	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=2,0521

Error: 45,8852 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
8	21,20	90	0,71	A
1	17,24	90	0,71	B
5	15,62	90	0,71	B
6	14,09	90	0,71	C
4	13,49	90	0,71	C
3	13,12	90	0,71	C
7	13,02	90	0,71	C
2	12,51	90	0,71	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

A5

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
A5	720	0,13	0,12	42,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1515,21	9	168,36	11,78	<0,0001
POB	1185,49	7	169,36	11,85	<0,0001
REP	329,72	2	164,86	11,53	<0,0001
Error	10150,63	710	14,30		
Total	11665,83	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,1455

Error: 14,2967 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
8	11,77	90	0,40	A
7	9,64	90	0,40	B
1	9,20	90	0,40	B
6	9,01	90	0,40	B
5	8,82	90	0,40	B
4	8,01	90	0,40	C
2	7,93	90	0,40	C
3	7,29	90	0,40	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

A6

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
A6	720	0,11	0,10	40,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1958,38	9	217,60	9,85	<0,0001
POB	1518,27	7	216,90	9,82	<0,0001
REP	440,11	2	220,05	9,96	0,0001
Error	15683,83	710	22,09		
Total	17642,20	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,4238

Error: 22,0899 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
8	14,98	90	0,50	A
1	12,36	90	0,50	B
5	12,13	90	0,50	B
7	11,38	90	0,50	B
4	11,36	90	0,50	B
6	11,30	90	0,50	B
3	10,36	90	0,50	C
2	9,88	90	0,50	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

V1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
V1	720	0,29	0,28	26,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	133,81	9	14,87	32,49	<0,0001
POB	99,72	7	14,25	31,14	<0,0001
REP	34,09	2	17,04	37,25	<0,0001
Error	324,86	710	0,46		
Total	458,67	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,2049

Error: 0,4575 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
1	3,04	90	0,07	A
8	2,82	90	0,07	B
3	2,80	90	0,07	B
5	2,68	90	0,07	B
2	2,67	90	0,07	B
4	2,36	90	0,07	C
6	2,11	90	0,07	D
7	1,87	90	0,07	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

V2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
V2	720	0,27	0,27	32,64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	202,85	9	22,54	29,85	<0,0001
POB	174,22	7	24,89	32,96	<0,0001
REP	28,63	2	14,32	18,96	<0,0001
Error	536,13	710	0,76		
Total	738,99	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,2633

Error: 0,7551 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
1	3,46	90	0,09	A
8	3,12	90	0,09	B
5	2,92	90	0,09	C
2	2,80	90	0,09	C
3	2,66	90	0,09	C
4	2,36	90	0,09	D
6	2,10	90	0,09	E
7	1,89	90	0,09	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

V3

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
V3	720	0,19	0,18	26,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	118,02	9	13,11	18,65	<0,0001
POB	88,82	7	12,69	18,05	<0,0001
REP	29,20	2	14,60	20,77	<0,0001
Error	499,18	710	0,70		
Total	617,20	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,2540

Error: 0,7031 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
8	3,68	90	0,09	A
1	3,59	90	0,09	A
5	3,36	90	0,09	B
4	3,34	90	0,09	B
3	3,21	90	0,09	B
2	3,06	90	0,09	B
6	2,74	90	0,09	C
7	2,62	90	0,09	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

D1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
D1	720	0,28	0,27	27,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9055,17	9	1006,13	30,52	<0,0001
POB	5506,01	7	786,57	23,86	<0,0001
REP	3549,15	2	1774,58	53,84	<0,0001
Error	23403,53	710	32,96		
Total	32458,69	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,7393

Error: 32,9627 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
1	24,97	90	0,61	A
8	23,79	90	0,61	A
3	22,36	90	0,61	B
5	21,39	90	0,61	B
4	20,67	90	0,61	B
2	20,15	90	0,61	B
6	17,67	90	0,61	C
7	16,12	90	0,61	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

D2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
D2	720	0,32	0,31	30,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	26601,40	9	2955,71	36,67	<0,0001
POB	20758,62	7	2965,52	36,79	<0,0001
REP	5842,78	2	2921,39	36,24	<0,0001
Error	57227,09	710	80,60		
Total	83828,49	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=2,7198

Error: 80,6015 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
1	38,68	90	0,95	A
8	34,75	90	0,95	B
5	31,71	90	0,95	C
2	29,90	90	0,95	D
3	28,41	90	0,95	D
4	27,97	90	0,95	D
6	22,75	90	0,95	E
7	21,46	90	0,95	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

D3

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
D3	720	0,31	0,30	29,67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	28338,46	9	3148,72	35,61	<0,0001
POB	21964,88	7	3137,84	35,49	<0,0001
REP	6373,57	2	3186,79	36,04	<0,0001
Error	62778,92	710	88,42		
Total	91117,37	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=2,8487

Error: 88,4210 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
1	40,14	90	0,99	A
8	37,67	90	0,99	A
5	34,48	90	0,99	B
4	31,52	90	0,99	C
3	31,39	90	0,99	C
2	30,83	90	0,99	C
6	24,71	90	0,99	D
7	22,77	90	0,99	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

HAB

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HAB	719	0,06	0,05	48,87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	30,60	9	3,40	5,20	<0,0001
POB	28,74	7	4,11	6,28	<0,0001
REP	1,86	2	0,93	1,42	0,2422
Error	463,86	709	0,65		
Total	494,46	718			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,2450

Error: 0,6542 gl: 709

POB	Medias	n	E.E.	
2	1,94	90	0,09	A
3	1,90	90	0,09	A
4	1,80	90	0,09	A
7	1,64	89	0,09	B
5	1,59	90	0,09	B
1	1,57	90	0,09	B
6	1,48	90	0,09	B
8	1,32	90	0,09	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

NC1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NC1	720	0,14	0,13	77,13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4590,66	9	510,07	13,15	<0,0001
POB	3170,75	7	452,96	11,68	<0,0001
REP	1419,91	2	709,95	18,30	<0,0001
Error	27539,29	710	38,79		
Total	32129,95	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=1,8867

Error: 38,7877 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
3	10,12	90	0,66	A
4	10,00	90	0,66	A
1	9,84	90	0,66	A
5	9,81	90	0,66	A
8	8,46	90	0,66	A
2	5,96	90	0,66	B
6	5,41	90	0,66	B
7	5,00	90	0,66	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

NC2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NC2	720	0,18	0,17	55,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	56131,32	9	6236,81	16,92	<0,0001
POB	51444,62	7	7349,23	19,94	<0,0001
REP	4686,70	2	2343,35	6,36	0,0018
Error	261686,23	710	368,57		
Total	317817,55	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=5,8160

Error: 368,5722 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
4	48,11	90	2,02	A
5	41,23	90	2,02	B
3	38,34	90	2,02	B
8	38,29	90	2,02	B
1	37,87	90	2,02	B
7	27,19	90	2,02	C
2	23,79	90	2,02	C
6	22,98	90	2,02	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

NC3

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NC3	720	0,14	0,13	67,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	453513,68	9	50390,41	13,07	<0,0001
POB	427288,33	7	61041,19	15,83	<0,0001
REP	26225,35	2	13112,68	3,40	0,0339
Error	2737653,15	710	3855,85		
Total	3191166,83	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=18,8116

Error: 3855,8495 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
4	136,34	90	6,55	A
5	107,83	90	6,55	B
8	106,71	90	6,55	B
3	101,23	90	6,55	B
1	81,33	90	6,55	C
7	76,27	90	6,55	C
2	63,17	90	6,55	C
6	59,79	90	6,55	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

PV

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PV	720	0,24	0,23	66,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4297211,03	9	477467,89	25,46	<0,0001
POB	3340590,90	7	477227,27	25,44	<0,0001
REP	956620,12	2	478310,06	25,50	<0,0001
Error	13316553,52	710	18755,71		
Total	17613764,55	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=41,4889

Error: 18755,7092 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
8	333,31	90	14,44	A
1	271,20	90	14,44	B
4	238,73	90	14,44	B
5	206,23	90	14,44	C
3	183,91	90	14,44	C
2	143,67	90	14,44	D
6	143,09	90	14,44	D
7	120,78	90	14,44	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

PS

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PS	720	0,21	0,20	66,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	89407,09	9	9934,12	20,71	<0,0001
POB	68299,91	7	9757,13	20,34	<0,0001
REP	21107,18	2	10553,59	22,00	<0,0001
Error	340578,60	710	479,69		
Total	429985,69	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=6,6351

Error: 479,6882 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
8	46,96	90	2,31	A
1	45,42	90	2,31	A
4	38,59	90	2,31	B
5	35,84	90	2,31	B
3	31,91	90	2,31	B
2	25,54	90	2,31	C
6	22,42	90	2,31	C
7	18,80	90	2,31	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

RTO

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RTO	720	0,09	0,08	87,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	262,65	9	29,18	8,01	<0,0001
POB	256,05	7	36,58	10,04	<0,0001
REP	6,61	2	3,30	0,91	0,4043
Error	2586,09	710	3,64		
Total	2848,75	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,5782

Error: 3,6424 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
4	3,30	90	0,20	A
5	2,91	90	0,20	A
3	2,24	90	0,20	B
1	2,22	90	0,20	B
7	2,01	90	0,20	B
2	1,64	90	0,20	B
8	1,63	90	0,20	B
6	1,52	90	0,20	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

P1000 (g)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P1000 (g)	720	0,03	0,02	27,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,57	9	0,06	2,75	0,0036
POB	0,52	7	0,07	3,24	0,0022
REP	0,05	2	0,02	1,04	0,3528
Error	16,43	710	0,02		
Total	17,00	719			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=0,0461

Error: 0,0231 gl: 710

POB	Medias	n	E.E.	
8	0,60	90	0,02	A
1	0,58	90	0,02	A
3	0,58	90	0,02	A
5	0,56	90	0,02	A
7	0,56	90	0,02	A
4	0,54	90	0,02	A
6	0,53	90	0,02	A
2	0,51	90	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)