



# Investigación, producción e industrialización de la alfalfa en Argentina



Compilador:  
Daniel H. Basigalup

# Investigación, producción e industrialización de la alfalfa en Argentina

Compilador:  
Daniel H. Basigalup

*INTA Ediciones*  
*Dirección Nacional Asistente de Comunicación Institucional*  
*Gerencia de Contenidos Periodísticos y Editoriales*  
2022



Instituto Nacional de  
Tecnología Agropecuaria

Secretaría de Agricultura,  
Ganadería y Pesca



Ministerio de Economía  
Argentina

633.311 Investigación, producción e industrialización de la alfalfa en Argentina /  
In89      compilador: Daniel H. Basigalup. – Buenos Aires : Ediciones INTA, 2022.  
783 p. : il. (PDF)

ISBN 978-987-679-348-3 (digital)

i.Basigalup, Daniel H.

Medicago sativa – Producción – Investigación – Industrialización –Argentina –  
Alfalfa

DD-INTA

Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto, queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899.

Diseño:

Alejandra Pereyra

Dirección Nacional Asistente de Comunicación Institucional

Gerencia de Producción Multimedia

Este libro  
cuenta con licencia:



## **Autores**

### **Arolfo, Valeria**

Bióloga (MSc) especializada en mejoramiento genético de alfalfa y trébol de olor blanco en la EEA Manfredi INTA y Coordinadora de la Red Nacional INTA de Evaluación de Cultivares de Alfalfa.

### **Ayub, Nicolás**

Licenciado en Ciencias Biológicas (Dr.), investigador independiente de CONICET especializado en microbiología, ingeniería genética y bioinformática, IABiMo UE INTA-CONICET, IGEAF INTA Castelar.

### **Basigalup, Daniel H.**

Ingeniero Agrónomo (MSc y PhD), especialista en desarrollo y evaluación de variedades de alfalfa e investigador de la EEA Manfredi INTA.

### **Brambilla, Silvina**

Licenciada en Biotecnología (Dra.) y Becaria Post Doctoral INTA-CONICET especializada en rizobios en el IABiMo UE INTA-CONICET, IGEAF INTA Castelar.

### **Cangiano, Carlos A.**

Ingeniero Agrónomo (MSc), especialista en producción animal y evaluación de forrajes e investigador retirado de la EEA Balcarce INTA.

### **Collino, Daniel**

Ingeniero Agrónomo (Dr.), especialista en fisiología vegetal e investigador retirado del CIAP INTA.

### **Davies, Patricio**

Médico Veterinario (MSc) especialista en producción animal e investigador de la EEA General Villegas INTA.

### **Díaz Zorita, Martín**

Ingeniero Agrónomo (MSc y Dr.) docente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa y Presidente de DZD Agro S.R.L.



**Dillon, Alicia**

Médica Veterinaria (Dra.), especialista en producción y sanidad animal, exinvestigadora de la EEA General Villegas INTA y actualmente asesora privada.

**Echeverría, Eduardo**

Ingeniero Agrónomo (MSc), especialista en producción de semilla de alfalfa y asesor técnico de AproAgro.

**Frare, Romina**

Licenciada en Biotecnología (Dra.) y Becaria Post Doctoral INTA-CONICET especializada en ingeniería genética vegetal en el IABiMo UE INTA-CONICET, IGEAF INTA Castelar.

**Gambaudo, Sebastián**

Ingeniero Agrónomo (MSc), especialista en fertilidad y corrección de acidez edáfica, investigador retirado de la EEA Rafaela INTA y actualmente asesor privado.

**Giolitti, Fabián J.**

Biólogo (Dr.) y Profesor en Ciencias Biológicas, especializado en la caracterización de enfermedades virales e investigador del área de Virología Vegetal del IPAVE-CIAP-INTA

**González, Norma (†)**

Ingeniera Agrónoma, especialista en microbiología y fijación simbiótica del nitrógeno y exinvestigadora (fallecida) de EEA INTA Balcarce-FCA UNMdP.

**Grandón, Nancy G.**

Licenciada en Genética (MSc), especialista en el desarrollo de marcadores moleculares para uso en mejoramiento de alfalfa y girasol e investigadora en el Laboratorio de Biotecnología de la EEA Manfredi INTA.

**Jozefkowicz, Cintia**

Doctora en Bioquímica e Investigadora Asistente CONICET especialista en ingeniería genética vegetal en el IABiMo UE INTA-CONICET, IGEAF INTA Castelar.

**Juan, Néstor A.**

Ingeniero Agrónomo (MSc, PhD), especializado en determinación de calidad forrajera a través de tecnología NIRS e investigador retirado de la EEA Anguil INTA.

**Kloster, Andrés M.**

Médico Veterinario (MSc), especialista en producción animal, exinvestigador (retirado) de la EEA Marcos Juárez INTA y docente de la UNVM.

**Mamaní, Eva M.**

Licenciada en Genética (MSc), especialista en uso de marcadores moleculares en alfalfa e implementación de selección asistida para carbón de maní e investigadora del Laboratorio de Biotecnología de la EEA Manfredi INTA.

**Martínez, Enrique M.**

Bachiller Agrícola, especialista en polinización entomófila, exinvestigador (retirado) de la EEA Hilario Ascasubi INTA y actualmente asesor privado.

**Mattera, Juan**

Ingeniero Agrónomo (MSc, Dr.), especialista en implantación y manejo de pasturas e investigador de la EEA Pergamino INTA.

**Méndez, Daniel**

Ingeniero Agrónomo (MSc), especialista en manejo y producción de forrajes e investigador de la EEA General Villegas INTA.

**Moreno, María V.**

Licenciada en Microbiología (MSc y Dra.), especialista en uso de marcadores moleculares en mejoramiento vegetal y estudio de microorganismos PGPR, e investigadora del Laboratorio de Biotecnología de la EEA Manfredi INTA.

**Moschetti, Carlos J.**

Ingeniero Agrónomo, especialista en producción de semilla y control de malezas de alfalfa, exinvestigador (retirado) de la EEA Hilario Ascasubi INTA y actualmente asesor privado.

**Odorizzi, Ariel S.**

Ingeniero Agrónomo (MSc y Dr.) especializado en el desarrollo y evaluación de variedades de alfalfa, investigador de la EEA Manfredi INTA y docente en la UNVM.

**Olivo, Silvia**

Ingeniera Agrónoma (MSc), especialista en producción, utilización y evaluación de pasturas y en ecofisiología de alfalfa e investigadora de la EEA Manfredi INTA.

**Pascuan, Cecilia**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Dra.) e investigadora INTA especializada en cultivo *in vitro* en el IABiMo UE INTA-CONICET, IGEAF INTA Castelar.

**Quiroga, Alberto R.**

Ingeniero Agrónomo (Dr.) especialista en manejo y fertilidad de suelos, investigador de la EEA Anguil INTA y docente de la UNLPam.

**Racca, Roberto W.**

Ingeniero Agrónomo, especialista en fisiología vegetal, fijación biológica del nitrógeno y biofertilizantes, exprofesor de Ecofisiología Vegetal UNC y exinvestigador (retirado) del CIAP INTA.

**Rodríguez, Nora E.**

Profesora de Ciencias Naturales especializada en Disherbología y exinvestigadora (retirada) de la EEA Manfredi INTA.

**Salvagiotti, Fernando**

Ingeniero Agrónomo (MSc y PhD) especializado en nutrición vegetal y fertilidad de suelos, investigador de la EEA Oliveros INTA e investigador independiente del CONICET.

**Sardiña, Cecilia**

Ingeniera Agrónoma especialista en manejo de forrajeras e investigadora de la EEA General Villegas INTA.

**Sipowicz, Pablo**

Licenciado en Biotecnología (MSc), especialista en uso de marcadores para mejoramiento de forrajeras, detección de transgenes RR en alfalfa e investigador del Laboratorio de Biotecnología de la EEA Manfredi INTA.

**Soto, Gabriela**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Dra.), investigadora independiente de CONICET especializada en biotecnología de alfalfa en el IABiMo UE INTA-CONICET, IGEAF INTA Castelar.

**Stritzler, Margarita**

Licenciada en Ciencias Biológicas (Dra.), Investigadora Asistente CONICET especialista en edición génica vegetal en el IABiMo UE INTA-CONICET, IGEAF INTA Castelar.

**Spada, María del C.**

Ingeniera Agrónoma (MSc), especialista en manejo de pasturas y evaluación de cultivares de alfalfa y exinvestigadora (retirada) de la EEA Manfredi INTA.

**Trucco, Verónica M.**

Licenciada en Biotecnología (Dra.), especializada en virología vegetal e investigadora del IPAVE-CIAP-INTA y UFyMA-CONICET-INTA.

**Urrets Zavalía, Gastón**

Ingeniero Agrónomo (MBA) especialista en maquinaria de henificación y en conservación e industrialización de forrajes e investigador de la EEA Manfredi INTA.

**Ventroni, Leandro**

Ingeniero Agrónomo (MSc), especializado en manejo de pasturas y asesor privado en sistemas de producción agrícola-ganaderos.

**Viviani Rossi, Enrique**

Ingeniero Agrónomo (Dr.) especializado en conservación de forrajes y exinvestigador (retirado) de la EEA Balcarce INTA.

**Zaniboni, Claudio M.**

Ingeniero Agrónomo (MSc) especialista en manejo de pasturas y producción animal, exinvestigador (retirado) de la EEA General Villegas INTA y actualmente asesor privado.

## Contenidos

■ <b>Prólogo</b>	<b>11</b>
■ <b>Capítulo 1:</b> Panorama actual del cultivo de alfalfa en Argentina <i>D. Basigalup</i>	<b>13</b>
■ <b>Capítulo 2:</b> Morfología de la alfalfa <i>N. Rodríguez y M. del C. Spada</i>	<b>36</b>
■ <b>Capítulo 3:</b> Ambiente y rendimiento potencial de alfalfa Abordaje desde la ecofisiología <i>S. Olivo, J. Mattera, F. Salvaggiotti y D. Collino</i>	<b>62</b>
■ <b>Capítulo 4:</b> Nutrición nitrogenada de la alfalfa e impacto económico y ecológico de los rizobios <i>R. Racca, N. Ayub, N. González, C. Jozefkowicz, S. Brambilla y R. Frare</i>	<b>112</b>
■ <b>Capítulo 5:</b> Establecimiento de alfalfa: aspectos ecofisiológicos y agronómicos <i>S. Olivo y J. Mattera</i>	<b>142</b>
■ <b>Capítulo 6:</b> Mejoramiento genético y desarrollo de variedades <i>A. Odorizzi y D. Basigalup</i>	<b>175</b>

<b>Capítulo 7:</b>	<b>244</b>
Biotecnología aplicada al mejoramiento de alfalfa	
<i>G. Grandón, M. V. Moreno, G. Soto, P. Sipowicz, M. Stritzler, C. Pascuan y E. Mamaní</i>	
<b>Capítulo 8:</b>	<b>317</b>
Evaluación de cultivares y panorama varietal	
<i>V. Arolfo y A. Odorizzi</i>	
<b>Capítulo 9:</b>	<b>356</b>
Enfermedades de la alfalfa	
<i>V. Arolfo, V. Trucco, F. Giolitti y D. Basigalup</i>	
<b>Capítulo 10:</b>	<b>390</b>
Fertilización y encalado en alfalfa	
<i>M. Díaz Zorita, S. Gambaudo y A. Quiroga</i>	
<b>Capítulo 11:</b>	<b>424</b>
Crecimiento y manejo de la defoliación	
<i>C. Cangiano y L. Ventroni</i>	
<b>Capítulo 12:</b>	<b>507</b>
Manejo y utilización de pasturas de alfalfa para producción de carne	
<i>A. Kloster, M. Zaniboni y C. Sardiña</i>	
<b>Capítulo 13:</b>	<b>550</b>
Producción de heno, silaje y henolaje de alfalfa	
<i>G. Urrets Zavalía, N. Juan y E. Viviani Rossi</i>	

<b>■ Capítulo 14:</b>	<b>624</b>
Meteorismo espumoso (empaste)	
<i>P. Davies, D. Méndez y A. Dillon</i>	
<b>■ Capítulo 15:</b>	<b>646</b>
Producción de semilla de alfalfa	
<i>E. Echeverría, C. Moschetti, E. Martínez y D. Basigalup</i>	
<b>■ Capítulo 16:</b>	<b>722</b>
Industrialización de la alfalfa	
<i>D. Basigalup y G. Urrets Zavalía</i>	

La alfalfa continúa siendo la especie forrajera más importante del país, a pesar de que el área de siembra del cultivo ha experimentado una disminución durante la última década. En el presente (año 2020), la superficie total de alfalfa se estima en alrededor de 3 millones de ha, incluyendo cultivos puros (60 %) y asociados con gramíneas templadas (40 %). En ese contexto, Argentina continúa siendo uno de los principales productores mundiales y –por lejos– el principal de América del Sur, donde Uruguay (140.000 ha), Perú (120.000 ha), Chile (120.000 ha), Bolivia (65.000 ha) y Brasil (35.000 ha) distan mucho de la tradición alfalfera argentina.

Desde los inicios del siglo XXI, la producción nacional de carne y leche viene atravesando una serie de cambios estructurales, particularmente los referidos a la creciente utilización de diversos grados de confinamiento, la disminución del pastoreo directo, el mayor uso de reservas forrajeras y el desplazamiento de las pasturas –por competencia de la producción de granos– hacia suelos y condiciones menos favorables. En el caso específico de la alfalfa, ese conjunto de factores se reflejó en menor superficie de siembra y en la implementación de planteos de producción más intensivos, lo que se tradujo básicamente en la utilización de variedades de menor reposo invernal y en el aumento de la confección de reservas forrajeras. Como parte de esta situación, creció significativamente la producción de heno, tanto para la suplementación dentro de la propia explotación como para la comercialización “tranquearas afuera” hacia el mercado interno o la exportación. Esto último ha movilizado un creciente interés por la obtención de heno de alta calidad, fortaleciendo así el enorme potencial que Argentina tiene para abastecer un mercado mundial insatisfecho y con evidentes signos de expansión.

También durante esos años se han producido en el país avances en materia de investigación y generación de conocimientos en distintos aspectos del cultivo, en especial los referidos al desarrollo de técnicas moleculares para la manipulación genética y su aplicación en el desarrollo de variedades; estudios ecofisiológicos para un mayor entendimiento de la adaptación a condiciones de estreses abióticos;



inscripción de nuevos cultivares, algunos como fruto de la ingeniería genética; caracterización de nuevas enfermedades, como el complejo viral del achaparramiento; investigaciones sobre la eficiencia y el impacto ambiental del proceso de fijación biológica del nitrógeno; y desarrollo de maquinaria de última generación para mejorar la eficiencia de los procesos de henificación y henolaje. Paralelamente, en otros países se han registrado avances en la utilización de la alfalfa como producto para las industrias farmacéutica, cosmetológica y de alimentación tanto humana como de animales menores y mascotas. Esto también abre para el país perspectivas sumamente promisorias para la elaboración y la exportación de materiales con valor agregado.

Este libro intenta resumir muchos de los avances mencionados precedentemente. Gran parte de esa producción científica y técnica fue generada por profesionales del INTA, algunos de los cuales están actualmente retirados. En otros casos, se ha contado con la colaboración siempre valiosa de profesionales del sector privado y del CONICET, en un contexto de articulación fructífera que busca la necesaria sinergia para el uso eficiente de los recursos disponibles.

En varios temas, la presente obra es una actualización y una ampliación del libro *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*, publicado también por Ediciones INTA en 2007. En este caso, se han agregado capítulos completamente nuevos, como los referidos a la industrialización de la alfalfa, la calidad forrajera y el enfoque ecofisiológico de las prácticas de siembra y establecimiento. Por el contrario, otros temas que –como el control de plagas y malezas– no registraron novedades significativas durante la última década, no fueron incluidos por su escaso aporte a lo ya publicado en 2007.

Hago propicia la oportunidad para agradecer al gran número de autores que han participado, al igual que a Ediciones INTA, al Centro Regional Córdoba y a la Dirección de la EEA Manfredi de INTA por el apoyo recibido durante la elaboración y la impresión de este libro. Deseo fervientemente que esta publicación constituya una herramienta eficaz para todos aquellos involucrados en el cultivo, la producción y la industrialización de la alfalfa en Argentina.

Ing. Agr. (PhD) Daniel H. Basigalup  
*Compilador*



# CAPÍTULO 1

## Panorama actual del cultivo de alfalfa en Argentina

Daniel. H. Basigalup

## Evolución del área de siembra y del mercado de semilla fiscalizada

A principios de 2018, el área de siembra de alfalfa se estimaba en cerca de 3,2 millones de hectáreas, de los cuales aproximadamente el 60 % correspondía a alfalfares puros –destinados principalmente a la producción de leche bovina y la henificación– y el restante 40 % a siembras asociadas con gramíneas templadas para la producción de carne en condiciones de pastoreo. No obstante, siguiendo una tendencia que se viene materializando desde hace unos años, el área alfalfada a mediados de 2019 había descendido a poco menos de 3 millones de ha. Si bien no se cuenta con datos oficiales de superficie sembrada, esta disminución es compatible con la cantidad de semilla fiscalizada que se consumió en el país durante el período 2016/2019, según la información de la Cámara de Semilleristas de la Bolsa de Cereales (CSBC) que se ofrece en la Tabla 1 (Zingoni, M. comunicación personal, 2019).

■ **Tabla 1.** Oferta y consumo de semilla fiscalizada de alfalfa peleteada en Argentina durante el período 2016/19. Datos tomados de la CSBC en octubre de 2019.

Temporada	Oferta (t) (*)	Consumo (t)	Carry-over (t)	Valor (USD)
2016/17	8.781	6.147	2.634	46.102.292
2017/18	7.202	4.681	2.521	30.405.769
2018/19	5.732	2.866	2.866	16.623.054

(\*) t = toneladas métricas; carry-over = diferencia entre oferta y consumo de cada temporada

A las cifras de la Tabla 1 se suma una cantidad no determinada de semilla de “propia producción” (también llamada de “uso propio”) y otra cantidad –tampoco determinada, pero asumida como importante– de semilla ilegal que vulgarmente se conoce como “bolsa blanca”. Por un lado, esta semilla, generada y comercializada fuera de las normas de fiscalización obligatoria que tiene el cultivo, y por lo tanto sin el rótulo oficial que proporciona el Instituto Nacional de Semillas (INASE), no solo lesiona los intereses legítimos de los obtentores y propietarios de las variedades mejoradas, sino que tampoco asegura la calidad genética y física de la semilla. Es común observar que la “bolsa blanca” es

portadora de una gran cantidad de semilla de malezas, que disminuyen la producción de forraje y aumentan los costos de producción en los lotes implantados con ella. Por otro lado, la mayoría de esa semilla es el resultado de una cosecha secundaria a la producción de forraje, sin prácticas efectivas de polinización, lo que origina una gran cantidad de semilla autofecundada, lo que generará una pastura con una importante población de plantas de escaso vigor; esto último se traduce no solo en menor producción de forraje sino también en menor persistencia. En consecuencia, el supuesto ahorro que significaría usar una semilla más barata (como generalmente es el caso de la "bolsa blanca"), termina generando un costo muy alto por kg de MS (materia seca) producido.

Las causas de la lenta pero firme disminución del área de siembra de alfalfa obedecen a varios factores, entre ellos, el cambio en el uso de la tierra que se dio a partir de 2003/04, donde los mejores suelos se destinaron a la producción agrícola pura, todavía sigue condicionando la disminución de pasturas en gran parte de la región pampeana. El desplazamiento de los recursos forrajeros hacia suelos de menor aptitud planteó dificultades al uso de la alfalfa, que para producir y persistir exige buenos niveles de fertilidad química y adecuadas características físicas.

Concomitantemente, la necesidad de intensificar los niveles de producción en suelos de buena aptitud, a fin de competir con la agricultura, provocó un profundo cambio en los sistemas de producción ganadera, donde el pastoreo directo viene perdiendo relevancia respecto de los sistemas que utilizan un variado grado de confinamiento, desde el total en planteos lecheros intensivos y de engorde a corral (feedlots), a los planteos con base pastoril y suplementación estratégica. En este contexto, el uso de silajes de maíz y sorgo y el empleo de distintos suplementos energéticos y proteicos han desplazado la utilización de las pasturas de alfalfa, al menos en la medida en que se usaban algunos años atrás. Si bien todavía una proporción cercana al 40 % de la producción de leche bovina todavía se lleva a cabo con una base pastoril donde la alfalfa es una parte central de la alimentación, no es menos cierto que ese uso pastoril se está concentrando en tambos de mediana a baja producción ( $\leq 130$  vacas en ordeño) y de superficies promedio no superiores a las 150 ha. Por un lado, en consecuencia, se aprecia una notable concentración de la producción en tambos de gran tamaño,

donde el sistema exclusivo es el confinamiento total en el que el heno de alfalfa (megafardos) es a menudo adquirido fuera del establecimiento y utilizado básicamente como fuente de fibra efectiva. En 2019 se estimaba que solo unos 340 tambos de gran tamaño generaban más litros de leche que el resto de los 6.000 que operaban en las cuencas lácteas del país. En este sentido, mientras que hacia 1990 las pasturas de alfalfa constituían el 60-70 % de la alimentación en los tambos, hacia 2019 esa cantidad se había reducido al 30-35 %.

Por otro lado, tanto la mayor demanda de heno de alfalfa de calidad que generó la proliferación de sistemas intensivos en confinamiento, sea de leche o de engorde, como las posibilidades de exportación de heno de alta calidad hacia mercados exigentes –como Arabia Saudita y Emiratos Árabes Unidos– favorecieron el advenimiento de productores de alfalfa especializados en la producción de rollos y megafardos. Se estima que en 2019 se registraban unas 110.000 ha de alfalfa destinadas a la producción de heno de alta calidad, distribuidas de la siguiente manera: a) secano: 35.000 ha en la parte centro-este de Córdoba; b) regadío: 23.000 ha en la cuenca del Río Dulce en Santiago del Estero; 6.000 ha en los valles del norte de San Luis; 16.000 ha en los oasis de la provincia de Mendoza, particularmente en el sur; 2.000 ha en el área de regadío de La Pampa; cerca de 4.000 ha en el valle inferior del río Colorado; y 15.000 ha en los valles de los Río Negro y Chubut, en la Patagonia. A ello se suma un estimado de 9.000 ha en condiciones de secano esparcidas en la zonas subhúmedas y semiáridas del O de Buenos Aires, NE La Pampa, S de Córdoba y SE de San Luis. De todos modos, aunque importante, esta producción de alfalfa para heno de calidad no alcanzó a compensar totalmente la pérdida de pasturas de alfalfa en el país que se comentara más arriba. No obstante, es importante resaltar que esta producción especializada hacia una producción de mayor calidad ha contribuido a crear una mayor conciencia sobre la necesidad de ajustar el manejo de los lotes y de utilizar maquinaria de henificación de alta tecnología. Prueba de ello es la constitución en 2017 de la Cámara Argentina de la Alfalfa (CAA) ([www.alfalfaargentina.org](http://www.alfalfaargentina.org)), una institución privada que nuclea a importantes productores de heno, cubos y pellets del país. La CAA tiene por finalidad tanto la defensa de los intereses profesionales del sector, así como la promoción de la investigación y el desarrollo de la producción, elaboración, logística y comercialización

interna o externa del heno de alfalfa y sus derivados, sea directamente per se o en colaboración con organismos oficiales, mixtos o privados del país o del exterior.

Como ejemplo de lo mencionado sobre la creciente importancia de la producción especializada de heno, y de acuerdo con datos proporcionados por el INTA Villa María (Dequino, S. comunicación personal), la superficie de alfalfa en el área de influencia de la Cuenca Lechera de Villa María (provincia de Córdoba) fue de 186.000 ha en 2014 a 155.000 ha en 2016, y retornó a las 180.000 ha en 2018. Analizando estos datos en conjunto, y en un marco de disminución del número de tambos en la cuenca, se aprecia que mientras que en los departamentos de Unión y San Martín –netamente tamberos– el área de alfalfa disminuyó entre 2014 y 2018, en los departamentos Río Segundo y Tercero Arriba, donde la producción especializada de heno ha crecido, el área de alfalfa registró incrementos durante el mismo período.

## Inscripción de cultivares de alfalfa en Argentina

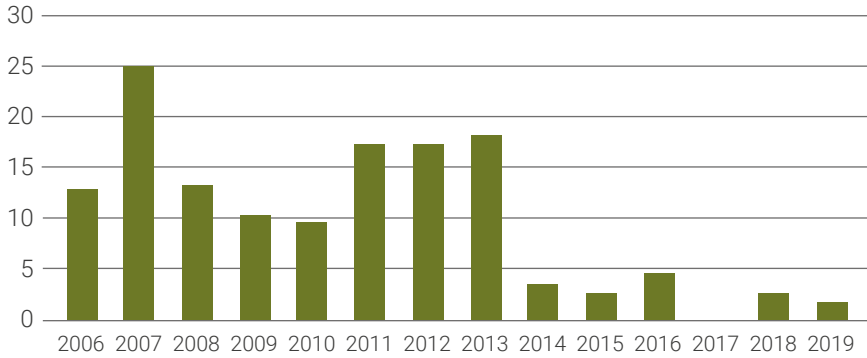
Entre 2006 y mediados de 2019 se inscribieron en el Registro Nacional de Cultivares (RNC) del INASE un total de 141 cultivares<sup>1</sup> de alfalfa. Considerando cada año en forma individual, la mayor cantidad de inscripciones (27) se registró en el año 2007 (Figura 1). A partir de 2014, el número de inscripciones aprobadas por el RNC tuvo una disminución constante, en particular en los últimos tres años del período analizado: ninguno en 2017, tres en 2018 y dos en 2019 (período enero-julio). La marcada caída en el desarrollo de nuevas variedades en los últimos años está en consonancia con lo expresado precedentemente acerca de la disminución del área de siembra de alfalfa.

Por un lado, en la Figura 2 se grafica el origen de los 141 cultivares inscriptos entre 2006 y 2019. Si bien se aprecia una participación importante de criaderos argentinos, no debe perderse de vista que una cantidad no menor de esos cultivares, si bien pudieron ser inscriptos

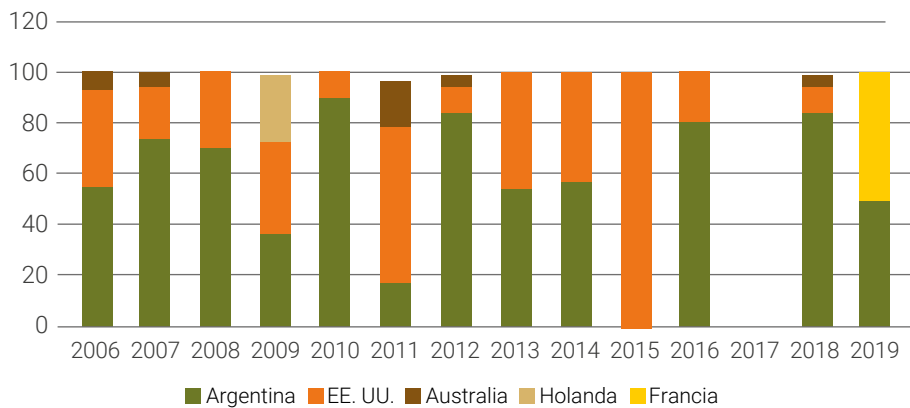
---

<sup>1</sup> El término “cultivar” es equivalente al de “variedad comercial” o simplemente “variedad” y deriva del término inglés *cultivated variety*, para diferenciarlo de las “variedades botánicas”

por empresas nacionales, tuvieron su origen en programas de mejoramiento genético de otros países.



**Figura 1.** Cantidad de cultivares de alfalfa registrados en Argentina entre 2006 y 2019. Fuente: INASE (7).



**Figura 2.** Participación porcentual del país de origen de los cultivares de alfalfa inscriptos en el RNC-INASE entre 2006 y 2019. Fuente: INASE (7).

Por otro lado, entre agosto de 2019 y marzo de 2020, se inscribieron otros cuatro cultivares y se presentaron los legajos de inscripción –para iniciar el trámite correspondiente– otros cuatro nuevos cultivares. Con el tiempo se verá si esto marca un quiebre de la tendencia bajista que se ha observado durante los últimos años, como ya fuera señalado.

Durante la última década, la mayoría de los programas de obtención de variedades de alfalfa han indicado la necesidad de desarrollar alfalfas

tolerantes a estreses abióticos, adaptadas a ambientes menos favorables; no obstante, se puede decir que la gran mayoría de los cultivares inscriptos en ese período se encuadran dentro de lo que se considera como “genética convencional”, esto es seleccionados por mayor producción de forraje y resistencia combinada a plagas y enfermedades. En oposición a esta tendencia, se diferencian claramente cuatro cultivares de reciente lanzamiento: dos materiales genéticamente diseñados (GE), también denominados genéticamente modificados (OGM), inscriptos en 2018 por una empresa privada, que reúnen tolerancia a glifosato de amonio (RR®) y menor contenido de lignina (HarvXtra®); y dos variedades inscriptas por el INTA a fines de 2019: una tolerante a condiciones de salinidad y otra con alta expresión multifoliolada, lo que le otorga una mayor calidad forrajera, en particular mayor contenido de proteína y más alta relación hoja: tallo.

## Criterios para la elección del cultivar

Desde su creación en 1982, el RNC tenía inscriptos hasta 2019 un total de 429 cultivares. Si bien, la mayoría de ellos ya son obsoletos y fueron retirados del mercado, actualmente, se comercializa un muy alto número de cultivares, lo que dificulta al productor la identificación de cuáles son los mejores para cada zona del cultivo. Solo en 2018, se ofrecían en el mercado nacional más de 120 variedades, pertenecientes a un rango de grados de reposo invernal (GRI) de 6 a 10 y provenientes tanto de programas de mejoramiento públicos como privados.

A fin de guiar la elección de las mejores variedades para cada ambiente, se proponen algunos criterios a tener en cuenta por parte del productor o asesor profesional. En primer lugar, debe entenderse que no todos los cultivares son iguales ni proporcionan los mismos niveles de producción de forraje, persistencia y sanidad. En segundo lugar, se sugiere considerar el potencial de rendimiento de materia seca por hectárea. En tercer lugar, si bien el rendimiento es probablemente la característica más sobresaliente en el proceso de elección, se recomienda enfáticamente no dejar de lado otros caracteres, tales como el grado de reposo invernal, la persistencia y la resistencia a plagas y enfermedades. Es importante que todos estos atributos sean considerados en conjunto



porque en muchas ocasiones la no detección de diferencias en producción de forraje no es sinónimo de similitud entre variedades (Casler y Undersander, 2000).

Debido a que las condiciones ambientales modifican la expresión de las características antes mencionadas, es recomendable basar la elección de los cultivares en la información de comportamiento generada en el área donde se sembrará el cultivo, o al menos de un área ambientalmente similar. Para tal fin, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) cuenta con una Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa (RECA), que incluye 14 localidades distribuidas en ambientes tanto de secano (región Pampeana, dividida en zonas semiárida, subhúmeda y húmeda) como de riego (NOA y Patagonia). En esa red, coordinada desde INTA Manfredi (Córdoba), los ensayos se evalúan durante cuatro temporadas (primavera-verano-otoño), a fin de tener no solo una estimación del rendimiento de materia seca sino también de la persistencia de los cultivares. Los ensayos, con series que se siembran cada dos años, se dividen en dos grandes grupos: a) ensayos territoriales de alfalfa de cultivares con reposo invernal moderado o intermedio (GRI 5-7) o ETA CRIM; y b) ensayos territoriales de alfalfa de cultivares sin reposo invernal (GRI 8-10) o ETA SRI. Una información detallada sobre el funcionamiento de esta red, así como los cultivares más destacados en cada localidad, se ofrece en el capítulo 8 de este libro.

## Grados de reposo invernal (GRI)

El reposo invernal es una característica genética de la alfalfa por la cual, en respuesta a la disminución del fotoperíodo y a las bajas temperaturas de otoño-invierno, las plantas reducen su crecimiento (McKenzie *et al.*, 1988). Esos factores ambientales desencadenan un proceso de aclimatación durante el cual se produce una acumulación de hidratos de carbono y compuestos nitrogenados en la parte superior de la raíz y en la corona, los que luego en primavera –cuando las condiciones ambientales sean propicias– posibilitarán el reinicio del crecimiento de la planta.

El reposo invernal se clasifica en grados (GRI) que se determinan de acuerdo a la altura del rebrote medido a los 25-30 días del último corte

de otoño, según una escala que contempla incrementos de 5 cm entre grados sucesivos (Teuber *et al.*, 1998). En los Estados Unidos se definen 11 GRI, cada uno representado por variedades testigo. En igual sentido, el legajo para la inscripción de variedades de alfalfa aprobado por el INASE también reconoce 11 GRI, desde GRI 1 (extremadamente con reposo) a GRI 11 (extremadamente sin reposo).

Los cultivares, dependiendo de su GRI, responden de diferente manera a las condiciones otoño-invernales, lo que a su vez determina la distribución de la curva de producción de forraje a lo largo de la temporada de crecimiento. Así, las variedades con reposo (GRI 1-4), que son más sensibles a las señales fisiológicas disparadas por las bajas temperaturas y por la menor longitud del día, detienen su crecimiento a principios del otoño como expresión de un mecanismo de protección contra el frío y las heladas. Por el contrario, los cultivares sin reposo (GRI 8-11) son menos sensibles a estas condiciones ambientales y continúan su crecimiento mientras la temperatura se mantenga  $\geq 5$  °C (Poole *et al.*, 2003), aún a costa de sufrir daños por las heladas. Por esto último, el uso de este tipo de cultivares se recomienda principalmente para áreas templadas, con inviernos no excesivamente rigurosos.

Si bien los cultivares ofrecidos en el mercado argentino van de GRI 5 a 10, durante la última década se produjo una marcada tendencia hacia la oferta de GRI 7-10. En la actualidad hay muy pocas variedades de GRI 5 que se recomiendan para el sur de la región Pampeana y la Patagonia. Los cultivares de GRI 8-10 se aconsejan para las producciones de leche bovina, donde todavía el uso del pastoreo directo sigue siendo importante y, por lo tanto, se requiere de forraje verde durante todo el año. También, por las mismas razones de pastoreo directo a lo largo del año, se aconsejan para producciones intensivas de carne y para la confección de reservas forrajeras (heno y henolaje) bajo riego o secano. Por su parte, los de reposo intermedio (GRI 6-7) se aconsejan para las producciones de carne más extensivas y en las zonas más australes, bajo pastoreo directo y asociados en muchos casos con gramíneas templadas. También son utilizados para la confección de heno, atento a su mayor pico de producción primaveral y al hecho de ofrecer una alta producción de forraje con un menor número de cortes que los sin reposo.

## Persistencia

Entre los varios factores que determinan la persistencia de la alfalfa, la resistencia múltiple a plagas y enfermedades suele consignarse por lejos como el más importante. Sin embargo, la experiencia de varios años indica que la persistencia del cultivo es un fenómeno complejo, donde el comportamiento sanitario constituye solo uno de los factores que la determinan. La supervivencia de las plantas incluye varios procesos fisiológicos interdependientes –y no totalmente esclarecidos– que condicionan la adaptación al ambiente y el comportamiento agronómico a lo largo del tiempo.

Como se señaló precedentemente, el rendimiento de forraje está directamente relacionado con la densidad de plantas del cultivo. Con base en la información producida por la RECA, se determinó que –para una amplia gama de localidades y cultivares de distinto GRI– existe una correlación lineal y positiva ( $r = 0,35$ ;  $p < 0,0004$ ) entre la producción de forraje acumulada y la persistencia a lo largo de cuatro temporadas de evaluación. No obstante, como lo señalaron Kallenbach *et al.* (2002), esta asociación puede no verificarse en muchos casos particulares. De acuerdo con Sheaffer *et al.* (1988), esto podría deberse –al menos parcialmente– a que el cultivo puede compensar la pérdida de plantas con un aumento del número de tallos en las plantas remanentes. En ese sentido, el número de tallos  $m^2$  sería un mejor indicador de la potencialidad del cultivo que el número de plantas  $m^2$ .

A similitud de lo que ocurre en la producción de forraje, también en la persistencia se detecta una importante interacción variedad x localidad, lo que equivale a decir que para una misma variedad la persistencia varía tanto entre períodos de utilización como entre localidades. Por todo ello, es aconsejable consultar también la persistencia de los cultivares en cada localidad a fin de elegir el más adaptado para la zona en la que se pretende su utilización.

## Resistencia a plagas y enfermedades

Además del efecto que las plagas y las enfermedades ejercen *per se* sobre la productividad y la persistencia de la alfalfa, se debe también tener en cuenta su acción en detrimento de la calidad del forraje y en la predisposición para intensificar el daño de otros agentes de estrés, tanto bióticos como abióticos. Por ello, la elección de las variedades debe orientarse hacia aquellas que ofrezcan los más altos niveles de resistencia a las plagas y las enfermedades que mayor importancia tengan en el área para sembrar, especialmente las de mayor impacto económico.

En un trabajo de Hijano y Pérez Fernández (1995) se identificaron las principales enfermedades que, por difusión y grado de daño, afectaron al cultivo en la región Pampeana durante la década de 1990. Entre ellas, se citaban especialmente a la “corchosis”(Xylaria spp.); el complejo de podredumbres de corona y raíz (*Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Phoma* spp., etc.); la podredumbre húmeda o fitóftora (*Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*), la fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*) y la antracnosis (*Colletotrichum trifolii*). Más tarde, con la difusión masiva de los cultivares sin reposo, se tornaron también importantes las enfermedades foliares (*Leptosphaerulina briosiana*, *Leptotrochilla medicaignis*, *Uromyces striatus*, *Pseudopeziza medicginis*, *Phoma* spp., etc.), que si bien no eliminan plantas como las anteriores, pueden disminuir significativamente la calidad y el rendimiento de forraje (Gieco *et al.*, 2007). Durante la última década se han identificado en todo el país daños crecientes del complejo viral del achaparramiento y enación de la alfalfa (Bejerman *et al.*, 2011). Investigaciones recientes han identificado que en dicho complejo intervienen al menos siete virus (Trucco *et al.*, 2018). En el capítulo 9 de este libro se ofrece un tratamiento más completo de las principales enfermedades del cultivo en el país.

Entre las plagas más importantes se encuentran los pulgones moteado (*Therioaphis trifolii*), verde (*Acyrtosiphum pisum*) y azul (*A. kondoi*), las orugas (*Colias lesbia*, *Agrotis malefida* y *Porosagrotis gypaetina*) y el complejo de gorgojos de la alfalfa (*Pantomorus leucoloma*, *P. auripes*, *P. verecundus*, *P. viridisquamosus*, *Naupactus cinereidorsum* y *Priocyphus bosqui*) (Aragón *et al.*, 2007). El pulgón negro (*Aphis craccivora*), con-

siderando históricamente como plaga secundaria, ha cobrado mayor importancia por ser el vector del complejo viral del achaparramiento.

Lamentablemente, frente a este panorama de ataque de enfermedades y plagas, solo se cuenta con cultivares que ofrecen altos niveles de resistencia a los tres primeros pulgones mencionados, a la fitóftora, la fusariosis y la antracnosis. El resto de plagas deben manejarse mediante la implementación de sistema de control integrado, una vez alcanzados los niveles de daño económico. Las enfermedades para las que no existen variedades resistentes se deben controlar con prácticas de manejo adecuadas, como evitar acumulaciones de agua en los lotes bajo riego, adelantar el corte o pastoreo ante presencia de enfermedades de hoja, rotación de cultivos, etc. El uso de fungicidas en alfalfa no es una práctica económica y, por lo tanto, no empleada en Argentina.

Según su reacción frente al ataque de un patógeno, los cultivares se pueden clasificar como: a) resistentes: las plantas son capaces de restringir o eliminar la actividad del agente dañino; b) tolerantes: las plantas no impiden el avance ni el desarrollo del patógeno, pero lo soportan sin manifestar disminución significativa de su producción; y c) susceptibles: las plantas son incapaces de restringir la actividad del patógeno y sufren daños económicos o la muerte. A su vez, el nivel de resistencia de una variedad se mide por el porcentaje de plantas sobrevivientes en pruebas estandarizadas y bajo condiciones controladas (NAAIC, 1998). De esa forma se las clasifica como: susceptible: < 5 %; de baja resistencia: 6-15 %; moderadamente resistente: 16-30 %; resistente: 31-50 %; y altamente resistente: > 51 %. Es importante puntualizar que en ningún momento se habla de "inmunidad" y que aun las variedades catalogadas como resistentes o altamente resistentes pueden sufrir algún grado de daño si las condiciones son muy propicias para el patógeno en cuestión.

## Alfalfas GE (u OGM)

Una forma de ampliar la variabilidad genética, a fin de mejorar caracteres específicos de los cultivos, es el uso de la transgénesis. Esta técnica consiste en la introducción de genes de otras especies que no existen

naturalmente en la especie que se quiere mejorar. El resultado es la obtención de productos que se denominan normalmente como “organismos genéticamente modificados” (OGM), aunque una forma más correcta sería nombrarlos como organismos genéticamente diseñados o “GE” (por sus siglas en inglés *genetically engineered*).

El primer logro concreto derivado del uso de la transgénesis en alfalfa fue la obtención de cultivares tolerantes al herbicida glifosato de amonio (Roundup®), conocidas vulgarmente como “alfalfas RR” (Roundup Ready®). Estas variedades, que fueron desarrolladas por una empresa de EE. UU. mediante el uso de los eventos J101, J163 y J101xJ163, se desregularon para su cultivo en los Estados Unidos (primero en 2005 y, luego de un paréntesis legal, definitivamente en 2011), Canadá (2005), México (2005) y Japón (2006). Poco después, estos cultivares fueron lamentablemente introducidos de contrabando en nuestro país y alcanzaron una difusión importante. No obstante, debe tenerse en claro que estas variedades de alfalfa RR son ilegales en nuestro país y que, por lo tanto, el productor debe abstenerse de su uso. Además de infringir los derechos del obtentor, constituyen una grave amenaza para las exportaciones de heno, dado que los principales mercados de la alfalfa argentina exigen forraje sin presencia de transgénicos.

Posteriormente, la misma empresa obtuvo en 2014 la desregulación en EE. UU. y Canadá del evento KK179, que a través de un proceso de silenciamiento génico por RNA de interferencia (*knock down o down regulation*) disminuye el contenido de lignina en los tallos (Temple y Dixon, 2018). Esta tecnología, que se comercializa como HarvXtra®, confiere una mayor digestibilidad a igual estado de madurez frente a una alfalfa convencional (es decir, con la síntesis de lignina sin alteraciones); o bien, le permite conservar un nivel de digestibilidad propio de estados de madurez más tempranos (botón floral/10 % de floración) a estados más avanzados de madurez (30-50 % de floración). Utilizando esta tecnología, la empresa desarrolló variedades de alfalfas con dos eventos apilados: KK179xJ101, es decir, alfalfas RR con menor contenido de lignina (HarvXtra-RR®). Estos cultivares se desregularon no solo en Estados Unidos sino también en Canadá, Japón y Argentina (Ministerio de Agroindustria, 2018). Hasta el año 2019 había en Argentina dos cultivares RR+HarvXtra inscriptos en el RNC y, por lo tanto, con autorización

de comercialización (desregulados). El resto de los materiales exclusivamente RR (eventos J101 y J163), es decir, sin tecnología HarvXtra apilada, que fueron introducidos como se comentara precedentemente, continúan siendo ilegales y nunca fueron aprobados para su uso en el país.

El uso de las alfalfas RR, independientemente de las reservas que puedan hacerse desde algunos sectores sobre el incremento del riesgo de generar malezas resistentes al glifosato, es una tecnología que puede aportar mejoras interesantes a la producción del cultivo. Esta tecnología, obviamente diseñada para alfalfares puros, facilita el control de las malezas y, bien usada, puede constituir una herramienta muy útil. Dentro de las prácticas que hacen al correcto uso de estos cultivares, resaltan básicamente dos: i) aplicar glifosato cuando realmente resulte necesario y de acuerdo a las normas recomendadas; y ii) no utilizar glifosato como única arma de control de malezas, alternándolo con otros herbicidas selectivos para alfalfa y con otras técnicas de manejo, como control mecánico o cultural.

## Desarrollo de alfalfas GE en Argentina

Como resultado de un esfuerzo conjunto que se desarrolló enteramente en el país y que involucró tanto al sector público (INTA-IGEAF y CONICET) como al privado, se desarrollaron poblaciones sintéticas de alfalfa transgénica con tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, que se encuentra actualmente en el largo y costoso proceso de desregulación comercial (Jozefkowicz *et al.*, 2016; Jozefkowicz *et al.*, 2018). La transformación genética fue mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y se empleó el protocolo desarrollado por el IGEAF INTA Castelar (García *et al.*, 2014; Jozefkowicz *et al.*, 2016) con glufosinato de amonio como agente selectivo (este trabajo se explica con más detalle en el capítulo 7 de este libro). El glufosinato de amonio es un herbicida de contacto y de amplio espectro de acción, por lo que constituye una herramienta muy interesante para controlar malezas anuales y perennes que provengan de semilla, incluyendo aquellas malezas que se han tornado resistentes al glifosato. De este modo, aplicándolo durante la etapa de implantación del cultivo, dentro del denominado "período crítico de competencia", se

puede partir de lotes con un muy bajo nivel de infestación de malezas, aumentando así la probabilidad de obtener alfalfas productivos y longevos. El lanzamiento comercial de esta alfalfa tolerante a glufosinato puede llevar varios años, habida cuenta de que no solo deben completarse los requisitos para su desregulación, sino que también debe realizarse la multiplicación a escala comercial de la semilla bajo estrictas normas de seguridad.

Otra de las líneas de trabajo del INTA IGAEF es la implementación del sistema de edición génica basado en la técnica CRISPR/Cas9 para mejorar caracteres como la tolerancia a herbicidas, el retardo de la floración, la tolerancia a estreses abióticos, el retraso de la senescencia de hojas, el aumento del rendimiento de forraje y la mayor eficiencia de nodulación. Estos trabajos, todavía en su etapa inicial, también se tratan con mayor detenimiento en el capítulo 7. Desde el punto de vista regulatorio, una de las mayores ventajas de la edición génica es que en Argentina –y algunos otros países– la liberación de los productos que se obtengan por esta vía no requeriría de tratamientos especiales de aprobación que tienen los productos transgénicos, de modo que solo se seguirían los requisitos exigidos para cualquier variedad convencional.

## Flujo génico desde alfalfas transgénicas

Aun cuando las alfalfas transgénicas se usen en forma correcta, deberían también tenerse en cuenta los posibles perjuicios que el flujo génico desde estos cultivares puede hacerle a la producción nacional de semilla de alfalfas convencionales (no GE). En este sentido, debería implementarse una serie de medidas destinadas a disminuir la presencia no deseada o adventicia (PA) de transgenes, preservando así la pureza genética de las variedades convencionales.

Se define como flujo génico al intercambio de genes entre dos poblaciones. La presencia indeseada de transgenes en una población convencional de alfalfa se puede dar básicamente por dos fenómenos: flujo génico mediado por polen o flujo génico mediado por semillas (Van Deynze *et al.*, 2008).



### *Flujo génico por intercambio de polen*

Para que esto ocurra, debe obviamente concretarse la formación de semilla proveniente de la fecundación cruzada (alogamia) y el subsecuente establecimiento de las plántulas originadas por esas semillas. En el caso particular de la alfalfa, el flujo génico a través del polen depende de la distancia de aislamiento entre las dos poblaciones (es decir, entre la alfalfa transgénica y la convencional), la frecuencia génica, la sincronización de la floración entre las dos poblaciones, y la densidad y el tipo de polinizadores.

Considerando los usos de la alfalfa (producción de semilla y producción de forraje, sea para heno o pastoreo) y la presencia de plantas de alfalfa asilvestradas (alfalfa feral), se podrían dar nueve combinaciones entre la población fuente de polen y la población receptora de polen: 1) de heno/pastoreo a heno/pastoreo; 2) de heno/pastoreo a semilla; 3) de heno/pastoreo a feral; 4) de semilla a heno/pastoreo; 5) de semilla a semilla; 6) de semilla a feral; 7) de feral a heno/pastoreo; 8) de feral a semilla; y 9) de feral a feral. Van Deynze *et al.* (2008) hacen una consideración detallada de las probabilidades de ocurrencia del intercambio génico en esas situaciones. Basado en ello, y adaptando el análisis a la realidad argentina relativa a los lotes de producción comercial (heno/pastoreo o semilla), podrían resumirse las siguientes consideraciones:

- De heno/pastoreo a heno/pastoreo: usualmente la probabilidad de heno a heno es muy baja porque deberían superarse una serie de barreras ambientales que incluyen el momento de corte (normalmente de botón floral a inicios de floración), la escasez de polinizadores, la remoción completa de toda la biomasa aérea (que previene la formación de semillas) y la remota posibilidad que tiene una semilla de alfalfa formada en un lote de producción de heno de germinar, establecerse y contribuir significativamente a la producción de forraje. El caso de los lotes de alfalfa en pastoreo puede incrementar la probabilidad de intercambio génico dado que los pastoreos se hacen a principios de floración ( $\geq 10-20\%$ ) o en estadios más avanzados ( $\geq 50\%$ ) para evitar el empaste. Además, el pastoreo normalmente no remueve toda la biomasa (eficiencias de uso del 50 al 75 %).

- De semilla a heno/pastoreo: la situación tiene muchos puntos en común con la descrita anteriormente, si bien la presencia de plantas totalmente florecidas y la abundancia de polinizadores en un lote para semilla incrementan las probabilidades de ocurrencia. De todos modos, el manejo recomendado del esquema de cortes para heno (botón floral a inicios de floración) previene normalmente la formación de semilla en el lote para henificación.
- De alfalfa feral a heno/pastoreo: nuevamente, las barreras mencionadas en el primer caso (heno a heno) aplican en su mayoría en esta situación. Sin embargo, la probabilidad de ocurrencia es aún menor, habida cuenta que las plantas ferales son normalmente muy escasas y de baja producción de polen (en comparación con plantas bajo cultivo). Además, el manejo oportuno de los cortes en la población para heno disminuye notoriamente el riesgo. De todos modos, el corte (para evitar la sincronía de floración) o la eliminación de las plantas ferales es una práctica recomendada.
- De heno/pastoreo a semilla: por un lado, en este caso la probabilidad es algo mayor que en los casos anteriores debido a factores como el grado y la duración de la floración y la presencia de polinizadores en el lote para semilla. Por otro lado, si el manejo de los cortes para heno y las normas de fiscalización de semilla se cumplen adecuadamente, la probabilidad de flujo génico es baja. Para disminuirla aún más, el uso de mayores distancias de aislamiento sería aconsejable. Como se mencionara anteriormente para otras situaciones, la probabilidad de flujo génico se incrementaría en el caso de lotes para pastoreo por la mayor probabilidad de plantas florecidas durante más tiempo.
- De feral a semilla: la probabilidad en este caso es muy baja, dependiendo de la ocurrencia, intensidad y duración de la floración en plantas ferales; de su sincronía con el lote de producción de semilla; de la distancia de aislamiento; y del tipo de polinizadores presentes. Dado que la mayoría de las zonas de producción de semilla se ubican en regiones áridas o semiáridas, la cantidad de plantas ferales de alfalfa fuera de los lotes irrigados es (o debería ser) escasa.
- De semilla a semilla: es el escenario de mayor posibilidad de intercambio génico entre dos poblaciones de alfalfa, dado que el manejo de los lotes está destinado a generar las máximas condi-

ciones de polinización para la mayor producción de semilla posible. En este contexto, habrá sincronía de floración entre los dos lotes, abundante presencia de polinizadores y muy alta cantidad de semillas maduras. Por eso, a efectos de mitigar este natural flujo génico, se establecen en los regímenes de fiscalización las distancias mínimas de aislamiento que se deben observar a fin de mantener la pureza varietal. Para el caso de las alfalfas convencionales, las distancias establecidas (que en Argentina son 200 m para semilla básica, 100 m para primera multiplicación y 50 m para segunda multiplicación) se consideran suficientes para preservar la pureza genética dentro de parámetros razonables. No obstante, atendiendo a que las distancias de vuelo de los agentes polinizadores son significativamente distintas, esas distancias deberían revisarse. En el caso de la “abeja cortadora de hojas” (*Megachile rotundata*) se ha detectado flujo génico hasta una distancia cercana a los 600 m. Por el contrario, en el caso de la “abeja melífera” (*Apis mellifera*), se ha detectado que el flujo génico, si bien en muy baja proporción, es posible hasta una distancia cercana a los 5 km. No obstante lo anterior, el caso de flujo génico entre lotes de producción legal de semilla transgénica y convencional en Argentina debería ser –al menos en el presente– nulo, dado que la empresa titular de la tecnología HarvXtra no multiplicará semilla de esas variedades en dicho país. En consecuencia, el escenario –siempre hablando de semilla legal– comprendería desde lotes transgénicos para heno o pastoreo hacia lotes de producción de semilla convencional. En un futuro, si se lanzaran otras variedades transgénicas que se multiplicaran en el país, la situación debería cambiar.

### *Flujo génico mediado por semillas*

Existen tres potenciales vías para generar flujo génico a través de semillas de alfalfa: 1) mezcla de lotes de semilla transgénica y convencional durante la cosecha de lotes, el proceso de limpieza y clasificación y el proceso de pelleteo (pildorado); 2) el establecimiento de plantas transgénicas voluntarias, provenientes del banco de semillas, en un lote de producción de semilla de alfalfa convencional que se haya implantado en un lote que anteriormente haya sido usado con alfalfa transgénica;

y 3) dispersión por animales que hayan pastoreado un lote de alfalfa transgénica con presencia de semillas maduras.

De los tres casos anteriores, el primero es el de mayor probabilidad de ocurrencia. Por lo tanto, una cuidadosa limpieza de la maquinaria de cosecha y un riguroso control del sistema de procesamiento de semilla en todo momento, a fin de prevenir mezclas y detectar presencia adventicia de transgénicos, son elementos fundamentales para prevenir problemas. Además, la implantación de lotes de multiplicación de semillas convencionales debería hacerse con semilla que haya sido analizada y en la que no se haya detectado la presencia adventicia de semilla transgénica. En este sentido, se recomienda consultar el trabajo *Best Management Practices for Adventitious Presence-Sensitive Alfalfa Seed Production* (NAFA, 2015a).

## Prácticas para la producción de semillas convencionales sin PA

A fin de disminuir significativamente la probabilidad de presencia adventicia (PA) de semilla transgénica en lotes de semilla convencional, se sugieren las siguientes medidas para tener en cuenta para el manejo de los lotes de producción de semilla:

- Para la implantación de lotes convencionales, usar semilla de variedades en las que no se haya detectado presencia de transgénicos.
- Sembrar en lotes que no hayan tenido alfalfa (particularmente transgénica) al menos en las tres campañas anteriores.
- Cuidadosa limpieza de la maquinaria de siembra.
- Utilizar mayores distancias de aislamiento entre diferentes tipos de variedades (transgénicas y convencionales). Esto está relacionado con el tipo de polinizador predominante.
- Usar polinizadores de menor radio de vuelo, particularmente *M. rotundata*. Además, estos insectos son de 10 a 20 veces más eficientes en polinizar flores que la abeja melífera.
- Cosechar en forma diferente los bordes de los lotes (más susceptibles de contaminación con polen foráneo) y los sectores centrales.

- Coordinar con los vecinos para que no utilicen variedades transgénicas.
- Relacionado con el punto anterior, otra posibilidad es declarar zonas “libres de transgénicos” para la multiplicación de semillas convencionales. A modo de orientación, se sugiere consultar el documento *Grower Opportunity Zones for Seed Production* (NAFA, 2915b).
- Limpieza cuidadosa de toda la maquinaria de recolección y trilla de semillas antes de entrar a cosechar los lotes.
- Monitoreo de cada lote de semilla que entra a la planta de procesamiento para la detección de presencia de transgénicos.
- Control permanente de todo el proceso de limpieza y clasificación de semilla.

Este paquete tecnológico de buenas prácticas para la producción de semilla convencional se debería complementar con las acciones que se sugieren a continuación:

- Definición de un protocolo de muestreo y de métodos de análisis de uso uniforme para determinar presencia de transgenes.
- Complementando lo anterior, establecer una red de laboratorios homologados para los análisis correspondientes.
- Atentos a la dificultad práctica de generar partidas de semilla totalmente libres de PA de transgénicos, se sugiere definir tolerancias de PA en lotes de semillas convencionales. Esas tolerancias podrían ser más o menos exigentes de acuerdo al destino de la producción. Si se tratara de abastecer a mercados muy sensibles a la PA, los lotes de semilla deberían ser rotulados como de “presencia no detectada” y no “libres de transgénicos”, porque esto último es un requisito imposible de cumplir en la práctica, dado que supondría analizar –y destruir– cada semilla individual. Para mercados menos exigentes, o que acepten la presencia de transgénicos, esas tolerancias podrían ser más laxas. Para más información se sugiere consultar Putnam *et al.* (2016).
- Ampliar las distancias de aislamiento para lotes de producción de semilla. Esto estará en función del tipo de polinizadores que se empleen, habida cuenta de los significativamente diferentes radios de vuelo de la abeja melífera y del megachile. Estas distancias también estarán afectadas por los valores de tolerancia de PA que se adopten: a tolerancias mayores, menores aislamientos y viceversa.

## Consideraciones finales

Como consecuencia de una serie de cambios que se han dado en los últimos 15 años en el uso del suelo y en las técnicas de producción animal, el área sembrada con alfalfa está en disminución. Eso se ha visto reflejado también en los volúmenes de semilla comercializados y en el número de cultivares inscriptos. Paralelamente, ha surgido un marcado interés por producir heno de alfalfa de alta calidad, particularmente para la exportación hacia mercados con demanda creciente e insatisfecha como Arabia Saudita y Emiratos Árabes Unidos, a los que se agrega –más recientemente– China. En este sentido, Argentina tiene –en el corto y mediano plazo– un enorme potencial para convertirse en un proveedor relevante para el mercado mundial de heno de alfalfa.

Pese la disminución del área de siembra, la oferta de cultivares de alfalfa en el mercado nacional supera las 100 variedades; en consecuencia, la elección por parte del productor respecto de cuáles son las mejores para su zona no suele ser una tarea sencilla. Por ello, se recomienda enfáticamente no solo comprar semilla fiscalizada, sino también elegir los cultivares para sembrar con base en su producción potencial de forraje, su persistencia y sus niveles de resistencia a plagas y enfermedades.

Un hecho significativo en cuanto al panorama varietal de Argentina ha sido la desregulación en 2018 de los primeros cultivares transgénicos, que además de su tolerancia al glifosato de amonio tienen un menor contenido de lignina por un proceso de silenciamiento génico (*knock-down*). Esto, además de importantes implicancias en la producción y manejo del cultivo, obliga a considerar una serie de medidas que protejan la producción nacional de semillas del flujo génico (llamado comúnmente contaminación) de las alfalfas transgénicas (GE), a fin de preservar la pureza genética de las alfalfas convencionales (no GE).

## BIBLIOGRAFÍA

ARAGÓN, J.; J.M. IMWINKELRIED. 2007. *Capítulo 7 Manejo integrado de plagas de la alfalfa*. En: BASIGALUP, D. (Ed.). *El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina*. Ediciones INTA, Buenos Aires. 165-197 pp.

BEJERMAN, N.; C. NOME; F. GIOLITTI; E. KITAJIMA; S. DE BREUIL; J. PÉREZ FERNÁNDEZ; D. BASIGALUP; M. CORNACCHIONE; S. LENARDON. 2011. *First Report of a Rhabdovirus Infecting Alfalfa in Argentina*. *Plant Disease* 95(6): 771. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-10-0764>

CASLER, M.; D.J. UNDERSANDER. 2000. *Forage Yield precision, experimental design, and cultivar mean separation for alfalfa cultivar trials*. *Agron. J.* 92: 1064-1071.

GARCÍA, A.N.; N.D. AYUB; A.R. FOX; M.C. GÓMEZ; M.J. DIÉGUEZ; E. PAGANO; C.A. BERINI; J.P. MUSCHIETTI; G. SOTO. 2014. *Alfalfa snakin-1 prevents fungal colonization and probably coevolved with rhizobia*. *BMC Plant Biol. (Sep)* 17 (14): 248. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0248-9>

GIECO, J.O.; M.V. MORENO; D.H. BASIGALUP. 2007. *Capítulo 9 Enfermedades de la alfalfa y abordaje molecular de la selección por resistencia*. En: BASIGALUP, D.H. (Ed.). *El cultivo de alfalfa en Argentina*, Ediciones INTA, Buenos Aires. 449-476 pp.

HIJANO, E.; J. PÉREZ FERNÁNDEZ. 1995. *Capítulo 7 Enfermedades de la alfalfa*. En: HIJANO, E.; A. NAVARRO (Ed.). *La alfalfa en la Argentina*. San Juan, Argentina: INTA Enciclopedia Agro de Cuyo, Manuales N.º 11. 125-142 pp.

INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS (INASE). 2019. *Catálogo Nacional de Cultivares*. (Disponible: <https://gestion.inase.gov.ar/consultaGestion/gestiones> consultado: 18/10/2019).

JOZEFKOWICZ C.; E. BOTTERO; C. PASCUAN; E. PAGANO; N. AYUB; G. SOTO. 2016. *Minimizing the time and cost of production of transgenic alfalfa libraries using the highly efficient completely sequenced vector pPZP200BAR*. *Plant Cell Rep.* 35 (9): 1987-1990. <https://dx.doi.org/10.1007/s00299-016-2026-7>

JOZEFKOWICZ C.; R. FRARE; R. FOX; A. ODORIZZI; V. AROLFO; E. PAGANO; D. BASIGALUP; N. AYUB; G. SOTO. 2018. *Maximizing the expression of transgenic traits into elite alfalfa germplasm using a supertransgene configuration in heterozygous conditions*. *Theor Appl Genet.* 131(5):1111-1123. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-018-3062-1>

KALLENBACH, R.L.; C.J. NELSON; J.H. COUTTS. 2002. *Yield, quality, and persistence of grazing- and hay-type alfalfa under three harvest frequencies* *Agron. J.* 94: 1094-1103.

MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2018. *Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. Resolución 33/2018*. (Disponible: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-33-2018-311332> consultado: 22/11/2019).

MCKENZIE, J.C.; R. PAQUIN; S.H. DUKE. 1988. *Cold and heat tolerance*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL, Jr. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA/CSSA/SSSA, Agronomy Monograph 29. Madison, Wisconsin. 259-302 pp.

NATIONAL ALFALFA & FORAGE ALLIANCE (NAFA). 2015. *A Best Management Practices for APS Alfalfa Seed Production. NAFA Coexistence Document.* (Disponible: [www.alfalfa-forage.org](http://www.alfalfa-forage.org) consultado: 12/06/2019).

NATIONAL ALFALFA & FORAGE ALLIANCE (NAFA). 2015. *B. Grower Opportunity Zones for Seed Production. NAFA Coexistence Document, Junio.* (Disponible: [www.alfalfa-forage.org](http://www.alfalfa-forage.org) consultado:18/06/2019).

NORTH AMERICAN ALFALFA IMPROVEMENT CONFERENCE (NAAIC). 1998. C. FOX; R. BERBERET; F. GRAY; C. GRAU; D. JESSEN; M. PETERSON (Ed.). *Standard Tests to Characterize Alfalfa Cultivars (3rd edition).* (Disponible: <http://naaic.org> consultado: 08/04/2019).

POOLE, G.; D. PUTNAM; S. ORLOFF. 2003 *Considerations in choosing an alfalfa variety. Proceedings 33rd California Alfalfa and Forage Symposium.* 191-200 pp.

PUTNAM, D.H.; T. WOORWARD; P. REISEN; S. ORLOFF. 2016. *Coexistence and Market Assurance for Production of Non-Genetically Engineered Alfalfa Hay and Forage in a Biotech Era. Crop Forage & Turfgrass Management, Volume 2, ASA-CSSA, Madison, WI, EUA.* DOI: 10.2134/cftm2015.0164

SHEAFFER, C.C.; G.D. LACEFIELD; V.L. MARBLE. 1988. *Cutting schedules and stands.* En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL, Jr. (eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement. ASA/CSSA/SSSA, Agronomy Monograph 29. Madison, Wisconsin.* 412-430 pp.

TEMPLE, S.J.; R.A. DIXON. 2018. *GE lignin modification in alfalfa.* En: BASIGALUP, D.; M. DEL C. SPADA; A. ODORIZZI; V. AROLFO (Ed.). *Proceedings of the Second World Alfalfa Congress, INTA, Córdoba, Argentina.* 99-101 pp. (Disponible: [www.worldalfalfacongress.org](http://www.worldalfalfacongress.org) consultado: 25/04/2019).

TEUBER, L.R.; K.L. TAGGARD; L.K. GIBSS; M.H. MCCASLIN, M.A. PETERSON; D.K. BARNES. 1998 (revised). *Fall Dormancy.* En: FOX, C.; R. BERBERET; F. GRAY; C. GRAU; D. JESSEN; M. PETERSON (Ed.). *Standard Test to Characterize Alfalfa Cultivars (3rd edition).* Published by North American Alfalfa Improvement Conference. *Agronomic Tests. A-1 p.*

TRUCCO, V.M.; N. BEJERMAN; S. DE BREUIL; D. CABRERA MEDEROS; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2018. *Alfalfa dwarf disease, a viral complex affecting alfalfa crop in Argentina.* En: BASIGALUP, D.; M. DEL C. SPADA; A. ODORIZZI; V. AROLFO (Ed.). *Proceedings of the Second World Alfalfa Congress, INTA, Córdoba, Argentina.* 84-87 pp. (Disponible: [www.worldalfalfacongress.org](http://www.worldalfalfacongress.org) consultado: 18/09/2019).

VAN DEYNZE, A.; S. FITZPATRICK; B. HAMMON; M. MCCASLIN; S.H. PUTNAM; L. TEUBER; S. UNDERSANDER. 2008. *Gene Flow in Alfalfa: Biology, Mitigation, and Potential Impact on Production. Council for Agricultural Science & Technology, Special Publication N.º 28, Ames, Iowa, EUA.* 30 p.





## CAPÍTULO 2

### Morfología de la alfalfa

Nora E. Rodríguez y  
María del Carmen Spada

## Introducción

La Morfología Botánica es la ciencia que estudia la forma de las plantas, abarcando tanto la morfología general como la experimental. La primera incluye principalmente a la organografía, que es la descripción de la forma de los distintos órganos vegetales (Font Quer, 1989).

Basado en un trabajo de Teuber y Brick (1988), la finalidad de este capítulo es precisamente describir, en forma resumida y práctica, los órganos que forman la planta de alfalfa, incluyendo una serie de imágenes que ilustran las descripciones en cada caso. En general, la bibliografía específica que trata este tema es muy escasa y no siempre fácil de conseguir. Ello se relaciona con el hecho de que la alfalfa es estudiada fundamentalmente como planta forrajera, resaltando solo los aspectos de rendimiento de forraje y manejo para la producción de carne y leche.

Para una mayor claridad en el tratamiento del capítulo, los órganos o estructuras de la alfalfa se han dividido en semilla, raíz, corona, tallo, hoja, flor y fruto. Finalmente, se incluye la definición y la caracterización de los estadios de madurez de la alfalfa, que tienen una gran importancia en el manejo del cultivo.

## Organografía de la alfalfa

### *Semilla*

El fruto, que recibe en este caso el nombre de legumbre, da origen a las semillas. Estas poseen generalmente forma arriñonada y color amarillento, pero también se pueden encontrar semillas angulares y de coloración que varía desde el verde oliva a distintas tonalidades de marrón (Figura 1).

Las semillas, en estado maduro, tienen aproximadamente 1-2 mm de longitud por 1-2 mm de ancho y 1 mm de espesor. Están constituidas por el funículo, el tegumento (testa), el embrión y el albumen (Figura 2). El funículo es el que mantiene unida la semilla al fruto; al secarse, se desprende y forma una cicatriz llamada hilio. El tegumento o testa es la

capa externa que rodea al embrión y le brinda protección, siendo además el responsable del color de la semilla.

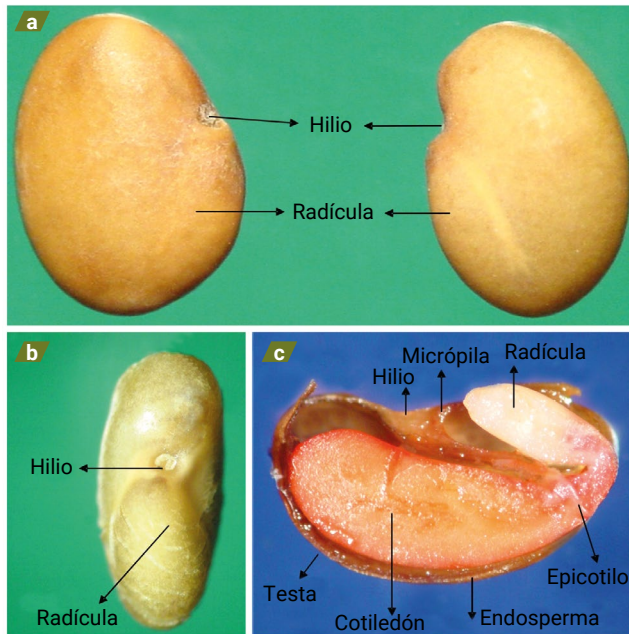
El embrión originará la futura plántula y en él se pueden observar la radícula, el hipocótilo, la plúmula y los cotiledones. La radícula, que durante la germinación emerge a través de la micrópila, formará la raíz. En sentido contrario, el hipocótilo dará origen a las partes aéreas de la plántula. Por su parte, la plúmula, que es un esbozo formado por hojitas, al desarrollarse originará el tallo. Los cotiledones, gruesos y carnosos, almacenan la mayor parte del tejido de reserva para el desarrollo del embrión. Por último, el albumen es un tejido de reserva que, en el caso de la alfalfa, se encuentra reducido y cuya función principal es facilitar el proceso de germinación.



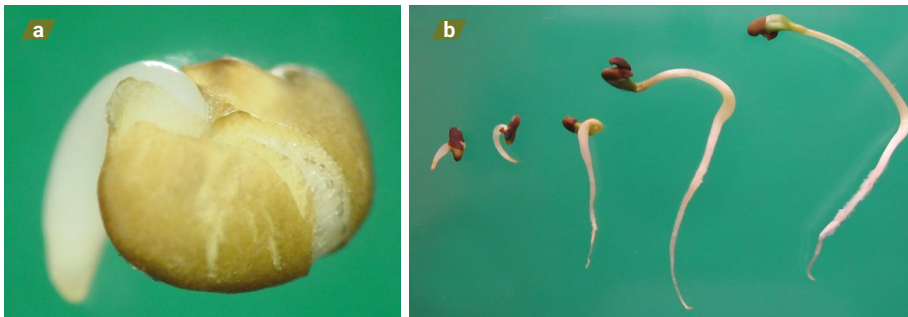
■ **Figura 1.** Diferentes formas y colores de la semilla de alfalfa.

### *Germinación y primeras etapas del desarrollo*

En el proceso de germinación, la semilla en contacto con el suelo comienza a embeberse de agua, lo que desencadena una serie de transformaciones que se resumen en el desarrollo de una raíz (partiendo de la radícula preexistente en la semilla) y de un talluelo, que se alarga hasta sacar los cotiledones por encima de la superficie del suelo (Figura 3). Estos procesos se realizan a costa de las reservas existentes en la semilla (Del Pozo Ibáñez, 1977).



■ **Figura 2.** Partes de la semilla de alfalfa. Sección externa: vistas lateral (a) y frontal (b). Sección interna: vista en corte transversal (c). Adaptado de Del Pozo Ibáñez (1977).

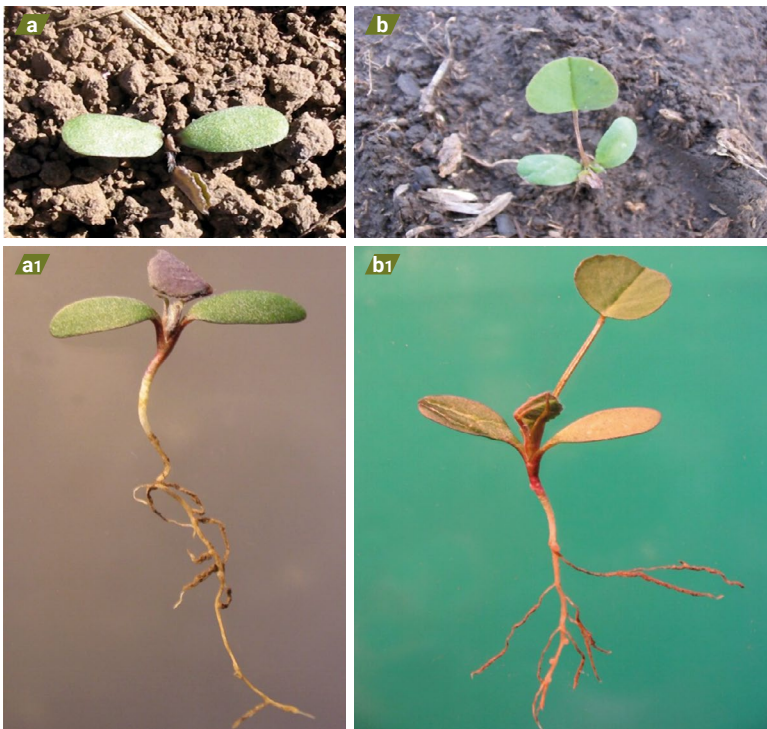


■ **Figura 3.** Germinación de la semilla de alfalfa: emergencia de la radícula (a) y desarrollo de la plántula, con aparición de los cotiledones (b).

Por un lado, para que las semillas puedan embeberse es necesario que encuentren en el suelo la humedad suficiente. Sin embargo, y atendiendo a que la plántula también precisa condiciones mínimas de aireación para su desarrollo, un exceso de humedad puede paralizar la germinación por reducción del volumen de poros libres en el suelo. Por otro

lado, en la alfalfa es común encontrar semillas “duras”, que son aquellas incapaces de embeberse de agua aun en condiciones óptimas de humedad. Este fenómeno, que responde a un mecanismo de supervivencia de la especie, se debe a la existencia de un engrosamiento de las paredes exteriores de las células en empalizada de la testa y constituye una barrera física para la absorción de agua. El porcentaje de semillas duras, que puede ser alto al momento de la cosecha, va disminuyendo con el tiempo. El mejor método para eliminar las semillas duras es el escarificado mecánico, que consiste en exponer la testa a la acción de superficies abrasivas.

A medida que el desarrollo de la parte aérea de la plántula continúa, el talluelo se alarga y expone a los cotiledones por encima de la superficie del suelo (Figura 4a). Posteriormente, la plántula exhibe primero una hoja unifoliada (Figura 4a1, b y b1) y luego las hojas trifoliadas, también llamadas “verdaderas” (Figura 5).



■ **Figura 4.** Primeras etapas de desarrollo vegetativo: cotiledonal (a y a1) y hoja unifoliada (b y b1).





■ **Figura 5.** Primeras etapas de desarrollo vegetativo, con la aparición de dos (a), tres (b), cuatro (c) y cinco (d) hojas trifoliadas.

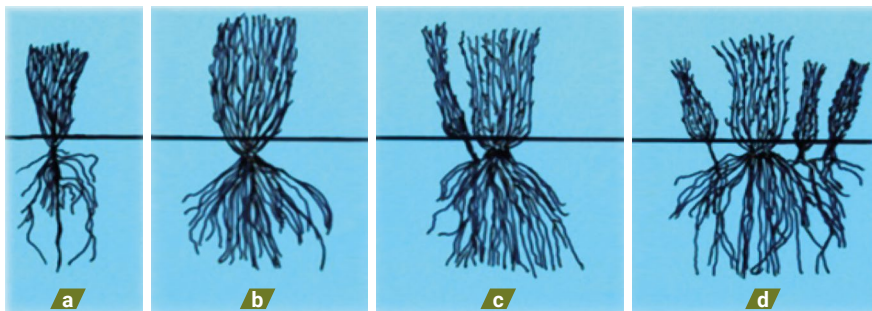
### *Raíz*

En general, el sistema radical de la alfalfa es robusto y profundo, y su función principal es la absorción de agua. Si no existen impedimentos en el perfil de suelo, la raíz puede alcanzar los 2 a 5 metros en solo 2 a 4 años de vida (Figura 6), de modo que la posibilidad de extraerla de las capas profundas del suelo le ha conferido a la alfalfa su reputación de tolerante a la sequía.



■ **Figura 6.** Raíces de alfalfa de 2 años que superaron los 1,40 m de profundidad en un suelo haplustol éntico de la EEA Manfredi-INTA.

La raíz principal de la planta emerge cerca del hilio y de ella puede o no partir un variado número de raíces secundarias o laterales. El sistema radical de la alfalfa puede clasificarse en cuatro tipos generales: raíz pivotante o típica (axonomorfa), ramificada, rizomatosa y rastrera (Goplen *et al.*, 1980; Heinrichs, 1968; Perez de Pereyra y Aguilar Espinosa, 2002). En alfalfas sin reposo invernal (GRI 8-11) mayoritariamente se observa la presencia de una raíz pivotante sin muchas ramificaciones (Figura 7a). Las alfalfas de reposo invernal intermedio o moderado (GRI 4-7) suelen presentar un alto número de raíces secundarias (Figura 7b) en relación directa con su mayor grado de latencia. En otros tipos de alfalfas, comúnmente con marcado reposo invernal (GRI 1-3), las raíces laterales poseen yemas de las que se originan tallos que, al emerger, formarán nuevas plantas o “matas”. Cuando las yemas activas son solo 1 o 2 y las nuevas “matas” se desarrollan a poca distancia de la planta original esas raíces se denominan rizomatosas (Figura 7c); por el contrario, si las yemas activas son varias y los renuevos alcanzan a cubrir una extensión de cierta magnitud, esa raíz se denomina rastrera (Figura 7d). Mientras que la existencia de una raíz pivotante se asocia con alfalfas de la especie *Medicago sativa*, la presencia de un alto número de raíces secundarias, rizomatosas o rastreras se asocia con aportes crecientes de germoplasma de *M. falcata* y *M. varia*.



■ **Figura 7.** Distintos tipos de raíces de alfalfa: pivotante (a), ramificada (b), rizomatosa (c) y rastrera (d). Adaptado de Goplen *et al.* (1980).

### Tallo y corona

El tallo primario es cuadrado en su sección transversal y presenta estomas y pelos. No solo tiene crecimiento primario, sino que también

posee un crecimiento secundario que da origen a un eje leñoso o porción perenne que forma parte de la corona. En su parte herbácea presenta nudos desde donde nacen las hojas. El número de los tallos depende de la edad y vigor de la planta y puede llegar hasta 20 (Figura 8). El crecimiento de los tallos es inducido por su utilización (pastoreo o corte) o por un nuevo ciclo fisiológico de crecimiento (Alfalfa, 2005).

Los tallos son usualmente de consistencia maciza, aunque en algunos casos pueden encontrarse tallos huecos, como en el ecotipo argentino *Saladina*. Existen también diferentes hábitos de crecimiento, fuertemente asociados al grado de reposo invernal. Como regla general, puede afirmarse que las alfalfas sin reposo invernal presentan tallos de porte erecto, en tanto que las alfalfas de reposo intermedio o marcado los poseen de porte semierecto o semirrastrero, respectivamente.

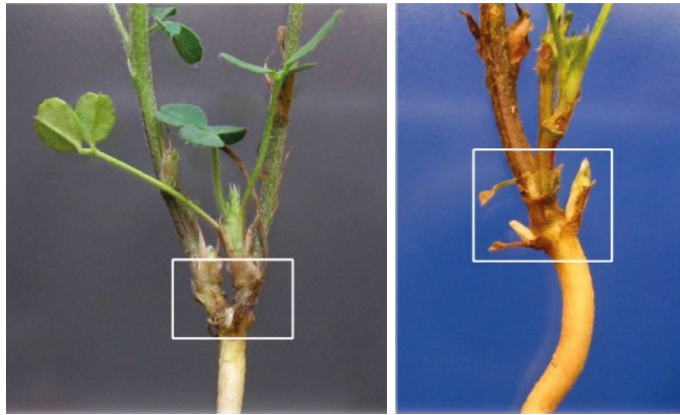


■ **Figura 8.** Tallos de alfalfa, con nudos desde donde salen las hojas trifoliadas.

A medida que el desarrollo de la planta continúa, el conjunto de la parte basal de tallos nuevos y viejos forma, entre la parte aérea y la raíz, una estructura que recibe el nombre de corona (Figura 9). Más adelante, en la planta adulta, la corona incluirá la porción perenne de los tallos.

En el proceso de formación de la corona, Jones (1928) notó que si el eje primario –a nivel de los cotiledones y las primeras hojas verdaderas– está enterrado, la corona puede desarrollarse a partir del área más alta del eje. Por su parte, Hayward (1938) estableció que en la conformación de la corona no intervienen las yemas ubicadas en la raíz.





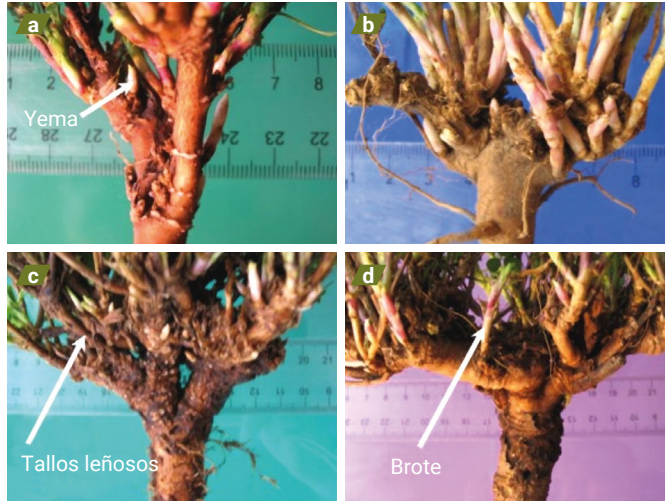
■ **Figura 9.** Fases iniciales de la formación de la corona en plantas de 4 meses.

La corona no es una estructura simple ni única, sino que es una zona compleja que incluye varias estructuras separadas (Teuber y Brick, 1988), como se muestra en la Figura 10. Si bien Stewart (1926) había señalado que la corona incluía únicamente a las porciones perennes de tallos, Simmonds (1935) concluyó que no solo involucra a estas, sino también a la parte superior de la raíz. De todas maneras, la delimitación morfológica exacta de la corona tiene muy poca importancia, ya que –además de las partes involucradas de la planta– es razonable suponer que la sequía estival, el frío invernal, las prácticas culturales, el ataque de plagas y enfermedades, el vigor general y la edad de las plantas influyen en la cantidad y el tipo de partes vegetativas que pueden intervenir en su conformación (Grove y Carlson, 1972).

Además de su constitución morfológica es conveniente resaltar la importancia funcional de la corona como estructura almacenadora de sustancias de reserva y sede de yemas a partir de las cuales se producirán los rebrotes de la planta. El ciclo acumulación/utilización de sustancias de reservas es fundamental para la vida de la planta y condiciona las prácticas de manejo del cultivo (ver capítulo 11).

El tamaño (pequeño, intermedio, grande) y el tipo (compacta o cerrada, intermedia, abierta) de la corona dependen de factores genéticos y ambientales (Figura 11). En general, las alfalfas sin reposo invernal tienen coronas pequeñas y compactas, en tanto que los cultivares de

mayor reposo invernal tienden a poseer coronas más anchas y abiertas. No obstante, factores como la densidad de plantas, el tipo de suelo, el daño de plagas y enfermedades, el pisoteo de los animales o el daño de la maquinaria, pueden influir grandemente en las características de la corona.



■ **Figura 10.** Diferentes partes constitutivas de coronas ya formadas en plantas de 1 (a), 2 (b), 3 (c) y 4 (d) años de vida.

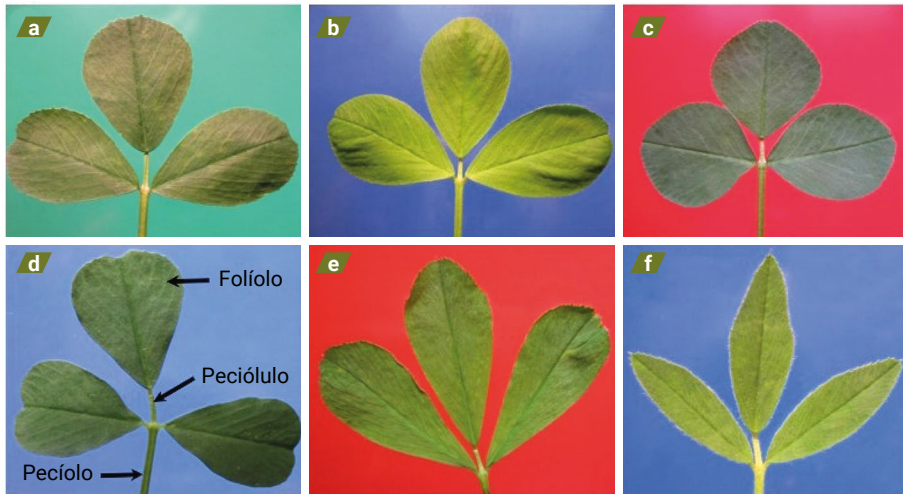


■ **Figura 11.** Coronas de distintos tipos y tamaños en plantas de 1 (a), 2 (b) y 3 (c) años.

## Hoja

La primera hoja de la plántula de alfalfa es unifoliolada y de forma orbicular. Las segundas y subsecuentes son pinnaticompuestas o imparipinnadas y se originan en el ápice del tallo. Posteriormente, cuando la planta ya está desarrollada, las hojas pueden originarse del ápice del tallo o de las yemas laterales ubicadas en los nudos de los tallos.

Las hojas se unen al tallo por el pecíolo y son usualmente trifolioladas, vale decir que se componen de tres folíolos peciolulados. Los folíolos son normalmente oblongos u obovados, pero se pueden encontrar formas desde redondeadas a obovado-oblongas e incluso lineales (Figura 12).



■ **Figura 12.** Distintas formas de folíolos en hojas trifolioladas de alfalfa: obovados (a), oblongos (b), redondeados (c), acorazonados (d), espatulados (e) y lineales (f).

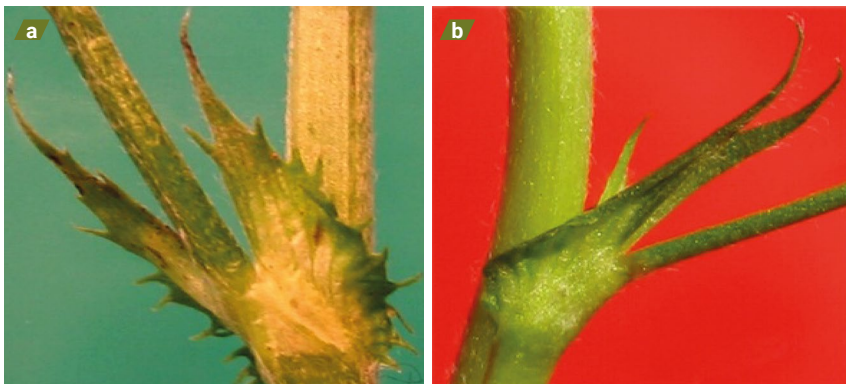
El borde de los folíolos es dentado usualmente solo en el tercio superior, aunque también puede extenderse hasta la mitad superior o incluso el tercio inferior (Figura 13). La distribución de los bordes dentados guarda relación con la forma de los folíolos.

Las hojas se disponen a lo largo del eje del tallo en forma alternada. En el nacimiento de las hojas se observan las estípulas, que son unos apéndices delgados a modo de pequeñas hojas modificadas situadas en la base del pecíolo y adheridas a sus lados. Las estípulas son normal-

mente laciniadas (Figura 14a), aunque también pueden ser lisas (Figura 14b). La experiencia indica que las primeras se encuentran usualmente en hojas de plantas de varios años y que las últimas se hallan casi exclusivamente en hojas de plantas jóvenes. Por lo tanto, puede concluirse empíricamente que la presencia de estípulas laciniadas o lisas se relacionaría más con la edad de las plantas que con algún otro factor.



■ **Figura 13.** Diferente distribución del borde dentado de la lámina de los folíolos: solo en el tercio superior (a), en la mitad superior (b), y hasta el tercio inferior (c).

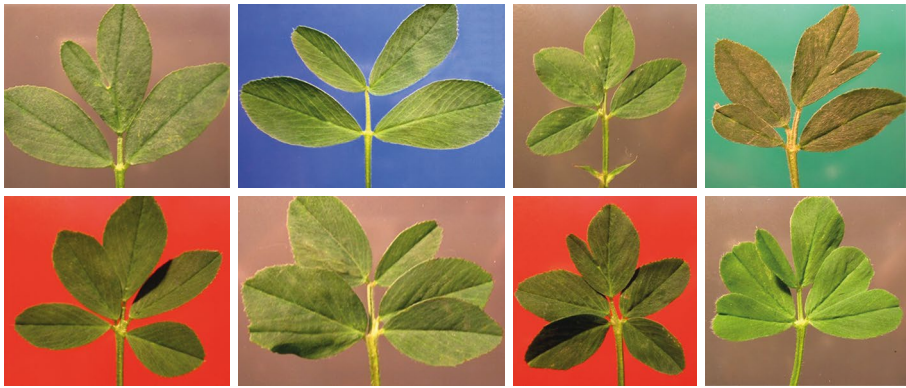


■ **Figura 14.** Los dos tipos de estípulas que se observan en hojas de alfalfa: (a) laciniada, en una planta de 3 años; y (b) lisa, en una planta de 1 año.

Los folíolos tienen una nervadura central prominente que se extiende a lo largo de la lámina y de la cual parten nervaduras laterales pinnadas que se subdividen formando una red. Las nervaduras son más notables en la cara abaxial (inferior) del folíolo, que es pubescente. Una observación microscópica de la hoja indica que los estomas (las aberturas

o poros por donde se realiza el intercambio gaseoso de las hojas), son más numerosos en la cara superior y en el ápice del folíolo.

Si bien la hoja trifoliada es la situación normal, se pueden encontrar hojas con 4 (tetrafoliadas), 5 (pentafolioladas) o más folíolos y que –por ello– reciben el nombre genérico de hojas multifolioladas (Figura 15). Mucho más raros son los casos de hojas con folíolos divididos en lóbulos, o con colores distintos al verde (moteadas, amarillas, etc.).



■ **Figura 15.** Hojas multifolioladas de alfalfa exhibiendo desde 4 hasta 6 folíolos.

### Flor

La flor se desarrolla cuando el ápice del tallo pasa del estado de crecimiento vegetativo al reproductivo. Este cambio, que se llama transición, comienza con la aparición de una protuberancia en la axila del primordio foliar, adyacente al ápice del tallo. De cada primordio se origina una inflorescencia en forma de racimo simple (Figura 16).

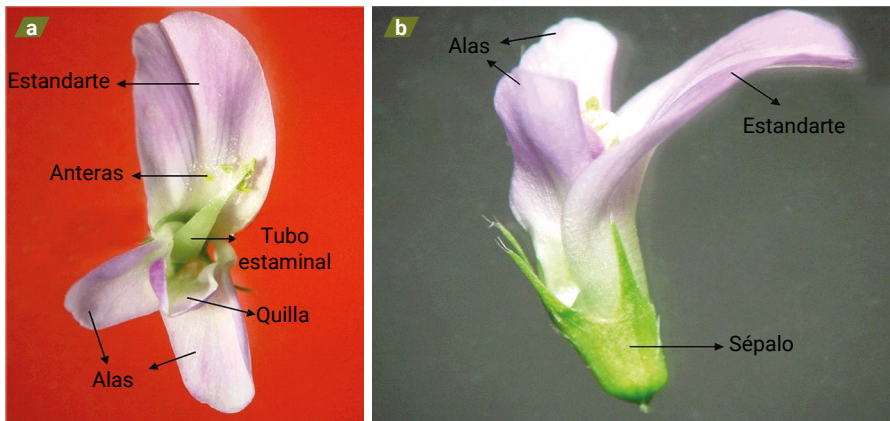
La flor de la alfalfa es completa y está formada por el cáliz, la corola, los estambres y el gineceo. Responde a los caracteres sistemáticos de la subfamilia *Papilionoidea*, o sea que posee una corola papilionada en forma de mariposa (Figura 17). El cáliz consta de cinco sépalos soldados formando un tubo; sin embargo, cada sépalo termina en un lóbulo o diente que es mayor en longitud al largo del tubo calicino (Figura 17b). La corola está formada por cinco pétalos desiguales: el estandarte, que es el superior y el más grande de los cinco; las alas, que son dos pétalos más pequeños que se ubican a ambos lados del estandarte; y la quilla,



que está envuelta por las alas y que se forma por dos pétalos soldados que se ubican más internamente (Del Pozo Ibáñez, 1977) (Figura 17a).



■ **Figura 16.** Inflorescencia de la alfalfa: racimo con botones florales (a) y racimo con 2 flores abiertas (b).



■ **Figura 17.** Estructura de la flor de la alfalfa: vista superior (a) y vista lateral (b).

Los estambres son 10 y están divididos en dos grupos: uno constituido por nueve, soldados en la base; y el restante formado por el décimo, que está libre y más cerca del estandarte. Esta disposición, que recibe el nombre de diadelfia, indica que los estambres de la alfalfa son diadel-

fos. Los filamentos de los 9 estambres soldados tienen distinta longitud y al fusionarse para formar el tubo se alternan los largos con los cortos. Por el interior del tubo que forman pasa el estilo que remata en un estigma rodeado por las anteras de los estambres fusionados. El gineceo presenta un carpelo que desarrolla un ovario súpero y posee un estilo y un estigma bien definidos.

La flor es generalmente de color púrpura, con extremos que van desde el violeta claro al morado oscuro (Figura 18). También se pueden encontrar flores blancas, azuladas, amarillas y variegadas, que son mezclas de colores o tonalidades que van cambiando a medida que la flor se desarrolla (Burkart, 1952).



■ **Figura 18.** Algunos colores de flor de alfalfa. En sentido horario: azulado, violeta claro, púrpura oscuro y púrpura claro.

### *Desenlace floral y polinización*

Las alas, en la corola, poseen en la base unos pequeños apéndices a modo de ganchos que mantienen unida y rígida a la columna estaminal; esta, a su vez, contiene empaquetado en su interior al estilo. De ese modo, la polinización solo es posible cuando –al separarse las alas a través de un proceso que se denomina desenlace floral– la columna estaminal se libera y expone el estigma al contacto con el polen (Figura 19). El movimiento brusco que se produce al liberarse la columna estaminal provoca la apertura de las anteras maduras y la consiguiente diseminación de los granos de polen.

Diversos mecanismos naturales pueden provocar el desenlace floral, como la acción de insectos y las variaciones de temperatura, hume-

dad y velocidad del viento. También lo puede provocar artificialmente el hombre con movimientos mecánicos provocados con la mano o con diversos instrumentos. La flor puede fecundarse con su propio polen (autofecundación o autogamia) o con el polen de otra flor (fecundación cruzada o alogamia). No obstante, la alfalfa es una especie de fecundación preponderantemente alógama, favorecida por mecanismos naturales de autoincompatibilidad y autoesterilidad (Viands *et al.*, 1988).

En condiciones naturales, la polinización de la alfalfa es entomófila y es consecuencia principalmente de la acción de distintas especies de abejas y abejorros. Cuando los insectos acuden a la flor para libar el néctar o recolectar el polen, la presión que le ejercen al posarse es suficiente para provocar el desenlace floral, haciendo que la columna estaminal impacte sobre su abdomen. Dado que esos insectos visitan flores de varias plantas en forma sucesiva, su abdomen está siempre cargado de polen de diferentes plantas, lo que asegura la alogamia. Se ha estimado que el 85-95 % de las flores desenlazadas son fecundadas por este mecanismo (Del Pozo Ibañez, 1977).



■ **Figura 19.** Desenlace floral de la alfalfa: (a) flor cerrada, sin separación de las alas; y (b) flor abierta, con exposición de la columna estaminal.

### Fruto

El fruto de alfalfa es del tipo legumbre o vaina, monocarpelar, seco e indehisciente, generalmente alargado y comprimido, con las semillas



alineadas en la hilera ventral. La vaina, por encorvamiento, desarrolla una espiral que generalmente posee 1 espira con autofecundación y 3 a 5 vueltas con fecundación cruzada (Alfalfa, 2005) (Figura 20). La dirección de la espira puede ser dextrógira (en sentido horario) o levógira (en sentido antihorario). Cada fruto contiene un número variable de semillas arriñonadas: 2-3 con autofecundación y alrededor de 9 semillas con fecundación cruzada (Alfalfa, 2005).



■ **Figura 20.** Distintos momentos en la evolución del fruto de la alfalfa, desde poco después de la fecundación de la flor (arriba, izquierda) hasta la vaina madura con varias espiras (abajo, derecha).

## Estadios de madurez de la alfalfa

Existe una gran cantidad de clasificaciones para describir la fenología y la evolución del desarrollo morfológico de las plantas de alfalfa. La utilidad de definir estos estadios de madurez reside en la definición de prácticas de manejo apropiadas para el cultivo. En ese contexto, y utilizando principalmente la altura del canopeo y la sucesión de estadios vegetativos y reproductivos, se han establecido cuatro categorías bási-

cas: estado vegetativo, botón floral, floración y fructificación. Sobre la base de esta categorización, e incluyendo criterios fisiológicos como la dinámica de acumulación y utilización de sustancias de reserva, se concluyó que el 10 % de floración es el momento óptimo para la utilización de la alfalfa, compatibilizando la producción de forraje, la calidad y la persistencia.

Sin embargo, Kalu y Fick (1981) y Fick y Mueller (1989) señalaron que esta clasificación, si bien es una forma simple para determinar el momento óptimo de utilización, no considera los cambios en la calidad que van ocurriendo a través de los distintos períodos de crecimiento. Como la calidad de las pasturas está asociada a los estadios fenológicos de la planta, tanto Kalu y Fick (1981) como Sanderson y Wedin (1989) sugirieron que el estado fenológico debería utilizarse como predictor de la calidad forrajera, considerando que la expresión de cada estadio morfológico es un resultado de la historia ambiental y fisiológica del cultivo. Fundamentándose en este concepto, Kalu y Fick (1981) describieron un método que se basa en la altura, las características y la presencia/ausencia de distintos órganos en los tallos para categorizar los estadios de madurez de la alfalfa. En ese trabajo se definen 10 estadios que comprenden tres estados vegetativos, dos de botón floral, dos de floración y tres de fructificación. Seguidamente, y atendiendo solo a la evolución morfológica del rebrote de un cultivo de alfalfa ya establecido, se describirán cada uno de esos estadios de madurez.

*A- Estado vegetativo:* comprende las fases tempranas de desarrollo en las cuales no se encuentran todavía estructuras reproductivas.

- *Estadio 0 (vegetativo temprano):* la altura de los tallos es menor a 15 cm y las yemas axilares no son visibles debido a su escaso desarrollo (Figura 21).
- *Estadio 1 (vegetativo medio):* la longitud de los tallos es de 16 a 30 cm y, como consecuencia del desarrollo de las yemas axilares, se observan una a dos hojas nuevas desplegadas en las axilas de las hojas viejas. Esta característica es más visible en la porción media de los tallos (Figura 22).
- *Estadio 2 (vegetativo tardío):* la longitud de tallos es mayor a 30 cm y se observan ramificaciones de las yemas axilares (Figura 23).

Estas ramificaciones se presentan por lo menos en dos nudos y constan de tres o más hojas.



■ **Figura 21.** Vista general de un tallo de alfalfa en estadio de madurez 0.



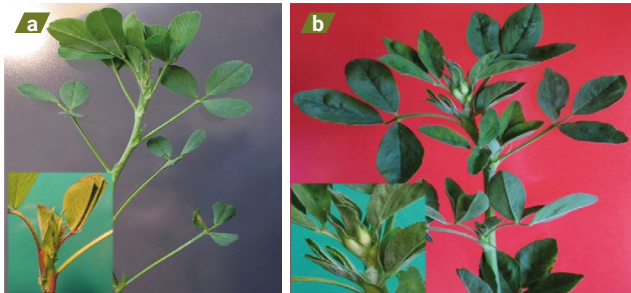
■ **Figura 22.** Vista general de un rebrote de alfalfa en estadio de madurez 1.



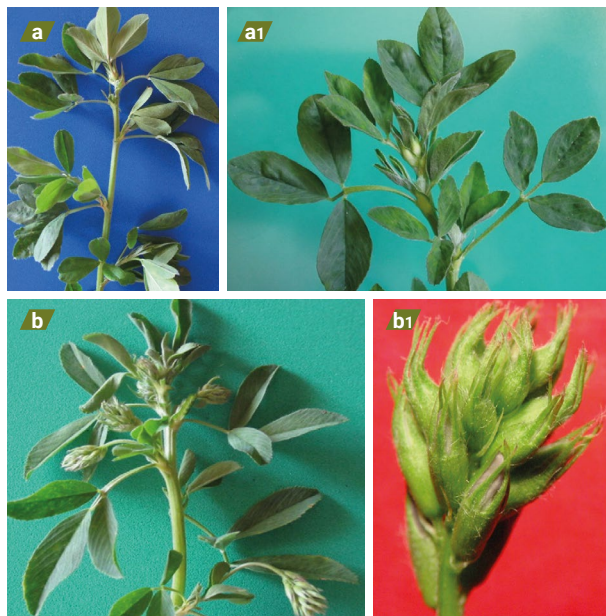
■ **Figura 23.** Vista general de un tallo en estadio de madurez 2 y detalle de una ramificación en una yema axilar.

*B- Estado de botón floral:* a partir de aquí comienza la diferenciación de los meristemas reproductivos y se visualizan los botones florales. Las yemas reproductivas aparecen próximas a los ápices de crecimiento del tallo principal o sus ramificaciones. La proximidad de los primordios florales forma una estructura globosa o globular, fácilmente reconocible al tacto o a la vista. Mientras que los ápices foliares presentan un aspecto plano, el de los reproductivos es redondeado (Figura 24).

- Estadio 3 (botón floral temprano): las yemas de los botones florales se visualizan solo en uno o dos nudos (Figuras 25a y a1). Los botones florales se pueden palpar en cada racimo dado que se encuentran muy próximos entre sí.
- Estadio 4 (botón floral): tres o más nudos presentan inflorescencias visibles y se aprecia una clara separación de los botones florales en el racimo (Figuras 25b y b1).



■ **Figura 24.** Diferenciación morfológica entre un ápice foliar (a) y uno reproductivo (b).



■ **Figura 25.** Vista general (a) y detalle (a1) de botones florales tempranos (estadio de madurez 3) y vista general (b) y detalle (b1) de botones florales más desarrollados y separados (estadio de madurez 4).



*C- Estado de floración:* cuando las condiciones ambientales (fundamentalmente foto y termoperíodo) lo permiten, las flores se abren y se hacen visibles. La floración es la expresión del estado reproductivo de la planta.

- Estadio 5 (floración temprana): se observan una o más flores abiertas en el racimo floral de un nudo del tallo. Se considera una flor abierta cuando el estandarte de la flor está desplegado (Figuras 26a, a1 y a2).
- Estadio 6 (floración tardía): en un tallo se presentan al menos dos nudos con flores abiertas. Además, a diferencia del anterior, se observa una mayor cantidad de inflorescencias en el tallo (Figuras 26b, b1 y b2).



■ **Figura 26.** Estadio 5 o de floración temprana (a, a1 y a2), con flores abiertas en solo un nudo floral del tallo. Estadio 6 o de floración tardía (b, b1 y b2), con flores abiertas en dos o más nudos florales.

*D- Estado de producción de semillas:* el desarrollo de frutos (vainas) y semillas comienza después de la polinización de las flores. Comprende tres estadios de fructificación que si bien son de interés para determinar el momento de cosecha de semilla, normalmente no se observan cuando la alfalfa es utilizada para la alimentación del ganado.

- Estadio 7 (fructificación temprana): uno a tres nudos contienen una vaina de reciente formación y de color verde. Como en el caso de los estadios florales, se pueden contar una o más vainas en cada racimo. Mientras las fructificaciones se encuentran principalmente en la porción media del tallo, en las partes apicales aún se observan flores (Figura 27).
- Estadio 8 (fructificación tardía): cuatro o más nudos presentan vainas todavía verdes pero bien formadas y espiraladas. Los tallos más viejos se encuentran muy ramificados y con una baja proporción de hojas (Figura 28).
- Estadio 9 (vainas maduras): la mayoría de las vainas, ya maduras, viran al color marrón y se secan. La proporción de hojas es muy baja y los tallos son muy fibrosos. Este es el momento apropiado para la cosecha de semillas (Figura 29).



■ **Figura 27.** Estadio 7 o de fructificación temprana, con vainas incipientes y no totalmente distinguibles a simple vista. También se observan flores en el tercio superior del tallo.



■ **Figura 28.** Estadio 8 o de fructificación tardía, con abundancia de vainas todavía inmaduras, pero bien espiraladas y una baja proporción de hojas en el tallo.



■ **Figura 29.** Estadio 9, donde se aprecia que la mayoría de las vainas ha virado al color marrón, indicando que están próximas a ser cosechadas. Se aprecia una muy baja proporción de hojas, que además son de tamaño reducido.

Es importante señalar que si bien la altura de tallos se emplea para la definición de los estadios vegetativos, su utilización debe hacerse con

cautela. Dado que el grado de crecimiento de las plantas depende fuertemente de las condiciones ambientales en las que se desarrollaron, la altura de los tallos no necesariamente representa su estado de madurez. En ese contexto, Guzmán y Spada (comunicación personal), trabajando en la Región Central de Córdoba, donde frecuentemente se presentan deficiencias hídricas, encontraron solo una mediana correlación entre altura de planta y estado de madurez. En consecuencia, aunque la altura de planta puede constituir una variable práctica para estimar el grado de madurez del cultivo, debe emplearse con el suficiente criterio para no caer en errores groseros de valoración.



## AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen de manera muy particular la colaboración especial de la Agr. Sandra Eroles, de la Ing. Agr. Carolina Guzmán y de la Est. Cs. Biol. Yanina Gillij. También agradecen al personal auxiliar de las secciones Malezas, Tecnología de Semillas y Recursos Forrajeros de la EEA Manfredi-INTA por el significativo apoyo brindado para la concreción de este capítulo. Finalmente, hacen extensivo su reconocimiento a la Biól. Valeria Arolfo, por la disposición del material vegetal de invernáculo para la toma de algunas fotografías, y al Ing. Agr. Gustavo Guerra y la Biól. María Cristina Plaza por haber amablemente facilitado el uso de su laboratorio fotográfico en la EEA Manfredi-INTA.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALFALFA. 2005. (Disponible: <http://www.latour.com.ar/alfalfa.htm> consultado: 04/01/2005).
- BURKART, A. 1952. *Las Leguminosas Argentinas - Silvestres y Cultivadas*. (2.ª ed.). ACME Agency. Ciencias Biológicas y Agronómicas. Buenos Aires, Argentina. 569 p.
- DEL POZO IBAÑEZ, M. 1977. *La Alfalfa, su cultivo y aprovechamiento*. (2.a ed.). Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España, 379 p.
- FICK, G.W.; S.C. MUELLER. 1989. *Alfalfa: quality, maturity, and mean stage of development*. Inf. Bull. N.º 217. Cornell Univ. Dept. of Agronomy. Nueva York, EUA. 14 p.
- FONT QUER, P. 1989. *Diccionario de botánica*. Editorial Labor. Barcelona, España. 1244 p.
- GOPLIN, B.P.; H. BAENZIGER; L.D. BAILEY; A.T.H. GROSS; M.R. HANNA; R. MICHAUD; K.W. RICHARDS; J. WADDINGTON. 1980. *Growing and managing alfalfa in Canada*. Agriculture Canada. Publication 1705. Ottawa, Canadá. 50 p.
- GROVE, A.R. Jr.; G.E. CARLSON. 1972. *Morfología y Anatomía*. En: HANSON, C.H. (ed.). *Ciencia y Tecnología de la Alfalfa*. Tomo I, capítulo 5. Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. 145-166 pp.
- HAYWARD, H.E. 1938. *Leguminosae, Medicago sativa. Estructure of economic plants*. MacMillan, New York, EUA. 309-338 pp.
- HEINRICH, D.H. 1968. *Alfalfa in Canada*. Canada Department of Agriculture. Publication 1377. Ottawa, Canadá. 28 p.
- JONES, F.R. 1928. *Winter injury of alfalfa*. *Journal of Agricultural Research* 30: 189-211.
- KALU, B.A.; G.W. FICK. 1981. *Quantifying morphological development of alfalfa for studies of herbage quality*. *Crop. Sci.* 21: 267-271.
- PEREZ DE PEREYRA, A.I.; N.B. AGUILAR ESPINOSA. 2002. *Diccionario bilingüe de términos para las ciencias agropecuarias. Español-Inglés e Inglés-Español*. Comunicarte. Córdoba, Argentina, 192 p.
- SANDERSON, M.A.; W.F. WEDIN. 1989. *Phenological stage and herbage quality relationships in temperate grasses and legumes*. *Agronomy Journal*. 81: 864-869.

SIMONDS, A.O. 1935. *Histological studies on the development of the root and crown of alfalfa*. *Journal of Science* 9 (4): 641-659.

STEWART, G. 1926. *Alfalfa growing in the United States and Canada*. MacMillan, Nueva York, EUA.

TEUBER, L.R.; M.A. BRICK. 1988. *Morphology and Anatomy*. En: HANSON, A.A.D. K. BARNES; R.R. JR. HILL. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement, Chapter 4*. *Agronomy Series 29*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, EUA. 125-162 pp.

VIANDS, D.R.; P. SUAN; D.K. BARNES. 1988. *Pollination control: Mechanical and Sterility*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. Jr. HILL. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement, Chapter 30*. *Agronomy Series 29*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. 931-960 pp.

## CAPÍTULO 3

### Ambiente y rendimiento potencial de alfalfa

*Abordaje desde la ecofisiología*

Silvia Olivo, Juan Mattera,  
Fernando Salvagiotti y  
Daniel Collino

## Introducción

En este capítulo se abordarán los procesos involucrados en el crecimiento y en el desarrollo del cultivo de alfalfa explicados a través de dos modelos i) el basado en la eficiencia del uso de la radiación (modelo “radiativo”), que fuera originalmente propuesto por Monteith (1977) y que posteriormente Teixeira *et al.* (2008) adaptaron para el cultivo de alfalfa; y ii) el de componentes del rendimiento propuesto por Volenec *et al.* (1987). Además, se desarrollarán aspectos relacionados con el uso del agua y las diferencias existentes entre las producciones potencial, alcanzada y utilizada. Finalmente, el otro objetivo del capítulo es explicar –desde la ecofisiología– cómo incide el ambiente en los procesos de captura y eficiencia de uso los recursos y cómo estas respuestas afectan a la producción y la calidad del forraje.

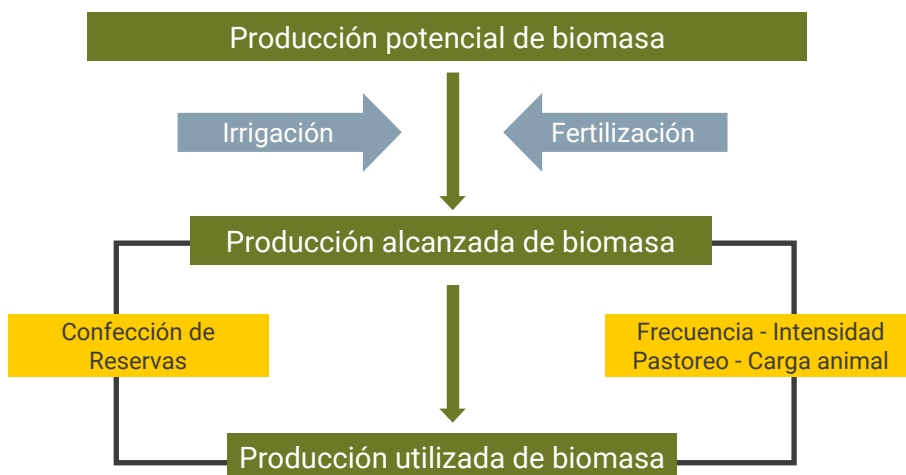
## Producción potencial, alcanzada y utilizada de alfalfa

En alfalfa, como en cualquier otro cultivo, el rendimiento potencial se define como aquella producción máxima que se puede obtener sin limitantes bióticas ni abióticas controlables (plagas, enfermedades y deficiencias de agua y nutrientes) bajo las condiciones de temperatura, radiación y fotoperíodo de cada ambiente en particular (Figura 1).

Por lo tanto, comprender los mecanismos fisiológicos con los que las plantas responden a estas señales ambientales (Teixeira, 2006) como así también aspectos relacionados con la implantación de la pastura (Romero *et al.*, 1991; Sevilla *et al.*, 2003; Mattera *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2011; Thiébeau *et al.*, 2011; Mattera *et al.*, 2013; Sevilla *et al.*, 2003; Olivo, 2018) y con el manejo de la defoliación o corte (Avice *et al.*, 1997; Belanger *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2007a; Ventroni *et al.*, 2010; Olivo *et al.*, 2017; Berone *et al.*, 2020) son esenciales para maximizar la producción de forraje.

En la Argentina, la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa del INTA (ver capítulo 8) conduce ensayos en diversos sitios agroecológicos que cubren gran parte del territorio nacional. Dichos ensayos son evaluados en condiciones óptimas de manejo del cultivo de alfalfa, por lo que de

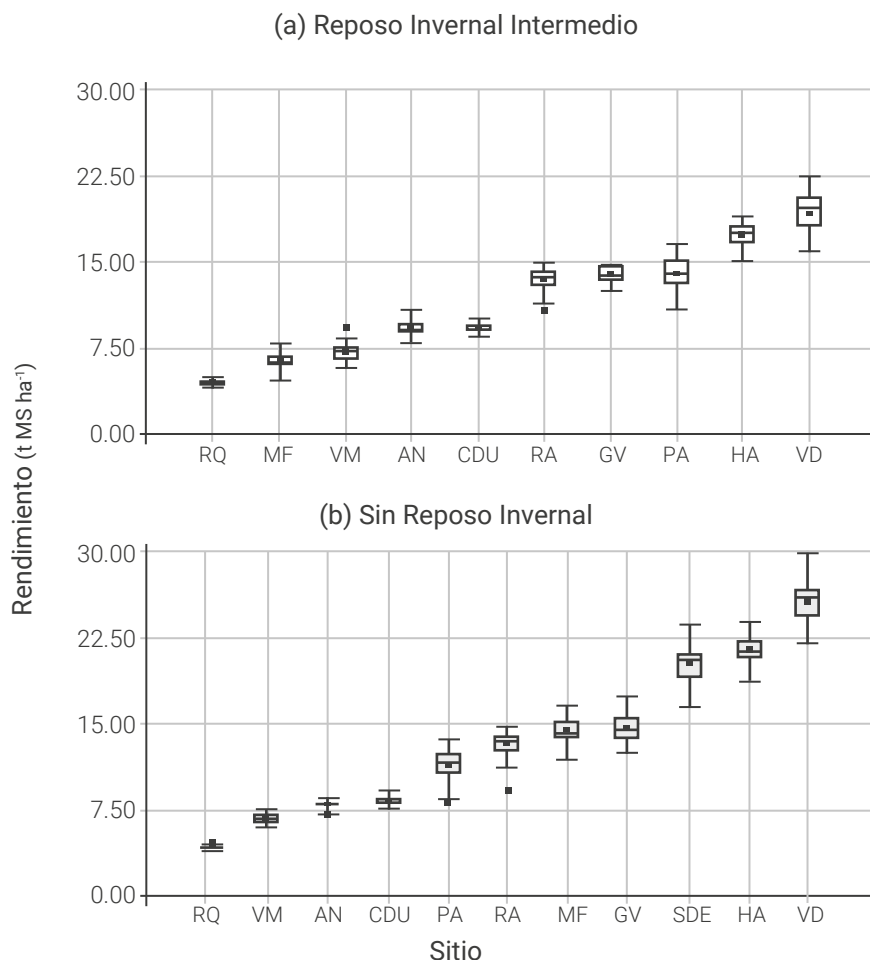
alguna manera brindan información acerca de la producción alcanzable en los diversos sitios.



■ **Figura 1.** Esquema de la producción potencial, alcanzada y utilizada en el cultivo de alfalfa.

En la Figura 2 se resumen los resultados de la serie 2014 de ensayos de evaluación conducidos en diez localidades de la red del INTA (Arolfo y Odorizzi, 2018). Se aprecia que tanto para los cultivares de reposo intermedio como para los sin reposo, los mayores rendimientos se obtuvieron en las localidades bajo riego (Santiago del Estero, Viedma e Hilario Ascasubi). Se destaca el caso de Viedma, donde los cultivares sin reposo invernal tuvieron un rango de producción de 22,5 a 30 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. Estos valores son muy cercanos a los valores potenciales de producción de alfalfa estimados por Collino *et al.* (2007), que oscilaron entre 30,5 y 32 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. Respecto de los cultivares con reposo invernal intermedio, los valores de producción en las tres localidades bajo riego estuvieron alrededor de las 20 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. Por un lado, en este caso, la brecha con respecto al potencial anteriormente señalado no está relacionada con la disponibilidad de agua sino con las condiciones de temperatura y radicación solar, que no fueron las suficientes para que el cultivo expresara su potencial de producción. Por otro lado, la diferencia de rendimiento entre grupos de reposo invernal registrada en Viedma también estaría indicando que los cultivares sin reposo aprovecharon mejor las condiciones de crecimiento de ese ambiente que los

de reposo intermedio. Esto se relaciona con un diferencial de potencial de producción entre grupos de reposo invernal.



■ **Figura 2.** Gráficos de caja (box-plot) para el promedio de rendimiento anual de forraje (t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) durante los tres primeros ciclos de producción en distintos sitios de la Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Alfalfa para el ciclo de evaluación 2014-18. Referencias: a) cultivares con reposo invernal intermedio (14 cultivares) y b) cultivares sin reposo invernal. Referencias: RQ = Reconquista, VM = Villa Mercedes, AN = Anguil, CDU = Concepción del Uruguay, PA = Paraná, RA = Rafaela, MF = Manfredi, GV = General Villegas, SDE = Santiago del Estero (SDE), HA = Hilario Ascasubi y VD = Viedma (VD). Para cada localidad, los puntos y las líneas representan la media y la mediana, respectivamente. Los límites inferior y superior de los cuadros verticales representan los percentiles 25 y 75, respectivamente. Tomado de Arolo y Odorizzi (2018).

Siguiendo con el análisis de la Figura 2, se advierte que un segundo grupo de ambientes tuvieron producciones que, si bien intermedias, son elevadas para condiciones de secano, como las registradas en los sitios de la región central de Argentina: Rafaela, Paraná, General Villegas y Manfredi. En estos casos la producción de forraje estuvo cercana a las 15 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, lo que hace inferir que la mayor limitante ha sido probablemente una oferta hídrica menor a la demanda del cultivo. En apoyo de esto, Totis *et al.* (1998) indicaron que para norte de la provincia de Buenos Aires la demanda hídrica de la alfalfa se ubica en torno a los 1640 mm año<sup>-1</sup>, mientras que los valores de precipitaciones oscilan entre 800 y 1200 mm año<sup>-1</sup>. En este contexto es esperable una limitación al crecimiento del cultivo.

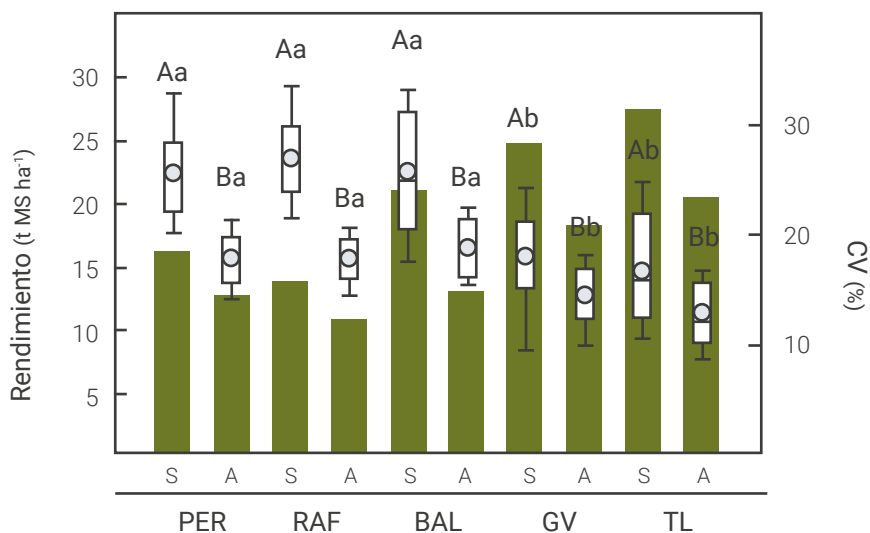
Por último, existe un tercer grupo integrado por Anguil, Villa Mercedes, Concepción del Uruguay y Reconquista, donde las mayores limitaciones ambientales hicieron que se alcanzaran producciones promedio por debajo de las 10 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. Las dos primeras localidades registran menores precipitaciones, lo que ocasiona usualmente fuertes limitaciones hídricas al crecimiento del cultivo. Por el contrario, las dos localidades restantes registran precipitaciones elevadas –similares a las de Rafaela y Paraná–, pero tienen restricciones edáficas (suelos de textura muy fina) que restringen el crecimiento de la alfalfa.

De todo lo anterior se desprende, por un lado, que las brechas entre el rendimiento potencial y el efectivamente alcanzado diversos sitios de la Argentina indican un claro margen de acción para mejorar la producción de la alfalfa. Como se señalara, los datos de producciones potenciales cercanas a las 30 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> poco menos que duplican los valores de producción alcanzados en los ensayos de evaluación de algunas localidades.

Por otro lado, cuando se recurre al riego, debe tenerse en cuenta que el impacto de esta práctica puede variar entre distintas zonas. Por ejemplo, para el norte de la provincia de Buenos Aires, Bertín *et al.* (2015) calcularon un incremento de 25 % en la producción de MS de alfalfa con riegos estratégicos, logrando ir de 15 a 18,7 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>; sin embargo, como efecto colateral, el uso del riego aumentó la concentración de sodio en el suelo como consecuencia de la calidad del agua disponible (Bertín, comunicación personal). En consecuencia, sería muy

interesante avanzar en el conocimiento de nuevas prácticas de manejo de la irrigación en el cultivo de alfalfa, como la irrigación deficitaria o el efecto de la irrigación subsuperficial.

Ojeda *et al.* (2018b) analizaron la variación interanual de la producción de alfalfa dentro de una secuencia de rotación (Figura 3). Para ello, utilizaron un modelo de estimación de rendimiento y de eficiencia de uso de las lluvias en diferentes secuencias de cultivo (cultivos anuales vs. alfalfa) y en zonas agroecológicas contrastantes.



**Figura 3.** Rendimiento medio de biomasa aérea (t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) para diferentes secuencias de cultivos (S) y alfalfa (A) en Pergamino (PER), Rafaela (RAF), Balcarce (BAL), General Villegas (GV) y Trenque Lauquen (TL) durante una serie climática de 30 años (1983–2013). Los círculos blancos y las líneas negras horizontales representan la media y la mediana de cada situación, respectivamente. Los límites inferior y superior de los cuadros verticales representan los percentiles 25 y 75, respectivamente. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas (p<0,05) entre tratamientos dentro de cada localidad. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (p<0,05) entre localidades para un mismo tratamiento. Las barras grises indican el coeficiente de variación (%) del rendimiento modelado de MS.

Conforme indicaron los autores del trabajo, por una parte las variaciones en el rendimiento de MS se asociaron con la disponibilidad de lluvias, siendo este efecto mayor en los sitios con más de 800 mm anuales. Cuando se analizaron las rotaciones, se observó que la alfalfa presentó menor rendimiento que la secuencia de cultivos anuales, aun-



que con menor coeficiente de variación. Por lo tanto, se concluye que las variaciones de rendimiento de las secuencias de cultivos anuales se correlacionaron con la variabilidad de las precipitaciones de cada año, mientras que el cultivo de alfalfa mostró una mayor estabilidad frente a esas variaciones.

Por otra parte, es igualmente importante mencionar que para acercarse a la producción potencial en cada ambiente es menester ajustar los aspectos relacionados con la nutrición del cultivo (ver capítulo 10). Además, a fin de reducir la brecha entre las producciones alcanzadas y efectivamente utilizadas, es clave también ajustar el manejo de la defoliación, ya sea bajo condiciones de corte o pastoreo (ver capítulo 11). Por ejemplo, en ensayos de pastoreo realizados en Rafaela en condiciones de secano, Baudracco *et al.* (2011) estimaron que la producción de forraje efectivamente utilizada por los animales pasaba de 62 % a 76 % por el solo hecho de aumentar la carga animal.

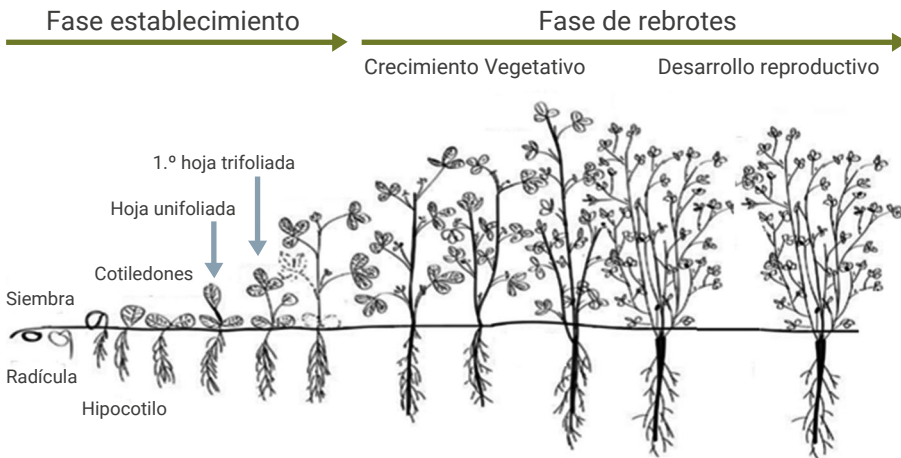
## Fenología del cultivo, temperatura y fotoperíodo

Conocer y entender los procesos de crecimiento y desarrollo del cultivo de alfalfa a través de los ciclos de rebrote a lo largo de las estaciones de crecimiento es fundamental para realizar prácticas de manejo adecuadas (Moot *et al.*, 2003). El crecimiento refiere a la acumulación de materia seca producto de la intercepción de la luz y partición del carbono fijado a través de la fotosíntesis, mientras que el desarrollo refiere al estado de madurez dentro del ciclo del cultivo o de rebrote (Christian, 1977). Estos procesos están fuertemente relacionados y son modificados por señales ambientales tales como temperatura, fotoperíodo y radiación. La materialización de tales procesos se hace visible por medio de la producción de nudos y hojas en el tallo principal y en las ramificaciones axilares (Fick *et al.*, 1988; Baldissera *et al.*, 2014).

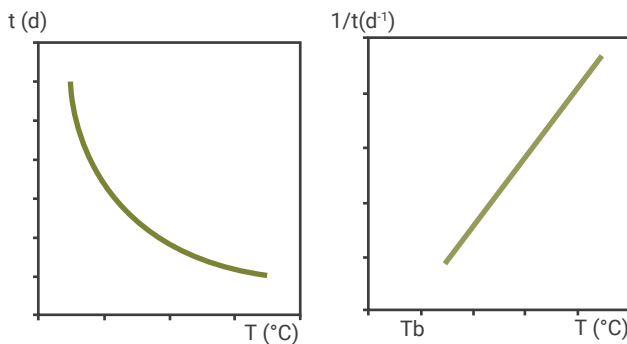
Una vez implantado el cultivo, la ontogenia de la alfalfa entra en la fase de rebrotes (ver capítulo 5), que comprende los ciclos de crecimiento que ocurren entre el primer y el último corte o defoliación en la vida del cultivo. A su vez, los ciclos de crecimiento comprenden dos períodos: 1) crecimiento vegetativo, que abarca la producción de hojas y tallos

(forraje); y II) crecimiento reproductivo, que abarca desde la floración hasta la producción de semillas (Kalu y Fick, 1981; Undersander *et al.*, 2011). Estos períodos se esquematizan en la Figura 4.

La temperatura es el principal factor que incide en la duración de cada período de crecimiento (Christian, 1977; Fick *et al.*, 1988). La relación entre la duración de un período y la temperatura no es lineal (Figura 5a), motivo por el cual la caracterización de un período queda generalmente determinado por su inversa ( $1/t$ ), que se denomina tasa de desarrollo y que se expresa en  $\text{día}^{-1}$  (Figura 5b).

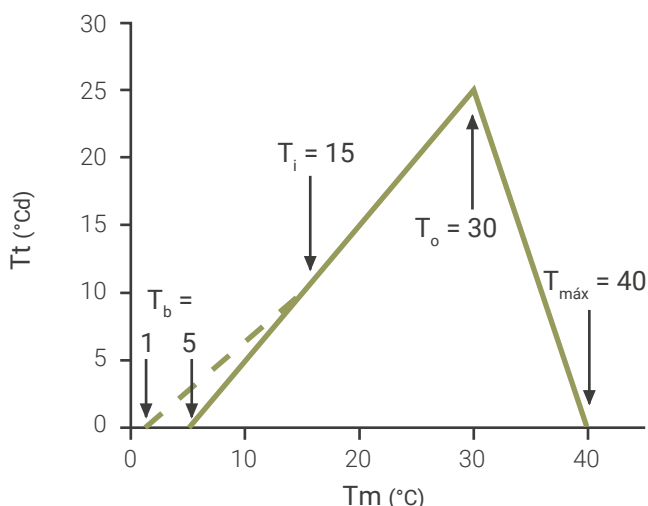


■ **Figura 4.** Ontogenia del cultivo de alfalfa dividida en fase de establecimiento y fase de rebrotes, comprendiendo esta última los períodos de crecimiento vegetativo y desarrollo reproductivo.



■ **Figura 5.** Respuesta idealizada a la temperatura  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) respecto de: (a) duración de una fase fenológica (días) y (b) su inversa, la tasa de desarrollo  $1/t$  ( $\text{día}^{-1}$ ). Adaptado de Sadras *et al.* (2009).

Por un lado, lo anterior permite definir tres temperaturas cardinales: la temperatura base ( $T_b$ ), la temperatura óptima ( $T_o$ ) y la temperatura máxima ( $T_{max}$ ). La  $T_b$  y la  $T_{m\acute{a}x}$  son las temperaturas en que la tasa de desarrollo es cercana a cero, es decir que, el desarrollo prácticamente se detiene. Por otro lado, la tasa de desarrollo aumenta linealmente entre la  $T_b$  y la  $T_o$ . De acuerdo con Fick *et al.* (1988), la alfalfa tiene una  $T_b = 5\text{ }^\circ\text{C}$ , una  $T_o = 30\text{ }^\circ\text{C}$  y una  $T_{m\acute{a}x} = 45\text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente, Moot *et al.* (2001) propusieron considerar una  $T_b = 1\text{ }^\circ\text{C}$  cuando la temperatura media del aire ( $T_m$ ) es  $\leq 15\text{ }^\circ\text{C}$  y una  $T_b = 5\text{ }^\circ\text{C}$  cuando la  $T_m > 15\text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 6). Todos estos valores son importantes para calcular los tiempos térmicos ( $T_t$ ) de cada período de crecimiento, expresados de grados-día ( $^\circ\text{Cd}$ ).



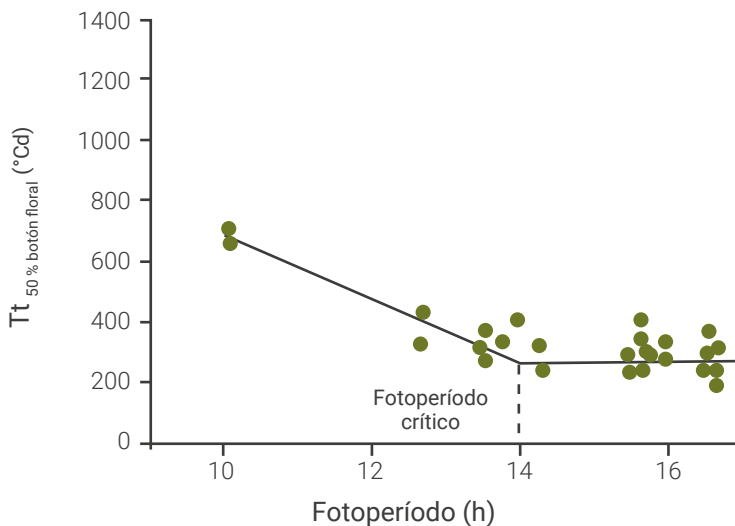
■ **Figura 6.** Umbrales de temperatura para calcular la acumulación de tiempo térmico ( $T_t$ ) en grados días ( $^\circ\text{Cd}$ ) durante el desarrollo del cultivo de alfalfa en función de la temperatura media del aire ( $T_m$ ). Referencias:  $T_b$ : temperatura base;  $T_i$ : temperatura de inflexión;  $T_o$ : temperatura óptima y  $T_{m\acute{a}x}$ : temperatura máxima. Cuando la  $T_m \leq 15\text{ }^\circ\text{C}$ , la  $T_b = 1\text{ }^\circ\text{C}$ ; cuando la  $T_m > 15\text{ }^\circ\text{C}$ , la  $T_b = 5\text{ }^\circ\text{C}$ . Adaptado de Brown *et al.* (2005).

El tiempo térmico ( $T_t$ ) es una forma de expresar la relación entre la temperatura y el desarrollo de la planta. El  $T_t$  también es conocido como la cantidad de Grados Día de crecimiento Acumulado (GDA) que se requieren entre dos estados de desarrollo (Arnold y Monteith, 1974). El modelo de cálculo para  $T_t$  se basa en la sumatoria de las diferencias

entre  $T_m$  y  $T_b$  (Ritchie y Nesmith, 1991) y se representa en la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo Térmico (Tt)} = \sum (T_m - T_b)$$

Otro factor que afecta la tasa de desarrollo de los cultivos es el fotoperíodo (duración del día), que es percibido por las hojas y transmitido al ápice de crecimiento. El fotoperíodo incide sobre la floración y, dependiendo de la latitud, puede incidir también sobre el filocrono (intervalo de aparición de hojas). La alfalfa es una especie de día largo que requiere mayores valores de  $T_t$  para florecer conforme disminuye la longitud del día, con un fotoperíodo crítico de 14 h (315 GDA,  $T_b = 5^\circ\text{C}$ ) (Major *et al.*, 1991); a partir de ese valor, para que las plantas alcancen 50 % de desarrollo de botón floral, el  $T_t$  se vuelve constante (Figura 7). Por lo tanto, cuando el fotoperíodo se incrementa de 13,5 a 16 h, el  $T_t$  requerido para florecer disminuye de 550 a 380 GDA (Moot *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2011; Sim *et al.*, 2015).



■ **Figura 7.** Tiempo Térmico ( $T_t$ ) requerido para alcanzar el 50 % de botones florales ( $T_t$  50 % botón floral  $^\circ\text{Cd}$ ) en función del fotoperíodo (h) en rebrotes de un cultivar de alfalfa con reposo invernal (GRI 5) creciendo en el rango del fotoperíodo de Lincoln, Nueva Zelanda. Adaptado de Teixeira *et al.* (2011).

## Modelo ecofisiológico de aprovechamiento de la radiación

Uno de los objetivos del manejo de cultivos de alto rendimiento es generar hojas (área foliar) para que las plantas puedan captar la radiación solar y convertirla en biomasa (Vega y Andrade, 2009). La producción de biomasa de un cultivo puede ser expresada a través del modelo ecofisiológico, desarrollado por Monteith (1977), que considera a la biomasa producida como el resultado del siguiente producto:

$$\text{Biomasa total} = \sum (f \text{ RFA}_{\text{interceptada}}) * \text{EUR}_{\text{total}}$$

En esa ecuación,  $\text{RFA}_{\text{inc}}$  es la radiación fotosintéticamente activa diaria incidente,  $f \text{ RFA}_{\text{interceptada}}$  es la fracción diaria de dicha radiación que el cultivo es capaz de interceptar y  $\text{EUR}_{\text{total}}$  es la eficiencia ( $\text{g MJ}^{-1}$ ) con la cual el cultivo convierte la radiación interceptada en biomasa (aérea + subterránea).

Cuando se analiza la producción de biomasa aérea, que reviste un interés particular en el caso de forrajeras como la alfalfa, ya que la biomasa aérea representa al rendimiento de forraje, el modelo sufre una modificación. De este modo el valor de  $\text{EUR}_{\text{total}}$  es afectado por el coeficiente  $p$ , que es la fracción particionada hacia estructuras subterráneas (raíz + corona) permitiendo cuantificar la  $\text{EUR}_{\text{aérea}}$ . Como se verá más adelante, esta modificación al modelo permitirá entender mejor las variaciones de  $\text{EUR}_{\text{aérea}}$  de la alfalfa a lo largo del año. De este modo la ecuación resultante (Brown *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2008) será:

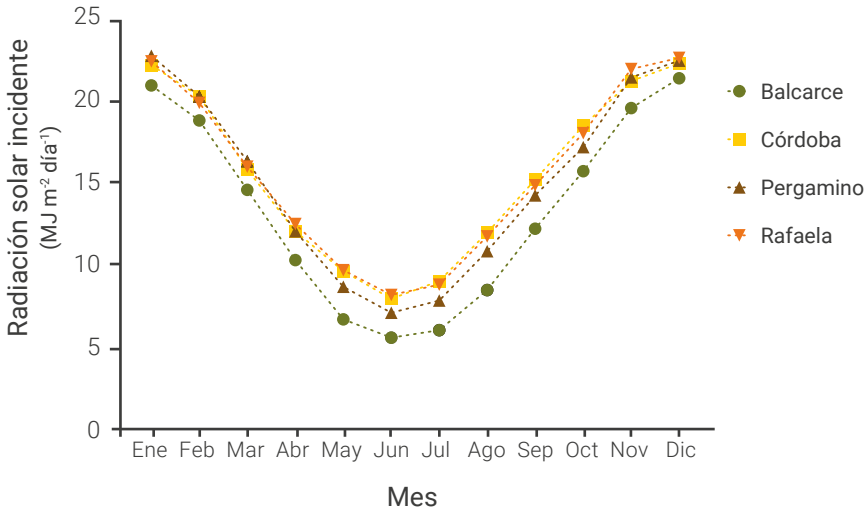
$$\text{Biomasa aérea} = \sum (f \text{ RFA}_{\text{interceptada}}) * \text{EUR}_{\text{aérea}}$$

$$\text{EUR}_{\text{aérea}} = \text{EUR}_{\text{total}} * (1 - p_{\text{raíz}})$$

### *Radiación global incidente y radiación fotosintéticamente activa incidente*

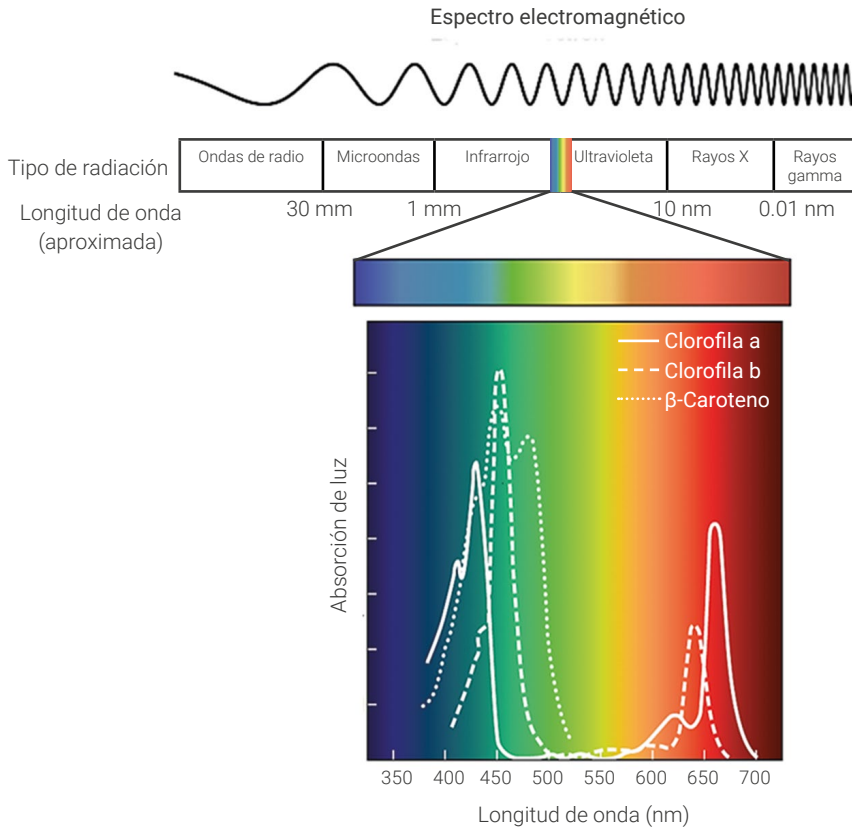
La cantidad de radiación solar global incidente a nivel de cultivo determina el potencial de producción de biomasa en un ambiente determinado Monteith (1981). La intensidad ( $\text{MJ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y la duración ( $\text{h día}^{-1}$ ) de la ra-

diación solar dependen del ángulo de elevación solar, por lo que ambos valores presentan variaciones en función de la latitud y de la estación del año, así como también de la altitud y de las condiciones de nubosidad del sitio. Al analizar los valores mensuales de radiación solar de algunas localidades representativas de la región pampeana (Figura 8), se observa que las variaciones de cada una a lo largo del año son más importantes que las diferencias entre localidades en cualquier época del año. Considerando el conjunto de localidades, la radiación solar promedio que incide presenta un rango anual de 15 a 17 MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (Collino *et al.*, 2007); por el contrario, la radiación a lo largo del año tiene una elevada variación, con valores de 6-10 MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en junio a 22-24 MJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en diciembre (Collino *et al.*, 2005).



■ **Figura 8.** Radiación solar incidente (MJ m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup>) en función a los meses del año para cuatro sitios de la región pampeana: Balcarce, Córdoba, Pergamino y Rafaela. Adaptado de Collino *et al.* (2007).

Usualmente, el cultivo solo utiliza entre 45 y 50 % del total de la radiación incidente (Monteith, 1972). Esa radiación utilizada corresponde a las longitudes de onda de entre 400 y 700 nanómetros, que es la fracción que absorben los pigmentos fotosintéticos presentes en las plantas (Figura 9). Esta fracción de la radiación solar se conoce como radiación fotosintéticamente activa incidente (RFA<sub>inc</sub>).



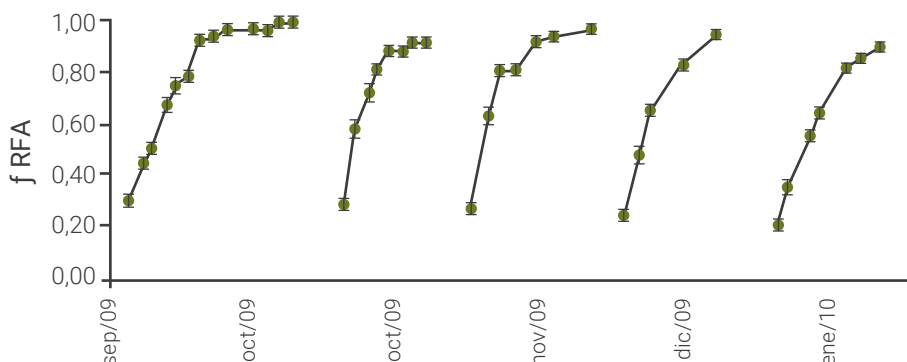
■ **Figura 9.** Longitudes de onda (400-700 nanómetros) que absorben los pigmentos fotosintéticos presentes en las plantas. Adaptado de Campbell y Norman (1998).

### *Fracción de la radiación interceptada por la canopia*

Las hojas son las estructuras de las plantas que, en mayor proporción, captan la luz solar. Así, a medida que las plantas crecen, interceptan y absorben una cantidad creciente de la  $RFA_{inc}$ . Este proceso puede ser representado por la curva de intercepción en el tiempo que se presenta en la Figura 10, y está fuertemente asociado a la evolución del Índice de Área Foliar (IAF), que cuantifica la cantidad de área foliar (hojas) por unidad de superficie (suelo) (Gardner *et al.*, 1985).

De acuerdo con Brown *et al.* (2005), el IAF puede entenderse a través de componentes de crecimiento (ej., tallos  $m^2$  y área individual de hoja) y de desarrollo (ej., número de hojas principales y ramificaciones). A

su vez, los cambios que surjan en el IAF serán dependientes de la tasa de aparición de hojas y de expansión foliar que –junto con la tasa de senescencia foliar en la base de la canopia– definen la expansión foliar neta diaria del IAF.



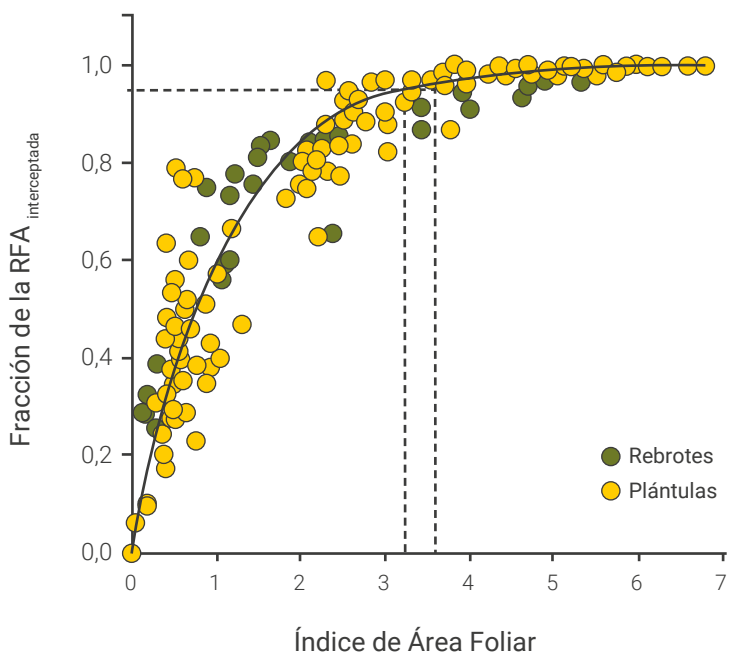
■ **Figura 10.** Evolución de la fracción de intercepción ( $f$ ) de la  $RFA_{inc}$  para cinco rebrotes de alfalfa en el cv. Monarca SP INTA (sin reposo invernal). Estimaciones hechas durante el período primavera-verano en Rafaela (Santa Fe) bajo condiciones de crecimiento potenciales y con un distanciamiento entre hileras de 15 cm. Adaptado de Mattera *et al.* (2013).

Al inicio de un período de crecimiento o rebrote, cuando el IAF es bajo, debido a la escasa cantidad de hojas presentes, la intercepción de la radiación también es baja, haciendo que una gran parte de esa radiación llegue al suelo sin ser aprovechada por el cultivo. Con el avance de los procesos de desarrollo y crecimiento, la acumulación de hojas aumenta hasta alcanzar un valor de IAF denominado “IAF crítico”, que corresponde a la intercepción del 95 % de la  $RFA_{inc}$ . En el caso de alfalfa, el IAF crítico corresponde a valores de IAF entre 3,2 a 3,6 (Figura 11); por encima de estos valores, se alcanza el *plateau* en torno a los valores máximos de intercepción (Teixeira *et al.*, 2007c; Teixeira *et al.*, 2011).

Además del IAF, la disposición de las hojas en el espacio aéreo también determina cómo es interceptada la radiación. La disposición de las hojas está básicamente definida por el ángulo de inserción y por el largo de los entrenudos en los tallos. Estas variables determinan el coeficiente de extinción lumínica ( $k$ ). Valores elevados de  $k$  se corresponden con canopeos de tipo planófilo, donde las hojas rápidamente interceptan la  $RFA_{inc}$  y alcanzan el IAF crítico a bajos valores, como es el caso del tré-



bol blanco (*Trifolium repens*). Por el contrario, valores bajos de  $k$  definen canopeos de tipo erectófilo, de estructura más abierta y donde el incremento de la interceptación es más lento, como por ejemplo en festuca alta (*Festuca arundinacea*).



**Figura 11.** Fracción de la radiación fotosintéticamente activa interceptada ( $f_{RFA_{inc}}$ ) en función del índice de área foliar para un cultivar de alfalfa con reposo invernol (GRI 5) en fase de establecimiento (plántulas) y rebrotos en Lincoln, Nueva Zelanda. Adaptado de Teixeira *et al.* (2007c; 2011).

En el caso particular de la alfalfa, la arquitectura del canopeo posee características que le permiten una captura de la luz eficiente, dada por la disposición de las hojas con distintos ángulos foliares entre estratos y por la capacidad de los folíolos de moverse siguiendo al sol (Travis y Reed, 1983; Heichel, 1988). Por una parte, de este modo, un IAF crítico de 3,2 a 3,6 (Figura 11) se corresponde con valores de  $k$  de 0,81 a 0,93 (Teixeira *et al.*, 2007c; Teixeira *et al.*, 2011). Por otra parte, de acuerdo con Sheehy *et al.* (1979), la tasa fotosintética en alfalfa aumenta en forma lineal ante incrementos del IAF, alcanzando niveles de saturación recién a elevados valores de IAF (de 5 a 6); esto es consecuencia del mayor sombreado y de menores temperaturas en los estratos inferiores del canopeo (Heichel *et al.*, 1988).

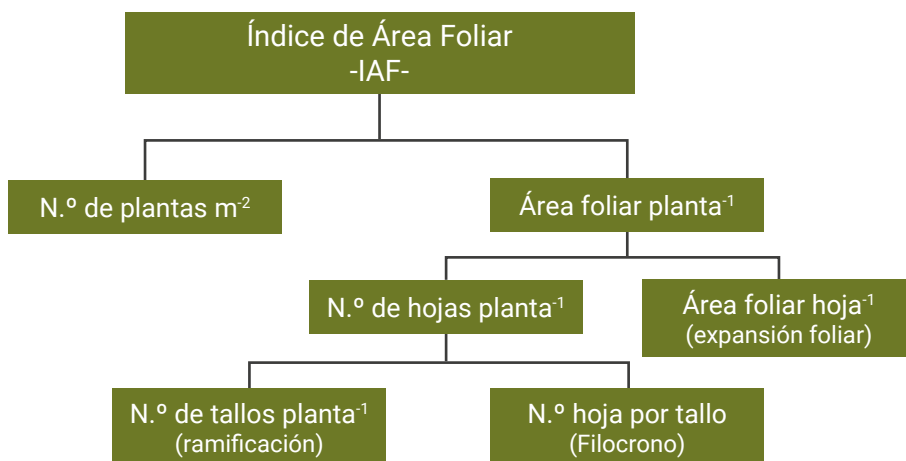
De la sumatoria diaria del producto entre la  $RFA_{inc}$  y la  $fRFA_{interceptada}$  surge la  $RFA_{interceptada}$  acumulada en cada período de crecimiento ( $RFA_{intacum}$ ), valor también afectado por la duración del período de crecimiento en cuestión. Además de los procesos de desarrollo y de crecimiento, y a medida que se avanza en el rebrote, un elevado IAF y una alta interceptación producen sombreado en los estratos inferiores del canopeo, lo que incrementa el proceso de senescencia de hojas. La tasa de senescencia es muy baja hasta la aparición de la novena hoja en el tallo principal; a partir de este momento, la tasa de senescencia alcanza un valor de 1,1, lo que equivale a decir que por cada hoja nueva aparecida en el tallo principal se muere 1,1 hoja en los estratos inferiores (Brown *et al.*, 2005). Por lo tanto, desde el inicio del rebrote hasta aproximadamente los 350-380 GDA ( $T_b=5\text{ }^\circ\text{C}$ ), que corresponde al intervalo de tiempo entre defoliaciones, la pérdida por senescencia es prácticamente despreciable (Brown *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2007c), alcanzando valores de 7 a 10 % del total del crecimiento acumulado del rebrote recién a los 700 GDA (Olivo *et al.*, 2017).

Lo anterior resulta en un cambio en la estructura del canopeo a medida que el período de crecimiento progresa por encima de los 450 GDA, pasando de una estructura más foliosa a una estructura donde la proporción de los tallos y la pérdida de hojas por senescencia se acrecientan. En consecuencia, si bien la producción de biomasa aérea puede seguir aumentando, las características nutritivas del forraje acumulado van disminuyendo, generando una menor digestibilidad y un menor porcentaje de proteína bruta como resultado de la menor relación hoja/tallo.

Los componentes de desarrollo del IAF que impactan en la  $fRFA_{interceptada}$  resultan del producto entre el área foliar de cada planta y la densidad de plantas. A su vez el área foliar de cada planta resulta del número de hojas por planta y el área foliar de cada hoja (Figura 12). Todos estos parámetros resultan de procesos controlados por la temperatura (Moot *et al.*, 2001) y modulados por el fotoperíodo (Brown *et al.*, 2005).

El intervalo de aparición de hojas sucesivas se denomina filocrono, que se cuantifica a través del tiempo térmico ( $T_t$ ) y se expresa en grados día ( $^\circ\text{Cd}$ ) (Lemaire y Chapman, 1996). Para las condiciones de Nueva Zelanda, Brown *et al.* (2005) estimaron un filocrono de  $37^\circ\text{Cd}$  durante la primavera y el verano; a partir del comienzo del otoño, con fotoperío-

dos decrecientes, el filocrono se incrementó a 60°Cd, lo que equivale a decir que durante el otoño se requiere más tiempo térmico para que aparezca una nueva hoja. Esto último también estaría relacionado con la prioridad que tienen los órganos subterráneos durante el otoño, momento en que se produce una mayor partición de fotoasimilados hacia raíz y corona, en desmedro del crecimiento y desarrollo de las estructuras aéreas (Avice *et al.*, 2003).

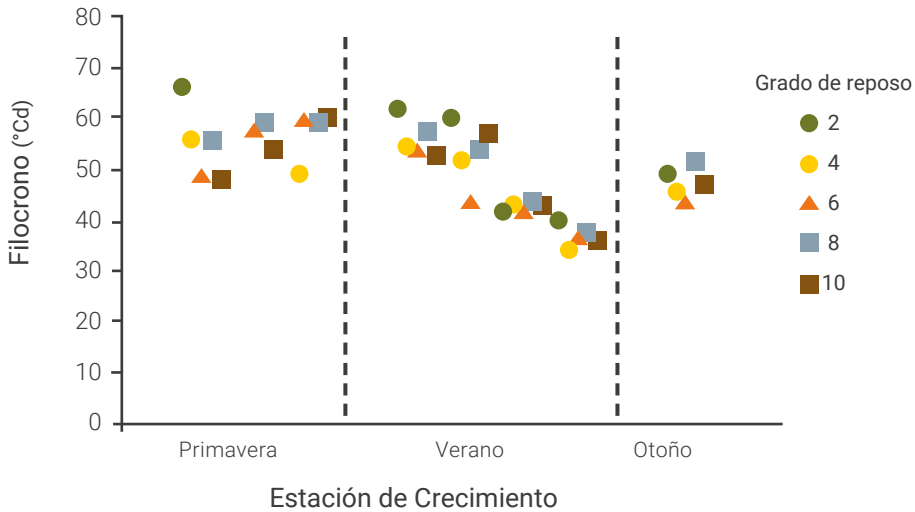


■ **Figura 12.** Componentes del índice de área foliar en una pastura de alfalfa. Entre paréntesis se menciona el proceso involucrado en la definición de alguna de las variables.

Diversos autores han estimado valores similares de filocrono, que van desde 35°Cd (73) a 32,4°Cd (Baldissera *et al.*, 2014). Teixeira *et al.* (2007c), evaluando diferentes frecuencias de corte, señalaron que si bien durante los meses estivales el filocrono fue similar a los anteriormente mencionados, en la medida que disminuyó el fotoperíodo —de 16,5 a 10,5 horas diarias— el filocrono aumentó entre 40 y 63°Cd, dependiendo de la frecuencia de corte utilizada.

Por un lado, Spada y Olivo (2014), caracterizando en Manfredi (zona semiárida) rebrotes de primavera-verano de cultivares de reposo invernal contrastante (GRI 2, 4, 6, 8 y 10) y con fotoperíodos de 12,5 a 14 horas diarias, no hallaron diferencias ( $p > 0,05$ ) de filocrono entre GRI (Figura 13), no obstante, cultivares de menor reposo manifestaron una tendencia a mayores valores. Por otro lado, debe considerarse que el déficit

hídrico estival que normalmente ocurre en Manfredi pudo haber modificado la expresión del filocrono.



**Figura 13.** Filocronos (°Cd) a lo largo de tres estaciones de crecimiento (primavera, verano y otoño) para cultivares de alfalfa con diferentes grado de reposo invernal (GRI 2, 4, 6, 8 y 10) en Manfredi (Córdoba). Los valores de filocrono corresponden a cuatro años de medición (2008-2011). Adaptado de Spada y Olivo (2014).

Por un lado, el IAF está afectado también por el proceso de ramificación de la planta, que está sincronizado con la aparición de hojas en el tallo principal. Las ramificaciones comienzan cuando aparece el 4.º o 5.º nudo hoja<sup>-1</sup> en el tallo principal, registrándose una mayor tasa de ramificación en otoño y primavera respecto de la que se produce en verano (Brown *et al.*, 2005; Baldissera *et al.*, 2014). Por otro lado, si bien el tamaño máximo de las hojas está determinado genéticamente, la expresión de ese potencial dependerá de factores ambientales —tales como la temperatura, la radiación, el agua disponible y el contenido de reservas endógenas en raíz y corona (Tardieu *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2005)— y del manejo del cultivo, particularmente la frecuencia de corte o pastoreo (Teixeira *et al.*, 2007c). De esta forma, el tamaño final quedará definido más fuertemente por los cambios diarios de la tasa de expansión foliar (m<sup>2</sup> hoja<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) que por la duración de la expansión (día hoja<sup>-1</sup>) (Tardieu *et al.*, 1999).

En ausencia de limitantes hídricas y nutricionales, la tasa de expansión foliar será mayor en primavera/verano que en otoño, con menores y mayores filocronos respectivamente (Brown *et al.*, 2005). Esto está asociado a que las condiciones térmicas en primavera/verano están más cercanas al rango óptimo (25-30 °C) de temperatura de crecimiento de la (Christian, 1977; Moot *et al.*, 2001). En relación con la frecuencia de corte o pastoreo, Teixeira *et al.* (Teixeira *et al.*, 2007c) demostraron que las mayores frecuencias (250 GDA GDA) de corte se corresponden con menores tasas de expansión foliar, seguramente asociadas con menores niveles de reservas nitrogenadas en raíz y corona. En relación con esto, Avice *et al.* (2003) detectaron que los cambios individuales en el tamaño de las hojas fueron notables a partir de la 6.ª hoja del nudo principal, argumentado que —independientemente de la frecuencia de corte utilizada— las primeras hojas desplegadas pueden haberse desarrollado antes del pico de disminución de reservas, que ocurre aproximadamente a los 10 días posteriores al corte.

### *Eficiencia en el uso de la radiación*

Según Sinclair y Muchow (1999), el modelo desarrollado por Monteith (1977) permite una aproximación a la estimación de la productividad en relación con la radiación incidente, estableciendo una relación lineal entre la acumulación de biomasa aérea y la radiación interceptada. Por su parte, la EUR presenta una relación curvilínea con las tasas fotosintéticas alcanzadas, donde los valores de EUR se estabilizan a valores altos de tasa de fotosíntesis. Esto explicaría la relativa estabilidad de la EUR cuando las plantas crecen bajo condiciones potenciales. Entre los factores que afectan la EUR, Sinclair y Muchow (1999) mencionan como principales a la especie, al nitrógeno, a la sequía y a la estacionalidad; y entre los factores menores identifican a la estructura del cultivo (IAF) y a la calidad de la radiación (relación entre la radiación directa y la radiación difusa).

Respecto del tipo de especie que se trate, las C4 son las que alcanzan mayores valores de EUR, lo que se traduce en mayores tasas fotosintéticas; siguen, en orden decreciente, las especies C3 no leguminosas y, por último, las C3 leguminosas, que tienen una menor EUR derivada de su mayor costo energético para formar biomasa con mayor contenido

de proteínas y grasas. El contenido de nitrógeno de la hoja evidencia una relación directa con la EUR en diversos cultivos, alcanzando una estabilización a valores elevados de nitrógeno foliar; en consecuencia, las diferencias del contenido de nitrógeno en el suelo impactan sobre la EUR. La sequía presenta un patrón de respuesta diferente, dado que la EUR recién se ve afectada por debajo de un valor umbral de humedad edáfica.

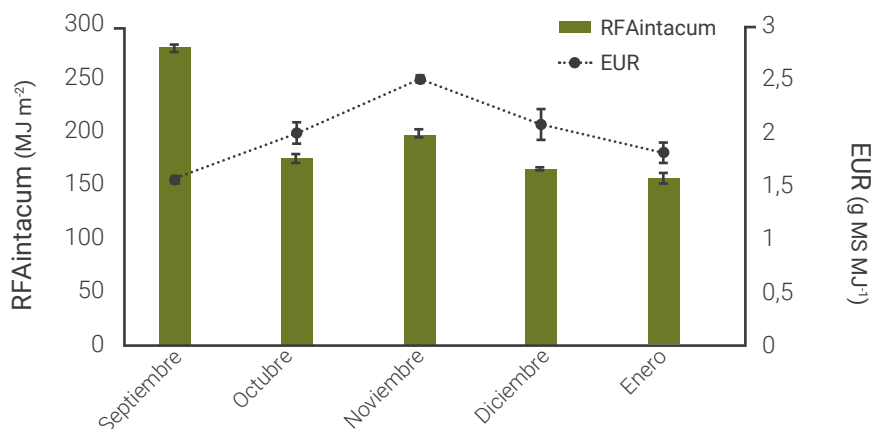
La estacionalidad de la EUR está relacionada con los cambios en las condiciones climáticas, que afectan las tasas máximas de fotosíntesis alcanzadas por los cultivos y, por ende, de EUR. En el caso de alfalfa, como se verá más adelante, se suman las variaciones estacionales registradas en lo referido a la partición de fotoasimilados hacia los órganos subterráneos (raíces + corona) (Brown *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2008).

Con bajos valores de IAF, la EUR se puede ver disminuida por una mayor proporción de hojas en estado de saturación lumínica; en cambio, en días nublados, con mayor proporción de radiación difusa, la EUR puede aumentar un poco como fruto de una mejor redistribución de la radiación dentro del canopeo.

En el caso particular de la alfalfa, la irrigación ha mostrado un mayor efecto sobre la expansión foliar, y en consecuencia sobre la interceptación de la radiación; no obstante, la EUR se reduce solo con niveles severos de estrés hídrico (Collino *et al.*, 2005). Derivado de su capacidad para utilizar el N del aire a través de la fijación biológica, el N foliar en alfalfa es generalmente elevado, por lo cual la EUR alcanzada no se ve usualmente limitada.

Como ya se ha mencionado, la época del año afecta la EUR. Mattera *et al.* (2013), trabajando con condiciones potenciales de crecimiento, estimaron en Rafaela variaciones de 1,5 a 2,5 g MS MJ<sup>-1</sup> de radiación interceptada entre primavera y fin de primavera-verano (Figura 14). Esto se debe a que las condiciones térmicas de noviembre-diciembre son más cercanas al valor óptimo para la alfalfa, lo que posibilita alcanzar los mayores valores de EUR.

En el mismo sentido, Collino *et al.* (2005) hallaron un incremento lineal de la EUR con la temperatura ambiente hasta los 21°C; por encima de ese valor, la respuesta se estabilizó. Valores similares fueron reportados por Guzmán *et al.* (2007).



■ **Figura 14.** Estacionalidad de la radiación fotosintéticamente activa interceptada y acumulada ( $RFA_{Intacum}$ ) y de la eficiencia del uso de la radiación (EUR) en cinco rebrotes de alfalfa del cv. Monarca SP INTA (sin reposo invernal) durante la primavera-verano en Rafaela (Santa Fe) bajo condiciones potenciales de crecimiento y con un distanciamiento entre hileras de 15 cm. Adaptado de Mattera *et al.* (2013).

La calidad de la radiación incidente también afecta la EUR de la alfalfa. Así, en sistemas silvopastoriles, donde se genera un incremento de la radiación difusa y una disminución de la relación rojo:rojo lejano, Varella *et al.* (2011) detectaron aumentos significativos de la EUR. Estos incrementos compensan, al menos en parte, la disminución de la cantidad de radiación que reciben los estratos inferiores del canopeo por efecto del sombreado típico de estos agroecosistemas. En canopeos obtenidos por diferentes arreglos espaciales, Mattera *et al.* (2013) hallaron que los bajos IAF en distancias muy espaciadas explicaron la menor EUR estimada en esos casos. Sin embargo, Olivo *et al.* (2017), al evaluar diferentes arreglos de siembra, no registraron variaciones en la EUR.

La frecuencia de defoliación también afecta la EUR, aunque con un menor impacto que la estacionalidad. Teixeira *et al.* (2008) concluyeron que los pastoreos muy frecuentes (250 GDA) no permitieron una adecuada recomposición de las reservas en raíces y corona, lo que se reflejó en menores tasas fotosintéticas. Por su parte, Olivo *et al.* (2017) detectaron menores valores de EUR cuando disminuyó la frecuencia de corte (350 vs. 700 GDA). Esto último difícilmente pueda ser explicado por una menor fotosíntesis, ya que trabajos previos demuestran que las pasturas de alfalfa defoliadas con baja frecuencia muestran similar, o ligeramente

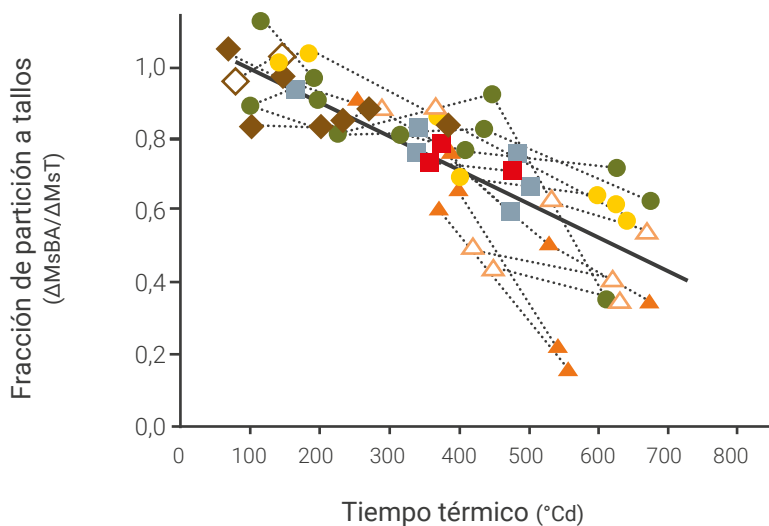
mayor, capacidad fotosintética que las pasturas defoliadas a muy alta frecuencia (250 GDA) (Teixeira *et al.*, 2008). Por el contrario, una posible explicación podría relacionarse con la hipótesis de que a partir del inicio de floración la partición de fotoasimilados de los órganos perennes sería mayor, lo que puede hacer que se reduzca la EUR en el tratamiento cortado cada 700 GDA. Esta línea de razonamiento es consistente con el mayor peso de biomasa perenne registrada por Olivo (2018) en alfalfa cortada menos frecuentemente.

### *Partición*

El proceso de partición del carbono fijado a través de la fotosíntesis abarca la asignación, la distribución y el transporte de asimilados desde el origen (fuente) hacia los diferentes sitios u órganos de utilización (destinos) (Heichel *et al.*, 1988). En alfalfa, el nivel de reservas endógenas, tanto de nitrógeno como de carbohidratos, en órganos perennes (corona + raíz) es un componente importante que impacta en la producción de biomasa y en la persistencia del cultivo (Avice *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2007c; Thiébeau *et al.*, 2011). El crecimiento de alfalfa no solo depende de la radiación solar interceptada por el follaje, sino también del aporte hacia tejidos aéreos desde las reservas endógenas de carbono y nitrógeno almacenadas en los órganos perennes (Khaiti y Lemaire, 1992; Cunningham *et al.*, 1998; Moot *et al.*, 2003; Avice *et al.*, 2001).

A fin de asegurar la persistencia del cultivo, se recomienda que la alfalfa acumule entre la siembra y la primera utilización (fase de implantación) entre 3 y 5 t MS ha<sup>-1</sup> de biomasa radicular, siendo este un destino prioritario durante ese período (Sim *et al.*, 2015). Por un lado, luego del primer corte, a lo largo de los rebrotes y las estaciones, la prioridad de los destinos se torna variable. Con relación a esto, Cralle (1983) observó que dentro de un ciclo de rebrote (período entre cortes sucesivos) los destinos de los fotoasimilados varían según el estadio de desarrollo de la pastura: durante los estadios vegetativos son prioritarios los órganos aéreos en detrimento de los órganos perennes, mientras que a partir de inicio de floración hasta fructificación (estadios reproductivos) las prioridades se invierten. Del mismo modo, Thiébeau *et al.* (2011) también señalaron que a medida que transcurre el tiempo de rebrote, la partición hacia los órganos perennes se va incrementando (Figura 15).





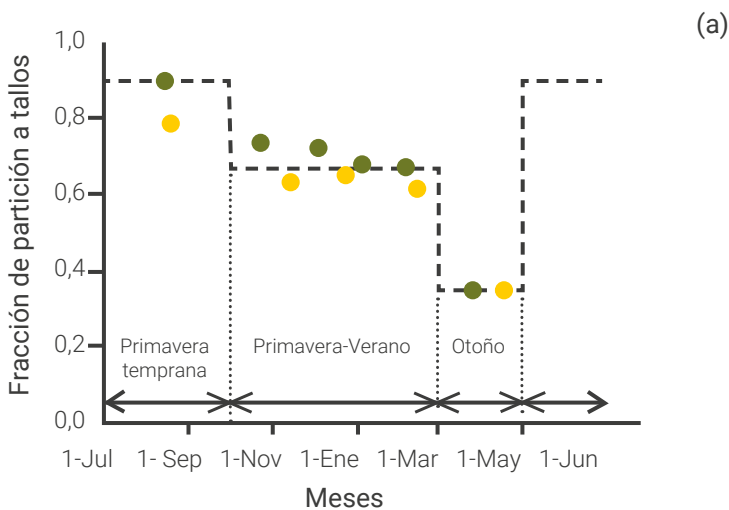
■ **Figura 15.** Fracción de partición hacia tallos ( $\Delta MsBA/\Delta MsT$ ) en función al Tiempo Térmico ( $^{\circ}Cd$ ) en alfalfa durante varios ciclos de rebrote y fechas de siembra.  $\Delta MsBA/\Delta MsT$ = delta de la materia seca de biomasa aérea/delta de la materia seca total. Ajuste de función lineal. Fracción de partición a tallos= $(1,9 - 8,90 * 10^{-4} * \text{Tiempo Térmico})$   $R^2 = 0,66$   $p < 0,001$ . Adaptado de Thibeau *et al.* (2011).

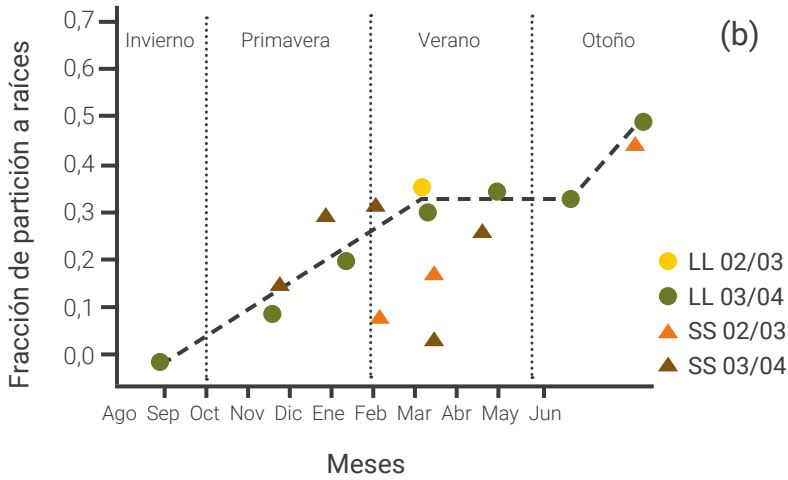
Por otro lado, el cultivo también presenta variaciones estacionales en la partición de fotosimilados. Brown *et al.* (2006) estimaron que la fracción de partición hacia los tallos fue mayor en primavera temprana (0,70-0,90), intermedia en primavera y verano (0,67) y menor en otoño temprano (0,35) (Figura 16a). Estas proporciones indican que en la medida que las temperaturas disminuyen y el fotoperíodo se acorta, la partición de asimilados tendrán como destino prioritario la raíz y la corona, de modo que se restablezcan los niveles de reservas durante el otoño, a fin de sobrevivir el invierno y asegurar la persistencia de las plantas (Moot *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2008) (Figura 16b). Además, la tasa de crecimiento de los primeros rebrotes de primavera se asocia de manera directa con el nivel de reservas presentes en los órganos perennes (Cunningham *et al.*, 1998; Moot *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2007a).

El nivel de reservas endógenas también se ve afectado por la frecuencia de corte o defoliación que se utilice. Luego de los sucesivos cortes o defoliaciones que se realizan durante los meses estivales, es necesario

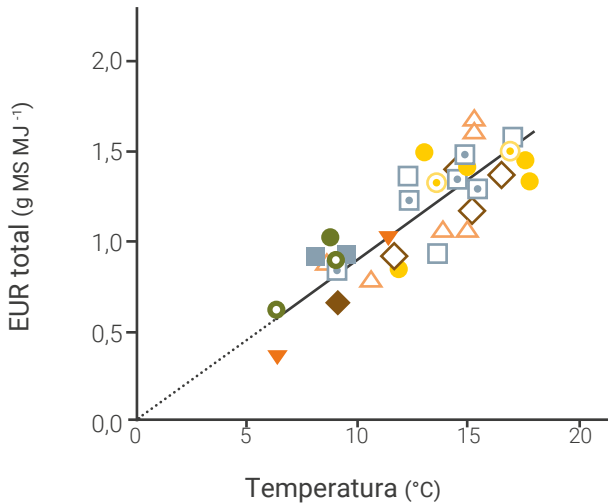
que la planta recupere el nivel de reservas entre fin de verano y principio de otoño. Mediante ese descanso, que no debe ser menor a los 500 GDA, la pastura de alfalfa podrá restablecer sus niveles de reservas y favorecer así la persistencia y la producción a lo largo de las sucesivas temporadas (Dhont *et al.*, 2004). Vázquez y Berone (2019), evaluando en Balcarce diferentes momentos de descanso otoñal en cultivares de reposo intermedio y sin reposo, concluyeron que —con independencia del grado de reposo invernal— la biomasa perenne solo se incrementó durante el invierno cuando el descanso comenzó temprano (inicios de febrero), lo que luego se tradujo en una mayor producción de biomasa durante la primavera siguiente. Por lo tanto, es importante remarcar que el momento óptimo del descanso sugerido hacia fin de verano-principio de otoño dependerá de las temperaturas, fecha promedio de la primera helada y radiación imperante en cada región agroecológica.

En función a lo anterior, las diferencias estacionales de prioridad de destinos (partición) estarán relacionadas en parte con los cambios registrados durante el año en la EUR de la biomasa aérea. Así, la disminución de la EUR aérea debida a la partición hacia estructuras subterráneas desaparece cuando se considera la biomasa total del cultivo y la EUR total. De todas formas, de acuerdo con Brown *et al.* (2006), existe una variación estacional de la EUR total debida principalmente al efecto de la temperatura sobre la fotosíntesis y el crecimiento (Figura 17).





■ **Figura 16.** (a) Fracción de partición a tallos en función de los meses y las estaciones del año para diferentes duraciones de rebrotes de alfalfa [Adaptado Brown *et al.* (2006)]; (b) Fracción de partición a raíces en función de los meses y las estaciones del año para diferentes frecuencias de pastoreo de alfalfa [Adaptado de Teixeira *et al.* (2007c)]. Las evaluaciones corresponden a las condiciones de Lincoln, Nueva Zelanda.



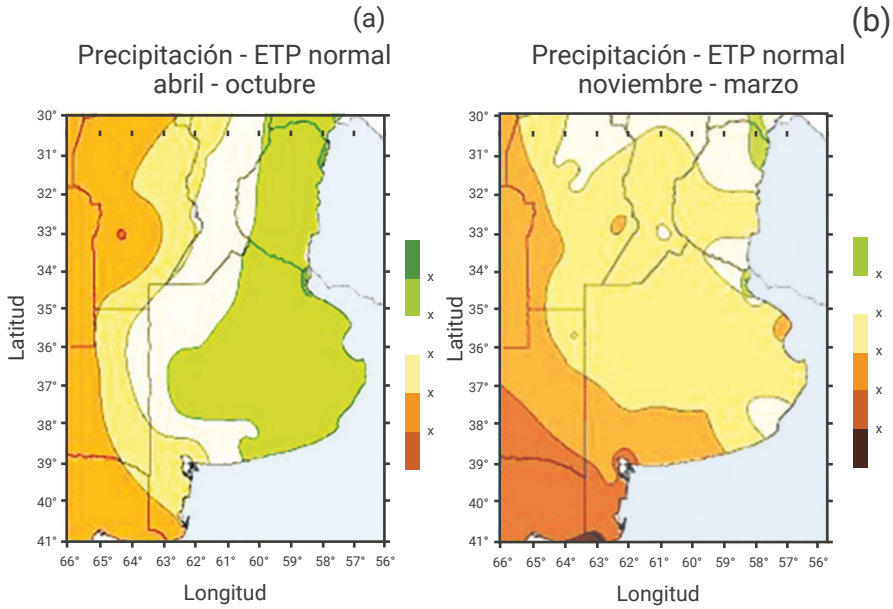
■ **Figura 17.** Eficiencia de uso de la radiación total (EUR total) en función de la temperatura media del aire en alfalfa irrigada cv. 'Kaituna' durante cinco ciclos de crecimiento (1997/1998–2001/2002) en la Universidad de Lincoln, Canterbury, Nueva Zelanda. Los símbolos representan diferentes años de medición y diferentes estaciones. Regresión (—):  $y = 0,090 x$ ,  $R^2 = 0,67$ . Adaptado de Brown *et al.* (2006).

## Uso del agua y producción

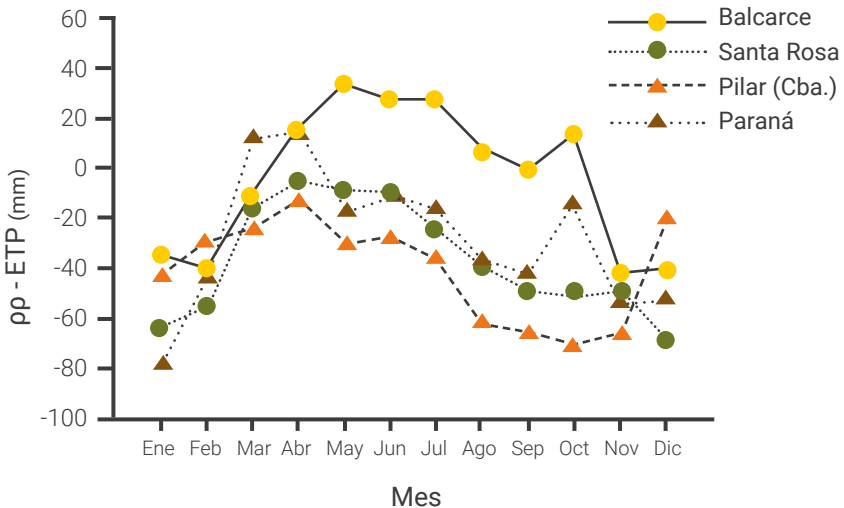
### *Disponibilidad de agua*

En un cultivo perenne como la alfalfa, cuya duración promedio en buenas condiciones de manejo es de cuatro años (Basigalup y Rossanigo, 2007), el agua almacenada en el suelo al momento de la siembra tiene una influencia relevante durante el primer año de vida. A lo largo de este primer año, además de la ocurrencia de precipitaciones, la disponibilidad de agua inicial en el perfil dependerá de la capacidad de almacenaje del suelo, que estará ligada a su vez a la profundidad del perfil. En cambio, en los años posteriores, el suministro de agua para el cultivo estará relacionado con la probabilidad de ocurrencia de las precipitaciones en cada región y con la distribución de estas durante el año. En el norte de la región Pampeana existe un patrón de decrecimiento de las precipitaciones de este a oeste, mientras que en el sur las lluvias decrecen en sentido norte-sur. En líneas generales, la ocurrencia de mayores precipitaciones se ubica entre noviembre y abril, y la de menores lluvias, entre junio y agosto. Considerando a la región Pampeana en conjunto, se aprecia que —a excepción de las zonas este y sudeste— la diferencia entre precipitación (pp) y Evapotranspiración Potencial (ETP) normal durante el período abril-octubre es negativa, particularmente en la zona noroeste (Figura 18a). En cambio, si se considera el período noviembre-marzo, el déficit se hace general para toda la región, en especial en el sector sudoeste (Figura 18b).

Por una parte, tal como se observa en la Figura 19, la diferencia entre precipitaciones y ETP en localidades contrastantes (desde zona húmeda a semiárida) de la región Pampeana muestra valores negativos casi todo el año, excepto en Balcarce durante la época invernal (Ojeda *et al.*, 2018a). Por otra parte, cuando se hace el cálculo de la disponibilidad de agua para el cultivo, en algunas áreas además hay que considerar el aporte de la napa freática. Esto último es importante porque el sistema radical de la alfalfa a los 10 meses de implantación puede absorber agua hasta los 2,20 m, y en proporciones decrecientes hasta los 3,5 m; y a los 24 meses de la siembra la exploración radicular puede alcanzar una profundidad de hasta 4-5 metros (Collino *et al.*, 2005).



■ **Figura 18.** Diferencia entre la precipitación y la evapotranspiración potencial normal de Penman (Penman, 1948) en la región pampeana para la serie 1961-2002: (a) período abril-octubre y (b) período noviembre-marzo. Datos suministrados por el Instituto de Clima y Agua (INTA Castelar).



■ **Figura 19.** Diferencia entre la precipitación (pp) y la evapotranspiración potencial (ETP) de Penman (1948), simbolizada como pp-ETP, para algunas localidades de la región Pampeana: Paraná (húmeda), Pilar (subhúmeda norte), Balcarce (subhúmeda sur) y Santa Rosa (semiárida).

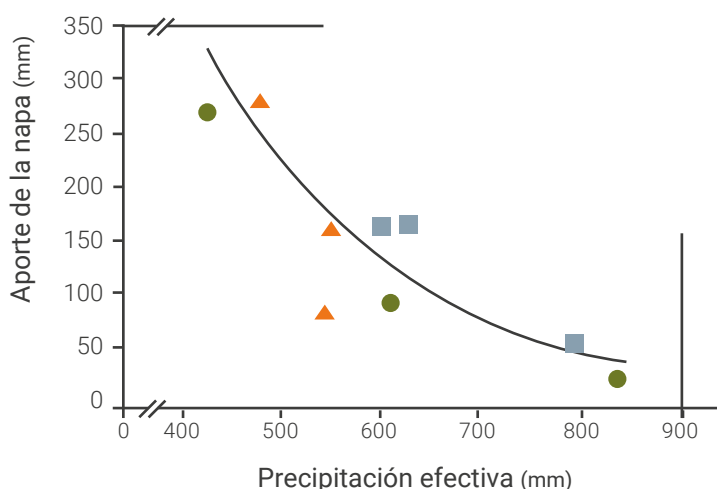
La proporción del agua de lluvia que llega al suelo y queda disponible para el cultivo estará determinada por la proporción de las precipitaciones que realmente ingresa al suelo, llamada precipitación efectiva ( $P_{ef}$ ). La mayoría de los suelos pampeanos tienen una elevada proporción de limo en el horizonte superficial (Hall *et al.*, 1992), lo cual los predispone al encostramiento, especialmente cuando el cultivo ha sido implantado con siembra convencional (labranza) (Cosentino y Pecorari, 2002). Esta característica superficial induce menores tasas de infiltración, que a su vez favorecen una mayor escorrentía. Dardanelli *et al.* (1992) sugirieron que para un suelo con horizonte superficial de textura franco-limosa y bajo un sistema de labranza reducida, la  $P_{ef}$  podría estimarse a partir de precipitaciones diarias ( $P_r$ ) superiores a 15 mm por medio de la siguiente ecuación exponencial:

$$P_{ef} = 2,43 * P_r^{0,667}$$

Más recientemente, Andriani *et al.* (2016) elaboraron un modelo cuantitativo para suelos Molisoles con pendientes menores a 1 %, incluyendo en las ecuaciones de predicción dos componentes importantes que determinan la  $P_{ef}$  como son la intensidad de la lluvia y el grado de humedad del suelo al inicio de las precipitaciones. Este trabajo también muestra que el componente de escorrentía en la estimación del balance hídrico comenzaría a cobrar importancia cuando las lluvias son superiores a los 15 mm.

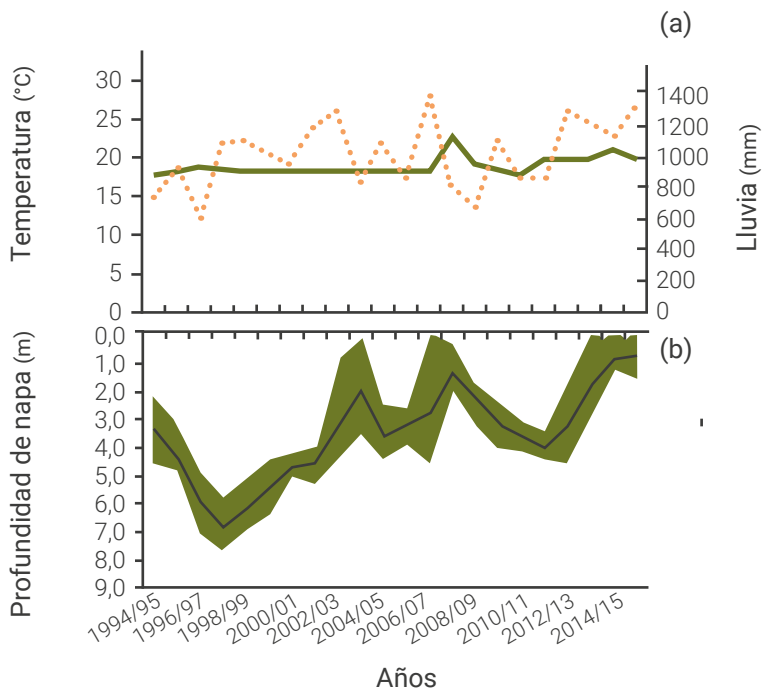
Por un lado, debe considerarse que en la región se presentan situaciones en que la influencia de la napa freática incrementa los rendimientos anuales y disminuye la variabilidad anual de producción. A diferencia de las lluvias, que por su elevada variabilidad generan una importante inestabilidad en la producción de MS, la presencia de napas freáticas tiende a elevar y estabilizar la producción de forraje entre años. La Figura 20 muestra que la importancia relativa de la napa en la producción de forraje será mayor en la medida que las precipitaciones sean menores (Dardanelli y Collino, 2002). Estos autores al encontrar la relación entre consumo de agua y la evapotranspiración potencial del cultivo mostraron que aun con aporte de agua de la napa las plantas no pudieron satisfacer completamente sus necesidades de agua, ya que el consumo potencial de agua del cultivo pasó de 45 % de satisfacción cuando

no hubo influencia de la napa a 56 % cuando hubo aporte de la napa. Este comportamiento también estará ligado a la profundidad en que se encuentre la napa, ya que en la medida que esta sea más profunda proveerá agua solo a una porción reducida de raíces. En un cultivo perenne como la alfalfa, el consumo permanente de agua por parte del sistema radical no permite un ascenso capilar hacia capas más superficiales de suelo. Por otro lado, la dinámica de la napa está asimismo ligada a la ocurrencia de precipitaciones de cada lugar, haciendo que —como se muestra en la Figura 21— cuando se producen lluvias abundantes la napa se eleve.

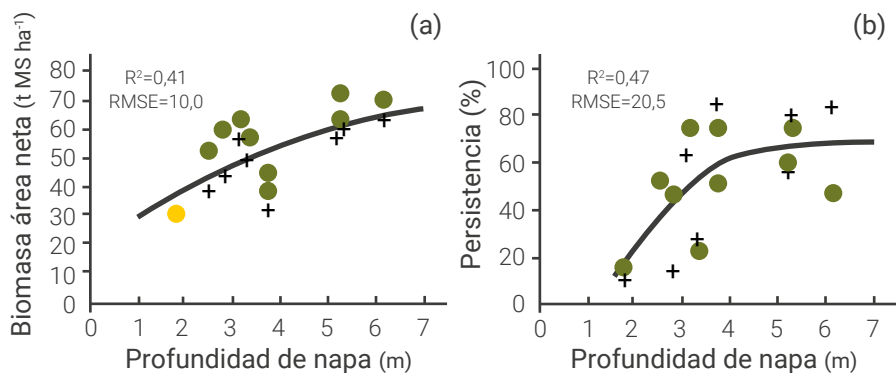


■ **Figura 20.** Relación entre el aporte de la napa al consumo total de agua de la alfalfa y la precipitación efectiva anual. Adaptado de Dardanelli y Collino (2002).

Berhongaray *et al.* (2019) analizaron datos de Rafaela de la Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Alfalfa del INTA y mostraron que tanto la productividad de forraje como la persistencia disminuyeron a medida que la napa alcanzaba niveles más superficiales. Como se representa en la Figura 22, a profundidades de napa menores a los 4 m, la producción de materia seca acumulada durante cuatro años disminuye en función de la profundidad. Se concluye que si bien la napa puede ser una importante fuente de agua para la alfalfa, este efecto positivo es más importante en regiones en donde la ocurrencia de precipitaciones no recargue la napa por encima de este umbral de 4 m.



■ **Figura 21.** (a) Temperatura media (línea continua) en °C y lluvias (línea discontinua) en mm y (b) Profundidad de la napa freática (línea gris) y rango anual (área gris) entre 1994-2016 en Rafaela, Santa Fe. Adaptado de Berhongaray et al. (2019).



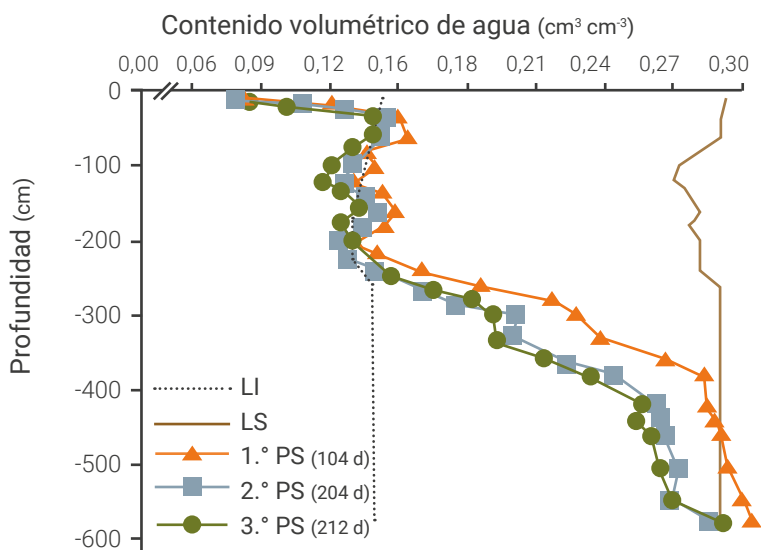
■ **Figura 22.** (a) Producción de biomasa aérea acumulada (t MS ha<sup>-1</sup>) y (b) persistencia (%) de alfalfa en función a la profundidad promedio de la napa freática (m) a lo largo de cuatro años en Rafaela para cultivares de grados de reposo invernal intermedio (cruces) y sin reposo (círculos). Las líneas representan el ajuste de los datos al modelo de Gompertz:  $\alpha * \exp(-\beta * \exp(-\gamma * wt))$ . Adaptado de Berhongaray et al. (2019).



### El sistema radical de la alfalfa y la captura de agua

Dos aspectos relevantes deben considerarse en relación con la importancia del sistema radical para la captura del agua: i) la velocidad de profundización de las raíces y su profundidad máxima y ii) la tasa de absorción del sistema radical ya establecido.

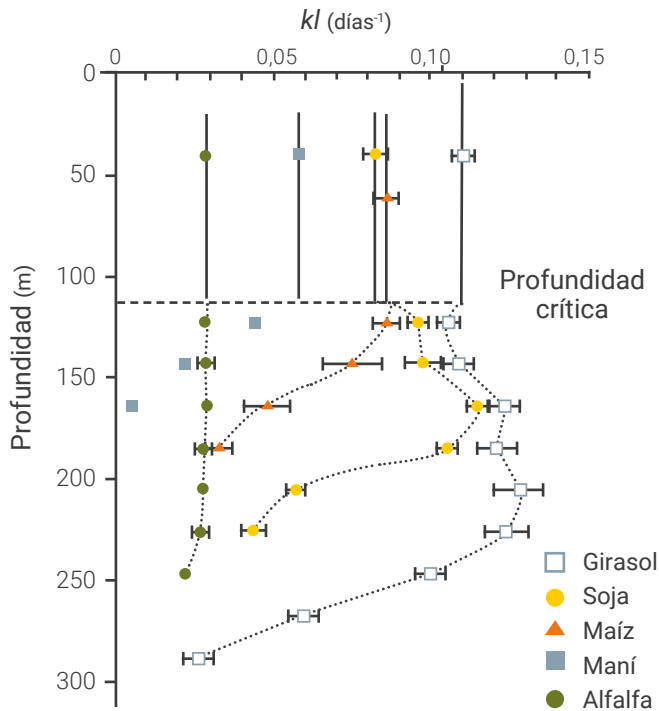
Estas variables se pueden estimar en forma indirecta analizando la evolución del agua en el suelo, obtenida durante períodos de sequía prolongada, sea natural o impuesta. La Figura 23 muestra el contenido volumétrico de agua a lo largo del perfil del suelo al final de tres períodos sucesivos de sequía, impuestos a un cultivo de la variedad de alfalfa Victoria SP INTA en Córdoba (Collino *et al.*, 2005).



■ **Figura 23.** Contenido volumétrico de agua a lo largo del perfil de suelo al final de tres períodos sucesivos de sequía impuesta a la variedad Victoria SP INTA. Ensayo sembrado el 15/3/2000 en Córdoba. Entre paréntesis se indica en días la duración de cada período de sequía (PS) impuesta. LS: límite superior (trazo continuo) y LI: límite inferior (trazo punteado) de agua útil. Adaptado de Collino *et al.* (2005).

En el estudio comentado, el agua del perfil fue repuesta al inicio de cada período de sequía hasta valores cercanos a la capacidad de campo. Al final del primer período de sequía, el cultivo tenía 10 meses de edad y había agotado el perfil hasta los 2,20 m de profundidad, aunque también se observó disminución del contenido de agua hasta 3,50 m de pro-

fundidad. Al final del segundo y del tercer período de sequía impuesta (cultivo de 17 y 24 meses de edad, respectivamente), las raíces habían alcanzado su máximo desarrollo dado que la cantidad de agua absorbida en ambos períodos fue similar, habiendo agotado el perfil hasta los 2,40 m y absorbido agua hasta los 5,50 m (Figura 23). A partir de esta profundidad, el incremento de su capacidad de absorción fue muy poco significativo (Figura 24). En consecuencia, se podría decir que el agua útil que puede tomar el cultivo de alfalfa en suelos sin impedancias físicas importantes (por ejemplo presencia de tosca) es de 420 mm en el primer año y de 540 mm en los años subsiguientes. Estos valores son similares a los señalados por Borg y Grimes (1986), quienes también habían observado que la alfalfa alcanza 1,8-2,4 m en el primer año y de 3 a 6 m en los años subsiguientes.



■ **Figura 24.** Tasa de extracción de agua del suelo (Kl) estimado a diferentes profundidades (m) para girasol, soja, maíz y alfalfa. Las barras horizontales indican el error estándar de las medias. Las líneas punteadas horizontales indican la profundidad crítica sobre la que se obtuvo el Kl de cada cultivo. Adaptado de Dardanelli *et al.* (2007).

La segunda característica que define la aptitud de un sistema de raíces para utilizar las reservas de agua del suelo es la tasa de absorción, que hace referencia a la capacidad de las raíces para absorber agua de una determinada capa de suelo por unidad de tiempo. En cultivos anuales se ha demostrado que esta tasa de absorción, una vez que las raíces se han desarrollado y si el suelo no presenta impedimentos, es aproximadamente el 10 % del agua útil presente en la capa de suelo por día (Dardanelli *et al.*, 2004). Por ejemplo, si una capa contiene 40 mm de agua útil, las raíces pueden absorber como máximo 4 mm día<sup>-1</sup>. Bajo las mismas condiciones, la alfalfa puede absorber agua a una tasa considerablemente menor, 3 % del agua útil presente en la capa (Dardanelli *et al.*, 1997). Es decir que, para una capa que contiene también 40 mm de agua útil, las raíces de alfalfa pueden absorber como máximo 1,2 mm día<sup>-1</sup> (Figura 24). Esta restricción hace que, por un lado, el cultivo sufra rápidamente las consecuencias del estrés; pero, por el otro lado, este comportamiento presenta como ventaja la capacidad de resistir períodos prolongados de sequía sin que el cultivo alcance niveles de estrés severos cercanos a la marchitez.

### *Disponibilidad de agua y producción de biomasa*

La producción de biomasa en alfalfa, como cualquier cultivo, está directamente relacionada con la transpiración. De esta manera, en la medida que los estomas estén abiertos el proceso de fotosíntesis se maximiza, dado que los estomas son la vía de entrada del CO<sub>2</sub> del aire. Entonces, la materia seca (MS) producida está linealmente relacionada con el agua transpirada, cuya pendiente representa la eficiencia en el uso del agua (EUA). Vale decir que la EUA estima la cantidad de MS que se produce por unidad de agua transpirada, expresada como kg MS mm<sup>-1</sup>. Otra forma de expresar la eficiencia es relacionando la producción de MS con el agua evapotranspirada (C), ya que muchas veces no se conoce cuál es la proporción de agua de la evapotranspiración que se pierde por transpiración de las plantas y por evaporación desde la superficie del suelo. En consecuencia, la producción de MS se puede calcular como:

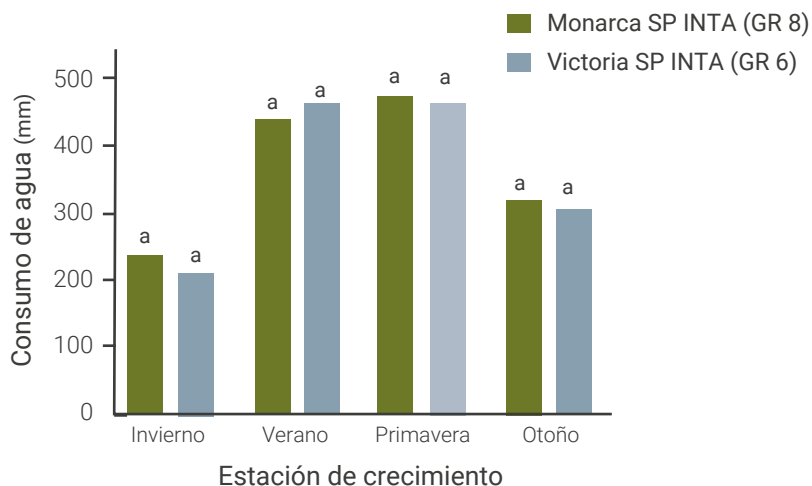
$$MS = C * EUA$$

La alfalfa, por su condición de perenne, consume agua durante todo el año, aun durante el reposo invernal, generando por ende una demanda de agua mayor que un sistema de cultivos anuales, en donde siempre existen períodos de barbecho. Por ejemplo, López *et al.* (1997) estimaron un consumo de agua de  $1464 \text{ mm año}^{-1}$  para una producción de forraje de  $28 \text{ t MS ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  en dos variedades de distinto grado de reposo invernal en un ensayo sin limitaciones hídricas conducido en Córdoba durante tres campañas, representando este valor de consumo el 90 % de la evapotranspiración potencial de referencia calculada por la fórmula de Penman-FAO. Este valor entra dentro del rango de consumo de agua de alfalfa estimado por Sheaffer *et al.* (1988), que se ubica entre  $400$  y  $1800 \text{ mm ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ . Para tener magnitud de esta demanda es interesante considerar los datos de algunos estudios de rotaciones de cultivos agrícolas en la región Pampeana, que estimaron para sistemas que incluyeron secuencias agrícolas de soja en rotación con maíz y trigo, consumos anuales de alrededor de  $775 \text{ mm ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  (Sanmarti *et al.*, 2018).

El estudio de López *et al.* (1997) muestra que el consumo de agua de dos variedades de alfalfa de reposo invernal relativamente cercano (GRI 6 y 8) presentó el mismo patrón de distribución estacional (Figura 25). De todos modos, aunque el consumo hídrico de las dos variedades en cada estación fue similar, la producción de materia seca en invierno y primavera fue diferente. Se concluye que, al menos en este rango de grados de reposo invernal, si bien la transpiración no se modificó, la diferente producción de forraje durante algunas estaciones del año es consecuencia de un diferente grado de almacenamiento y removilización de asimilados.

La EUA puede ser modificada por una serie de factores: (i) la proporción de agua evaporada respecto de la transpirada, (ii) el déficit de presión de vapor, (iii) las condiciones de temperatura a lo largo del año, (iv) el grado de reposo invernal de la variedad utilizada y (v) el nivel de estrés hídrico. Guitjens (1990), a partir de una revisión general y considerando cortes individuales, menciona una amplia variación de EUA, con un rango de valores de  $6$  a  $30 \text{ kg MS mm}^{-1}$ . En la región Pampeana, diferentes investigaciones han estimado un rango entre  $9$  y  $24 \text{ kg de MS mm}^{-1}$  evapotranspirado (López *et al.*, 1997; Collino *et al.*, 2005). Dependiendo del nivel de producción, el grado de estrés hídrico y el diferente grado de

sequedad del aire a lo largo del año, junto con otras variables meteorológicas, dicho rango modifica la demanda transpiratoria de las plantas. A un mismo valor de radiación solar, cuanto mayor sea la sequedad del aire, mayor deberá ser la transpiración del cultivo para producir la misma cantidad de MS. Este grado de sequedad del aire depende de la combinación de temperatura y humedad relativa, y se expresa a través de una variable conocida como déficit de presión de vapor (DPV).



**Figura 24.** Consumo de agua (mm) en diferentes estaciones del año de las variedades Monarca SP INTA (GRI 8) y Victoria SP INTA (GRI 6) en un ensayo conducido en Córdoba sin limitaciones de agua. Letras iguales indican diferencias no significativas ( $p > 0,05$ ) entre variedades dentro de cada estación del año. Adaptado de López *et al.* (1997).

La EUA y la eficiencia de captura del agua (EC), que se mide en mm de agua transpirada por mm de agua aportada (precipitaciones + riego), son las dos componentes para estimar la productividad del agua aportada. Ojeda *et al.* (2018a) estimaron para Balcarce que la EC osciló entre 79 y 96 % del agua total recibida por precipitaciones en dos años de evaluación. Para ese mismo período, la EUA fue calculada entre 20 y 24,5 kg MS  $\text{mm}^{-1}$  transpirado. En consecuencia, la productividad del agua de lluvia se ubicó entre 19,3 y 19,4 kg MS  $\text{mm}^{-1}$  de lluvia. En otro trabajo, Ojeda *et al.* (2018b), utilizando modelos de simulación con series históricas de datos meteorológicos, calcularon que la productividad del agua osciló entre 14 y 20 kg MS  $\text{mm}^{-1}$ .

La producción de materia seca de alfalfa presenta diferencias a lo largo de las estaciones afectando de esta manera la EUA. En la Tabla 1 se aprecia que la EUA en primavera es mayor que en verano. Esto se relaciona con que, aun cuando en primavera la temperatura media está ligeramente por debajo del valor crítico, el forraje producido proviene no solo de la fotosíntesis actual de la estación de crecimiento, sino también de la energía generada por la removilización de reservas desde la corona y la raíz. Contrariamente, las bajas EUA en otoño e invierno son producidas por limitaciones de temperatura y por la movilización de fotoasimilados hacia los órganos de reserva (López *et al.*, 1997).

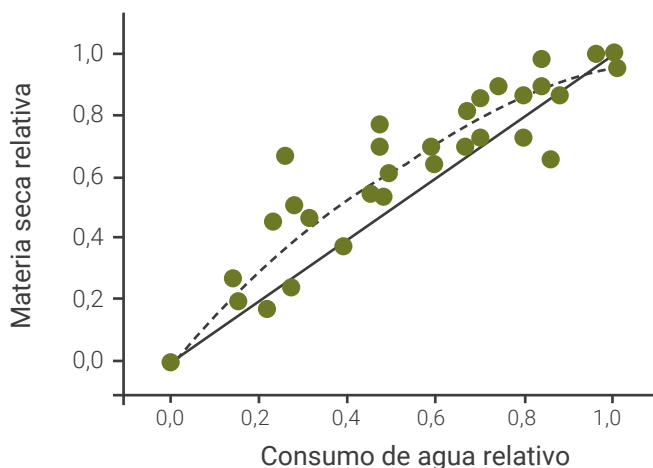
■ **Tabla 1.** Producción estacional de materia seca (MS), consumo de agua (C), temperatura media (Tmed) y eficiencia en el uso del agua (EUA) para las variedades Victoria SP INTA y Monarca SP INTA. También se indica la eficiencia en el uso del agua corregida por déficit de presión de vapor (EUAc). Adaptado de López *et al.* (1997).

Estación	MS (kg ha <sup>-1</sup> )		C (mm)	Tm (°C)	EUA		EUAc	
	Vitoria	Monarca			Vitoria	Monarca	Vitoria	Monarca
	SP INTA	SP INTA			SP INTA	SP INTA	SP INTA	SP INTA
Otoño	4,15		317	15,8	13,1		11,3	
Invierno	3,28	4,12	224	12,7	14,6	18,4	15,6	19,7
Primavera	11,71	10,95	454	20,1	25,8	24,1	45,1	42,2
Verano	9,20		470	22,8	19,6		29,8	

En términos generales, la expansión foliar es el proceso más sensible y el primero en verse afectado por efecto de algún estrés ambiental. Así, Collino *et al.* (2005) observaron que ante estrés hídrico moderado, la radiación fotosintéticamente activa interceptada (RFA<sub>i</sub>), sucedáneo de la expansión foliar, se redujo 14-23 %, pero sin disminuir la eficiencia en el uso de la radiación (EUR), que es el sucedáneo de la actividad fotosintética. En cambio, bajo condiciones de estrés severo no solo la RFA<sub>i</sub> se redujo 40 % sino que también la EUR se redujo, lo cual indica que en este último caso se afectó parcialmente el proceso fotosintético.

Estudios hechos en alfalfa sobre estrés hídrico han demostrado que la EUA es mayor cuando se incrementa el nivel de estrés hídrico (Figura 26). Considerada en términos relativos a un tratamiento sin limitaciones hídricas, la relación entre producción de MS y consumo de agua no es lineal,

indicando que ante diferentes niveles de estrés hídrico la producción de MS se reduce proporcionalmente menos que el consumo de agua (Collino *et al.*, 2005). Esto sugiere que cuando se produce el cierre estomático ante el estrés hídrico, la transpiración se reduce más que la fotosíntesis, porque la resistencia estomática tiene mucho menos influencia sobre la difusión del CO<sub>2</sub> que sobre la difusión del vapor de agua (Ferreira *et al.*, 2003).



■ **Figura 26.** Relación entre la producción de materia seca y el consumo de agua relativa a un testigo regado. La línea recta representa la relación 1:1 y la línea punteada es la función de ajuste:  $y = 0,997(1 - 0,0195x)$ ,  $r^2 = 0,861$ . Adaptado de Collino *et al.* (2005).

En cultivos anuales se ha observado que para lograr una mayor captura de los recursos, reflejado esto en una mayor producción de biomasa, el cultivo no debe estar limitado por deficiencias nutricionales (Salvagiotti *et al.*, 2017; Salvagiotti *et al.*, 2008; Carciochi *et al.*, 2020). En el caso de la alfalfa, el N debe ser provisto tanto por el suelo como a través de la fijación biológica, por lo que es importante que los cultivos sean inoculados. Sin embargo, dado que en la región Pampeana existen otros nutrientes que limitan la producción —como el fósforo, el azufre y algunos micronutrientes como Zn— es necesario corregir estas deficiencias en la implantación a fin de lograr una cobertura más rápida del suelo. Con esto se logra una mayor interceptación de radiación, que a su vez se verá traducida en una mayor productividad. Estudios conducidos en el sur de Santa Fe por Ibarlucea *et al.* (2020) han demostrado que en suelos con bajos niveles de fósforo ( $\leq 14$  ppm) la productividad de la alfalfa

se incrementó 228 % por la aplicación de 200 kg ha<sup>-1</sup> de superfosfato triple. Estas correcciones de deficiencias nutricionales se verán traducidas posteriormente en mayores EUR y EUA.

## Modelo de componentes del rendimiento

Los efectos sobre la producción de biomasa de alfalfa, usualmente llamado rendimiento de forraje, pueden ser analizados mediante la siguiente ecuación que reúne los componentes de rendimiento de forraje (Volenc *et al.*, 1987):

$$\text{Producción de Biomasa} = N.^\circ \text{ plantas m}^2 * \text{número de tallos planta}^{-1} * \text{peso tallo}^{-1}$$

Este enfoque permite una aproximación con mayor nivel de detalle para la comprensión de los mecanismos involucrados ante cambios en el rendimiento. Los autores del trabajo precitado analizaron el efecto de la densidad de siembra sobre el rendimiento de forraje y sus componentes, hallaron que la densidad de plantas disminuye el peso por planta (menor número de tallos por planta y menor peso por tallo). No obstante, ese resultado es sobrecompensado por el aumento en la densidad de plantas, lo que produce una mayor biomasa por unidad de superficie cuando la densidad de plantas se acerca a las 200 plantas m<sup>2</sup>.

Existen procesos de competencia en el cultivo de alfalfa que determinan la evolución de los componentes del rendimiento. La competencia intraespecífica (entre plantas de la misma especie) puede ocasionar tres tipos de efectos: i) mortalidad denso-dependiente (denominado auto-raleo o *self-thinning* en inglés); ii) efectos compensatorios entre tamaño y densidad (denominado SDC por sus siglas en inglés: *size density compensation*); y iii) alteración de la estructura de tamaños de la población, generando una estructura jerarquizada (Park *et al.*, 2003).

En el caso particular de la alfalfa ocurren los tres efectos. La mortalidad denso-dependiente determina una disminución del número de plantas desde las etapas tempranas del establecimiento (Romero *et al.*, 1991), con períodos de mayores tasas de mortalidad cuando la tasa de crecimiento del cultivo es mayor, es decir, en primavera-verano (Arolfo y



Odorizzi, 2018). También la mortandad de plantas en alfalfa es afectada por el ambiente (Rowe, 1989); así, prácticas de manejo como la distancia de siembra pueden colaborar para sostener un mayor número de plantas por unidad de superficie debido un espaciamiento más equidistante entre individuos, redundando en una menor competencia (Mattera *et al.*, 2013). En este contexto, la evolución del número de plantas  $m^{-2}$  es un parámetro importante que se mide en las redes de evaluación de cultivares, ya que da una idea de la persistencia de las pasturas. En la Red Nacional de Evaluación de Cultivares Alfalfa del INTA se evalúa no solo la producción de forraje sino también la cobertura en cada parcela, que se relaciona directamente con el rendimiento (Arolfo y Odorizzi, 2018) (ver capítulo 8).

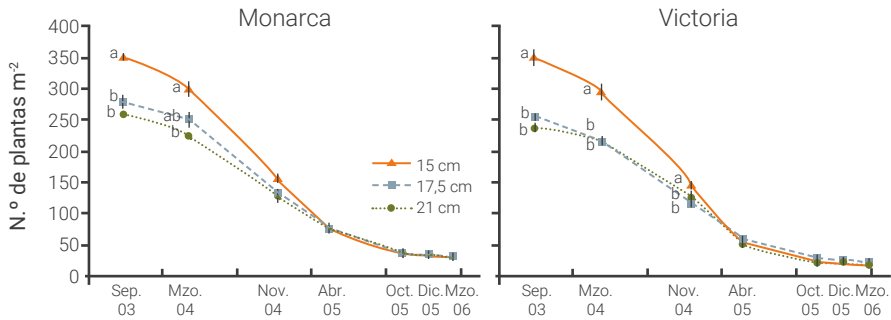
El segundo efecto de la competencia intraespecífica que también ocurre en alfalfa es la compensación entre el número de plantas y la cantidad de tallos por planta; esto último junto con el peso por tallo determinan el tamaño de cada planta. Hay referencias bibliográficas que indican que a medida que se pierden plantas en el cultivo, las plantas supervivientes presentan un mayor número de tallos (Teixeira *et al.*, 2007b) y un mayor tamaño de planta (Mattera *et al.*, 2009) (Figura 27). En este último trabajo se observó que la edad de la pastura tuvo un fuerte efecto sobre la dinámica del número de plantas y el peso por planta en los dos cultivares evaluados (Monarca SP INTA y Victoria SP INTA). También se detectó un efecto del sistema de siembra, dado que la menor distancia entre hileras permitió un mayor número de plantas por  $m^{-2}$ ; sin embargo, como contraparte, se produjeron compensaciones tamaño-densidad que redundaron en menores pesos por planta para ese tratamiento, lo que resultó a la postre en una menor producción de biomasa. En cambio, la distancia intermedia entre hileras, que mantuvo el mayor peso por planta, fue la que resultó en una mayor producción de forraje final.

Por último, dentro del cultivo existen jerarquías entre plantas suprimidas y plantas dominantes. Las suprimidas se localizan en los estratos inferiores del canopeo, donde llega menos radiación, lo que ocasiona que tengan menores tasas de crecimiento y que, por ende, vayan quedando relegadas frente al resto de la población. Estas plantas son las que irán desapareciendo por mortalidad denso-dependiente.

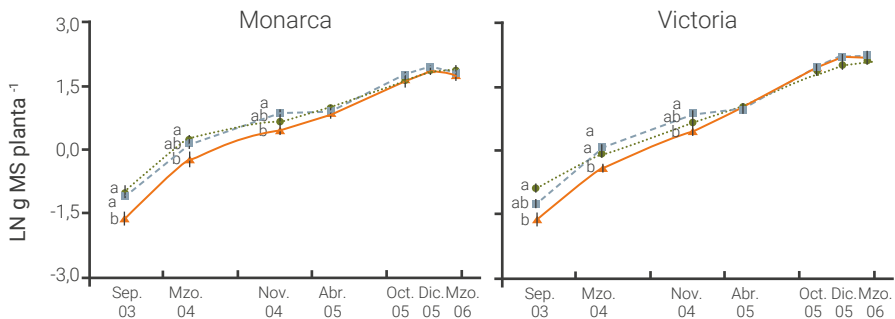
Como se aprecia en la Figura 28, el componente número de tallos planta<sup>-1</sup> comprende dos tipos de tallos: los provenientes de yemas ubicadas en los tallos remanentes luego de la defoliación (Tipo 1) y los tallos

provenientes de yemas ubicadas en las coronas de las plantas (Tipo 2) (Gosse *et al.*, 1988).

a) Densidad de plantas



b) Peso aéreo por planta



■ **Figura 27.** Efecto de la distancia de siembra sobre la dinámica de los componentes del rendimiento de alfalfa: (a) la densidad de plantas (plantas  $m^{-2}$ ) y (b) peso aéreo por planta. Datos de tres años de evaluación en los cultivares Monarca SP INTA (GRI 8) y Victoria (GRI 6) para tres distancias de siembra: 15, 17,5 y 21 cm. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de tres repeticiones. Adaptado de Mattera *et al.* (2009).

Al inicio del rebrote, los tallos Tipo 1 tienen una mayor participación, pero a medida que progresa el rebrote, los tallos Tipo 2 adquieren más importancia, aportando entre el 60 al 80 % de la biomasa producida (Gosse *et al.*, 1988). Teixeira *et al.* (2007b) describieron tres jerarquías de tallos en función de su altura: dominantes ( $>2/3$  de altura máxima), intermedios (entre  $1/3$  y  $2/3$  de la altura máxima) y suprimidos ( $<1/3$  de la altura máxima). Señalaron que inmediatamente después de un corte, la población de tallos se incrementa de manera similar para todas las jerarquías hasta alcanzar un promedio de casi 800 tallos  $m^{-2}$  y un IAF = 2. Luego, a

partir de ese momento, conforme avanza el rebrote, existe una reducción de la luz que llega a la base de la canopia y que genera una disminución en la proporción de tallos intermedios y suprimidos (Figura 29).

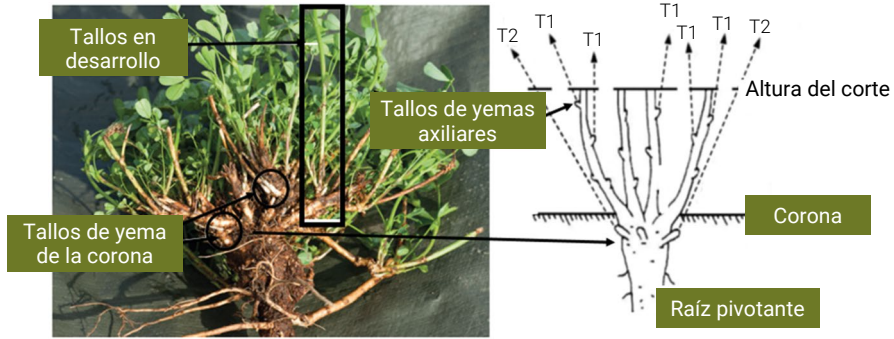


Figura 28. Tipos de tallos de los que se origina la biomasa luego de un corte o pastoreo. T1: tallos de yema remanentes y T2: tallos de yemas de la corona. Adaptado de Gosse *et al.* (1988) y Undersander *et al.* (2011).

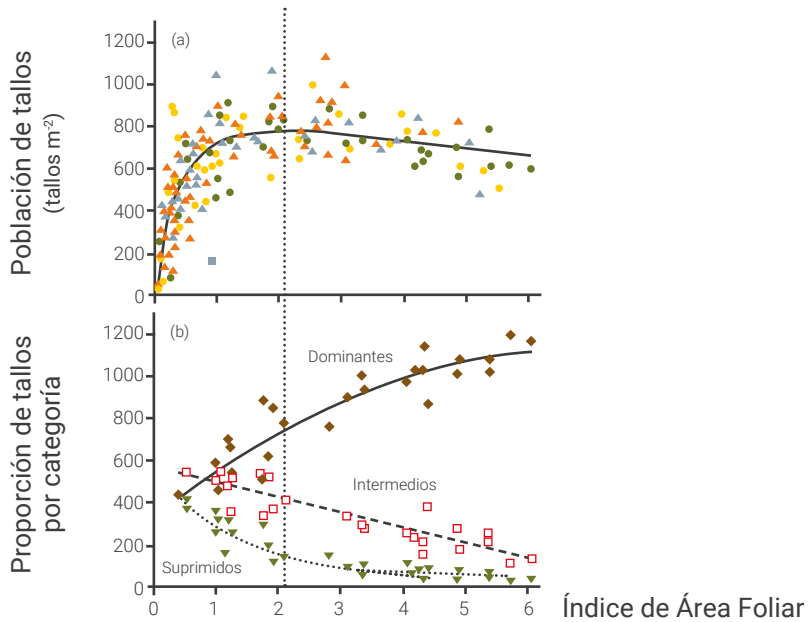
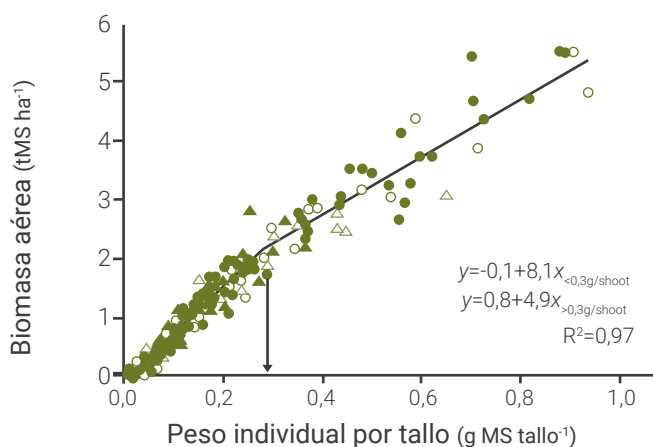


Figura 29. (a) Población de tallos (tallos  $m^{-2}$ ) en función al Índice de Área Foliar (IAF) para un cultivar de alfalfa sometido a diferentes frecuencias de pastoreo y (b) Proporción de tallos por categoría (suprimidos, intermedios y dominantes) en función del IAF para un cultivar de alfalfa defoliado cada 450-500 grados días acumulados en Lincoln, Nueva Zelanda. Línea vertical (punteada): valor de IAF en que se maximiza la producción de tallos. Adaptado de Teixeira *et al.* (2007b).

El último componente del rendimiento forrajero es el peso por tallo, que ha sido reconocido en diversos trabajos como el componente del rendimiento que ha explicado en mayor medida las diferencias obtenidas en el rendimiento por planta (Volnec *et al.*, 1987; Teixeira *et al.*, 2007b; Ventroni *et al.*, 2010; Olivo, 2018). Si bien en bajas densidades de plantas, tanto el número de tallos por planta como el peso por tallo explican el rendimiento de cada planta, en densidades elevadas las diferencias de rendimiento por planta son básicamente explicadas por el peso por tallo (Figura 30).



■ **Figura 30.** Biomasa aérea (t MS ha<sup>-1</sup>) en función del peso individual por tallo (g MS tallo<sup>-1</sup>) para diferentes frecuencias de defoliación y ciclos de crecimiento. Ajuste bilineal para tallos de <0,3 gramos ( $y = 0,1 + 8,1 x$ ) y para tallos >0,3 gramos ( $y = 0,8 + 4,9 x$ ) Lincoln, Nueva Zelanda. Aclaración: círculos y triángulos blancos y verdes representan diferentes frecuencias de defoliación. Adaptado de Teixeira *et al.* (2007b).

Otras prácticas de manejo del cultivo de alfalfa, como la fertilización con fósforo y potasio, han explicado diferencias de rendimiento de forraje por los cambios que ocurrieron en el peso por tallo, es decir que, aquellos cultivos que respondieron a la fertilización produjeron tallos más pesados (Berg *et al.*, 2005). De forma similar, la extensión de la frecuencia de defoliación (descansos más prolongados) aumentó el rendimiento de forraje, principalmente por el aumento del peso por tallo (Teixeira *et al.*, 2007b; Ventroni *et al.*, 2010; Olivo, 2018). De la Figura 30 se infiere que existe un ajuste bilineal para cuantificar rendimiento de biomasa en función al peso individual de los tallos. El rendimiento se in-

crementa con una tasa  $8,1 \text{ t ha}^{-1} \text{ g}^{-1}$  cuando los valores de peso individual por tallo son menores a  $0,3 \text{ g}$ . Cuando el peso individual por tallo supera los  $0,3 \text{ g}$ , dicha tasa disminuye a  $4,9 \text{ t ha}^{-1} \text{ g}^{-1}$  (Teixeira *et al.*, 2007b).

## Consideraciones finales

Como conclusión puede afirmarse que la caracterización de la eficiencia en el uso de la radiación y de la eficiencia en el uso del agua así como el desglose de los componentes del rendimiento de forraje permite comprender más acabadamente los mecanismos ecofisiológicos de la alfalfa. De esta manera, se pueden interpretar más adecuadamente las respuestas productivas observadas y la variabilidad estacional e interanual de esa producción, así como también analizar y prever los impactos de diversas prácticas de manejo sobre la producción, la estacionalidad y la persistencia. Existen compensaciones en las plantas que pueden aliviar o reducir el impacto de ciertas prácticas de manejo. Todos esos factores también pueden tener un impacto sobre otros aspectos de las pasturas, como por ejemplo la calidad del forraje; eso, a su vez, impactará sobre la respuesta animal para la producción de carne o de leche.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDRIANI, J.M.; L. MAGNANO; N. SANMARTI. 2016. Modelo "cuanti-cualitativo" de escurrimiento superficial del agua en suelos agrícolas de la región pampeana argentina. *Ciencia del Suelo* 34(2): 293-301.
- ARNOLD, S.M.; J.L. MONTEITH. 1974. Plant development and mean temperature in a tees date habitat. *Journal of Ecology* 62: 711-720.
- AROLFO, V.; A. ODORIZZI. 2018. *Ensayos Territoriales de Alfalfa. INTA Manfredi. Avances en Alfalfa Año 28 (28): 7-11.*
- AVICE, J.C.; F.L. DILY; E. GOULAS; C. NOQUET; F. MEURIOT; J.J. VOLENEC; P. NADEAU. 2003. Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation. *Canadian Journal of Botany* 81 (12): 1198-1212.
- AVICE, J.C.; S. LOUAHLIA; A. KIM; A. JACQUET; A. MORVAN-BERTRAND; M.P. PRUDHOMME; A. OURRY J.C. SIMON. 2001. Influence des reserves azotees et caerbonees sur la repousse des especes prairiales. *Fourrages* 165: 3-22.
- AVICE, J.C.; G. LEMAIRE; A. OURRY; J. BOUCAUD. 1997. Effects of the previous shoot removal frequency on subsequent shoot regrowth in two *Medicago sativa* L. cultivars. *Plant and Soil* 188 (2): 189-198.
- BALDISSERA, T.C.; E. FRAK; P.C.D.F. CARVALHO; G. LOUARN. 2014. Plant development controls leaf area expansion in alfalfa plants competing for light. *Annals of Botany* 113 (1): 145-157.
- BASIGALUP, D.; R. ROSSANIGO. 2007. *Panorama actual de la alfalfa en la Argentina. En: BASIGALUP, D. (Ed.). El Cultivo de Alfalfa en la Argentina. Ediciones INTA, Buenos Aires. Cap. 1. 13-27 pp.*
- BAUDRACCO, J.; N. LOPEZ-VILLALOBOS; L.A. ROMERO; D. SCANDOLO; M. MACIEL; E.A. COMERON; C.W. HOLMES; T.N. BARRY. 2011. Effects of stocking rate on pasture production, milk production and reproduction of supplemented crossbred Holstein-Jersey dairy cows grazing lucerne pasture. *Animal Feed Science and Technology* 168: 131-143.
- BELANGER, G.; T. KUNELIUS; D. MCKENZIE; Y. PAPADOPOULOS; B. THOMAS; K. MCRAE; S. FILLMORE; B. CHRISTIE. 1999. Fall cutting management affects yield and persistence of alfalfa in Atlantic Canada. *Canadian Journal of Plant Science* 79 (1): 57-63.
- BERG, W.K.; S.M. CUNNINGHAM; S.M. BROUDER; B.C. JOERN; K.D. JOHNSON; J. SANTINI; J.J. VOLENEC. 2005. Influence of Phosphorus and Potassium on Alfalfa Yield and Yield Components. *Crop Science* 45: 297-304.
- BERHONGARAY, G.; M. BASANTA; J. JAUREGUI. 2019. Water table depth affects persistence and productivity of alfalfa in Central Argentina. *Field Crops Research* 235: 54-58.
- BERONE, G.D.; M.C. SARDIÑA; D.J. MOOT. 2020. Animal and forage responses on lucerne (*Medicago sativa* L.) pastures under contrasting grazing managements in a temperate climate. *Grass and Forage Science* 75 (2): 192-205.

- BERTÍN, O.D.; P.F. BARLETTA; E. PACENTE; J. MATTERA; M.J. BERIBE; J.N. CAMARASA. 2015. *Secuencias de cultivos anuales y pastura perenne para forraje en suelo agrícola*. *Revista de Tecnología Agropecuaria* 10: 38-42.
- BORG, H.; D.W. GRIMES. 1986. *Depth development of roots with time: an empirical description*. *American Society of Agricultural Engineers* 29: 194-196.
- BROWN, H.E.; D.J. MOOT; E.I. TEIXEIRA. 2006. *Radiation use efficiency and biomass partitioning of lucerne (Medicago sativa) in temperate climate*. *European Journal of Agronomy* 25 (4): 319-327.
- BROWN, H.E.; D.J. MOOT; E.I. TEIXEIRA. 2005. *The components of lucerne (Medicago sativa) leaf area index respond to temperature and photoperiod in a temperate climate*. *European Journal of Agronomy* 23 (4): 348-358.
- CAMPBELL, G.S.; J.M. NORMAN. 1998. *An introduction to environmental biophysics*. Springer-Verlag, Nueva York, EUA.
- CARCIOCHI, W.D.; F. SALVAGIOTTI; A. PAGANI; N.I. REUSSI CALVO, M. EYHERABIDE; H.R. SAINZ ROZAS; I.A. CIAMPITTI. 2020. *Nitrogen and sulfur interaction on nutrient use efficiencies and diagnostic tools in maize*. *European Journal of Agronomy* 116, Article 126045: 1-11.
- CHRISTIAN, K.R. 1977. *Effects of the environment of the growth of alfalfa*. *Advances in Agronomy* 29: 183-227.
- COLLINO, D.; J. DARDANELLI; J.; M. DE LUCA. 2007. *Capítulo 3 Uso del agua y la radiación para producción de forraje*. En: BASIGALUP, D. (Ed.). *El Cultivo de Alfalfa en la Argentina*. Ediciones INTA, Buenos Aires. 45-65 pp.
- COLLINO, D.J.; J.L. DARDANELLI; M.J. DE LUCA; R.W. RACCA. 2005. *Temperature and water availability effects on radiation and water use efficiencies in alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Aust. J. Exp. Agric.* 45: 383-390.
- COSENTINO, D.; C. PECORARI. 2002. *Impact of low-density minerals on physical properties of soils of the Pampean region*. *Ciencia del Suelo* 20 (1): 9-16.
- CRALLE, H.T. 1983. *Photosynthetic partitioning in alfalfa populations selected for high nitrogen fixation capability*. Ph. D. Thesis. Univ. of Minnesota, St. Paul., EUA. Diss. Abstr. DA 8329508, 150 p.
- CUNNINGHAM, S.M.; J.J. VOLENEC; L.R. TEUBER. 1998. *Plant survival and root and bud composition of alfalfa populations selected for contrasting fall dormancy*. *Crop Science* 38 (4): 962-969.
- DARDANELLI, J.L.; J.T. RITCHIE; M. CALMON; J.M. ANDRIANI; D.J. COLLINO. 2004. *An empirical model for root water uptake*. *Field Crops Res.* 87 (1): 59-71.
- DARDANELLI, J.; D.J. COLLINO. 2002. *Water table contribution to alfalfa water use in different environments of the Argentine Pampas*. *Agriscientia* 19: 11-18.
- DARDANELLI, J.L.; O.A. BACHMEIER; R. SERENO; R.C. GIL. 1997. *Potential soil water extraction parameters for several crops in a silty loam soil*. *Field Crops Res.* 54: 29-38.

- DARDANELLI, J.L.; A.C. DE LA CASA; M.R. ATECA; R. ZANVETTOR; F. NÚÑEZ VÁZQUEZ; H.P. SALAS. 1992. *Validación del balance hidrológico versátil para la rotación sorgo-soja bajo dos sistemas de labranza*. *Rev. Agropecuaria de INTA Manfredi y Marcos Juárez* 7 (2): 20-29.
- DHONT, C.; Y. CASTONGUAY; P. NADEAU; G. BÉLANGER; R. DRAPEAU; F.P. CHALIFOUR. 2004. *Untimely fall harvest affects dry matter yield and root organic reserves in field-grown alfalfa*. *Crop Science* 44: 144-157.
- FERREYRA, R.A.; J.L. DARDANELLI, L.B. PACHEPSKY; D.J. COLLINO; P.C. FAUTINELLI; G. GIAMBASTIANI; V.R. REDDY; J.W. JONES. 2003. *Nonlinear effects of water stress on peanut photosynthesis at crop and leaf scales*. *Ecological Modelling* 168: 57-76.
- FICK, G.W.; D.A. HOLT; D.G. LUGG. 1988. *Environmental physiology and crop growth*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL Jr. (Eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. *Agronomy Monograph 29*. American Society of Agronomy, Madison, EUA. 163-194 pp.
- GARDNER, F.P.; R. BRENT PEARCE; R.L. MITCHEL. 1985. *Carbon fixation by crop canopies*. *Physiology of Crop Plants*. Iowa State University Press. 31-57 pp.
- GOSSE, G.; G. LEMAIRE; M. CHARTIER; F. BALFOURIER. 1988. *Structure of a lucerne population (Medicago sativa L.) and dynamics of stem competition for light during re-growth*. *Journal of Applied Ecology* 25: 609-617.
- GUIJTENS, J.C. 1990. *Alfalfa and alfalfa improvement*. En: STEWART, B.A.; D.R. NIELSEN (Eds.). *Irrigation of Agricultural Crops*. *Agronomy Monograph N.º 30*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, EUA.
- GUZMÁN, C.; M. DEL C. SPADA; J. MOMBELLI. 2007 *Eficiencia del uso de la radiación de cultivares de alfalfa de distinto grado de reposo en Córdoba, Argentina*. XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA), Cuzco, Perú, disco compacto (CD).
- HALL, A.J.; C.M. REBELLA; C.M. GHERSA; J.P. CULOT. 1992. *Field-crop systems of the Pampas*. En: PEARSON, C.J. (Ed.). *Ecosystems of the world: field crop ecosystems*. Elsevier Science BV. Ámsterdam, Holanda. 413-449 pp.
- HEICHEL, G.H.; R.H. DELANEY; H.T. CRALLE. 1988. *Carbon assimilation, partitioning, and utilization*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL Jr. (Eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. *Agronomy Monograph 29* Madison, Wisconsin, EUA. 195-228 pp.
- IBARLUCEA, J.; L. MAGNANO; F. SALVAGIOTTI. 2020. *Respuesta a fósforo y azufre en alfalfa en un suelo con larga historia agrícola*. *Actas Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal*. Santiago del Estero. AAPA (en prensa).
- KALU, B.A.; G.W. FICK. 1981. *Quantifying morphological development of alfalfa for studies of herbage quality*. *Crop Sci.* 21: 267-271.
- KHAITI, M.; G. LEMAIRE. 1992. *Dynamics of shoot and root growth of lucerne after seeding and after cutting*. *European Journal of Agronomy* 1 (4): 241-247.



- LEMAIRE, G.; D. CHAPMAN. 1996. *Tissue Flows in Grazed Plant Communities*. En: J. HODGSON; A.W. ILLIUS (Eds.). *The Ecology and Management of Grazing Systems*, CAB International, Londres. 3-36 pp.
- LÓPEZ, A.; J.L. DARDANELLI; D. COLLINO; R. SERENO; R.W. RACCA. 1997. *Efecto del grado de reposo invernal sobre la producción, consumo y eficiencia en el uso del agua en alfalfa cultivada bajo riego*. *RIA* 28 (2): 41-48.
- MAJOR, D.J.; M.R. HANNA; B.W. BEASLEY. 1991. *Photoperiod response characteristics of alfalfa (Medicago sativa L.) cultivars*. *Can. J. Sci.* 71:87-93.
- MATTERA, J.; L.A. ROMERO; A. CUATRÍN; P.S. CORNAGLIA; A.A. GRIMOLDI. 2013. *Yield components, light interception and radiation use efficiency of lucerne (Medicago sativa L.) in response to row spacing*. *European Journal of Agronomy* 45: 87-95.
- MATTERA, J.; L.A. ROMERO; A. CUATRÍN; A.A. GRIMOLDI. 2009. *Efectos de la distancia de siembra sobre la producción de biomasa y la persistencia de un cultivo de alfalfa*. *Revista Argentina de Producción Animal* 29: 131-140.
- MONTEITH, J.L. 1981. *Climatic variation and the growth of crops*. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* 107: 749-774.
- MONTEITH, J.L. 1977. *Climate and the efficiency of crop production in Britain*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences* 281: 277-294.
- MONTEITH, J.L. 1972. *Solar radiation and productivity in tropical ecosystems*. *J. Appl. Ecol.* 9: 747-766.
- MOOT, D.J.; H.E. BROWN; E.I. TEIXEIRA; K.M. POLLOCK. 2003. *Crop growth and development affect seasonal priorities for lucerne management*. En: D.J. MOOT (Ed.). *Legumes for Dryland Pastures Proceedings of a New Zealand Grassland Association*. (Disponible: [https://www.researchgate.net/publication/260164594\\_Crop\\_growth\\_and\\_development\\_affect\\_seasonal\\_priorities\\_for\\_lucerne\\_management](https://www.researchgate.net/publication/260164594_Crop_growth_and_development_affect_seasonal_priorities_for_lucerne_management) consultado: 20/08/2019).
- MOOT, D.J.; M.J. ROBERTSOEN; K.M. POLLOCK. 2001. *Validation of the APSIM-Lucerne model for phenological development in a cool-temperature climate*. *Proceedings of the 10th Australian Agronomy Conference*. *Australian Soc. of Agronomy*. (Disponible: [https://www.researchgate.net/publication/284261367\\_Validation\\_of\\_the\\_APSIM-Lucerne\\_model\\_for\\_phenological\\_development\\_in\\_a\\_cool-temperate\\_climate](https://www.researchgate.net/publication/284261367_Validation_of_the_APSIM-Lucerne_model_for_phenological_development_in_a_cool-temperate_climate) consultado: 20/08/2019).
- OJEDA, J.J.; O.P. CAVIGLIA; M.G. AGNUSDEI; P.M. ERRECART. 2018a. *Forage yield, water and solar radiation productivities of perennial pastures and annual crops sequences in the south-eastern Pampas of Argentina*. *Field Crops Research* 221: 19-31.
- OJEDA, J.J.; O.P. CAVIGLIA; J.G.N. IRISARRI; M.G. AGNUSDEI. 2018b. *Modelling inter-annual variation in dry matter yield and precipitation use efficiency of perennial pastures and annual forage crops sequences*. *Agric. and For. Meteorol.* 259: 1-10.
- OLIVO, S. 2018. *Producción de biomasa de alfalfa (Medicago sativa L.) en respuesta al arreglo espacial de siembra y frecuencia de corte*. Tesis Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina, 76 p.

- OLIVO, S.M.; G.D. BERONE; P.L. CICORE; A. CERRUDO; A. CASTAÑO. 2017. *Producción de biomasa aérea de alfalfa (Medicago sativa L.) en respuesta al arreglo espacial de siembra y frecuencias de corte*. *Revista Argentina de Producción Animal* 37: 411-417.
- PARK, S.E.; L.R. BENJAMIN; A.R. WATKINSON. 2003. *The theory and application of plant competition model: an agronomic perspective*. *Annals of Botany* 92: 741-748.
- PENMAN, H.L. 1948. *Natural evaporation from open water, bare soil and grass*. *Proc. R. Soc. A193*: 120-145.
- RITCHIE, J.T.; D.S. NESMITH. 1991. *Temperature and crop development*. *Modeling Plant and Soil Systems* 31: 5-29.
- ROMERO, L.A.; O.A. BRUNO; J.L. FOSSATI; O.R. QUAINO. 1991. *Densidad de siembra de alfalfa cultivar CUF 101: número de plantas y producción*. *Revista Argentina de Producción Animal* 11: 411-417.
- ROWE, D.E. 1989. *Competition thinning of alfalfa planted at three densities*. *Crop Science* 29: 1357-1361.
- SADRAS, V.O.; M. FERREIRO; F. GUTHEIM; A.G. KANTOLIC. 2009. *Desarrollo fenológico y su respuesta a temperatura y fotoperiodo*. En: ANDRADEF.H.; V.O. SADRAS (Eds.). *Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja*. EEA. Balcarce INTA – FCA, UNMDP. Balcarce, Argentina. 19-39 pp.
- SALVAGIOTTI, F.; P. PRYSTUPA, G. FERRARIS; L. COURETOT; L. MAGNANO; D. DIGNANI; F.H. GUTIERREZ BOEM. 2017. *N:P:S stoichiometry in grains and physiological attributes associated with grain yield in maize as affected by phosphorus and sulfur nutrition*. *Field Crops Research* 203: 128-138.
- SALVAGIOTTI, F.; D.J. MIRALLES. 2008. *Radiation interception, biomass production and grain yield as affected by the interaction of nitrogen and sulfur fertilization in wheat*. *European Journal of Agronomy* 28: 282-290.
- SANMARTI, N.; S. BACIGALUPPO; F. SALVAGIOTTI. 2018. *Consumo y eficiencia en el uso del agua en secuencias agrícolas con distinto grado de intensificación*. *Actas XXVI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. Tucumán, Argentina.
- SEVILLA, G.H.; A.M. PASINATO; J.M. GARCÍA. 2003. *Producción de forraje y densidad de plantas de alfalfa irrigada comparando distintas densidades de siembra*. *Archivos Latinoamericanos de Prod. Animal* 10 (3): 164-170.
- SHEAFFER, C.C.; C.B. TANNER; M.B. KIRKHAN. 1988. *Water relations and irrigation*. EN: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL (eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. *Agronomy Monograph N.º 29, Chapter 11*. ASA-CSSA-SSSA. Madison, WI, EUA. 373-409 pp.
- SHEEHY, J.E.; F.I. WOODWARD; M.B. JONES; A. WINDRAM. 1979. *Microclimate, photosynthesis and growth of Lucerne (Medicago sativa L.)*. I. *Microclimate and Photosynthesis*. *Annals of Botany* 44: 693-707.

- SIM, R.E.; D.J. MOOT; H.E. BROWN; E.I. TEIXEIRA. 2015. *Sowing date affected shoot and root biomass accumulation of lucerne during establishment and subsequent regrowth season. European Journal of Agronomy* 68: 69-77.
- SINCLAIR, T.R.; R.C. MUCHOW. 1999. *Radiation use efficiency. Advances in Agronomy* 65: 215-265.
- SPADA, M. DEL C.; S. OLIVO. 2014. *Determinación del filocrono de cultivares de Medicago sativa de diferente grado de reposo. Revista Argentina de Producción animal* 34 (1): 97-211.
- TARDIEU, F.; C. GRANIER; B. MULLER. 1999. *Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate? New Phytologist* 143 (1): 33-43.
- TEIXEIRA, E.I. 2006. *Understanding growth and development of lucerne (Medicago sativa L.) crops with contrasting levels of perennial reserves. Ph.D. thesis, Lincoln University, Lincoln, Canterbury. 274 p.*
- TEIXEIRA, E.I.; H.E. BROWN; E.D. MEENKEN; D.J. MOOT. 2011. *Growth and phenological development patterns differ between seedling and regrowth lucerne crops (Medicago sativa L.). European Journal of Agronomy* 35: 47-55.
- TEIXEIRA, E.I.; D.J. MOOT; H.E. BROWN. 2008. *Defoliation frequency and season affected radiation use efficiency and dry matter partitioning to roots of lucerne (Medicago sativa L.) crops. European Journal of Agronomy* 28:103-111.
- TEIXEIRA, E.I.; D.J. MOOT; M.V. MICKELBART. 2007a. *Seasonal patterns of root C and N reserves of lucerne (Medicago sativa L.) crops grown in a temperate climate were affected by defoliation regime. European Journal of Agronomy* 26:10-20.
- TEIXEIRA, E.I.; D.J. MOOT; H.E. BROWN; A.L. FLETCHER. 2007b. *The dynamics of lucerne (Medicago sativa L.) yield components in response to defoliation frequency. European Journal of Agronomy* 26: 394-400.
- TEIXEIRA, E.I.; D.J. MOOT; H.E. BROWN; K.M. POLLOCK. 2007c. *How does defoliation management impact on yield, canopy forming processes and light interception of lucerne (Medicago sativa L.) crops? European Journal of Agronomy* 27: 154-164.
- THIÉBEAU, P.; N. BEAUDOIN; E. JUSTES; J.M. ALLIRAND; G. LEMAIRE. 2011. *Radiation use efficiency and shoot:root dry matter partitioning in seedling growths and regrowth crops of lucerne (Medicago sativa L.) after spring and autumn sowings. European Journal of Agronomy* 35: 255-268.
- TOTIS DE ZELJKOVICH, L.; G. COCA DE GONZÁLEZ. 1998. *Necesidades de agua de un cultivo de alfalfa y su relación con la productividad. Revista de Tecnología Agropecuaria* 3: 22-24.
- TRAVIS, R.L.; R. REED. 1983. *The solar tracking pattern in a closed alfalfa canopy. Crop Science* 23: 664-668.

UNDERSANDER, D.; M.V. HALL; P. VASSALOTTI; D. COSGROVE. 2011. *Alfalfa Germination and Growth*. National Alfalfa & Forage Alliance, St. Paul, MN, EUA 22 p.

VARELLA, A.C.; D.J. MOOT; K.M. POLLOCK; P.L. PERI; R.J. LUCAS. 2011. *Do light and alfalfa responses to cloth and slatted shade represent those measured under an agroforestry system?* *Agroforestry Systems* 81: 157-173.

VAZQUEZ, R.J.; G.D. BERONE. 2019. *Descanso otoñal de pasturas de alfalfa en el sudeste bonaerense: ¿Cuándo debe comenzar?* *Revista Argentina de Producción Animal* 39 (1): 99-167.

VEGA, C.R.; F.H. ANDRADE. 2009. *Densidad de plantas y espaciamento entre hileras*. En: F.H. ANDRADE; V.O. SADRAS (Eds.). *Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja*. EEA. Balcarce INTA – FCA, UNMdP. Balcarce, Argentina. 69-97 pp.

VENTRONI, L.M.; J.J. PA; C.A. CANGIANO. 2010. *Fall dormancy and cutting frequency impact on alfalfa yield and yield components*. *Field Crops Research* 119: 252-259.

VOLENEC, J.J.; J.H. CHERNEY; K.D. JOHNSON. 1987. *Yield components, plant morphology, and forage quality of alfalfa as influenced by plant population*. *Crop Science* 27: 321-326.

## CAPÍTULO 4

Nutrición nitrogenada de la alfalfa  
e impacto económico y  
ecológico de los rizobios

Roberto W. Racca,  
Nicolás Ayub,  
Norma González,  
Cintia Jozefkowicz,  
Silvina Brambilla y  
Romina Frare

## Introducción

Una característica destacada de la alfalfa es el alto contenido de nitrógeno (N) total que, casi exclusivamente en forma de proteínas y aminos, se ubica principalmente en las hojas. Comparado con otras especies, el forraje de alfalfa tiene un mayor contenido de proteínas (Bickoff *et al.*, 1972; Howarth, 1988). En condiciones de regadío, Ball y Teneyck (1980) y Roth *et al.* (1983) determinaron que para producir 21,3 y 47,5 toneladas (t) de materia seca (MS) ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, la alfalfa extrae entre 784 y 1120 kg de N ha<sup>-1</sup>, respectivamente. En condiciones de secano, Romero *et al.* (1977) establecieron que una producción de alfalfa de 15 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> utiliza 450 kg de N ha<sup>-1</sup>.

Dentro de los ciclos biogeoquímicos de los minerales, el ciclo del N es posiblemente uno de los más complejos, ya que el elemento se encuentra en condiciones naturales en diferentes estados de oxidación, que van desde +5 a -3, formando tanto compuestos estables como inestables. El N es imprescindible para el crecimiento vegetal. Sin embargo, a pesar de que la atmósfera contiene aproximadamente 78 % de N<sub>2</sub>, las plantas superiores no pueden utilizarlo directamente en su nutrición. Esto es así porque la triple ligadura que une los dos átomos del N<sub>2</sub> es una de las más fuertes de las conocidas en la naturaleza. Solamente algunas bacterias, entre ellas los rizobios, poseen un complejo enzimático denominado nitrógenoasa, que le permite romper esas triples ligaduras a temperatura y presión normales, necesitando para ello de energía (ATP) y poder reductor (NADPH), que deben ser provistos indirectamente por la planta hospedera con la que la bacteria debe asociarse para que el proceso natural de fijación biológica del nitrógeno (FBN) ocurra (simbiosis).

El establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno es el resultado de una compleja serie de eventos coordinados de comunicación, reconocimiento y diferenciación entre la planta de alfalfa y su bacteria específica. Cuando estos pasos se cumplen, la manifestación de la simbiosis es la formación de un nuevo órgano vegetal: el nódulo. Este último está habitado por las bacterias simbióticas que, transformadas en bacteroides, son capaces de cumplir con el proceso de reducción del N<sub>2</sub> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Hirsch *et al.*, 2001). Normalmente, la alfalfa satisface gran parte de sus requerimientos nitrogenados a través de su relación

simbiótica con la bacteria *Sinorhizobium meliloti*. Heichel *et al.* (1983) estimaron que la alfalfa puede derivar de la FBN entre 43 y 64 % de sus requerimientos totales de N. Se ha determinado que el cultivo puede fijar entre 50 y 740 kg de N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, con un promedio de aproximadamente 200 kg de N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Vance, 1978; Heichel *et al.*, 1983; Heichel *et al.*; 1984). Este amplio rango en las estimaciones de N fijado está condicionado por una serie de factores, entre los que se incluyen la cepa del rizobio y su interacción con el genotipo de la planta, las condiciones ambientales [pH, contenido de fósforo (P) y potasio (K) del suelo, disponibilidad de agua, radiación, temperatura, etc.] y las alternativas de manejo del cultivo (Vance *et al.*, 1988). Recientemente se observó que optimizando el proceso de inoculación y utilizando la cepa nativa *Sinorhizobium meliloti* B401, el N fijado en forma simbiótica puede superar el 85 % del N total de la planta de alfalfa, tanto en condiciones óptimas de precipitación como en ambientes semiáridos (Jozefkowicz *et al.*, 2017). Los estudios fisiológicos y moleculares mostraron que la cepa B401, en respuesta al estrés osmótico en condiciones de campo, tiene la inusual capacidad de producir grandes cantidades de un soluto compatible (glicina betaína) que le permite mitigar el desbalance osmótico producido por condiciones de estrés abiótico. El análisis del genoma de esta cepa permitió comprender las rutas anabólicas involucradas en la biosíntesis de este soluto, determinándose que la cepa B401 posee la típica ruta de biosíntesis de glicina betaína a partir de colina codificada por los cromosomas bacterianos y que, además, posee transportadores alternativos codificados por un elemento extra cromosómico (denominado megaplásmido A), capaces de importar tanto glicina betaína como su precursor (colina) del medioambiente (Figura 1). En conclusión, estos estudios recientes muestran la posibilidad de continuar mejorando el proceso de FBN en el cultivo de alfalfa a través la utilización de nuevas tecnologías de inoculación.

En términos generales, existe una profusa información fisiológica, bioquímica y genómica referente a la simbiosis entre *Ensifer meliloti* y varias especies del género *Medicago*, entre ellas la alfalfa (Galibert *et al.*, 2001; Pistorio *et al.*, 2002; Del Papa *et al.*, 2003). Desafortunadamente, la gran mayoría de estos estudios están restringidos a organismos modelos, tales como *Ensifer meliloti* 1021 y *Medicago truncatula* (Galibert *et al.*, 2001), lo cual limita notablemente la comprensión del proceso de

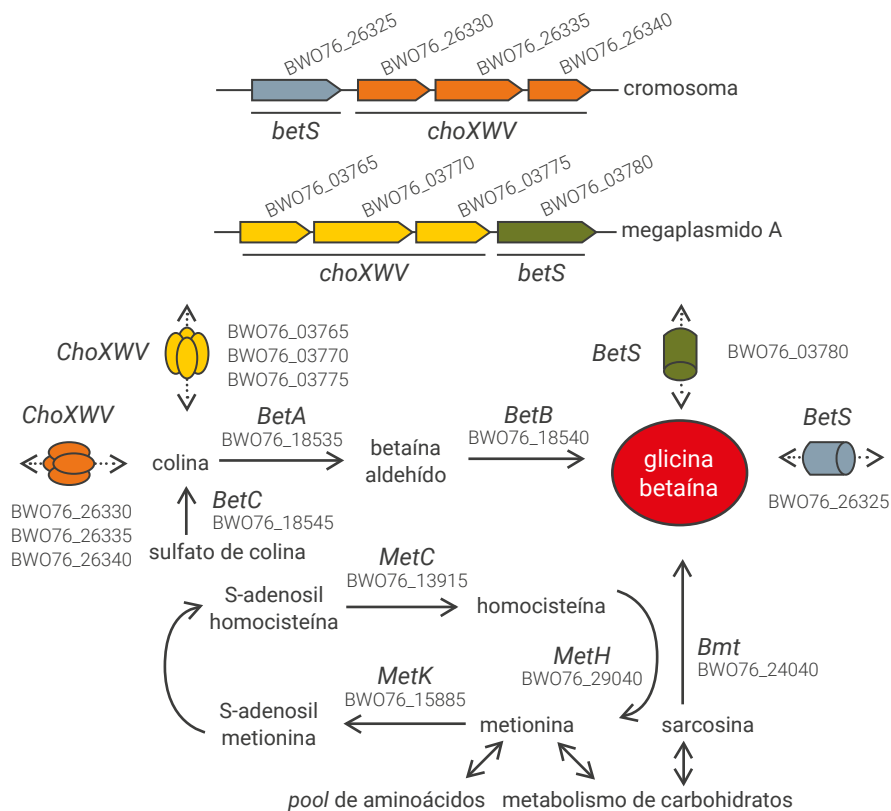
FBN en condiciones agrónomicamente relevantes, es decir, utilizando germoplasma elite de alfalfa, inoculantes comerciales y condiciones de campo. Para poder avanzar en esta área poco atendida por el sector académico tradicional, el INTA-IGEAF (Instituto de Genética “Ewald A. Favret”) secuenció el genoma de la bacteria 12-F-34, que es el inoculante más utilizado en el cultivo de alfalfa en los últimos 50 años. El análisis del genoma de la cepa 102-F-34 (conocida en nuestro país como *Ensifer meliloti* B399) mostró que es prácticamente idéntico (99 % de identidad nucleotídica) al genoma de la cepa modelo 1021, con la excepción de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones que le otorgan a la cepa 102-F-34 una mayor eficiencia de FBN en condiciones de campo con respecto a la cepa modelo 1021 (Jozefkowicz *et al.*, 2017) (Figura 2).

Estos estudios, como tantos otros, ponen en evidencia las limitaciones intrínsecas del uso de organismos modelos y la importancia de la inversión del sector público para la conducción de evaluaciones bajo condiciones reales de trabajo. Además, estos resultados sugieren que pequeñas modificaciones en el genoma de los rizobios pueden tener grandes cambios en su eficiencia de FBN, lo que ha dado lugar en el INTA-IGEAF a nuevos programas de selección natural y mutagénesis inducida sobre los inoculantes comerciales actuales con la finalidad de producir inoculantes mejorados para alfalfa, libres de manipulaciones genéticas (inoculantes “GMO-free”). Los nuevos avances en esta temática se detallan más adelante.

Valorar la importancia de la FBN en la alfalfa y los factores que la condicionan es trascendente para la sustentabilidad de los sistemas de producción que la incluyen. Si este cultivo no pudiera satisfacer la mayor parte de sus altos requerimientos de N a través de la FBN, disminuiría significativamente sus rendimientos y la fertilidad nitrogenada de los suelos en los que crece. Esto afectaría la productividad de los cultivos agrícolas que le siguen en la rotación y obligaría al empleo de fertilizantes químicos, con el consiguiente impacto económico y ambiental.

Entre 1993 y 1997, el INTA generó un Proyecto Nacional titulado “Fijación Biológica del Nitrógeno en Alfalfa para el Desarrollo Sostenible de los Sistemas Agrícola-Ganaderos”, que se identificó sintéticamente con el nombre de PRONALFA. Su objetivo principal fue determinar la contribución de la FBN a la nutrición nitrogenada de la alfalfa (% de N derivado



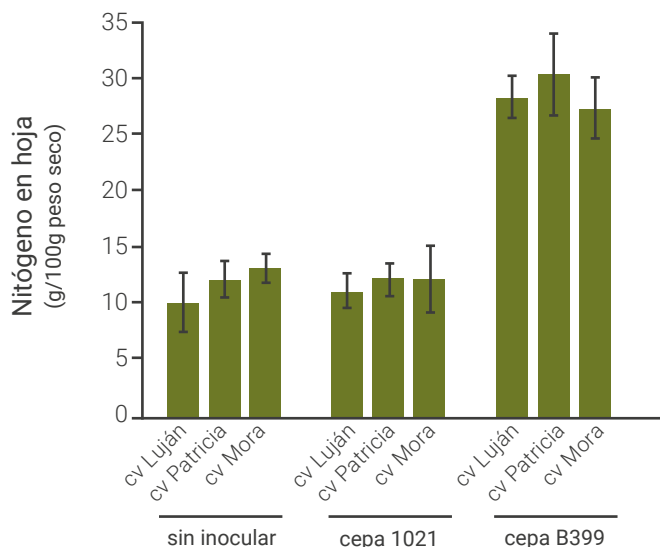


■ **Figura 1.** Identificación de los genes potencialmente involucrados en la modulación de la concentración intracelular del compuesto osmoprotector glicina betaína (*bet*) en el genoma de la cepa comercial B401. Dentro del cromosoma se identificaron los siguientes genes probablemente involucrados: a) BWO76\_18535, BWO76\_18540 y BWO76\_18545, relacionados con la biosíntesis de *bet* desde *colina* (*col*) o sulfato de *col* (*betABC*); b) BWO76\_26325, BWO76\_26330, BWO76\_26335 y BWO76\_26340 (*betS*-*ChoXWV*), relacionados con el transporte de las moléculas *bet* y *col*; y c) *metC* (BWO76\_13915), *metK* (BWO76\_15885), *metH* (BWO76\_29040) y *bmt* (BWO76\_24040), asociados a la producción de *bet* acoplada a la síntesis de metionina. Además, como se muestra en la parte superior de la figura, dentro del megaplásmido A se identificó un cluster (BWO76\_03765 - BWO76\_03770 - BWO76\_03775 - BWO76\_03780) alternativo de transporte de *bet* y *col* (*choXWV*-*betS*), que sería particular de la cepa B401.

de la atmósfera) y evaluar el impacto que sobre este proceso tienen los factores de clima y suelo. En el marco de este proyecto se condujeron ensayos en Rafaela (Santa Fe), Manfredi (Córdoba), Anguil (La Pampa), General Villegas (Buenos Aires) y Barrow (Buenos Aires), localidades

ubicadas en las áreas pampeanas tradicionalmente productoras de alfalfa, que representaban combinaciones particulares de condiciones edáficas (rango textural de franco-arcilloso a franco-arenoso) e hídricas (precipitaciones anuales de 950 mm en la zona húmeda a 630 mm en la zona semiárida). Todos los suelos presentaban valores de P que excedían los niveles críticos para alfalfa, excepto Barrow, cuyos valores fueron corregidos por fertilización.

A continuación, y sobre la base de la información generada por el PRONALFA (Racca *et al.*, 2001), se analizarán diversos aspectos involucrados en la dinámica de la nutrición nitrogenada del cultivo de alfalfa en la región Pampeana bajo condiciones de secano.

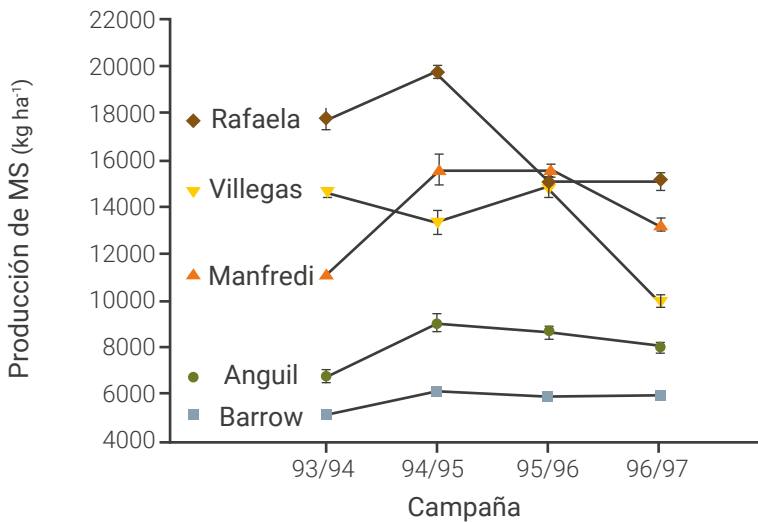


■ **Figura 2.** Cuantificación del contenido de nitrógeno en alfalfa inoculada con distintos rizobios en campo. El contenido total de nitrógeno de las hojas de alfalfa proveniente de plantas de seis meses sin inocular, o inoculadas con la cepa modelo 1021 o con la cepa comercial B399.

## Producción de forraje y acumulación de nitrógeno

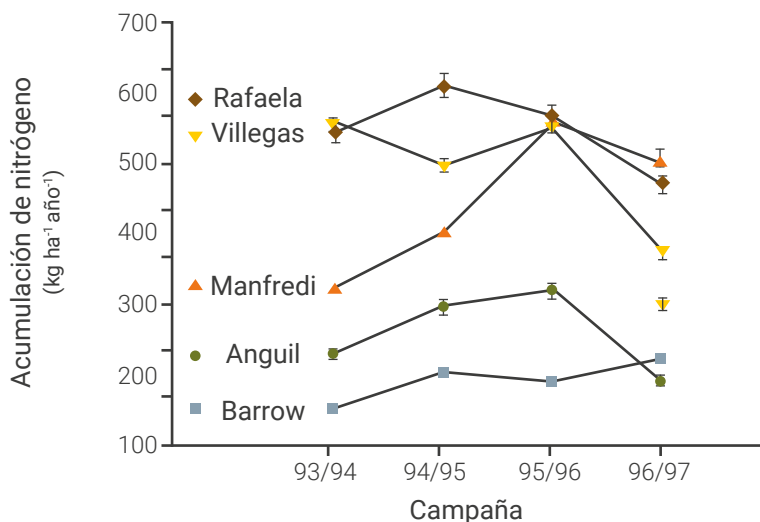
La producción promedio de forraje durante los cuatro años en que se condujeron los ensayos del proyecto fluctuó entre 5.767 kg MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en

Barrow (con una limitación severa de profundidad del suelo por presencia de una capa de tosca entre 40 y 60 cm y con los valores más bajos de temperatura y radiación) y 16.582 kg MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en Rafaela (sin limitantes edáficas importantes y con los máximos valores de temperatura y radiación de todos los sitios ensayados) (Figura 3). Estos valores están comprendidos en el rango experimental de rendimiento de forraje citado por Rossanigo *et al.* (1995) para cultivares bajo corte. En general, se observó que la variabilidad en la producción de forraje a lo largo del proyecto fue más importante entre localidades que entre campañas dentro de cada localidad.



■ **Figura 3.** Producción de materia seca (MS) de alfalfa en seco durante cuatro campañas en cinco localidades de la región Pampeana. Los segmentos verticales representan el error estándar. Adaptado del Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001).

El promedio de acumulación total de nitrógeno, considerando las cuatro campañas de evaluación en cada localidad, varió entre 193 y 550 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> para Barrow y Rafaela, respectivamente. En la Figura 4 se presentan los valores promedio para cada campaña en cada localidad.



■ **Figura 4.** Acumulación de nitrógeno en forraje de alfalfa producido en secano durante cuatro campañas en cinco localidades de la región Pampeana. Los segmentos verticales representan el error estándar. Adaptado del Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001).

## Aporte de nitrógeno por fijación biológica

La cantidad de nitrógeno aportada por la fijación biológica, estimada a través de la técnica del valor A con el uso de  $^{15}\text{N}$  propuesta por Rennie *et al.* (1978), fluctuó entre 28,7 y 79,4 % (Tabla 1).

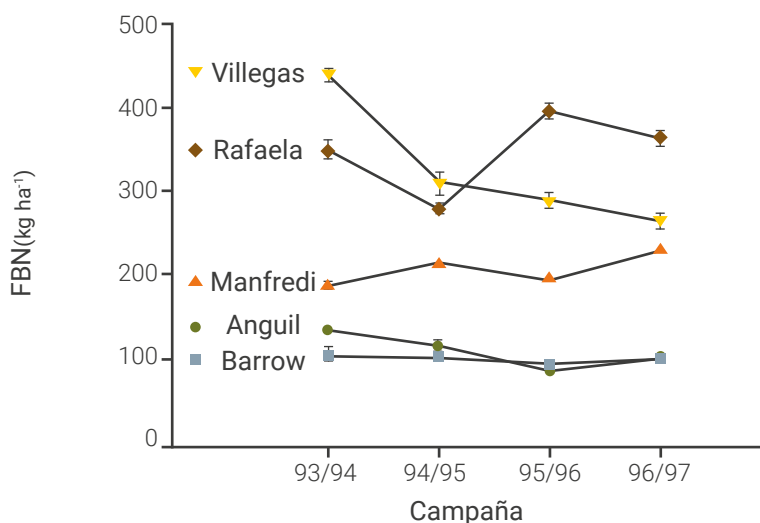
Haciendo una evaluación global por temporada, se aprecia que –en líneas generales– el porcentaje de N derivado de la FBN fue máximo en la primera, disminuyó en la segunda y tercera y se incrementó nuevamente en la cuarta. Este comportamiento se vio influenciado principalmente por la disponibilidad de agua, tanto de las precipitaciones como del acceso a la napa freática que se experimentó en algunas localidades (Tabla 2).

En la Figura 5 se presenta la evolución de la cantidad de nitrógeno fijado ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) en cada localidad y para las cuatro temporadas en las que se condujeron los ensayos. Claramente se aprecia que los mayores valores de FBN correspondieron a Rafaela y General Villegas, en tanto que los menores valores se observaron en Barrow y Anguil. Es intere-

sante resaltar que, durante las dos primeras campañas, aun con una producción de forraje por debajo de otras localidades (Figura 3), General Villegas registró los mayores aportes de nitrógeno derivados de la FBN como consecuencia de su mayor porcentaje de fijación (Tabla 1).

■ **Tabla 1.** Porcentaje de nitrógeno derivado de la fijación biológica respecto del contenido total de N en biomasa aérea de alfalfa en ensayos conducidos por cuatro temporadas en cinco localidades de la región Pampeana. Adaptado del Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001).

Localidad	Porcentaje de nitrógeno (%)				Promedio
	Campaña				
	93/94	94/95	95/96	96/97	
Anguil	60,2	39,8	28,7	52,6	42,00
Barrow	70,1	48,7	53,1	45,3	54,06
Manfredi	58,8	49,7	32,1	44,8	43,44
Rafaela	64,8	45,8	69,8	78,8	65,80
Villegas	79,4	54,9	52,5	63,9	60,64
Promedio	66,6	47,8	47,2	57,0	53,18



■ **Figura 5.** Cantidad de N ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) derivado de la fijación biológica en forraje de alfalfa producido en seco durante cuatro campañas en cinco localidades de la región Pampeana. Los segmentos verticales representan el error estándar. Adaptado del Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001).

■ **Tabla 2.** Evapotranspiración potencial de cultivo o ETc (mm), consumo de agua (mm), aporte de la napa freática (mm y %) y deficiencia de agua (mm) en ensayos de alfalfa conducidos por cuatro temporadas en cinco localidades de la región Pampeana. Adaptado del Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001).

Localidad	Campaña	ETc (mm)	Consumo de Agua (mm)	Aporte de la napa (mm)	Aporte de la napa (%)	Deficiencia de agua con aporte de napa (mm)	Deficiencia de agua sin aporte de napa (mm)
Anguil	93/94	1460	701	0	0	759	759
	94/95	1602	564	0	0	1038	1038
	95/96	1434	582	0	0	852	852
	96/97	1664	749	0	0	808	808
	Media	1490	649	$\Sigma=0$	0	841	841
Barrow	93/94	1275	762	0	0	513	513
	94/95	1340	713	0	0	627	627
	95/96	1389	718	0	0	671	671
	96/97	1325	739	0	0	586	586
	Media	1332	733	$\Sigma=0$	0	599	599
Manfredi	93/94	1418	760	0	0	658	658
	94/95	1476	819	339	41,4	657	996
	95/96	1283	823	320	38,9	460	780
	96/97	1527	728	98	13,5	799	897
	Media	1426	783	$\Sigma=757$	24,2	643	833
Rafaela	93/94	1428	891	77	8,6	537	614
	94/95	1526	1034	409	39,6	492	899
	95/96	1510	922	150	16,3	588	738
	96/97	1401	738	331	44,9	663	994
	Media	1466	896	$\Sigma=967$	27,0	570	811
Villegas	93/94	1389	863	192	22,2	526	718
	94/95	1369	933	118	12,6	436	554
	95/96	1499	946	280	29,6	553	833
	96/97	1483	634	0	0	849	849
	Media	1435	844	$\Sigma=590$	17,5	591	738

De acuerdo con Collino *et al.* (2005), las condiciones de temperatura, radiación y disponibilidad de agua (precipitación más aporte de napa) podrían explicar mayormente las variaciones en producción de forraje y FBN entre localidades y entre temporadas dentro de cada localidad. La evapotranspiración calculada (ETc) fue similar entre localidades, excepto en Barrow donde los menores valores de radiación y temperatura determinaron condiciones de menor demanda atmosférica (Tablas 2 y 3). El consumo de agua del cultivo fluctuó entre 44 % y 61 % de la ETc en Anguil y Rafaela, respectivamente, lo que indicó que en todas las localidades hubo importantes deficiencias de agua. Sin embargo, esas deficiencias no estuvieron directamente relacionadas con la precipitación efectiva en Manfredi, Rafaela y General Villegas, porque en estas localidades hubo aporte de agua desde la napa freática. Si bien este aporte fue variable, no solo entre estas localidades sino también entre campañas dentro de localidades, resultó de un efecto significativo para mitigar –al menos en parte– la eventual escasez de humedad. En este contexto, si no se hubiesen producido los aportes de la napa, las deficiencias hídricas habrían sido similares en Anguil, Manfredi y Rafaela. La combinación de aportes de agua por precipitaciones y napa freática hizo que las menores deficiencias se registraran en Rafaela, General Villegas y Barrow, que en Manfredi se presentaran valores intermedios y que en Anguil se verificara la condición hídrica más desfavorable.

■ **Tabla 3.** Valores promedio y coeficientes de variación (entre paréntesis), de temperaturas máxima (T.máx.) y mínima (T.mín.), radiación solar (Rad.), evapotranspiración potencial de referencia (ETo), precipitaciones (Pp.) y deficiencia hídrica climática (ETo-Pp.) para cinco localidades de la región Pampeana en el período 1993/97. Adaptado del Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001).

Localidad	T.máx.	T.mín.	Rad.	Eto	Pp.	ETo-Pp
	°C	°C	MJ m <sup>2</sup>	Mm	mm	Mm
Anguil	23,0 (1,2)	8,1 (7,5)	15,3 (2,1)	1625 (3,0)	763 (33,8)	862 (42,4)
Barrow	20,6 (1,7)	7,7 (6,1)	15,3 (1,8)	1459 (2,5)	838 (13,1)	621 (17,9)
Manfredi	24,0 (2,3)	9,9 (3,3)	15,8 (4,1)	1562 (6,2)	636 (13,2)	925 (20,2)
Rafaela	24,8 (2,7)	12,0 (2,1)	16,7 (2,6)	1622 (7,7)	806 (21,8)	816 (41,6)
Villegas	22,7 (3,4)	8,4 (6,8)	15,7 (3,8)	1571 (5,1)	760 (17,9)	811 (31,3)
C.V.	(6,7)	(18,2)	(4,1)	(6,1)	(21,3)	(32,6)

De todo lo anterior, se puede concluir que en los alfalfares de la región Pampeana, como promedio general, 53 % del nitrógeno total acumulado en la biomasa aérea deriva de la FBN, con un rango que va del 79 al 29 % dependiendo de la interacción planta-ambiente. En ese contexto, la disponibilidad de agua constituye un factor de primer orden para la determinación de la magnitud de la FBN.

## Rizobios en el suelo y el sistema nodular

La información provista por el Proyecto PRONALFA también ha permitido comprobar que habitualmente en los suelos de la región Pampeana que registran antecedentes de haber tenido alfalfa existen poblaciones nativas o naturalizadas de *Ensifer meliloti* capaces de nodular especies de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Estas poblaciones de rizobios se encuentran en número variable y a distintas profundidades. Con frecuencia, en los muestreos iniciales cercanos a la siembra, las técnicas de detección habituales de estos microorganismos arrojan resultados negativos (Racca *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando los cultivos no inoculados comienzan a desarrollarse aparecen nódulos espontáneos que son consecuencia de la estimulación que ejercen las plantas de alfalfa sobre estas poblaciones de muy bajo número de individuos por gramo de suelo (Da y Deng, 2003). Esto ha sido confirmado en nuevos ensayos conducidos en Balcarce y en Punta Espinillo (Uruguay), donde en suelos aparentemente libres de rizobios específicos para alfalfa en el momento de la siembra, se detectó en la primavera siguiente que el 25 % de los nódulos estaban ocupados por una cepa diferente de la inoculada (Grassano y Ronchi, comunicación personal). En esas zonas, y principalmente en Uruguay, la carga inicial no detectable de *E. meliloti* en los suelos condiciona una implantación muy deficitaria del cultivo (Labandera, Uruguay, comunicación personal).

Durante la conducción de los ensayos del Proyecto PRONALFA, la observación de los sistemas radicales de alfalfa a lo largo del perfil de suelo permitió la detección de nódulos en toda la raíz, hasta profundidades superiores a 1 m. La distribución de los nódulos en el perfil presentó usualmente gran variabilidad y no pareció estar ligada al tipo de suelo,



excepto en Barrow donde la presencia de un horizonte petrocálcico definido causa serias limitaciones para el desarrollo de las plantas.

En aquellos tratamientos del Proyecto PRONALFA en los que se sembró semilla de alfalfa inoculada, los rizobios que se incorporaron con el inoculante fueron capaces de formar nódulos en todas las temporadas, tanto en superficie como en profundidad, lo que indica que las cepas introducidas persistieron y compitieron eficientemente con las cepas naturalizadas.

En respuesta a la inoculación, e independientemente de la población de *Ensifer meliloti* naturalizada en el suelo, durante el año de implantación y en los primeros 30 cm de profundidad aparecieron nódulos asociados a la raíz principal o a raíces secundarias en desarrollo. Los nódulos de alfalfa cuando son nuevos tienen forma unilobulada o alargada; a medida que se siguen desarrollando adquieren aspecto palmado, y finalmente –si persisten– forman ramilletes coraloides o racimos (Figuras 6 y 7).



■ **Figura 6.** Nódulos de alfalfa de forma alargada, detectados a profundidades cercanas a los 30 cm durante el año de implantación del cultivo. Adaptado de Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001).



■ **Figura 7.** Ramilletes coraloides de nódulos de alfalfa detectados durante el tercer año de vida del cultivo. Adaptado de Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001).

Los nódulos de alfalfa son de tipo meristemático y de crecimiento indeterminado. Estas características, frente a situaciones de estrés moderado (corte, defoliación, sequía, etc.), hacen que, aunque una parte o la totalidad del tejido funcional que participa en la FBN pueda morir, el meristema nodular persista y sea capaz de regenerar el crecimiento cuando la situación de estrés se revierta (Stougaard, 2000).

La nodulación inicial, expresada como porcentaje de plantas noduladas, es usualmente más abundante en aquellos suelos que presentan altos contenidos de  $\text{Ca}^{++}$  y un pH próximo a la neutralidad, porque en ellos la población rizobial naturalizada es también mayor. En una etapa temprana, si no existen limitaciones en el suministro de P, el agua disponible en la porción del suelo explorado por las raíces es el factor que regula directamente la magnitud de la nodulación. A pesar de que se ha señalado que niveles medianamente altos de materia orgánica conllevan un alto potencial de mineralización y, por lo tanto, podrían desalentar la nodulación (Dusha, 2002), esta no se vio comprometida en los ensayos del Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001).

A medida que avanza el ciclo del cultivo y las raíces profundizan en el suelo, es frecuente la no detección de nódulos en los primeros 30 o 40 cm del perfil; ello no implica que la alfalfa los haya perdido, sino que estos se desarrollan a mayor profundidad. Como la emisión de raíces nuevas está gobernada por la disponibilidad de agua, cuando la humedad de los estratos superficiales del suelo se va agotando, el sistema radical de la alfalfa –si no encuentra mayores limitaciones– va profundizando y emitiendo raicillas capaces de aprovechar el contenido de agua subsuperficial. Estas raicillas son receptivas a las células de *E. meliloti* y pueden formar nuevos nódulos en profundidad (Figura 8), que en algunos casos pueden superar el metro. La formación de estas nuevas raicillas sería la clave para la dinámica de nodulación en profundidad.

La observación de sistemas radicales sin disturbar en suelos bajo una intensa sequía muestra que los primeros 30-40 cm de raíz principal son muy pobres en raicillas secundarias y prácticamente sin nódulos. Por el contrario, en una situación sin limitaciones hídricas, se encuentra gran abundancia de nuevas raicillas cortas, unidas a la raíz principal que albergan nódulos nuevos.



■ **Figura 8.** Nódulos de aspecto coraloide encontrados a una profundidad cercana a los 70 cm en raíces de alfalfa de 2 años de edad. Adaptado de Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001).

Aun bajo condiciones de sequía, se observa la existencia de nódulos persistentes en profundidad en ramilletes coraloideos o en racimos (Timmers *et al.*, 2000) que en ocasiones pueden llegar a diámetros superiores a 1 cm. Esto sugiere una estrategia de supervivencia diferente para este tipo de nódulos. La masa nodular profunda parece ser bastante independiente de las condiciones ambientales. Sus nódulos serían capaces de otorgar estabilidad al sistema de FBN, satisfaciendo en gran parte los requerimientos nutricionales nitrogenados del cultivo. Contrariamente, los nódulos de las capas superficiales del suelo al ser más dependientes de las condiciones edafoclimáticas (humedad y temperatura) pueden inactivarse, morir, o volver a formarse en función del crecimiento de raicillas y de la humedad disponible.

En función de todo lo precedente, Racca *et al.* (2001) sugirieron que el sistema nodular superficial actuaría como compensador de los mayores requerimientos nitrogenados del cultivo cuando se dan condiciones ambientales favorables para su crecimiento, en tanto que el profundo sería el responsable de la supervivencia del cultivo.

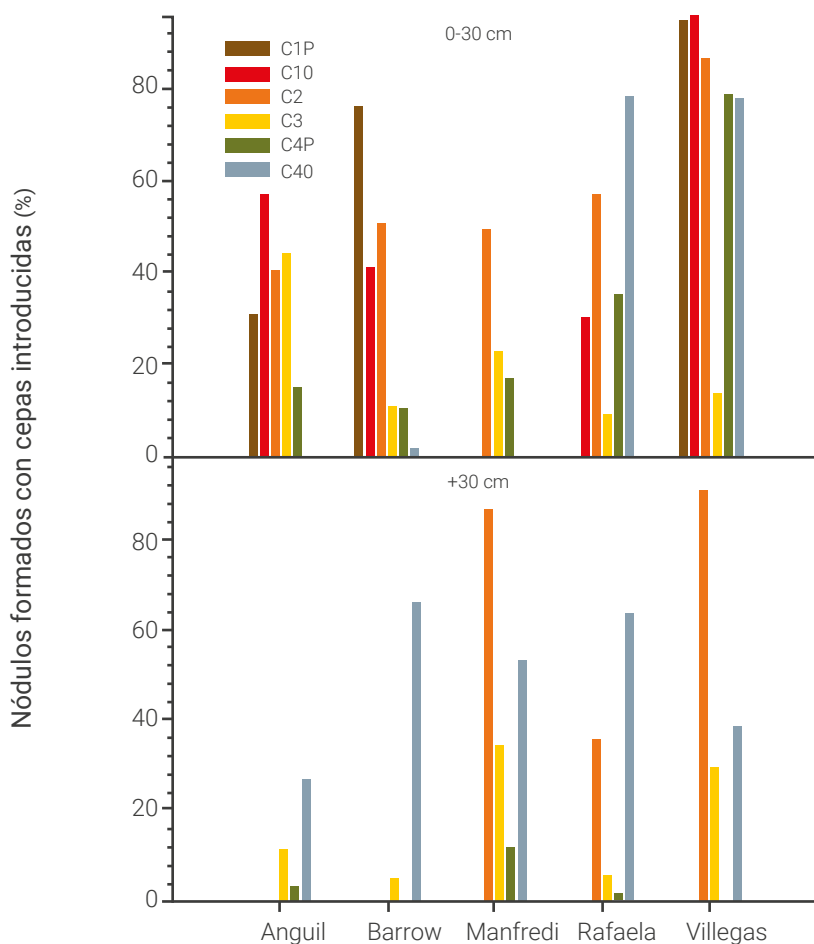
La población saprofítica de *Ensifer meliloti* tiende a aumentar en el suelo durante los primeros años de cultivo para posteriormente estabilizarse en función de las condiciones locales de clima y suelo. Por un lado, aunque la inoculación puede contribuir a alcanzar este equilibrio, se estima como más importante el papel que juega la estimulación provocada por los exudados radicales de la alfalfa. Por otro lado, y a través del estudio de la dinámica de la ocupación nodular realizada en el Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001), se ha comprobado el fenómeno de competencia, tanto en el estrato superficial como a mayores profundidades del perfil. En general, las cepas naturalizadas dominaron los

sistemas nodulares en todos los sitios experimentales; sin embargo, en algunas campañas y localidades las cepas introducidas fueron las que formaron el mayor porcentaje de nódulos (Figura 9). También se observó que la competitividad de las cepas introducidas fue elevada y varió desde 30 % (Manfredi) a 75 % (General Villegas) de ocupación nodular en el estrato 0-30 cm y de 14 % (Anguil) a 53 % (General Villegas) a profundidades mayores. A lo largo de los años, y como promedio general, la proporción de nódulos ocupados por las cepas introducidas disminuyó en el estrato de 0-30 cm de 57 % en la primera mitad del proyecto a 31 % en la segunda, mientras que a mayores profundidades la disminución fue de 42 % a 23 %, respectivamente. Este comportamiento podría indicar una mayor persistencia de los nódulos formados a partir de cepas naturalizadas, o bien una mayor disponibilidad y competitividad de estas últimas a través del tiempo.

En consecuencia, los resultados de productividad y de acumulación de nitrógeno así como también la proporción de este que proviene de la fijación biológica parecen ser la consecuencia de una combinación de la actividad de las cepas naturalizadas y las introducidas. Los datos del Proyecto PRONALFA permiten inferir que tanto las cepas naturalizadas como las introducidas han sido funcionales y eficientes en todos los sitios experimentales y a lo largo de todos los años de ensayo. La presencia de nódulos a profundidades superiores a 1 m sugiere que las bacterias podrían haber llegado hasta esos niveles arrastradas posiblemente por el agua. Con la única excepción de Barrow, probablemente debido a su condición de suelo poco desarrollado por la presencia de tosca subsuperficial, los alfalfares de todos los otros sitios exhibieron nódulos funcionales –y en algunos casos abundantes– aun a los cuatro años de implantados los cultivos.

De manera general, con el envejecimiento del cultivo comenzaron a hacerse evidentes problemas sanitarios en las raíces. Estos parecieron ser mayores en los suelos que presentaban una textura más arcillosa en profundidad que en aquellos de textura más gruesa. Paralelamente, se advirtió en los suelos una gran actividad biológica asociada con frecuencia a plagas y enfermedades de la alfalfa. A profundidades de 40 a 60 cm se observaron abundantes raíces muertas o en proceso de degradación, con evidencias de ataque –eventualmente secundario–

de hongos. Las plantas cuyas raíces fueron dañadas por gorgojos o corchosis y no pudieron llegar a la napa, no presentaron nódulos grandes en la corona y, en general, carecieron de nódulos en todo el perfil. No obstante, también se hallaron algunas raíces totalmente enfermas de las cuales surgían una o pocas raicillas, usualmente muy finas, que portaban uno o pocos nódulos de buen tamaño (Figura 10).



**Figura 9.** Porcentajes de nódulos formados con cepas introducidas (marcadas con resistencia a antibióticos) respecto del total de nódulos encontrados a profundidades de 0-30 cm (gráfico superior) y >30 cm (gráfico inferior) en la primavera de 1993 (C1P), en el otoño de 1994 (C10), en la primavera de 1994 (C2), en la primavera de 1995 (C3), en la primavera de 1996 (C4P), y en el otoño de 1997 (C40) en cinco localidades de la región Pampeana. Adaptado del Proyecto PRONALFA (Racca *et al.*, 2001).

Si bien lo descrito en el último párrafo no es la situación común y se acepta generalmente que las raíces enfermas generan menos nódulos que las sanas, las observaciones comentadas aportarían evidencias de que la duración de la simbiosis no sería la causa primera y probablemente ni siquiera una importante del decaimiento de los alfalfares y que la nodulación como fenómeno biológico se da aisladamente aun en plantas enfermas. Sin embargo, una raíz en estado sanitario deteriorado conlleva globalmente a una menor masa nodular y, como contrapartida, una raíz sana mantiene un sistema nodular activo y vigoroso hasta bien entrado el quinto año de vida del cultivo.

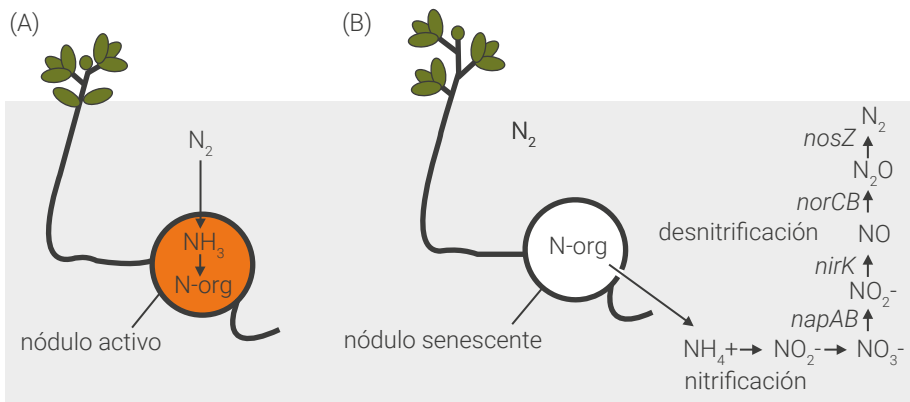


■ **Figura 10.** Raíz de alfalfa de 3 años de vida que pese a sus evidentes signos de deterioro presenta algunas raicillas con nódulos activos y de gran tamaño.

## Inoculantes para la producción de alfalfa económica y ambientalmente sustentable

Durante el proceso de FBN, y tal como se describió en la introducción, los rizobios pueden realizar en los nódulos activos una respiración de tipo aeróbica con el fin de reducir el nitrógeno ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4^+$ ); pero cuando el nódulo alcanza la senescencia, estos microorganismos se encuentran en un ambiente de baja tensión de oxígeno (debido a su lejanía con la superficie de la tierra) y alto contenido de nitrógeno. En estas condiciones, para seguir siendo capaces no solo de sobrevivir sino

también de multiplicarse e infectar nuevos nódulos, los rizobios deben poder realizar una respiración de tipo anaeróbica, proceso que se conoce como desnitrificación. La desnitrificación se considera total cuando las moléculas de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) se van reduciendo sucesivamente a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y finalmente nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ). Algunas cepas de *E. meliloti*, como por ejemplo la cepa modelo *E. meliloti* 1021, son capaces de realizar la desnitrificación en forma completa liberando  $\text{N}_2$  al medioambiente (Figura 11). Estas cepas resultan inocuas para el ambiente, dado que este gas es el que se encuentra en mayor proporción en la atmósfera y no tiene efectos conocidos sobre la capa de ozono o sobre el calentamiento global.



■ **Figura 11.** Esquema de las principales transformaciones de los compuestos nitrogenados en leguminosas mediadas por los rizobios inoculados. (A) Fijación biológica de nitrógeno; y (B) Nitrificación, donde el nitrógeno orgánico ( $\text{N-org}$ ) se transforma en amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), seguida de desnitrificación, donde el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) se transforma en nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ). Se muestra al menos un gen estructural presente en cada uno de los complejos enzimáticos relacionados con las reacciones de reducción de compuestos nitrogenados durante el proceso de desnitrificación. Durante este proceso, los complejos nitrato (NAP), nitrito (NIR), óxido nítrico (NOR) y óxido nitroso (NOS) reductasa transforman el  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{N}_2$ .

Sin embargo, no todas las cepas de *E. meliloti* son capaces de realizar la desnitrificación en forma completa. Por ejemplo, las cepas comerciales *E. meliloti* B399 y B401, que son las más ampliamente utilizadas como bioinoculantes en varios países productores de alfalfa, conservan la capacidad de producir  $\text{N}_2\text{O}$  pero no de reducir el  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$  (Brambilla *et al.*, 2018). Por este motivo, liberan a la atmósfera  $\text{N}_2\text{O}$  un poderoso gas de

efecto invernadero capaz de degradar la capa de ozono y cuya actividad en este sentido es incluso más de 300 % mayor que la del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Estas diferencias entre las cepas comerciales y las no comerciales se pudieron explicar luego de la secuenciación de los genomas de las cepas comerciales *E. meliloti* B399 y B401 (Jozefkowicz *et al.*, 2017; Jozefkowicz *et al.*, 2018) y de un exhaustivo análisis de sintenia entre estas cepas y la cepa modelo *E. meliloti* 1021 (Brambilla *et al.*, 2018). Se identificaron al menos cuatro agrupamientos (*clusters*) de genes responsables de que el proceso de desnitrificación se realice de manera completa, y que se denominan *clusters* NAP, NIR, NOR y NOS.

Por un lado, en las cepas comerciales respecto a las cepas modelo, se observó una delección de 15 Kb en el cluster NOS (nosRZDFYLX) (Figura 12). Este *cluster*, que codifica para la síntesis del complejo óxido nítrico reductasa, está asociado a la reducción de N<sub>2</sub>O a N<sub>2</sub>. Es importante destacar que este paso resulta clave para llevar a cabo el proceso de desnitrificación en forma completa ya que en ausencia del complejo óxido nítrico reductasa el aceptor final de electrones en el proceso es el óxido nítrico; por lo tanto, estas cepas comerciales resultan nocivas para el medioambiente.

Por otro lado, se observó un 100 % de identidad nucleotídica entre las cepas comerciales y la cepa modelo en la región genómica que codifica para la nitrato (NAP), nitrito (NIR) y óxido nítrico (NOR) reductasas, que participan de la reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a partir de N<sub>2</sub>O. Además, estos tres clusters se encuentran colocalizados en el megaplásmido A en todas las cepas mencionadas (Brambilla *et al.*, 2018) (Figura 13).

Si bien la identidad aminoacídica de las proteínas para las cuales codifican los genes de la región NAP-NIR-NOR es mayor al 98 % entre cepas de *E. meliloti*, se encontró que la proteína nitrato reductasa (NapC) presenta una identidad menor al 96 % entre la cepa modelo *E. meliloti* 1021 y nuevos aislamientos de rizobios naturales de *E. meliloti* (Tabla 4). Las proteínas NapC de estos nuevos aislamientos (llamados INTA1-6) muestran bajos niveles de identidad aminoacídica (48,0-93,4 %) y de cobertura (39,0-96,1 %) con respecto a la proteína NapC codificada por la cepa modelo (Brambilla *et al.*, 2019).





Por un lado, con el objetivo de evaluar si las diferencias encontradas a nivel genético y molecular generan un impacto en el fenotipo de emisión de N<sub>2</sub>O de estas cepas, se llevaron a cabo ensayos de microcosmos utilizando tierra no estéril inoculada con las cepas de *E. meliloti* arriba mencionadas (Tabla 5). Interesantemente, las emisiones de óxido nitroso registradas para las cepas INTA1-6 resultaron ser entre uno y dos órdenes de magnitud menores que las cuantificadas para las cepas que presentan en su genoma el *cluster* NOS (cepas NOS+, por ejemplo, la cepa modelo 1021) o no lo presentan (cepas NOS-, por ejemplo, la cepa comercial B399), respectivamente (Brambilla *et al.*, 2019).

■ **Tabla 4.** Análisis de la similitud de las proteínas de desnitrificación provenientes de las cepas INTA1-6 con respecto a la cepa modelo 1021. En esta tabla, las similitudes se expresan como porcentajes de identidad aminoacídica con respecto a la cepa modelo 1021. En gris se destacan las únicas proteínas que tienen <98 % de identidad aminoacídica. Como control adicional se incluyó a la cepa comercial B399, la cual posee el *cluster* NOS deletado, pero los *cluster* NAP, NIR y NOR intactos. Es interesante señalar que las cepas INTA 1-6 corresponden a aislamientos de rizobios naturales provenientes de distintas provincias de la Argentina (Santa Fe, Chaco, Buenos Aires, San Luis, Córdoba y La Pampa, respectivamente).

Cepas	Nos								Nap					Nir			Nor				
	R	Z	D	F	Y	L	X	C	B	A	D	F	E	V	K	D	Q	B	C	E	
1021	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
B399	Delección 15-kb (ver Figura 11)							99.6	100	98.9	100	98.2	100	99.0	99.7	98.7	100	99.3	100	100	100
INTA-1	100	100	100	99.7	100	100	100	95.3	100	98.9	100	98.2	100	99.3	99.7	98.2	99.6	99.7	100	99.5	
INTA-2	100	100	100	99.7	100	100	100	64.8	98.8	98.9	100	98.2	100	99.0	99.7	98.2	99.6	99.7	100	99.5	
INTA-3	100	100	100	99.7	100	100	100	65.7	100	98.9	100	98.2	100	99.0	99.7	98.2	99.6	99.7	100	99.5	
INTA-4	100	100	100	100	100	100	100	76.2	100	100	100	100	100	100	99.8	100	100	100	100	100	
INTA-5	98.5	99.7	100	99.3	99.3	98.4	98.5	93.4	100	98.9	100	98.2	100	99.0	99.5	98.6	100	99.3	99.3	100	
INTA-6	100	100	100	99.7	100	100	100	48.0	100	100	100	100	100	100	99.8	100	100	100	100	100	

Por otro lado, al analizar los efectos de la inoculación de estas cepas sobre el crecimiento y la formación de nódulos en cultivos hidropónicos de alfalfa tras 40 días de crecimiento en invernáculo, se observó que

todas las plantas de alfalfa inoculadas con los rizobios INTA1-6 mostraron un crecimiento vigoroso (Figura 14a), similar al observado en el control inoculado con la cepa comercial B399. Más importante aún, no se observaron diferencias de productividad (Figura 14b) ni de nódulos totales (Figura 14c) entre las plantas tratadas con el inoculante comercial B399 y las cepas INTA4-6.

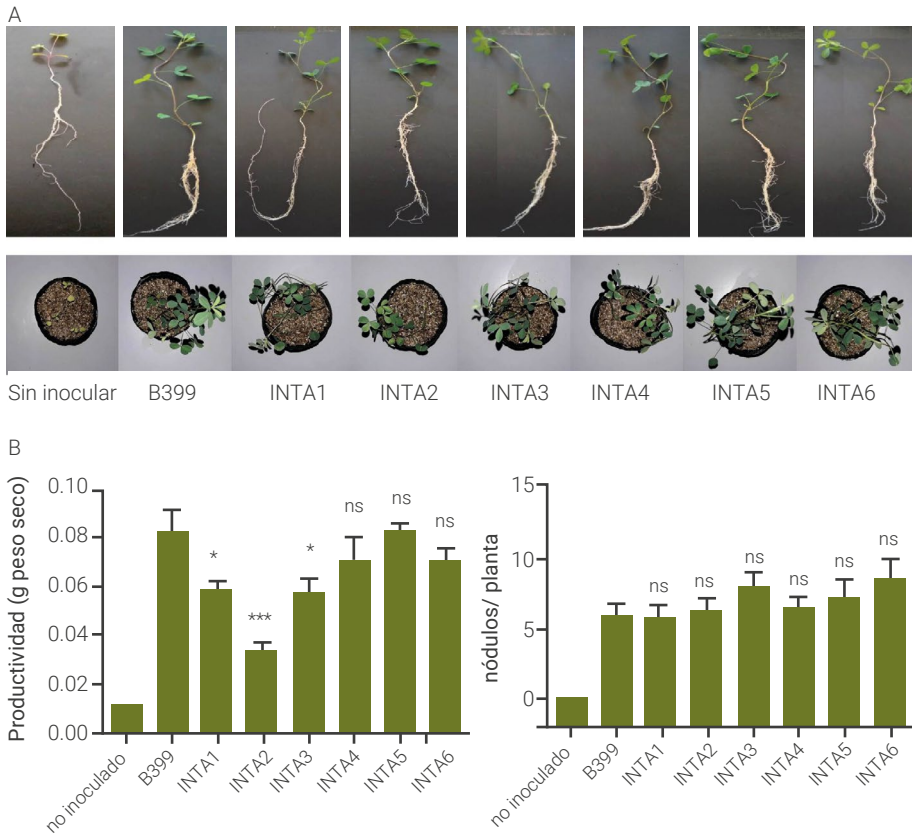
■ **Tabla 5.** Producción de N<sub>2</sub>O en suelo inoculado con rizobios de alfalfa. Los valores representan la media ± el error estándar de tres mediciones independientes. Se analizó el perfil de emisión de óxido nitroso de nuevos aislamientos de rizobios (cepas INTA 1-6), de la cepa comercial B399, de la cepa modelo 1021 y de la cepa B399C (que es la cepa B399 transformada con el cósmido pYC7 para contener el *cluster* NOS completo de la cepa modelo *S. meliloti* JJ1c10) (Chan y McCormick, 2004). Como control se determinó la presencia del gen *nosZ* (gen que codifica para una proteína esencial en el complejo óxido nitroso reductasa) mediante PCR. En la tabla también se indica el origen de cada una de las cepas evaluadas.

Cepa	mg N <sub>2</sub> O / kg suelo	PCR para el gen <i>nosZ</i>	Origen
1021	0,93 ± 0,11	+	Hertfordshire, Reino Unido
B399	9,27 ± 1,86	-	Wisconsin, EUA
B399C	1,26 ± 0,25	+	Cepa recombinante
INTA-1	0,03 ± 0,02	+	Santa Fe, Argentina
INTA-2	0,06 ± 0,03	+	Chaco, Argentina
INTA-3	0,05 ± 0,01	+	Buenos Aires, Argentina
INTA-4	0,06 ± 0,02	+	San Luis, Argentina
INTA-5	0,08 ± 0,01	+	Córdoba, Argentina
INTA-6	0,04 ± 0,03	+	La Pampa, Argentina

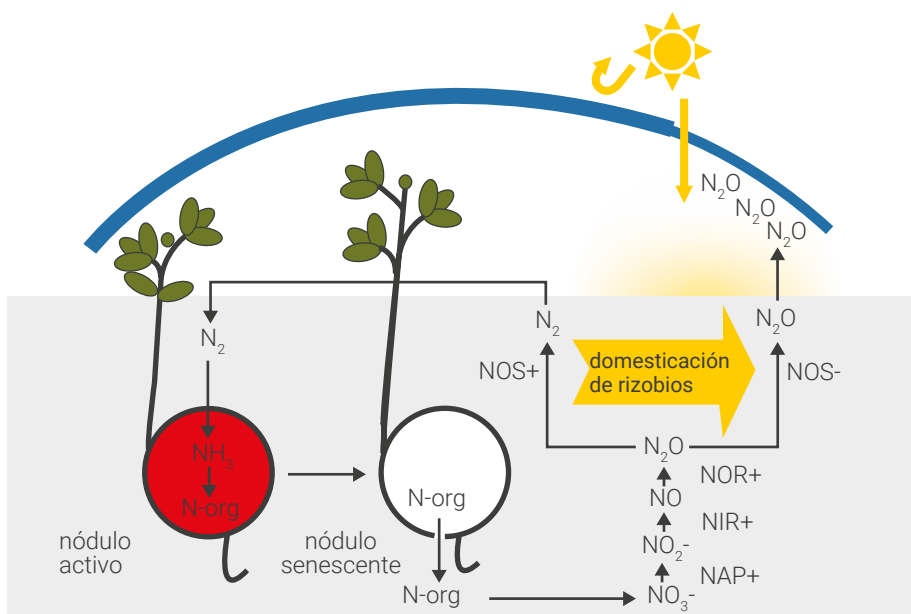
Estos datos indican que los nuevos aislamientos de rizobios de *E. meliloti* (INTA1-6) representan una alternativa atractiva a los inoculantes de alfalfa actuales, tanto desde el punto de vista económico como ambiental, ya que conjugan alta eficiencia de fijación de nitrógeno y bajo daño ambiental. Teniendo en cuenta además las diferencias genómicas halladas entre las cepas *E. meliloti* INTA1-6, las cepas comerciales B399 y B401 y la cepa modelo podemos concluir que la integridad de los cuatro *clusters* (NAP, NIR, NOR y NOS) y en particular ciertas mutaciones es-

pontáneas en el gen *napC* permiten a los rizobios no solo realizar una desnitrificación en forma completa sino además emitir bajos niveles de óxido nitroso a la atmósfera. Es interesante señalar que las proteínas truncadas de *NapC* derivan de diferentes alteraciones de dicho gen, que se originan durante el proceso de transcripción cuando las cepas de *S. meliloti* son cultivadas en condiciones de desnitrificación (con baja tensión de oxígeno), momento en que este gen sería particularmente susceptible a mutaciones (Brambilla *et al.*, 2019).

En forma contraria, la presencia de los *clusters* NAP, NIR, NOR y la ausencia del cluster NOS en las cepas comerciales actualmente utilizadas para inocular alfalfa llevan a un proceso de desnitrificación incompleta con el consecuente incremento de la producción neta de  $N_2O$  en lotes de alfalfa. Los inoculantes comerciales B399 y B401 corresponden respectivamente a aislamientos realizados en la década de 1960 en los Estados Unidos y de 1990 en la Argentina, fechas en las que aún no había emergido el cambio climático como un problema de relevancia; por lo tanto, en ese momento no solo no se tenían en consideración las emisiones de óxido nitroso, sino que tampoco se contaba con técnicas de secuenciación de genomas a relativamente bajo costo, como en la actualidad. Es interesante señalar que los cuatro clusters que desempeñan un rol clave en el proceso de desnitrificación completa (NAP, NIR, NOR y NOS) se encuentran en un mismo replicón (megaplásmido A) en el genoma de los rizobios; no obstante, el cluster NOS no se encuentra colocalizado con los cluster NAP, NIR, NOR (Brambilla *et al.*, 2018). Esta particularidad probablemente resultó determinante para el proceso de evolución independiente de estos clusters y para la pérdida completa del cluster NOS durante la domesticación (selección artificial) de las cepas comerciales B399 y B401 a lo largo de los años. En conclusión, durante el proceso de domesticación, las cepas utilizadas actualmente para inocular alfalfa a nivel comercial conservaron su capacidad de fijar nitrógeno en forma eficiente, pero perdieron su habilidad para degradar el  $N_2O$  (Figura 15). Estas evidencias resaltan el riesgo medioambiental que conlleva la domesticación de bacterias promotoras del crecimiento y la necesidad de reevaluar los bioinoculantes comerciales para mitigar las emisiones de óxido nitroso en los cultivos de alfalfa.



**Figura 14.** Efectos de la inoculación con las cepas INTA1-6 sobre el crecimiento de la alfalfa. (A) Vista general del crecimiento de las plantas de alfalfa sin inocular e inoculadas con la cepa comercial B399 y las cepas INTA1-6 en medio hidropónico sobre un sustrato inerte (vermiculita) y regado con un medio mínimo sin nitrógeno (INTA13), en el cual la productividad es directamente proporcional al nitrógeno fijado. (B) Análisis de la productividad y del número de nódulos (a) de las plantas de alfalfa. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar, con un  $n = 5$ , donde  $n = 1$  representa el promedio de los valores obtenidos de tres plantas individuales creciendo en la misma maceta. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA seguido por contrastes de Tukey ( $ns =$  no significativo,  $* p < 0,05$ ,  $** p < 0,01$ ,  $*** p < 0,001$ ). Las comparaciones estadísticas se llevaron a cabo entre el tratamiento B399 contra el resto de los tratamientos de inoculación (INTA1-6). El tratamiento sin inocular fue utilizado como control de la ausencia de rizobios en el sustrato.



■ **Figura 15.** Probable riesgo ambiental de la domesticación de los rizobios. Como se describió en la Figura 11, parte del  $N_2$  fijado durante la simbiosis ( $N\text{-org}$ ) puede volver a la atmósfera mediante un proceso de desnitrificación que convierte el  $NO_3^-$  en  $N_2$ . Este proceso es mediado en parte por los rizobios  $NAP+$ ,  $NIR+$ ,  $NOR+$ ,  $NOS+$  liberados del nódulo senescente. Sin embargo, para el caso de las cepas comerciales utilizadas en alfalfa, el proceso de domesticación de los rizobios puede conducir a una conservación de la maquinaria relacionada con la producción de  $N_2O$  ( $NAP+$ ,  $NIR+$ ,  $NOR+$ ) y a una pérdida de los factores asociados a la degradación del  $N_2O$  ( $NOS-$ ), lo que podría conducir al aumento de las emisiones de  $N_2O$  al ambiente.

## Consideraciones finales

Como resumen de todo lo observado en el Proyecto PRONALFA puede decirse que tanto los rizobios preexistentes en el suelo (naturalizados) como los aportados por la inoculación fueron capaces de formar nódulos funcionales y eficientes en todos los sitios experimentales y a lo largo del ciclo de cultivo. Se observó la presencia de nódulos activos en raíces creciendo hasta profundidades superiores a 1,10 m. Las cepas aportadas por el inoculante formaron, en promedio, el 50 % del total de los nódulos recolectados durante las dos primeras campañas y el 27 % durante las

dos últimas. Dentro de un amplio rango de producción anual de forraje, el promedio general de N derivado de la FBN representó el 53 % del total de N utilizado por el cultivo. Cuando no se presentan limitaciones ambientales (especialmente sequías) muy marcadas, por cada 1000 kg de MS de alfalfa se incorporan aproximadamente 20 kg de N provenientes de la atmósfera. En ese contexto, la cantidad promedio de N derivado de la FBN, medida en la biomasa aérea, fue de 235 kg de N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, con máximos de 426 y mínimos de 113 kg de N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. La cantidad promedio de N derivado de la FBN, calculada en función de la biomasa total, aérea y radical, fue de 350 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, con máximos de 639 y mínimos de 169 kg de N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Racca *et al.*, 2001).

En líneas generales, se puede concluir que en la región Pampeana el sistema de FBN en alfalfa funciona aportando un porcentaje muy significativo del total del N requerido por el cultivo a lo largo de todo su ciclo de vida. Sin embargo, la sustentabilidad a largo plazo del sistema agropecuario debe considerar tanto el impacto económico como ambiental de los bioinoculantes utilizados en la actualidad, dado que el proceso de selección de cepas por mayor eficiencia de FBN ha afectado su capacidad para reducir el NO<sub>2</sub> a N<sub>2</sub>, con el consiguiente impacto en la emisión de gases de marcado efecto invernadero. En función de ello, se propone que los futuros programas de selección y evaluación de rizobios fijadores de nitrógeno consideren la conservación de la capacidad de efectuar una completa desnitrificación (hasta la producción de N<sub>2</sub>) para, de esta forma, conservar su original inocuidad ambiental. Por último, si bien esta descripción esta basada en el caso de la alfalfa y sus rizobios, se podría extrapolar a otros cultivos de leguminosas, como por ejemplo soja y maní.

## BIBLIOGRAFÍA

BALL, J. A.; G. TENEYCK. 1980. *Top management on irrigated alfalfa produces top yields. Better Crops Plant Food* 64: 16-19.

BICKOFF, E.M.; G.O. KOHLER; S. SMITH. 1972. *Chemical Composition of Herbage. En: HANSON, C.H. (ed.). Alfalfa Science and Technology. Chapter 12. Agronomy Series N.º 15, ASA. Madison, WI, EUA. 247-282 pp.*

BRAMBILLA, S.; R. FRARE; G. SOTO; C. JOZEFKOWICZ; N. AYUB. 2018. *Absence of the nitrous oxide reductase gene cluster in commercial alfalfa inoculants is probably due to the extensive loss of genes during rhizobial domestication. Microb. Ecol.* 76(2):299-302. doi: 10.1007/s00248-018-1145-9

BRAMBILLA, S.; G. SOTO; A. ODORIZZI; V. AROLFO; W. MCCORMICK; E. PRIMO; W. GIORDANO; C. JOZEFKOWICZ; N. AYUB. 2019. *Spontaneous mutations in the nitrate reductase gene napC drive the emergence of eco-friendly low-N<sub>2</sub>-emitting alfalfa rhizobia in regions with different climates. Microb Ecol.* 2019 Dec 11. doi: 10.1007/s00248-019-01473-w

CHAN, Y.K.; W.A. MCCORMICK. 2004. *Experimental evidence for plasmid-borne *nir* genes in *Sinorhizobium meliloti* JJ1c10. Can. J. Microbiol.* 50:657-667. <https://doi.org/10.1139/w04-062>

COLLINO, D.; J. DARDANELLI; L. DE LUCA; R.W. RACCA. 2005. *Temperature and water availability effects on radiation and water use efficiencies in alfalfa. Aust. J. Exp. Agric.* 45 (4): 383-390.

DA, H.N.; S.P. DENG. 2003. *Survival and persistence of genetically modified *Sinorhizobium meliloti* in soil. Applied Soil Ecology* 22: 1-14.

DEL PAPA, M.F.; M. PISTORIO; L. BALAGUÉ; C. WEGENER; A. PERTICARI; K. NIEHAUS; A. LAGARES. 2003. *A microcosm study on the influence of pH and the host plant on the soil persistence of different alfalfa-nodulating rhizobia. Biology and Fertility of Soils* 39: 112-116.

DUSHA, I. 2002. *Nitrogen control of bacterial signal production in *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. Indian J. Exp. Biol.* 40(9): 981-988.

GALIBERT, F.T.; M. FINAN; S.R. LONG, A. PÜHLER, P. ABOLA; F. AMPE; F. BARLOYHUBLER, M.; J. BARNETT; A. BECKER, P. BOISTARD. 2001. *The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science* 293: 668-672.

HEICHEL, G.H.; C.P. VANCE; D.K. BARNES. 1983. *Symbiotic nitrogen fixation of alfalfa, birdsfoot trefoil and red clover. En: SMITH, J.A.; V.W. HAYS (eds.). Proc. 14th Int. Grassl. Congr. Westview Press, Boulder, CO, EUA. 336-339 pp.*

HEICHEL, G.H.; C.P. VANCE; D.K. BARNES; K.I. HENJUM. 1984. *Dinitrogen fixation and N and dry matter partitioning during a four year alfalfa stand. Crop. Sci.* 25: 101-105.

HIRSCH, A.M.; M.R. LUM; J.A. DOWNIE. 2001. *What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? Plant Physiol.* 127: 1484-1492.



HOWARTH, R.E. 1988. *Antiquity Factors and Nonnutritive Chemical Components*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL, Jr. (eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agronomy Series N.º 29, Cap.15. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, EUA. 493-514 pp.

JOZEFKOWICZ, C.; S. BRAMBILLA; R. FRARE; M. STRITZLER; C. PICCINETTI; M. PUENTE; C.A. BERINI; P.R. PÉREZ; G. SOTO; N. AYUB. 2017. *Stable symbiotic nitrogen fixation under water-deficit field conditions by a stress-tolerant alfalfa microsymbiont and its complete genome sequence*. *J Biotechnol* 10: 263:52-54. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.10.007

JOZEFKOWICZ, C., S. BRAMBILLA; R. FRARE; M. STRITZLER; M. PUENTE; C.; PICCINETTI, G. SOTO; N. AYUB. *Microevolution rather than large genome divergence determines the effectiveness of legume-rhizobia symbiotic interaction under field conditions*. 2017. *J Mol. Evol.* 85(3-4):79-83. doi: 10.1007/s00239-017-9808-6

PISTORIO, M.; L. BALAGUÉ; M.F. DEL PAPA; A. PICH OTERO; A. LODEIRO; D. HOZBOR; A. LAGARES. 2002. *Construction of a Sinorhizobium meliloti strain carrying a stable and non transmissible chromosomal single copy of the green fluorescent protein GFP-P64L/S64T*. *FEMS Microbiol. Letters* 214: 165-170.

RACCA, R.W.; D. COLLINO; J. DARDANELLI; D. BASIGALUP; N. GONZÁLEZ; E. BRENZONI; N. HEIN; M. BALZARINI. 2001. *Contribución de la Fijación Biológica del Nitrógeno a la nutrición nitrogenada de la alfalfa en la Región Pampeana*. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. 56 p.

RENNIE, R.J.; E.A. RENNIE; M. FRIED. 1978. *Concepts of 15N usage in dinitrogen fixation studies*. *Isotopes in Biological Dinitrogen Fixation Conference*. IAEA, Viena, Austria.

ROMERO, N.A.; C. BARIGGI; G. SCHENKEL. 1977. *Exploración de deficiencias nutritivas para la alfalfa en suelos pampeanos mediante ensayos de campo*. INTA Anguil. Proyecto FAO-INTA Argentina 75/006. Documento de Trabajo N.º 3, 76 p.

ROSSANIGO, R.; M.C. SPADA; O. BRUNO. 1995. *Evaluación de cultivares de alfalfa y panorama varietal en la Argentina*. En: HIJANO, E.H.; A. NAVARRO (eds.). *La alfalfa en la Argentina*, Cap. 4. INTA. Enc. Agro de Cuyo, Manual N.º 11. Editar, San Juan, Argentina. 63-78 pp.

ROTH, R.L.; B. GARNER; G. TRITZ; E. LAKATOS. 1983. *Alfalfa response to water and nitrogen variables*. *13th California Alfalfa Symposium*. Cal. Coop. Ext. Serv., University of California-Davies, EUA.

STOUGAARD, J. 2000. *Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development*. *Plant Physiol.* 124: 531-540.

TIMMERS, A.C.; E. SOUPENE; M.C. AURIAC; F. DE BILLY; J. VASSE; P. BOISTARD; G. TRUCHET. 2000. *Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13(11): 1204-13.

VANCE, C.P. 1978. *Nitrogen fixation in alfalfa: an overview*. *Proc 8th Annu. Alfalfa Symp.* 34-41 pp.

VANCE, C.P.; G.G. HEICHEL; D. PHILLIPS. 1988. *Nodulation and Symbiotic Dinitrogen Fixation*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL, Jr. (eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agronomy Series N.º 29, Cap. 7. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, EUA. 229-257.



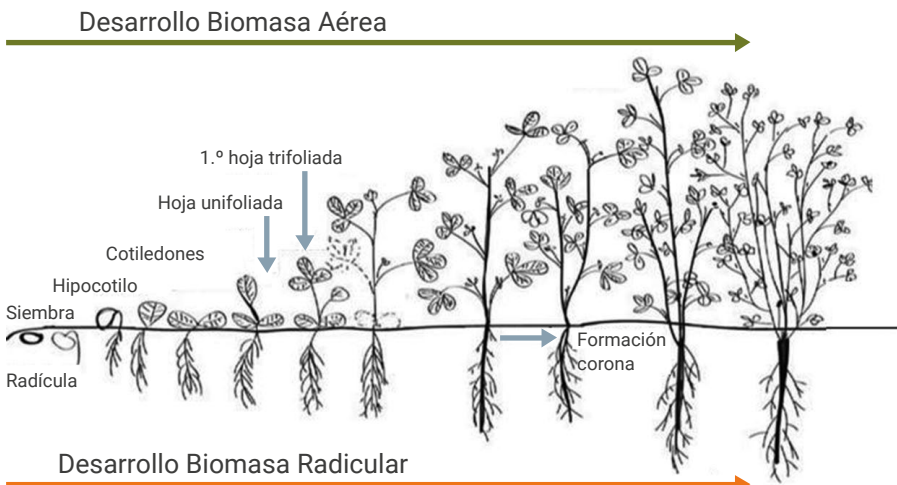
## CAPÍTULO 5

Establecimiento de alfalfa:  
aspectos ecofisiológicos y agronómicos

Silvia Olivo y Juan Mattera

## Fenología del cultivo y respuesta a variables ambientales

La ontogenia de la alfalfa puede ser descrita en dos fases: I) estado de plántula-establecimiento y II) rebrotes (Figura 1). La primera fase es el período que va desde la germinación, la emergencia y el establecimiento del cultivo hasta la primera utilización (Moot *et al.*, 2001; Undersander *et al.*, 2011). La segunda fase comprende los ciclos de crecimiento que ocurren entre el primer y el último corte o defoliación en la vida del cultivo. En este capítulo se tratarán únicamente los factores para considerar en la fase de establecimiento del cultivo, que impactarán a su vez en su productividad y persistencia (Fick *et al.*, 1988).



■ **Figura 1.** Fenología del cultivo de alfalfa. Primera fase del desarrollo: estado de plántula-establecimiento.

Cuando las condiciones de humedad no son limitantes la temperatura es el principal factor que incide en la duración de las fases de desarrollo de la alfalfa (Christian, 1977). Una forma de expresar la relación entre la temperatura y el desarrollo de la planta es a través del cálculo del tiempo termal (TT), también conocido como grados día de crecimiento acumulado ( $^{\circ}\text{GDA}$ ) que se requieren entre dos estados de desarrollo (Arnold y Monteith, 1974). El modelo de cálculo para TT se basa en la sumatoria de la diferencia entre la temperatura media diaria ( $T_m$ ) y la temperatura base ( $T_b$ ) por debajo de la cual no hay desarrollo (Ritchie y Nesmith, 1991), lo que se representa en la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo Térmico (TT)} = \sum (\text{Tm} - \text{Tb})$$

El valor de  $T_b$  varía según la especie; para alfalfa es de 1 o 5 °C cuando la  $T_m$  es menor o mayor a 15 °C, respectivamente (Moot *et al.*, 2000). Para la germinación y la emergencia se considera la temperatura media del suelo a los 2 cm de profundidad. A partir de la primera hoja unifoliada, la temperatura media del aire será la que incidirá en el desarrollo (Teixeira *et al.*, 2011).

### Germinación

La semilla de alfalfa, como la mayoría de las semillas forrajeras, es de pequeño diámetro, lo que hace que la energía germinativa sea muy baja. En consecuencia, un establecimiento exitoso comienza con una rápida y pronta emergencia. Asumiendo un adecuado valor cultural de la semilla, la germinación y la emergencia están influenciadas por la temperatura y contenido de humedad del suelo y la concentración de sales (Fick *et al.*, 1988).

En alfalfa, la germinación ocurre cuando las semillas absorben 125 % de su peso en agua, por lo que el contenido de humedad del suelo determinará que el proceso pueda llevarse a cabo en mayor o menor tiempo (Triplett y Tesar, 1960; Undersander *et al.*, 2011). Además, la captura de agua por parte de la semilla será afectada por la concentración de sales en la cama de siembra. La presencia de niveles excesivos de algunos cationes puede resultar tóxica para la planta, afectando procesos metabólicos. Bertram *et al.* (2015), evaluando dos condiciones hídricas (capacidad de campo y seco) y cuatro suelos con diferentes conductividades eléctricas (CE) (0,2, 2,1, 3,9 y 8,7 dS.m<sup>-1</sup>), que representaban un gradiente de restricciones ambientales, concluyeron que –independientemente de la condición hídrica del suelo– cuando la CE fue  $\geq 8,7$  dS m<sup>-1</sup> las semillas no germinaron. También estimaron que hasta una concentración de 3,9 dS m<sup>-1</sup>, por cada unidad de incremento de la CE el porcentaje de germinación se reducía 6 % (rango: 0 a 8,7 dS m<sup>-1</sup>). Contenidos hídricos cercanos a la capacidad de campo favorecieron la producción de biomasa y altura, mientras que el déficit hídrico genera reducciones de ambas. Relacionado con esto, Allen *et al.* (1985) habían ya informado

durante la germinación diferencias en la tolerancia a la salinidad inducidas por la selección genética.

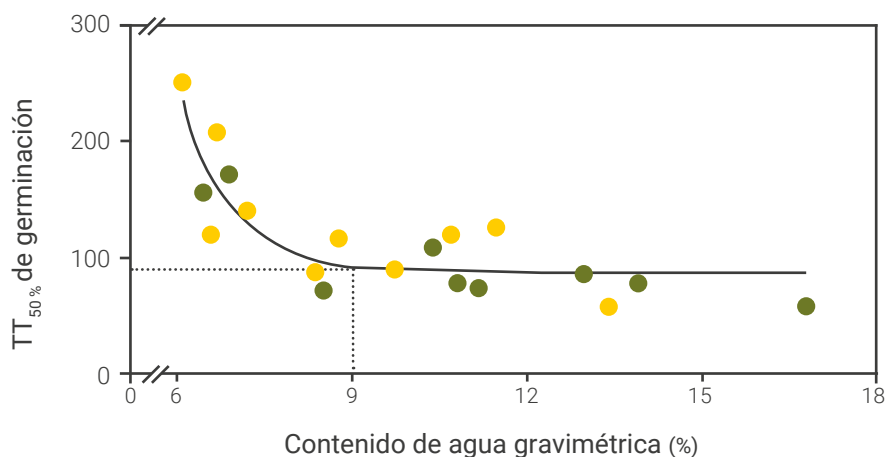
En alfalfa, los valores óptimos de  $T_m$  del suelo para la germinación se encuentran en el rango de 18-29 °C (Muller *et al.*, 2007). En ambiente controlado, la  $T_b$  se puede considerar cercana a 0 °C. En este sentido, Moot *et al.* (2001) estimaron valores de  $T_b = 0,9$  °C, necesitando 40°GDA para que germinara el 75 % de las plántulas. Algo similar fue registrado por Jungers *et al.* (2016), quienes considerando diversos cultivares y situaciones hídricas definieron valores de  $T_b$  entre 0,39 y 0,12 °C, lo que hizo que se necesitaran 25-30°GDA para lograr el 50 % de germinación de las semillas. Sin embargo, estos autores argumentan que existe una baja correlación entre los datos obtenidos en laboratorio y lo que sucede a campo. Muller *et al.* (2007), trabajando en condiciones de campo, señalaron que cuando la  $T_m$  del suelo fue de 4 °C, el 50 % de las plántulas tardaron 6 días en germinar, mientras que cuando  $T_m$  del suelo fue de 18 °C los días requeridos se redujeron a dos. De esto se podría inferir que si se considera una  $T_b = 0$  °C, los GDA necesarios para que germine el 50 % de las plántulas serían de 24 a 36°GDA para 4 °C y 18 °C, respectivamente.

### *Emergencia*

La emergencia es el momento en que los cotiledones de la plántula de alfalfa son visibles y se encuentran totalmente desplegados (Figura 1). Este es un proceso fisiológico complejo que depende de la temperatura y del contenido hídrico de la cama de siembra (Watt *et al.*, 2011). Generalmente, temperaturas de 18 a 29 °C serían adecuadas para lograr una rápida emergencia del cultivo (Muller *et al.*, 2007). Además, es importante remarcar que temperaturas menores a -4,4 °C durante cuatro horas incrementan la mortalidad de las plántulas (Undersander *et al.*, 2011).

Ta *et al.* (2016) evaluando diferentes grados de reposo invernal (GRI 2, 5 y 10) señalaron que las plántulas necesitaron en promedio 260°GDA ( $T_b = 1$  °C) para alcanzar 50 % de emergencia. Sin embargo, Sim (2014) evaluando dos tipos de suelos, uno con alta y otro con baja capacidad de retención de agua observó que el TT requerido para la emergencia se incrementó exponencialmente de 90 a 250°GDA ( $T_b = 1$  °C) cuando el

contenido volumétrico de agua pasó de 9 a 6 % (Figura 2). Esto evidenciaría que cuando el suelo disponga de menor humedad se producirá un incremento en el TT para lograr el 50 % de emergencia de las plántulas. Este autor también señaló que contando a partir de la emergencia la primera hoja unifoliada se produjo en promedio a los 190°GDA ( $T_b = 1\text{ }^\circ\text{C}$ ) y la aparición de la primera hoja trifoliada alrededor de los 170-180°GDA después de la hoja unifoliada.



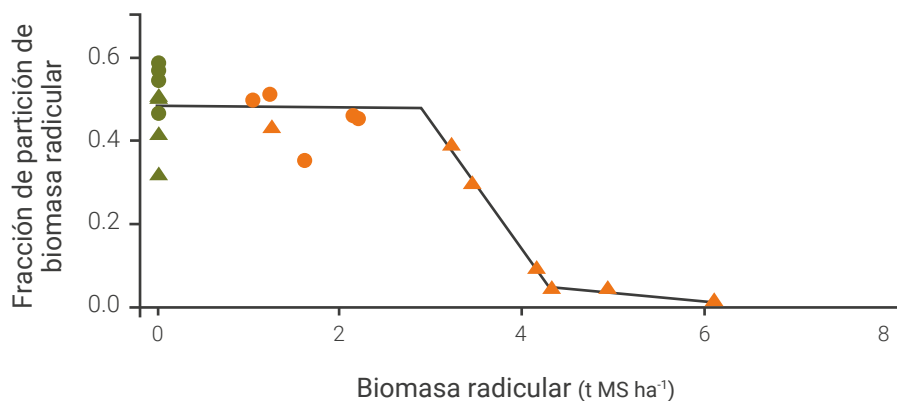
■ **Figura 2.** Tiempo Térmico requerido para alcanzar el 50 % de germinación (TT 50 % de germinación) en relación con el contenido de agua gravimétrica (%) del suelo para un cultivar de alfalfa de GR 5. Canterbury, Nueva Zelanda. Adaptado de Sim (2014).

### Establecimiento

Heichel *et al.* (1988) propusieron que el proceso de partición de fotoasimilados supone el transporte de estos (fuente) hacia los diferentes sitios u órganos de utilización (destinos). Por su parte, Cralle (1983) ya había sugerido que los destinos de los fotoasimilados variaban según el estadio de desarrollo del cultivo. Por un lado, durante el establecimiento, la biomasa radicular (raíz + corona) es el principal órgano de destino, existiendo así una prioridad de acumulación de biomasa radicular por sobre la biomasa aérea (hojas + tallos) (Khaiti *et al.*, 1992; Sim, 2014; Teixeira *et al.*, 2011; Thiébeau *et al.*, 2011). Por otro lado, la tasa de crecimiento del cultivo aumentará linealmente cuando la  $T_m$  aire es cercana a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  y disminuirá a cero cuando la  $T_m$  es mayor a  $40\text{ }^\circ\text{C}$  (Moot *et al.*, 2001).

Relacionado con lo anterior, Sim *et al.* (2015) establecieron que el período de establecimiento del cultivo abarca desde la siembra del cultivo hasta una acumulación promedio de 5 t MS ha<sup>-1</sup> de biomasa radicular. También señalaron que la fracción de partición que se envía hacia la raíz varía a lo largo de la fase de establecimiento hasta que el cultivo alcanza las 3 t MS ha<sup>-1</sup>, la fracción de partición hacia la raíz es cercana a una proporción de 0,5; a partir de allí, comienza a disminuir linealmente hasta alcanzar las 5 t MS ha<sup>-1</sup> (Figura 3). Valores similares de partición fueron informados por Khaiti y Lemaire (1992), Thiébeau *et al.* (2011) y Ta *et al.* (2016).

Sim *et al.* (2015) establecieron que el proceso de partición es independiente de la ontogenia del cultivo, es decir, que, dependiendo de las condiciones ambientales del establecimiento, esto es retrasos en la fecha de siembra, condiciones de humedad del suelo y otras situaciones, puede extenderse más allá de la primera defoliación en floración. En este trabajo, los autores concluyeron que en la medida en que se retrasó la fecha de siembra y que disminuyeron las condiciones de capacidad de retención de agua en el suelo, la fase de implantación se incrementó de cuatro a nueve meses, lo que se relacionó con una disminución de rendimiento durante la segunda temporada de crecimiento.



■ **Figura 3.** Fracción de la partición biomasa radicular durante el establecimiento (símbolos verdes) y rebrotes (símbolos naranjas) en relación biomasa radicular (t MS ha<sup>-1</sup>) al inicio del ciclo de crecimiento para un cultivar de alfalfa GR 5, en diferentes fechas de siembra y creciendo en un suelo con bajo, alta (Δ) y baja (O) capacidad de retención de agua. Canterbury, Nueva Zelanda. Adaptado de Sim *et al.* (2015).



Durante el período de establecimiento la producción de biomasa aérea es menor y el cultivo requiere mayor tiempo térmico para florecer que el necesario entre sucesivos rebrotes. De acuerdo con Teixeira *et al.* (2011), ese mayor tiempo térmico para florecer sería explicado, al menos en parte, por la prioridad de los destinos en este momento (raíces), lo que determina una tasa de expansión foliar de un 40 % más lenta y un mayor TT requerido para la aparición de una hoja (filocrono): 47 vs. 35°CDA en el período de establecimiento y en los rebrotes, respectivamente.

Basado en todo lo anterior, se concluye que -como se tratará más adelante- las fechas de siembra realizadas en suelos con menores temperaturas y menores contenidos hídricos impactarán negativamente en el rápido establecimiento del cultivo.

## Pautas de manejo agronómico para el establecimiento de alfalfa

El éxito en el establecimiento del cultivo reside principalmente en planificar una adecuada siembra. Una medida disponible para definir el correcto establecimiento de las pasturas es la eficiencia de implantación, que se define como el cociente entre la cantidad de plántulas logradas sobre la cantidad de semillas viables sembradas, estimado después de una cantidad determinada de días desde la siembra, como por ejemplo a los 30, 60 o 90 días. Relevamientos realizados en la región Pampeana evidenciaron valores de eficiencia de implantación a los 90 días de la siembra que oscilaban entre 40 y 50 % (CREA, 2015). Estos valores son considerados bajos, dado que en el mismo trabajo y en el realizado por Odorrizzi *et al.* (2017a) se informan casos en los que la eficiencia rondó el 80 %.

En condiciones normales, el número de plantas de alfalfa irá disminuyendo progresivamente desde la emergencia hasta que el cultivo se establece. Esto se debe, primariamente a la competencia intraespecífica entre las plántulas por luz, agua y nutrientes que genera una mortalidad denso-dependiente y la muerte de las plántulas de menor tamaño (Gosse *et al.*, 1988; Park *et al.*, 2003). Sumado a esto existen también pérdidas de plantas por otros factores tales como enferme-

dades, daño de insectos, inadecuado control de malezas (competencia interespecífica), incorrecto manejo de la defoliación o corte, y otros (Lodge, 1991). Otro aspecto para considerar es que la alfalfa produce compuestos alelopáticos que generan autotoxicidad para la instalación de nuevas plantas de alfalfa en una población (stand) ya establecida (Chon *et al.*, 2006); esta situación torna difícil la resiembra natural en un lote de alfalfa o la intersiembra exitosa de alfalfa sobre alfalfa.

Por estas razones, el logro de un buen stand inicial de plantas es importante a fin de consolidar un cultivo que luego, con prácticas de manejo adecuadas, consiga potenciar la producción de biomasa por unidad de superficie. A continuación se detallarán aspectos de diversas prácticas del manejo agronómico que hacen a la consecución de un adecuado establecimiento del cultivo.

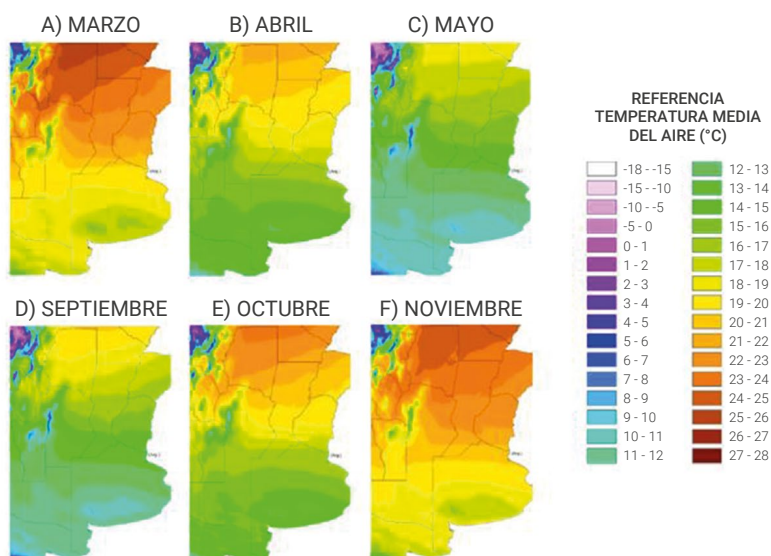
### *Fecha de siembra*

La fecha de siembra óptima será aquella que permita completar el estado de plántula y su posterior establecimiento bajo condiciones de temperatura, humedad y radiación adecuadas.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, la temperatura óptima para la germinación y la emergencia de la alfalfa se encuentra entre 18 y 29 °C (Muller *et al.*, 2007). Luego para el establecimiento, la tasa de crecimiento de la alfalfa aumenta linealmente, cuando la  $T_m$  aire es cercana a 30 °C y disminuye a cero cuando la  $T_m$  es mayor a 40 °C (Moot *et al.*, 2001). En consecuencia, considerando el promedio mensual de temperaturas del aire en la región central argentina (Figura 4), se concluye que para la mayor parte de la región en el mes de marzo se registran valores por encima de la temperatura óptima. A medida que se avanza en el otoño las temperaturas van disminuyendo hacia valores por debajo del óptimo, especialmente en el sur de la región, lo que puede limitar el desarrollo y el crecimiento de las plántulas (Figura 5) e incrementar la cantidad de días requeridos para alcanzar la suma térmica de cada fase fenológica.

Por lo tanto, la fecha de siembra óptima para la alfalfa en la región Pampeana es el otoño temprano (marzo y abril). En esta época, la temperatura del suelo a los 2 cm de profundidad es relativamente alta, lo

que posibilita que si el nivel de humedad del suelo es adecuado, se logre el necesario desarrollo radicular que permita posteriormente sobrellevar durante el primer verano del cultivo probables condiciones de sequía y de temperaturas elevadas. Para las condiciones de INTA Manfredi, las siembras de mayo y junio implicaron respectivamente reducciones del 30 % y 70 % en el rendimiento de forraje en relación con el obtenido con la siembra de abril (Figura 5). Por el contrario, y asumiendo que las condiciones de humedad lo permitan, hacia el norte de la región Pampeana la fecha de siembra puede demorarse dado que las temperaturas son más elevadas.



■ **Figura 4.** Isotermas mensuales en la región central de la República Argentina para los meses de siembras otoñales de alfalfa: A) marzo, B) abril, y C) mayo; y para los meses de siembras primaverales: D) septiembre, E) octubre y F) noviembre. Adaptado de Bianchi y Cravero (2010).

Por un lado, las siembras de primavera también son viables en Argentina. Sin embargo, en el mes de septiembre la mayor parte de los suelos de la región Pampeana se encuentra por debajo de las temperaturas óptimas y solo a medida que la estación avanza se van alcanzando los valores óptimos. Por otro lado, a medida que el verano se aproxima existen mayores probabilidades de que se produzcan deficiencias hídricas por mayor demanda de evapotranspiración y variabilidad en las precipitaciones, lo que haría exponer las plántulas a un estrés hídrico

durante el establecimiento. Sumado a ello, la presión que ejerce la competencia de las malezas aumenta considerablemente en la primavera dificultando aún más un adecuado establecimiento del cultivo.



■ **Figura 5.** Desarrollo radicular para tres fechas de siembra de un cultivo de alfalfa sin reposo invernal y en condición de secano en un ensayo conducido en INTA Manfredi durante 2019. Las siembras se realizaron en los meses abril (a), mayo (b) y junio (c) y los muestreos de plántulas en el mes de julio, es decir, a los 90, 60 y 30 días desde la siembra. El largo promedio de las raíces fue de 15-20 cm (a), 10 cm (b) y 3-5 cm (c).

A diferencia de lo señalado en el párrafo anterior, hay países como Nueva Zelanda donde las condiciones más favorables para la implantación del cultivo de alfalfa se ubican en la primavera. En esta época se registran temperaturas óptimas y el suelo cuenta con humedad almacenada de las precipitaciones de invierno (Jáuregui *et al.*, 2019). Por lo tanto, las siembras primaverales generan mayores rendimientos del cultivo durante el establecimiento y el primer año (Justes *et al.*, 2002; Moot *et al.*, 2012; Sim *et al.*, 2015; Jáuregui *et al.*, 2019). Sin embargo, Thiebeau *et al.* (2011) en Francia y Sim *et al.* (2015) en Nueva Zelanda mostraron que retrasar la fecha de siembra hacia fines de primavera o verano provoca reducciones del 60 % al 85 % del rendimiento de forraje durante el año de establecimiento, en comparación con las siembras de primavera temprana. Durante el segundo ciclo de crecimiento, estas disminuciones fueron del 20-25 %.

La conclusión de todo lo anterior es que, independientemente de la latitud en que se decida implantar el cultivo, la fecha de siembra óptima será aquella en que las condiciones de humedad, temperatura, radiación y competencia de malezas le permitan establecerse adecuadamente acumulando la biomasa radicular necesaria para lograr un alto rendimiento y una alta persistencia desde el primer ciclo productivo.

### *Elección del lote y cultivo antecesor*

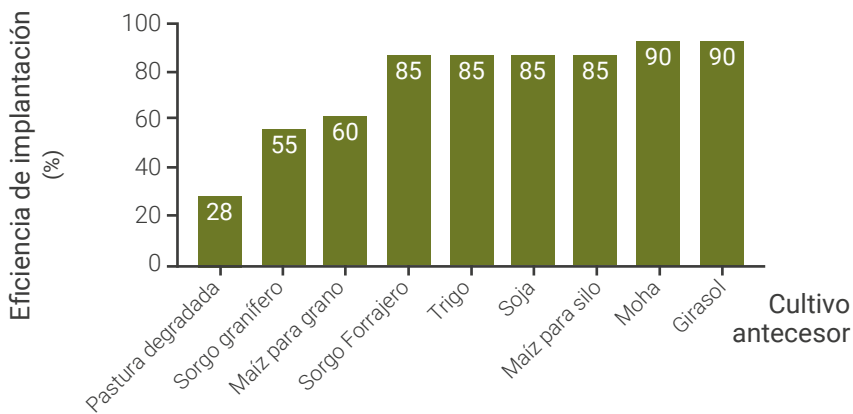
En la elección del lote para sembrar es conveniente evitar aquellos que tengan una elevada población de malezas problemáticas –como por ejemplo cebollín (*Cyperus rotundus*) y gramón (*Cynodon dactylon*)-, al menos hasta que se pueda disminuir la abundancia de estas (Rainero, 2003). En sistemas mixtos que rotan cultivos agrícolas con ganadería se deben tener en consideración los herbicidas aplicados al cultivo agrícola precedente a la siembra de alfalfa, de modo de evitar efectos fitotóxicos que puedan provocar fallas en la implantación de la alfalfa.

El cultivo antecesor es uno de los factores determinantes de la eficiencia de implantación de la alfalfa en siembra directa (SD). Estudios realizados en INTA Rafaela por Fontanetto y Keller (1998) demostraron que los mejores antecesores de la alfalfa en SD son la moha (*Setaria itálica*) y el girasol (*Helianthus annuus*) (Figura 6) que permitieron alcanzar el 90 % de la densidad de plantas en comparación con un testigo implantado sobre suelo laboreado (siembra convencional). También presentaron un buen comportamiento como antecesores los cultivos de trigo (*Triticum aestivum*), sorgo forrajero (*Sorghum vulgare*), soja (*Glycine max*) y maíz (*Zea mays*) para silaje. En general, los antecesores con mejor comportamiento son aquellos que dejan un menor volumen de rastrojo al momento de la siembra de la alfalfa. El maíz y el sorgo para grano por el excesivo volumen de rastrojo que dejan en el lote no serían recomendables como buenos antecesores.

En la Figura 6 se demuestra también que las pasturas degradadas son muy malos antecesores de la alfalfa, no solo por el volumen de rastrojo remanente, sino también por problemas de compactación de suelo, mayor infestación de malezas y posibles efectos de autotoxicidad si la pastura degradada contenía alfalfa. Respecto de esto último, el tiempo que debe transcurrir para evitar los efectos de autotoxicidad varía en función de las condiciones edafoclimáticas, que son las que determinan la tasa de degradación de los compuestos alelopáticos en el suelo. La recomendación más común es hacer descansar el lote con algún otro cultivo por al menos una estación de crecimiento (Chon *et al.*, 2006).

En Pergamino, zona húmeda de la región Pampeana, Bertín *et al.* (2015) compararon en condiciones de secano el efecto de una secuencia intensificada de cultivos antecesores sobre la eficiencia de implantación de

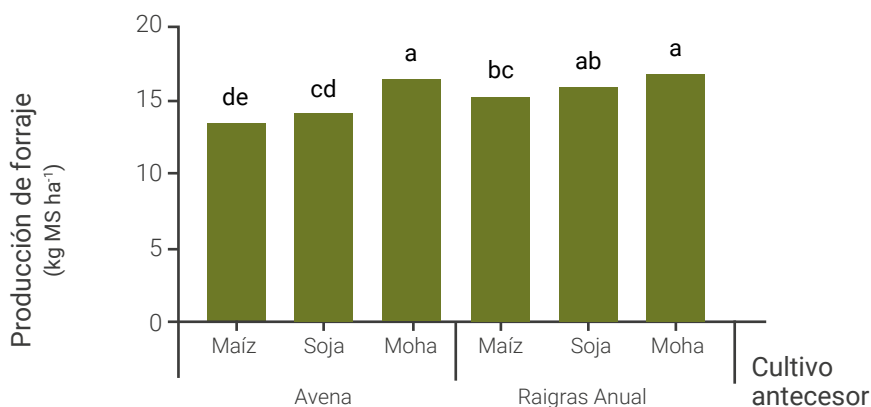
alfalfas sembradas en el otoño siguiente. Las combinaciones de cultivos antecesores fueron verdes de invierno bajo corte [avena (*Avena sativa*) y raigrás anual (*Lolium multiflorum*)] combinados con cultivos de verano para reserva forrajera (moha para heno, maíz para silaje y soja para silaje). El promedio general de eficiencia de implantación se ubicó en torno al 66 %, y si bien no hallaron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre las secuencias de antecesores, señalaron que la moha, combinada con cualquiera de los verdes de invierno, tuvo un efecto positivo sobre la producción acumulada de forraje de alfalfa en la primera temporada en comparación con la obtenida con maíz y soja como antecesores (Figura 7).



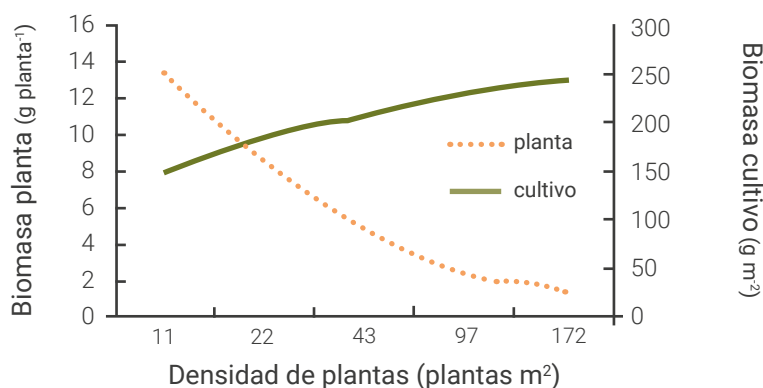
■ **Figura 6.** Eficiencia de implantación (en %) de pasturas de alfalfa en siembra directa según distintos cultivos antecesores en comparación con un testigo implantado en suelo laboreado (siembra convencional) considerado como 100 %. Adaptado de Fontanetto y Keller (1998).

### Densidad de siembra

La elección de una densidad de siembra adecuada incidirá en el éxito del objetivo final que es lograr el número de plantas óptimo en el cultivo. Si bien la densidad de siembra impacta sobre el número final de plantas emergidas, y eventualmente logradas, existen compensaciones entre el tamaño y la densidad de las plantas que determinan que las diferencias en el rendimiento de forraje sean generalmente de menor magnitud (Figura 8). Sin embargo, existen niveles de cantidad de plantas por metro cuadrado en los que, aunque el peso individual de cada planta va disminuyendo, aumenta la cantidad de biomasa producida por unidad de superficie (Volenc et al., 1987).



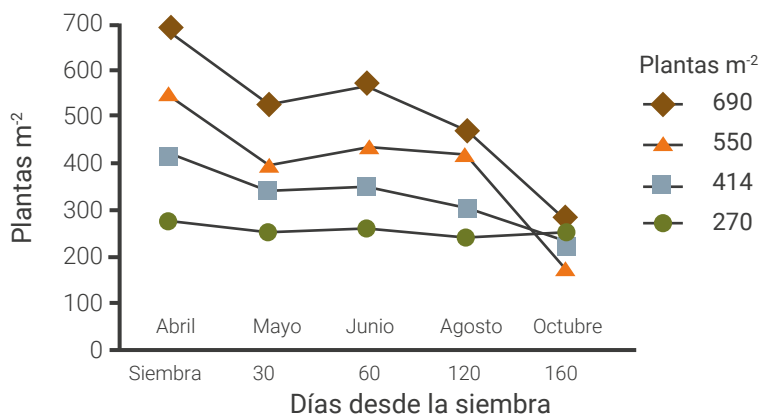
■ **Figura 7.** Producción de forraje (kg MS ha<sup>-1</sup>) durante el primer ciclo de producción de alfalfa según la combinación de cultivos antecesores de invierno y verano en una secuencia forrajera. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Adaptado de Bertín *et al.* (2015).



■ **Figura 8.** Biomasa por planta de alfalfa y por unidad de superficie a medida que incrementa la densidad de plantas. Adaptado de Volenec *et al.* (1987).

A partir de la emergencia, y conforme avanza el tiempo, la mortalidad de plántulas por competencia se incrementa en proporción directa a su densidad inicial; sin embargo, esto sucede hasta un punto de cierta estabilidad, que determina valores similares de densidad de plantas en la población independientemente de la densidad de siembra (Figura 9). Para una pastura de alfalfa pura en la región Pampeana húmeda un stand inicial de plantas de alrededor entre 250-350 plantas m<sup>-2</sup> a los 90 días desde la siembra es considerado adecuado para lograr pasturas altamente productivas. Para mezclas de alfalfa y festuca alta (*Festuca*

*arundinacea*), la densidad objetivo para lograr a los 90 días sería de 200 plantas  $m^{-2}$  de alfalfa y alrededor de 120-150 plantas  $m^{-2}$  de festuca, dependiendo esto último si se trata del tipo continental o mediterráneo, ya que las primeras tienen una mayor capacidad para ocupar el espacio.



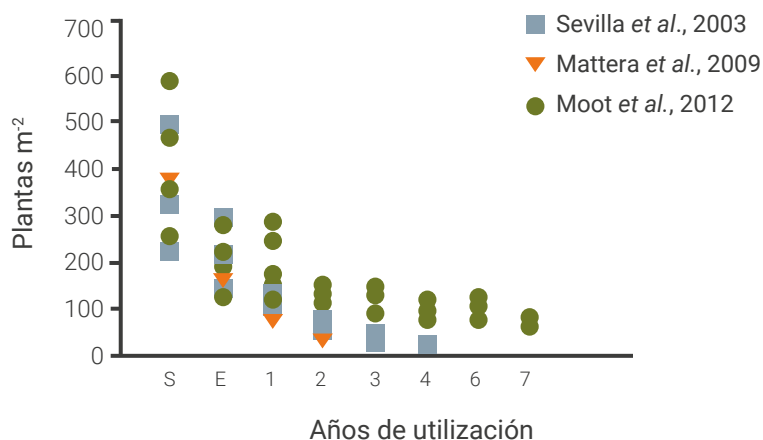
■ **Figura 9.** Evolución de la densidad de plantas (plantas  $m^{-2}$ ) en un cultivo de alfalfa sin reposo invernal en función a los días desde la siembra (abril) hasta los 160 días (octubre) posteriores. INTA Manfredi, Córdoba. Adaptado de Odorizzi *et al.* (2017a).

Por lo tanto, independientemente de la latitud en la que se decida implantar el cultivo, cuando la alfalfa se siembra en un rango de densidades de 250 a 550 semillas  $m^{-2}$ , la cantidad de plantas tiende a estabilizarse al año de implantación y sin diferencias en producción de biomasa. Esto fue corroborado en ensayos conducidos en INTA Hilario Ascasubi, extremo sur la provincia de Buenos Aires bajo condiciones de riego (Sevilla *et al.*, 2003); INTA Pergamino, región Pampeana húmeda (Mattera *et al.*, 2009) y Nueva Zelanda (Moot *et al.*, 2012) (Figura 10). A similares resultados arribaron Romero *et al.* (1991) en INTA Rafaela, región Pampeana húmeda, y Juan y Romero (1993) en INTA Anguil, región Pampeana semiárida. Por estas razones, densidades muy elevadas conllevan por lo general a incrementar el costo de la semilla, pero no necesariamente a una mayor densidad de plantas finalmente establecidas.

La relación entre los  $kg\ ha^{-1}$  de semillas sembradas y la cantidad de plantas logradas no siempre es la misma. Los aspectos que la modifican son las características propias de las semillas, es decir, el poder germinativo, la pureza y el peso de mil semillas. Si bien se recomienda, como



ya se ha señalado, la utilización de semilla peleteada o pildorada –que incluya inoculante, fungicida e insecticida–, es importante considerar que el peleteado incrementa el peso de mil semillas con resultados variables conforme a cómo se haya hecho el proceso. En consecuencia, se hace necesario tener en cuenta este hecho para calcular la correcta densidad para sembrar.



■ **Figura 10.** Evolución de la densidad de plantas (plantas m<sup>2</sup>) de alfalfa desde la siembra (S), establecimiento (E) y años de utilización del cultivo (1 a 7) para diferentes grados de reposo y en tres ambientes diferentes: Hilario Ascasubi (Sevilla et al., 2003), Rafaela (Mattera et al., 2009) y Nueva Zelanda (Moot et al., 2012).

Un uso recomendable de la técnica del peleteado supone incrementos de no más del 30 al 40 % del peso de las mil semillas; sin embargo, no pocas semillas comerciales superan significativamente ese valor, lo que puede ocasionar una densidad de siembra efectiva demasiado baja, con la consiguiente reducción de la producción de forraje (Odorizzi et al., 2017b). En 2005, Maddaloni y Ferrari (2001) estimaron un peso promedio mil semillas de alfalfa sin peletear (semilla desnuda) de 2,2 g. Más recientemente, Lus et al. (2017) informaron valores algo mayores, con una media de 2,35 g y un rango de 1,8 g a 3,0 g. Un ensayo conducido en INTA Rafaela detectó mayor producción de forraje ( $p < 0,05$ ) en las parcelas sembradas con semillas peletadas, independientemente del sistema de siembra utilizado. En dicho ensayo, se utilizó una densidad (kg de semilla ha<sup>-1</sup>) fija para todos los tratamientos, lo que determinó un mayor número inicial de plántulas en las parcelas sembradas con semilla sin peletear; sin embargo, a lo largo del período de estableci-

miento, las parcelas sembradas con semilla peleteada tuvieron no solo un mayor número de plantas establecidas al momento del primer corte, sino también que estas eran más vigorosas y de mayor tamaño, lo que se vio reflejado en una mayor producción de forraje.

Según las normas establecidas por el INASE, la semilla fiscalizada de categoría certificada debe tener un poder germinativo (PG) mínimo de 85 % y una pureza mínima de 98,5 %. Basado en los valores de PG y pureza, se puede calcular el valor cultural (VC) según la siguiente ecuación:

$$\text{Valor Cultural (VC)} = \frac{(\text{Pureza} * \text{Poder Germinativo})}{100}$$

De esta manera, la densidad de siembra (kg de semilla ha<sup>-1</sup>) se puede estimar como:

$$\text{kg de semillas ha}^{-1} = \frac{\text{Plantas m}^2 * \text{Peso de mil semillas (g)}}{\text{Valor Cultural}}$$

Por un lado, el valor estimado se deberá ajustar por el porcentaje de incremento de peso por peleteo y por la eficiencia de implantación esperada. De este modo quedarían establecidos los kg de semilla para utilizar efectivamente para la siembra de la pastura. Por otra parte, no debe perderse de vista que si la cama de siembra no está en óptimas condiciones, habrá que considerar también una reducción en la eficiencia de implantación, que puede ser del orden del 45-50 %, generando en consecuencia un aumento de los kg de semilla ha<sup>-1</sup> para sembrar.

Para ilustrar lo anterior, se ofrece el siguiente ejemplo: si a los 90-120 días de la siembra se espera contar con 300 plantas m<sup>-2</sup> y se asume una eficiencia de implantación del 45 %, en el momento de la siembra deberíamos contar con 435 semillas m<sup>-2</sup>.

$$\begin{aligned} & 300 \text{ plantas m}^2 + (300 \text{ plantas m}^2 * 45 \% \text{ eficiencia de implantación}): \\ & (300 \text{ plantas m}^2 + 135 \text{ plantas m}^2) = 435 \text{ plantas m}^2 \end{aligned}$$

Si se asume un peso de 1000 semillas de 2,35 g de semilla desnuda con un VC de la semilla de 84,15= (85 x 99) /100 los kilogramos a sembrar serán:

$$435 \text{ plantas m}^{-2} * 2,35 \text{ g} / 84,5 = 12 \text{ kg semilla ha}^{-1}$$

Si se asume un incremento de peso por peleteo del 30%, entonces los kg de semilla para sembrar serán:

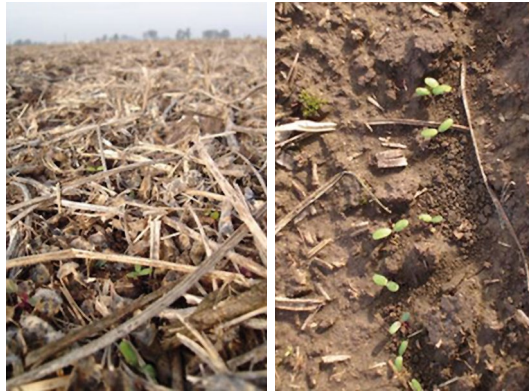
$$12 \text{ kg semillas ha}^{-1} + (12 \text{ kg semillas ha}^{-1} * 30\% \text{ peleteo}) = \\ (12 \text{ kg semillas ha}^{-1} + 3,6 \text{ kg semillas ha}^{-1}) = 15,6 \approx 16 \text{ kg semilla ha}^{-1}$$

Por lo tanto, para las condiciones de semilla definidas en el ejemplo (VC, peso de 1000 semillas e incremento de peso por peleteo), si a los 90-120 días de la siembra se espera contar con 300 plantas m<sup>-2</sup>, se deberán sembrar 16 kg de semilla ha<sup>-1</sup>.

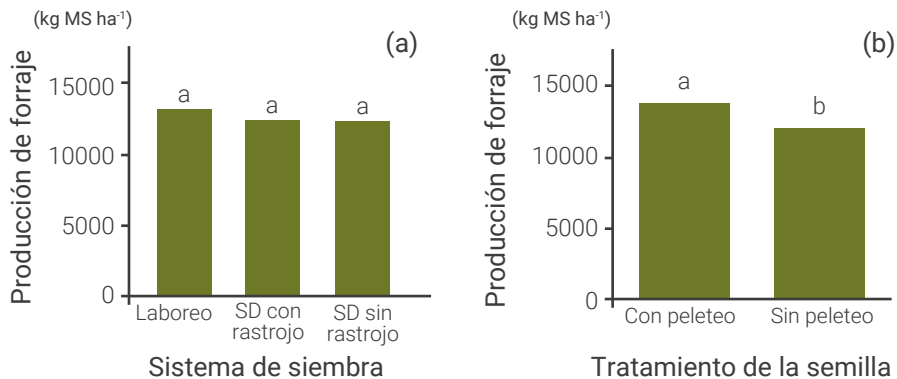
### *Sistemas de siembra y operación de siembra*

En los últimos años se ha observado con mayor frecuencia la utilización de la siembra directa de pasturas de alfalfa (Figura 11). En este sentido, se han realizado ensayos en unidades del INTA donde se compararon diferentes sistemas de siembra y tratamientos de semilla. En INTA Rafaela, Romero *et al.* (2008) no detectaron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre siembra convencional y siembra directa (Figura 12a). Por el contrario, en INTA Pergamino, Moreno *et al.* (2015) constataron una mayor cantidad de plantas en siembra directa, si bien observaron un menor desarrollo radicular bajo este sistema.

En cuanto al tratamiento de la semilla, se aconseja la utilización de semilla peleteada (pildorada) que no solo esté inoculada con rizobios activos, sino que incluya también un fungicida y un insecticida. Esta tecnología mejora la eficiencia de implantación, es decir, posibilita el logro de un mayor número de plantas establecidas en relación con el número de semillas sembradas. El uso de semilla tratada determinó una mayor producción de alfalfa, independientemente del sistema de labranza utilizado (Figura 12b).



**Figura 11.** Emergencia de plántulas de alfalfa en sistema de siembra directa (imagen izquierda) y en un sistema laboreado (imagen derecha).



**Figura 12.** Producción de forraje (kg MS ha<sup>-1</sup>) de una pastura de alfalfa durante su primer ciclo de producción según A: sistema de siembra: Laboreado, Siembra Directa (SD) con y sin rastrojo; y B: tratamiento de la semilla: con y sin peleteo. INTA Rafaela (Santa Fe). Letras diferentes indican diferencias significativas test de Tukey ( $p < 0,05$ ) Adaptado de Romero *et al.* (2008).

La cama de siembra óptima es la que permite un buen contacto del suelo con la semilla, con condiciones de humedad, temperatura, radiación y disponibilidad de nutrientes adecuados para el desarrollo y crecimiento inicial de las plántulas. Además del nivel de cobertura antes mencionado, es importante que independientemente del sistema de siembra se logre una cama firme pero no compactada, evitando condiciones que puedan propiciar el planchado del suelo; de no ser así, la emergencia se verá afectada negativamente.

Los equipos de siembra utilizados para la implantación de pasturas de alfalfa son usualmente sembradoras de grano fino. El uso de “cajón alfalfero”, con dosificadores del tipo de rodillos acanalados, es efectivo para la alfalfa y otras leguminosas de semillas pequeñas porque permite una más eficiente dosificación de la densidad de siembra. Es importante que los tubos de bajada desde el cajón alfalfero a los trenes de siembra no tengan pliegues en su interior, dado que allí se pueden acumular semillas que podrían generar irregularidades en su bajada y distribución (Ferrari, 2014).

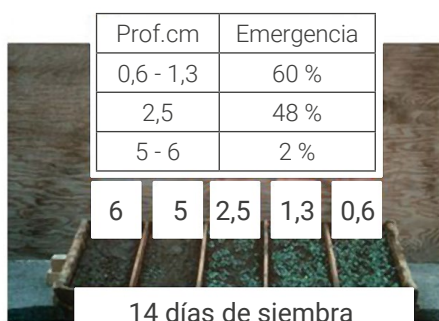
En equipos de siembra directa, la cuchilla del tren sembrador deberá hacer una buena microlabranza, cortando el rastrojo y facilitando el contacto del suelo con la semilla en la hilera de siembra; para ello, no deberá trabajar por debajo de 1 cm de la profundidad de siembra. En esto último, el abresurco bidisco es el más apropiado ya que permite un mayor control de la profundidad de siembra (1-1,5 cm), aspecto clave para lograr una emergencia uniforme y rápida de las pasturas de alfalfa (Ferrari, 2014).

### *Profundidad de siembra*

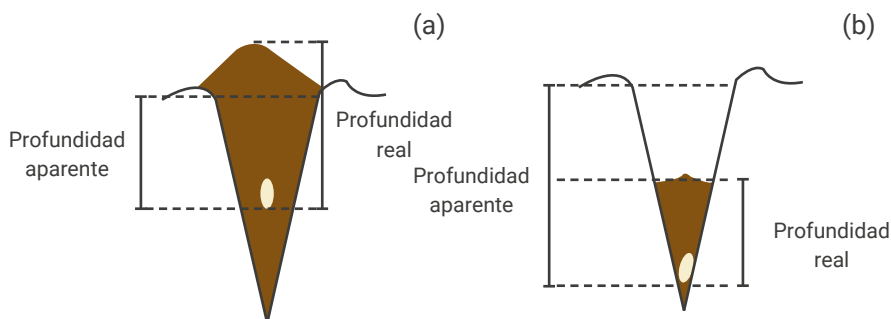
Como ya se ha señalado, el pequeño tamaño de la semilla de alfalfa hace que tenga una muy baja energía germinativa, de manera que el éxito de una buena siembra es hacer que la semilla germine y emerja rápidamente. En este sentido, la semilla debe ser depositada a una escasa profundidad, normalmente entre 1 y 1,5 cm. Sin embargo, esas profundidades podrán variar en función de la humedad de la cama de siembra y del tipo, compactación y cobertura del suelo (Ferrari, 2014). Triplet y Tesar (1960) y Muller *et al.* (2007) determinaron que en suelos franco-limosos y arenosos, con una profundidad de siembra de 0,60 a 1,3 cm se logró una eficiencia de emergencia del 60 %. Esto coincide con lo señalado por Putnam y Orloff (2003), quienes también mostraron cómo disminuye el porcentaje de emergencia de plántulas a medida que se incrementa la profundidad de siembra (Figura 13).

Bajo condiciones de humedad adecuada, la semilla puede depositarse a una menor profundidad aparente para que luego al ser cubierta por las ruedas tapadoras alcance una correcta profundidad real (Figura 14a).

Frente a situaciones donde la humedad superficial del suelo es baja, una alternativa es retirar las ruedas tapadoras de la sembradora y utilizar las ruedas “aprieta-semillas” o afirmador de semillas tipo “Keeton”. De esta manera, se logrará hacer un surco profundo (surco aparente) para poder ubicar la semilla en una zona con mejor nivel de humedad (Figura 14b). La profundidad real quedará definida por la tierra que se desmorona por encima de la semilla. El íntimo contacto de la semilla con el suelo se consigue por la presión que ejerce la rueda “aprieta-semillas o colita de castor” (Capelle, 2013).



■ **Figura 13.** Efecto de la profundidad de siembra (en cm) sobre el porcentaje de emergencia de plántulas de alfalfa a partir de semilla sembrada en un suelo sin cobertura. Adaptado de Putnam y Orloff (2003).



■ **Figura 14.** Profundidad de siembra y tapado de la semilla. (a) Siembra con adecuada humedad superficial: semilla colocada a menor profundidad aparente y cubierta por las ruedas tapadoras; (b) Siembra con adecuada humedad superficial: siembra con escasa humedad superficial: semilla colocada a mayor profundidad aparente en contacto con la humedad del suelo, con las ruedas tapadoras de la sembradora retiradas.

### Arreglos espaciales de siembra

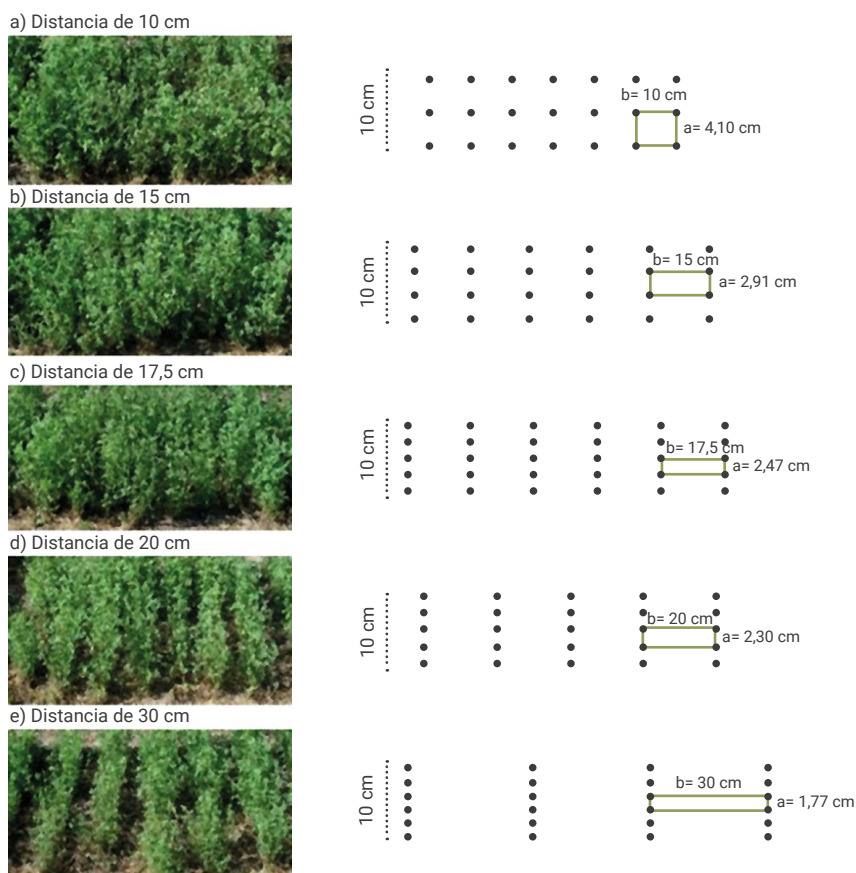
El concepto de arreglo espacial responde a la disposición de las plantas en la superficie y se logra generando modificaciones en el distanciamien-

to entre líneas o cambiando la disposición de esas líneas en el terreno (Gardner *et al.*, 1985; Praat, 1995; Thom, 1993). En este sentido, a igual densidad de siembra, acercar la distancia entre hileras implicaría una mayor distancia entre plantas dentro de la hilera (Figura 15) generando así una distribución más equidistante de las plantas en el terreno (Gardner *et al.*, 1985; Park *et al.*, 2003; Heitholt y Sassenrath-Cole, 2009; Connor *et al.*, 2011; Mattera *et al.*, 2013) y disminuyendo la competencia intraespecífica entre las plantas por luz, agua y nutrientes (Park *et al.*, 2003).

Una serie de ensayos realizados en INTA Rafaela han dado cuenta de mejores resultados cuando las hileras de siembra se encuentran más próximas, habiéndose registrado los más altos rendimientos de forraje cuando la distancia fue 15 cm entre hileras; por el contrario, cuando las distancias fueron  $\geq 20$  cm, los rendimientos disminuyeron (Mattera *et al.*, 2013; Mattera *et al.*, 2009). En este sentido, siembra a 20 cm generó una disminución del rendimiento del 20 % (Figura 16). Los mayores rendimientos que se obtuvieron con las menores distancias entre hileras se explicaron principalmente por un mejor aprovechamiento de la radiación disponible en el ambiente, asociado a la mejor distribución de las plantas.

Los efectos del distanciamiento entre hileras sobre el rendimiento de forraje también están influenciados por el ambiente. Por un lado, en ensayos conducidos en INTA Rafaela (Mattera *et al.*, 2013; Mattera *et al.*, 2009), zona húmeda al N de la región Pampeana, las diferencias en producción se concentraron más notoriamente en el período primavera-verano, es decir, en las épocas con mayores tasas de crecimiento. Por otro lado, en ensayos realizados en INTA Balcarce (Colabelli *et al.*, 2002; Olivo *et al.*, 2019), zona subhúmeda al S de la región Pampeana, solo se registraron diferencias ( $p < 0,05$ ) en el primer corte. En esta última localidad, Olivo (2018) comparó la evolución de la producción de biomasa aérea de parcelas de alfalfa sembradas a 10 y a 20 cm entre hileras (Figura 17) y registró más de un 50 % de rendimiento en favor del menor distanciamiento; en particular, se destaca el crecimiento obtenido con 370°GDA –correspondiente a primavera temprana– que se produjo con temperaturas medias diarias entre 10 y 15 °C, que son consideradas subóptimas para el crecimiento de alfalfa (Christian, 1977; Collino *et al.*, 2005). Este crecimiento se explicó por una mayor captura

de radiación, índice de área foliar y número y peso de tallos. En ese marco, sugirió que la siembra en hileras paralelas a 10 cm podría ser una vía efectiva para incrementar la producción de forraje, particularmente en períodos o sitios en los cuales la alfalfa crece bajo un rango de temperaturas subóptimas, situación bastante frecuente durante los meses de otoño-invierno e inicio de primavera en zonas más australes de la región Pampeana.



■ **Figura 15.** Izquierda: imágenes de los canopeos generados con diferentes distancias entre hileras de alfalfa (10, 15, 17,5, 20 y 30 cm). Derecha: esquemas de los arreglos espaciales de las plantas dentro de las hileras que resultan de los distintos distanciamientos entre hileras ( $a$ = separación entre plantas dentro de la hilera;  $b$ = separación entre hileras). Las fotos corresponden al comienzo de la primera primavera (septiembre) en un ensayo en INTA Rafaela. Adaptado de Mattera *et al.* (2013).



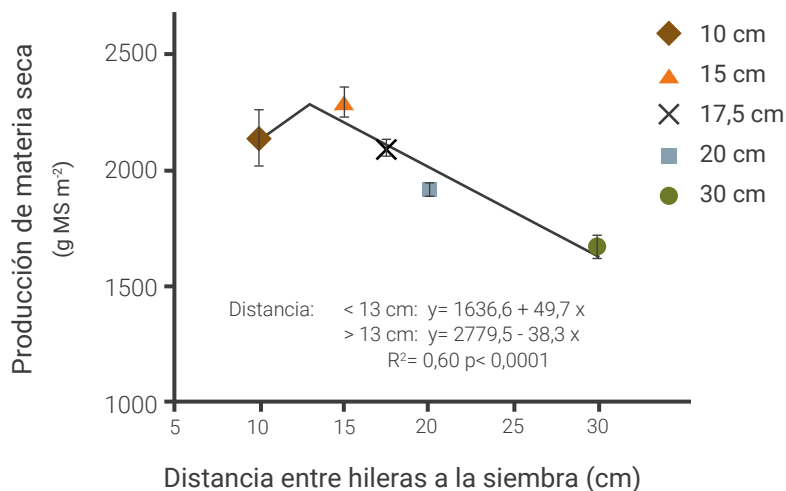


Figura 16. Producción de biomasa aérea total acumulada (suma de seis cortes) de cultivos puros de alfalfa (cultivar Monarca) en función de la distancia de siembra durante la primera temporada de producción en INTA Rafaela. Los valores de producción corresponden al promedio de cinco repeticiones  $\pm$  error estándar. Adaptado de Mattera *et al.* (2013).

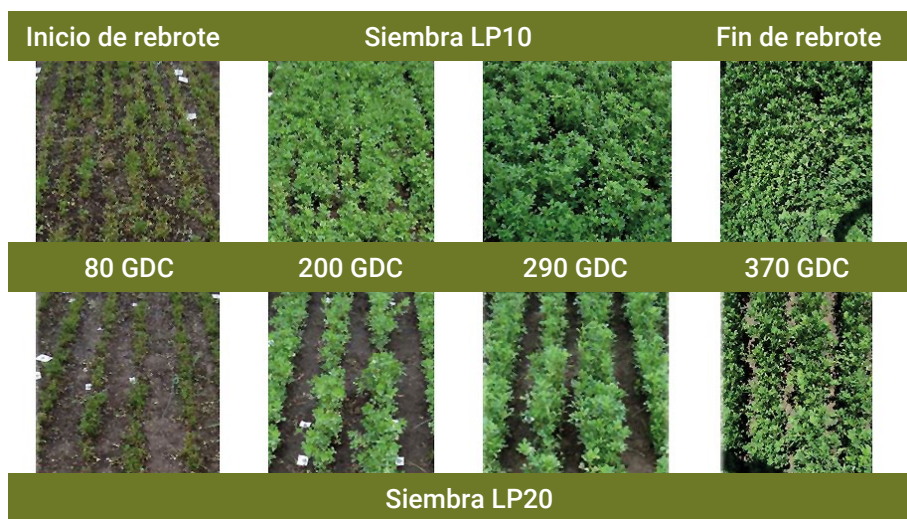
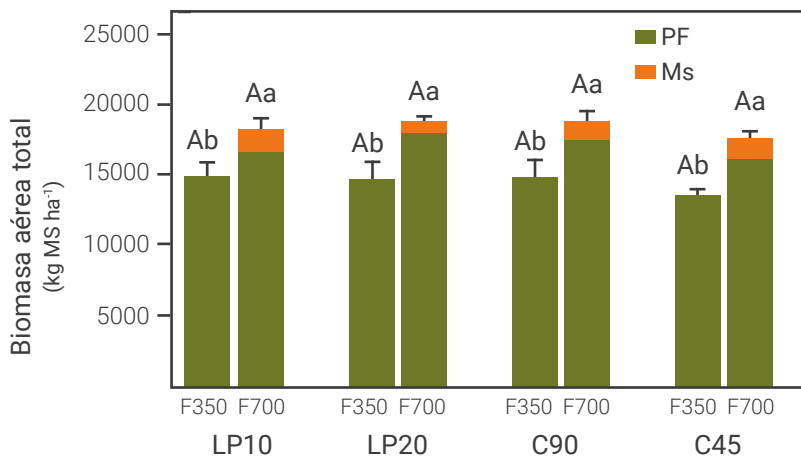


Figura 17. Evolución del crecimiento de un cultivar de alfalfa sin reposo invernal en INTA Balcarce sembrado a líneas paralelas a 10 cm (LP10) y 20 cm (LP20). GDA = Grados Días Acumulados. Temperatura base ( $T_b$ ) = 5 °C. El crecimiento de 370°GDA se produjo en condiciones de temperaturas medias subóptimas (10-15 °C) desde fin de setiembre hasta principio de noviembre. De izquierda a derecha: evolución del rebrote a los 80, 200, 290 y 370°GDA. Tomado de Olivo (2018).

No obstante lo anterior, hay quienes sostienen que la disminución de la producción que deriva de los mayores distanciamientos entre hileras se puede compensar realizando siembras cruzadas. Así se han difundido algunos sistemas de siembra en los que manteniendo distancias de 20-21 cm se realiza primero una pasada simple de sembradora y luego otra pasada con un ángulo de 90° o 45°, las que se denominan siembra cruzada en cuadrícula (C90) y siembra cruzada sesgada (C45), respectivamente (Figura 18c y d). El objetivo que persigue esta práctica es generar una mejor distribución de la semilla en la superficie disminuyendo la competencia intraespecífica (Park *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando Olivo *et al.* (2019) compararon en INTA Balcarce arreglos cruzados a 45° (C45) y a 90° (C90) con siembra en líneas paralelas a 20 cm y bajo frecuencias de corte muy contrastantes (suma térmica entre defoliaciones de 350 vs. 700°GDA) no detectaron ninguna mejora de las siembras cruzadas en cuanto a densidad y peso de tallos, número de plantas, captura de radiación y eficiencia de uso de la radiación (Figura 19). El trabajo concluyó que los arreglos cruzados, tanto a 45 grados (C45) como a 90 grados (C90), no produjeron mejoras en la producción de forraje respecto de la siembra en hileras paralelas a 20 cm (Figura 19). Esto concuerda con lo informado para otras especies forrajeras y otras regiones (Praat, 1995; Scheneiter, 2006; Bertram, 2008; Sardiña *et al.*, 2015).



■ **Figura 18.** Ensayo en INTA Balcarce para comparar arreglos espaciales de siembra: (a) siembra en líneas paralelas a 20 cm (LP20); (b) siembra en líneas paralelas a 10 cm (LP10); (c) siembra en líneas cruzadas a 90° (C90); (d) siembra en líneas cruzadas a 45° (C45) para un cultivar de alfalfa sin reposo invernal. Tomado de Olivo *et al.* (2003).

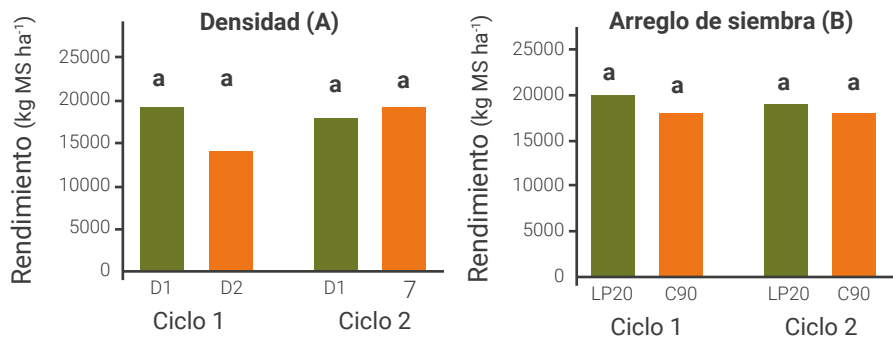


■ **Figura 19.** Valores promedio de biomasa aérea total (kg MS ha<sup>-1</sup>) de un cultivar de alfalfa sin reposo invernal durante su primer año de vida en cuatro arreglos de siembra: líneas paralelas a 10 cm (LP10) y 20 cm (LP20) y cruzadas a 90° (C90) y 45° (C45). Los cortes se hicieron cada 350° y 700°GDA. La parte gris de cada barra corresponde a la producción de forraje (PF) y la parte negra a material senescente (MS) recolectado del suelo. Letras mayúsculas distintas denotan diferencias significativas entre arreglos de siembra para cada frecuencia de corte ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas denotan diferencias significativas entre frecuencias de corte para cada arreglo de siembra ( $p < 0,05$ ). Adaptado de Olivo *et al.* (2019).

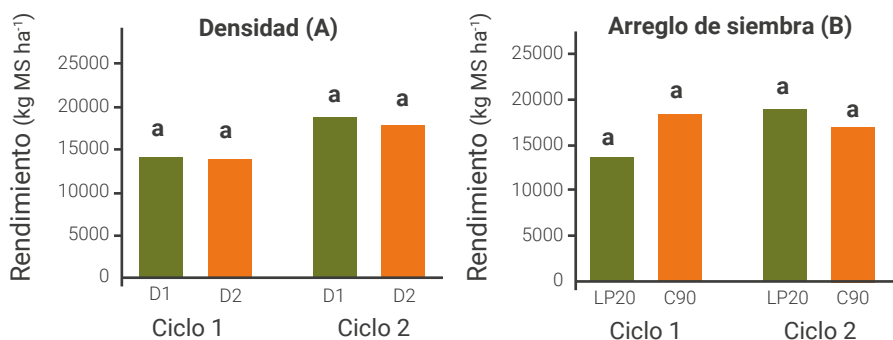
Por otro lado, Sardiña *et al.* (2015) evaluaron en General Villegas (zona subhúmeda pampeana), durante dos ciclos productivos, el efecto de combinaciones de dos arreglos de siembra (en líneas paralelas a 20 cm y en líneas cruzadas a 90°) con altas y bajas densidades de plantas (562 y 330 plantas m<sup>-2</sup>) sobre el rendimiento de forraje de dos cultivares con distinto grado de reposo invernal (GRI 6 y 9) y no detectaron diferencias entre los tratamientos (Figura 20).

De este último trabajo se infiere que si no es posible realizar una siembra con líneas distanciadas a 15 o 17,5 cm, que es la situación en la que el cultivo registra usualmente altos niveles de rendimiento, una siembra en hileras a 20 cm realizada correctamente –esto es con suficiente cantidad de semilla, adecuada profundidad y apropiada velocidad de labor, entre otros factores– sería suficiente para obtener una pastura de alfalfa productiva, sin necesidad de realizar dos pasadas de siembra. Esto reduciría los costos de implantación, los tiempos operativos y la logística asociada a la siembra.

## GR6



## GR9



■ **Figura 20.** Rendimiento (kg de MS ha<sup>-1</sup>) acumulado durante dos ciclos productivos de dos cultivares de alfalfa de GRI 6 y 9 establecidos con dos densidades [562 (D1) y 330 (D2) plantas m<sup>-2</sup>] y sembrados con dos arreglos espaciales: líneas paralelas a 20 cm (LP20) y líneas cruzadas a 90° (C90). Adaptado de Sardiña *et al.* (2015).

Otro aspecto importante que se puede presentar es cómo manejar las siembras de alfalfa asociada con otras especies forrajeras. En este sentido, Romero *et al.* (2011) condujeron un ensayo en INTA Rafaela donde compararon siembras de alfalfa y de festuca puras y en mezcla (1:1) bajo tres arreglos de siembra: i) cada especie en hileras alternadas, ii) ambas especies en la misma hilera y iii) una especie cruzada con la otra. Después de dos ciclos de producción, no hallaron diferencias productivas entre los arreglos espaciales de siembra; entre especies, la alfalfa pura fue la más productiva durante el primer ciclo de producción (Figura 21). No obstante, en que se busque reducir la competencia interespecífica entre la leguminosa y la gramínea, se recomienda la siembra

en líneas alternadas y con una relación 1:1 o 2:1 entre hileras de alfalfa y festuca, respectivamente. Obviamente, la relación 2:1 prioriza la producción de alfalfa como principal componente de la mezcla.



■ **Figura 21.** Producción de forraje (kg MS ha<sup>-1</sup>) de alfalfa y festuca alta puras y en mezcla (1:1) con diferentes arreglos espaciales de siembra y durante dos ciclos de producción (ciclos 1 y 2) en INTA Rafaela. Los valores son promedio de tres repeticiones. Letras distintas entre pasturas dentro de cada ciclo de producción indican diferencias significativas (Fisher,  $p < 0,05$ ). Adaptado de Romero *et al.* (2011).

## Consideraciones finales

La información presentada en este capítulo resume los avances recientes de investigación sobre siembra e implantación del cultivo de alfalfa en las condiciones agroecológicas de la República Argentina. Como se ha podido evidenciar, el período de implantación es fundamental para la producción y la persistencia posterior del cultivo. Conocer los procesos ecofisiológicos que ocurren durante esta fase inicial permite ajustar la planificación y el manejo agronómico de la pastura de alfalfa. Al ser un cultivo perenne, las plantas priorizan durante la fase del establecimiento la partición hacia estructuras subterráneas (raíces y corona) en desmedro del crecimiento aéreo. Esto constituye un proceso no solo normal sino también deseable a fin de propiciar una adecuada persistencia del cultivo. Para todo ello, es fundamental la consideración de aspectos

como la elección del lote; el cultivo antecesor; la fecha, la densidad y profundidad de siembra, el sistema de siembra y el arreglo espacial de las semillas en el lote.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, S.G.; A.K. DOBRENZ; M.H. SCHONHORST; J.E. STONER. 1985. *Heritability of NaCl tolerance in germinating alfalfa seeds. Agronomy J.* 77 (1): 99-101.
- ARNOLD, S.M.; J.L. MONTEITH. 1974. *Plant development and mean temperature in a tees date habitat. Journal of Ecology* 62: 711-720.
- BERTÍN, O.D.; P.F. BARLETTA; E. PACENTE; J. MATTERA; M.J. BERIBE; J.N. CAMARASA. 2015. *Secuencias de cultivos anuales y pastura perenne para forraje en suelo agrícola. Revista de Tecnología Agropecuaria* 10: 38-42.
- BERTRAM, N. 2008. *Respuesta de agropiro alargado (Thinopyrum ponticum) a la densidad de siembra y al arreglo espacial: desarrollo del área foliar, estructura poblacional e intercepción lumínica en el año de implantación. Tesis Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina, 58 p.*
- BERTRAM, N.A.; C.S. ALFONSO; S. CHIACCHIERA; A.E. OHANIAN; H.R. PAGLIARICCI. 2015. *Efecto de la concentración salina y el régimen hídrico en la germinación, emergencia y crecimiento temprano de alfalfa (Medicago sativa). Revista Argentina de Producción Animal* 35 (1): 139-257.
- BIANCHI, A.R.; S.A.C. CRAVERO. 2010. *Atlas climático digital de la República Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Salta, Argentina.*
- CAPELLE, N. 2013. *Tecnología de siembra-implantación de pasturas y verdeos invernales. Jornada Técnica Pasturas 2013. Claves para producir más y mejor.* 31-38 pp.
- CHON, S.U.; J.A. ENNINGS; C.J. NELSON. 2006. *Alfalfa (Medicago sativa L.) autotoxicity: current status. Allelopathy Journal* 18: 57-80.
- CHRISTIAN, K.R. 1977. *Effects of the environment of the growth of alfalfa. Advances in Agronomy* 29: 183-227.
- COLABELLI, M.R.; H. URCOLA; M. AGNUSDEI. 2002. *Intersiembra de leguminosas en suelos de aptitud agrícola. 1. Efecto de la época de intersiembra y de la distancia entre surcos sobre el establecimiento de las especies intersembradas. Avances en Producción Animal* 27: 77-86.
- COLLINO, D.J.; J.L. DARDANELLI, M.J. DE LUCA; R.W. RACCA. 2005. *Temperature and water availability effects on radiation and water use efficiencies in alfalfa (Medicago sativa L.). Australian Journal of Experimental Agriculture* 45: 383-390.
- CONNOR, D.J.; R.S. LOOMIS; K.G. CASSMAN. 2011. *Crop ecology, productivity and management in agricultural systems. Cambridge University Press (2nd edition), Reino Unido, 576 p.*
- CRALLE, H.T. 1983. *Photosynthate partitioning in alfalfa populations selected for high nitrogen fixation capability. Ph.D. Thesis. Univ. of Minnesota, St. Paul, USA. Diss. Abstr. DA 8329508, 150 p.*
- CREA. 2015. *RIDZO. Red de Innovación y Desarrollo Zona Oeste. Logro de pasturas. Eficiencia de implantación en la campaña 2011 y evolución de los 3 años de relevamiento*

en la Zona Oeste de Buenos Aires. (Disponible:[http:// www.creaoeste.org.ar/wp-content/uploads/2015/02/Informe-Final-Implantacion-de-Pasturas-RiDZo.pdf](http://www.creaoeste.org.ar/wp-content/uploads/2015/02/Informe-Final-Implantacion-de-Pasturas-RiDZo.pdf) consultado: 19/09/2019).

FERRARI, H. 2014. Consideraciones a tener en cuenta en la sembradora para lograr una buena implantación de pasturas. 5.º Jornada Nacional de Forrajes Conservados (Disponible: [http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/agoindustria\\_lizacion/Jornada-Nacional-Forrajes-Conservados-2014.asp](http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/agoindustria_lizacion/Jornada-Nacional-Forrajes-Conservados-2014.asp) consultado: 19/09/2019).

FICK, G.W.; D.A. HOLT; D.G. LUGG. 1988. *Environmental physiology and crop growth*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL Jr. (Eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. American Society of Agronomy, Madison, WI, Agronomy Series 29. 163-194 pp.

FONTANETTO, H.; O. KELLER. 1998. *La siembra directa de alfalfa sobre diferentes cultivos antecesores*. Información Técnica para Productores 1997-1998. Publicación Miscelánea N.º 89.

GARDNER, F.P.; R. BRENT PEARCE; R.L. MITCHEL. 1985. *Carbon fixation by crop canopies*. *Physiology of Crop Plants*. Iowa State University Press. 31-57 pp.

GOSSE, G.; G. LEMAIRE; M. CHARTIER; F. BALFOURIER. 1988. *Structure of a lucerne population (Medicago sativa L.) and dynamics of stem competition for light during regrowth*. *Journal of Applied Ecology* 25: 609-617.

HEICHEL, G.H.; R.H. DELANEY; H.T. CRALLE. 1988. *Carbon assimilation, partitioning and utilization*. En: HANSON A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL Jr. (Eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. American Society of Agronomy, Madison, WI, Agronomy Series 29. 195-228 pp.

HEITHOLT, J.J.; G.F. SASSENATH-COLE. 2009. *Inter-plant competition growth responses to plant density and row spacing*. (Disponible: [https://www.researchgate.net/publication/226891531\\_Inter-Plant\\_Competition\\_Growth\\_Responses\\_to\\_Plant\\_Density\\_and\\_Row\\_Spacing](https://www.researchgate.net/publication/226891531_Inter-Plant_Competition_Growth_Responses_to_Plant_Density_and_Row_Spacing) consultado: 15/03/2020).

JÁUREGUI, J.M.; A. MILLS; D.B. BLACK; K. WIGLEY; H.J. RIDGWAY; D.J. MOOT. 2019. *Yield components of lucerne were affected by sowing dates and inoculation treatments*. *European Journal of Agronomy* 103: 1-12.

JUAN, N.A.; N.A. ROMERO. 1993. *Efecto de la densidad de plantas sobre la producción y persistencia de variedades de alfalfa con distintos grados de dormancia*. INTA EEA Anguil (Argentina). *Boletín de Divulgación Técnica*.

JUNGERS, J.M.; M. BRAKKE; A. RENDAHL; C.C. SHEAFFER. 2016. *Identifying Base Temperature for Alfalfa Germination: Implications for Frost Seeding*. *Crop Science* 56 (5): 2833-2840.

JUSTES, E.; P. THIEBEAU; J. AVICE; G. LEMAIRE; J. VOLENEC; A. OURRY. 2002. *Influence of summer sowing dates, N fertilization and irrigation on autumn VSP accumulation and dynamics of spring regrowth in alfalfa (Medicago sativa L.)* *Journal of Experimental Botany* 53: 111-121.



- KHAITI, M.; G. LEMAIRE. 1992. *Dynamics of shoot and root growth of lucerne after seeding and after cutting*. *European Journal of Agronomy* 1(4): 241-247.
- LODGE, G.M. 1991. *Management practices and other factors contributing to the decline in persistence of grazed lucerne in temperate Australia: a review*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 31: 713-724.
- LUS, J.; M.J. CUDA; G.L. GONZÁLEZ; M. PECILE; C.A. ROSSI. 2017. *Variabilidad e importancia del peso de 1000 semillas como un determinante de la densidad de siembra en alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Revista Argentina de Producción Animal* 37 (1): 68.
- MADDALONI, J.; L. FERRARI. 2001. *Festuca alta*. En: MADDALONI, J.; L. FERRARI. (Eds.). *Forrajas y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina*. INTA-Universidad de Lomas de Zamora. 165-182 pp.
- MATTERA, J.; L.A. ROMERO; A. CUATRÍN; P.S. CORNAGLIA; A.A. GRIMOLDI. 2013. *Yield components, light interception and radiation use efficiency of Lucerne (Medicago sativa L.) in response to row spacing*. *European Journal of Agronomy* 45: 87-95.
- MATTERA, J.; L.A. ROMERO, A. CUATRÍN; A.A. GRIMOLDI. 2009. *Efectos de la distancia de siembra sobre la producción de biomasa y la persistencia de un cultivo de alfalfa*. *Revista Argentina de Producción Animal* 29 (1): 131-140.
- MOOT, D.J.; K.M. POLLOCK; B. LEWIS. 2012. *Plant population, yield and water use of lucerne sown in autumn at four sowing rates*. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 74: 97-102.
- MOOT, D.J.; M.J. ROBERTSOEN; K.M. POLLOCK. 2001. *Validation of the AP-SIM-Lucerne model for phenological development in a cool-temperature climate*. *Proceedings of the 10th Australian Agronomy Conference*. Australian Soc. of Agronomy. (Disponible: [https://www.researchgate.net/publication/284261367\\_Validation\\_of\\_the\\_APSIM-Lucerne\\_model\\_for\\_phenological\\_development\\_in\\_a\\_cool-temperature\\_climate\\_consultado:20/08/2019](https://www.researchgate.net/publication/284261367_Validation_of_the_APSIM-Lucerne_model_for_phenological_development_in_a_cool-temperature_climate_consultado:20/08/2019)).
- MOOT, D.J.; W.R. SCOTT; A.M. ROY; A.C. NICHOLLS. 2000. *Base temperature and thermal time requirements for germination and emergence of temperate pasture species*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* (43) 1: 15-25.
- MORENO, A.; P. BARLETTA; J.O. SCHENEITER. 2015. *Cómo afectan el rastrojo de soja y el sistema*. *Revista de Tecnología Agropecuaria* 10: 59-62.
- MULLER, S.C.; C.A. FRATE; M.C. MATHEWS. 2007. *Alfalfa Stand Establishment*. En: SUMMERS, C.; D. PUTMAN (Eds.). *Irrigated Alfalfa Management for Mediterranean and Desert Zones*. University of California and Natural Resources, Chapter 4. 1-22 pp. (Disponible: [https://alfalfa.ucdavis.edu/IrrigatedAlfalfa/dfs/UCAlfalfa8290StandEstablish\\_free.pdf](https://alfalfa.ucdavis.edu/IrrigatedAlfalfa/dfs/UCAlfalfa8290StandEstablish_free.pdf) consultado: 14/10/2019).
- ODORIZZI, A.; V. AROLFO; S. OLIVO. 2017a. *Arreglos espaciales de siembra en alfalfa. Dinámica a campo "Jornadas Nacionales de Alfalfa"*. *Cuadernos de la alfalfa. Jornadas Nacionales de Alfalfa: del cultivo al negocio*. 62-68 pp.

ODORIZZI, A.S.; V. AROLFO; D.H. BASIGALUP; S. SOLÁ. 2017b. *Efecto del porcentaje de pildorado sobre la implantación y productividad de alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Agriscientia* 34: 59-65.

OLIVO, S. 2018. *Producción de biomasa de alfalfa (Medicago sativa L.) en respuesta al arreglo espacial de siembra y frecuencia de corte*. Tesis Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina, 76 p.

OLIVO, S.; G. BERONE; P. CICCORE. 2019. *Arreglo de siembra en alfalfa. Acercar para producir más*. *Revista Técnica de la Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa-Planteos Ganaderos*. 96-102 pp.

PARK, S.E.; L.R. BENJAMIN; A.R. WATKINSON. 2003. *The theory and application of plant competition model: an agronomic perspective*. *Annals of Botany* 92: 741-748.

PRAAT, J.P. 1995. *Row spacing and seeding rate interactions in perennial ryegrass and tall fescue swards established by direct drilling (no tillage)*. PhD Thesis, Massey University, Palmerston North, Nueva Zelanda. 278 p.

PUTNAM, D.; S. ORLOFF. 2003. *Using varieties or cutting schedules to achieve quality hay –what are the tradeoff? Proceedings of the 33rd California Alfalfa & Forage Symposium (December), Monterey, CA*. (Disponible: <https://alfalfa.ucda vis.edu/+symposium/proceedings/2003/03-201.pdf> consultado: 03/10/2019).

RAINERO, H. 2003. *Actualización en el control de malezas en alfalfa*. Jornada Técnica Todo Alfalfa. INTA-EEA Manfredi, Argentina. 16 p.

RITCHIE, J.T.; D.S. NESMITH. 1991. *Temperature and crop development*. *Modeling Plant and Soil Systems*. 31: 5-29.

ROMERO, L.A.; J. MATTERA; M.A. SCOTTO LENZ. 2011. *Producción de forraje de una mezcla bajo distintos sistemas de siembra*. *Revista Argentina de Producción Animal* 31 (1): 561.

ROMERO, L.A.; O.A. BRUNO; J.L. FOSSATI; O.R. QUAINO. 1991. *Densidad de siembra de alfalfa cultivar CUF 101: número de plantas y producción*. *Revista Argentina de Producción Animal* 11 (1): 411-417.

ROMERO, L.A.; J. MATTERA; A. CUATRIN. 2008. *Efecto del tipo de siembra sobre la producción y el número de plantas en pasturas de alfalfa en el año de implantación*. *Revista Argentina de Producción Animal* 28 (1): 505-506.

SARDIÑA, C.; M. DIEZ; C. OTTAVIANO. 2015. *Densidad de siembra y arreglo espacial de plantas en un cultivo de alfalfa (Medicago sativa L.)*. (Disponible: <https:// inta.gob.ar/documentos/densidad-de-siembra-y-arreglo-espacial-de-plantas-en-un-cultivo-de-alfalfa-medicago-sativa-l> consultado: 03/03/2020).

SCHENEITER, O. 2006. *Efecto del sistema y densidad de siembra sobre la implantación de agropiro alargado (Thinopyrum ponticum (Podp.) Barkw. and Dewey)*. Reunión Anual sobre Forrajeras: Novedades en Mejoramiento Genético y Producción de Pasturas. Pergamino. 6 p.

- SEVILLA, G.H.; A.M. PASINATO; J.M. GARCÍA. 2003. *Producción de forraje y densidad de plantas de alfalfa irrigada comparando distintas densidades de siembra*. *Archivos Latinoamericanos de Prod. Animal* 10 (3): 164-170.
- SIM, R.E. 2014. *Water extraction and use of seedling and established dryland lucerne crops*. PhD Thesis, Lincoln University, Lincoln, NZ. 287 p.
- SIM, R.E.; D.J. MOOT; H.E. BROWN; E.I. TEIXEIRA. 2015. *Sowing date affected shoot and root biomass accumulation of lucerne during establishment and subsequent re-growth season*. *European Journal of Agronomy* 68: 69-77.
- TA, H.T.; E.I. TEIXEIRA; D.J. MOOT. 2016. *Impact of autumn (fall) dormancy rating on growth and development of seedling lucerne*. *Journal of New Zealand Grasslands* 78:169-176.
- TEIXEIRA, E.I.; H.E. BROWN; E.D. MEENKEN; D.J. MOOT. 2011. *Growth and phenological development patterns differ between seedling and regrowth lucerne crops (Medicago sativa L.)*. *European Journal of Agronomy* 35: 47-55.
- TESAR, M.B.; V.L. MARBLE. 1988. *Alfalfa Establishment*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL Jr. (Eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, American Society of Agronomy, Madison, WI, Agronomy Series 29. 303-332 pp.
- THIÉBEAU, P.; N. BEAUDOIN; E. JUSTES; J.M. ALLIRAND; G. LEMAIRE. 2011. *Radiation use efficiency and shoot: root dry matter partitioning in seedling growths and regrowth crops of lucerne (Medicago sativa L.) after spring and autumn sowings*. *European Journal of Agronomy* 35: 255-268.
- THOM, E.R.; W.R. RITCHIE. 1993. *Banded versus blanket spraying and direct drilling*. *Pasture Renovation Manual*. AgResearch, Ruakura, Hamilton, New Zealand. 55-58 pp.
- TRIPLETT, G.B. JR.; M.B. TESAR. 1960. *Effects of Compaction, Depth of Planting, and Soil Moisture Tension on Seedling Emergence of Alfalfa*. *Agronomy Journal* 52 (12): 678-684.
- UNDERSANDER, D.; M.V. HALL; P. VASSALOTTI; D. COSGROVE. 2011. *Alfalfa Germination & Growth*. *National Alfalfa & Forage Alliance*, 22 p.
- VOLENEC, J.J.; J.H. CHERNEY; K.D. JOHNSON. 1987. *Yield components, plant morphology, and forage quality of alfalfa as influenced by plant population*. *Crop Science* 27:321-326.
- WATT, M.S.; M. BLOOMBERG; W.E. FINCH-SAVAGE. 2011. *Development of a hydrothermal time model that accurately characterizes how thermo inhibition regulates seed germination*. *Plant, Cell and Environment* 34: 870-876.



## CAPÍTULO 6

### Mejoramiento genético y desarrollo de variedades

Ariel S. Odorizzi y  
Daniel H. Basigalup

## Introducción

La alfalfa es una especie perenne, de flores perfectas (estambres y carpelos) y de fecundación preponderantemente alógama. La polinización es entomófila, llevada a cabo principalmente por varias especies del orden *Himenóptera* (abejas, abejorros y megachiles) que utilizan sofisticados mecanismos de desenlace floral y aseguran la polinización cruzada. La alogamia se ve favorecida por mecanismos de autoesterilidad y autoincompatibilidad (Viands *et al.*, 1988).

La gran capacidad de adaptación a las más diversas condiciones de suelo, clima y manejo que posee la alfalfa se debe a su extraordinaria variabilidad genética, enriquecida por la introgresión de las especies que conforman el "complejo *Medicago sativa*" (Quiros y Bauchan, 1988). Existen aproximadamente 60 especies de *Medicago* (Shifino-Wittmann, 2008), tanto anuales como perennes, de las cuales apenas una decena se utilizan como forrajeras en producción animal. Dentro de este complejo se destaca la alfalfa cultivada, *M. sativa* L. [o *M. sativa* subsp. *sativa* (L.) L. & L.], que es autotetraploide y deriva del cruzamiento de taxones diploides y tetraploides de *M. sativa* y *M. falcata*.

El genoma de la alfalfa es relativamente grande (800–900 Mbp) y, considerando su estructura genética, se define como polimórfico, con 8 cromosomas como número básico ( $x = 8$ ) y con formas diploides ( $2n = 2x = 16$ ) y tetraploides ( $2n = 4x = 32$ ). La naturaleza autotetraploide de la alfalfa cultivada determina la compleja herencia de sus caracteres y define los modelos genéticos sugeridos para la especie.

En este capítulo se tratarán brevemente las implicancias de la herencia en el mejoramiento de la alfalfa y se describirán los principales métodos de mejoramiento empleados para el desarrollo de variedades. Un tratamiento más exhaustivo de estos temas podrá encontrarse en Rumbaugh *et al.* (1988). Finalmente, se resumirán los principales logros obtenidos en Argentina para el mejoramiento de algunos caracteres específicos que revisten una destacada importancia económica.

## Modelos genéticos autotetraploides

Asumiendo la existencia de una población panmíctica (aleatoria) en equilibrio y la segregación cromosómica al azar, Kempthorne (1957) desarrolló el primer modelo autotetraploide para la alfalfa, basado en la presencia de cuatro posibles alelos (i, j, k, l) por cada locus (A). En consecuencia, el valor genotípico de un determinado individuo es el resultado de la clase y el número de alelos individuales presentes y todas sus posibles interacciones. Por ejemplo, el valor genotípico  $V(G)$  del genotipo  $A_i A_j A_k A_l$  se calcula de la siguiente manera:

$$V(G) = A_i A_j A_k A_l = \mu + a_i + a_j + a_k + a_l + b_{ij} + b_{ik} + b_{il} + b_{jk} + b_{jl} + b_{kl} + c_{ijk} + c_{jil} + c_{ikl} + c_{jkl} + d_{ijkl}$$

En este modelo, los efectos individuales de cada alelo (a) son llamados "efectos aditivos" y se comportan de la misma forma que en los modelos diploides; las interacciones de primer orden (b) se denominan efectos digénicos y son análogos a los efectos heteróticos en un locus del modelo diploide; las interacciones de segundo (c) y tercer (d) orden se denominan efectos tri y tetragénicos, respectivamente, y son propios de los modelos tetraploides.

Sobre la base del modelo anterior, y de acuerdo con el número de alelos presentes en un locus determinado, existen cuatro posibles genotipos que se definen como mono, di, tri o tetraalélico; o sus equivalentes monos, di, tri o tetragénico. Si la definición se hace sobre la frecuencia de un solo alelo en un determinado locus, existen cinco posibles genotipos: nuliplex (0), simplex (1), duplex (2), triplex (3) y cuádruplex (4).

Hill (1971) propuso un segundo modelo, basado en la suposición de que no haya más de dos alelos por locus, de manera que los efectos genéticos son el resultado de la frecuencia del alelo principal en cada genotipo. El  $V(G)$  del nuliplex es considerado como el efecto basal. La principal restricción reside en que la sumatoria de ambos alelos p y q es igual a 1 ( $p + q = 1$ ). Sobre la base de los valores genotípicos, los efectos genéticos en este modelo se denominan aditivos (valor del alelo principal en un determinado genotipo) o di, tri y cuádrigénicos, según la interacción entre dos, tres o cuatro copias del alelo principal de un determinado genotipo.

La formulación de modelos genéticos es fundamental para estimar los componentes de las varianzas y covarianzas genéticas y sus interacciones con el ambiente. Esto constituye la base para estimar valores de heredabilidad (proporción de la varianza fenotípica que puede ser atribuida a efectos genéticos) de distintos caracteres, predecir respuestas a la selección, anticipar cambios de frecuencias génicas, predecir comportamientos de poblaciones con desequilibrios gaméticos y de ligamiento, e interpretar los efectos detrimentales de la endocría en alfalfa. Para un tratamiento más amplio de todos estos temas se recomienda consultar Rumbaugh *et al.* (1988) y Ferreira *et al.* (2011). De acuerdo con Levings y Dudley (1963), la estimación de los componentes de la varianza genética en un autotetraploide puede hacerse utilizando cualquier diseño de apareamiento que no contemple el uso de la endocría. Una de las principales diferencias en el análisis genético entre autotetraploides y diploides radica en la interpretación de las covarianzas entre parientes (Kempthorne, 1955). La evaluación clonal es particularmente útil para estimar la magnitud de la varianza ambiental y su interacción con la varianza genotípica, lo que constituye una herramienta interesante para realizar estudios genéticos y para mejorar caracteres de baja heredabilidad, con una significativa interacción genotipo x ambiente (GxA).

Una particularidad de la alfalfa es su extrema sensibilidad a la endocría, que se manifiesta con una notable pérdida de vigor aun con bajos niveles de consanguinidad. Melton (1979) observó significativas reducciones de rendimiento de forraje y semilla con solo unas pocas generaciones de autofecundaciones. La endocría puede producirse no solo por la autofecundación del progenitor, sino también por el apareamiento de individuos autofecundados y relacionados entre sí (Rodríguez, 1986). Busbice y Wilsie (1966) han atribuido esta rápida depresión por consanguinidad a la pérdida de interacciones de segundo y tercer orden dentro de cada locus. Es importante tener en cuenta que la gameta diploide –propia de las especies tetraploides– es capaz también de mantener y transmitir un cierto nivel de endocría a través del polen o los óvulos, lo que ciertamente puede elevar el nivel de consanguinidad.

### *Implicancias de la autotetraploidía en el mejoramiento de alfalfa*

Además de las cuestiones de genética cuantitativa planteadas en el punto anterior, el fitomejorador debe considerar en su trabajo las implicancias prácticas derivadas de la naturaleza autotetraploide de la alfalfa. A diferencia de lo que sucede en las especies diploides, en un cruzamiento de alfalfa el rango total de genotipos esperables se logra luego de al menos dos generaciones en panmixia. En ese contexto, las combinaciones genotípicas extremas se producen en muy baja frecuencia. En la práctica, esto significa que si el objetivo es identificar genotipos extremos (nuliplex o cuádruplex), se deberá permitir la ocurrencia de un mínimo de dos generaciones de apareamientos al azar y se deberá evaluar un alto número de individuos (Busbice *et al.*, 1972).

Otra característica de los autotetraploides es que alcanzan el equilibrio gamético en forma asintótica. En condiciones de panmixia –y a diferencia de los diploides– los autotetraploides pierden en cada generación de apareamiento solo dos tercios del desequilibrio gamético debido a que la propia naturaleza de sus gametas impide la libre combinación de todos los alelos en una sola generación. En la práctica, se considera que el equilibrio gamético en la alfalfa se alcanza al cabo de al menos cuatro generaciones de panmixia (Busbice *et al.*, 1972).

Una tercera implicancia, como ya fuera mencionado, es la alta sensibilidad de la alfalfa a la endocría. Si bien existe la factibilidad de seleccionar genotipos adaptados a la autofecundación (Scotti *et al.*, 1994), la situación común es que cuando se tiene éxito en la formación de vainas, estas poseen un relativamente bajo número de semillas; además, esta simiente es usualmente más pequeña que lo normal y origina plántulas de poco vigor. En la mayoría de los casos, es muy difícil avanzar más allá de la segunda o tercera generación de autogamia. De este hecho se derivan dos consecuencias prácticas que condicionan la labor de fitomejoramiento de alfalfa: 1) el desarrollo de líneas homocigotas para la obtención de híbridos es impracticable; y 2) el desarrollo de variedades de alta producción de forraje y buena persistencia solo se logra intercruzando progenitores no endocriados ni relacionados, a fin de no producir progenies consanguíneas que manifiesten posteriormente signos de depresión por endocría en los caracteres de importancia.



Una cuarta implicancia es que cuando se selecciona por un solo gen dominante, como normalmente sucede en el mejoramiento de la resistencia a una plaga o enfermedad, la rapidez de la respuesta a la selección dependerá de la frecuencia inicial del gen en cuestión: a valores  $<0,5$ , la respuesta es generalmente rápida; a valores  $>0,5$ , la respuesta se hace lenta y poco perceptible; y, por un lado, si la frecuencia es  $= 0,5$ , el 93 % de los individuos de una población autotetraploide en equilibrio expresará el fenotipo dominante (Rodríguez, 1986). Por otro lado, si la frecuencia del gen dominante es muy baja, o si el carácter para mejorar está condicionado por un gen recesivo, se debe prestar particular atención a la detección y selección de solo los genotipos deseables, dado que la inclusión de genotipos indeseables ("escapes") puede retrasar notoriamente el progreso de la selección (Busbice *et al.*, 1972).

## Mejoramiento genético

### *Implementación de un programa de mejoramiento*

Además de conocer los conceptos previamente expuestos en la sección anterior, el mejorador deberá analizar cuidadosamente una serie de cuestiones que impactarán en la eficiencia y en el resultado final de su trabajo.

En primer lugar, es fundamental definir los objetivos del programa de mejoramiento, que deben ser claros y razonables en función del tiempo necesario para lograrlos y de la infraestructura disponible. En caso de tener que mejorar un conjunto de caracteres, es importante fijar un orden de prioridad, tratando de mejorar primero aquellos que aparecen como más deficitarios y, en etapas posteriores, mejorar las relativamente buenas características que pudieren estar ya presentes (Rodríguez, 1983). Complementariamente, y a efectos de conseguir una mayor eficiencia de trabajo, sería de gran utilidad conocer la correlación genética y fenotípica de los caracteres en cuestión. Una buena descripción de los objetivos más comúnmente presentes en el mejoramiento genético de la alfalfa podrá encontrarse en Rodríguez (1986).

Cualesquiera sean los caracteres por mejorar, debe existir un adecuado nivel de variabilidad genética para cada uno de ellos. El supuesto bási-

co para la concreción de un proceso de selección es la existencia de variabilidad genética que sea heredable. Los métodos de mejoramiento tradicionales hacen uso de la variabilidad genética que naturalmente está presente en la especie para mejorar o en sus especies relacionadas. Si la variabilidad del carácter fuera nula o no detectable, o ese carácter no estuviera naturalmente presente en el cultivo para mejorar, esa variabilidad deberá crearse. Esto se puede hacer mediante la inducción de mutaciones o el uso de técnicas biotecnológicas de ingeniería genética (GE por sus siglas en inglés), como el aprovechamiento de la variación somaclonal, la transgénesis, el silenciamiento génico, los marcadores moleculares, o la más reciente edición génica, entre otras. El empleo de agentes mutagénicos en alfalfa, muy en boga hace unas décadas, tiene actualmente un uso más acotado. Por el contrario, la utilización de técnicas GE adquiere cada vez más importancia. Así, por ejemplo, desde 2005 se lanzaron en Estados Unidos variedades comerciales de alfalfa transgénica resistentes al herbicida glifosato de amonio, conocidas como alfalfas RR o Roundup Ready® (Monsanto, 2005). En Argentina, se aprobó en 2018 la comercialización de variedades de alfalfas con dos eventos apilados: RR y menor contenido de lignina (HarvXtra®) (McCaslin, 2018), tecnología que ya se viene difundiendo en Estados Unidos desde 2017. También se han desarrollado alfalfas transgénicas experimentales con resistencia a lepidópteros (alfalfa Bt) o con expresión de taninos condensados en el follaje para reducción del timpanismo espumoso (Ardila *et al.*, 2003). Otra de las técnicas biotecnológicas empleadas es el uso de marcadores moleculares para desarrollar procesos de selección asistida y de selección genómica (Veronesi *et al.*, 2003). Las tecnologías de secuenciación de próxima generación, como los marcadores denominados *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) y el genotipado por secuenciación, son estrategias cada vez más accesibles y simples para la caracterización de la variabilidad genética. La edición génica precisa y controlada permite modificar la información genética de forma relativamente sencilla y cada vez más segura (Doudna y Charpentier, 2014).

Entre otras cuestiones puramente técnicas que el fitomejorador debe definir, se encuentra la elección del/los método/s de mejoramiento para emplear, las unidades de selección, el tamaño de la población para conducir, la intensidad de la selección y el grado de mejoramiento esperado

(Rumbaugh *et al.*, 1988). Ciertamente que, si se contara con información previa sobre la heredabilidad de los caracteres para mejorar, el peso relativo de los efectos génicos y la magnitud de la interacción GxA, la definición de los temas anteriormente mencionados se vería facilitada. Por ejemplo, para caracteres cualitativos y de alta heredabilidad, la utilización de la selección masal o de la selección fenotípica recurrente sería suficiente. Para caracteres cuantitativos, usualmente de baja heredabilidad y muy influenciados por el ambiente, la realización de pruebas de progenie podría ser aconsejable, ya sea *per se* o alternada con otros métodos de mejoramiento. Un comentario similar podría efectuarse respecto de las unidades de selección (plantas individuales, familias, o combinación de ambas).

Respecto del material básico de selección para utilizar en el programa de mejoramiento, resulta obvio mencionar que la elección de materiales con alto potencial de rendimiento y adecuada adaptación constituye un paso inicial de capital importancia para el desarrollo de variedades mejoradas. Todos los programas destinados a la obtención de variedades comerciales utilizan como base de sus bancos activos germoplasmas elite, con destacados atributos agronómicos como alto rendimiento de forraje, buena persistencia, resistencia a plagas y enfermedades y apropiado grado de reposo invernal. Complementariamente, las colecciones de germoplasma exótico se emplean solo como fuente de alelos raros o poco frecuentes en los materiales de los bancos activos, especialmente cuando se quieren resolver nuevos problemas sanitarios o mejorar caracteres no tradicionales o con poca variabilidad. En ese sentido, el uso de la colección base de germoplasma de alfalfa de los Estados Unidos se ha visto favorecido por la designación de una "colección núcleo" (*core collection*), que consistió en la identificación de unas 200 accesiones destinadas a representar, con un mínimo de repetitividad, la mayor parte de la variabilidad genética presente en una colección de más de 1100 entradas (Basigalup *et al.*, 1995). La evaluación de la colección núcleo puede orientar la búsqueda de alelos favorables en aquellos caracteres de evaluación costosa o compleja; de ese modo, si esos alelos se detectaran en algunas accesiones, se podrá luego intensificar la evaluación de las otras accesiones en la colección base que sean de idéntica o similar procedencia.

Otro de los temas fundamentales que el fitomejorador deberá precisar es la infraestructura con la que cuenta para llevar a cabo su trabajo. La disponibilidad de campo experimental, de herramientas y equipamiento, y de recursos humanos y financieros debe ser la adecuada para la consecución de los objetivos planteados en el programa de mejoramiento. En otros casos, además de lo anterior, puede ser necesario, por un lado, contar también con laboratorios, cámaras de cría (con condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo) e invernáculos. Teniendo en cuenta que el tiempo promedio que va desde el inicio de la evaluación y selección del material de crianza hasta el lanzamiento de un cultivar es al menos de 8 a 10 años, es importante que la infraestructura esté en condiciones operativas durante todo el proceso. Por otro lado, también debe tenerse en cuenta que la selección y síntesis de nuevas variedades se hace generalmente en las áreas de uso de esos materiales, las que suelen presentar condiciones desfavorables para la producción de semilla; en consecuencia, es aconsejable que el fitomejorador cuente también con lotes de multiplicación de sus poblaciones avanzadas y de semilla prebásica (*breeder*) o básica (fundación) en zonas apropiadas, donde las condiciones ambientales posibiliten altos rendimientos de semilla. De esta manera, podrá contar con la suficiente cantidad de simiente para la implantación de ensayos de evaluación en varias localidades. Obviamente, la multiplicación de esos materiales avanzados se hará con el necesario aislamiento y las adecuadas restricciones en cuanto a los años de cosecha de los lotes, a fin de asegurar la identidad genética de las poblaciones, evitando la deriva génica provocada por la selección natural que puede ejercer el nuevo ambiente.

### *Métodos de mejoramiento*

Los métodos de mejoramiento constituyen diferentes modos de combinar técnicas y unidades de selección con el posterior manejo de los genotipos seleccionados. En esta sección se ofrecerá simplemente una somera descripción de aquellos métodos más comúnmente utilizados en el desarrollo de variedades de alfalfa.

A fin de facilitar su descripción, los métodos de mejoramiento pueden clasificarse de acuerdo con distintos criterios. En este capítulo se seguirá

el criterio adoptado por Rumbaugh *et al.* (1988), que los agrupan según sistemas de apareamiento (intra- o interpoblacionales) y unidades de selección (individuos o familias). En la Tabla 1 se ofrece el listado de los métodos que más frecuentemente se han utilizado en el desarrollo de variedades de alfalfa. Es importante tener en cuenta que esta clasificación es conveniente solo a los fines de facilitar la comprensión de las particularidades de cada método, pero que de ningún modo supone su mutua exclusión. En ese contexto, el fitomejorador deberá decidir si para ser más eficiente en su trabajo combinará o no dos o más métodos diferentes.

■ **Tabla 1.** Clasificación de los métodos de mejoramiento más utilizados en alfalfa según sistemas de apareamiento (A y B) y unidades de selección (a y b). Adaptado de Rumbaugh *et al.* (1988).

A- Interpoblacional	B- Intrapoblacional
1- Formación de poblaciones	a- Selección de plantas individuales
2- Variedades Sintéticas/Sintéticos	1- Selección Masal/Fenotípica Recurrente
3- Retrocruzamientos	2- Evaluación Clonal
4- Cruzamientos Complementarios de cultivares	3- Pruebas de Progenie:
5- Híbridos	I) Polinización Abierta
	II) Autofecundación (S1)
	III) Topcross
	IV) Policruza
	V) Cruzamientos Dialélicos
	b- Selección de familias
	1- Familias de medio-hermanos
	2- Familias de hermanos completos
	3- Selección dentro de familias
	4- Selección combinada

En la actualidad, la gran mayoría de los programas de mejoramiento destinados a la obtención de variedades comerciales utilizan la producción de variedades sintéticas, el cruzamiento complementario de cultivares y la selección fenotípica recurrente. Seguidamente se ofrecerá primero una breve descripción de algunos métodos no muy empleados para luego centrar la descripción de aquellos más utilizados.

La formación de poblaciones es en realidad un término general que incluye cualquier forma de construcción y enriquecimiento poblacional que, usualmente a través de cruzamientos amplios y posterior selección, busca elevar la frecuencia de alelos favorables para los caracteres de interés (Tysdal *et al.*, 1942). El retrocruzamiento, dentro de sistemas de apareamiento interpoblacional, se ha utilizado en alfalfa para corregir alguna deficiencia, generalmente susceptibilidad a una plaga o enfermedad, en materiales agronómicamente muy valiosos. Se trata de un proceso iterativo en el que las plantas selectas se retrocruzan en cada ciclo de selección con individuos del padre recurrente a efectos de conservar el fenotipo original, pero con el carácter que se quiere mejorar ya incorporado. En alfalfa, a fin de disminuir el riesgo de endocría, se debe tener la precaución de utilizar en cada ciclo plantas diferentes del padre recurrente (Stanford y Houston, 1954). Si bien es un método esencialmente conservador que no se ha utilizado mucho, su empleo se ha visto favorecido en los últimos años por la necesidad de incorporar a poblaciones elite los caracteres generados por la biotecnología.

Como ya se mencionara anteriormente, el desarrollo de líneas endocriadas de alfalfa para la obtención de híbridos capaces de capitalizar las acciones génicas no aditivas es sumamente difícil debido a la marcada depresión por endocría que la especie manifiesta. Como alternativa, Burkart (1947) propuso la clonación de genotipos seleccionados y su posterior apareamiento para formar "híbridos" simples y dobles; sin embargo, el costo y el esfuerzo que demanda este procedimiento lo hicieron comercialmente impracticable. Barnes *et al.* (1972) concluyeron que la autoincompatibilidad en la alfalfa no era un mecanismo lo suficientemente confiable para el control de la polinización en la obtención de híbridos. El uso de androesterilidad citoplásmica, sugerido por Davies y Greenblatt (1967) y por Bradner y Childers (1968), tampoco dio los resultados esperados; además, la herencia autotetraploide complica el empleo de genes restauradores de la fertilidad. No obstante, existen en el mercado algunas variedades híbridas que provienen del cruzamiento de un clon A androestéril por otro clon B fértil (que puede o no ser restaurador de la fertilidad); en la etapa siguiente, ese híbrido AB se cruza por un clon C fértil y la semilla del producto final se cosecha en *bulk* (Wiersma, 2001). En sentido estricto, estas variedades son en realidad semihíbridos porque, al cosecharse en *bulk*, una parte de la se-

milla se origina de cruzamientos entre individuos del clon C. Por ello, la proporción de individuos híbridos (AB x C) y no híbridos (C x C) en cada ciclo de producción de semilla no es constante sino variable, a punto tal que en el rótulo de las bolsas de semilla se consigna la existencia de un porcentaje mínimo (cerca del 85 %) de semilla híbrida. Brummer (1999) propuso el empleo de otro tipo de semihíbrido basado en el desarrollo y el mantenimiento de dos grupos heteróticos que cuando finalmente se combinan dan como resultado una población en la que la mitad de la progenie proviene de cruzamientos interpoblacionales y la otra mitad de cruzamientos intrapoblacionales. En el mismo sentido, Bingham (1983a; 1983b) sugirió un esquema de doble cruzamiento [(A x B) x (C x D)] entre cuatro cultivares no emparentados, calculando que en la tercera generación de cruzamientos al azar (Syn-3) el 50 % de los individuos debería ser el resultado del doble cruzamiento, expresando así el máximo grado de heterocigosis.

Una ventaja de la alfalfa es su facilidad para la propagación vegetativa (clones) a través del enraizamiento de trozos de tallo (esquejes) en sustratos inertes como vermiculita, arena, perlita u otros (Figura 1). Para lograr una mayor eficiencia de clonado, los tallos a utilizar deben ser jóvenes, vigorosos y de crecimiento activo. La evaluación clonal se puede usar para la valoración de caracteres cuantitativos de la biomasa aérea o también para estimar la magnitud de la varianza ambiental. Por el contrario, dado que la clonación altera el normal desarrollo de las raíces, su utilización no es aconsejable en la evaluación de caracteres radiculares.



■ **Figura 1.** Propagación vegetativa de alfalfa (clones): a) tallos de alfalfa colocados en medio inerte y humedad adecuada; b) tallos de alfalfa enraizados transplantados a maceta para su desarrollo.

Las pruebas de progenie tienen por finalidad la identificación de genotipos superiores a través de la evaluación de su descendencia. Una vez identificados, los genotipos parentales selectos (no su descendencia) son inter cruzados para producir la siguiente generación de selección. Todas las pruebas de progenie requieren al menos una generación extra por cada ciclo de selección y una considerable cantidad de recursos (particularmente los cruzamientos dialélicos y el *topcross*), por lo que, en general, se reservan para estudios genéticos (estimación de la aptitud combinatoria general o específica) o para el mejoramiento de caracteres poligénicos, de baja heredabilidad y muy influenciados por el ambiente. La diferencia fundamental de la selección de familias respecto de los métodos de mejoramiento intrapoblacional con evaluación de progenie radica en las unidades de selección: en este caso las mejores progenies (no los genotipos parentales) son inter cruzados para producir la siguiente generación en el proceso de mejoramiento. La selección de familias ya sea de medio hermanos o de hermanos completos es más efectiva que la selección masal para mejorar caracteres cuantitativos. En el caso de la selección dentro de cada familia, la diferencia radica en que solo los mejores individuos dentro de cada familia son seleccionados para inter cruzarse y producir la siguiente generación de selección. La selección combinada complementa la selección entre familias con la elección de individuos dentro de cada familia selecta.

El concepto de variedades sintéticas fue originalmente sugerido para maíz y supone, como requisito para la elección de los progenitores, el desarrollo de pruebas de progenie para determinar su aptitud combinatoria general. Busbice (1969) definió a una variedad sintética de alfalfa como “un cultivar producido por el libre apareamiento de varios progenitores, de manera tal que cada posible cruzamiento tenga igual probabilidad de ocurrencia”. En alfalfa, Tysdal y Crandal (1948) habían propuesto el uso de las pruebas de progenie de policruza para la estimación de la aptitud combinatoria de los clones para seleccionar como progenitores de la nueva variedad. No obstante, los programas actuales de mejoramiento han eliminado la determinación de la aptitud combinatoria, atendiendo a la mayor demanda de tiempo y recursos que implica su implementación. En ese contexto, la elección de los progenitores de la nueva variedad se basa solamente en una valoración fenotípica de aquellos caracteres considerados agrónomicamente importantes,



como rendimiento, persistencia, vigor, resistencia a insectos y enfermedades, reposo invernal y la calidad forrajera, entre los más frecuentes. En consecuencia, el proceso de formación de una variedad sintética se limita a la selección de los individuos progenitores (Syn-0) y su posterior intercrucamiento para la producción de la semilla de primera generación de síntesis (Syn-1); seguidamente, la semilla Syn-1 es utilizada para la producción de la semilla Syn-2; y así sucesivamente. Vale decir que una variedad sintética, o simplemente “sintético” como también suele denominarse, es un conjunto de infinitos genotipos con un alto grado de uniformidad fenotípica que se mantiene a lo largo de las generaciones. De esta manera, se permite la expresión de un buen nivel de heterosis al tiempo que se conserva una apreciable variabilidad genética. Obviamente, esto último dependerá del número de progenitores utilizados y del grado de consanguinidad entre ellos. En este sentido, se suele hacer una distinción arbitraria y no muy precisa entre sintéticos de “base angosta” (<100 progenitores) y de “base amplia” (>100 progenitores). Debe tenerse en cuenta que el rendimiento de forraje de una variedad sintética decrece a medida que avanzan las generaciones de síntesis –especialmente entre la Syn-1 y la Syn-2 (Kehr *et al.*, 1961)–, hasta alcanzar un equilibrio alrededor de la Syn-4 o Syn-5. Atendiendo a que estas últimas constituyen usualmente la semilla comercial que llega al productor, sería deseable que las redes de evaluación de variedades incluyeran al menos una generación de esa semilla comercial, a fin de reflejar el verdadero comportamiento de una variedad en las condiciones reales de producción. La tasa de disminución del rendimiento de un sintético depende no solo de la generación de síntesis, sino también del número de padres utilizados, de su grado de consanguinidad y de la cantidad de autofecundaciones que se produzcan durante el proceso de multiplicación de la semilla (Busbice, 1970). En ese sentido, los sintéticos de base amplia deberían ser más estables en generaciones avanzadas que los de base angosta; sin embargo, Busbice y Gurgis (1976) concluyeron que el uso de solo 16 progenitores no emparentados ni endocriados debería ser suficiente para reducir a un mínimo la endocria de una variedad sintética en el punto de equilibrio. Por su parte, Hill (1971) sugirió que los fitomejoradores deberían enfatizar el alto potencial de rendimiento de los progenitores más que sus posibilidades de combinación, dado que a partir del uso de cuatro individuos

parentales la ganancia adicional aportada por la combinación de estos se reduce a un mínimo.

Los cruzamientos complementarios de cultivares (*strain crosses*) tienen por objetivo reunir en una sola población las buenas características de dos o más fuentes de genes de interés, sean estas fuentes cultivares, ecotipos, accesiones de germoplasma o germoplasmas mejorados (*prebreeding*). Para ello, se combinan plantas individuales o semillas de cada fuente de forma tal que se produzca la mayor cantidad de cruzamientos posibles entre ellas. Los policruzamientos pueden hacerse en forma manual o natural (polinizadores); en este último caso, se han utilizado con éxito las jaulas de polinización, la siembra o trasplante en hileras alternadas bajo condiciones de aislamiento, y el uso de grillas especialmente diseñadas. Las poblaciones resultantes, una vez en equilibrio, pueden utilizarse directamente como cultivares comerciales o como fuentes de germoplasma (Elgin *et al.*, 1983). Este método de mejoramiento tiene las ventajas de su fácil implementación y de permitir la expresión de un grado considerable de heterosis, en particular cuando las fuentes génicas que se utilizan no están relacionadas ni endocriadas (Hill, 1983). Busbice *et al.* (1972) demostraron que, si se cruzan dos poblaciones que difieren en un gen dominante en distintos loci, cada uno con una frecuencia de 0,5, la población resultante tendrá al alcanzar el equilibrio una proporción de 46,7 % de individuos con ambos genes dominantes, 43,3 % con solamente uno de ellos y solo el 10 % con ninguno de los dos. Esto es especialmente importante para el mejoramiento de niveles de resistencia a plagas y enfermedades, dado que se trata de caracteres cualitativos comúnmente condicionados por genes dominantes.

La selección fenotípica recurrente (SFR) es un refinamiento de la selección masal, donde los individuos son primero seleccionados por su fenotipo y luego esos genotipos seleccionados son intercruzados, sea de manera manual (Figura 2) o con insectos, para producir la siguiente generación de selección. Estos pasos se repiten de manera cíclica o recurrente tantas veces como sea necesario hasta alcanzar el nivel de mejoramiento propuesto (Hanson *et al.*, 1972). A diferencia de la selección masal, la fuente de polen se restringe solo a los individuos seleccionados.



■ **Figura 2.** Cruzamientos manuales: a) recolección de polen para la policruza; b) policruzamiento de las selectas.  
Foto: Valeria Arolfo.

A través de los ciclos de SFR se busca incrementar progresivamente la frecuencia de los alelos favorables para mejorar los caracteres deseados. El método está particularmente indicado para el desarrollo de poblaciones de alfalfa con resistencia combinada a plagas y enfermedades, dado que posibilita una gran presión de selección y complementa el corto intervalo generacional de la especie con un esquema cíclico de selección (Haag y HILL, 1974). De esa manera, se pueden evaluar grandes poblaciones de plantas y seleccionar un número relativamente alto de progenitores para producir la siguiente generación de selección, lo que es importante para el mantenimiento de bajos niveles de endocría. Sobre esto último, se ha sugerido que en alfalfa deberían policruzarse en cada ciclo no menos de 75 individuos (Hill *et al.*, 1969). La SFR, al igual que la selección masal, es más efectiva para el mejoramiento de caracteres cualitativos y de alta heredabilidad; no obstante, también ha sido usada con buenos resultados en especies forrajeras para la mejora del rendimiento y de otros caracteres cuantitativos (Twamley, 1974). Para su empleo exitoso, es fundamental mantener una adecuada presión de selección (Rodríguez, 1986). Como lo señalan Hill y Haag (1974), las complicaciones que pueden aparecer con la utilización de este método se relacionan con una baja frecuencia inicial de los alelos de interés, una baja heredabilidad del carácter en cuestión y un elevado valor de la varianza ambiental.

### *Incorporación de transgenes*

La naturaleza autopoliploide de la alfalfa plantea una problemática muy especial en lo referente a la incorporación de transgenes para el desa-

rollo de variedades GE. La típica variedad transgénica de una especie diploide posee un transgen proveniente de un único evento de transformación, que está presente en condición hemicigota en una única ubicación en el genoma (ejemplo: A-). La forma de incorporar ese material transgénico ( $T_o$ ) en los programas de mejoramiento es retrocruzarlo con líneas elite y luego autofecundar esas plantas hasta alcanzar la homocigosis (AA); si esas líneas homocigotas son usadas para la producción de híbridos  $F_1$  o cultivares, la totalidad de las plantas resultantes de esos cruzamientos tendrán el fenotipo transgénico (A- o AA). Por el contrario, para el caso de la herencia autotetraploide de la alfalfa, Samac y Temple (2004) señalaron que la obtención de un nivel suficientemente alto de expresión de un carácter transgénico (> 90-95 %) requeriría el uso de individuos que tuvieran un evento particular en condición duplex (AA- -), triplex (AAA-) o cuádruplex (AAAA). En consecuencia, se haría necesaria la utilización de pruebas de progenie que permitieran la identificación de individuos que compartan el mismo fenotipo transgénico. Además del mayor trabajo que supone esta situación, la selección y las pruebas de progenie incrementan el riesgo de generar una significativa depresión por endocria o deriva genética. A fin de superar estas dificultades, además de ahorrar recursos y maximizar la expresión de caracteres transgénicos en autoploides, se propusieron el uso de marcadores moleculares (McCaslim *et al.*, 2002) y de plantas "multi-homogénicas", esto es, individuos con más de una copia del transgen en diferentes loci independientes dentro del genoma (Samac y Temple, 2004). Las plantas que poseen al menos una copia de un transgen determinado provenientes de dos eventos independientes se denominan "dihomogénicas". Por ejemplo, una planta que tenga un transgen en la condición simplex en el locus A y duplex en el locus B se denomina "dihomogénica 1,2", vale decir que su genotipo es A- - - BB - -. Esas plantas dihomogénicas son luego utilizadas en un proceso de selección genotípica recurrente para introgresar el carácter transgénico de interés en el material de cría.

El método descrito fue utilizado con éxito en el desarrollo de poblaciones de alfalfa RR (Temple *et al.*, 2002). En este caso concreto se utilizaron cuatro líneas experimentales de alfalfa, cada una contenía una copia simple del transgen RR proveniente de cuatro eventos independientes (A, B, C y D). Para cada una de ellas, se determinó la posición

de la inserción mediante una tecnología PCR evento-específica, donde un primer se fusiona con una secuencia del flanco dentro de la región 5' o 3' del transgen, mientras que el otro primer se fusiona con la región del flanco correspondiente al genoma de la planta. De esta manera se pudieron evaluar miles de plantas transgénicas, hasta identificar los genotipos dihomogénicos adecuados que se utilizaron como parentales en cada generación de síntesis a través de un proceso de selección genotípica recurrente. Complementariamente, se desarrolló un modelo computarizado para predecir la pureza y la herencia del transgen dominante en una estructura autotetraploide con dos eventos independientes de transformación (McCaslin *et al.*, 2002). El evento de lignina reducida que se usó para desarrollar variedades comerciales HarvXtra® se generó a través de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* del clon de alfalfa R2336, utilizando un vector binario que contiene dos T-ADN (Barros-Rios, 2018).

En Argentina, Josefkwicz *et al.* (2018) presentaron un proceso alternativo para la producción de variedades de alfalfa transgénica que utiliza un solo evento GE en una configuración supertransgénica (mini inversión paracéntrica) en condición heterocigota. El procedimiento se usó para introgresar el transgen BAR –utilizado en este caso tanto como marcador seleccionable como gen de interés–, que confiere tolerancia al glufosinato de amonio, un herbicida de contacto de amplio espectro de control (Soto, 2018). Previamente, ese grupo de trabajo había informado la transformación mediada por *A. tumefaciens* del clon de alfalfa C23 regenerativo (García *et al.*, 2014) y la alta eficiencia del vector binario pPZP200BAR para la producción rápida y económica de grandes bibliotecas de eventos transgénicos (Jozefkwicz *et al.*, 2016). El procedimiento combina una alta expresión de los transgenes con el análisis RTqPCR para identificar plantas individuales con dos copias del transgen BAR; de esta forma se maximiza la frecuencia del transgen en el germoplasma elite luego de varias generaciones de retrocruzamiento. Para mayores detalles sobre esta técnica, consultar el capítulo 7 de este libro.

### *Protocolos de selección*

Los protocolos de selección –que son la combinación de procedimientos de laboratorio, invernáculo, cámara de cría y campo– permiten la

evaluación de los caracteres para mejorar y posibilitan la identificación y selección de los genotipos que reúnan las cualidades buscadas. La *North American Alfalfa Improvement Conference* (NAAIC) (<https://www.naaic.org/resource/stdtests.php>) publica la serie completa de pruebas estandarizadas que se han establecido para la caracterización de los niveles de resistencia a las principales plagas y enfermedades de importancia económica. En ellos se especifican las condiciones de cultivo de patógenos o de cría de insectos, las condiciones ambientales de las pruebas y los testigos (cultivares o líneas experimentales) resistentes y susceptibles para emplear en cada caso. También se incluyen las especificaciones para la evaluación de varios caracteres agronómicos, tales como grado de reposo invernal, tolerancia al pastoreo, resistencia al frío, calidad forrajera y hojas multifolioladas, entre otras. Para la implementación de un programa de mejoramiento, se pueden tomar esas indicaciones como referencia, seleccionando e inter cruzando los genotipos resistentes. Tal es el caso de los protocolos para resistencia a antracnosis (*C. trifolii* Bain & Essary) (Figura 3), a fitóftora (*Phytophthora megasperma*) (Figura 4), a pulgón azul (*Acyrtosiphon kondoi Shinji*) y a pulgón moteado (*Terioaphis maculata Monnell*) (Figura 5).

En la bibliografía existen también muchos otros protocolos de selección para el mejoramiento de otros caracteres de importancia. Por ejemplo, Goplen *et al.* (1993) describieron la técnica *in situ* de la bolsa de nylon modificada para la identificación de las plantas con menor velocidad inicial de desaparición ruminal en la búsqueda de tolerancia al timpanismo espumoso (empaste). Lamb *et al.* (2000) publicaron métodos para la caracterización morfológica de raíces en alfalfa, sugiriendo estandarizar no solo la edad de la planta y las prácticas culturales, sino también las condiciones ambientales para evaluar el diámetro de la raíz pivotante, el número de raíces laterales o secundarias y la masa de raíces fibrosas. Dall'Agnol *et al.* (1996) compararon diferentes técnicas de evaluación y selección para el desarrollo de germoplasmas de alfalfa tolerantes a suelos ácidos y con niveles tóxicos de aluminio. Smith (1998), entre otros autores, ha sugerido un método para la identificación de plantas de alfalfa tolerantes a la salinidad.





■ **Figura 3.** Protocolo de selección por resistencia a antracnosis (*C. trifolii*) en ambiente controlado: (a) cultivo del hongo patógeno en agar papa y recuento de esporas; (b) plántulas listas para ser infectadas con suspensión de esporas; (c) cámara húmeda (24-72 h) para favorecer la infección y d) identificación de genotipos resistentes (R). Adaptado de NAAIC.



■ **Figura 4.** Protocolo de selección por resistencia a fitóftora (*P. megasperma*) en condiciones de campo: (a) poblaciones para evaluar con testigos resistentes y susceptibles y condiciones propicias para el patógeno (alta humedad y suelo infectado); (b) extracción de plantas para su evaluación; (c) lavado de plantas para evaluación de síntomas y d) selección por sintomatología. Adaptado de NAAIC.



■ **Figura 5.** Protocolo de selección por resistencia a pulgones (*A. kondoi* y *T. maculata*) en ambiente controlado: (a) cría de pulgones en tallos de alfalfa; (b) plántulas listas para la infestación; (c) genotipos infestados y d) identificación de genotipos resistentes (R) y susceptibles (S). Adaptado de NAAIC.

### *Selección por más de un carácter*

Es posible que un programa de selección tenga como objetivo mejorar un solo carácter excluyente, pero por lo común –y especialmente cuando se quieren desarrollar cultivares comerciales– se debe seleccionar por dos o más caracteres de importancia. Para ello se han diseñado las llamadas “técnicas de selección para caracteres múltiples”, que en el caso de la alfalfa se dividen básicamente en tres: a) niveles independientes de selección; b) selección en tándem; y c) selección por índices (Rumbaugh *et al.*, 1988). Cada una de ellas se complementa con los métodos de mejoramiento descriptos con anterioridad, especialmente con la selección fenotípica recurrente.

En los niveles independientes de selección se establecen niveles para alcanzar para cada carácter incluido en el programa y se retienen, en el mismo ciclo de mejoramiento, todas las unidades de selección (plantas individuales o familias) que satisfagan esos niveles prefijados. Por ejemplo, si se quisieran mejorar los caracteres A, B y C, se puede comenzar seleccionando las plantas que alcancen el nivel establecido para A; seguidamente, de esas plantas, se eligen las que satisfagan el nivel para el carácter B; y finalmente, de esas selectas, se retienen las que alcancen el nivel establecido para el carácter C. Las plantas selectas por los tres caracteres son finalmente intercruzadas para producir la siguiente generación de mejoramiento o ciclo de selección. A fin de reducir las posibilidades de consanguinidad, es fundamental partir con un número inicial elevado de plantas, especialmente si la frecuencia de alelos favorables es de moderada a baja. Una variante de este procedimiento,



empleada para el desarrollo de resistencia múltiple a insectos y enfermedades, se denomina eliminación sucesiva y consiste básicamente en exponer a la siguiente plaga/enfermedad los individuos sobrevivientes de la plaga/enfermedad anterior, y así sucesivamente.

Para la selección en tándem se realizan tantos ciclos o generaciones de selección como sean necesarios hasta alcanzar el nivel preestablecido para el carácter A. Con los individuos de la población experimental mejorada para ese primer carácter (A), se comienza a mejorar –de la misma forma– el carácter B. Seguidamente, con esa nueva población mejorada para los caracteres A y B, se comienza a seleccionar por el carácter C. Y así sucesivamente hasta desarrollar una población mejorada para todos los caracteres de interés.

En la selección por índices se definen los caracteres para mejorar y se establece una escala para cada uno de ellos. Seguidamente, se calcula un índice final para cada unidad de selección, ponderado por la importancia genética y económica de cada carácter. En ese contexto, solo las unidades de selección que alcancen ese índice ponderado son retenidas e intercruzadas para producir la semilla de la siguiente generación de selección. Este procedimiento es más efectivo cuando se trabaja con caracteres de alta heredabilidad y que, a su vez, tienen una moderada a alta correlación genética entre sí (Rodríguez, 1986). Harris (1964) sugirió el uso de poblaciones grandes ( $\geq 1000$  individuos) para minimizar los errores en la estimación de las ganancias esperadas con el empleo de índices de selección.

De acuerdo con Hazel y Lush (1942), la selección por índices es más eficiente que la selección por niveles independientes, y esta, a su vez, es más eficiente que la selección en tándem. Por un lado, la superioridad de la selección por índices se incrementa cuanto mayor es el número de caracteres para mejorar, pero disminuye cuando los caracteres difieren en importancia o cuando se debe incrementar la intensidad de selección. Por otro lado, si los caracteres para mejorar tienen igual importancia y los valores de sus varianzas y heredabilidades son similares, la selección por niveles independientes es más efectiva que la selección en tándem (Rumbaugh *et al.*, 1988); sin embargo, esta última es menos demandante en recursos e infraestructura. Obviamente, el fitomejorador deberá definir su curso de acción basado no solo en las

cuestiones estrictamente técnicas, sino también en sus condiciones reales de trabajo (recursos, infraestructura, etc.) y en las particularidades de los caracteres para mejorar (momento de expresión del carácter, requerimientos ambientales, etc.).

## Mejoramiento de alfalfa en Argentina

La alfalfa fue introducida en Argentina desde Chile y Perú por los conquistadores españoles en el siglo XVII, cultivándose primero en las provincias de Cuyo y luego en Córdoba, para finalmente llegar a la zona del Plata en el siglo XVIII (Itria, 1986). Hacia fines del siglo XIX y principios del siglo XX, con la apertura de la llanura pampeana a la explotación agropecuaria, se produjo una difusión explosiva que alcanzó su punto máximo (8.500.000 ha) en 1921-22. La especie originalmente introducida fue *Medicago sativa*, aunque desde el Perú se introdujeron poblaciones de morfología y comportamiento algo diferentes, identificadas taxonómicamente como *M. sativa* var. *Polia* y conocida en aquel entonces como “alfalfa peruana” (Burkart, 1952). Posteriores introducciones realizadas en la región Pampeana y en algunas zonas de regadío de la Patagonia norte, caracterizadas por la presencia de flores variegadas, se emparentaban con poblaciones de *M. varia*. La gran expansión del cultivo durante las primeras décadas del siglo XX se produjo con grandes importaciones de semillas de diversos orígenes, principalmente de Italia, Francia, Alemania, Turquistán, Rusia y Siria (Rodríguez, 1986).

De acuerdo con Itria (1986), los diversos orígenes y las modalidades de uso en cada región del país fueron delineando la formación de diferentes ecotipos (landraces) a lo largo del tiempo. Así, en la región Pampeana más austral, donde la utilización predominante fue bajo pastoreo continuo, se desarrollaron poblaciones de corona ancha, tallos foliosos, porte semierecto y reposo invernal más marcado (GRI 4-5). Estos ecotipos se denominaron, de acuerdo con su zona de origen, como “pampeano”, “de Villarino”, etc. Más al norte, se desarrollaron ecotipos de menor reposo (GRI 6-7), con mayor rapidez de rebrote y coronas intermedias, que se denominaron colectivamente “alfalfa cordobesa”. En el NOA, las alfalfas “peruanas”, cultivadas en condiciones de regadío y utilizadas básicamente bajo corte, desarrollaron ecotipos sin reposo

invernal (GRI 8), de coronas más pequeñas, tallos huecos, porte erecto y rápido rebrote. Esas poblaciones se conocieron según su zona de origen y uso como "Saladina", "Inverniza", "Vallista", etc.

Hasta principios de los años 1950, los trabajos relacionados con el mejoramiento de la alfalfa se focalizaron en estudios de biología floral (Burkart y Ragonese, 1933; Burkart, 1937a.) y propuesta de algunos métodos de mejoramiento (Burkart, 1947). Por un lado, también se llevaron a cabo trabajos de selección de alfalfas resistentes al nematodo del tallo (*Anguillulina dipsaci*, *syn. Ditylenchus dipsaci*) (Burkart, 1937b; Tomé, 1947) y la obtención por parte de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires de dos variedades tolerantes: Nemasint y San Martín FAV (Kugler *et al.*, 1963). Por otro lado, en el Instituto de Fitotecnia de Castelar, Covas y Fernández (1947) y Covas *et al.* (1949) usaron infecciones artificiales para identificar genotipos resistentes al nematodo del tallo y realizaron estudios sobre técnicas de emasculación, porcentaje de fecundación cruzada y clonación por estacas, entre otras cosas. A mediados de los años 1950, desde el Ministerio de Agricultura y Ganadería se desarrolló el cultivar Fortín Pergamino MAG (Kugler *et al.*, 1963). Después de la creación del INTA (año 1956) se obtuvieron las variedades Bordenave INTA, Polihíbrido Manfredi, Salagrim INTA, Híbrida INTA, Anguil INTA y Varsat INTA (Kugler *et al.*, 1963). Sin embargo, todos estos cultivares tuvieron nula o muy poca difusión comercial y no trascendieron al gran cultivo.

Durante los años 1960 la alfalfa comenzó a experimentar una serie de problemas que afectaron notoriamente su producción y persistencia. La situación hizo crisis en 1969 con la irrupción del pulgón verde (*Acyrtosiphon pisum* Harris), que causó enormes pérdidas y una significativa retracción en el área de siembra (Itria, 1969). Ante esto, el INTA creó en 1970 el Programa Alfalfa, orientado a generar investigaciones sobre el cultivo en una manera más orgánica y aplicada a la resolución de los numerosos problemas. El programa se organizó en cinco equipos de trabajo (Mejoramiento Genético y Evaluación de Variedades, Manejo del Cultivo, Entomología, Fitopatología y Producción de Semillas) y contó con la asistencia técnica y financiera de la FAO a través del Proyecto Alfalfa FAO/INTA Arg 75/006. Los resultados de estos trabajos se publicaron en el libro "Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa"

(INTA, 1986). Como resultado de la labor de mejoramiento del programa, se obtuvieron los cultivares Painé INTA, Fortinera INTA, Salinera INTA y Cordobesa INTA (Rodríguez, 1986). No obstante, como en los casos anteriores, ninguno de estos materiales alcanzó mayor difusión comercial.

Desde 1987, y como consecuencia de una política de apertura institucional, el mejoramiento de alfalfa del INTA se viene llevando a cabo a través de convenios de vinculación tecnológica (CVT) con empresas del sector privado. En ese marco, el INTA es el responsable del desarrollo de cultivares –que se inscriben en el INASE como propiedad del INTA– y la empresa contraparte toma a su cargo la multiplicación y comercialización de las variedades que se inscriban en carácter de licenciatario exclusivo. A cambio de este licenciamiento, la contraparte financia los trabajos de selección, evaluación y obtención de cultivares, y abona al INTA un porcentaje de sus ventas en concepto de regalías. Las actividades se coordinan desde la EEA INTA Manfredi e incluyen la participación de otras unidades del INTA, que llevan a cabo tareas de evaluación de poblaciones experimentales (Rafaela, Gral. Villegas y Santiago del Estero) y de producción de semilla prebásica (breeder) o básica (fundación) de las poblaciones experimentales (H. Ascasubi).

La primera etapa de vinculación (1987-1997) se hizo con las empresas SanCor y Produsem y dio como resultado la inscripción de los cultivares: Monarca SP INTA, Victoria SP INTA, Gloria SP INTA, Rocío SP INTA, Esmeralda SP INTA, Costera SP INTA, Perla SP INTA y Bárbara SP INTA. De ellas, las dos primeras alcanzaron una gran difusión comercial, a punto tal que en la actualidad –ya como variedades públicas– siguen teniendo una importante participación en el mercado. La segunda etapa (1998-2008) se hizo con la empresa Produsem y arrojó como resultado la inscripción de los cultivares ProINTA Luján, ProINTA Patricia, ProINTA Carmina (menor potencial timpanizante), ProINTA Mora y ProINTA Súper Monarca. Estas variedades alcanzaron una importante participación en el mercado, especialmente las dos primeras. La tercera etapa (2009-2019) se llevó a cabo con la empresa Palo Verde SRL y dio como resultado la inscripción de tres cultivares: Pulmarí PV INTA, Traful PV INTA y Limay PV INTA. La cuarta etapa, que se inició a fines de 2019 y que durará hasta 2029, también con Palo Verde SRL como socio estratégico,

dio como resultado hasta el presente la inscripción de otros dos nuevos cultivares: Kumén PV INTA (tolerante a salinidad) y Amaya PV INTA (alta expresión multifoliolada). En la siguiente sección de este capítulo se hará una descripción más detallada de estas dos últimas variedades.

Además de la labor del INTA, por un lado, tanto el sector privado –a través de varias empresas– como otros actores del sector público –básicamente universidades– tienen también programas de desarrollo de variedades de alfalfa. Por otro lado, hay varias empresas semilleras que comercializan cultivares de alfalfa desarrollados por empresas internacionales, algunas de las cuales también tienen programas de selección en el país. En el RNC del INASE hay registradas más de 430 variedades de alfalfa, de las cuales cerca de 120 se pueden encontrar actualmente en el mercado. De ahí la importancia de orientar a los productores en su elección por medio de los datos de producción y persistencia proporcionados por la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa conducida por el INTA. Para más detalles sobre esto último, se recomienda consultar el capítulo 8 de este libro.

### *Mejoramiento de caracteres específicos*

La gran mayoría de las variedades del INTA mencionadas en la sección anterior se han desarrollado teniendo en cuenta los objetivos tradicionales comunes a los programas de mejoramiento de alfalfa: producción de forraje, persistencia y resistencia combinada a plagas y enfermedades. Pero también el programa del INTA contempla el desarrollo de cultivares mejorados para otros caracteres específicos, como la tolerancia a estreses abióticos, el mejoramiento de la calidad forrajera y el uso de técnicas moleculares como herramientas de selección. Seguidamente, se hará una breve mención de aspectos conceptuales y tareas realizadas desde el INTA para el mejoramiento de algunos de estos caracteres de importancia económica y ambiental. Complementariamente, se incluyen consideraciones sobre la selección por tolerancia a la acidez edáfica, carácter que es abordado actualmente por el programa del INTA.

*1- Tolerancia a la salinidad.* La salinidad es uno de los estreses abióticos más importantes que afectan el crecimiento y la productividad de las plantas a nivel mundial (Munns y Tester, 2008). La salinidad de los

suelos afecta la captación de agua por parte de las plantas; además, la presencia de niveles excesivos de algunos cationes puede resultar tóxica, alterando varios procesos metabólicos. En muchos casos, los problemas de salinidad tienen ocurrencia estacional, principalmente durante el verano. Las altas temperaturas aceleran los procesos de subida capilar del agua edáfica y su pérdida por evapotranspiración, lo que aumenta la concentración de sales en superficie. En épocas de lluvias o de menores temperaturas, al subir la napa freática, la concentración de sales tiende a diluirse. En áreas deprimidas, donde la napa freática está cercana a la superficie, el estrés salino está usualmente asociado al anegamiento (Humphries y Auricht, 2001). Todo este contexto plantea desafíos adicionales a los cultivos perennes como la alfalfa que deben enfrentar estas cambiantes situaciones a lo largo de su vida.

Históricamente, la alfalfa ha sido clasificada como moderadamente sensible a la salinidad, con una disminución del rendimiento a partir de los  $2 \text{ dS m}^{-1}$  CEx (conductividad eléctrica del extracto en pasta de suelo saturado). No obstante, trabajos más recientes señalan que la especie posee una tolerancia bastante mayor que la inicialmente asumida. En este sentido, Benes *et al.* (2018) evaluaron una amplia colección de variedades de alfalfa en condiciones de invernáculo y observaron altos niveles de tolerancia a salinidades de agua de riego  $>5 \text{ dS m}^{-1}$  CEa (conductividad eléctrica en agua), con una variación significativa entre variedades. Señalaron también que en un estudio de tres años en condiciones de campo irrigado con agua que contenía  $5-7 \text{ dS m}^{-1}$  CEx, las plantas exhibieron producciones normales de forraje y excelente persistencia. En otro ensayo de campo regado con agua salina de  $8-10 \text{ dS m}^{-1}$  CEx, lo que determinó conductividades en el suelo del orden de  $10-16 \text{ dS m}^{-1}$  CEx, el promedio de pérdida en el rendimiento de 21 variedades fue solo de 9 a 13 %.

La salinidad afecta a las plantas de dos maneras importantes: a través del estrés osmótico y del estrés iónico (Flowers *et al.*, 2015). Para hacer frente al estrés por salinidad es necesario que las plantas desarrollen tanto respuestas fisiológicas y bioquímicas como estrategias ecológicas para evitar o tolerar el estrés. Algunas estrategias comunes incluyen la captación de iones por las raíces, la exclusión de iones de las raíces, la acumulación de iones en las vacuolas de las células de la

raíz o del follaje, la regulación del transporte de iones de la raíz al follaje, el aumento de la tolerancia a altas concentraciones de iones tóxicos y la acumulación de solutos compatibles (Gupta y Huang, 2014). Para abordar este problema complejo es importante vincular las respuestas bioquímicas y fisiológicas con los mecanismos genéticos subyacentes. La identificación de los mecanismos genéticos que regulan la tolerancia es la clave para desarrollar materiales genéticos tolerantes a la sal.

De acuerdo con Smith (1994), se pueden identificar en alfalfa tres estados de crecimiento bajo condiciones de salinidad: a) germinación, que incluye la imbibición, el alargamiento de la radícula y la emergencia de los cotiledones; b) desarrollo de la plántula, que lleva unos 20-40 días y que abarca desde la elongación del hipocótilo y la expansión de los cotiledones hasta el inicio del desarrollo de tallos secundarios; y c) crecimiento de la planta madura, que se inicia en el desarrollo de los tallos secundarios y llega hasta la cosecha y los posteriores rebrotes. Existen numerosos trabajos que investigaron la germinación de la alfalfa bajo condiciones de salinidad. La conclusión general es que tanto el porcentaje como la tasa de germinación de las semillas de alfalfa se ven disminuidos a una concentración salina  $\geq 150$  mM NaCl, y que ninguna o muy poca germinación se observa a un nivel de estrés osmótico-salino entre 300 y 500. McKimmie y Dobrenz (1987) observaron que cerca del 75 % de las plántulas emergidas sobrevivían durante 2 semanas cuando eran irrigadas por inundación con agua que contenía 243 mM NaCl, y que solamente el 13 % sobrevivió a una concentración salina de 289 mM NaCl.

Los síntomas causados por la salinidad son esencialmente iguales en plántulas y en plantas maduras: i) a bajos niveles de estrés ( $<100$  mM NaCl) solo se reduce el rendimiento de la fitomasa aérea (menos tallos y más cortos); ii) a niveles intermedios de estrés la reducción del crecimiento es acompañada por una decoloración de los folíolos en plantas jóvenes, lo que está asociado a una mayor succulencia de hojas y tallos (Smith, 1994), una coloración verde oscura o verde-azulada de las hojas más viejas y un incremento en la relación hoja/tallo (Hoffman *et al.*, 1975); y iii) a altos niveles de estrés se produce necrosis marginal o clorosis de las hojas, a lo que sigue la caída de las hojas más viejas (Smith, 1994).

McKimmie y Dobrenz (1991) detectaron variabilidad fenotípica referida a sobrevivencia y crecimiento de plantas de alfalfa sometidas a estrés salino; el grupo de individuos tolerantes exhibió una menor concentración de Na y Cl en el follaje y una tendencia a acumular Na en las raíces. En general, la tolerancia a la salinidad parece estar relacionada con menores concentraciones iónicas ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) en hojas (Rogers, 1998), mayores potenciales hídricos y crecimientos más vigorosos, lo que puede ser útil para diluir las acumulaciones iónicas (McKimmie y Dobrenz, 1991). La exclusión de las sales puede ocurrir primariamente a nivel radicular, lo que aseguraría menores concentraciones salinas en los tejidos internos en relación con el suelo (Noble *et al.*, 1984).

Tradicionalmente, por un lado, los programas de mejoramiento genético para desarrollar alfalfas tolerantes a la salinidad se han focalizado en las etapas de la germinación, emergencia y plántula (McKimmie y Dobrenz, 1987). Sin embargo, a partir de Johnson *et al.* (1991), se reconoció la importancia de incorporar la selección en planta adulta como forma de mejorar también la producción forrajera. Por otro lado, el protocolo de selección para inducir el estrés salino debe representar lo más fielmente posible el ambiente para el que se selecciona el material. El cultivo en soluciones salinas (AL-Khatib *et al.*, 1993) o las técnicas de baños de agua, donde la sal es suspendida alrededor de las raíces, parecieran ser más apropiados que la lixiviación de sales a través del suelo utilizando riego con soluciones salinas (Smith, 1994). Complementariamente, por un lado, se han propuesto índices de evaluación que incluyen porcentaje de germinación, peso seco de fitomasa aérea (plántula y estadios posteriores), necrosis foliar y número de tallos (Noble, 1983). Noble *et al.* (1984) desarrollaron poblaciones de alfalfa tolerantes a salinidad con base en el porcentaje de daño en las hojas. Dos generaciones de selección fenotípica recurrente fueron suficientes para incrementar significativamente la tolerancia sin sacrificar rendimiento bajo condiciones no salinas. La heredabilidad estimada del carácter fue razonablemente buena ( $h^2 = 0,41$ ). Otros autores también han lanzado diversos materiales tolerantes, que han exhibido un grado variable de germinación y sobrevivencia en condiciones controladas (invernáculo). Entre ellos, pueden citarse los germoplasmas AZ-90NDC-ST (Johnson *et al.*, 1991), AZ-97MEC y AZ-97MEC-ST (AL-Doss y Smith, 1998) y el cv. Salado (Downes, 2000). En Argentina, se desarrollaron los cultivares Salinera



INTA (Ochoa, 1980), Trinidad 87 (Ochoa y Anzardi, 1996) y Salina PV ([www.paloverde.com.ar](http://www.paloverde.com.ar)).

Por otro lado, se han propuesto técnicas de selección basadas en la estimación del funcionamiento normal de la planta a nivel celular, lo que permitiría una temprana detección de la tolerancia, no solo a salinidad sino también a otros factores estresantes. En ese sentido, Shabala *et al.* (1998) sugirieron la medición de la fluorescencia clorofílica y el empleo de la técnica bioeléctrica. Esta última, a través del grado de respuesta a pulsos eléctricos de baja intensidad, estima la reacción de la planta a nivel de la membrana celular ante el impacto de una determinada situación de estrés. Ambas técnicas son rápidas y no destructivas, lo que las hace muy apropiadas para ser implementadas en un programa de mejoramiento. La técnica bioeléctrica puede ser una buena alternativa frente a la estimación de la tolerancia a salinidad a través de la medición del rendimiento forrajero en planta adulta, que demanda tiempo y espacio.

Como lo indicó tempranamente Winicov (1998), existen también posibilidades concretas de desarrollar nuevos materiales a través de la ingeniería genética. En la última década, se han logrado algunos avances en la comprensión de las reacciones fisiológicas relacionadas con la tolerancia a la sal. Sin embargo, la caracterización de las respuestas moleculares y bioquímicas en plantas aún está en sus primeros pasos, ya que la mayoría de estas respuestas se determinan en sistemas de plantas modelo (Postnikova *et al.*, 2013). Se espera que los mecanismos moleculares que regulan la tolerancia a la salinidad en especies moderadamente tolerantes como la alfalfa, se diferencien en algunos aspectos. Por lo tanto, la caracterización de los mecanismos de regulación de los genes de alfalfa implicados en la tolerancia a la salinidad será crucial para la selección de cultivares tolerantes.

Los genes involucrados en la tolerancia indican un gran número de proteínas que actúan en la exclusión de iones, la compartimentación de iones, la desintoxicación de los efectos de los iones acumulados y la regulación de la expresión de genes en plantas expuestas a la salinidad. Algunos genes de alfalfa han proporcionado una mayor tolerancia en *Arabidopsis* contra la salinidad. Por ejemplo, la transformación del gen de alfalfa que condiciona el factor de respuesta al etileno (MsERF11) condujo a una mayor tolerancia a la sal en *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2012).

Anteriormente, Winicov *et al.* (1999) habían demostrado que la sobreexpresión del factor de transcripción Alfin1 estimuló la expresión del gen MsPRP2 y aumentó la tolerancia a la sal en la alfalfa. Más recientemente, se han explorado los genes involucrados en la síntesis de polioles, azúcares, prolina y betaínas que controlan la homeostasis y desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la osmorregulación durante el estrés salino (Ferreira *et al.*, 2015). La acción conjunta del antioxidante glutatión y del aminoácido prolina se ha propuesto como mecanismo que permite a las plantas la tolerancia al estrés conjunto de los metaloides y la salinidad (Anjum *et al.*, 2014).

No obstante, los programas de mejoramiento tradicionales para tolerancia a salinidad han tenido hasta el presente un éxito limitado. La selección de plantas individuales vigorosas y que excluyan los iones de Na y Cl puede mejorar el potencial para la obtención de poblaciones de alfalfa con mayor tolerancia que sus parentales. Estudios recientes muestran que existe una variación considerable en la tolerancia a la salinidad en alfalfa (Cornacchione y Suarez, 2015; Cornacchione y Suarez, 2017). Sin embargo, el vínculo entre la variación de la tolerancia a la salinidad y los mecanismos genéticos que conducen a esa variación aún se desconocen. Una combinación de enfoques fisiológicos, bioquímicos y genéticos puede ayudar a seleccionar genotipos más tolerantes y productivos.

En 2019, y como fruto de un trabajo conjunto entre las unidades de Manfredi y Santiago del Estero, el INTA inscribió el cultivar sin reposo invernal (GRI 9) Kumén PV INTA (designación experimental: SISA 14), que tolera condiciones de moderada a alta salinidad. Este cultivar fue desarrollado luego de tres ciclos de selección fenotípica recurrente en las condiciones naturales de alta salinidad edáfica del paraje Isla Verde, Santiago del Estero, Argentina (28° 38' 41.9" S, 64° 05' 03.8" O; taxonomía del suelo: típico Natracuulf). En el proceso de selección se retuvieron aquellos genotipos capaces de emerger, crecer y producir forraje y semillas en suelos con una concentración salina de 10,6 y 32,8 dS m<sup>-1</sup> CEx (0-5 cm) y con un pH promedio de 7,74. En el primer ciclo se seleccionaron 250 plántulas después de la emergencia que fueron trasplantadas temporalmente a pequeñas macetas individuales y finalmente a un sector de suelo con una CEx (0-30 cm) de 4,1 a 20,8 dS m<sup>-1</sup>. Las mejores 70 plantas –seleccionadas por vigor, sanidad

y producción de biomasa– se inter cruzaron con polinizadores nativos (*Xylocopa* spp.), generando así la semilla del primer ciclo de selección. Para el segundo y tercer ciclo de selección se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, en sectores de suelo con valores de CE<sub>ex</sub> (0-30 cm) de 14 a 32,2 dS m<sup>-1</sup>. Parte de la semilla del tercer ciclo de selección se empleó para estudios de largo plazo en condiciones controladas de temperatura, luz y diferentes concentraciones y tipo de sales en el USDA Salinity Laboratory, Riverside EUA. El sistema de riego y el drenaje cerrado utilizados permitieron mantener constantes los niveles de estrés, lo que permitió realizar una evaluación comparativa de varias poblaciones de alfalfa. Entre estas, la SISA 14 combinó alta tolerancia (en términos relativos respecto del control) y mayor producción de biomasa (gr pl<sup>-1</sup>), explicada en parte por una menor concentración de Na<sup>+</sup> en su biomasa aérea (Cornacchione y Suarez, 2015).

Si bien es importante disponer de variedades de alfalfa tolerantes, no debe perderse de vista que el comportamiento de las plantas en suelos salinos está también condicionado por las características de suelo. Como lo señalaron Suarez *et al.* (2006), la textura del suelo, la estructura, la relación CE/RAS, el pH y otros atributos químicos del suelo, así como las propiedades de infiltración, el volumen de agua aplicado y la fracción de lixiviación inciden grandemente en el comportamiento final de las plantas. De ese modo, la gestión cuidadosa del agua durante el establecimiento, la prevención de la formación de costras y las prácticas agronómicas para promover la infiltración del agua y evitar el estancamiento son particularmente importantes para la producción exitosa de alfalfa en condiciones salinas y salino-sódicas.

*2- Tolerancia a la sequía.* Frente al contexto de cambio climático actual, que provoca la alteración de factores ambientales, las plantas ven fuertemente afectado su potencial productivo, sobre todo en zonas áridas y semiáridas donde el suministro de agua a través del riego será cada vez más complicado. Las variaciones en temperatura y en la cantidad y la distribución de las lluvias, como así también la necesidad de generar producción agropecuaria en ambientes restrictivos, constituyen un nuevo desafío en la obtención de materiales con adaptación a ambientes específicos. En este sentido, entre los caracteres de mayor interés está la obtención de cultivares con tolerancia al estrés hídrico.

El déficit hídrico acarrea importantes consecuencias para la fisiología y la morfología de las plantas, provocando a corto y mediano plazo un descenso del potencial hídrico, del contenido relativo de agua y de la conductividad estomática (Medrano *et al.*, 2007). Esto resulta en impactos negativos sobre el crecimiento y la producción de las plantas, además de cambios anatómicos por modificaciones en el tamaño de las células, senescencia de hojas y hasta la muerte en muchas especies (Morales *et al.*, 2013).

La intensidad y la duración del estrés hídrico influyen en los efectos que causa y en la capacidad de las plantas para resistirlo (Erice *et al.*, 2010). A lo largo de la evolución, las especies vegetales han desarrollado diferentes mecanismos morfológicos y fisiológicos para tolerar períodos de sequía (Blum, 1996). La reducción de la altura y biomasa de plantas, del tamaño de raíces, del área foliar y del peso foliar específico son los principales efectos morfológicos ante el déficit hídrico que impactan sobre el crecimiento y la producción de biomasa (Khurana y Singh, 2004; Sangwan *et al.*, 2006; Aranjuelo *et al.*, 2007). Asimismo, la eficiencia de uso de agua en la productividad (EUAp) también es alterada por cambios en la biomasa total y en la evapotranspiración (Turner, 1986).

En cuanto a los mecanismos fisiológicos implicados en la adaptación estratégica a la sequía se distinguen principalmente la disminución de pérdida de agua a través del cierre estomático (Jaleel *et al.*, 2009) y la reducción del intercambio gaseoso limitando la fotosíntesis (Erice *et al.*, 2010). Esto genera una reducción del área foliar expuesta a la radiación solar, lo que conlleva a una reducción de la captura de luz y, por consiguiente, de la producción de biomasa y de la calidad forrajera.

Gran parte de la superficie de alfalfa sembrada en Argentina se centra en zonas donde las condiciones de temperatura y de radiación son favorables para el crecimiento de la pastura; no obstante, en algunos períodos se presenta un marcado déficit hídrico que afecta la producción. Por ello, es necesario desarrollar cultivares que presenten una mayor eficiencia del uso del agua, con alto potencial productivo y persistencia. La selección de genotipos para la obtención de estas poblaciones debe abordarse en un contexto multidisciplinario, donde se integren la fisiología vegetal, la ecofisiología, la genética y la biología molecular. De esta manera se podrán desarrollar metodologías de evaluación más

eficientes y precisas, basando la selección de individuos en función de varios caracteres en forma simultánea. Dentro de este panorama, sería deseable la incorporación del análisis de imágenes como un nuevo abordaje de fenotipado masivo. El uso de la teledetección, que provee imágenes aéreas de un amplio rango de condiciones ambientales a escala local y regional, aparece como muy promisorio (Gebremedhin *et al.*, 2019.). El uso de aeronaves no tripuladas (drones) complementado con mediciones fenotípicas *in situ* que permiten determinar relaciones entre parámetros fotográficos y mecanismos fisiológicos de los materiales para evaluar ha sido propuesto para el mejoramiento de *Lolium perenne* L. (Jayasinghe *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). La gran ventaja de estas nuevas tecnologías es que permiten el fenotipado de un alto número de individuos en condiciones reales de campo, evitando la distorsión que pueden tener algunas determinaciones realizadas en invernáculo o en cámaras de cría. En un sentido similar, en el INTA Manfredi se ha iniciado un programa de evaluación de variables relacionadas con la tolerancia a sequía en condiciones de campo mediante la utilización de shelters, que son estructuras móviles que permiten generar situaciones de estrés hídrico inducido. El objetivo es medir variables ecofisiológicas tales como biomasa en rendimiento de forraje y sus componentes, índice de área foliar, conductancia estomática, entre otras, las que serán correlacionadas con imágenes de temperatura del canopy; caracteres que posibilitarán la identificación de genotipos con mayor tolerancia a deficiencias hídricas de variada intensidad.

*3- Mayor calidad forrajera por alta expresión del carácter multifoliolado.* Además del rendimiento y la persistencia, la calidad del forraje también es muy importante en la producción de alfalfa. Entre las especies forrajeras, las leguminosas (Fabaceae) en general, y la alfalfa en particular, son las fuentes más altas y económicas de proteína para la producción animal. La calidad de la alfalfa no solo depende del medioambiente, sino también del cultivar y de la proporción de hojas (Lacefield, 2004). Las hojas de alfalfa son más digestibles y de mayor valor nutricional que los tallos. Entre 70 y 75 % de la proteína total de la planta está en las hojas.

Las hojas de la alfalfa son normalmente trifoliadas, aunque existe naturalmente una proporción de hojas multifolioladas o MF ( $\geq 4$  folíolos).

Por lo tanto, el valor nutritivo de la alfalfa se puede mejorar a través del aumento de la relación hoja/tallo (RHT) seleccionando por alta frecuencia de plantas con hojas MF en la población, conforme fuera propuesto por Volenec y Cherney (1990). Bauder (1938) fue el primero en estudiar el carácter MF para el que propuso un modo disómico de herencia con dos genes independientes que muestran epistasis. El efecto epistático, que es no alélico y por tanto opuesto a la relación de dominancia, puede ser debido a la presencia de factores recesivos homocigóticos en un par de genes o a un alelo dominante que se contrapone a la expresión de otro gen dominante. Bingham (1964) estudió el patrón de herencia del carácter MF en alfalfa diploide analizando las proporciones de segregación en dos  $S_1$ , una  $F_1$ , once  $F_2$  y tres familias de retrocruzamiento, y concluyó que el carácter estaba condicionado por tres genes independientes: uno recesivo (mf) en condición homocigota en un locus, que se requiere para el desarrollo de hojas MF; y otros dos aditivos, y en otros loci, que influyen en el grado de expresión. A nivel tetraploide, Bingham (1964) postuló que dos o más loci están envueltos en el control genético de este carácter. Bingham y Murphy (1965) estudiaron el efecto de la selección de la frecuencia de las hojas MF en alfalfas tetraploides luego de tres ciclos de SFR. Observaron que la frecuencia de las plantas MF (con 60 a 100 % de hojas MF) aumentó de 19 % en el ciclo II hasta 68 % en el ciclo III. Concluyeron que la selección recurrente fue eficaz en el aumento de la frecuencia de las plantas MF y que la expresión del carácter era estable y altamente heredable. Brick *et al.* (1976) estudiaron la transmitancia del carácter MF en alfalfas sin reposo invernal y concluyeron que el rasgo era fácilmente transmisible, aunque parecía estar bajo un complejo control genético. Azizi (1980), a través de un examen preliminar de los resultados obtenidos en un esquema de cruzamientos dialélicos, sugirió que el carácter MF en alfalfa tetraploide está controlado por más de dos genes principales y que el grado de expresión depende del número de alelos dominantes. Respecto de esto último y asumiendo la herencia tetrasómica en alfalfa postuló que tres genes principales son los que condicionan el grado de expresión. Estos tres genes que se denominaron LA, LB y LM actúan con independencia y con la misma contribución a la expresión del carácter. No se encontró evidencia de efecto epistático. El número promedio de folíolos por hoja (FH) se incrementó a medida que el número de alelos dominantes

aumentó. El efecto de dominancia fue solo parcial y la dominancia completa estuvo ausente. Basado en esto, se planteó la hipótesis de que las plantas con rangos promedio de 3,1; 3,2 a 3,4; 3,5 a 4,0 y >4,1 FH contenían 4, 5, 6 y 7 alelos dominantes por genotipo, respectivamente. Analizando segregaciones en familias  $F_2$  se sugirió finalmente que en alfalfa tetraploide el carácter MF es controlado por al menos tres genes tetrasómicos (LA, LB y LM) con herencia cromosómica al azar y que la presencia de cuatro o más alelos dominantes produciría hojas MF. Se estimó para el carácter una heredabilidad en sentido amplio de alrededor de 0,86, lo que induce a asumir que los factores ambientales tienen poca influencia en su expresión. Sobre la base de esta estructura genética, la selección fenotípica recurrente debería ser idónea para aumentar significativamente la frecuencia de plantas de MF en una población de alfalfa.

Derivado de lo anterior, y con el objetivo de mejorar la calidad forrajera, el INTA Manfredi llevó a cabo un programa de selección fenotípica recurrente para incrementar la expresión multifoliolada en un material extremadamente sin reposo invernal (GRI 10). Partiendo de una población inicial de 349 plantas (mayoritariamente trifoliadas) provenientes de tres cultivares GRI 10, evaluadas en condiciones de campo, se seleccionaron 83 genotipos por vigor, comportamiento sanitario y rapidez de rebrote. Estas selectas se trasplantaron a una jaula de polinización y se entrecruzaron con abejas melíferas (*A. mellifera*) para producir semillas de la población inicial de mejoramiento (C-0). Esa semilla C-0 fue sembrada en condiciones de invernáculo para iniciar la selección fenotípica recurrente por alta expresión multifoliolada. La evaluación del carácter MF se realizó en dos etapas del desarrollo de la planta: a) en estado vegetativo temprano, eligiendo plantas con al menos una hoja MF; y b) en floración temprana, sobre las selectas del paso anterior, eligiendo aquellas que alcanzaban un valor MF 4 (6-7 hojas MF tallo<sup>-1</sup>) y 5 ( $\geq 8$  hojas MF tallo<sup>-1</sup>) de acuerdo con Sheaffer *et al.* (1995). En cada ciclo de selección se evaluaron 1.000 plantas. Después de cuatro ciclos, la expresión MF aumentó de 6,7 % en C-0 (población inicial) a 77,7 % en la población C-4 (cuarto ciclo). El efecto de la alta expresión MF sobre los componentes de rendimiento y de calidad a lo largo de los ciclos de selección (C-1 a C-4) se evaluó en condiciones de campo utilizando tanto ensayos a plantas individuales como ensayos a stand denso. Las variables evalua-

das fueron rendimiento de forraje (cortes al 10 % de floración), número de tallos, altura de las plantas, número de nudos por tallo, número de hojas por tallo, número de folíolos por hoja, expresión multifoliolada (% MF) y relación hoja/tallo (RHT). La calidad del forraje se evaluó a través de la estimación del contenido de proteína bruta (PB), fibra detergente neutro (FDN) y digestibilidad real de la materia seca *in vitro* a las 48 horas. Los ciclos más avanzados de selección (C-3 y C-4) exhibieron menor ( $P < 0,05$ ) altura de planta y menor ( $P < 0,05$ ) producción de materia seca que C-0 en condiciones de planta individual pero no en stand denso (Odorizzi *et al.*, 2015). Por el contrario, C-3 y C-4 tuvieron mayores ( $P < 0,05$ ) valores de MF, RHT y PB que C-0 en ambas condiciones (planta individual y stand denso). Según la escala propuesta por Sheaffer *et al.* (1995) para la tipificación de la expresión MF, las poblaciones C-1, C-2 y C-3/C-4 se clasificaron como de “expresión baja”, de “expresión moderada” y de “expresión alta”, respectivamente. En 2019, la población C-4 fue inscrita como cultivar Amaya PV INTA en el Registro Nacional de Propiedad de Cultivares (RNPC) y en el Registro Nacional de Cultivares (RNC) del Instituto Nacional de Semillas (INASE).

Un aspecto interesante en el desarrollo de cultivares de alfalfa es evaluar la posible pérdida de variabilidad por el estrechamiento de la base genética durante el proceso de selección, que podría causar problemas de pérdida de vigor por endocría en las etapas posteriores de multiplicación y uso de la variedad sintética. En el caso concreto de Amaya PV INTA, y con la utilización de marcadores moleculares, se realizó una comparación de la variabilidad genética entre los ciclos C-0 y C-4 a través del empleo de 25 marcadores microsatélites o *Simple Sequence Repeats* (SSR). El estudio arrojó un alto número de alelos por locus en ambas poblaciones, con un promedio de 6,28. Para determinar la variabilidad en cada ciclo se utilizó la estimación de la diversidad genética de Nei (1987), que arrojó valores de 0,723 en C-0 y 0,726 en C-4, lo que indica que la variabilidad en C-4 fue tan grande como la de C-0. La diferenciación entre poblaciones se estimó a través del índice de Nei (1973), que con un valor de 0,013 determinó que solo el 1,3 % de la diversidad genética total se encontró entre poblaciones y que el 98,7 % se halló dentro de poblaciones (Odorizzi *et al.*, 2015). Estos resultados indicaron que el proceso de selección fue no solo eficiente, sino que además no causó ninguna pérdida de variabilidad ni aumento de la endocría. Todo



esto estaría relacionado, tal como se mencionara en la discusión de los modelos autotetraploides y los métodos de mejoramiento, al alto número de plantas utilizadas en cada ciclo de selección.

*4- Tolerancia al empaste.* El empaste, timpanismo o meteorismo espumoso es una disfunción digestiva de los rumiantes que se origina cuando los gases liberados por la fermentación microbiana de los alimentos en el rumen quedan atrapados en minúsculas burbujas y no pueden ser eliminados por eructación. Este problema se asocia con el consumo de especies forrajeras de alta digestibilidad y alto contenido de proteínas solubles, como la alfalfa y los tréboles blancos (*Trifolium repens*) y rojo (*T. pratense*) (Howarth, 1988). El timpanismo es probablemente la causa más importante de pérdidas en la producción bovina y su control constituye una de las mayores preocupaciones de los productores pecuarios. En el capítulo 14 se describe una serie de medidas de variada efectividad para tratar de controlar o atenuar el problema, a lo que puede agregarse la revisión hecha por Cangiano (Cangiano, 1997). Sin embargo, una solución económica y definitiva para el productor ganadero sería el desarrollo de variedades de alfalfa con menor propensión timpanizante, manteniendo un nivel adecuado de calidad y comportamiento agronómico. En este marco, y comparando especies de leguminosas timpanizantes y no-timpanizantes, Howarth *et al.* (1978) concluyeron que el desarrollo de esas variedades menos timpanizantes puede llevarse a cabo a través de: 1) la incorporación al genoma de alfalfa, por medio de la ingeniería genética, de los genes de otras especies de leguminosas forrajeras responsables de la síntesis de taninos condensados; o 2) la selección de plantas con menor tasa inicial de desaparición ruminal (Goplen *et al.*, 1983).

Por un lado, los taninos condensados (TC), como los presentes en *Lotus corniculatus*, son agentes antiespumógenos muy efectivos por su capacidad para formar complejos con las proteínas, impidiendo así la formación de espuma estable en el rumen. Por otro lado, y a diferencia de los taninos hidrolizables, no son perjudiciales de la calidad forrajera. Una completa revisión sobre el efecto de los TC en la fermentación ruminal y el empaste de bovinos puede consultarse en McMahon *et al.* (2000). Atendiendo a que la alfalfa posee TC en los tegumentos de la semilla, pero no en el follaje, se han propuesto técnicas de ingenie-

ría genética que promuevan la expresión de aquellos genes que, por cuestiones regulatorias, no alcanzan a hacerlo en hojas y tallos. En Argentina, el IGEAF INTA Castelar llevó a cabo un proyecto para alterar la expresión de la enzima chalcona sintetasa, involucrada en la síntesis metabólica de los taninos (Ardila *et al.*, 2003). Sobre la base de los resultados obtenidos, se concluyó que la inducción de TC en la alfalfa aparece como una vía de mejoramiento promisorio que verdaderamente controlaría el problema del empaste. Sin embargo, los esfuerzos a la fecha tanto en Argentina como en otros países no han superado la fase experimental.

La segunda vía, es decir, la selección de genotipos de alfalfa por menor tasa inicial de desaparición ruminal (TIDR) se basa en las teorías conocidas como de ruptura de la pared celular y de velocidad inicial de digestión (Howarth *et al.*, 1982). Durante la década de 1970 se iniciaron en Canadá varios trabajos multidisciplinarios tendientes a identificar la etiología del empaste o meteorismo. Se observó que algunas leguminosas, como el *Astragalus cicer*, eran no-meteorizantes porque poseían una tasa de desaparición 25-30 % más lenta que las leguminosas meteorizantes (Howarth *et al.*, 1982), derivado de patrones diferentes en la disposición de las nervaduras de hojas y células del mesófilo con paredes celulares más gruesas, lo que retardaba la acción de la microflora ruminal e impedía una liberación explosiva de los contenidos celulares al rumen. De esta manera, se mantenía relativamente baja la concentración de agentes espumógenos (proteínas solubles, restos de cloroplastos, etc.), haciendo que la producción de gas por la fermentación microbiana se mantuviera por debajo de los umbrales críticos para causar meteorismo (Howarth *et al.*, 1982). Basado en esto, Agriculture Canada, en Saskatoon, inició en 1983 un programa de mejoramiento genético de alfalfa con la finalidad de identificar genotipos con menor TIDR a través de la técnica *in situ* de la bolsa de nylon modificada (Goplen *et al.*, 1983), que posibilitaba la identificación de esos individuos después de 4 h de permanencia en el rumen de animales fistulados. La población original de plantas se compuso de un pool de germoplasma integrado por cultivares de reposo invernal largo y muy resistentes al frío (GRI 2-3). Aunque el objetivo del programa fue disminuir la desaparición inicial en valores cercanos al 25 %, después de cuatro ciclos de selección se logró una disminución promedio de solo el 15 % (Coulman

*et al.*, 1996). Sin embargo, cuando la población experimental (LIRD-4) se comparó en ensayos de pastoreo con la variedad 'Beaver' (testigo), se observó que esa disminución fue suficiente para reducir significativamente el número de animales empastados, con un valor promedio de 62 % y un rango de 40 a 88 % de disminución (Berg *et al.*, 2000; Coulman *et al.*, 1996; Coulman *et al.*, 2000). Las plantas de la población experimental LIRD-4 poseían paredes celulares más gruesas (Goplen *et al.*, 1993) y mayor contenido de fibra (Coulman *et al.*, 1998) que las alfalfas testigo sin seleccionar. En 1997 la población LIRD-4 fue lanzada al mercado como el cv. AC Grazeland Br (Coulman *et al.*, 2000), la primera variedad canadiense tolerante al empaste.

Basado en la metodología anterior, el INTA Manfredi inició en 1991 un programa de mejoramiento con el objetivo de desarrollar un cultivar de alfalfa sin reposo invernal con menor TIDR. Se partió de una población de 2000 plantas compuesta por individuos de las variedades Monarca SP INTA, 5929, Mecca y Sequel (500 plantas de cada una). El criterio de selección fue la menor velocidad inicial de desaparición ruminal, medida *in situ* a las 4 h de permanencia en el rumen de novillos fistulados (Figura 6).

El método de mejoramiento combinó la selección fenotípica y genotípica (prueba de progenie por policruza) en un proceso recurrente que incluyó la utilización de jaulas de policruzamiento con abejas melíferas. En cada ciclo de selección se evaluaron entre 1200 y 1850 plantas individuales, con tres repeticiones ciclo<sup>-1</sup> y en dos épocas del año (primavera y verano) (Basigalup *et al.*, 1996). Después de tres ciclos de selección recurrente, se desarrolló la población experimental BDI-C-3 que comparada con la población original exhibió 22 % de disminución en la TIDR (Basigalup *et al.*, 2003; Basigalup *et al.*, 1998). En 2001, esa población fue inscrita como cultivar ProINTA Carmina en el Registro Nacional de Propiedad de Cultivares (Res. 125/01 de la SAGPyA). Comparada con la variedad testigo Bárbara SP INTA, ProINTA Carmina presentó mayor contenido de fibra (FDA y FDN) pero similar contenido de proteína bruta y relación hoja/tallo (Basigalup *et al.*, 2007). Completando su caracterización agronómica, cabe señalar que presentó un buen potencial de producción de forraje, aunque algo inferior al de las mejores variedades del mercado (Spada, 2005).



■ **Figura 6.** Protocolo de selección por menor TIDR a través de la técnica *in situ* de la bolsa de nylon modificada: (a) plantas de alfalfa listas para ser evaluadas; (b) materiales utilizados en el proceso; (c) bolsas de nylon permeables atadas a pesas y d) animal fistulado. Adaptado de Goplen *et al.* (1993).

Para evaluar a ProINTA Carmina en condiciones de pastoreo, se implantaron en el otoño de 2003 ensayos en las unidades del INTA de Marcos Juárez, General Villegas, Manfredi y Rafaela. También se realizaron ensayos a gran escala en campos de productores (Basigalup *et al.*, 2007). El objetivo fue evaluar la menor capacidad timpanizante de ProINTA Carmina a través de un diseño de parcelas apareadas, utilizando como testigo al cv. Bárbara SP INTA. El grado de timpanización en cada parcela se determinó sobre los desafíos periódicos y empleando una escala de estimación visual de 0 (= sin timpanización) a 5 (= tratamiento o muerte del animal) adaptada de Lippke *et al.* (1972). La información conjunta de todos esos ensayos indica que ProINTA Carmina disminuyó significativamente el número de animales timpanizados y que, dentro del grupo de timpanizados, disminuyó la intensidad del problema hacia una mayor proporción de grados leves y moderados (Bernaldez *et al.*, 2005); en los casos graves (grados 4 y 5 de la escala) no se observaron diferencias con el testigo. Estos resultados permiten concluir

que ProINTA Carmina, si bien no elimina el timpanismo, constituye una herramienta interesante para su atenuación, disminuyendo significativamente sus riesgos. De esa forma –complementada con otras técnicas de control– podría disminuir los costos de producción, reducir las pérdidas de animales y facilitar el manejo de los rodeos, particularmente en categorías menos sensibles como vacas de cría en planteos intensivos. En los últimos años se continuó con el trabajo de selección partiendo de ProINTA Carmina, pero seleccionando plantas con menor TIRD a través de tecnología *Near-infrared reflectance spectroscopy* (NIR o NIRS). La tecnología NIRS se basa en la región espectral del infrarrojo cercano que se extiende desde el extremo de las longitudes más altas del visible (alrededor de 780 nm) hasta los 3000 nm ( $13.000\text{ cm}^{-1}$  hasta  $3300\text{ cm}^{-1}$ ). A través de esta implementación, y luego de dos ciclos de selección, se logró una nueva población que fue probada en desafíos a campo con ovinos durante dos temporadas (2019-2020 y 2021-2022). Actualmente esta nueva potencial timpanizante se encuentra en proceso de inscripción con el nombre de Maltén Pv INTA.

5- *Tolerancia a la acidez y aluminio (Al)*. Aproximadamente el 30 % de los suelos y más del 50 % de las tierras cultivables del mundo son ácidas (Von Uexküll y Mutert, 1995). El complejo suelo-ácido, que consiste en la fitotoxicidad del exceso de iones como el aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ) y protones ( $\text{H}^+$ ), es uno de los factores principales que limitan la productividad del cultivo (Delhaize y Ryan, 1995; Ishitani *et al.*, 2004). La existencia de suelos ácidos se puede deber fundamentalmente a dos causas: 1) la propia naturaleza ácida de los materiales que dieron origen al suelo, asociado a su bajo contenido en cationes básicos como  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{++}$ ; y 2) el lavado o lixiviación de esos cationes básicos, por erosión o uso excesivo, que reducen la capacidad buffer de ese suelo. La fertilización amoniacal y la nitrificación que desencadena aceleran el proceso de acidificación. A medida que el pH decrece el Al se solubiliza hasta alcanzar valores fitotóxicos en la solución del suelo; paralelamente, elementos como P, N, Ca, Mg y K se tornan menos disponibles para las plantas. Además, en el caso específico de la alfalfa, la acidificación del suelo resiente la fijación simbiótica del  $\text{N}_2$ , dado que los rizobios son sensibles a la acidez. A un pH bajo, el Al se solubiliza a partir de silicatos de Al no tóxicos y forma los iones  $\text{Al}^{3+}$  fitotóxicos (Hoekenga *et al.*, 2003). La acción fitotóxica del Al se centra principalmente en el ápice

de la raíz inhibiendo la división y la elongación celular, lo que a su vez resiente el desarrollo radical y paraliza la formación de raíces secundarias afectando la captación de agua y de nutrientes. Las concentraciones micromolares de  $Al^{3+}$  pueden inhibir el crecimiento de la raíz y dañar el sistema radicular a los pocos minutos de la exposición, por lo tanto, el Al también reduce significativamente los rendimientos al limitar el consumo de agua y nutrientes (Kochian, 1995; Kochian *et al.*, 2004). El Al también altera una serie de procesos fisiológicos y bioquímicos, interfiriendo en el funcionamiento celular y en la síntesis metabólica de numerosos compuestos (Samac y Tesfaye, 2003). Los rendimientos en biomasa de alfalfa y la capacidad de persistencia se ven comprometidos debido a la inhibición del crecimiento de la raíz en suelos con pH bajo.

La falta de cultivares de alfalfa Al-tolerantes puede atribuirse a múltiples factores, incluida la ausencia de protocolos sólidos para evaluar y seleccionar la respuesta de la planta a este elemento. Taylor (1991) propuso dividir las estrategias para la búsqueda de tolerancia al Al de las plantas en dos grandes grupos: a) mecanismos que excluyen el Al del ápice radical; y b) mecanismos que permiten a la planta tolerar el Al dentro de las células. Las estrategias del primer grupo se basan en el hecho de que los individuos tolerantes de algunas especies exudan ácidos orgánicos –como citratos, oxalatos, malatos y succinatos– que quelan el Al y lo excluyen del ápice radical (López-Bucio *et al.*, 2000; Ma, 2000; Ma *et al.*, 2001). Se han descrito también otros mecanismos de exclusión del Al, como la mutante *alr-104* de *Arabidopsis* que aumenta el influjo de  $H^+$  hacia el ápice radical, lo que aumenta el pH de la zona rizosférica y hace precipitar el Al en la solución del suelo, tornándolo no disponible para las raíces (Degenhardt *et al.*, 1998). En otros casos, se ha sugerido que el mucílago del capuchón radical contribuye a formar una barrera que impide al ápice tomar contacto con el Al (Henderson y Ownby, 1991; Li *et al.*, 2000). Dentro de las estrategias del segundo grupo, si bien no han sido tan estudiadas como las del primero, se han descrito casos en los que el Al es secuestrado por ligantes orgánicos (catequinas, ácidos fenólicos, etc.), formando complejos que se acumulan en células especializadas de la epidermis de las hojas (Jensen *et al.*, 2002) o en las vacuolas de células de la raíz (Vasquez *et al.*, 1999).

Los métodos descritos para evaluar la tolerancia al Al en la alfalfa incluyen ensayos con suelo ácido (Dall’Agnol *et al.*, 1996), ensayos en

solución líquida (hidropónica) (Pan *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2008) y ensayos de cultivo *in vitro* de tejidos (callos) (Parrot y Bouton, 1990). La quelación de Al por los ácidos orgánicos puede ser un importante mecanismo de tolerancia al Al en la alfalfa (Barone *et al.*, 2008), pero los quelantes orgánicos difieren libremente en la solución de crecimiento, lo que limita la capacidad del cultivo en solución hidropónica para identificar genotipos con tolerancia al Al. Además, la mayoría de los sistemas hidropónicos son difíciles de mantener y no son adecuados para el fenotipado de alto rendimiento.

Devine *et al.* (1976) propusieron utilizar macetas con suelo ácido y concentraciones tóxicas de Al para comparar el crecimiento de plantas de alfalfa a fin de identificar los genotipos tolerantes. Este procedimiento es simple y permite evaluar las plantas en un estado juvenil cuando el desarrollo de la raíz es importante para el establecimiento del cultivo; sin embargo, suelos ácidos con pH similares pueden variar significativamente sus valores de saturación de Al. Una variante del método anterior es el cultivo de plantas directamente en suelos ácidos, bajo condiciones reales de campo; no obstante, su uso está limitado a solo aquellos lugares en donde la disponibilidad de tales suelos es abundante. Para obviar este problema, por un lado, Villagracia *et al.* (2001) propusieron cultivar las plantas en arena y regarlas con soluciones que proporcionen, además de todos los nutrientes necesarios, los valores requeridos de pH ácido y concentraciones tóxicas de Al. Por otro lado, Voigt y Godwin (1997) señalaron que para las especies de semillas pequeñas –como tréboles y alfalfa– el momento crítico es el establecimiento del cultivo. En consecuencia, para evaluar la germinación y el inmediato desarrollo de las plántulas en condiciones de acidez/Al sugirieron un método que utiliza una fina capa de suelo ácido sobre una capa de agar por lo que aquellas plántulas que alcanzan el agar en menor tiempo son consideradas tolerantes. La técnica fue empleada para medir con efectividad la tolerancia a la acidez de varias especies de leguminosas forrajeras (Voigt y Mosjidis, 2002).

El cultivo de plantas en soluciones líquidas (hidroponía) con el objetivo de discriminar genotipos tolerantes al Al también ha sido propuesto para varias especies y para alfalfa (Baligar *et al.*, 2002). Por un lado, en general, las plantas son mantenidas primeramente en una solución de



bajo pH y luego son colocadas en otra solución con valores tóxicos de Al; después de algún tiempo en esas nuevas condiciones, se mide el crecimiento de las raíces y se lo relaciona con el desarrollo radical del tratamiento testigo (sin Al), comparando el cociente  $Al^{(+)}/Al^{(◊)}$ . El método es bastante rápido y permite comparar un alto número de genotipos en poco tiempo y espacio físico, pero tiene el inconveniente de que, al compararse la relación tratamiento/testigo, aquellas plantas que crezcan más lentamente que otras pueden catalogarse como más tolerantes de lo que realmente son. Por otro lado, es difícil identificar la concentración ideal de Al en el medio, al igual que mantenerla a lo largo del período de evaluación o selección; además, los exudados de las raíces alteran constantemente el pH del medio y el Al puede formar complejos con varios nutrientes, limitando su disponibilidad. Como alternativa a la medición del crecimiento radical en soluciones líquidas, Giaveno y Miranda (2000) propusieron la utilización de colorantes para identificar plantas con tolerancia al Al. Brevemente, el método consiste en tratar las plántulas para evaluar con una solución ácida de Al y una vez eliminado el exceso de Al con agua teñir las raíces con una solución de hematoxilina (0,2 %) +  $NaIO_3$  o KI (0,02 %); las plantas tolerantes son las que presentan ninguna o muy escasa coloración. Entre las ventajas del método se destacan su alta sensibilidad para detectar concentraciones de Al aun antes de que el crecimiento radical se vea inhibido, su bajo costo y su naturaleza no destructiva, que lo hace apto para un programa de mejoramiento. Presenta dos inconvenientes importantes: mide la tolerancia en términos más cualitativos que cuantitativos; y no tiene en cuenta que no todos los genotipos pueden excluir el Al con la misma rapidez, lo que puede hacer que se eliminen plantas potencialmente tolerantes bajo otras condiciones. Resumiendo, puede decirse que todos los métodos que emplean evaluación en soluciones líquidas (con o sin colorantes) son efectivos para identificar tolerancia al Al; sin embargo, solo en unos pocos casos se ha visto una aceptable correlación entre la tolerancia observada bajo condiciones experimentales y la obtenida en suelos ácidos (Samac y Tesfaye, 2003).

Por un lado, el empleo de métodos de cultivo in vitro ofrece un potencial interesante no solo para identificar genotipos tolerantes a la acidez/Al, sino también para investigar la respuesta celular al problema. Una ventaja adicional es la posibilidad de generar variantes somaclonales que



contribuyan a aumentar la variabilidad genética para el carácter (Foy *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1992). Al igual que con el uso de soluciones líquidas, uno de los principales inconvenientes del cultivo *in vitro* es generar medios de cultivo con la adecuada concentración fitotóxica de Al que sea capaz de mantenerse a lo largo del período de evaluación. Por otro lado, la utilización de la selección *in vitro* en programas de mejoramiento supone que la tolerancia al Al identificada a nivel celular se exprese también a nivel de planta entera. En alfalfa, Parrot y Bouton (1991) observaron que la tolerancia al Al se expresaba tanto a nivel de cultivo de células como de planta entera, y que los callos producidos a partir de genotipos tolerantes al Al exhibían mayores ganancias de peso que los callos producidos a partir de genotipos sin seleccionar. Kamp-Glass *et al.* (1993) propusieron para alfalfa el uso de un medio de cultivo con concentraciones tóxicas de Al para inducir la formación de callos y el desarrollo de embriones y plantas más tolerantes.

Para el desarrollo de germoplasmas de alfalfa tolerantes a suelos ácidos y con niveles tóxicos de Al, Dall'Agnol *et al.* (1996) compararon las siguientes técnicas de evaluación: a) selección en macetas tubulares con suelo ácido; b) selección en macetas tubulares con suelo ácido + una capa superficial de suelo encalado y fertilizado); c) selección divergente en cultivo de tejidos por alta y baja relación de crecimiento de callos en medios con y sin Al (cociente  $Al^+/Al$ ); d) selección en tándem entre suelo ácido (selectas en a) y alta relación de crecimiento de callos (selectas en c); y e) selección en tándem entre suelo ácido + capa superficial de suelo encalado y fertilizado (selectas en b) y alta relación de crecimiento de callos (selectas en c). Todas las poblaciones desarrolladas por estas técnicas (a-e) fueron luego evaluadas en condiciones de invernáculo y sobre tres sustratos: suelo ácido, suelo encalado y suelo ácido + una capa superficial de suelo encalado. En suelo ácido la mayoría de las poblaciones experimentales presentó mayor crecimiento de raíces y forraje que la población original (sin seleccionar), pero solo la desarrollada sobre suelo ácido (a) exhibió mayor desarrollo que las otras en suelo ácido + una capa superficial de suelo encalado. En suelo encalado ninguna población experimental tuvo menor desarrollo que la población original. La selección *in vitro* (cultivo de tejidos) no mejoró la tolerancia al Al. Estos ensayos no pudieron detectar respuestas de tolerancia al Al en las raíces, que son el tejido de respuesta prima-

ria afectado por el estrés de Al (Foy, 1992). En términos de éxito y de requerimientos de tiempo y recursos, los autores concluyeron que la selección directa sobre suelo ácido era la forma más efectiva de desarrollar variedades de alfalfa tolerantes a la acidez/Al.

Aplicando la selección directa de fenotipos tolerantes en suelo ácido, Bouton y Radcliffe (1989) desarrollaron el germoplasma de alfalfa GA-AT que mostró mayor crecimiento y nodulación que el testigo cuando ambos se sembraron en un suelo con pH = 4,6 y con contenido de Al = 32  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Hartel y Bouton, 1989). Sin embargo, el rendimiento forrajero de GA-AT en suelo ácido comparado con su producción en suelo encalado resultó inaceptable desde el punto de vista agronómico, tanto que los autores concluyeron que eran necesarios mayores niveles de tolerancia a la acidez para alcanzar rendimientos económicamente viables (Bouton y Radcliffe, 1989). A fin de ampliar la búsqueda de variabilidad genética para tolerancia a la acidez, Bouton (1996) evaluó las 200 accesiones de la colección núcleo de Medicago perennes de los Estados Unidos, utilizando una combinación de suelo ácido y suelo encalado y fertilizado (capa superficial). Como medida de tolerancia usó el peso seco de las raíces que lograron penetrar la capa subsuperficial de suelo ácido con relación al testigo tolerante (GA-AT). Asumiendo que la colección núcleo es una representación bastante aproximada de la variabilidad existente en la colección general (Basigalup *et al.*, 1995), el trabajo concluyó que la detección de fuentes de tolerancia en la colección sería muy poco probable.

Por un lado, los métodos descriptos anteriormente consumen demasiado tiempo y trabajo y no son adecuados para un alto número de evaluaciones. A las complicaciones metodológicas explicitadas más arriba, se suman la herencia autotetraploide del cultivo y las restricciones que impone la depresión por endocría, elementos que pueden enmascarar la expresión de la tolerancia. El empleo de técnicas biotecnológicas ofrece alguna esperanza para resolver el problema. Sledge *et al.* (2002), utilizando análisis de RFLP en poblaciones  $F_2$  y retrocruzas, fueron capaces de identificar QTLs que se relacionan con la tolerancia al Al en alfalfa diploides; obviamente, esto facilitaría la selección y la obtención de variedades tolerantes. Por otro lado, el desarrollo de construcciones transgénicas que incrementen la expresión de genes

inducidos por la presencia de Al y aumenten la producción de ácidos orgánicos que excluyan al Al del ápice radical también abren algún camino alternativo para el futuro. Tesfaye *et al.* (2001) informaron la producción de plantas transgénicas de alfalfa que sobreexpresan la enzima malato-deshidrogenasa en el ápice de la raíz –lo que incrementó 7 veces la exudación de ácidos orgánicos (malatos, oxalatos, citratos, succinatos y acetatos) respecto del control no transgénico– y disminuyen la concentración de Al dentro de las células de alfalfa. En un trabajo posterior, Tesfaye *et al.* (2003) señalaron que las mayores cantidades de ácidos orgánicos exudados por las raíces de las alfalfas transgénicas impactaron positivamente no solo en la diversidad y en la actividad de la microflora rizosférica, sino también en la disponibilidad de macro- y micronutrientes para las plantas.

Khu *et al.* (2012) desarrollaron dos ensayos de plantas enteras, uno en diferentes medios sólidos transparentes y otro con suelo para evaluar el rendimiento en condiciones ácidas y Al-tóxicas. Estos métodos permiten la cuantificación del crecimiento de raíces y follaje y, en el caso del ensayo de medios, la visualización de las diferencias en la arquitectura de la raíz. Los ensayos propuestos fueron capaces de discriminar entre genotipos para la tolerancia al Al. Ambos métodos permiten fenotipar un gran número de individuos, incluido el mapeo de poblaciones y el germoplasma en los programas de mejoramiento. Ambos ensayos se usaron para fenotipar más de 400 individuos de dos poblaciones de mapeo, lo que llevó a la identificación de un QTL asociado con tolerancia al Al. Entre las ventajas adicionales del ensayo de plantas enteras en medios en comparación con otros métodos, como los sistemas hidropónicos, se destacan que las raíces crecen en una matriz de medio no líquido que contiene moléculas secretadas alrededor de la zona de la raíz, lo que permite el monitoreo y la visualización en tiempo real; además, el método es no destructivo del crecimiento de la raíz durante la duración del ensayo y elimina la necesidad de lavar el suelo o la arena de las raíces. Debido a que las plantas se cultivan en cámaras de crecimiento, este método permite un control cuidadoso de las condiciones de desarrollo, incluidos los medios de cultivo, la temperatura, la disponibilidad de luz y la humedad, lo que facilita la comparación de las evaluaciones fenotípicas realizadas durante todo el año.

6- *Tolerancia al anegamiento*. Los excesos de agua superficial y la saturación del suelo pueden causar pérdidas completas de pasturas en implantación y reducen el potencial de producción primavera-estival en las pasturas establecidas. Las precipitaciones excesivas provocan desde inundaciones totales, con suelos que aún permanecen bajo agua, a suelos saturados con falta de piso y lotes con encharcamientos locales prolongados por ascenso de la napa. En los lotes ubicados en posiciones topográficas deprimidas, sin vías de drenaje natural, el agua se mantiene en superficie por largo tiempo.

La alfalfa es muy sensible a condiciones de exceso de agua en el perfil de suelo. El encharcamiento de los lotes produce la falta de oxigenación de las raíces, lo que puede llevar a la muerte rápida de las plantas (Basigalup *et al.*, 2007). Además, las condiciones de alta humedad favorecen el desarrollo de agentes patógenos, principalmente *Phytophthora megasperma*, *Pythium* spp. y *Rhizoctonia* spp., que también pueden eliminar gran cantidad de plantas. Los pelos finos de la raíz, que son críticos para la absorción de nutrientes y agua, se dañan particularmente durante el anegamiento y se deben regenerar más adelante si las plantas sobreviven. También se ve afectada la disponibilidad de micronutrientes. En un suelo en condiciones reductoras (bajo contenido de oxígeno), el hierro y otros micronutrientes pueden no estar disponibles para el crecimiento de las plantas debido al exceso de bicarbonatos. Los nódulos para la fijación biológica del nitrógeno se debilitan o se dañan bajo condiciones de inundación, lo que altera la nutrición nitrogenada. La magnitud de los daños por anegamiento es variable según el estado fisiológico del cultivo y la temperatura ambiente; en este sentido, la tolerancia es mayor en plantas adultas y con tiempo fresco (Romero *et al.*, 1995).

El programa de mejoramiento genético de alfalfa del INTA realizó una selección de plantas con alta persistencia en un lote experimental de la EEA INTA Concepción del Uruguay (Entre Ríos), en el ambiente característico de los suelos pesados (Vertisol; Pelluderte típico) de esa zona. Como resultado, se inscribió el cultivar Limay PV INTA, una variedad sintética de GRI 9 que deriva del cruzamiento de 22 plantas seleccionadas por persistencia, sanidad y vigor en un ensayo sin reposo invernal conducido bajo condiciones de corte durante cinco años.

En la actualidad y en colaboración con el INTA Rafaela, se están conduciendo tareas de selección de genotipos tolerantes a hipoxia en condiciones de hidroponía. El objetivo final es conformar una población de alfalfa tolerante a la falta de oxígeno como forma de generar una variedad apta para suelos anegadizos y de napas cercanas a la superficie.

7- *Selección por resistencia al achaparramiento de la alfalfa.* Una nueva enfermedad viral, llamada “achaparramiento de la alfalfa” (AA) fue identificada en Argentina en el año 2010. Los síntomas incluyen achaparramiento (notable disminución de la altura de las plantas), amarillamiento de las nervaduras y severa deformación de hojas, que incluye arrugamiento, epinastia y engrosamiento de las nervaduras en el envés de los folíolos, originando enaciones y formaciones tipo papilas de distintos tamaños. Los ensayos iniciales de campo indicaron que el AA presentó incidencias superiores al 50 %, disminuyó el rendimiento en materia seca hasta un 30 % y redujo significativamente la vida del cultivo (Lenardón *et al.*, 2010). En las plantas infectadas con AA se encontraron coinfecciones del *Alfalfa mosaic virus* (AMV) y del *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus* (ADV). Posteriormente, otros cinco virus fueron detectados en las mismas plantas: *Bean leafroll virus* (BLRV), *Alfalfa enamovirus-1* (AEV-1), *Alfalfa leaf curl virus* (ALCV), *Medicago sativa alfapartitivirus 1* (MsAPV1) y *Medicago sativa alfapartitivirus 2* (MsAPV2). Hasta el momento, estos siete virus se detectaron en plantas de alfalfa de Argentina, siendo ADV, AEV-1 las especies de virus descritas por primera vez en todo el mundo (Trucco *et al.*, 2018) y MsAPV 1 y 2 ya descritas parcialmente (Bejerman *et al.*, 2019). Para mayor información, se sugiere consultar el capítulo 9 de este libro. En cuanto al desarrollo de variedades resistentes, actualmente se está trabajando articuladamente entre las EEA INTA de Manfredi y Santiago del Estero en la selección de plantas individuales que no presenten sintomatología en condiciones de campo. Estas plantas son seguidamente analizadas en el INTA IPAVE (Córdoba), a fin de determinar con precisión la ausencia del complejo viral. Los individuos selectos son finalmente interpolinizados para generar una población de alfalfa resistente a la enfermedad.

## Uso de técnicas moleculares

- Selección genómica a través de fenotipado y genotipado por secuenciación (GBS)

Las tecnologías de secuenciación de próxima generación o next-generation sequencing (NGS), como los SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) a escala del genoma, permiten la caracterización de la variación genética. Sin embargo, la secuenciación de genomas grandes y complejos de especies forrajeras alógamas, como la alfalfa, es difícil de lograr incluso con NGS y requiere de una reducción de la complejidad del genoma (Kopecky y Studer, 2013). La genotipificación por secuenciación o genotyping-by-sequencing (GBS) es una estrategia NGS accesible y simple para caracterizar ampliamente la variación entre los genomas de las plantas, incluso en ausencia de un genoma de referencia (Elshire *et al.*, 2011). El GBS se ha utilizado en poliploides para desarrollar mapas de enlaces de alta densidad (Li *et al.*, 2014), para proporcionar información sobre la diversidad y complejidad del genoma (Lu *et al.*, 2013) y para caracterizar los cambios en las frecuencias alélicas dentro y entre las poblaciones (Byrne *et al.*, 2013). El muestreo robusto de alelos, sin embargo, es esencial para el análisis del impacto de la selección en la composición genética de las poblaciones (Beissinger *et al.*, 2013; Schilling *et al.*, 2014). El análisis genético de especies poliploides alógamas está evolucionando rápidamente gracias a los avances tecnológicos recientes en la secuenciación de alto rendimiento, que hacen que la cobertura de marcadores en todo el genoma sea accesible a un costo razonable (He *et al.*, 2014). La alfalfa es una especie altamente heterocigótica con una gran diversidad genética intravarietal (Nagl *et al.*, 2011).

En un emprendimiento conjunto entre el CREA-ZA, Lodi, Italia y el INTA Manfredi, se planteó llevar adelante el secuenciado de un grupo de cultivares que se destacaron en varias series de ensayos de la Red Nacional de Cultivares del Alfalfa del INTA. El objetivo sería conformar la población de referencia (*training population*) para determinar el valor de mejoramiento (*breeding value*) asociado a los marcadores (GBS) que luego serán utilizados en la predicción de fenotipos sin necesidad de fenotiparlos. Con ello, se espera identificar en una determinada población los mejores individuos para generar variedades de alfalfa con mayor potencial de producción y persistencia.

- Estimación de la distancia genética a través de marcadores moleculares

En la actualidad se cuenta con un gran número de marcadores moleculares (ver capítulo 7 de este libro). No obstante, los microsatélites o *Simple Sequence Repeats* (SSRs) y los *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLPs) son los que más se han usado hasta el presente en el análisis genómico debido a su capacidad para detectar polimorfismos entre genotipos, su alta reproducibilidad y su cobertura genómica. Para estudios de diversidad genética se utilizan comúnmente los SSR, que son eficientes en proporcionar información valiosa debido a su alto polimorfismo, su carácter codominante, su abundancia en el genoma y su fácil detección por métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Suwabe *et al.*, 2004). Los SSR consisten en pequeñas secuencias de 1 a 4 pb de largo, repetidas en tándem. En plantas se distribuyen con una frecuencia de uno cada 50 mil pb y la secuencia repetida más común es el dinucleótido AT (Ferreira y Grattapaglia, 1998). La base genética del polimorfismo detectado en los microsatélites se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tándem y, consecuentemente, en el tamaño del microsatélite amplificado en individuos de una especie. Julier *et al.* (2003) indicaron que los marcadores SSR son herramientas útiles para explorar el genoma de alfalfa debido a su herencia tetrasómica ampliamente aceptada y a su infrecuente fenómeno de doble reducción, que los hacen efectivos para los análisis de la diversidad y la elaboración de mapas genéticos. Diwan *et al.* (1997) fueron los primeros en desarrollar estos marcadores en *Medicago* spp. e indicaron que los marcadores SSR pueden funcionar en alfalfa para la construcción de mapas genéticos. Por lo tanto, estos marcadores demostraron ser útiles en la construcción de mapas de ligamiento genético (Julier *et al.*, 2003), análisis de la diversidad genética (Bagavathiannan *et al.*, 2010; Flajoulot *et al.*, 2005; Sakiroglu *et al.*, 2010), análisis de QTL (Maureira-Butler *et al.*, 2007), mapas de asociación (Sakiroglu *et al.*, 2012) y de relaciones filogenéticas (Sakiroglu y Brummer, 2013). También los marcadores SSR se han aplicado en alfalfa en estudios de variado tipo (Carelli *et al.*, 2009; Diwan *et al.*, 2000; Ellwood *et al.*, 2006; Eujayl *et al.*, 2004; Falahati-Anbaran *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009; Mengoni *et al.*, 2000; Mengoni *et al.*, 2000; Petolescu *et al.*, 2010; Sledge *et al.*, 2005).

En los últimos años, el programa de mejoramiento genético de alfalfa del INTA Manfredi, realizó un *screening* molecular a través de marcadores codominantes SSR con el fin de describir la diversidad genética entre poblaciones. Los objetivos fueron elegir genotipos genéticamente distantes a fin de orientar los cruzamientos entre ellos para generar poblaciones de mayor vigor y, por ende, mejorar el rendimiento de forraje. Como resultado, se desarrollaron 10 poblaciones experimentales que fueron evaluadas bajo corte por producción de forraje y persistencia en condiciones de campo (cultivo denso). El análisis de SSR se llevó a cabo utilizando 40 pares de primers originados principalmente de *M. truncatula* (Julier *et al.*, 2003). Las reacciones de amplificación se realizaron de acuerdo con Flajoulot *et al.* (2005); la posterior visualización se hizo en geles de poliacrilamida mediante tinción con plata (Bassam *et al.*, 1991; Creste *et al.*, 2001), finalmente, en estos geles se estimó el tamaño de cada banda (Figura 7). Con base en los resultados se organizaron los cruzamientos entre los genotipos que presentaron mayor distancia genética.



**Figura 7.** Preparación de material para extracción de ADN y posterior genotipado: a) liofilizado de muestras; b) molienda de muestras para posterior extracción; c) extracción de ADN; d) equipo para reacción de amplificación y e) cuba para corrida electroforética de geles de poliacrilamida. Fotos: Nancy Grandón.

- Edición génica

Edición génica mediada por el sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, en español “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas” y Cas9 es el nombre de una serie de proteínas, principalmente unas endonucleasas de ADN de ARN guía; proteína asociada 9). Es una técnica biotecnológica que permite manipular los genomas de cualquier organismo (Doudna y Charpentier, 2014). La diferencia entre esta tecnología,



bautizada metafóricamente como 'tijera molecular', y las herramientas predecesoras utilizadas para alterar secuencias de ADN, radica en su capacidad para modificar la información genética de manera precisa y controlada de forma relativamente sencilla y cada vez más segura. En la actualidad, el IGEAF INTA Castelar trabaja en la edición del genoma de la alfalfa para mejorar distintos aspectos de su productividad. Para ello se generaron vectores binarios de expresión en alfalfa a fin de modificar genes endógenos que permitirán aumentar el desarrollo vegetativo y el retraso de la floración, buscando así una mayor producción de biomasa. Entre otros caracteres de interés, también se trabaja en mejorar la tolerancia a condiciones de estrés abiótico, el retraso de la senescencia de hojas y la tolerancia a herbicidas. Estos temas se tratan con mayor detalle en el capítulo 7 de este libro.

## Consideraciones finales

El mejoramiento genético de la alfalfa ha alcanzado un notable grado de desarrollo en todo el mundo, a punto tal de contarse con un extenso listado de variedades obtenidas para una gran diversidad de situaciones ambientales y sistemas de producción. Para ello, además de aprovechar la enorme variabilidad genética de la especie, se han desarrollado métodos de mejoramiento adaptados a las particularidades de la alfalfa, como la autotetraploidía, la autoincompatibilidad, la intolerancia a la endocría y la perennidad, entre otras. Para la mejora de aquellos caracteres en los que la variabilidad genotípica natural es nula o muy escasa, las técnicas moleculares son cada vez más usadas, a punto tal que ya se cuenta con variedades transgénicas. En Argentina, el desarrollo de cultivares de alfalfa es llevado a cabo tanto por entidades públicas (principalmente el INTA) como por empresas privadas. La tasa de renovación de materiales mejorados en el mercado es elevada, de modo que el productor pecuario tiene siempre la posibilidad de elegir lo que mejor se adapte a sus necesidades. En ese sentido, se recomienda enfáticamente consultar la información generada por las redes de evaluación de cultivares y el empleo de semilla fiscalizada (con rótulo del INASE), que garantiza la calidad y la pureza genética de los cultivares.

## BIBLIOGRAFÍA

- AL-DOSS, A.; S. SMITH. 1998. *Registration of AZ-97MEC and AZ-97MEC-ST very non-dormant alfalfa germplasm pools with increased shoot weight and different response to saline irrigation*. *Crop Sci.* 38: 568.
- AL-KHATIB, M.; T. MCNEILLY; J.C. COLLINS. 1993. *The potential of selection and breeding for improved salt tolerance in lucerne (Medicago sativa L.)*. *Euphytica* 65: 43-51.
- ANJUM, N.A.; I.M. AREF; A.C. DUARTE; E. PEREIRA; I. AHMAD; I. MUHAMMAD. 2014. *Glutathione and proline can coordinately make plants withstand the joint attack of metal (loid) and salinity stresses*. *Front. Plant Sci.* 5, doi: 66210.3389/fpls.2014.00662
- ARANJUELO, I.; J. JOSÉ IRIGOYEN; M. SÁNCHEZ-DÍAZ. 2007. *Effect of elevated temperature and water availability on CO<sub>2</sub> exchange and nitrogen fixation of nodulated alfalfa plants*. *Environmental and Experimental Botany.* 59. 99-108. 10.1016/j.envexpbot.2005.10.008
- ARDILA, F.; J. CIANCIO; M.R. GARAY; E. PAGANO; R.D. RÍOS; P.M. FRANZONE. 2003. *Genetic engineering manipulation of condensed tannin biosynthesis for the obtention of safe-bloat alfalfa*. *Proc. 3rd International Symposium of Molecular Breeding of Forage and Turf*. Dallas, TX, EUA.
- AZIZI, M.R. 1980. *Inheritance of the multifoliolate trait in tetraploid alfalfa, Medicago sativa L.* Ph.D. Thesis. Graduate College. University of Arizona. 41 p.
- BAGAVATHIANNAN, M.V.; B. JULIER; P. BARRE; R.H. GULDEN; R.C. VAN ACKER. 2010. *Genetic diversity of feral alfalfa (Medicago sativa L.) populations occurring in Manitoba, Canada and comparison with alfalfa cultivars: an analysis using SSR markers and phenotypic traits*. *Euphytica.* 173: 419-432.
- BALIGAR, V.C.; J.H. ELGIN JR.; C.D. FOY. 2002. *Variability in alfalfa for growth and mineral uptake and efficiency ratios under aluminium stress*. *Agron. J.* 81: 223-229.
- BARNES, D.K.; E.T. BINGHAM; J.D. AXTELL; W.H. DAVIS. 1972. *The flower, sterility mechanism, and pollination control*. En: HANSON, C.H. (ed.). *Alfalfa Science and Technology*. ASA, Agronomy 15. Madison, WI, EUA. 123-141 pp.
- BARONE, P.; D. ROSELLINI; P. LAFAYETTE; J. BOUTON; F. VERONESI; W. PARROTT. 2008. *Bacterial citrate synthase expression and soil aluminum tolerance in transgenic alfalfa*. *Plant Cell Rep.* 27:893-901. doi:10.1007/s00299-008-0517-x
- BARROS-RIOS, J.; S. TEMPLE; R. DIXON. 2018. *Development and commercialization of reduced lignin alfalfa*. *Current opinion in biotechnology.* 56. 48-54. 10.1016/j.copbio.2018.09.003
- BASIGALUP, D.H.; D.K. BARNES; R.E. STUCKER. 1995. *Development of a core collection for perennial Medicago Plant Introductions*. *Crop Sci.* 35 (4): 1163-1168.
- BASIGALUP, D.H.; E.H. HIJANO. 1995. *Mejoramiento genético de la alfalfa*. En: HIJANO, E.H.; A. NAVARRO (ed.). *La Alfalfa en la Argentina*. INTA, SubPrograma Alfalfa. *Enciclopedia Agro de Cuyo, Manuales* 11. 39-60 pp.

BASIGALUP, D.H.; C.V. CASTELL; C.D. GIAVENO. 1996. *Breeding a bloat-tolerant alfalfa in Argentina*. En: WOORDWARD, W.T.; J.H. ELGIN, Jr. (eds.). *Report of the 35th North American Alfalfa Improvement Conference*. Oklahoma City, OK, EUA. 31 p.

BASIGALUP, D.H.; C.V. CASTELL; V. AROLFO; M. BENÍTEZ. 1998. *Response to selection in the development of a bloat-tolerant alfalfa in Argentina*. En: BOUTON, J.; G. Bauchan (eds.). *Report of the 36th North American Alfalfa Improvement Conference*. Bozeman, MT, EUA. 90 p.

BASIGALUP, D.H.; C.V. CASTELL; C.D. GIAVENO. 2003. *Response to selection for lower initial rate of dry matter disappearance in the development of a bloat-tolerant non-dormant alfalfa population*. *Journal of Genetics and Breeding* 57 (1): 31-38.

BASIGALUP, D.H.; J. MARTINEZ FERRER; A. ODORIZZI; V. AROLFO; E. USTARROZ; L. BERNÁLDEZ; N. LATIMORI; A. KLOSTER; P. DAVIES; D. MÉNDEZ; M. CORREA LUNA. 2007. *ProINTA Carmina. Variedad de alfalfa con menor potencial timpanizante*. IDIA XXI. Año VII, N.º 9. 32-37 pp.

BASIGALUP, D.H.; R. ROSSANIGO; M.V. BALLARIO. 2007. *Panorama actual de la alfalfa en la Argentina*. En: BASIGALUP, D.H. *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*. Buenos Aires: INTA. Cap. 1. 13-25 pp.

BASSAM, B.J.; G. CAETANO-ANOLLÉS; P.M. GRESSHOFF. 1991. *Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels*. *Anal. Biochem.* 196: 80-83.

BAUDER, W.W. 1938. *The inheritance of the odd leaf character in Medicago sp.* M.S. Thesis. University of Nebraska, Lincoln. En: FERGUSON, J.E.; R.P. MURPHY. 1973. *Comparison of trifoliolate and multifoliolate phenotypes of alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Crop Science* 13: 463-465.

BEISSINGER, T.M.; C.N. HIRSCH; R.S. SEKHON; J.M. FOERSTER; J.M. JOHNSON; G. MUTTONI. 2013. *Marker density and read depth for genotyping populations using genotyping-by-sequencing*. *Genetics*. 193:1073-1081. 10.1534/genetics.112.147710

BEJERMAN, N.; H. DEBAT; C. NOME; D. CABRERA MEDEROS; V. TRUCCO; S. DE BREUIL; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2019. *Redefining the medicago sativa alphapartitiviruses genome sequences*. *Virus Research*. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.021>

BENES, S.E.; G. GALDI; R.B. HUTMACHER; S.R. GRATTAN; I. CHAHAL; D.H. PUTNAM. 2018. *Alfalfa (Medicago sativa L.) is more tolerant to salinity than guidelines indicate: Implications of field and greenhouse studies*. En: *Proceedings. Second World Alfalfa Congress, Cordoba, Argentina*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (Disponible: <http://www.worldalfalfacongress.org/> consultado: agosto de 2020).

BERG, B.P.; W. MAJAK; T.A. MCALLISTER; J.W. HALL; D. MCCARTNEY; B.E. COULMAN; B.P. GOPLEN; S.N. ACHARYA; R.M. TAIT; K.J. CHENG. 2000. *Bloat in cattle grazing alfalfa cultivars selected for a low initial rate of digestión: a review*. *Can. J. Plant Sci* 80: 493-502.

- BERNALDEZ, M.L.; D. BASIGALUP; J. MARTÍNEZ FERRER; D. ALOMAR. 2005. *Potencial meteorizante de un cultivar de alfalfa con baja tasa inicial de degradación ruminal*. *Rev. Arg. De Prod. Animal* 25 (Supl. 1): 184-185.
- BINGHAM, E.T. 1964. *A genetical and morphological investigation of multifoliolate leaves of alfalfa, Medicago sativa L. Ph.D. Thesis. Cornell University, Ithaca, Nueva York. Univ. Microfilms, Ann Arbor, Mich. (Diss. Abstr.25: 3217)*.
- BINGHAM, E.T. 1983A. *Maximizing hybrid vigor in autotetraploid alfalfa*. In: *Better Crops for Food. CIBA Foundation Symp 97. Pitman Books, Londres, Reino Unido. 130-143 pp.*
- BINGHAM, E.T. 1983b. *Molecular genetic engineering vs. plant breeding*. *Pl. Mol. Biol.* 2: 221-228.
- BINGHAM, E.T.; R.P. MURPHY. 1965. *Breeding and morphological studies on multifoliolate selections of alfalfa Medicago sativa L. Crop Science* 5: 233-235.
- BLUM, A. 1996. *Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. Plant Growth Regulation.* 20. 135-148. 10.1007/BF00024010.
- BOUTON, J.H.; D.R. RADCLIFFE. 1989. *Effects of acid soil selection on agronomically important traits in alfalfa*. En: *Association Française pour la Production Fourragère (ed.). Proc. 16th Intern. Grass. Congress. Nice, France. French Grassland Society, Versailles. 377-378 pp.*
- BOUTON, J.H. 1996. *Screening the alfalfa core collection for acid soil tolerance. Crop Sci.* 36:198-200. doi:10.2135/cropsci1996.0011183X003600010035x
- BRADNER, N.T.; W.R. CHILDERS. 1968. *Cytoplasmic male sterility in alfalfa. Can. J. Pl. Sci.* 48: 111-112.
- BRICK, M.A.; A.K. DOBRENZ; M.H. SCHONHORST. 1976. *Transmittance of the multifoliolate leaf characteristics into non-dormant alfalfa. Agron. J.* 68:134-136.
- BRUMMER, E.C. 1999. *Capturing heterosis in forage crop cultivar development. Crop Sci.* 39: 943-954.
- BURKART, A. 1937a. *Frecuencia de la fecundación cruzada en la alfalfa según experiencias con plantas recesivas de flor blanca y consideraciones sobre el mejoramiento de esta forrajera. Rev. Arg. de Agronomía* 4: 83-100.
- BURKART, A. 1937b. *La selección de alfalfa inmune al nemátode del tallo (Anguillulina dipsaci). Rev. Arg. de Agronomía* 4:171-196.
- BURKART, A. 1947. *Adelantos recientes en las técnicas de mejoramiento genético de alfalfa. Anales Acad. Nac. Ciencias Exac., Fís. y Nat. (Arg.)*. 12: 39-57.
- BURKART, A. 1952. *Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. Buenos Aires, Acme Agency, 389 p.*
- BURKART, A.; A. RAGONESE. 1933. *Investigaciones relacionadas con la biología floral de la alfalfa bonaerense. Rev. Centro de Estudiantes de Agronomía* 26:54-66.

- BUSBICE, T.H.; C.O. WILSIE. 1966. *Inbreeding depression and heterosis in autotetraploids with application to Medicago sativa L. Euphytica* 15: 52-67.
- BUSBICE, T.H. 1969. *Inbreeding in synthetic varieties. Crop Sci.* 9: 601-604.
- BUSBICE, T.H. 1970. *Predicting yields in synthetic varieties. Crop Sci.* 10: 265-269.
- BUSBICE, T.H.; R.R. HILL JR.; H.L. CARNAHAN. 1972. *Genetics and breeding procedures. En: HANSON.H. (ed.). Alfalfa Science and Technology. ASA, Agronomy 15. Madison, WI, EUA. 283-318 pp.*
- BUSBICE, T.H.; R.Y. GURGIS. 1976. *Evaluating parents and predicting performance of synthetic varieties. US Gov. Printing Office. USDA-ARS-S 130.*
- BYRNE, S.; A. CZABAN; B. STUDER; F. PANITZ; C. BENDIXEN; T. ASP. 2013. *Genome wide allele frequency fingerprints (GWAFFs) of populations via genotyping by sequencing. PLoS One.* 8:e57438 10.1371/journal.pone.0057438
- CANGIANO, C.A. 1997. *Empaste. Métodos de prevención. En: C.A. Cangiano (ed.). Producción Animal en Pastoreo. Cap. 7. Ediciones INTA, Balcarce, Argentina. 103-115 pp.*
- CARELLI, M.; G. GNOCCHI; C. SCOTTI. 2009. *Alfalfa germplasm from Sahara oasis: Characterization by means of bio-agronomic traits and SSR markers. Plant Breed.* 128:271-277.
- CHEN, T.; Q. YANG; X. ZHANG; W. DING; M. GRUBER. 2012. *An alfalfa (Medicago sativa L.) ethylene response factor gene, MsERF11, enhances salt tolerance in transgenic Arabidopsis. Plant Cell Rep.* 31, 1737-1746. doi: 10.1007/s00299-012-1287-z
- CORNACCHIONE, M.V.; D.L. SUAREZ. 2015. *Emergence, forage production, and ion relations of alfalfa in response to saline waters. Crop Sci.* 55, 444-457, doi: 10.2135/cropsci2014.01.0062
- CORNACCHIONE, M.V.; D.L. SUAREZ. 2017. *Evaluation of alfalfa (Medicago sativa L.) populations response to salinity stress. Crop Sci.* 57(1):137-150. doi:10.2135/cropsci2016.05.0371
- COULMAN, B.E.; W. MAJAK; T. MCALLISTER; B. BERG; D. MCCARTNEY; K.-J. CHENG; J.W. HALL; B.P. GOPLIN. 1996. *Reduced bloat incidence in grazing trials of alfalfa selected for low initial rate of digestion (LIRD). Report of the 35th North American Alfalfa Improvement Conference, Oklahoma City, OK.*
- COULMAN, B.E.; C. DUNCAN; B.P. GOPLIN. 1998. *Response to four cycles of selection for low initial rate of digestion in alfalfa. En: J. BOUTON; G. BAUCHAN (eds.). Report of the 36th North American Alfalfa Improvement Conference, Bozeman, MT, EUA. 74 p.*
- COULMAN, B.E.; M. GRUBER; T.A. MCALLISTER; W. MAJAK; D. THOMPSON. 2000. *Future of alfalfa as a grazing crop: Bloat. En: BOUTON, J.; G. BAUCHAN (eds.). Report of the 37th North American Alfalfa Improvement Conference. Madison, WI, EUA. 351-358 pp.*
- COULMAN, B.; B. GOPLIN; W. MAJAK; T.A. MCALLISTER; K.-J. CHENG; B. BERG; J. HALL; D. MCCARTNEY; S. ACHARYA. 2000b. *A review of the development of a bloat-reduced alfalfa cultivar. Can. J. Plant Sci.* 80: 487-491.

- COVAS, G.; O. FERNÁNDEZ. 1947. Cruzamientos naturales y artificiales en alfalfa. *Rev. Arg. De Agronomía* 14(1):70-72.
- COVAS, G.; C.D. ITRIA; W. GODEK; O. FERNÁNDEZ. 1949. Observaciones relacionadas con la fitotecnia de la alfalfa. *Reun Com. V. An. I. Fitot.* 10 p.
- CRESTE, S.; A. TULMANN NETO; A. FIGUEIRA. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter.* 19: 299-306.
- DALL'AGNOL, M.; J.H. BOUTON; W.A. PARROTT. 1996. Screening methods to develop alfalfa germplasm tolerant to acid, aluminium toxic soils. *Crop Sci.* 36: 64-70. doi:10.2135/cropsci1996.0011183X003600010011x
- DAVIS, W.H.; J.M. GREENBLATT. 1967. Cytoplasmic male sterility in alfalfa. *J. of Heredity* 58: 301-305.
- DEGENHARDT, J.; P.B. LARSEN; S.H. HOWELL; L. KOCHIAN. 1998. Aluminium resistance in the *Arabidopsis* mutant *alr-104* is caused by an aluminium increase in rizosphere pH. *Plant Physiol.* 117: 19-27.
- DELHAIZE, E.; P.R. RYAN. 1995. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107:315-321.
- DEVINE, T.E.; C.D. FOY; A.L. FLEMING; C.H. HANSON; T.A. CAMPBELL; J.E. MCMURTREY; J.W. SCHWARTZ. 1976. Development of alfalfa strains with differential tolerance to aluminium toxicity. *Plant Soil* 44: 657-665.
- DIWAN, N.; A.A. BHAGWAT; G.R. BAUCHAN; P.B. CREGAN. 1997. Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome* 40: 887-895.
- DIWAN, N.; J.H. BOUTON; G. KOCHERT; P.B. CREGAN. 2000. Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 165-172.
- DOUDNA, J.A.; E. CHARPENTIER. 2014. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 346(6213):1258096. doi: 10.1126/science.1258096
- DOWNES, R. 2000. Lucerne, *Medicago sativa*, 'Salado'. *Plant Var. J.* 13 (1): 52-53.
- ELGIN, J.H. JR.; J.E. MCMURTEY III; B.J. HATMAN; B.D. THYR; E.L. SORENSEN; D.K. BARNESM; F.I. FROSHEISER; R.N. PEADEN; R.R. HILL JR.; K.T. LEATH. 1983. Use of strain crosses in the development of multiple pest resistant alfalfa with improved field performance. *Crop Sci.* 23: 57-64.
- ELLWOOD, N.K.; L.G. D' SOUZA; T.I. KAMPHUIS; R.M. BURGESS; R.P. NAIR; S.R. OLIVER. 2006. SSR analysis of the *Medicago truncatula* SARDI core collection reveals substantial diversity and unusual genotype dispersal throughout the Mediterranean basin. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 977-983.

- ELSHIRE, R.J.; J.C. GLAUBITZ; Q. SUN; J.A. POLAND; K. KAWAMOTO; E.S. BUCKLER; E.T. AL. 2011. *A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PLoS One. 6:e19379 10.1371/journal.pone.0019379*
- ERICE, G.; S. LOUAHLIA; J. IRIGOYEN; M. SANCHEZ; J. AVICE. 2010. *Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. Journal of plant physiology, 167(2).114-20 pp.*
- EUJAYL, I.; M. SLEDGE; L. WANG; G. MAY; K. CHEKHOVSKIY; J. ZWONITZER; M. MIAN. 2004. *Medicago truncatula EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for Medicago spp. Theoretical and Applied Genetics 108: 414-422.*
- FALAHATI-ANBARAN, M.; A. HABASHI; M. ESFAHANY, S. MOHAMMADI; B. GHARE-YAZIE. 2007. *Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (Medicago sativa L.) from various regions contiguous to the centers of origin of the species. J. Genet. 86: 59-63.*
- FERREIRA, R.P.; E. SOARES DE VASCONCELOS; D.H. BASIGALUP; C.D. CRUZ; A. VANDER PEREIRA. 2011. *Genética quantitativa aplicada ao melhoramento da alfafa. En: FERREIRA, E.P.; D.H. BASIGALUP; J.O. GIECO (ed.). Melhoramento Genético da Alfafa, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, Brasil, Cap. 4. 83-103 pp.*
- FERREIRA, J.F.S.; M.V. CORNACCHIONE; X. LIU; D.L. SUAREZ. 2015. *Nutrient composition, forage parameters, and antioxidant capacity of alfalfa (Medicago sativa, L.) in response to saline irrigation water. Agriculture 5, 577-597. doi: 10.3390/agriculture5030577*
- FERREIRA, M.Y.; D. GRATTAPAGLIA. 1998. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia, Brasil. 38-56 pp.*
- FLAJOULOT, S.; J. RONFORT; P. BAUDOUIN; P. BARRE; T. HUGUET; C. HUYGHE; B. JULIER. 2005. *Genetic diversity among alfalfa (Medicago sativa) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. Theoretical and Applied Genetics 111: 1420-1429.*
- FLOWERS, T.J.; R. MUNNS; T.D. COLMER. 2015. *Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. Ann. Bot. 115, 419-431. doi: 10.1093/aob/mcu217*
- FOY, C.D. 1992. *Soil chemical factors limiting plant root growth. Adv. Soil Sci. 19:97-149.*
- FOY, C.D.; R.R. DUNCAN; R.M. WASKON; D.T. MILLER. 1993. *Tolerance of sorghum genotypes to an acid, aluminium toxic tatum subsoil. J. Plant Nutr. 161: 97-127.*
- GARCÍA, A.; N.D. AYUB; A.R. FOX; M.C. GÓMEZ; M.J. DIÉGUEZ; E.M. PAGANO; C. BERINI; J.P. MUSCHIETTI; G. SOTO. 2014. *Alfalfa snakin-1 prevents fungal colonization and probably coevolved with rhizobia. BMC Plant Biology. 14:248.*
- GIAVENO, C.D.; J.B. MIRANDA. 2000. *Rapid screening for aluminium tolerance in maize (Zea mays L.). Genet. Mol. Biol. 23: 847-850.*
- GOPLIN, B.P.; R.E. HOWARTH; G.L. LEES; W. MAJAK; J.P. FAY; K.-J. CHENG. 1983. *Evolution of selection techniques in breeding for bloat-safe alfalfa. En: SMITH J.A.; V.W. HAYS (ed.). Proc. 14th Int. Grassl. Congr., Westview Press, Boulder, CO. 221-223 pp.*

- GOPLEN, B.P.; R.E. HOWARTH; G.L. LEES. 1993. *Selection of alfalfa for a lower initial rate of digestion and corresponding changes in epidermal and mesophyll cell wall thickness. Can. J. Plant Sci.* 73: 111-122.
- GEBREMEDHIN, A.; P. BADENHORST; J. WANG; N. COGAN; G. SPANGENBERG; K. SMITH. 2019. *Combining NDVI and plant height as a proxy to enable high-throughput phenotyping of herbage yield in perennial ryegrass breeding program. Proceedings of the International Forage & Turf Breeding Conference, Lake Buena Vista, FL, EUA.* 110 p.
- GUPTA, B.; B.R. HUANG. 2014. *Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. Int. J. Genomics* 2014, Article ID 701596, 18 p. doi: 10.1155/2014/701596
- HAAG, W.L.; R.R. HILL JR. 1974. *Comparison of selection methods for autotetraploids. II. Selection for disease resistance in alfalfa. Crop Sci.* 14: 591-593.
- HANSON, C.H.; T.H. BUSBICE; R.R. HILL JR.; O.J. HUNT; A.J. OAKES. 1972. *Directed mass selection for developing multiple pest resistance and conserving germplasm of alfalfa. J. Environ. Quality* 1: 106-111.
- HARRIS, D.L. 1964. *Expected progress from index selection involving estimates of populations parameters. Biometrics* 20: 46-72.
- HARTEL, P.G.; J.H. BOUTON. 1989. *Rhizobium meliloti inoculation of alfalfa selected for tolerance to acid, aluminium rich soils. Plant Soil* 116: 283-285.
- HAZEL, L.N.; J.L. LUSH. 1942. *The efficiency of three methods of selection. J. Heredity* 33: 393-399.
- HE, C.; Z.L. XIA; T.A. CAMPBELL; G.R. BAUCHAN. 2009. *Development and characterization of SSR markers and their use to assess genetic relationships among alfalfa germplasms. Crop Science* 49: 2176-2186.
- HE, J.; X. ZHAO; A. LAROCHE; Z.X. LU; H. LIU; Z. LI. 2014. *Genotyping by sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. Front Plant Sci.* 5:484 10.3389/fpls.2014.00484
- HENDERSON, M.; J.D. OWNBY. 1991. *The role of root cap mucilage secretion in aluminium tolerance of wheat. Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 10: 134-141.
- HILL, R.R. JR.; C. H. HANSON; T.H. BUSBICE. 1969. *Effect of four recurrent selection programs on two alfalfa populations. Crop Sci.* 9: 129-133.
- HILL, R.R. JR. 1971. *Effect of the number of parents on the mean and variance of synthetic varieties. Crop Sci.* 11: 283-286.
- HILL, R.R. JR.; W.L. HAAG. 1974. *Comparison of selection methods for autotetraploids. Theoretical. Crop Sci.* 14: 587-590.
- HILL, R.R. JR. 1983. *Heterosis in population crosses of alfalfa. Crop Sci.* 23: 48-50.
- HOEKENGA, O.A.; T.J. VISION; J.E. SHAFF; A.J. MONFORTE, G.P. LEE; S.H. HOWELL; L.V. KOCHIAN. 2003. *Identification and characterization of aluminum tolerance loci in Ara-*



*bidopsis* (*Landsberg erecta* × *Columbia*) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiol.* 132:936-948. doi:10.1104/pp.103.023085

HOFFMAN, G.J.; E.V. MASS; S.L. RAWLINS. 1975. Salinity-ozone interactive effects on alfalfa yield and water relations. *Journal of Environmental Quality* 4: 326-331.

HOWARTH, R.E.; B.P. GOPLIN; A.C. FESSER. 1978. A possible role for leaf cell rupture in legume pasture bloat. *Crop Sci.* 18: 129-133.

HOWARTH, R.E.; K.-J. CHENG; J.P. FAY; W. MAJAK; G.L. LEES; B.P. GOPLIN; J.W. COSTERTON. 1982. Initial rate of digestion in legume pasture bloat. En: SMITH J.A.; V.W. HAYS (ed.) *Proc. 14th Int. Grassl. Congr., Westview Press, Boulder, CO.* 719-722 pp.

HOWARTH, R.E.; B.P. GOPLIN; S.A. BRANDT; K.-J. CHENG. 1982. Disruption of leaf tissues by rumen microorganisms: An approach to breeding bloat-safe forage legumes. *Crop Sci.* 22: 564-568.

HOWARTH, R.E. 1988. Antiquality factors and nonnutritive chemicals components. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL, Jr. (ed.) *Alfalfa and Alfalfa Improvement, Agronomy 29, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.* 493-514 pp.

HUMPHRIES, A.W.; G.C. AURICHT. 2001. *Breeding Lucerne for Australia's southern dryland cropping environments.* *Aust. J. Agric. Res.* 52:153-169.

INTA. 1986. *Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa.* Colección Científica INTA, Bs. As. 488 p.

ISHITANI, M.; I. RAO; P. WENZL; S. BEEBE; J. TOHME. 2004. Integration of genomics approach with traditional breeding towards improving abiotic stress adaptation: Drought and aluminum toxicity as case studies. *Field Crops Res.* 90:35-45. doi:10.1016/j.fcr.2004.07.004

ITRIA, C.D. 1986. *El cultivo de la alfalfa en la República Argentina.* En: BARIGGI, C.; V.L. MARBLE; C.D. ITRIA; J. BRUN (ed.) *Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa.* Colección Científica INTA, Bs. As. Cap. 1. 7-22 pp.

ITRIA, C.D. 1969. *La alfalfa en la República Argentina.* INTA, IDIA Suplemento N.º 21.

JALEEL, C.A.; P. MANIVANNAN; A. WAHID; M. FAROOQ; H.J. AL-JUBURI; R. SOMASUNDARAM; R. PANNEERSELVAM. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 100-105.

JAYASINGHE, C.; J. WANG; P. BODENHORST; J. JACOBS; G. SPANGENBERG; K. SMITH. 2019. Application of multispectral image sensors for evaluation of perennial ryegrass persistence in field plots. *Proceedings of the International Forage & Turf Breeding Conference, Lake Buena Vista, FL, EUA.* 109 p.

JENSEN, S.; M.R. BROADLEY; W. ROBBRECHT; E. SMETS. 2002. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *Bot. Rev.* 68: 235-269.

JOHNSON, D.W.; S.E. SMITH; A.K. DOBRENZ. 1991. Registration of AZ-90NDC-ST non-dormant alfalfa germplasm with improved forage yield in saline environments. *Crop Sci.* 31: 1098-1099.

- JOZEFKOWICZ, C.; E. BOTTERO; C. PASCUAN; E. PAGANO; N.D. AYUB; G. SOTO. 2016. *Minimizing the time and cost of production of transgenic alfalfa libraries using the highly efficient completely sequenced vector pPZP200BAR*. *Plant Cell Rep. Sep*;35(9):1987-90.
- JOZEFKOWICZ, C.; R. FRARE; R. FOX; A. ODORIZZI; V. AROLFO; E. PAGANO; D. BASIGALUP; N. AYUB; G. SOTO. 2018. *Maximizing the expression of transgenic traits into elite alfalfa germplasm using a supertransgene configuration in heterozygous conditions*. *Theor Appl Genet. May*; 131(5):1111-1123.
- JULIER, B.; S. FLAJOULOT; P. BARRE; G. CARDINET; S. SANTONI; T. HUGUET; C. HUYGHE. 2003. *Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (Medicago sativa) using microsatellite and AFLP markers*. *BMC Plant Biology* 3, 9. doi:10.1186/1471-2229-3-9
- KAMP-GLASS, M.; D. POWELL; G.B. REDDY; V.C. BALIGAR; R.J. WRIGHT. 1993. *Bio-techniques for improving acid aluminium tolerance in alfalfa*. *Plant Cell Rep.* 12: 590-592.
- KEHR, W.R.; H.O. GAUMAN; C.C. LOWE; C.O. GARDNER. 1961. *The performance of alfalfa synthetics in the first and advance generations*. *Neb. Agr. Exp. Stn. Bull.* 200.
- KEMPTHORNE, O. 1955. *The correlation between relatives in a simple autotetraploid population*. *Genetics* 40: 168-174.
- KEMPTHORNE, O. 1957. *An introduction to genetics statistics*. John Willey and Sons, Nueva York, EUA. 545 p.
- KHU, D-M.; R. REYNO; E.C. BRUMMER; M.J. MONTEROS. 2012. *Screening Methods for Aluminum Tolerance in Alfalfa*. *Crop. Science*, Vol. 52. 161-167 pp.
- KHURANA, E.; J.S. SINGH. 2004. *Germination and seedling growth of five tree species from tropical dry forest in relation to water stress: Impact of seed size*. *J. Trop. Ecol.* 20: 385-396.
- KOCHIAN, L.V. 1995. *Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:237-260. doi:10.1146/annurev.pp.46.060195.001321
- KOCHIAN, L.V.; O.A. HOEKENGA; M.A. PINEROS. 2004. *How do crop plants tolerate acid soils? – Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:459-493. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655
- KOPECKY, D.; B. STUDER. 2013. *Emerging technologies advancing forage and turf grass genomics*. *Biotechnol Adv.* 2014; 32:190-199. 10.1016/j.biotechadv
- KUGLER, W.F.; M.S. MORO; J.A. JOSIFOVICH. 1963. *Catálogo de cultivares de plantas agrícolas argentinas*. Colección Agropecuaria N.º 9, INTA. Bs. As. 176-179 pp.
- LACEFIELD, G.D. 2004. *Alfalfa quality: what is it? What we can do about it? And, will it pay?*. *Proc. National Alfalfa Symposium, San Diego, CA, UC*.
- LAMB, J.F.S.; L.D. JOHNSON; D.K. BARNES; J.J. MARQUEZ-ORTIZ. 2000. *A method to characterize root morphology traits in alfalfa*. *Can. J. Plant Sci.* 80: 97-104.

- LENARDÓN, S.; D. BASIGALUP; J. PÉREZ FERNÁNDEZ. 2010. *Una virosis limitante del cultivo de alfalfa en Argentina. Informe técnico. Argentina, INTA.*
- LEVINGS, D.S. III; J.W. DUDLEY. 1963. *Evaluation of certain mating designs for estimation of genetic variance in autotetraploid alfalfa. Crop Sci. 3: 532-535.*
- LI, X.F.; J.F. MA; S. HIRADATE; H. MATSUMOTO. 2000. *Mucilage strongly binds aluminium but does not prevent roots from aluminium injury in Zea mays. Physiol. Plant 108: 152-160.*
- LI, X.; Y. WEI; A. ACHARYA; Q. JIANG; J. KANG; E.C. BRUMMER. 2014. *A saturated genetic linkage map of autotetraploid alfalfa (Medicago sativa L.) developed using genotyping-by-sequencing is highly syntenous with the Medicago truncatula genome. G3 (Bethesda); 4(10):1971-1979.*
- LIPPKE, H.; J.L. REAVES; N.L. JACOBSON. 1972. *Rumen pressure associated with the score of a bloat severity scale. J. An. Sci. 34(1):171-175.*
- LÓPEZ-BUCIO, J.; M.F. NIETO-JACOBO; V. RAMÍREZ-RODRÍGUEZ; L. HERRERA-ESTRELLA. 2000. *Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. Plant Sci. 160: 1-13.*
- LU, F.; A.E. LIPKA; J. GLAUBITZ; R. ELSHIRE; J.H. CHERNEY; M.D. CASLER. 2013. *Switchgrass genomic diversity, ploidy, and evolution: novel insights from a network-based SNP discovery protocol. PLoS Genet. 9:e1003215 10.1371/journal.pgen.1003215*
- MA, J.F. 2000. *Role of organic acids in detoxification of aluminium in higher plants. Plant Cell Physiol. 41: 383-390.*
- MA, J.F.; P.R. RYAN; E. DELHAIZE. 2001. *Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. Trends Plant Sci. 6: 273-278.*
- MAUREIRA-BUTLER, I.J.; J.A. UDALL; T.C. OSBORN. 2007. *Analyses of a multi-parent population derived from two diverse alfalfa germplasms: testcross evaluations and phenotype-DNA associations. Theoretical and Applied Genetics 115: 859-867.*
- MCCASLIN, M.; S.J. TEMPLE; J.E. TOFTE. 2002. *Methods for maximizing expression of transgenic traits in autopolyploid plants. U. S. Patent Office Application Publication N.º US-2002-0042928-A1.*
- MCCASLIN, M.H. 2018. *Use of GE traits for Improvement of Forage Quality in Alfalfa. IN Proceedings. Second World Alfalfa Congress, Cordoba, Argentina. (Disponible: <http://www.worldalfalfacongress.org/> consultado: agosto de 2020).*
- MCKIMMIE, T.; A.K. DOBRENZ. 1987. *A method for evaluation of salt tolerance during germination, emergence and seedling establishment. Agron. J. 79: 943-945.*
- MCKIMMIE, T.; A.K. DOBRENZ. 1991. *Ionic concentrations and water relations of alfalfa seedlings differing in salt tolerance. Agronomy Journal 83 (2): 363-367.*
- MCMAHON, L.R.; T.A. MCALLISTER; B.P. BERG; W. MAJAK; S.N. ACHARYA; J.D. POPP; B.E. COULMAN; Y. WANG; K.-J. CHENG. 2000. *A review of the effects of forage*

condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can. J. Plant Sci.* 80: 469-485.

MEDRANO, H.; J. BOTA; J. CIFRE; J. FLEXAS; M. RIBAS; J. GUILAS. 2007. *Eficiencia en el uso del agua por las plantas. Investigaciones Geográficas*, 43.63-84 pp.

MELTON, B. 1979. *Inbreeding, environmental effects and combining ability studies in alfalfa. New Mexico State Univ. Agr. Exp. Stn. Special Report 35*, 223 p.

MENGONI, A.; C. RUGGINI; G.G. VENDRAMIN; M. BAZZICALUPO. 2000a. *Chloroplast microsatellite variations in tetraploid alfalfa. Plant Breed.* 119: 509-512.

MENGONI, A.; A. GORI; M. BAZZICALUPO. 2000b. *Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, Medicago sativa. Plant Breeding.* 119: 311-317.

MILLER, D.R.; R.M. WASKOM; R.R. DUNCAN; P.L. CHAPMAN; M.A. BRICK; G.E. HANNING; D.A. TIMM; M.W. NABORS. 1992. *Acid soil stress tolerance in tissue culture-derived sorghum lines. Crop Sci.* 32: 324-327.

MONSANTO. 2005. *Safety assessment of roundup ready alfalfa events J101 and J163. Executive Summary.* 1-32 pp.

MORALES, C.; M. PINO; A. DEL POZO. 2013. *Phenological and physiological responses to drought stress and subsequent rehydration cycles in two raspberry cultivars. Scientia Horticulturae*, 162.234-241 pp.

MUNNS, R.; M. TESTER. 2008. *Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.

NAGL, N.; K. TASKI-AJDUKOVIC; G. BARAC; A. BABURSKI; I. SECCARECCIA; S. MILIC. 2011. *Estimation of the genetic diversity in tetraploid alfalfa populations based on RAPD markers for breeding purposes. Int J Mol Sci.* 12:5449-5460. 10.3390/ijms12085449

NEI, M. 1973. *Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Nat. Acad. of Sci. USA.* 70, 3321-3323.

NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. Nueva York, EUA.* 512 p.

NOBLE, C.L. 1983. *The potential for breeding salt-tolerant plants. Proc. of the Royal Soc. of Victoria* 95: 133-138.

NOBLE, C.L.; G.M. HALLORAN; D.W. WEST. 1984. *Identification and selection for salt tolerance in Lucerne (Medicago sativa L.). Austr. J. Agric. Res.* 35: 239-252.

OCHOA, L.H. 1980. *Obtención de variedades mejoradas de alfalfa. Informe anual del Plan de Trabajo 41:1345. EEA La Banda-INTA.*

OCHOA, L.H.; G.A. ANZARDI. 1996. *Trinidad 87. Legajo de inscripción. Ministerio de Economía-SAGyPA-INASE. Registro Nacional de Cultivares. Bs. As., Arg.*

ODORIZZI, A.; E. MAMANÍ; P. SIPOWICZ; B. JULIER; J. GIECO; D. BASIGALUP. 2015. *Effect of phenotypic recurrent selection on genetic diversity of non-dormant multifoliate*

lucerne (*Medicago sativa* L.) populations. *Crop and Pasture Science*. 66. 1190. 10.1071/CP14280.

PAN, X.; C. ZHU; C. CHENG. 2008. Assessment of techniques for screening alfalfa cultivars for aluminum tolerance. *Euphytica* 164:541-549. doi:10.1007/s10681-008-9751-0

PARROT, W.A.; J.H. BOUTON. 1990. Aluminum tolerance in alfalfa as expressed in tissue culture. *Crop Sci.* 30:387-389. doi:10.2135/crops ci1990.0011183X003000020030x

PETOLESCU, C.; S. CIULCA; A. LAZAR; M. SCHITEA; E.M. BADEA 2010. Intra-Population genetic diversity in romanian alfalfa cultivars as revealed by SSR markers. *Romanian Biotechnological Letters*. Vol. 15 (2).

POSTNIKOVA, O.; J. SHAO; L.G. NEMCHINOV. 2013. Analysis of the alfalfa root transcriptome in response to salinity stress. *Plant Cell Physiol.* 54, 1041-1055. doi: 10.1093/pcp/pct056

QUIROS, C.F.; G.R. BAUCHAN. 1988. *The Genus Medicago and the origin of Medicago sativa Complex*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL Jr. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, EUA. 93-124 pp.

RODRÍGUEZ, J.A. 1983. *Conceptos para el mejoramiento de especies forrajeras*. EEA Anguil. INTA. Publ. Misc. 8, 19 p.

RODRÍGUEZ, J.A. 1986. *Mejoramiento genético de la alfalfa*. En: BARIGGI, C.; V.L. MARBLE; C.D. ITRIA; J.M. BRUN (ed.). *Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa*. INTA, Colección Científica, Bs. As., Cap. 9. 251-323 pp.

ROGERS, M.E. 1998. *Salinity effects on irrigated lucerne*. En: MICHALK, D.L.; J.E. PRATLEY (ed.). *Proc. of the 9th Austr. Agronomy Conference, Waga Wagga, Australia*. 266-268 pp.

ROMERO, N.A.; N.A. JUAN; L.A. ROMERO. 1995. *Establecimiento de la alfalfa en la Región Pampeana*. En: HIJANO H.; A. NAVARRO (ed.). *La alfalfa en la Argentina*. INTA, Subprograma Alfalfa. *Enciclopedia Agro de Cuyo Manuales* 11, Capítulo 2. 21-36 pp.

RUMBAUGH, M.D.; J.L. CADDEL; D.E. ROWE. 1988. *Breeding and Quantitative Genetics*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL Jr. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, EUA. 777-808 pp.

SAKIROGLU, M.; J.J. DOYLE; E.C. BRUMMER. 2010. *Inferring population structure and genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Theoretical and Applied Genetics* 121: 403-415.

SAKIROGLU, M.; S. SHERMAN-BROYLES; A. STORY; K.J. MOORE; J.J. DOYLE; E.C. BRUMMER. 2012. *Patterns of linkage disequilibrium and association mapping in diploid alfalfa (M. sativa L.)*. *Theoretical and Applied Genetics* 125: 577-590.

SAKIROGLU, M.; E.C. BRUMMER. 2013. *Presence of phylogeographic structure among wild diploid alfalfa accessions (Medicago sativa L. subsp. microcarpa Urb.) with evidence of the center of origin*. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 60: 23-31.

SAMAC, D.A.; M. TESHAYE. 2003. *Plant Improvement for tolerance to aluminium in acid soils – a review. Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 75: 189-207.

SAMAC, D.A.; S.J. TEMPLE. 2004. *Development and utilization of transformation in Medicago species. En: LING, G.H.; D.Z. SKINNER (ed.). Genetically Modified Crops – Their development, uses and risks. Food Products Press, EUA. 165-202 pp.*

SANGWAN, N.; H.A. FAROOQI; R. SANGWAN. 2006. *Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. New Phytologist*. 128. 173-179. 10.1111/j.1469-8137.1994.tb04000.x.

SCHILLING, M.P.; P.G. WOLF; A.M. DUFFY; H.S. RAI; C.A. ROWE; B.A. RICHARDSON. 2014. *Genotyping-by-sequencing for Populus population genomics: an assessment of genome sampling patterns and filtering approaches. PLoS One*. 9:e95292 10.1371/journal.pone.0095292

SCOTT, B.J.; M.A. EWING; R. WILLIAMS; A.W. HUMPHRIES; N.E. COOMBES. 2008. *Tolerance of aluminium toxicity in annual Medicago species and lucerne. Aust. J. Exp. Agric.* 48:499-511. doi:10.1071/EA07137

SCOTTI, C.; C. SUARDI, F.; PUPILLI; F. DAMIANI; S. ARCIONI; P. ROTILI. 1994. *Inbreeding depression in Medicago sativa: estimation of the different levels of heterozygosity by RFLP. En: MICHAUD, R.; J.H. ELGIN Jr. (ed.). Report 34th North American Alfalfa Improvement Conference. Guelph, ON, Canadá. 84 p.*

SHABALA, S.N.; S.I. SHABALA; A.I. MARTYNENKO; O. BABOURINA; I.A. NEWMAN. 1998. *Salinity effect on bioelectronic activity, growth, Na<sup>+</sup> accumulation and chlorophyll fluorescence of maize leaves: a comparative survey and prospects for screening. Aust. J. Plant Physiol.* 25 (5): 609-616.

SHEAFFER, C.C.; M. MCCASLIN; J.J. VOLENEC; J.H. CHERNEY; K.D. JOHNSON; W.T. WOODWARD; D.R. VIANDS. 1995. *Multifoliolate leaf expression. Standard tests to characterize alfalfa cultivars. NAAIC. doi: <http://www.naaic.org/stdtests/multifol.htm>*

SHIFINO-WITTMANN, M.T.S. 2008. *Alfalfa. En: BARBIERI, R.L.; E.R.T. STUMPF (Ed.). Origem e evolução de plantas cultivadas. Brasília,DF: Embrapa Informação Tecnológica. 89-120 pp.*

SLEDGE, M.K.; J.H. BOUTON; M. DALL'AGNOLL; W.A. PARROT; G. KOCHER. 2002. *Identification and confirmation of aluminium tolerance QTL in diploid Medicago sativa subsp. coerulea Crop Sci.* 42: 1121-1128.

SLEDGE, M.; I. RAY; G. JIANG. 2005. *An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.). Theoretical and Applied Genetics* 111: 980-992.

SMITH, S.E. 1994. *Salinity and the production of alfalfa. En: PESSAKARI M. (ed.). Handbook of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker, Tucson, AZ, EUA. 431-449 pp.*

SMITH, S.E. 1998. *Evaluating salt tolerance: some experiences with nondormant alfalfa. En: BOUTON J.; G.T. BAUCHAN (ed.). Report 36th North American Alfalfa Improvement Conference. Bozeman, MT, EUA. 26 p.*

- SOTO, G.C. 2018. *Transgenic alfalfa tolerant to herbicides, from Lab to Field*. IN *Proceedings. Second World Alfalfa Congress, Cordoba, Argentina*. (Disponible: <http://www.worldalfalfacongress.org/> consultado: agosto de 2020).
- SPADA, M. DEL C. (ED). 2005. *Avances en Alfalfa. Ensayos Territoriales*. EEA Manfredi-INTA, Año 15 N.º 15, 51 p.
- STANFORD, E.H.; E.R. HOUSTON. 1954. *The backcross technique as a method of breeding alfalfa*. Report of 14th Alfalfa Improvement Conference. Davis, CA. 44-45 pp.
- SUAREZ, D.L.; J.D. WOOD; S.R. LESCH. 2006. *Effect of SAR on water infiltration under a sequential rain-irrigation management system*. *Agric. Water Manage.* 86: 150-164.
- SUWABE, K.; H. TSUKAZAKI; H. IKETANI; K. HATAKEYAMA; M. FUJIMURA; M. KONODO; T. NUNOME; H. FUKUOKA; M. HIRAI; S. MATSUMOTO. 2004. *Joint meeting of the 14th Crucifer Genetics Workshop and the 4th ISHS Symposium on Brassicas 2004*, Chungnam National University Daejeon, Korea. 143 p.
- TALIBART, T.; M. JEBBAR; G. GOUESBET; S. HIMDIKABBAB; H. WROBLEWSKI; C. BLANCO; T. BERNARD. 1994. *Osmoadaptation in rhizobia-ectoine-induced salt tolerance*. *J. of Bacteriology* 176 (17): 5210-5217.
- TAYLOR, G.J. 1991. *Current views of the aluminium stress response: the physiological basis of tolerance*. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 10: 57-93.
- TEMPLE, S.J.; B.J. DRUMMOND; J.E. TOFTE; M. MCCASLIN. 2002. *Maximizing expression of transgenic traits in autopolyploid plants*. En: SHEAFFER, C.; G.R. BAUCHAN (ed.). *Report 38th North American Alfalfa Improvement Conference*. Sacramento, CA, EUA. 42 p.
- TESFAYE, M.; S.J. TEMPLE; D.L. ALLAN; C.P. VANCE; D.A. SAMAC. 2001. *Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum*. *Plant Physiol.* 127:1836-1844. doi:10.1104/pp.010376
- TESFAYE, M.; N.S. DUFAULT; M.R. DORNBUSCH; D.L. ALLAN; C.P. VANCE; D.A. SAMAC. 2003. *Influence of enhanced malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability*. *Soil Biol. & Biochem.* 35: 1103-1113.
- TOMÉ, G. 1947. *El mejoramiento de la alfalfa*. *Rwv. Arg. de Agronomía* 14:279-313.
- TRUCCO, V.M.; N. BEJERMAN; S. DE BREUIL; D. CABRERA MEDEROS; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2018. *Alfalfa dwarf disease, a viral complex affecting alfalfa crop in Argentina*. IN *Proceedings. Second World Alfalfa Congress, Cordoba, Argentina*. (Disponible: <http://www.worldalfalfacongress.org/> consultado: agosto de 2020).
- TURNER, N.C. 1986. *Crop water deficits: A decade of progress*. *Adv. Agron.* 39: 1-51.
- TWAMLEY, B.E. 1974. *Recurrent selection in forages*. *Plant Breeding Abst.* 44: 613-616.
- TYSDAL, H.M.; T.A. KIESSELBACH; H.L. WESTOVER. 1942. *Alfalfa breeding*. *Univ. of Nebraska, Agr. Exp. Stn. Res. Bull.* 124, 46 p.



- TYSDAL, H.M.; B.H. CRANDALL. 1948. *The polycross progeny performance as an index of the combining ability of alfalfa clones*. *J. Am. Soc. Agronomy* 40: 293-306.
- VASQUEZ, M.D.; C. POSCHENRIEDER; I. CORRALES; J. BARCELO. 1999. *Change in apoplastic aluminium during the initial growth response to aluminium during the initial growth response to aluminium by rotos of a tolerant maize variety*. *Plant Physiol.* 119: 435-444.
- VERONESI, F.; D. ROSELLINI; E. ALBERTINI. 2003. *The use of molecular markers in alfalfa breeding*. *Czech J. Genet. Plant Breeding.* 39. 104-111.
- VIANDS, D.R.; P. SUN; D.K. BARNES. 1988. *Pollination control: mechanical and sterility*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL Jr. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, EUA. 931-960 pp.
- VILLAGRACIA, M.R.; T.E. CARTER; T.W. RUFTY; A.S. NIEWOEHNER; M.W. JENNETTE; C. ARELLANO. 2001. *Genotypic rankings for aluminium tolerance of soybean roots grown in hydroponics and sand culture*. *Crop Sci.* 41: 1499-1507.
- VOIGT, P.W.; H.W. GODWIN. 1997. *A soil-on-agar method to evaluate acid-soil resistance in white clover*. *Crop Sci.* 37: 1493-1496.
- VOIGT, P.W.; J.A. MOSJIDIS. 2002. *Acid-soil resistance of forage legumes as assessed by a soil-on-agar method*. *Crop Sci.* 42: 1631-1639.
- VOLENEC, J.J.; J. CHERNEY. 1990. *Yield components, morphology and forage quality of multifoliolate alfalfa phenotypes*. *Crop Sci.* 30, 1234-1238.
- VON UEXKÜLL, H.R.; E. MUTERT. 1995. *Global extent, development and economic impact of acid soils*. *Plant Soil* 171:1-15. doi:10.1007/BF00009558
- WANG, J.; P. BODENHORST; A. PHELAN; L. PEMBLETON; G. SPANGENBERG; N. COGAN. 2019. *Applications of unmanned aircraft system for genomic selection of drought tolerance in perennial ryegrass*. *Proceedings of the International Forage & Turf Breeding Conference, Lake Buena Vista, FL, EUA.* 114 p.
- WIERSMA, D. 2001. *Are Hybrids the New Yield Force in Alfalfa? A Summary of Alfalfa Hybrid Performance in University Variety Trials. Focus on Forage*. University of Wisconsin-Madison. Vol. 3. N.º 12. 4 p. (Disponibile: <https://fyi.extension.wisc.edu/forage/files/2014/01/hybridalfalfa2.pdf> consultado: agosto de 2020).
- WINICOV, I. 1998. *New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants*. *Annals of Botany* 82: 703-710.
- WINICOV, I.; D. BASTOLA. 1999. *Transgenic overexpression of the transcription factor Alfin1 enhances expression of the endogenous MsPRP2 gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants*. *Plant Physiol.* 120, 473-480. doi: 10.1104/pp.120.2.473



## CAPÍTULO 7

### Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de alfalfa

Nancy G. Grandón,  
María V. Moreno,  
Gabriela Soto,  
Pablo Sipowicz,  
Margarita Stritzler,  
Cecilia Pascuan  
y Eva Mamaní

## Introducción

Las diferentes herramientas biotecnológicas desarrolladas durante la última década complementan el mejoramiento convencional, reduciendo el tiempo de obtención de nuevos cultivares y aumentando la ganancia genética en estos. A partir de la década de 1980, el desarrollo de los marcadores moleculares había abierto las puertas para el estudio de la diversidad genética en colecciones de germoplasma y para el mapeo de QTLs (*Quantitative Traits Loci*) asociados a caracteres de interés agronómico. Por un lado, más recientemente, con el avance de las tecnologías de secuenciación de próxima generación o NGS (*Next-Generation Sequencing*) (Metzker, 2010) y el desarrollo de herramientas bioinformáticas, se ha podido secuenciar un genoma entero y descubrir una gran cantidad de marcadores con polimorfismo en nucleótidos individuales o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Posteriormente, la amplia variedad de plataformas de genotipado que se fueron desarrollando permitió generar una gran cantidad de datos en un gran número de loci y en grandes poblaciones. Esto permitió obtener una mayor cobertura genómica y aumentar la resolución de los mapas de ligamiento desarrollados a partir de ellos (Li *et al.*, 2014b; Zhang *et al.*, 2019). Por otro lado, los SNPs facilitaron el mapeo fino de QTLs y el estudio de asociación a genoma amplio (GWAS: *Genome-Wide Association Studies*), como así también su aplicación en otras estrategias como la selección asistida por marcadores (SAM) y la selección genómica (SG) (Li y Brummer, 2012).

No obstante, por un lado, si bien la implementación de la SAM permitió seleccionar individuos con marcadores asociados a QTLs de efecto mayor, la técnica no fue eficiente –al menos hasta el presente– para mejorar caracteres complejos. Una de las principales razones para esto es la dificultad de encontrar el mismo QTL en múltiples ambientes (interacción QTL x ambiente) y en diferentes fondos genéticos. Por otro lado, el desarrollo de modelos estadísticos para predecir la asociación entre los marcadores moleculares y los caracteres en estudio ha posibilitado la implementación de la selección genómica como estrategia de mejoramiento para la obtención de nuevas variedades en menor tiempo y con mejor comportamiento. Dicha estrategia permite la selección de individuos favorables basados en un valor de mejora estimado de los marcadores que mejor predicen el carácter en estudio (Cossa *et al.*, 2017).

Paralelamente, se han desarrollado otras herramientas que permiten generar variabilidad sin modificar el fondo genético. Entre ellas, la transgénesis permite introducir genes de otras especies en materiales elite, incorporando caracteres naturalmente inexistentes en las especies de interés. Además, la edición génica permite la generación de mutaciones puntuales y dirigidas a un lugar específico del genoma. Esto permite silenciar genes determinados que modifican la expresión de algunos caracteres que se quieren disminuir, como por ejemplo el contenido de lignina. Entre las principales ventajas de la edición génica se cuentan: a) al producir una modificación dirigida se conoce la ubicación del gen modificado; b) después de un ciclo de cruzamiento se elimina la maquinaria de edición; y c) sus productos no se regularían como un organismo transgénico, lo que evitaría el largo y costoso proceso de desregularización que se requiere para la comercialización de los eventos transgénicos.

El presente capítulo pretende no solo describir las más importantes herramientas biotecnológicas utilizadas en la actualidad para complementar al mejoramiento tradicional, sino también discutir brevemente sus aplicaciones en el desarrollo de cultivares de alfalfa.

## Marcadores moleculares

Un marcador molecular es una secuencia de ADN con una ubicación específica, que presenta variabilidad detectable entre los individuos de una población segregante y herencia Mendeliana. Asimismo, dicha secuencia puede pertenecer a regiones codificantes o no codificantes del genoma (Ferreira y Grattapaglia, 1996; Borém y Teixeira Caixeta, 2006; Teixeira Caixeta *et al.*, 2014).

Actualmente, existe gran cantidad de marcadores moleculares desarrollados y disponibles en bases públicas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sin embargo, dependiendo del objetivo del proyecto, la población de estudio y la disponibilidad de los marcadores para la especie en estudio, se debe elegir el tipo de marcador más adecuado para cumplir con dicho propósito. Las características deseadas en los marcadores moleculares son que sea altamente polimórfico, de herencia mendeliana, neutro, codominante y de detección temprana. En este sentido, a continuación, se detallan los marcadores más utilizados en alfalfa.

### *RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)*

Los RFLP fueron los primeros marcadores desarrollados por Grodzicker *et al.* (1974) en virus. Posteriormente, Botstein *et al.* (1980) lo ajustaron en humanos y más tarde Beckmann y Soller (1983) y Burr *et al.* (1983) señalaron su aplicación en mejoramiento vegetal. Esta técnica se basa en la detección de fragmentos polimórficos generados por el corte con enzimas de restricción en sitios específicos del ADN. Luego, estos fragmentos son separados por electroforesis en geles de agarosa y detectados con sondas de ADNc radioactivas, complementarias a la secuencia blanco. A continuación, el patrón de ADN generado es transferido a una membrana de nitrocelulosa para exponerla a las sondas que hibridarán con el ADN. Por último, la visualización de los fragmentos se realiza por exposición de la membrana a una placa autorradiográfica.

Los RFLPs son altamente reproducibles, codominantes, multialélicos y neutros. Además, las sondas utilizadas son homólogas a secuencias únicas del genoma, detectando uno o pocos loci cada vez. La base genética del polimorfismo se debe a la presencia de mutaciones puntuales en los sitios de restricción o a inserciones, deleciones y otros rearrreglos cromosómicos que modifican la distancia entre los sitios de corte, generando variaciones en la longitud de los fragmentos obtenidos. Si bien esta técnica se utilizó ampliamente para el desarrollo de mapas de ligamiento (Brummer *et al.*, 1993; Kiss *et al.*, 1993) y análisis de variabilidad genética (Brummer *et al.*, 1991; Kidwell *et al.*, 1994), con el paso del tiempo y el desarrollo de marcadores más económicos, se la dejó de lado debido, principalmente, a su alto costo operativo y desarrollo laborioso, al uso de material radioactivo y a la falta de una biblioteca de sondas específicas.

### *RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs)*

Esta técnica fue desarrollada simultáneamente por dos grupos independientes (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) y consiste en la utilización de un único cebador corto de 10 pb de secuencia arbitraria, que hibrida al azar en el genoma. Además, para que haya amplificación, dos secuencias de ADN complementarias al cebador arbitrario deben estar lo suficientemente adyacentes (a menos de 4000 pb) y en orientación opuesta. Puesto que las bajas temperaturas de hibridación generan varios fragmentos de secuencia desconocida, cada banda en

el gel es considerada como un locus RAPD. Así, la visualización de los fragmentos generados se realiza en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio o en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata.

El polimorfismo detectado se debe a la presencia o ausencia de fragmentos amplificados debido a mutaciones puntuales en el sitio de hibridación del cebador o a deleciones o inserciones entre dos sitios de apareamiento de aquel. Dado que no permite distinguir individuos homocigotas de heterocigotas, se dice que es un marcador dominante, ya que la presencia de la banda podría corresponder a un individuo homocigota dominante o a un heterocigota para ese locus. Además, la ausencia de banda en el gel se atribuye a la presencia de un genotipo homocigota recesivo.

Esta técnica requiere poca cantidad de ADN y debido a su amplia cobertura genómica es posible muestrear regiones de copia única o altamente repetitivas. Además, no usa sondas radioactivas y no requiere bibliotecas de sondas específicas. Sin embargo, presenta algunas dificultades como tener baja reproducibilidad y ser sensible a pequeñas variaciones en el protocolo que podrían llevar a resultados negativos. Además, debido a que solo detecta un alelo por locus, brinda bajo contenido de información polimórfica. En alfalfa existen diferentes trabajos sobre construcción de mapas de ligamiento (Kiss *et al.*, 1993; Echt *et al.*, 1994) y análisis de diversidad genética (Ghérardi *et al.*, 1998; Mengoni *et al.*, 2000) con este tipo de marcador.

### *AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism)*

La técnica se basa en la amplificación de un subconjunto de fragmentos de restricción mediante una PCR selectiva (Vos *et al.*, 1995) y comprende las siguientes cuatro etapas:

a) Etapa de digestión enzimática: el ADN total se corta con dos enzimas de restricción por separado; primero, con una enzima de corte raro que reconoce sitios de restricción con 6 a 8 pb y otra de corte frecuente que reconoce sitios con 4 pb. Así, se generan tres tipos de fragmentos: grandes producidos por la enzima de corte raro, pequeños producidos por la enzima de corte frecuente e intermedios producidos por la combinación de ambas enzimas.

b) Etapa de ligación de adaptadores: en este paso, los fragmentos de ADN de doble cadena llamados “adaptadores” se ligan a los extremos de los fragmentos de restricción generados en la etapa anterior. Aquellos son secuencias cortas de 20 a 30 pb, con una secuencia principal seguida de una secuencia específica y complementaria al extremo cohesivo del fragmento generado, los cuales servirán de moldes en la siguiente etapa de amplificación.

c) Etapa de amplificación selectiva: la secuencia de los adaptadores y el sitio de restricción adyacente sirven como sitios de unión del cebador. Pero, no todos los fragmentos generados en el punto a) se amplificarán. Así, la selección de aquellos se realiza con cebadores específicos de secuencia arbitraria (20 a 25 pb) y complementaria al adaptador; con el agregado de 1 o 3 nucleótidos (nt) en el extremo 3'. A su vez, esta etapa cuenta de dos pasos. Primero, se realiza una amplificación selectiva de los fragmentos empleando cebadores con 1 nt arbitrario. Luego, el fragmento generado sirve de molde para los cebadores con 2 nt selectivos adicionales al anterior. En este caso, los cebadores llevan una marca radiactiva (P32) o fluorescente en el extremo 5'.

d) Etapa de análisis: si bien los tres fragmentos de restricción son amplificados, solamente los de tamaño intermedio se podrán resolver con claridad. En este caso, la separación de aquellos se puede realizar en geles de poliacrilamida y la visualización por autorradiografía o tinción con nitrato de plata pudiendo detectar entre 50 y 100 fragmentos. Además, la utilización de marcas fluorescentes permite su separación por electroforesis capilar en secuenciadores automáticos y la visualización de realiza mediante programas computacionales específicos para tal fin.

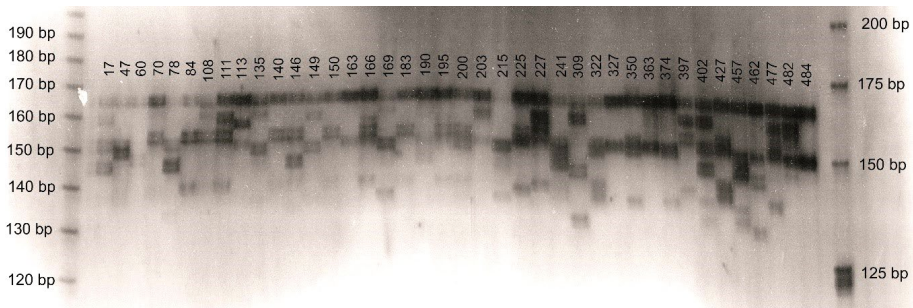
El polimorfismo detectado se debe a la presencia o ausencia de fragmentos amplificados de un tamaño determinado dado por mutaciones puntuales, inversiones, deleciones o inserciones que producen ganancia o pérdida de un sitio de restricción o la alteración de la secuencia reconocida por el cebador. Al igual que los RAPDs, los AFLPs se consideran marcadores dominantes de naturaleza binaria (presencia/ausencia). Además, se caracterizan por detectar un alto nivel de polimorfismo, debido a que exploran simultáneamente la presencia/ausencia de los sitios de restricción y la ocurrencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias. En cambio, a diferencia de los RAPDs, utilizan

cebadores más largos que aumentan la especificidad de la reacción de PCR. Asimismo, debido a la amplificación al azar, no necesita información previa de las secuencias del ADN, permitiendo realizar un muestreo amplio y simultáneo del genoma. A su vez, tienen la desventaja de ser una técnica relativamente laboriosa y costosa. Más aún, presentan un mayor número de etapas que la técnica RAPDs, necesitan mayor cantidad de reactivos y ADN de mejor calidad. No obstante, dado a su amplia cobertura genómica, se los ha utilizado en la construcción de mapas de ligamiento (Barcaccia *et al.*, 1999; Julier *et al.*, 2003), mapeo de QTLs (Musial *et al.*, 2007) y análisis de diversidad (Segovia-Lerma *et al.*, 2003).

### *Microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats)*

Inicialmente, la técnica se desarrolló en humanos (Litt y Luty, 1989); años más tarde, Morgante y Olivieri (1993) la pusieron a punto en plantas. Dichos autores determinaron que los microsatélites se distribuyen con una frecuencia de uno por cada 50 mil pb y la unidad repetida más común es el dinucleótido AT. Es decir que, los SSR son secuencias hipervariables con arreglos de pequeñas secuencias de 1 a 6 pb de largo, repetidas en tándem y que se repiten de 10 a 100 veces. De este modo, cada microsatélite constituye un locus genético altamente variable y multialélico. Por lo tanto, cada segmento amplificado de tamaño diferente representa un alelo del mismo locus. Para amplificarlas se utilizan cebadores específicos de 20 a 30 pb complementarios a las secuencias que flanquean la región del microsatélite. Dichos fragmentos se resuelven en geles de poliacrilamida y se visualizan mediante tinción con nitrato de plata (Figura 1) o por electroforesis capilar mediante la utilización de cebadores fluorescentes.

El polimorfismo detectado se basa en la variabilidad del número de repetidos en tándem y, en consecuencia, del tamaño del microsatélite amplificado en los individuos de una especie (Martínez *et al.*, 2010). Por lo tanto, la base genética de dicho polimorfismo estaría dada por el deslizamiento de la ADN polimerasa que incorpora o elimina repetidos durante la replicación del ADN (*slippage*) o por un entrecruzamiento desigual entre cromosomas homólogos durante la meiosis, generando alelos con un número diferente de unidades (Litt y Luty, 1989).



■ **Figura 1.** Perfil molecular de 40 genotipos de alfalfa analizados con marcadores microsatélites en gel de poliacrilamida al 6 % (p/v); pb: pares de bases. Adaptado de Grandón *et al.* (2013).

Los SSR se caracterizan por tener alta reproducibilidad, buena cobertura genómica, herencia codominante, neutralidad y alto contenido de información polimórfica (PIC) (Varshney *et al.*, 2005). Dichas cualidades los hicieron ideales para mapeo genético en diferentes especies, así como también para estudios de diversidad y estructura poblacional (Flajoulot *et al.*, 2005; Sakiroglu *et al.*, 2010; Sakiroglu y Brummer, 2013). En alfalfa se han publicado diferentes mapas de ligamiento con base en SSR solamente (Sledge *et al.*, 2005; Mun *et al.*, 2006) o en conjunto con otros marcadores como RFLP (Diwan *et al.*, 2000) o AFLP (Julier *et al.*, 2003).

### *ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)*

Es una variante de los microsatélites (Zietkiewicz *et al.*, 1994) y se basa en la amplificación de un fragmento de ADN localizado entre dos regiones microsatélites idénticas. Esta técnica utiliza la secuencia repetida como un único cebador (di- o trinucleótido) en la reacción de PCR con el adicional de cuatro nucleótidos en uno de sus extremos. Este tipo de marcador de secuencia arbitraria, que hibrida al azar, permite la amplificación simultánea de diferentes regiones del genoma. Sin embargo, su naturaleza dominante constituye una gran limitación en su uso. No obstante, se lo ha utilizado en alfalfa en análisis de diversidad (Touil *et al.*, 2008), mapeo de QTLs (Barcaccia *et al.*, 2000) y estructura poblacional (Xavier *et al.*, 2011).



### *SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions)*

Estos son marcadores PCR alelo-específicos que provienen de marcadores AFLPs o RAPDs. Así que, cuando el marcador derivado proviene de un fragmento RAPD se denomina SCAR (Paran y Michelmore, 1993). Para ello, los productos RAPD amplificados se clonan, se secuencian y se diseñan cebadores específicos de 16 a 24 pb complementarios a los extremos del fragmento. En consecuencia, cada par de cebadores amplifica un único locus del mismo tamaño del fragmento RAPD. Por lo tanto, el polimorfismo estaría dado tanto por la presencia/ausencia de banda en el gel (marcador dominante) como por el polimorfismo de longitud del fragmento amplificado (marcador codominante), dado que pueden contener unidades repetitivas en su secuencia (Paran y Michelmore, 1993). Sin embargo, presentan un bajo nivel de polimorfismo entre variedades de una misma especie (trigo, soja, etc.), disminuyendo así la posibilidad de transformar marcadores dominantes en marcadores codominantes. No obstante, tienen alta reproducibilidad y son fácilmente transferibles a otros laboratorios. Además, por ser locus específicos se aplican muy bien a estudios de mapeo (Wang *et al.*, 2012) y diagnóstico de enfermedades en alfalfa (Larsen *et al.*, 2002).

### *CAPS (Cleavage Amplified Polymorphic Sequence)*

En esta técnica, desarrollada por Konieczny y Ausubel (1993), un fragmento de ADN se amplifica por PCR con cebadores específicos de 20 a 25 pb, luego se digiere con enzimas de restricción y se resuelve por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La base del polimorfismo está dada por la presencia/ausencia de sitios de restricción en el fragmento amplificado; considerándolo como un marcador codominante. Si bien es necesario conocer la secuencia del fragmento genómico blanco para el diseño de los cebadores, se considera una técnica sencilla, fácilmente transferible y altamente reproducible. En este sentido, este tipo de marcador se ha aplicado predominantemente en mapeo genético tanto en alfalfa (Narasimhamoorthy *et al.*, 2007) como en *Medicago truncatula* (Schnabel *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2013).

## SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

Por un lado, los polimorfismos de nucleótido simple son variaciones de punto que corresponden a la sustitución de una única base por otra o a la inserción/delección de una base (inDel), en una posición específica del genoma. Este tipo de polimorfismo corresponde a las variaciones genéticas naturales más frecuentes. En este sentido, se dice que son bialélicos, con una frecuencia de 1 cada 100-300 pb en genomas vegetales. Sin embargo, para que la variación se considere un SNP, debe tener 1 % de ocurrencia en la población. Los SNPs se pueden localizar tanto en regiones codificantes como no codificantes. Por lo tanto, las variaciones localizadas en las primeras presentan un 100 % de asociación con el carácter de interés, siendo útiles para su aplicación en Selección Asistida por Marcadores (SAM) (en inglés MAS: *Marker-Assisted Selection*). Por otro lado, dado que son estables evolutivamente, se los puede emplear fácilmente en estudios poblacionales y filogenéticos. Asimismo, por tener una tasa mutacional relativamente baja, son muy frecuentes en el genoma e importantes marcadores genotípicos.

La forma directa de detección e identificación de SNPs es por medio de la amplificación y secuenciación de fragmentos genómicos equivalentes de regiones genómicas específicas de ADN de diferentes individuos y comparando dichas secuencias para encontrar variaciones puntuales. Para ello se usan programas computacionales para alinear las secuencias amplificadas resultantes y así identificar polimorfismos. Otra forma de encontrar SNPs es por medio del análisis *in silico* de bancos de secuencias ESTs (*Expressed Sequence Tags*). No obstante, independientemente del método utilizado, una vez identificados los SNPs se deben validar experimentalmente en un pequeño grupo de genotipos diferentes. Dicha validación se puede realizar por medio de diferentes técnicas como, por ejemplo: microarreglos (Li *et al.*, 2014a), PCR en tiempo real, digestión con enzimas de restricción (marcadores CAPS) (Kamphuis *et al.*, 2008), análisis por curvas HMR (*High-Resolution Melting*) (Han *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2012), *genotyping-by-sequencing* (GBS) (Li *et al.*, 2014b) y por RAD-seq (*Restriction Associated DNA Sequencing*) (Zhang *et al.*, 2019), entre otros. Por último, una vez validados, se deben genotipar en toda la población de estudio, objeto del mejoramiento. Para ello, actualmente existe una amplia variedad de plataformas de genoti-

pado disponibles, tales como *GoldenGate* (Illumina), *Infinium* (Illumina) (Li *et al.*, 2014a), *SNPstream* (Beckman Coulter), *GeneChip* (Affymetrix), *Perlegen Wafers* y *Molecular Inversion Probe – MIP* (Affymetrix). Sin embargo, no existe un protocolo ideal y a la hora de elegir una de ellas se debe tener en cuenta una serie de factores, como por ejemplo la sensibilidad, la reproducibilidad, la exactitud y la capacidad de la técnica para el análisis a gran escala, además de su costo operativo y su flexibilidad para utilizarla en otras aplicaciones. Sus principales aplicaciones son la identificación de variantes SNPs asociadas a caracteres de interés, los estudios de diversidad a genoma amplio (Li *et al.*, 2014a), la construcción de mapas de alta resolución (Li *et al.*, 2014b; Zhang *et al.*, 2019) y la certificación de variedades, entre otros usos.

### *Aplicaciones de los marcadores moleculares*

El desarrollo de los marcadores moleculares contribuyó al mejoramiento tradicional mediante diversas aplicaciones como la caracterización de germoplasma, el análisis de diversidad de colecciones y la identificación de variedades. La aplicación de esta tecnología permitió asociar marcadores a características de interés agronómico y seleccionar de manera indirecta características deseables en estadios tempranos del desarrollo. Esto permitió reducir el tiempo de obtención de nuevos cultivares a través del incremento de la eficiencia y la efectividad del proceso de selección.

En este sentido, se ha impulsado el desarrollo y la aplicación de los marcadores moleculares en el premejoramiento de alfalfa para realizar diferentes tipos de estudios. Todos ellos con la idea de caracterizar el material genético antes de introducirlo a un programa de mejoramiento e identificar las regiones genómicas asociadas a caracteres de interés agronómico. Estos estudios implican: análisis de diversidad (Bagavathiannan *et al.*, 2010; Herrmann *et al.*, 2010; Herrmann *et al.*, 2017), construcción de mapas de ligamiento genético (Kiss *et al.*, 1993; Diwan *et al.*, 2000; Julier *et al.*, 2003), mapeo de QTLs (Musial *et al.*, 2007; Narasimhamoorthy *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2015), estudios de estructuración poblacional (Sakiroglu *et al.*, 2010; Annicchiarico *et al.*, 2017) y de mapeo por asociación (Li *et al.*, 2011; Sakiroglu *et al.*, 2012), entre otros. Luego, en la etapa del mejoramiento propiamente dicho, los marcadores

identificados previamente mediante diferentes estrategias de mapeo y asociados a regiones genómicas que controlan dichas características son utilizados en la SAM. A continuación, se detallan algunas de las principales aplicaciones de los marcadores moleculares en alfalfa.

### *a-Análisis de diversidad*

El estudio de la diversidad es el proceso por el cual la variación entre individuos, grupos o poblaciones es analizada por medio de un método específico o por la combinación de métodos (Gonzaga Pereira y Santana Pereira, 2006). Dicha variación puede ser morfológica, bioquímica (vía isoenzimas) o genética (vía técnicas moleculares), entre otras. Los datos así generados permiten obtener una mayor diferenciación de los individuos posibilitando a los mejoradores seleccionar aquellos genotipos superiores para la obtención de nuevas combinaciones génicas favorables y generar así poblaciones básicas de mejoramiento (Basbag *et al.*, 2017).

En este sentido, los marcadores moleculares permiten acceder a una gran cantidad de información sobre la diversidad genética y la relación filogenética presente en el germoplasma. Esto se debe a que la gran cantidad de marcadores disponibles en bases públicas posibilitan un muestreo amplio del genoma de interés a nivel de la secuencia del ADN. En alfalfa, existen diferentes estudios con marcadores moleculares para estimar la diversidad genética presente en las colecciones. Annicchiarico *et al.* (2017), usando marcadores SSR, estudiaron la diversidad genética en tres poblaciones de alfalfa –una italiana, una egipcia y una población EECM (germoplasma silvestre proveniente de Europa del Este, Canadá y España)– y concluyeron que la variación entre poblaciones resultó ocho veces menor que la variación promedio dentro de poblaciones (2,05 vs. 17,24). Barghi *et al.* (2016), empleando marcadores RAPD, también observaron esta situación cuando analizaron la diversidad genética entre y dentro de poblaciones de alfalfa de diferentes áreas de Irán. La combinación de los datos moleculares y los fenotípicos provee información adicional para el agrupamiento de genotipos o para la diagramación de cruzamientos dirigidos. Así, Annicchiarico *et al.* (2016) exploraron la diversidad entre once ecotipos (landraces) de *Medicago sativa* L. *subsp. sativa* representativos del norte de Italia mediante la utilización

de marcadores SNPs y SSRs y de caracteres morfofisiológicos. Si bien la combinación de caracteres fenotípicos y moleculares aumentó la probabilidad de discriminación entre las poblaciones, no detectaron correlación entre la diversidad morfofisiológica y la diversidad basada en SSRs ( $r=0,04$ ); la correlación entre la variabilidad fenotípica y la de SNPs fue baja ( $r=0,23$ ;  $p<0,15$ ). Concluyeron que, si bien el criterio basado en marcadores SNPs resultó menos discriminante que la clasificación por caracteres morfofisiológicos, complementa la información obtenida con la caracterización morfológica. En otro trabajo, Herrmann *et al.* (2017) compararon los índices de diferenciación para caracteres morfológicos y marcadores moleculares entre cultivares de *M. sativa* provenientes del norte y del sur de Europa y concluyeron que, si bien los caracteres morfológicos separaron ambos grupos, los marcadores moleculares no generaron una diferenciación clara. Una posible explicación para esto último podría estar relacionada con el hecho de que los marcadores, al ser neutros en términos evolutivos, no estarían sometidos a la presión de selección que sí experimentarían los caracteres morfológicos. En el trabajo comentado, dicho efecto diferencial quedó demostrado por los distintos valores de los índices QST y FST, lo que indicaría que la selección habría efectivamente actuado sobre los caracteres morfológicos evaluados. En este sentido, independientemente de la falta de correlación entre caracteres morfológicos y marcadores moleculares, ambas caracterizaciones se complementan a la hora de clasificar y distinguir variedades dentro de un esquema de certificación de cultivares.

El análisis de diversidad también contribuye a enriquecer la base genética de las colecciones de germoplasma a través del planeamiento del muestreo, mantenimiento y manejo de un banco de germoplasma. Dicho análisis también puede ser utilizado en la conformación de colecciones núcleo (*core collections*), que constituyen una porción mínima representativa de toda la diversidad genética contenida en un banco de germoplasma. Así, por ejemplo, Basigalup *et al.* (1995) desarrollaron la primera core collection de alfalfa perenne del Sistema Nacional de Germoplasma de USDA-ARS. Esta colección comprende 200 entradas seleccionadas a partir de un análisis exhaustivo de 1100 accesiones recolectadas en 47 países y clasificadas en 18 grupos geográficos. La caracterización inicial se realizó con base en caracteres agronómicos, calidad forrajera, morfología de raíz y corona, tolerancia a estreses y

resistencia a enfermedades y plagas. Luego, mediante un análisis multivariado se seleccionaron las 200 entradas que representaban la mayor variabilidad de la colección original. A partir de aquí, dicha colección fue caracterizada por diferentes autores para estudiar la variación genética en la calidad del forraje (Jung *et al.*, 1997), analizar la diversidad de marcadores AFLP entre accesiones de alto rendimiento (Bhandari *et al.*, 2011) y determinar la estructura genética poblacional mediante marcadores SSR (İlhan *et al.*, 2016), entre otros.

### *b- Mapas de ligamiento genético*

La amplia disponibilidad de marcadores moleculares ha permitido la construcción de varios mapas de ligamiento en alfalfa (Tabla 1), los cuales permiten la localización de regiones genómicas asociadas a características cualitativas y cuantitativas de importancia económica. Un mapa de ligamiento genético es una representación gráfica lineal del orden más probable de los marcadores, determinado a partir de la frecuencia de recombinación observada entre estos (Cervigni *et al.*, 2010). Para ello, se debe contar con una población segregante proveniente del cruzamiento de dos progenitores contrastantes fenotípicamente para el carácter en estudio que sea lo suficientemente grande como para aumentar la probabilidad de identificar individuos segregantes con la combinación génica deseada. Además, dichos parentales deben ser distantes genéticamente a fin de incrementar la probabilidad de detectar polimorfismos a nivel del ADN. Otra condición básica para el desarrollo de estos mapas es que los marcadores seleccionados presenten segregación mendeliana. De lo contrario, la distorsión en la segregación reduce el número de marcadores disponibles para el genotipado, afectando así el cálculo de la distancia entre marcadores y el orden de estos en el grupo de ligamiento.

La alfalfa cultivada es una especie autotetraploide, alógama y altamente heterocigota ( $2n=4x=32$ ), características que han impedido la construcción de mapas de ligamiento de alta densidad mediante un sistema tradicional de marcadores moleculares. A diferencia de otras especies, en alfalfa existe la dificultad de obtener líneas puras debido a la depresión por endocria que experimenta con las sucesivas autofecundaciones. En este caso, se trabaja con poblaciones  $F_1$  genéticamente

heterogéneas y con menor distorsión de segregación de marcadores que en una población  $F_2$ . Por lo tanto, los marcadores segregan en diferentes proporciones dependiendo de la configuración de los progenitores. Así, es posible pre-seleccionar marcadores que amplifiquen en uno de los parentales, pero que estén ausentes en el otro y que a su vez presenten polimorfismo en la  $F_1$ , obteniéndose así un mapa de ligamiento para cada parental. Los marcadores de este tipo se denominan alelos de dosis única (*SDA: single-dose allele*) y se aplican principalmente en microsatélites, donde no se puede estimar de forma sencilla la dosis de cada alelo. En esta metodología, los alelos presentes en copias únicas en la línea parental son computados individualmente con base en la presencia o ausencia en la progenie y las relaciones de ligamiento se establecen en cada cromosoma individual. Los grupos de ligamiento homólogos pueden luego ser combinados en grupos de ligamiento consenso (Diwan *et al.*, 2000; Julier *et al.*, 2003). Esta metodología ha posibilitado el mapeo eficiente de especies poliploides como la alfalfa (Brouwer y Osborn, 1999; Diwan *et al.*, 2000; Sledge *et al.*, 2005). Esta estrategia, conocida como *pseudo-testcross*, depende del nivel de heterocigosidad del individuo elegido para el mapeo, de la distancia genética entre los progenitores y de lo informativo del sistema de marcadores utilizados (Barcaccia *et al.*, 1999).

Por lo tanto, dada la complejidad de la herencia tetrasómica de la alfalfa, los primeros mapas de ligamiento se construyeron en especies diploides de *M. sativa L.* con  $2n=2x=16$  (Tabla 1). Dos de estos mapas se desarrollaron en poblaciones  $F_2$ , encontrando un alto porcentaje de marcadores con distorsión de segregación, 50 % en Kiss *et al.* (1993) y 48 % en Brummer *et al.* (1993). Por el contrario, en poblaciones  $F_1$  o  $BC_1$ , los porcentajes se redujeron a 5,2 % y 4 % en los mapas desarrollados por Barcaccia *et al.* (1999) y Brouwer y Osborn (1999), respectivamente. En este sentido, la distorsión de la segregación se define como el desvío de las frecuencias genotípicas observadas con respecto a la proporción esperada en una población segregante (Lu *et al.*, 2002). No obstante, Brouwer y Osborn (1999) fueron los primeros en desarrollar un mapa de ligamiento en alfalfa tetraploide ( $2n=4x=32$ ) a partir de una población de retrocruza (*BC: backcross*) y mediante la metodología de *pseudo-testcross*. Más tarde, Diwan *et al.* (2000) lograron incorporar 10 SSR en el mapa de 108 RFLP desarrollado anteriormente por Brummer *et al.*

(1993), extendiendo la longitud total a 534,6 cM (Tabla 1). A continuación, los mapas desarrollados por Julier *et al.* (2003), Musial *et al.* (2005) y Sledge *et al.* (2005), en poblaciones  $F_1$  y  $BC_1$  de alfalfa tetraploide, lograron incorporar un número variable de marcadores y así aumentar la longitud total de los mapas anteriormente desarrollados. Más tarde, con el descubrimiento de los marcadores SNPs y el desarrollo de tecnologías de genotipado de alto caudal, fue posible desarrollar mapas de ligamiento de alta densidad de marcadores. Por un lado, en alfalfa, Li *et al.* (2014b) desarrollaron un mapa saturado con 3591 loci SDA, de los cuales 3555 SNPs fueron detectados por medio del genotipado por GBS. Por otro lado, Zhang *et al.* (2019) utilizaron la metodología RAD-seq para el genotipado y detección de variantes SNPs. Las ventajas que ofrecen estas nuevas plataformas de genotipado de alto caudal son el bajo costo operativo, el amplio número de variantes SNPs detectadas y la mayor resolución de los genomas. Todo esto aumenta la probabilidad de detectar QTLs asociados a caracteres de interés.

### *c- Mapeo de QTLs*

Muchas de las características de importancia agronómica presentan una distribución continua de valores, es decir que, dentro de una población determinada no existe una clara distinción entre clases fenotípicas. Por lo tanto, la base genética de estas características estaría dada por la acción aditiva de muchos genes (Yule, 1902). Geldermann (1975) propuso denominar a estos loci controladores de características cuantitativas como QTLs.

Basado en su asociación con un marcador molecular, existen dos abordajes distintos que permiten determinar la ubicación de una región genómica (o QTL) responsable de un carácter de interés. Uno es la estrategia de mapeo biparental, que parte de una población segregante ( $F_2$ , RILs, DH o BC), proveniente del cruzamiento de dos progenitores contrastantes para el carácter de interés (como se detalló en mapas de ligamiento). Luego del genotipado de dicha población y de la construcción del mapa de ligamiento, se procede a su fenotipado. Esta etapa es muy importante ya que de ella depende el éxito del mapeo. Para ello, dicha evaluación debe ser precisa y presentar un diseño experimental que permita encontrar diferencias significativas entre individuos.



■ **Tabla 1.** Características de los mapas de ligamiento en alfalfa diploide y tetraploide.

Referencia	Población de mapeo	Ploidía	Tamaño población	Marcador molecular	N.º Marcadores	Grupos de ligamiento	Longitud del mapa (cM)
Brummer <i>et al.</i> (1993)	F2	2x	86	RFLP	108	10	467,5
Kiss <i>et al.</i> (1993)	F2	2x	138	RFLP, RAPD, isoenzimas y marcadores morfológicos	89	8	659
Echt <i>et al.</i> (1994)	BC	2x	87	RFLP y RAPD	86/61	10/7	553/603
Tavoletti <i>et al.</i> (1996)	F1	2x	55	RFLP	50/55	10/8	234/603
Barcaccia <i>et al.</i> (1999)	F1	2x	-	RFLP, RAPD y AFLP	67	19	368,6
Diwan <i>et al.</i> (2000)	F2	2x	86	RFLP y SSR	118	6	534,6
Kaló <i>et al.</i> (2000)	F2	2x	137	RFLP, RAPD, isoenzimas y marcadores morfológicos	868	8	754
Brouwer y Osborn (1999)	BC	4x	101	RFLP	88	7	443
Julier <i>et al.</i> (2003)	F1	4x	168	AFLP y SSR	706	8/8	2649/3045
Musial <i>et al.</i> (2005)	BC	4x	120	RAPD, AFLP y SSR	155	18	2136,5
Sledge <i>et al.</i> (2005)	BC	4x	93	SSR	286	8	624
Li <i>et al.</i> (2014b)	F1	4x	384	SNP y SSR	1437/2154	32/32	2126/2133
Zhang <i>et al.</i> (2019)	F1	4x	149	SNP y SSR	3312/1153	32/32	4381/3455

Por último, se realiza el análisis de QTLs propiamente dicho, donde por medio de programas estadísticos se realiza la asociación genotipo x fenotipo. El otro abordaje, que se emplea en alfalfa debido a su naturaleza tetraploide, utiliza poblaciones F1 derivadas del cruzamiento de dos genotipos contrastantes para el carácter de interés (Tabla 1). No obstante,

debe considerarse que estas  $F_1$  no representan la diversidad del QTL en una población completa de mejoramiento (Flint-García *et al.*, 2003). En consecuencia, dado que estas poblaciones poseen pocos eventos de recombinación, se limita también la resolución del mapeo de QTL. En contraste, el mapeo por asociación surge como un complemento de la estrategia anterior y consiste en utilizar eventos de recombinación históricos a lo largo de un linaje para establecer posibles asociaciones entre genotipo y fenotipo (Paniego *et al.*, 2010). Esta estrategia se focaliza en las asociaciones entre marcadores y caracteres en poblaciones no estructuradas o colecciones de germoplasma silvestre (Brescghello y Sorrells, 2006). En este sentido, la base para la detección de tales correlaciones se basa en la identificación de desequilibrio de ligamiento (DL), puesto que dos marcadores que presentan DL están asociados de manera no aleatoria a nivel físico; seguidamente, se evalúa estadísticamente la asociación de esos marcadores con el fenotipo de interés. Dado que las poblaciones naturales abarcan mayor diversidad genética y representan una acabada historia de recombinación dentro del cultivo en estudio, se logran identificar más QTLs con mapeo por asociación que con la primera estrategia (Li *et al.*, 2011; Sakiroglu *et al.*, 2012). En alfalfa se han identificado QTLs mayores asociados a diferentes caracteres relacionados con producción de forraje (Robins *et al.*, 2007a, 2007b; Li *et al.*, 2011), eficiencia en el uso del agua (EUA) (Julier *et al.*, 2010), nutrición con nitrógeno (Moreau *et al.*, 2012), persistencia (Robins *et al.*, 2008), resistencia a enfermedades (Musial *et al.*, 2005; Mackie *et al.*, 2007), resistencia a pulgón (Kamphuis *et al.*, 2013) y tolerancia a estreses abióticos (Tabla 2). Otros QTLs informados en la bibliografía se asocian con el tiempo de floración (Pierre *et al.*, 2008) y la morfogénesis aérea (Julier *et al.*, 2007).

De los caracteres mencionados, vale destacar algunos que revisten mayor importancia histórica para el mejoramiento de alfalfa en Argentina, como la producción de forraje, la persistencia y la resistencia a plagas y enfermedades. Otros –como la EUA, la nutrición nitrogenada y la tolerancia a estreses abióticos– están adquiriendo una importancia creciente por su fuerte impacto en aspectos ambientales y adaptativos.

En el caso de la producción de forraje, diferentes autores han abordado el estudio de este carácter por medio del mapeo de QTLs tanto me-

dian­te la estrategia biparen­tal como por mapeo por aso­ciación. En el primer caso, Robins *et al.* (2007a, 2007b) desarrol­laron una pobla­ción de herma­nos com­ple­tos de *Medicago sativa* deriva­da de un cruza­mien­to interespe­cífico entre *M. sativa subsp. falcata* y *M. sativa subsp. sativa* con heterosis conocida para ren­dimien­to forra­jero. Se reali­zaron evalua­ciones du­rante va­rios años en tres locali­dades y se con­struyó un mapa de liga­mien­to com­bi­nando mar­cadores RFLP y SSR que cu­brieron 546 cM y que se dis­tribuyeron en ocho gru­pos de liga­mien­to (GL). Se log­raron iden­ti­ficar 41 mar­cadores aso­ciados a la pro­duc­ción de bio­masa, ubi­cados en los GL 5 y 7, con alelos favorables aportados por ambos parentales. Dado que uno de ellos es *M. sativa subsp. falcata*, se infiere que el germoplasma no adaptado puede emplearse como fuente de alelos favorables para este carácter. En cuanto a la estrategia de mapeo por asociación, Li *et al.* (2011) detectaron un desequilibrio de liga­mien­to signifi­cativo em­pleando mar­cadores SSR. De un total de 312 alelos con frecuencias mayores al 10 %, iden­ti­ficaron 15 que eviden­cia­ron fuerte aso­ciación con el ren­dimien­to en al menos uno de los cinco ambientes analizados. Solo un alelo mostró fuerte asociación con fibra detergente ácida (FDA) y otro con lignina detergente ácida (LDA). No obstante, si bien estos alelos asociados podrían ser utilizados en procesos de selección asistida por marcadores, se señaló que de acuerdo con el desequilibrio estimado se requerirían cerca de 1.000 marcadores para explorar el genoma completo de la alfalfa con fines de asociación marcador-carácter.

La producción potencial de forraje requiere de una disponibilidad hídrica no limitante para poder satisfacer la transpiración del cultivo. La alfalfa al ser un cultivo perenne consume agua durante todo el año, aun durante el reposo invernal, generando una demanda de evapotranspiración mayor que un sistema de cultivo anual. Por lo tanto, el mejoramiento orientado a una mayor EUA es un objetivo importante dentro de los programas de mejoramiento. En este sentido, Julier *et al.* (2010) emplearon 85 marcadores SSR para identificar QTLs asociados a dicho carácter. Evaluaron una población F1 de 224 individuos, proveniente del cruza­mien­to entre genotipos parentales contrastantes para la EUA. El ensayo se realizó en lisímetros de 2 m de altura y se midió la producción de materia seca durante seis ciclos de rebrote bajo riego. Luego mediante el cálculo del consumo hídrico entre cortes, se determinó la EUA pro-

medio por genotipo para los seis cortes. Así, la población  $F_1$  mostró variación cuantitativa para el carácter. Además, se lograron identificar entre seis y nueve marcadores que mostraron un efecto significativo asociado a la variación de dicho carácter y que explican el 31 % de la variación fenotípica.

La tolerancia a los estreses abióticos es un carácter complejo, controlado por múltiples genes/QTLs y está sujeto a grandes efectos ambientales. Esto hace difícil seleccionar y estudiar los genes asociados a estos caracteres, tanto a nivel fisiológico como genético. Por lo tanto, el uso de marcadores moleculares permite diseccionar los caracteres cuantitativos particulares a través del mapeo de QTLs y así, identificar loci individuales que puedan ser usados en un programa de SAM. En este sentido, existe en alfalfa una amplia variedad de trabajos sobre mapeo de QTLs asociados a algún tipo de estrés. En la Tabla 2 se detallan tanto los QTLs como las variantes SNPs asociadas a diferentes características relacionadas con la tolerancia a algunos estreses abióticos.

Con referencia a la nutrición nitrogenada, Moreau *et al.* (2012) realizaron un estudio en la leguminosa modelo *M. truncatula* con el objetivo de explorar los determinantes genéticos y moleculares de este carácter en las leguminosas. Se analizaron variables de eficiencia de la planta asociadas con el procesamiento del carbono (C) y del nitrógeno (N). Se emplearon líneas endogámicas recombinantes de cuatro ciclos de fecundación, en un experimento de invernadero bajo dos concentraciones de nitrato contrastantes. A niveles bajos de nitrato, la fijación simbiótica de  $N_2$  fue la principal fuente de N para el crecimiento de las plantas, detectándose un QTL de efecto mayor en el GL 8. Asimismo, también se detectaron un QTL en el GL 5 y otro involucrado en interacciones epistáticas en GL 2. En la condición de alta concentración de nitrato, la asimilación de este fue la fuente principal de N y se identificaron varios QTLs con efectos menores. Solo dos QTLs fueron comunes a ambos tratamientos con nitrato, uno asociado con la biomasa subterránea en el GL 3 y otro relacionado con área foliar, absorción específica de N y relación de biomasa aérea sobre biomasa radicular en el GL 6. En conclusión, este trabajo aportó resultados que enriquecen el conocimiento sobre el control genético de la nutrición de N en *M. truncatula*, los cuales podrían extrapolarse a la alfalfa.

■ **Tabla 2.** Número de QTLs o variantes SNPs asociados a diferentes caracteres agronómicos, morfológicos y fisiológicos, relacionados con la tolerancia a distintos estreses abióticos en alfalfa.

Estrés abiótico	N.º de loci identificados	Carácter asociado	Marcador molecular	Referencia
Resistencia al invierno	102	Crecimiento otoñal/ Reposo invernal	RFLP, SSR y SNP	Brouwer <i>et al.</i> (2000); Alarcón-Zúñiga <i>et al.</i> (2004); Maureira-Butler <i>et al.</i> (2007); Li <i>et al.</i> (2015a); Adhikari <i>et al.</i> (2018).
	83	Supervivencia al invierno	RFLP, SSR y SNP	Brouwer <i>et al.</i> (2000); Ma <i>et al.</i> (2002); Alarcón-Zúñiga <i>et al.</i> (2004); Maureira-Butler <i>et al.</i> (2007); Li <i>et al.</i> (2015a); Adhikari <i>et al.</i> (2018).
	31	Concentración de metabolitos	RFLP y SSR	Alarcón-Zúñiga <i>et al.</i> (2004).
	20	Biomasa radical	RFLP, SSR y SNP	Alarcón-Zúñiga <i>et al.</i> (2004); Li <i>et al.</i> (2015a).
	19	Daño por frío	RFLP	Brouwer <i>et al.</i> (2000); Ma <i>et al.</i> (2002).
	17	Producción de forraje	RFLP, SSR y SNP	Alarcón-Zúñiga <i>et al.</i> (2004); Maureira-Butler <i>et al.</i> (2007); Robins <i>et al.</i> (2007b); Li <i>et al.</i> (2015a).
Sequía	64	Producción de forraje	SSR y SNP	Ray <i>et al.</i> (2013); Yu (2017); Santantonio <i>et al.</i> (2019).
	19	Índice de resistencia a sequía	SNP	Zhang <i>et al.</i> (2015)
	15	Contenido relativo de agua		
	15	Eficiencia en el uso del agua	SSR	Julier <i>et al.</i> (2010).
	6	Discriminación del isótopo del C	SSR y SNP	Santantonio <i>et al.</i> (2019).
	2	Contenido de C y N		
Salinidad	95	Altura de planta, Conductancia estomática, Contenido de clorofila foliar, Contenido relativo de agua, Peso Fresco y Peso seco	SNP	Liu y Yu (2017); Liu <i>et al.</i> (2019).
	36	Tasa de germinación	SNP	Yu <i>et al.</i> (2016).
Toxicidad por Aluminio	6	Tasa de crecimiento del callo y de la raíz	SSR	Narasimhamoorthy <i>et al.</i> (2007); Khu <i>et al.</i> (2013).

Otro carácter importante para el mejoramiento, que a su vez condicionaría el potencial de producción, es la persistencia del cultivo a lo largo de los años. Dado que no existe un ideotipo persistente que pueda emplearse en todos los ambientes y condiciones, se deben abordar diferentes alternativas para desarrollar materiales adaptados a ambientes específicos. En este contexto, y de acuerdo con Bouton (2012), la selección por mayor persistencia debe considerar aquellos materiales que presenten mejor adaptación, adecuado grado de reposo invernal y resistencia específica a las plagas y enfermedades del ambiente para el que se selecciona. Robins *et al.* (2008) evaluaron la persistencia en una población  $F_1$  proveniente del cruzamiento entre *M. sativa subsp. falcata* y *M. sativa subsp. sativa* en distintos ambientes. Como resultado, detectaron QTLs asociados al carácter en los GL 1, 2 y 7, donde ambos genomas parentales contribuyeron con alelos favorables, lo cual sería un indicio de que ambas especies tienen potencial para ser usadas en SAM. Se verificó, además, interacción significativa genotipo  $\times$  ambiente, así como QTLs específicos de ambiente para la persistencia en alfalfa. Dado que muchos de los alelos detectados en el GL 7 también se asociaron con la producción de biomasa, podría haber determinantes genéticos comunes a ambos caracteres. Resultó importante la detección del alelo al37288-1a1, correspondiente a un marcador SSR, que se pudo asociar positiva y significativamente al carácter en todos los ambientes en estudio.

La selección por resistencia a las enfermedades económicamente más importantes en Argentina es otro criterio trascendente en el mejoramiento de alfalfa. Entre ellas resaltan las enfermedades de raíz y corona, como podredumbre húmeda o fitóftora (*Phytophthora megasperma* Drechs. f. sp. *medicaginis*), antracnosis (*Colletotrichum trifolii* Bain & Essary), corchosis (*Xylaria* spp.) y fusariosis (*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *medicaginis* (Weimer) Syn. & Hans). En menor medida se encuentran las enfermedades foliares como tallo negro de primavera (*Phoma medicaginis* Malbr. & Roum var. *medicaginis* Boerema), roya (*Uromyces striatus* Schroet) viruela (*Pseudopeziza medicaginis*), manchón foliar amarillo (*Leptotrochila medicaginis* (Fckl) Shüepf) y mancha ocular (*Leptosphaerulina briosiana* (Poll.) Graham & Luttrell), entre otras. Si bien estas últimas no matan a las plantas, ocasionan importantes pérdidas por disminución del área foliar y por ende del rendimiento y

de la calidad del forraje. Para un mejor tratamiento de estos temas se sugiere ver el capítulo 9 de este libro.

No obstante la importancia del daño por enfermedades, en la literatura son pocos los trabajos que hacen referencia al mapeo de QTLs asociados con la resistencia a alguna de estas enfermedades. Por lo tanto, a continuación, se detallan solamente los trabajos relacionados con las siguientes enfermedades.

La fitóftora causa una podredumbre húmeda de la raíz y es la principal limitante de la producción del cultivo en Australia y América del Norte. Musial *et al.* (2005) analizaron una población de retrocruza (BC) de 120 individuos de *M. sativa* con el objetivo de identificar QTLs asociados a la resistencia a dicha enfermedad. Para ello construyeron un mapa de ligamiento combinando marcadores RAPD, AFLP y SSR, totalizando 2.136,5 cM, con una distancia promedio de 15 cM por locus. Así lograron identificar tres regiones en los GL 2, 14 y 18 asociadas con la enfermedad, las cuales explicaron entre 6 y 15 % de la variación fenotípica y confirieron resistencia en diferentes órganos de la planta. El marcador W11-2 del GL 18 contribuyó con el 7 % de la variación fenotípica en la respuesta foliar de la población, dado que codifica un factor de resistencia expresado tanto en hoja como en raíz. Además, detectaron al menos seis loci que confieren resistencia al patógeno, con distintos modos de herencia sobre diferentes fondos genéticos de *M. sativa*. Posteriormente, Armour *et al.* (2006) identificaron un QTL de resistencia en un cultivar australiano tetraploide (WA272) en un mapa de ligamiento construido con marcadores SSR de ubicación genómica conocida y combinando información proveniente tanto de *M. sativa* como *M. truncatula*. La caracterización fenotípica de la población se realizó usando cortes de cotiledones y raíces infectadas, sobre las que se evaluó incidencia y severidad. Como resultado, se identificaron dos QTLs de efecto mayor en los GL 2 y 6, los cuales explicaron 32 % y 22 % de la variación fenotípica, respectivamente. También se detectaron dos QTLs en los GL 5 y 7, aunque con menor porcentaje de variabilidad fenotípica (10 % y 14 %, respectivamente). En consecuencia, los marcadores asociados a los QTLs identificados en este trabajo se podrían utilizar en SAM para resistencia parcial a *P. medicaginis* en alfalfa.

La antracnosis es una de las enfermedades más destructivas a nivel mundial (Yang *et al.*, 2007). Los síntomas ocasionados van desde pe-

queños sectores negros hasta lesiones ovales, alargadas y hundidas de color pardo rojizo. El problema más serio que produce es la podredumbre negra de la base de los tallos, dado que el hongo avanza sobre la raíz causando la muerte de la planta (Hijano y Pérez Fernández, 1995). Torregrosa *et al.* (2004) caracterizaron genotipos contrastantes de *M. truncatula* para evaluar la resistencia a este patógeno mediante el análisis del perfil de expresión en ambos genotipos. Identificaron 126 EST, que correspondieron a 92 genes relacionados tanto con funciones de defensa como con el proceso de transducción de señal. Con base en estos resultados se eligieron los parentales a partir de los cuales se construyó una población RIL (*Recombinant Inbred Lines*) de mapeo. Por un lado, concluyeron que la resistencia está gobernada por un locus de efecto mayor (gen *Ct1*), localizado en el cromosoma 4. Luego, Torregrosa *et al.* (2008), a partir de un análisis *in silico*, identificaron en dicha región la presencia de varios grupos de genes ricos en leucina que confieren resistencia atípica y que se expresan en situaciones relacionadas con el estrés. Por otro lado, la aparición de nuevos patotipos (cepas) del patógeno dificulta el manejo de la enfermedad basada solamente en el uso de cultivares resistentes. Por ello, algunos investigadores utilizan en sus trabajos distintas razas del patógeno. En este sentido, Mackie *et al.* (2007) detectaron QTLs asociados a las razas 1, 2 y 4 de *C. trifolii* en un clon de alfalfa tetraploide (W126) proveniente de un cultivar australiano. Para ello, utilizaron una población de retrocruzas derivada de 145 individuos de *M. sativa*, la cual fue inoculada en los tallos tanto por inyección como por pulverización del inóculo. En el primer caso, la inoculación por inyección con las razas 1 y 4 produjo una resistencia del tipo dominante incompleta y se mapeó en un GL homólogo al GL 8 de *M. truncatula*. En la inoculación por pulverización se identificó un QTL asociado a la resistencia en el GL 8. Además, se identificaron seis QTLs asociados a la raza 1 y cuatro QTLs con la raza 4. La resistencia a la raza 2 fue recesiva incompleta, identificándose cuatro QTLs, uno de los cuales está en el GL 4 (al igual que la resistencia para la raza 1). Otros trabajos abordan el estudio de la enfermedad en *M. truncatula*, lo que permite un abordaje más simplificado por su nivel de ploidía (diploide) y por su cercanía con la alfalfa tetraploide. En este contexto, Yang *et al.* (2007) presentaron un mapa genético de alta resolución para el gen de resistencia RCT1 contra la raza 1 de *C. trifolii* en el GL 4 de *M. truncatula*. Este gen forma parte



de un locus complejo conformado por numerosos genes homólogos a genes de resistencia de tipo TIR-NBSLRR. Así, el aporte de este trabajo facilita el clonado posicional de este gen en *M. sativa*.

Entre las enfermedades foliares, el tallo negro de primavera puede producir pérdidas de rendimiento de hasta 20 % en cultivares susceptibles. En plantas afectadas se observan lesiones sobre los tallos de color pardo oscuro, que comienzan aisladas para luego fusionarse y tomar un color negro; en las hojas se observan lesiones de color marrón que pueden llegar a marchitarlas (Hijano y Pérez Fernández, 1995). Dado que es un hongo necrotrófico, el mecanismo de resistencia es cuantitativo y, por ello, se conoce poco acerca de su base genética. Kamphuis et al. (2008) realizaron la caracterización macroscópica y citológica de la respuesta a la enfermedad en dos poblaciones de mapeo  $F_2$  (A y B) provenientes del cruzamiento de una accesión resistente con dos diferentes accesiones susceptibles de *M. truncatula*, detectando QTLs que confieren resistencia. Los mapas de ligamiento se construyeron combinando SSR, SNP y CAPS. El mapa generado para la población A tiene una distancia total de 497,8 cM, con una distancia promedio de 6,4 cM por locus, que se distribuyen en siete GL, debido a que los GL 4 y 8 formaron un único grupo. El mapa de la población B tiene una distancia total de 488,3 cM y una distancia promedio de 4,2 cM por locus, distribuidos en ocho GL. Combinando ambas poblaciones (A y B), se detectaron dos QTLs de efecto mayor para *P. medicaginis* OMT5, uno en cada población de mapeo. El QTL detectado en la población A, llamado rnpm1, se localiza en el GL 4 y explicó 33,6 % de la varianza fenotípica de la respuesta a la infección. Por un lado, el QTL detectado en la población B, llamado rnpm2, se localiza en el GL 8 y explicó 29,6 % de la varianza fenotípica. Además, se detectó en el GL 1 de la población B un tercer QTL de efecto menor, denominado rnpm3, que explicó 19,4 % de la varianza total. Para finalizar, dicho estudio se complementó con un mapeo fino del gen rnpm2 a lo largo del GL 8, empleando 524 familias F3. De este modo se localizó la región a un intervalo de 0,8 cM entre los marcadores h2\_16a6a y h2\_21h11d. Por otro lado, el gen rnpm1 está estrechamente ligado a un grupo de genes TIR-NBS-LRR y genes tipo proteínas de resistencia a patógenos.

Otra enfermedad foliar de menor importancia en Argentina, pero que a nivel mundial reviste relevancia, es la roya. Entre los síntomas que

causa se observan amarillamiento y marchitamiento generalizado de la planta, lo que puede originar la pérdida total de forraje en un lote infectado (Hijano y Pérez Fernández, 1995). En un trabajo reciente, Adhikari y Missaoui (2019), usando el genotipado por GBS, identificaron cuatro QTLs para la resistencia a roya en una población  $F_1$  de 184 individuos de alfalfa tetraploide. De los cuatro QTLs, el más importante (Us-RustR1) explicó 13 % de la varianza fenotípica, lo que sugiere que la resistencia tendría herencia poligénica. No obstante, se requiere la validación de estos QTLs en diferentes fondos genéticos y el mapeo fino de estos como próximo abordaje para su posterior utilización en selección asistida por marcadores.

Otro carácter que también reviste importancia en Argentina es la resistencia a pulgones, en particular los pulgones azules (*Acyrtosiphon kondoi* [Shinji]) y moteado (*Therioaphis trifolii* Monell). Para el primero, se detectó un locus en el GL 3 asociado a la resistencia, que cosegrega con otro locus asociado a la resistencia a pulgón verde (*Acyrtosiphon pisum* Harris) (Guo et al., 2012). Este estudio se realizó en una población de 114 RILs de *M. truncatula*. La variable asociada correspondió a la reducción corporal (biomasa) del áfido, lo cual indicaría un mecanismo de antibiosis para ambos pulgones. Además, se encontraron dos loci independientes en los GL 3 y 5 asociados a una reducción de la biomasa de la planta, lo que indicaría un mecanismo de tolerancia al ataque de estos dos pulgones. Para el caso del pulgón moteado, Kamphuis et al. (2013) compararon la reacción de tres accesiones de *M. truncatula* sometidas al ataque de este áfido, observando que mientras una de ellas resultó altamente susceptible, las otras dos fueron moderada y altamente resistentes, respectivamente. A partir de ellas, se realizó un cruzamiento recíproco y las respectivas RILs fueron estudiadas. Como resultado, se concluyó que la resistencia moderada está mediada por el floema, vinculando procesos de antibiosis y tolerancia. Se asociaron tres QTLs en los GL 3, 6 y 7 vinculados a ambos modelos de defensa (antibiosis y tolerancia).

#### d- Selección asistida por marcadores

La selección asistida por marcadores (SAM) es un método por el cual el fenotipo es seleccionado por medio del genotipo del marcador (Collard

*et al.*, 2005). Por lo tanto, se necesita tener una amplia cobertura genómica a fin de maximizar la probabilidad de detectar QTLs o variantes SNPs asociados al carácter. Si bien los primeros mapas desarrollados permitieron encontrar regiones genómicas asociadas a caracteres de herencia simple, no fueron eficientes para mapear caracteres cuantitativos, como los estreses abióticos. En este sentido, tanto las plataformas de genotipado como los nuevos métodos estadísticos de análisis de asociación permitieron asociar variantes alélicas (del tipo SNPs) con este tipo de caracteres. Sin embargo, la asociación de estas variantes con las características de interés no es garantía de que dicho marcador sea parte del gen causante del carácter. Para ello es necesario validar el locus identificado tanto en diferentes fondos genéticos como en distintos ambientes, antes de asegurar la asociación entre marcador y carácter.

La selección asistida permite tanto identificar plantas que porten el QTL de interés, como evaluar su dosaje alélico. Esto último es importante para identificar padres que posean un alto dosaje a fin de aumentar el porcentaje de plantas tolerantes en la población para desarrollar por selección. La estrategia consiste en integrar los marcadores a las evaluaciones fenotípicas en el campo con el objetivo de verificar la selección de individuos con un carácter particular de interés y cuyo dosaje alélico sea alto. Por más que haya varios QTLs mapeados en alfalfa, se requiere mayor esfuerzo para lograr que las asociaciones marcador-carácter sean suficientemente precisas para ser usadas en selección asistida. Por ello, los marcadores cobran mayor importancia cuando son asociados a caracteres que son difíciles de evaluar en el campo o cuyo fenotipado consume mucho tiempo. Es importante destacar que siempre se deberá contar con un fenotipado preciso de los individuos para poder identificar un QTL asociado (Li y Brummer, 2012). No obstante, el mayor impacto de los marcadores en los programas de mejoramiento de alfalfa es la selección a marcador único, dado que pueden realizarse múltiples ciclos de selección por año (Li y Brummer, 2012).

Por una parte, la aplicación de esta metodología en alfalfa presenta algunas complicaciones. Uno de los principales problemas de usar germoplasma para introgresar regiones de interés con el auxilio de los marcadores es limitar el segmento específico del donador (Collard y Mackill, 2008). Además, en los casos donde los marcadores están cer-

ca de fijarse, el efecto del alelo disminuye y se genera la necesidad de un nuevo mapeo para identificar otros QTLs asociados. Por otra parte, el empleo de muchos QTLs de manera simultánea requiere tamaños poblacionales demasiado grandes e impracticables (Casler y Brummer, 2008). Otro punto para considerar aplicar SAM en alfalfa es que se deben evaluar ensayos multiambientales eligiendo sitios contrastantes con base en el conocimiento previo de los patrones de interacción genotipo-ambiente (GxE) (Annicchiarico *et al.*, 2010).

Si bien existe gran número de QTLs y variantes SNPs mapeadas y asociadas con la tolerancia a algún tipo de estrés abiótico (Tabla 2), hasta el momento solo en estrés hídrico se encuentran trabajos que hacen referencia al uso de la SAM. Así, en la Universidad de Nuevo México, EE. UU., después de 20 años de trabajo se ha implementado un proceso de SAM para la obtención de variedades de alfalfa tolerantes a deficiencias de agua. Como resultado, se han identificado y mapeado 10 regiones genómicas que influyen en la producción de biomasa aérea y radicular bajo estrés hídrico (Ray, 2010; Ray *et al.*, 2015). Bajo estrés hídrico seis de estas regiones aumentan la producción de biomasa [marcadores “alta biomasa aérea” o HS (*high shoot*) y “alta biomasa radicular” o HR (*high root*)] y cuatro de ellas la disminuyen [marcadores “baja biomasa aérea” o LS (*low shoot*) y “baja biomasa radicular” o LR (*low root*)]. Luego de evaluar durante tres años diferentes poblaciones en condiciones de campo y bajo dos condiciones hídricas, se identificó un genotipo con los cuatro tipos de marcadores moleculares (HS, HR, LS y LR). A partir del cruzamiento de este genotipo con una variedad comercial estándar se generó una población base (C0), cuyos individuos –con base en el genotipado que se practicó– se clasificaron en cuatro grupos, correspondientes a cada tipo de marcadores. Seguidamente, se llevó a cabo una policruza entre los individuos de cada cada grupo, obteniendo así las poblaciones C1 (1.º generación de híbridos SAM). Estas poblaciones se cruzaron con tres cultivares elite de GRI 7 (uno tolerante y dos susceptibles al estrés hídrico), lo que originó la 2.º generación de híbridos SAM (Ray *et al.*, 2013). Más tarde, con el objetivo de validar estos QTLs, las poblaciones generadas se evaluaron en el campo durante dos años y en dos condiciones hídricas (riego normal y riego limitado) (Babb, 2014). Por un lado, la C1 derivada de la selección a favor de los marcadores para alta biomasa aérea (HS) y radicular (HR) mejoró el

rendimiento de forraje bajo estrés en 23 % y 20 %, respectivamente; sin embargo, rindieron menos que los tres cultivares parentales y sus híbridos SAM respectivos. Por otro lado, la 2.º generación de híbridos SAM provenientes de los dos cultivares elite susceptibles mejoró respectivamente 6 % y 9 % el rendimiento en forraje y conservó 75 % del fondo genético del cultivar elite. Por último, cruzaron la población C1 por seis poblaciones sintéticas de GRI 4-5 y los híbridos SAM así obtenidos se evaluaron a campo durante 2016 y 2017 bajo condiciones de estrés hídrico (Ray, 2017). La producción de forraje bajo estrés de los híbridos SAM superó entre 10 y 25 % a la de los parentales comerciales. Basados en estos resultados se concluyó que la SAM para la obtención de cultivares de alfalfa tolerantes al estrés hídrico funciona de manera adecuada y que los marcadores moleculares seleccionados resultaron apropiados para dicha tarea.

No obstante, los esquemas de selección basados en marcadores aun deben considerar las mismas necesidades comunes a todos los programas de mejoramiento, a saber: a) una clara especificación del ambiente objetivo a los cuales se apunta destinar el cultivar resultante; b) la capacidad de realizar mediciones con precisión de los rasgos de interés; y c) la importancia de realizar evaluaciones fenotípicas en las condiciones lo más cercanas posible al ambiente objetivo.

## Genómica

### *Genoma de referencia de M. sativa*

Un genoma de referencia, también conocido como ensamblado de referencia, es una representación lineal del genoma de una especie y funciona como el cimiento de todas las bases de datos genómicos. De ese modo, conforma una plataforma para el ensamblado de genomas *de novo*, la tipificación de variantes alélicas, el alineamiento de lecturas de ARN u otras secuencias y la “anotación” de genes (Ballouz *et al.*, 2019). La obtención de un genoma de referencia constituye un gran avance no solo para el estudio de la regulación de la expresión de caracteres de interés, sino también para programas de mejoramiento genético. Esto se debe a que ofrece numerosas herramientas para el desarrollo de marcadores moleculares y el uso de técnicas de edición génica.

Sin embargo, no todas las especies se pueden secuenciar con la misma facilidad. El tamaño del genoma, el nivel de heterocigosidad, la estructura y número de elementos repetitivos y la ploidía son las principales características que influyen en el proceso de ensamblado de un genoma (Dominguez del Angel *et al.*, 2018; Li y Harkess, 2018). Es por ello que hasta el momento (2020) no se ha logrado secuenciar el genoma de la alfalfa cultivada tetraploide. A continuación, se detallan las particularidades del genoma de esta especie que explican en cierta medida el porqué de esta situación.

En primer lugar, a mayor tamaño del genoma, mayor será el costo del proyecto de secuenciación. En este sentido, se necesita cierta cantidad de secuencias (lecturas) para ensamblar un genoma. Para ello, cuando se menciona que para un proyecto de secuenciación se necesita una profundidad de 10X significa que el número total de nucleótidos, en el total de lecturas, debe ser 10 veces el número total de nucleótidos en todo el genoma. En definitiva, cuanto mayor sea el tamaño en pares de bases mayor será el número de nucleótidos, como así también el número de datos para ordenar y, por ende, el costo y la complejidad de la secuenciación (Dominguez del Angel *et al.*, 2018). Cabe señalar que la alfalfa posee un genoma relativamente pequeño, entre 0,8 y 1 Gigabases (Gb), si se considera que en plantas el rango oscila entre 0,063 y 148,8 Gb (Greilhuber *et al.*, 2006). No obstante, debe considerarse que se han secuenciado genomas de más de 10 Gb y, por lo tanto, el tamaño no representaría una limitación severa en este caso.

Por un lado, por lo general, los programas de ensamblado reducen diferencias alélicas en una única secuencia consenso para que el ensamble final resulte haploide. Sin embargo, en genomas con elevada heterocigosidad las lecturas de alelos homólogos pueden ser demasiado diferentes como para ser condensadas en una sola secuencia y, por lo tanto, son ensambladas de forma separada generando duplicaciones ficticias. Por otro lado, también puede fallar el ensamblado en dichas regiones variables, por lo que al aumentar el nivel de heterocigosidad se obtiene un ensamblaje más fragmentado. En estas situaciones se recomienda, de ser posible, secuenciar individuos endogámicos (Li y Harkess, 2018). Sin embargo, la alfalfa presenta complicaciones en este sentido: además de poseer un genoma de elevada heterocigosidad –debido a su

sistema de reproducción alógama–, sufre una fuerte depresión por endogamia (Li y Brummer, 2009). En consecuencia, estos factores hacen virtualmente imposible generar líneas puras en dicha especie.

En cuanto a la estructura y el número de elementos repetitivos no se han publicado estudios referidos a estos elementos contenidos en el genoma de alfalfa, por lo que se desconoce el nivel de complejidad del genoma en este sentido. Por último, la ploidía también es un factor determinante, ya que en especies alo o autopoliploides la aparición de haplotipos adicionales dificultan el ensamblado del genoma ya que es probable que se dupliquen sitios y que el genoma resulte con mayor fragmentación (Li y Harkess, 2018). Por consiguiente, la autotetraploidía de la alfalfa ( $2n = 4X = 32$ ) representaría una gran limitación en el correcto ensamblado de su genoma.

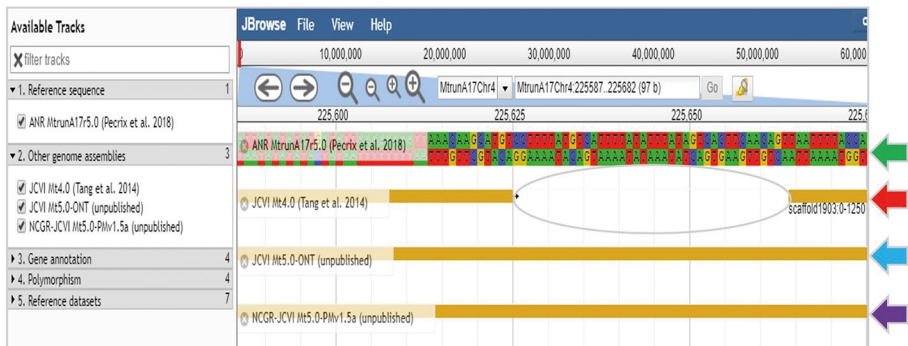
En este contexto, para contrarrestar dichas limitaciones, se inició un proyecto para secuenciar el genoma a partir de clones provenientes de un individuo perteneciente a una población de alfalfa cultivada diploide (Bingham y McCoy, 1979). Esta población se originó a partir de un programa de retrocruzamiento cuyo cruzamiento inicial involucró individuos androestériles de alfalfa cultivada tetraploides e individuos silvestres diploides de *Medicago falcata* L. Como resultado de este retrocruzamiento, 98,44 % del genoma es de la alfalfa cultivada y 1,56 % del genoma de *M. falcata* (Bingham y McCoy, 1979). Como resultado, en 2016 se liberó el genoma ensamblado de alfalfa diploide (CADLv0.95P), disponible para su descarga en el sitio web <http://www.medicagohapmap.org/downloads/cadl> y para su visualización en el sitio <http://www.alfalfatoolbox.org/jbrowse>. Dado que no se ha completado el ensamblado en pseudomoléculas, representando cada uno de los ocho cromosomas básicos de la especie, solo se puede visualizar la secuencia y posición de genes en *scaffolds* o estructura “en andamiaje” (Hapmap Project, 2016). De todas maneras, a pesar de no poder observarse la posición física en los cromosomas, el visualizador de genomas permite realizar búsquedas de secuencias mediante la herramienta BLAST. Además de identificar bloques sinténicos, analizar y descargar secuencias, también permite simultáneamente tener una perspectiva de zonas cromosómicas extensas y explorar pequeñas áreas en busca de detalles (Wang *et al.*, 2013). El método de secuenciación utilizado fue

la tecnología PacBio, con una profundidad de 100X, y como resultado se obtuvo un ensamblado constituido por 6593 *scaffolds*, que en su totalidad abarcan 1200 megabases (Mb) (Hapmap Project, 2016). Si bien el tamaño del genoma haploide esperado es de 800 Mb, la diferencia entre lo esperado y lo ensamblado se podría deber a errores resultantes de la elevada heterocigosidad que presenta el genoma de esta especie. De ser así, la mitad del genoma estaría representado por el ensamblado de dos haplotipos distintos como mínimo, lo cual implicaría que el contenido de genes presente una proporción significativa de copias alélicas de los genes resultantes de falsas duplicaciones segmentales. Este dato no es menor ya que no se tiene certeza de si, al comparar la secuencia de genes similares, se está ante miembros de una familia génica o ante copias alélicas de un único gen.

Históricamente, ante la ausencia de un genoma de referencia de *Medicago sativa*, se ha utilizado como referencia el genoma de *Medicago truncatula* GAERTN. Esta especie modelo es autógena, diploide y está altamente emparentada con la alfalfa. Además, al igual que esta, desarrolla una relación simbiótica con *Ensifer meliloti* (Barker *et al.*, 1990). Otro rasgo interesante de esta leguminosa modelo es que posee un genoma relativamente pequeño, de aproximadamente 375 a 465 Mb (Blondon *et al.*, 1994). Su número cromosómico básico también es ocho y presenta un amplio grado de sintenia con el genoma de alfalfa (Julier *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2014b). Dicha sintenia es muy importante, ya que permite el uso futuro de la genómica aplicada a *M. truncatula* en estudios genéticos en alfalfa cultivada. Hasta el momento, se han liberado diferentes versiones del genoma de *M. truncatula* utilizando distintas técnicas de secuenciación. La primera versión ensamblada (Mt3.5), publicada en 2011, se basó en la técnica de secuenciación de cromosomas artificiales de bacterias mediante Sanger (Young *et al.*, 2011). Dicha versión representaba solo 250 Mb del genoma por lo que, aprovechando la disminución de costos en tecnologías de secuenciación de segunda generación, se inició un nuevo proyecto para actualizar la versión del genoma de esta especie. En el año 2014, se liberó la versión Mt4.0, la cual se realizó *de novo* mediante la técnica *whole genome shotgun*. Esta versión mejoró el anclaje de secuencias en pseudomoléculas logrando representar el 97 % de la secuencia genómica y abarcando 360 Mb de secuencias que se extienden 390 Mb (Tang *et al.*, 2014). Ahora bien, en



la versión Mt4.0 quedaron regiones con secuencias repetitivas sin resolver. Por lo que se realizó una actualización de dicha versión mediante tecnologías de secuenciación de tercera generación basadas en “lecturas largas”. Actualmente, existen tres versiones completas basadas en secuenciación por PacBio y Oxford Nanopore. La más completa de las tres es MtrunA17r5.0-ANR, que se liberó en el año 2018 y se realizó mediante la tecnología PacBio, con una profundidad de lecturas superior a 100X. Tiene un tamaño de 430 Mb y permitió descubrir rearrreglos cromosómicos entre genotipos y genes duplicados no hallados en la versión anterior Mt4.0 (Pecrix *et al.*, 2018). Dichos genomas se pueden visualizar con la herramienta genome browser en el sitio web <https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/> (Figura 2). Además, se pueden descargar secuencias de hasta 500 kb para el diseño de marcadores y análisis de genes candidatos.



■ **Figura 2.** Visualización del genoma MtrunA17r5.0-ANR. Secuencia de la región de 97 pb comprendida entre los puntos 225587 y 225682 del cromosoma 4 del genoma MtrunA17r5.0-ANR (flecha verde). Secuencias ensambladas de distintas versiones del genoma de *M. truncatula* como Mt4.0 (flecha roja), Mt5.0-ONT (flecha celeste) y Mt5.0-PMv1.5a (flecha violeta). El círculo rojo señala un intervalo no resuelto en la versión del genoma Mt4.0. Adaptado de *Medicago truncatula A17 r5.0 genome portal* (Pecrix *et al.*, 2018).

### Plataformas de genotipado de alto caudal

Las estrategias de genotipado de alto caudal se desarrollaron con el objetivo de detectar e identificar una gran cantidad de marcadores SNPs en poblaciones con alto número de individuos. Su uso se vio impulsado por el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de próxima generación o NGS (*Next-Generation Sequencing*) (Metzker,

2010) que posibilitó reducir el costo de la secuenciación y obtener una gran cantidad de datos genómicos. En este contexto, las plataformas desarrolladas en alfalfa se centran en los SNP *arrays* (microarreglos) (Li *et al.*, 2014a) y en el genotipado por secuenciación o GBS (*Genotyping by Sequencing*) (Li *et al.*, 2014b). Tanto la aplicación como la generación de estas estrategias están en continuo desarrollo. Esto se debe no solo al desafío que implica identificar si las mutaciones encontradas son verdaderos marcadores SNPs (*SNP calling*), sino también a la dificultad en tratar de discriminar el dosaje alélico en un genoma tetraploide como el de la alfalfa cultivada.

### *a* -SNP array

Un *SNP array* es un microarreglo de ADN constituido por un soporte sólido en el que se fijan de forma ordenada sondas colindantes a marcadores SNP distribuidos en todo el genoma. Estos microarreglos permiten caracterizar el genotipo (genotipar) de solo unos cientos a cientos de miles de marcadores simultáneamente, transformándolos en plataformas de genotipado de alto caudal. Aunque cada compañía que desarrolla este tipo de tecnología usa diferentes reacciones químicas para identificar el alelo de cada variante SNP, todas tienen dos aspectos en común. El primero es que ambas se basan en la complementariedad de bases del ADN para “pescar” las regiones “blanco” donde se localizan los marcadores SNPs, facilitando así la unión de estos a sus respectivas sondas alelo-específicas. El segundo se refiere a que una vez producida esta reacción química, que genera una señal fluorescente o de otro tipo, se requiere un algoritmo computacional robusto que determine la presencia o ausencia de cada variante en cada SNPs (La Framboise, 2009).

En comparación con las plataformas tradicionales de secuenciación, que requieren mayor tiempo para la construcción de las librerías y para el análisis bioinformático, las principales ventajas que presenta esta técnica son la rapidez en la obtención de los datos y la facilidad del análisis. Además, la conformación del microarreglo está dada por el empleo de SNPs conocidos; por lo tanto, muchos de ellos pueden ser construidos para determinadas regiones genómicas de interés o para responder preguntas específicas de acuerdo a la población en estudio.

Otra ventaja que presenta es una relación costo-beneficio de baja a moderada (You *et al.*, 2018).

Una de las mayores desventajas que presenta radica en que, a fin de utilizar marcadores SNPs de localización conocida, se debe disponer de información genómica previa a partir de transcriptomas, secuenciación de bibliotecas de BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) o genomas de referencia. Esto genera cierto grado de error para encontrar marcadores SNPs polimórficos, ya que no sólo se parte de pocos individuos, sino que además su elección no es necesariamente aleatoria, impidiendo así la captación de todo el polimorfismo en una población de interés. Dicho problema se resolvería ampliando las bases genómicas disponibles a través de la secuenciación de genomas completos de varios individuos con mayor representación poblacional, de modo de actualizar los SNPs de un microarreglo o bien combinar varios de ellos de acuerdo al objetivo de estudio (You *et al.*, 2018).

Por un lado, el desarrollo de estas estrategias en especies poliploides –como la alfalfa– es más lento que en las especies diploides. Esto se debe, como ya fuera señalado, a la dificultad para determinar el número de copias de cada alelo (dosaje alélico) en un determinado SNP, lo que obliga a que la construcción de algoritmos apropiados para la correcta asignación de un genotipo a un determinado individuo esté en constante evolución. Por otro lado, dado que la alfalfa aún no cuenta con un genoma de referencia, se recurre al genoma ensamblado de *M. truncatula* con el cual presenta un amplio grado de sintenia. El empleo de esta alternativa es lo que ha posibilitado el desarrollo de la tecnología de microarreglos en alfalfa.

En la actualidad, solamente Li *et al.* (2014a) han desarrollado un chip de marcadores SNPs (*SNP array*) de alta densidad en alfalfa. Este fue construido a partir de una base de datos transcriptómicos de 27 genotipos, tanto diploides silvestres como tetraploides cultivados, que permitieron identificar 900.000 SNPs (Li *et al.*, 2012). Luego de un proceso de filtrado, ortología con genes candidatos y alineamiento sobre las ocho pseudomoléculas del genoma de *M. truncatula* se desarrolló un *SNP array* con 9.277 SNPs. Dicho chip se validó en un panel de 280 genotipos, que incluyeron tanto individuos diploides como tetraploides, mediante la tecnología Illumina ®. Como resultado, 81 % de las

variantes detectadas (7.476 SNPs) pasaron los controles de calidad y presentaron polimorfismo. Además, el chip también mostró un alto nivel de transferibilidad para especies de *Medicago* estrechamente relacionadas –como *M. prostrata*, *M. lupulina* y *M. truncatula*– y una transferibilidad razonable para trébol rojo (*Trifolium pratense*).

También, se pudo determinar el dosaje alélico del 14 % de las variantes SNPs detectadas en alfalfa tetraploide. Es importante puntualizar que, debido a que el dosaje alélico puede afectar la expresión génica y los fenotipos en las especies poliploides, la integración de la información de dosificación alélica en los modelos estadísticos de GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) mejoraría el mapeo de QTLs (*Quantitative Traits Loci*) en este tipo de especies. Por lo tanto, el chip mencionado podría aplicarse no sólo en experimentos de diversidad genética, sino también en mapeo genético, GWAS y selección genómica en alfalfa.

### *b- Genotipado por secuenciación o GBS*

Esta estrategia combina, en un único procedimiento, el descubrimiento de marcadores SNPs y la genotipificación de la población de estudio. Esta característica hace de esta técnica una plataforma de genotipificación verdaderamente rápida y flexible, aplicable a un amplio rango de especies y de recursos genéticos. Debido a su simplicidad, el método se ha extendido a un amplio rango de especies, aun cuando muchas de ellas no poseen –como la alfalfa– un genoma de referencia. Por definición, los métodos GBS se basan en la secuenciación de una porción reducida del genoma, cuyos fragmentos deben ser adyacentes a un polimorfismo de una única base o SNP. No obstante, en la actualidad, la terminología GBS también se aplica a la resecuenciación de nuevos genotipos en aquellos cultivos que cuentan con un genoma de referencia. La diferencia más importante entre ambas aproximaciones es que las técnicas de reducción del genoma capturan una gran proporción de marcadores SNPs, mientras que las de resecuenciamiento permiten detectar todas las variantes SNPs presentes en la población. Por lo tanto, las metodologías que utilizan la reducción del genoma son las siguientes:

1- RADseq (*Restriction Associated DNA Sequencing*): combina la digestión con una enzima de restricción y la selección de fragmentos polimórficos adyacente a esos sitios (Baird *et al.*, 2008).

2- GBS: combina la digestión con una enzima de restricción y el enriquecimiento de fragmentos cortos mediante amplificación por PCR (Elshire *et al.*, 2011; Poland *et al.*, 2012).

3- ddRADseq (*double digest RADseq*): combina la digestión de dos enzimas de restricción, una de fragmentos largos y otra de fragmentos cortos, y elimina el paso de selección de fragmentos (Peterson *et al.*, 2012).

Cabe destacar que el número de marcadores SNPs obtenidos por cualquiera de las tres estrategias varía entre 100.000 y 1 millón. La densidad de estos depende de dos factores: a) del número de mezclas de ADN de los diferentes individuos (*multiplexing*) que constituyen una librería, considerando que a mayor número de muestras menor será el número de secuencias que se alineen en un determinado sitio del genoma; y b) de la selección de las enzimas de restricción que se utilicen para reducir el genoma, lo que implica que cada especie requiere un pequeño ajuste en el número y el tipo de enzima de restricción para utilizar.

La principal fortaleza de estas metodologías radica en el *multiplexing* de ADN, dado que, al utilizar adaptadores genéricos (*barcode*), permite mezclar el ADN de diferentes genotipos en una única muestra y construir librerías reduciendo el costo por muestra. La inclusión del paso de amplificación de fragmentos cortos por medio de cebadores complementarios a los adaptadores, magnifica la señal de estos para la fase de secuenciación (Poland y Rife, 2012). Este paso permite generar muchas secuencias colindantes a los sitios de restricción y obtener así –a través del alineamiento de aquellas– una secuencia consenso robusta y marcadores SNPs validados por su frecuencia en una determinada posición. Otra ventaja que presenta esta plataforma es que se puede aplicar a especies con o sin genoma de referencia. Esto ha permitido que muchas especies con escaso desarrollo en el área de la genética molecular, puedan rápidamente obtener nuevos marcadores que faciliten el abordaje de enfoques genéticos a genoma amplio.

Para cualquiera de las metodologías que incluyen reducción del genoma, uno de los puntos débiles es la gran cantidad de datos faltantes generados para un marcador SNP determinado. Esto puede deberse a la presencia de mutaciones en los sitios de restricción que impiden la obtención de fragmentos cortos. Dicha dificultad es inherente al geno-

ma de la especie y a la selección de las enzimas para la reducción de la complejidad del genoma. Otro punto en contra es el uso de altos niveles de multiplexing, que disminuyen la cantidad de datos obtenidos por genotipo, reduciendo a su vez el nivel de cobertura. En general, se espera tener gran cantidad de secuencias cortas que secuencias muy largas para poder encontrar marcadores SNPs. Sin embargo, estas últimas son útiles en poliploides para encontrar SNPs de genoma específico.

El número de datos faltantes es un punto crítico a la hora de caracterizar tanto paneles de asociación de germoplasma como parentales de poblaciones de mejoramiento. Para reducir ese número, se podría aumentar el nivel de cobertura genómica o bien disminuir el nivel de multiplexing. Otra forma de salvar este punto es imputar los genotipos faltantes según haplotipos de referencia, es decir, inferir el alelo de la variante SNP faltante en relación con un grupo de SNPs adyacentes en ausencia de recombinación. Esto se puede realizar mediante metodologías algebraicas de inteligencia artificial (*Machine Learning*) como los modelos de regresión Random Forest (Breiman, 2001). Otra alternativa, como ya fuera mencionado, es secuenciar el genoma completo de algunos individuos claves en la población de estudio, lo que permitiría referenciar los *gaps* (brechas de secuenciación) generadas previamente por GBS (Poland y Rife, 2012). Esta desventaja podría desconsiderarse si el genotipado se realiza sobre poblaciones tempranas de mejoramiento y no sobre los parentales. Por lo tanto, dado que la frecuencia de estos marcadores se irá modificando a lo largo de los ciclos de selección, conviene dirigir el esfuerzo requerido para completar la información faltante al genotipo final.

La metodología GBS se ha utilizado en diferentes abordajes de genómica aplicada en alfalfa, como por ejemplo en la construcción de mapas de ligamiento de alta densidad (Li *et al.*, 2014b; Munjal *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019), en el mapeo de QTLs con mayor precisión (Adhikari *et al.*, 2018; Adhikari *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019), en estudios de GWAS (Zhang *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016; Biazzi *et al.*, 2017; Liu y Yu, 2017; Yu, 2017; Liu *et al.*, 2019) y en la selección y predicción genómica (Annicchiarico *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015b; Biazzi *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2018), entre otros. En este contexto, el GBS genera un gran aporte a la construcción de mapas de ligamiento cuando se dispone de un genoma de referencia, dado

que permite el alineamiento de los marcadores generados, facilitando la identificación de los puntos de recombinación. También se pueden construir mapas a través de la posición asignada a cada marcador, sin tener en cuenta la frecuencia de recombinación. Asimismo, la falta de un genoma de referencia no constituiría una limitante, ya que los SNPs generados se pueden agrupar y ordenar mediante *pipelines* (conductos) de alineamiento de secuencias para ensamblado de genoma *de novo* o por sintenia de mapa con especies muy cercanas. En el caso de la alfalfa tetraploide, como se explicó anteriormente, se utiliza el genoma de *M. truncatula* para facilitar el ordenamiento y el posicionamiento de aquellos. También el GBS facilita la localización de genes simples a través del mapeo fino, ya que permite el balance entre la identificación de marcadores asociados al gen de interés y el desarrollo de ensayos de marcadores diagnósticos. Luego, esos marcadores servirán para el seguimiento del gen asociado al marcador en las diferentes poblaciones de mejoramiento o fondos genéticos que se deseen analizar (Poland y Rife, 2012).

### *Genómica aplicada al mejoramiento de alfalfa*

#### *a- GWAS*

El método *Genome-Wide Association Studies* (Estudios de Asociación a Genoma Amplio) se aplicó por primera vez en genética humana (Corder *et al.*, 1993). El primer uso sobre datos agronómicos lo realizaron Thornsberry *et al.* (2001) en maíz para el carácter fecha de floración. La metodología brinda una estrategia poderosa para superar las limitaciones del mapeo biparental de QTLs. En comparación con este último, GWAS permite mapear loci genéticos con una ubicación más precisa. Y en lugar de una población biparental, el método se realiza sobre una población de individuos no relacionados con diversidad amplia, como poblaciones de mejoramiento MAGIC (*Multi-parent Advanced Generation Inter-Cross*) o un panel de accesiones de germoplasma.

Esta forma de análisis surgió con el avance de las plataformas de genotipado masivo permitiendo asociar marcadores SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma a las variantes fenotípicas, tanto cualitativas como cuantitativas. Dicho análisis se basa en el desequilibrio

de ligamiento (DL) a nivel poblacional, resultante de la acumulación de eventos de recombinación históricos durante las sucesivas generaciones que dieron origen a la población de estudio. Por lo tanto, cuando el marcador SNP detectado está asociado al gen que controla el carácter en estudio, se dice que es funcional y se lo denomina QTN (*Quantitative Trait Nucleotide*). Si, por el contrario, dicho marcador se ubica por fuera del gen controlador, el segmento genómico mapeado se denomina QTL. En este sentido, un factor importante para considerar es el nivel de DL, que se refiere al grado de asociación no aleatoria de alelos en diferentes loci y cuyo nivel a través del genoma determina la resolución del mapeo de asociación. Por lo tanto, cuanto mayor sea el DL entre la variante SNP y la variante fenotípica, mayor será la probabilidad de encontrar asociación entre ellos. Por el contrario, cuanto menor sea el DL medido en pares de bases a lo largo del genoma, mayor será el número de marcadores SNPs necesarios para realizar un GWAS y poder mapear QTLs asociados al carácter en estudio con mayor precisión (Zeng *et al.*, 2017).

Existen diferentes aspectos para ser considerados en este tipo de estudio. Entre ellos, el tipo de plataforma de genotipado que se debe utilizar, la eficiencia y el poder de discriminación del método estadístico, y la corrección de factores intrínsecos que puedan generar algún error en la asociación. En este caso, los métodos estadísticos para encontrar la asociación marcador-QTL deben adecuarse al tipo de carácter en estudio, ya sea cuantitativo o cualitativo. En general, para los primeros se usan modelos de regresión lineal, donde el poder estadístico de asociación es suficientemente significativo como para encontrar marcadores SNPs completamente ligados a genes de efecto mayor y menor. Para los segundos, se utilizan métodos de regresión logística o prueba de Fisher, cuyo poder estadístico es muy efectivo para identificar la red de genes asociados a un fenotipo simple (Scherer y Christensen, 2016).

El punto crítico de esta estrategia GWAS es evitar los falsos positivos o los falsos negativos, debidos a diferentes aspectos del análisis que podrían generarlos. Entre ellos, el tamaño de la población y la precisión en el fenotipado. Otro aspecto para considerar es la frecuencia del alelo causal, ya que cuando este es un alelo raro el poder de detección del análisis de asociación disminuye. Al mismo tiempo, otro inconveniente es la posible asociación espuria causada por la estructura de la pobla-



ción y la distancia genética, como cuando por ejemplo las accesiones de una colección núcleo se dividen en subespecies. Dicha estratificación subyacente puede identificarse con métodos estadísticos, como el análisis de componentes principales o el uso de modelos lineales mixtos (Scherer y Christensen, 2016).

En alfalfa se han realizado diferentes análisis de este tipo para identificar loci SNPs asociados a la calidad del forraje (Biazzi *et al.*, 2017), a la tolerancia a la sequía (Zhang *et al.*, 2015; Yu, 2017) y al estrés salino (Yu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019), al reposo invernal (Munjal *et al.*, 2018) y a la resistencia a enfermedades (Yu *et al.*, 2017), entre otros. Estos marcadores SNPs, así identificados, proporcionan una plataforma para el mapeo fino de QTLs a nivel de genoma amplio que luego pueden ser aplicados en selección asistida (SAM) y selección genómica (SG). En este sentido, Zhang *et al.* (2015) evaluaron en invernáculo el índice de resistencia a sequía (IRS) y el contenido relativo de agua (CRA) en un panel de 198 accesiones de alfalfa. Como resultados del GWAS, por un lado, identificaron 34 marcadores SNPs asociados con la tolerancia a la sequía. Diecinueve de ellos mostraron asociación significativa ( $p \leq 0,05$ ) con IRS; de esos, 15 fueron asignados a siete cromosomas, basados en el alineamiento contra el genoma de referencia de *M. truncatula*. Por otro lado, 15 SNPs se asociaron significativamente con CRA y –por alineamiento contra el genoma de referencia de *M. truncatula*– también fueron asignados a siete cromosomas. Además, por medio de la búsqueda de homología con genes candidatos, se identificaron seis SNPs homólogos para loci asociados con IRS y tres SNPs homólogos para loci asociados con CRA. Asimismo, Liu *et al.* (2019) lograron identificar variantes SNPs asociadas a caracteres de tolerancia a la sal en una población avanzada de mejoramiento de 291 individuos de alfalfa en condiciones controladas de invernáculo. En este caso, se calculó un índice de susceptibilidad al estrés (ISE) para cada una de las cinco variables analizadas (peso seco, peso fresco, altura de planta, contenido relativo de agua y conductividad estomática). De esta manera, lograron identificar 53 marcadores SNPs localizados en 49 loci asociados significativamente ( $p \leq 0,05$ ) con los ISE de cada variable. Estos loci se distribuyen sobre los ocho cromosomas y, por homología de secuencias con el genoma de *M. truncatula*, 21 de ellos se asociaron a genes candidatos de tolerancia al estrés salino. Como resultado de ambos

trabajos, los marcadores SNPs asociados –después de ser validados por medio de marcadores diagnóstico en otras poblaciones de mejoramiento o fondos genéticos– se podrán utilizar en SAM o SG.

### *b- Selección genómica*

La selección genómica (SG) es una estrategia de mejoramiento que se está adoptando con mucha rapidez en diferentes programas de mejoramiento (Meuwissen *et al.*, 2001). Es importante su empleo en aquellos cultivos donde el área de la genómica está muy desarrollada –como, por ejemplo, en soja, trigo y maíz–, ya que ha superado varias de las limitaciones que presenta la SAM. Si bien esta última se aplica desde la década de 1990 para la detección e introgresión de genes mayores asociados a caracteres simples, no ha demostrado ser eficiente para caracteres cuantitativos. Esto último se debe a que las asociaciones marcador-QTL utilizadas en esta estrategia se obtienen a partir del mapeo de poblaciones biparentales, en las cuales se pueden capturar con mayor probabilidad genes de efecto mayor. A su vez, el DL entre el marcador-QTL encontrado en dichas poblaciones no suele ser lo suficientemente estable como para garantizar que dicho marcador se pueda utilizar para detectar ese QTL en otras poblaciones o fondos genéticos. Tampoco se ha obtenido una reducción significativa en la duración de los ciclos de selección. Por lo tanto, la relación costo-beneficio solo aparece como interesante para los caracteres de alta heredabilidad. Como consecuencia de todo lo anterior, la SAM ha sido poco efectiva en aquellos caracteres cuantitativos determinados por muchos genes de efecto menor y de alta interacción genotipo-ambiente. Contrariamente, la SG se basa en un modelo de predicción que utiliza la alta densidad de marcadores SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma para identificar aquellos que estén complemente asociados a los loci del carácter de interés. Esta metodología permite seleccionar individuos solo por su genotipo y sin evaluación fenotípica previa, reduciendo así el tiempo de desarrollo de un cultivar.

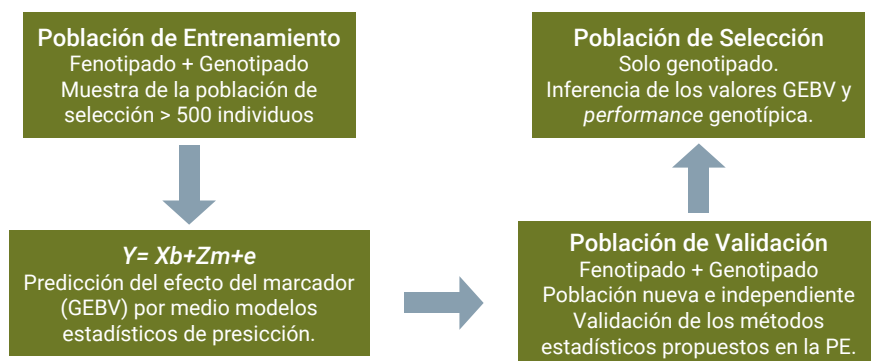
La aplicación de esta estrategia requiere definir tres poblaciones: 1- población de estimación o población de entrenamiento (PE); 2- población de validación (PV); y 3- población de selección (PS). Estas tres pueden ser: a- todas físicamente distintas; b- dos poblaciones, donde una de

ellas se utilice como población de estimación y validación; o c- una sola población que cumpla con los tres roles (Deon Vilela de Rezende *et al.*, 2014). Por lo general, se usan las dos primeras estrategias (a y b) (Figura 3). La PE debe estar conformada por más de 500 individuos aproximadamente, que deben ser fenotipados con la mayor precisión posible y genotipados con una alta densidad de marcadores. Es sobre esta población donde se desarrollan los modelos predictivos para la estimación de los valores de mejora genómica (*GEBV: Genomic Estimated Breeding Values*). Para ello, primero se deben estimar para cada genotipo los efectos de todos los marcadores de manera individual. Luego, se identifican aquellos que estén asociados al carácter y, sobre estos, se estiman los efectos sobre el fenotipo y se calcula el valor GEBV para cada individuo. La PV es un grupo pequeño de individuos (aproximadamente 20 % de la PE) que también se debe fenotipar y genotipar, y sobre la cual se verifica la precisión del modelo propuesto. Para ello, los GEBVs son inferidos a partir de los efectos de cada marcador obtenidos en la PE y correlacionados con los valores fenotípicos observados. Con esta correlación y con el valor de heredabilidad del carácter se obtiene el parámetro *selection accuracy* (precisión de selección) que permite determinar la confiabilidad del modelo propuesto. La PS está constituida por los individuos (aproximadamente unos 10.000) que serán seleccionados a través de esta metodología y que solo serán genotipados. A partir de la base de datos genotípicos y de acuerdo con el modelo validado, se pueden inferir tanto sus GEBVs como su futuro desempeño (*performance*) fenotípico (Deon Vilela de Rezende *et al.*, 2014).

El efecto del marcador sobre un genotipo no es igual en los diferentes ambientes, por lo que un determinado modelo de SG solo puede ser aplicado sobre el ambiente donde se obtuvieron los datos fenotípicos de la PE. Por esta razón, para el uso de la SG, se deben considerar los análisis multiambientales que puedan generar modelos que incluyan la interacción genotipo-ambiente ( $G \times E$ ). Otro aspecto para considerar es que los individuos de la PE tienen que tener algún grado de parentesco entre ellos y con la población de selección. De esta forma, puede decirse que la SG se basa en el grado de similitud genética entre ambas poblaciones y en el DL entre el marcador y el carácter (Desta y Ortiz, 2014).

La principal ventaja de la SG sobre la selección fenotípica recurrente es que permite acortar significativamente el tiempo de desarrollo de un

cultivar al alternar los ciclos de selección, haciendo que algunos de ellos se basen únicamente en la constitución genómica de los individuos. De esta manera, se puede aumentar la ganancia genética por unidad de tiempo y de costo; esto es muy ventajoso principalmente en cultivos perennes, donde se requieren muchos años de evaluación para caracteres complejos como el rendimiento. También es conveniente para caracteres donde la selección fenotípica sea ineficiente, o cuando el costo del genotipado sea menor al del fenotipado. Entre las desventajas, pueden mencionarse el costo del genotipado, la pérdida de diversidad cuando la PE no fue constituida sobre la premisa de una base de genética amplia, la dificultad para modelar la interacción G x E en multiambientes y la falta de una guía clara de cómo y cuándo incorporar esta estrategia dentro de un programa de mejoramiento (Crossa *et al.*, 2017).



■ **Figura 3.** Esquema teórico de aplicación de la Selección Genómica en un programa de mejoramiento genético. Adaptado de Deon Vilela de Resende *et al.* (2014). Referencias: Y= valor fenotípico observado; X= matriz de incidencia de los valores fenotípicos; b= vector de efectos fijos; Z= matriz de incidencia de los genotipos; h= vector de efectos aleatorios de los marcadores; e= error residual; GEBV= *Genomic Estimated Breeding Values*; y PE= población de entrenamiento.

## Transformación genética

El mejoramiento genético convencional se basa en la existencia natural de variabilidad genética para los caracteres que se desean mejorar y se vale de la reproducción sexual para la modificación de estos. Este hecho hace que el aprovechamiento de la variabilidad esté restringido por barreras de cruzabilidad. Además, para muchos caracteres de importancia agronómica, la selección resulta ineficiente. No obstante, en

términos generales, el mejoramiento genético convencional ha sido exitoso en el desarrollo de cultivares de alfalfa con alta resistencia a plagas y enfermedades o con alta expresión multifoliolada. Por el contrario, no fue eficaz para la mejora de determinados caracteres de importancia, como la tolerancia a herbicidas (Kumar, 2011) o la resistencia a enfermedades foliares.

La metodología de transformación genética que posibilita la introducción asexual de genes en plantas permite revertir situaciones en las cuales la variabilidad genética utilizada en los programas de mejoramiento convencionales no resulta suficiente. En este sentido, se la utilizó con éxito para la introducción de genes que confieren tolerancia a herbicidas, mejorando notablemente el control de malezas en distintos cultivos de importancia económica. Tanto es así que el 80 % de los eventos aprobados para su comercialización en Argentina confieren tolerancia para uno o más herbicidas (CONABIA, 2019; Ministerio de Agroindustria, 2019).

## *Transgénesis*

### *La problemática de las malezas en alfalfa*

Debido a la presencia de más de 120 especies de malezas, se generan importantes pérdidas en las pasturas de alfalfa en nuestro país, a punto tal que se estiman pérdidas de hasta 80 % del rendimiento potencial de forraje (AAPRESID, 2017). Además, como suele ocurrir con otros forrajes, las malezas se cosechan junto con la alfalfa, provocando una pérdida significativa del valor nutricional del forraje y, en consecuencia, una disminución de su valor en el mercado (Rubiales, 2014). Sin embargo, comparado con otros cultivos –como soja, trigo, maíz y arroz–, el mercado mundial de alfalfa es limitado y no incentiva mayormente el desarrollo de agroquímicos específicos, utilizándose por ello herbicidas registrados primero para otros cultivos, como la soja. No obstante, durante los últimos años se desarrollaron productos para soja que no son selectivos para alfalfa, lo que restringe sensiblemente la posibilidad de encontrar nuevas alternativas de control químico. Por lo expuesto, se desprende que en la actualidad el manejo de lotes de alfalfa con herbicidas es complejo, lo que resalta la necesidad de contar con profe-

sionales formados y con experiencia para alcanzar adecuados niveles de control. En este contexto, la falta de herbicidas selectivos, sumado a la ausencia de cultivares tolerantes y al mal manejo de los lotes, intensifica la aparición de malezas resistentes, lo que torna aún más complejo el panorama futuro del manejo de las malezas en el cultivo.

### *Plataforma para el desarrollo de alfalfas tolerantes a herbicidas*

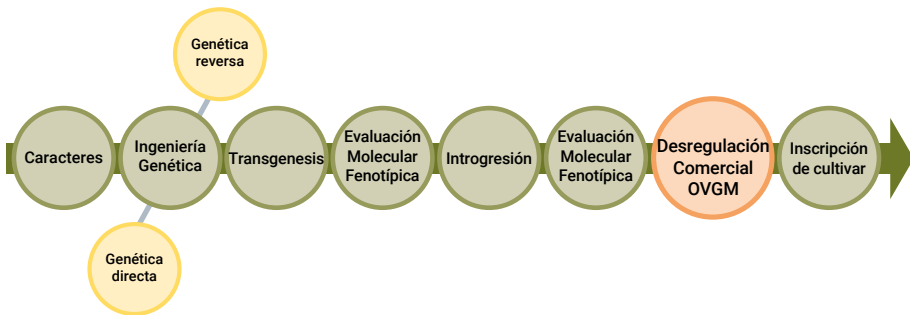
En los Estados Unidos, la empresa Forage Genetics International (FGI), en asociación con Monsanto, liberó en 2005 cultivares transgénicos de alfalfa tolerantes a glifosato de amonio, conocidos como “alfalfas RR” (Roundup Ready®). Posteriormente, la misma empresa liberó cultivares de alfalfa con dos eventos apilados: RR + bajo tenor de lignina (tecnología denominada HarvXtra®). En 2018, FGI, a través de una acción conjunta con INDEAR, logró desregular en Argentina dos cultivares tolerantes a glifosato y de bajo tenor de lignina (RR+HarvXtra) (Ministerio de Agroindustria, 2018), que son los únicos aprobados para ser comercializados en el país.

Si bien las alfalfas RR facilitan el control de malezas en alfalfa, debe considerarse que no presentan la solución integral al problema. Es ampliamente conocido el hecho de que la aplicación masiva de glifosato a nivel global ha promovido la aparición de un número creciente de malezas resistentes (Heap, 2014). Por lo tanto, la disponibilidad de cultivares de alfalfa tolerantes a glifosato no resuelve completamente el problema de las malezas en el cultivo. Recientemente, se ha generalizado a nivel global el concepto que establece que el éxito de un herbicida en particular es solo temporal, haciendo así cada vez mayor la necesidad de desarrollar estrategias alternativas de control para lograr un manejo sustentable de las malezas.

En Argentina, a través de un esfuerzo conjunto que involucró tanto al sector público (INTA y CONICET) como al privado, se estandarizaron protocolos para conformar sintéticas experimentales de alfalfa transgénica desarrolladas completamente en nuestro país. La primera de estas poblaciones posee tolerancia al herbicida glufosinato de amonio (Jozefkowicz *et al.*, 2018; Jozefkowicz *et al.*, 2016) y se encuentra actualmente en proceso de desregulación comercial. Para ello se ha

desarrollado una plataforma de ingeniería genética que maximiza la expresión y la contención del transgen y acelera el proceso de introgresión del evento transgénico en germoplasma elite.

La plataforma comienza con la selección del carácter de interés (Figura 4). En una primera instancia, y teniendo en cuenta las pérdidas significativas que ocasionan las malezas, se eligió para la estandarización del proceso desarrollar la tolerancia a herbicidas a través del gen *bar*, que además de conferir tolerancia al herbicida glufosinato de amonio se puede utilizar como marcador de selección, evitando así el uso de resistencia a antibióticos (Jozefkowicz *et al.*, 2016). El uso del herbicida también facilita la evaluación (*screening*) en cada paso de la plataforma (Jozefkowicz *et al.*, 2018).

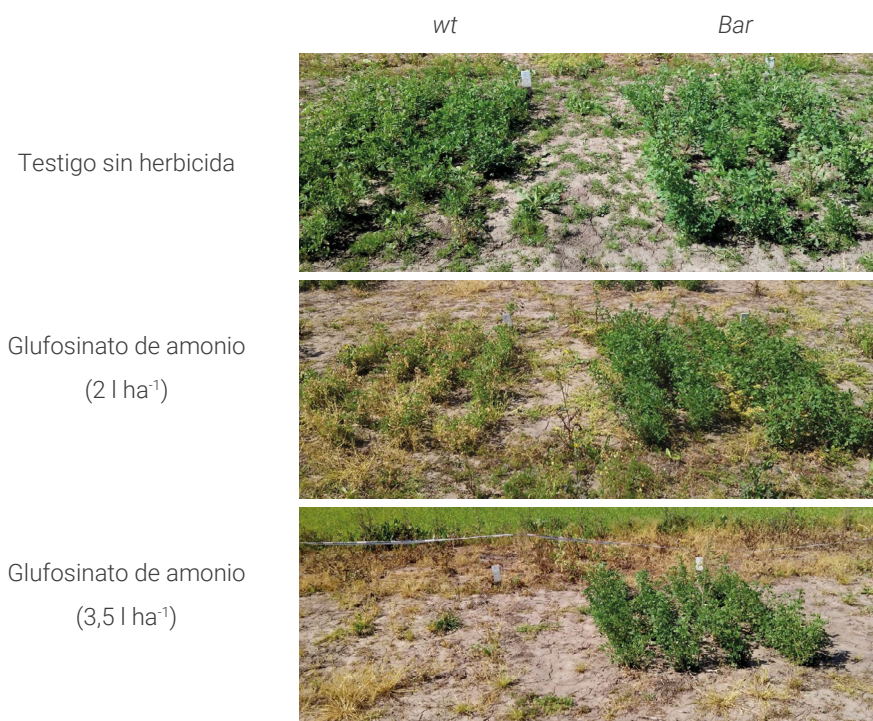


■ **Figura 4.** Esquema de la plataforma para el desarrollo de sintéticas experimentales de alfalfa transgénica estandarizada entre INTA y CONICET.

El protocolo de transformación genética de alfalfa vía *Agrobacterium tumefaciens* se lleva a cabo rutinariamente en el actual Laboratorio de Ingeniería Genética de Leguminosas del IGAEF-INTA desde hace 25 años. En ese tiempo se han optimizado diferentes agentes selectivos: kanamicina, higromicina y glufosinato de amonio. En todos los casos, la eficiencia de transformación es muy alta, próxima al 95 %, observándose escapes en forma muy infrecuente. Para la transformación genética se utiliza el clon de regeneración RegelNTA, con alta capacidad para la regeneración *in vitro*, que en alfalfa se produce habitualmente por embriogénesis somática (Saunders y Bingham, 1972). Los materiales, los medios de cultivo, las condiciones de trabajo y el procedimiento en general se describen detalladamente en García *et al.* (2014) y Jozefkowicz *et al.* (2016).



El siguiente paso en la plataforma es la identificación de los eventos con mejor performance fenotípica, lo que se realiza a través de desafíos con glufosinato de amonio. Para ello, se incuban tallos de cada evento transgénico en concentraciones crecientes de glufosinato de amonio en agua, en condiciones controladas de luz (16 h) y temperatura (25 °C). Los eventos seleccionados por mayor tolerancia son seguidamente desafiados en ensayos de aspersión con variadas dosis del herbicida, en diferentes momentos del desarrollo y en distintos tejidos. Los eventos seleccionados se distinguen fácilmente de los convencionales no transformados (genotipos “salvajes” o *wild types*) por su tolerancia al glufosinato de amonio en todos los estadios y tejidos de la planta y en dosis aun mayores a las recomendadas para el control de malezas a campo (Figura 5).



■ **Figura 5.** Desafíos a campo de sintéticas experimentales de alfalfa transgénica con tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Referencias: *wt* (*wild type*): cultivar comercial convencional; *Bar*: sintética transgénica. En todos los casos se aplicó como coadyuvante  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (1 %). Adaptado de Jozefkowicz *et al.* (2018).



El proceso de introgresión consiste en el cruzamiento del evento transgénico con variedades seleccionadas durante cinco ciclos de retrocruzas sucesivas. Dichas retrocruzas buscan reemplazar el bagaje (*background*) genético del clon de alta regeneración (RegelNTA), que no posee aptitudes agronómicas adecuadas. Estos ciclos se llevan a cabo mediante polinización manual en cámaras de cría. Las plantas que se utilizan son plantas jóvenes, crecidas en macetas de 800 ml bajo luz continua a 25 °C para acelerar la floración y lograr, de esta forma, realizar entre tres y cuatro retrocruzas en el término de un año. En cada una de las generaciones se seleccionan los eventos transgénicos por medio de ensayos de aspersión con glufosinato de amonio, que se confirman posteriormente mediante PCR. Para mantener la variabilidad genética y prevenir problemas de endocría se utilizan en cada retrocruza poblaciones de alrededor de cien individuos por variedad. Todo el procedimiento se encuentra detallado en Jozefkowicz *et al.* (2016). Finalmente, y siguiendo la normativa vigente en nuestro país, el material transgénico es evaluado en ensayos a campo a fin de confirmar la tolerancia al glufosinato de amonio y evaluar sus aptitudes agronómicas. En ambos casos, el material generado es contrastado con cultivares comerciales de alto rendimiento (Figura 5). La información obtenida en estos ensayos se puede integrar a la documentación requerida para la desregulación comercial del evento.

### *Desregulación de OVGМ en Argentina*

Argentina se encuentra entre los países pioneros en la adopción de cultivos transgénicos; es el primer país de Latinoamérica que estableció normativas para la regulación y el segundo en el mundo que aprobó un cultivo genéticamente modificado. En el país, todas las actividades con organismos vegetales genéticamente modificados (OVGM) para uso agropecuario están reguladas desde el año 1991. Hasta 2019 se había autorizado la comercialización de 71 eventos transgénicos (Ministerio de Agroindustria, 2019). La soja fue el primer OVGМ aprobado para uso comercial en 1996, en el mismo año que se aprobó en EE. UU. La evaluación de un OVGМ desde su desarrollo hasta su comercialización tiene un costo elevado, conlleva varios años y debe pasar por tres instancias de evaluación, a saber:

I- Análisis de seguridad para el agroecosistema, evaluación que está a cargo de la Dirección de Biotecnología y la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA).

II- Evaluación de inocuidad alimentaria para consumo humano y animal, a cargo del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y del Comité Técnico Asesor en el Uso de OGM (CTAUOGM).

III- Análisis de impacto productivo y comercial de su liberación a gran escala, evaluación que realiza la Dirección de Mercados Agrícolas del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

Cada una de estas etapas es totalmente independiente y cada entidad emite un dictamen no vinculante, que dirige al Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, quien a su vez otorgará o no los permisos para el desarrollo y comercialización de OGM en la Argentina. Como se mencionó previamente, la evaluación respecto del comportamiento agronómico del OVGM la realiza la Dirección de Biotecnología y la CONABIA. El análisis de las solicitudes presentadas se realiza caso a caso, basándose en criterios científicos y técnicos establecidos en el marco regulatorio (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2011; Ministerio de Agroindustria, 2019). Este trabajo está a cargo de especialistas, tanto del sector público como privado, que analizan las solicitudes en profundidad. El objetivo de esta evaluación es asegurar que, bajo las mismas condiciones, el comportamiento agronómico del OVGM sea similar al del organismo no genéticamente modificado (homólogo convencional). Además de las características del OVGM en cuestión, también se analiza el objetivo de la actividad para desarrollar, el cómo, dónde y cuándo se desarrollará dicha actividad y la idoneidad del solicitante.

Los solicitantes, para poder realizar ensayos o multiplicaciones con OVGM, deben estar inscriptos previamente en el Registro Nacional de Operadores con Organismos Vegetales Genéticamente Modificados (RNOOVGM). El INTA está inscripto en dicho registro desde el año 2004 (Registro Nacional de Operadores con OVGM, 2004). En una primera etapa, el solicitante debe presentar información detallada del OVGM, describiendo el modo de obtención, las construcciones utilizadas y el material genético introducido en el producto final. También se deben detallar tanto el lugar donde se realizarán los ensayos como las medi-

das de contención y de aislamiento, además de un plan de acción ante eventuales escapes, a fin garantizar el aislamiento del OGM regulado (Ministerio de Agroindustria, 2019). Luego, en una segunda etapa, se realiza un análisis de riesgo que estima la bioseguridad para el agroecosistema. El objetivo de esta etapa es determinar y evaluar los posibles efectos adversos de la liberación de los OVGM, incluyendo el impacto sobre la conservación y la utilización sostenible de la biodiversidad y los riesgos para la salud humana por exposición no alimentaria. En esta etapa se detallan el comportamiento agrofenotípico del OVGM, en comparación con su homólogo convencional y los métodos actualizados de detección del OVGM (Ministerio de Agroindustria, 2019).

Además, se debe demostrar la inocuidad alimentaria del OVGM para consumo humano y animal, cuya evaluación –como ya se mencionó– está a cargo de SENASA (2002). En esta etapa se dimensionan los riesgos potenciales que podrían derivar del consumo como alimento tanto del OVGM como de sus subproductos. Se determina la presencia de tóxicos y de alérgenos, así como la ocurrencia de posibles modificaciones nutricionales que se pudieron haber generado por la transformación genética.

Por último, la tercera etapa es realizada por la Dirección de Mercados Agrícolas que determina la conveniencia de la comercialización del OGM de manera de evitar potenciales impactos negativos en las exportaciones argentinas. Para ello el solicitante deberá hacer un extenso estudio de mercado con la información requerida por la mencionada dirección (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2011).

Como resultado de estas tres etapas se emiten informes técnicos que se elevan al MAGyP, organismo que toma la decisión final sobre autorizar o no la siembra, el consumo (humano y animal) y la comercialización del cultivo OVGM analizado.

En cuanto a los productos obtenidos por otras herramientas biotecnológicas diferentes de la transgénesis, entre las cuales se incluye la edición génica, se estableció que se evaluarán caso a caso en una instancia de consulta previa (ICP) (Ministerio de Agroindustria, 2019) para establecer si el producto en cuestión es alcanzado o no por la Resolución 763/11. En esta instancia, la CONABIA evaluará si se ha generado

o no una nueva combinación de material genético. Para ello, analizará si se ha producido una inserción en el genoma de una construcción genética definida. Si se determina que no se ha producido una nueva combinación, entonces el producto no será alcanzado por la Resolución 763/11. Por consiguiente, no será necesario transitar la desregulación comercial antes mencionada y el producto seguirá las mismas vías que los productos obtenidos por métodos tradicionales.

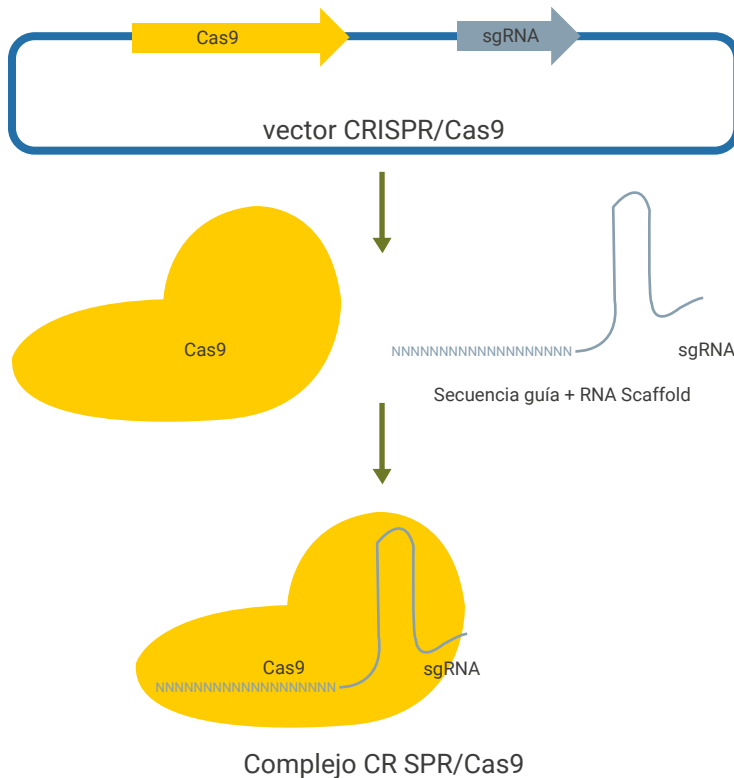
### *Edición génica*

La edición génica es otra herramienta que representa una verdadera revolución tecnológica y que se ha consolidado como una poderosa tecnología de vanguardia para modificar genomas de manera rápida, eficiente y precisa. La técnica utiliza el sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), que forma parte del aparato inmune natural de algunas bacterias y archeas frente a las invasiones de virus. El genoma bacteriano acumula secuencias de los virus a los que se ha enfrentado, que son luego utilizadas como guías de una endonucleasa asociada Cas (*CRISPR associated protein*) que, frente a un nuevo ataque, cortará la cadena de ADN invasora y otorgará así inmunidad (Bolotin *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005). Tanto la capacidad de reconocimiento y corte como la simpleza y los pocos requerimientos que posee esta maquinaria hicieron evidente el potencial de CRISPR como un nuevo sistema de edición genética programable para cualquier organismo.

CRISPR/Cas9 es un sistema de edición de *Streptococcus pyogenes* que se ha adaptado particularmente para múltiples organismos. Se trata un complejo ribonucleoproteico que consta de la endonucleasa Cas9 y de una molécula de ARN *single guide* (ARNsg), que guiará a la enzima a la secuencia blanco (*target*) para generar un corte doble hebra o simple hebra (Jinek *et al.*, 2012; Charpentier y Doudna, 2013; Doudna y Charpentier, 2014) (Figura 6).

Para aplicar esta maquinaria en cualquier organismo se diseña primero el ARNsg que contiene una secuencia guía de 20 nt del gen *target* y una secuencia de andamiaje o *scaffold*. Seguidamente, para efectuar el corte, Cas9 requiere la identificación de un pequeño motivo conocido

como secuencia PAM (NGG), que debe estar río arriba del sitio de hibridación de la guía en la secuencia *target* (Anders *et al.*, 2014; Doudna y Charpentier, 2014). La selección de guías para CRISPR/Cas9 debe tener en cuenta la existencia de este motivo PAM como condición necesaria para que el sistema pueda ser dirigido hacia la región buscada.



■ **Figura 6.** Representación del sistema de dos componentes de edición génica vía CRISPR/Cas9.

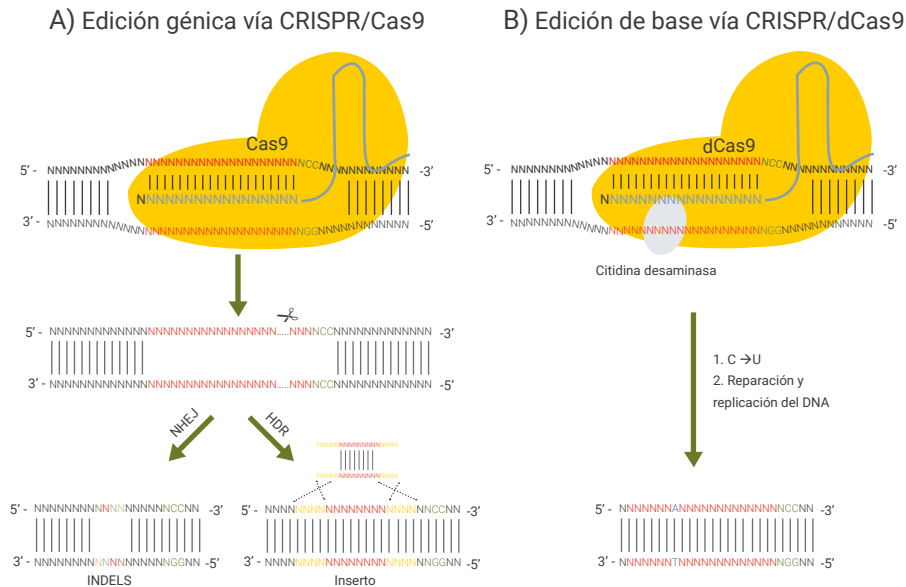
Una vez que Cas9 realiza el corte DBS (*Double-Strand Break*), se dispara el mecanismo de reparación del ADN. Por un lado, la unión de extremos no homólogos, denominados NHEJ por sus siglas en inglés (*Non Homologous End-Joining*), es la forma de reparación más usual y está acompañada de la generación de micro deleciones/inserciones en el sitio de reparación (Figura 7a). Por otro lado, en presencia de un ADN templado con homología a la región flanqueante del corte, la reparación puede darse por recombinación homóloga directa o HDR (*Homology*

*Directed Repair*), lo que evita la generación de errores. Sin embargo, la HDR tiene una eficiencia extremadamente baja (Richardson *et al.*, 2016). Si bien el sistema CRISPR/Cas9 asociado a HDR puede utilizarse para realizar reemplazos alélicos, el mecanismo NHEJ resulta ser más eficaz y es el que se utiliza principalmente para lograr la eliminación de la expresión de un gen (*knock-out*) o de fragmentos cromosómicos. Típicamente, para realizar el *knock-out* de un gen se utilizan vectores que contienen la enzima Cas9 y las guías que hibridan con el gen *target* y conducen a la endonucleasa al sitio donde realizará el corte. Para eliminar la expresión de un gen, se diseñan al menos dos guías de forma tal de generar dos cortes y eliminar el fragmento de ADN entre ellos. Para aumentar la eficiencia del *knock-out*, las guías se diseñan generalmente en el primer o segundo exón del gen *target*. Obviamente, un número mayor de guías hará que el proceso sea más eficaz. Finalmente, y haciendo uso de distintos paquetes informáticos (*software*) disponibles, debe asegurarse que cada guía cuente con la mayor probabilidad de generar los cambios buscados, lo que le otorga un alto *score* (es decir, un lugar destacado en el ranking de guías). Complementariamente, también se busca que esas guías, para ser elegidas, produzcan el menor número de *targets* no deseados (*off-targets*) posibles. Mediante este método pueden eliminarse varios genes en simultáneo, ya sea por el agregado de guías específicas o por el diseño de guías para zonas conservadas entre varios genes (característico de las familias génicas).

La técnica CRISPR/Cas9 puede utilizarse además para realizar la generación de cambios puntuales en la secuencia de ADN, es decir, de una única base o nucleótido, lo que se denomina edición de base (*base editing*) (Figura 7b). Para realizar la edición de base se utilizan vectores que poseen una endonucleasa que reconoce a los genes *target* –pero que es enzimáticamente inactiva– fusionada a una enzima que produce un cambio de base conocido. Por ejemplo, la enzima citidina deaminasa, que produce la desaminación de las citosinas que se encuentran río arriba de la secuencia PAM del gen *target*, es utilizada en este sistema para mutar la citosina a uracilo.

El sistema CRISPR/Cas9 se ha aplicado de manera eficiente en plantas desde 2013 para la edición o eliminación de un gen de manera simple, específica y estable (Feng *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Nekrasov *et al.*,

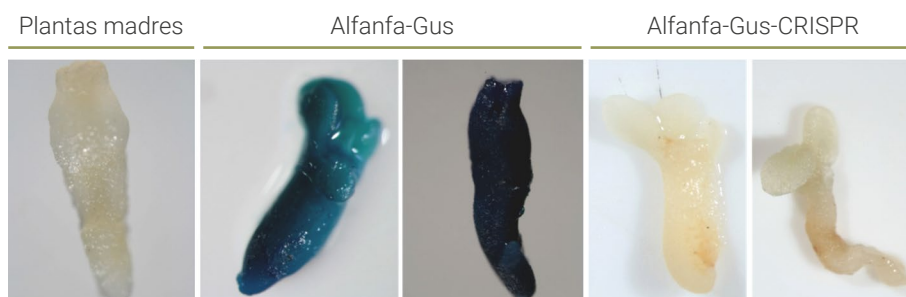
2013; Shan *et al.*, 2013; Xie y Yang, 2013). Además, cuenta con la bondad trascendental de generar cambios en el genoma sin dejar trazas de material génico exógeno. En las plantas, la adquisición del ARNsg que contiene las guías y la Cas9 puede realizarse a través del bombardeo de vectores por biobalística o a través de *Agrobacterium tumefaciens* y la utilización de vectores binarios. No obstante, la estrategia utilizada depende de los objetivos y de las posibilidades considerando la especie en estudio.



■ **Figura 7.** Representación esquemática de los usos más frecuentes del sistema CRISPR/Cas9 en plantas. A) Técnica de unión de extremos no homólogos. B) Técnica de edición de base.

La edición génica emerge como una herramienta sumamente útil para el mejoramiento de cultivos de interés agroeconómico, ya que permite la modificación dirigida de genes de interés y la obtención de productos libres de transgenes. Es por ello que el Instituto de Genética IGEAF-INTA ha comenzado a implementar esta tecnología de edición para el mejoramiento de la alfalfa. Para el primer abordaje de la técnica se utilizó un vector binario (cedido por Gabriela Massa de INTA Balcarce) que cuenta con las guías y la maquinaria para generar el *knock-out* del gen reportero GUS y que se aplicó en plantas transgénicas que sobreexpresaban

dicho gen y que habían sido generadas previamente en el laboratorio. Las plantas obtenidas tras la transformación con este vector demostraron una reducción total o parcial de la actividad glucuronidasa, evidenciando una reversión del fenotipo con respecto a los individuos sobreexpresantes. Este primer abordaje demostró la efectividad de la maquinaria de edición CRISPR/Cas9 para eliminar la expresión de un gen de manera dirigida en alfalfa (Figura 8).



■ **Figura 8.** Estandarización de la tecnología CRISPR/Cas9 en alfalfa utilizando el gen reportero GUS.

En el marco de una estadía en el laboratorio del Dr. E. Blumwald en UC Davis, EE. UU., que estandarizó el sistema CRISPR/Cas9 para especies modelo, se construyeron vectores específicos para genes de interés en alfalfa que pueden utilizarse en los dos abordajes mencionados previamente: silenciamiento o *knock-out* y edición de base (*base editing*). Los genes seleccionados en alfalfa se relacionan con la tolerancia a herbicidas y a estrés abiótico, el aumento de la biomasa y la calidad, la adaptabilidad y la nodulación (fijación biológica del N<sub>2</sub>). Estos trabajos apuntan no solo a alcanzar un mayor entendimiento sobre la fisiología de la alfalfa, sino también a generar cultivares de mayor productividad y calidad, mejor comportamiento en áreas marginales y tolerancia a herbicidas.

## Consideraciones finales

A lo largo de este capítulo se describió el desarrollo de las diferentes técnicas moleculares que permitieron generar un conocimiento más amplio sobre la genética de la alfalfa y su aplicación al mejoramiento del cultivo. El desarrollo en el área de la genómica permitió obtener a



relativamente bajo costo una gran cantidad de datos para identificar con mayor probabilidad estadística marcadores SNPs asociados a caracteres de interés agronómico. En igual sentido, la implementación de la selección asistida por marcadores para incrementar la frecuencia de genes de efecto mayor debería complementarse con estrategias como la selección genómica, que permite seleccionar individuos a partir de la estimación estadística de su valor de mejora. En este contexto, la resolución de los problemas que enfrenta el cultivo implicaría la adopción de estas estrategias para un mejor uso de la variabilidad existente, de manera de obtener en menor tiempo nuevas variedades con mejor desempeño.

La transgénesis y la edición génica permiten generar una variabilidad genética extra que posibilita la obtención de variedades de alfalfa tolerantes a herbicidas. A su vez, estas técnicas también aparecen como muy promisorias para la mejora de otros caracteres de interés agronómico.

Tal vez el mayor desafío en el futuro inmediato sea la incorporación paulatina y eficiente de estas nuevas estrategias y metodologías a fin de actualizar los programas de mejoramiento de alfalfa para el desarrollo de cultivares comerciales.

## BIBLIOGRAFÍA

- AAPRESID. 2017. *Manejo de malezas en pasturas*. (Disponible en <http://www.aapresid.org.ar/blog/manejo-de-malezas-en-pasturas/> consultado: 18/12/2019).
- ADHIKARI, L.; A.M. MISSAOUI. 2019. *Quantitative trait loci mapping of leaf rust resistance in tetraploid alfalfa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 106: 238-245.
- ADHIKARI, L.; S.O. MAKAJU; A.M. MISSAOUI. 2019. *QTL mapping of flowering time and biomass yield in tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.)*. *BMC Plant Biology* 19: 359. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1946-0>
- ADHIKARI, L.; O.M. LINDSTROM; J. MARKHAM; A.M. MISSAOUI. 2018. *Dissecting key adaptation traits in the polyploid perennial Medicago sativa using GBS-SNP mapping*. *Frontiers in Plant Science* 9 (July): 1-19. <https://10.3389/fpls.2018.00934>
- ALARCÓN-ZÚÑIGA, B.; P. SCOTT; K.J. MOORE; D. LUTH; E.C. BRUMMER. 2004. *Quantitative Trait Locus Mapping of Winter Hardiness Metabolites in Autotetraploid Alfalfa (M. sativa)*. En: HOPKINS, A.; Z.Y. WANG; R. MIAN; M. SLEDGE; R.E. BARKER (Eds.). *Molecular Breeding of Forage and Turf*. Kluwer Academic Publishers, Oklahoma (EUA). 97-104 pp.
- ANDERS, C.; O. NIEWOEHNER; A. DUERST; M. JINEK. 2014. *Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease*. *Nature* 513: 569-573.
- ANNICCHIARICO, P.; Y. WEI; E.C. BRUMMER. 2017. *Genetic structure of putative heterotic populations of alfalfa*. *Plant Breeding* 136(5): 671-678. <https://doi.org/10.1111/pbr.12511>
- ANNICCHIARICO, P.; N. NAZZICARI; A. ANANTA; M. CARELLI; Y. WEI; E. C. BRUMMER. 2016. *Assessment of Cultivar Distinctness in Alfalfa: A Comparison of Genotyping-by-Sequencing, Simple-Sequence Repeat Marker, and Morphophysiological Observations*. *The Plant Genome* 9 (2): 12. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.10.0105>
- ANNICCHIARICO, P.; N. NAZZICARI; X. LI; Y. WEI; L. PECETTI; E.C. BRUMMER. 2015. *Accuracy of Genomic Selection for alfalfa biomass yield in different reference populations*. *BMC Genomics* 16(1): 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2212-y>
- ANNICCHIARICO, P.; C. SCOTTI; M. CARELLI; L. PECETTI. 2010. *Questions and avenues for lucerne improvement*. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 46 (1): 1-13.
- ARMOUR, D.; K.S. AITKEN; E. AITKEN; C. LAMBRIDES; M. DIETERS; J. IRWIN. 2006. *Identification of the genomic location of QTL for Phytophthora medicaginis resistance in alfalfa*. *Proceedings of the XIV Annual International Plant and Animal Genome Conference*. January 14-18, San Diego, California (EUA).
- BABB, M.G.M. 2014. *DNA marker assisted selection to improve drought tolerance in alfalfa (Medicago sativa L.)*. *PhD Thesis, New Mexico State University, Las Cruces, NM, EUA*. (Disponible: <http://espace.wheaton.edu/lr/a-sc/archives/theses/201307-PsyD-PSYC-FikkertLindsay.pdf> consultado: 20/09/2019).
- BAGAVATHIANNAN, M.V.; B. JULIER; P. BARRE; R.H. GULDEN; R.C. VAN ACKER. 2010. *Genetic diversity of feral alfalfa (Medicago sativa L.) populations occurring in Ma-*

*nitoba, Canada and comparison with alfalfa cultivars: An analysis using SSR markers and phenotypic traits. Euphytica* 173 (3): 419-432. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0156-5>

BAIRD, N.A.; P.D. ETTER; T.S. ATWOOD; M.C. CURREY; A.L. SHIVER; Z.A. LEWIS; E.U. SELKER; W.A. CRESKO; E.A. JOHNSON. 2008. *Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. Plos One*, 3, e3376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>

BALLOUZ, S.; A. DOBIN; J.A. GILLIS. 2019. *Is it time to change the reference genome? Genome Biology* 20:159. DOI: 10.1186/s13059-019-1774-4

BARCACCIA, G.; E. ALBERTINI; D. ROSELLINI; S. TAVOLETTI; F. VERONESI. 2000. *Inheritance and mapping of 2n-egg production in diploid alfalfa. Genome* 43: 528-537. <https://doi.org/10.1139/gen-43-3-528>

BARCACCIA, G.; E. ALBERTINI; S. TAVOLETTI; M. FALCINELLI; F. VERONESI. 1999. *AFLP fingerprinting in Medicago spp.: Its development and application in linkage mapping. Plant Breeding* 118: 335-340. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.1999.00376.x>

BARGHI, M.; H. MONIRIFAR; A.R. HAGHIGHI; A. GHANBARI; S.A. MOHAMMADI; B. SIASAR. 2016. *Assessment of genetic variation in alfalfa populations using RAPD markers. Analele Universității Din Oradea, Fascicula Biologie XXIII (2): 78-83.*

BARKER, D.G.; S. BIANCHI; F. BLONDON; Y. DATTEÉ; G. DUC; S. ESSAD; P. FLAMENT; P. GALLUSCI; G. GÉNIER; P. GUY; X. MUEL; J. TOURNEUR; J. DÉNARIÉ; T. HUGUET. 1990. *Medicago truncatula, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. Plant Molecular Biology Reporter* 8: 40-49. DOI: 10.1007/BF02668879

BASBAG, M.; A. AYDIN; M. SAKIROGLU. 2017. *Evaluating Agronomic Performance and Investigating Molecular Structure of Drought and Heat Tolerant Wild Alfalfa (Medicago sativa L.) Collection from the Southeastern Turkey. Biochemical Genetics* 55(1): 63-76. <https://doi.org/10.1007/s10528-016-9772-7>

BASIGALUP, D.H.; D.K. BARNES; R.E. STUCKER. 1995. *Development of a Core Collection for Perennial Medicago Plant Introductions. Crop Science* 35 (4): 1163-1168.

BECKMANN, J.S.; M. SOLLER. 1983. *Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theoretical and Applied Genetics* 67 (1): 35-43. <https://doi.org/10.1007/BF00303919>

BHANDARI, H.S.; A.H. AL LAWATI; I.M. RAY. 2011. *Amplified fragment length polymorphism marker diversity among high yielding perennial alfalfa (Medicago sativa L.) core collection accessions. Crop Science* 51 (3): 1110-1121. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.08.0492>

BIAZZI, E.; N. NAZZICARI; L. PECETTI; E.C. BRUMMER; A. PALMONARI; A. TAVA; P. ANNICCHIARICO. 2017. *Genome Wide Association Mapping and Genomic Selection for alfalfa (Medicago sativa) forage quality traits. Plos One*, 12 (1), e0169234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169234>

- BINGHAM, E.; T. MCCOY. 1979. *Cultivated alfalfa at the diploid level: origin, reproductive stability, and yield of seed and forage*. *Crop Science* 19: 97-100. DOI: 10.2135/cropsci1979.0011183X001900010024x
- BLONDON, F.; D. MARIE; S. BROWN; A. KONDOROSI. 1994. *Genome size and base composition in Medicago sativa and M. truncatula species*. *Genome* 37 (2): 264-270. DOI: 10.1139/g94-037
- BOLOTIN, A.; B. QUINQUIS, B.A. SOROKIN; S.D. EHRLICH. 2005. *Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin*. *Microbiology* 151: 2551-2561.
- BORÉM, A.; E. TEIXEIRA CAIXETA. 2006. *Marcadores moleculares*. Viçosa, MG (BR), 374 p.
- BOTSTEIN, D.; R.L. WHITE; M. SKOLNICK; R.W. DAVIS. 1980. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms*. *American Journal of Human Genetics* 32 (3): 314-331.
- BOUTON, J.H. 2012. *Breeding lucerne for persistence*. *Crop and Pasture Science* 63 (2):95-106. <http://dx.doi.org/10.1071/CP12009>
- BREIMAN, L. 2001. *Random Forests*. *Machine Learning* 45 (1): 5-32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- BRESEGHELLO, F.; M.E. SORRELLS. 2006. *Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (Triticum aestivum L.) cultivars*. *Genetics* 172: 1165-1177.
- BROUWER, D.J.; T.C. OSBORN. 1999. *A molecular marker linkage map of tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Theoretical and Applied Genetics* 99 (7-8): 1194-1200. <https://doi.org/10.1007/s001220051324>
- BROUWER, D.J.; S.H. DUKE; T.C. OSBORN. 2000. *Mapping genetic factors associated with winter hardiness, fall growth, and freezing injury in autotetraploid alfalfa*. *Crop Science* 40 (5): 1387-1396.
- BRUMMER, E.C.; J.H. BOUTON; G. KOCHERT. 1993. *Development of an RFLP map in diploid alfalfa*. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 329-332. <https://doi.org/10.1007/BF01184927>
- BRUMMER, E.C.; G. KOCHERT; J.H. BOUTON. 1991. *RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa*. *Theoretical and Applied Genetics* 83 (1): 89-96. <https://doi.org/10.1007/BF00229230>
- BURR, B.; S.V. EVOLA; F.A. BURR; J.S. BECKMANN. 1983. *Application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding*. En: SETLOW, J.K. y A. HOLLAENDER (Eds.). *Genetic Engineering*. Plenum Press. Nueva York (EUA). 45-59 pp.
- CASLER, M.D.; E.C. BRUMMER. 2008. *Theoretical expected genetic gains for among and-within family selection methods in perennial forage crops*. *Crop Science* 48: 890-902.
- CERVIGNI, G.D.L.; J.P.A. ORTIZ; S.E. FEINGOLD. 2010. *Construcción de mapas de ligamiento genético, localización de genes y regiones cromosómicas asociadas a caracteres*

de interés en plantas. En: LEVITUS, G.; V. ECHENIQUE; C. RUBINSTEIN; E. HOPP; L. MROGINSKI (Eds.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II, Capítulo 6*. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. 86-99 pp.

CHARPENTIER, E.; J.A. DOUDNA. 2013. *Rewriting a genome*. *Nature* 495: 50-51.

COLLARD, B.C.; D.J. MACKILL. 2008. *Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Serie B-Biological Sciences* 363: 557-572.

COLLARD, B.C.Y.; M.Z.Z. JAHUFER; J.B. BROUWER; E.C.K. PANG. 2005. *An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts*. *Euphytica* 142: 169-196. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>

CONABIA. 2019. *Dirección de Biotecnología y la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria*. (Disponible: <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/biotecnologia/conabia/> consultado: 25/11/2019).

CORDER, E.; A. SAUNDERS; W. STRITTMATTER; D. SCHMECHEL; P. GASKELL; G. SMALL; A.D. ROSES; J. HAINES; M.A. PERICAK-VANCE. 1993. *Gene dose of apolipoprotein e type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. *Science* 261 (5123): 921-923.

CROSSA, J.; P. PÉREZ-RODRÍGUEZ; J. CUEVAS; O. MONTESINOS-LÓPEZ; D. JARQUÍN; G. DE LOS CAMPOS; J. BURGUEÑO; J.M. CAMACHO-GONZÁLEZ; S. PÉREZ-ELIZALDE; Y. BEYENE; S. DREISIGACKER; R. SINGH; X. ZHANG; M. GOWDA; M. ROORKIWAL; J. RUTKOSKI; R.K. VARSHNEY. 2017. *Genomic Selection in Plant Breeding: Methods, Models, and Perspectives*. *Trends in Plant Science* 22 (11): 961-975. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.011>

DEON VILELA DE REZENDE, M.; F. FONSECA; E. SILVA; M.F.R. RESENDE JR.; C.F. AZEVEDO. 2014. *Genome-Wide Selection (GWS)*. En: BORÉM A.; R. FRITSCHÉ-NETO (Eds.). *Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. Capítulo 5. Academic Press, Elsevier Inc., California (EUA). 105-133 pp.

DESTA, Z.A.; R. ORTIZ. 2014. *Genomic selection: Genome-wide prediction in plant improvement*. *Trends in Plant Science* 19 (9). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.05.006>

DIWAN, N.; J.H. BOUTON; G. KOCHERT; P.B. CREGAN. 2000. *Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa*. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 165-172.

DOMINGUEZ DEL ANGEL, V.; E. HJERDE; L. STERCK; S. CAPELLA-GUTIERREZ; C. NOTRDAME; O. VINNERE PETERSON; J. AMSELEM; L. BOURI; S. BOCS; C. KLOPP; J.F. GIBRAT; A. VLASOVA; B.L. LESKOSEK; L. SOLER; M. BINZER-PANCHAL; H. LANTZ. 2018. *Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation*. *F1000Res*, 7: ELIXIR-148. DOI:10.12688/f1000research.13598.1

DOUDNA, J.A.; E. CHARPENTIER. 2014. *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. *Science* 346: 1077.

ECHT, C.S.; K.K. KIDWELL; S.J. KNAPP; T.C. OSBORN; T.J. MCCOY. 1994. *Linkage mapping in diploid alfalfa (Medicago sativa)*. *Genome* 37: 61-71. <https://doi.org/10.1139/g94-008>

ELSHIRE, R.J.; J.C. GLAUBITZ; Q. SUN; J.A. POLAND; K. KAWAMOTO; E.S. BUCLER; S.E. MITCHELL. 2011. *A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species*. *Plos One*, 6 (5), e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>

FENG, Z.; B. ZHANG; W. DING; X. LIU; D.L. YANG; P. WEI. 2013. *Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system*. *Cell Res* 23: 1229-1232.

FERREIRA, M.E.; D. GRATAPAGLIA. 1996. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética (2.º Ed.)*. EMBRAPA, Brasília, DF, (Brasil), 220 p.

FLAJOULOT, S.; J. RONFORT; P. BAUDOUIN; P. BARRE; T. HUGUET; C. HUYGHE; B. JULIER. 2005. *Genetic diversity among alfalfa (Medicago sativa) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers*. *Theoretical and Applied Genetics* 111 (7): 1420-1429. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0074-4>

FLINT-GARCÍA, S.A.; J.M. THORNBERRY; E.S. BUCKLER. 2003. *Structure of linkage disequilibrium in plants*. *Annual Review of Plant Biology* 54: 357-374.

GARCÍA, A.N.; N.D. AYUB; A.R. FOX; M.C. GÓMEZ; M.J. DIÉGUEZ; E.M. PAGANO; C.A. BERINI; J.P. MUSCHIETTI; G. SOTO. 2014. *Alfalfa snakin-1 prevents fungal colonization and probably coevolved with rhizobia*. *BMC Plant Biol.* 14: 248. doi: 10.1186/s12870-014-0248-9.

GELDERMANN, H. 1975. *Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods*. *Theoretical and Applied Genetics* 46: 319-330.

GHÉRARDI, M.; B. MANGIN; B. GOFFINET; D. BONNET; T. HUGUET. 1998. *A method to measure genetic distance between allogamous populations of alfalfa (Medicago sativa) using RAPD molecular markers*. *Theoretical and Applied Genetics* 96 (3-4): 406-412. <https://doi.org/10.1007/s001220050756>

GONZAGA PEREIRA, M.; T.N. SANTANA PEREIRA. 2006. *Marcadores moleculares no pré-melhoramento de plantas*. En: BORÉM A.; E. TEIXEIRA CAIXETA, (Eds.). *Marcadores moleculares*. Capítulo 3. Viçosa, MG (Brasil). 85-106 pp.

GRANDÓN, N.G.; Y. ALARCON; M.V. MORENO; V. AROLFO; A. ORODIZZI; D.H. BASIGALUP; J.O. GIECO; C. BRUNO. 2013. *Genetic diversity among alfalfa genotypes (Medicago sativa L.) of non-dormant cultivars using SSR markers and agronomic traits*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Cuyo* 45 (2): 181-195.

GREILHUBER, J.; T. BORSCH; K. MÜLLER; A. WORBERG; S. POREMBSKI; W. BARTHLOTT. 2006. *Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae with chromosomes of bacterial size*. *Plant Biology* 8: 770-777.

GRODZICKER, T.; J. WILLIAMS; P. SHARP; J. SAMBROOK. 1974. *Physical Mapping of Temperature-sensitive Mutations of Adenoviruses*. *Cold. Quant. Biol.* 39: 439-446.

- GUO, S.M.; L.G. KAMPHUIS; L.L. GAO; J.P. KLINGLER; J. LICHTENZVEIG; O. EDWARDS; K.B. SINGH. 2012. *Identification of distinct quantitative trait loci associated with defense against the closely related aphids Acyrtosiphon pisum and A. kondoi in Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* 63 (10): 3913-3922.
- HAN, Y.; D.M. KHU; M.J. MONTEROS. 2012. *High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Molecular Breeding* 29 (2): 489-501.
- HAN, Y.; Y. KANG; I. TORRES-JEREZ; F. CHEUNG; C.D. TOWN; P.X. ZHAO; M.K. UDVARDI; M.J. MONTEROS. 2011. *Genome-wide SNP discovery in tetraploid alfalfa using 454 sequencing and high resolution melting analysis*. *BMC Genomics* 12 (July). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-350>
- HAPMAP PROJECT. 2016. *Medicago truncatula* (Disponibile: [http://www.medicago-hapmap.org/downloads/CADL/CADL\\_v0.95p\\_README.pdf](http://www.medicago-hapmap.org/downloads/CADL/CADL_v0.95p_README.pdf) consultado: 14/02/2020).
- HEAP, L. 2014. *Global perspective of herbicide-resistant weeds*. *Pest Management Sci.* 70 (9):1306-1315.
- HERRMANN, D.; S. FLAJOULOT; P. BARRE; C. HUYGHE; J. RONFORT; B. JULIER. 2017. *Comparison of morphological traits and molecular markers to analyse diversity and structure of alfalfa (Medicago sativa L.) cultivars*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 65 (2) 527-540. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0551-z>
- HERRMANN, D.; S. FLAJOULOT; B. JULIER. 2010. *Sample size for diversity studies in tetraploid alfalfa (Medicago sativa) based on codominantly coded SSR markers*. *Euphytica* 171 (3): 441-446. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-0077-3>
- HIJANO, E.H.; J. PÉREZ FERNÁNDEZ. 1995. *Enfermedades de la alfalfa*. En: HIJANO, E.H.; A. NAVARRO (Eds.). *La Alfalfa en la Argentina*. INTA-Subprograma alfalfa. Agro de Cuyo, Mendoza (AR), Manuales N.º 11, Cap. 1. 13-18 pp.
- İLHAN, D.; X. LI; E.C. BRUMMER; M. SAKIROGLU. 2016. *Genetic diversity and population structure of tetraploid accessions of the Medicago sativa-falcata complex*. *Crop Science* 56 (3): 1146-1156. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.12.0750>
- JIA, C.; F. ZHAO, X. WANG; J. HAN; H. ZHAO; G. LIU; Z. WANG. 2018. *Genomic Prediction for 25 agronomic and quality traits in alfalfa (Medicago sativa)*. *Frontiers in Plant Science* 9: 1220. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01220>
- JINEK, M.; K. CHYLINSKI; I. FONFARA; M. HAUER; J.A. DOUDNA; E. CHARPENTIER. 2012. *A programmable Dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *Science* 337: 816-821.
- JOZEFKOWICZ, C.; R. FRARE; R. FOX; A. ODORIZZI; V. AROLFO; E. PAGANO; D. BASIGALUP; N. AYUB; G. SOTO. 2018. *Maximizing the expression of transgenic traits into elite alfalfa germplasm using a supertransgene configuration in heterozygous conditions*. *Theor. Appl Genet.* 131 (5):1111-1123. doi: 10.1007/s00122-018-3062-1

- JOZEFKOWICZ, C.; E. BOTTERO; C. PASCUAN; E. PAGANO; N. AYUB; G. SOTO. 2016. *Minimizing the time and cost of production of transgenic alfalfa libraries using the highly efficient completely sequenced vector pPZP200BAR*. *Plant Cell Rep.* 35 (9): 1987-1990. doi: 10.1007/s00299-016-2026-7
- JULIER, B.; K. BERNARD; C. GIBELIN; T. HUGUET; F. LELIÈVRE. 2010. *QTL for Water Use Efficiency in Alfalfa*. En: HUYGHE, C. (Ed.). *Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding*. Springer Science+Business Media B.V. 433-436. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-8706-5>
- JULIER, B.; T. HUGUET; F. CHARDON; R. AYADI; J.B. PIERRE; J.M. PRÓSPERI; P.; BARRE; C. HUYGHE. 2007. *Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula**. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 1391-1406.
- JULIER, B.; S. FLAJOULOT; P. BARRE; G. CARDINET; S. SANTONI; T. HUGUET; C. HUYGHE. 2003. *Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers*. *BMC Plant Biology* 3: 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-3-9>
- JUNG, H.G.; C.C. SHEAFFER; D.K. BARNES; J.L. HALGERSON. 1997. *Forage Quality Variation in the U.S. Alfalfa Core Collection*. *Crop Science* 37 (4): 1361-1366.
- KALÓ, P.; G. ENDRE; L. ZIMÁNYI; G. CSANÁDI; G.B. KISS. 2000. *Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*)*. *Theoretical and Applied Genetics* 100 (5): 641-657. <https://doi.org/10.1007/s001220051335>
- KAMPHUIS, L.G.; J. LICHTENZVEIG; K. PENG; S.M. GUO; J.P. KLINGLER; K.H.M. SIDDIQUE; L.L. GAO; K.B. SINGH. 2013. *Characterization and genetic dissection of resistance to spotted alfalfa aphid (*Therioaphis trifolii*) in *Medicago truncatula**. *Journal of Experimental Botany* 64 (16): 5157-5172.
- KAMPHUIS, L.G.; J. LICHTENZVEIG; R.P. OLIVER; S.R. ELLWOOD. 2008. *Two alternative recessive quantitative trait loci influence resistance to spring black stem and leaf spot in *Medicago truncatula**. *BMC Plant Biology* 8 (1): 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-30>
- KHU, D.M.; R. REYNO; Y. HAN; P.X. ZHAO; J.H. BOUTON; E.C. BRUMMER; M.J. MONTEROS. 2013. *Identification of aluminum tolerance quantitative trait loci in tetraploid alfalfa*. *Crop Science* 53 (1): 148-163. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.03.0181>
- KIDWELL, K.K.; E.T. BINGHAM; D.R. WOODFIELD; T.C. OSBORN. 1994. *Relationships among genetic distance, forage yield and heterozygosity in isogenic diploid and tetraploid alfalfa populations*. *Theoretical and Applied Genetics* 89 (2-3): 323-328. <https://doi.org/10.1007/BF00225162>
- KISS, G.B.; G. CSANÁDI; K. KÁLMÁN; P. KALÓ; L. ÖKRÉSZ. 1993. *Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers*. *Molecular and General Genetics* 238: 129-137. <https://doi.org/10.1007/BF00279539>
- KONIECZNY, A.; F.M. AUSUBEL. 1993. *A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers*. *The Plant Journal* 4 (2): 403-410.



KUMAR, M. 2011. *Biotechnological advancements in alfalfa improvement*. *J Appl. Genet.* 2011 52 (2): 111-124.

LA FRAMBOISE, T. 2009. *Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances*. *Nucleic Acids Research* 37 (13): 4181-4193. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp552>

LARSEN, R.C.; C.R. HOLLINGSWORTH; G.J. VANDEMARK; M.A. GRITSENKO; F.A. GRAY. 2002. *A Rapid Method Using PCR-Based SCAR Markers for the Detection and Identification of Phoma sclerotoides: The Cause of Brown Root Rot Disease of Alfalfa*. *Plant Disease* 86 (9): 928-932. <https://doi.org/10.1094/pdis.2002.86.9.928>

LI, F.W.; A. HARKESS. 2018. *A guide to sequence your favorite plant genomes. Applications in Plant Sciences* 6 (3): e1030. DOI:10.1002/aps3.1030

LI, J.F.; J.E. NORVILLE; J. AACH; M. MCCORMACK; D. ZHANG; J. BUSH; G.M. CHURCH; J. SHEEN. 2013. *Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9*. *Nat. Biotechnol.* 31: 688-691.

LI, X.; B. ALARCÓN-ZÚÑIGA; J. KANG; M.H.N. TAHIR; Q. JIANG; Y. WEI; R. REYNO; J.G. ROBINS; E.C. BRUMMER. 2015a. *Mapping fall dormancy and winter injury in tetraploid alfalfa*. *Crop Science* 55 (5): 1995-2011. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.12.0834>

LI, X.; Y. WEI; A. ACHARYA; J.L. HANSEN; J.L. CRAWFORD; D.R. VIANDS; R. MI-CHAUD; A. CLAESSENS; E.C. BRUMMER. 2015b. *Genomic Prediction of biomass yield in two selection cycles of a tetraploid alfalfa breeding population*. *The Plant Genome* 12 (3): 1-10. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.12.0090>

LI, X.; Y. HAN; Y. WEI; A. ACHARYA; A.D. FARMER; J. HO; M.J. MONTEROS; E.C. BRUMMER. 2014a. *Development of an alfalfa SNP array and its use to evaluate patterns of population structure and linkage disequilibrium*. *PLoS ONE*, 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084329>

LI, X.; Y. WEI; A. ACHARYA; Q. JIANG; J. KANG; E.C. BRUMMER. 2014b. *A saturated genetic linkage map of autotetraploid alfalfa (Medicago sativa L.) developed using genotyping-by-sequencing is highly syntenous with the Medicago truncatula genome*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 4 (10): 1971-1979. <https://doi.org/10.1534/g3.114.012245>

LI, X.; E.C. BRUMMER. 2012. *Applied genetics and genomics in alfalfa breeding*. *Agronomy* 2: 40-61. <https://doi.org/10.3390/agronomy2010040>

LI, X.; A. ACHARYA; A.D. FARMER; J.A. CROW; A.K. BHARTI; R.S. KRAMER; Y. WEI; Y. HAN; J. GOU; G.D. MAY; M.J. MONTEROS; E.C. BRUMMER. 2012. *Prevalence of single nucleotide polymorphism among 27 diverse alfalfa genotypes as assessed by transcriptome sequencing*. *BMC Genomics* 13: 568.

LI, X.; Y. WEI; K.J. MOORE; R. MICHAUD; D.R. VIANDS; J.L. HANSEN; A. ACHARYA; E.C. BRUMMER. 2011. *Association Mapping of Biomass Yield and Stem Composition in a Tetraploid Alfalfa Breeding Population*. *The Plant Genome Journal*, 4(1), 24. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2010.09.0022>

- LI, X.; C. BRUMMER. 2009. *Inbreeding Depression for Fertility and Biomass in Advanced Generations of Inter and Intrasubspecific Hybrids of Tetraploid Alfalfa*. *Crop Science* 49. DOI: 10.2135/cropsci2008.04.0205
- LITT, M.; J.A. LUTY. 1989. *A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene*. *American Journal of Human Genetics* 44: 397-401.
- LIU, X.P.; C. HAWKINS; M.D. PEEL; L.X. YU. 2019. *Genetic loci associated with salt tolerance in advanced breeding populations of tetraploid alfalfa using genome-wide association studies*. *Plant Genome* 12 (1). <https://doi.org/10.3835/plantgenome2018.05.0026>
- LIU, X.P.; L.X. YU. 2017. *Genome-wide association mapping of loci associated with plant growth and forage production under salt stress in alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Frontiers in Plant Science* 8 (May): 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00853>
- LU, H.; J. ROMERO-SEVERSON; R. BERNARDO. 2002. *Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize*. *Theoretical and Applied Genetics* 105 (4): 622-628. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0970-9>
- MA, C.X.; G. CASELLA; Z.J. SHEN; T.C. OSBORN; R. WU. 2002. *A unified framework for mapping quantitative trait loci in bivalent tetraploids using single-dose restriction fragments: A case study from alfalfa*. *Genome Research* 12 (12): 1974-1981. <https://doi.org/10.1101/gr.320202>
- MACKIE, J.M.; J.M. MUSIAL; D.J. ARMOUR; H.T.T. PHAN; S.E. ELLWOOD; K.S. AITKEN; J.A.G. IRWIN. 2007. *Identification of QTL for reaction to three races of Colletotrichum trifolii and further analysis of inheritance of resistance in autotetraploid lucerne*. *Theoretical and Appl. Genetics* 114: 1417-1426. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00122-007-0527-z>
- MAKAROVA, K.S.; N.V. GRISHIN; S.A. SHABALINA; Y.I. WOLF; E.V. KOONIN. 2006. *A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action*. *Biology Direct* 1:7 doi:10.1186b /1745-6150-1-7
- MARTÍNEZ, M.C.; M. HELGUERA; A. CARRERA. 2010. *Marcadores Moleculares*. En: LEVITUS, G.; V. ECHENIQUE; C. RUBINSTEIN; E. HOPP; L. MROGINSK (Eds.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Capítulo 5. Ediciones INTA, Buenos Aires (Argentina). 70-85 pp.
- MAUREIRA-BUTLER, I.J.; J.A. UDALL; T.C. OSBORN. 2007. *Analyses of a multi-parent population derived from two diverse alfalfa germplasms: Testcross evaluations and phenotype-DNA associations*. *Theoretical and Applied Genetics* 115 (6): 859-867. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0614-1>
- MENGONI, A.; A. GORI; M. BAZZICALUPO. 2000. *Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, Medicago sativa*. *Plant Breeding* 119 (4): 311-317. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00501.x>

- METZKER, M.L. 2010. *Sequencing technologies – the next generation*. *Nat Rev Genet* 11: 31-46.
- MEUWISSEN, T.H.E.; B.J. HAYES; M.E. GODDARD. 2001. *Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps*. *Genetics* 157: 1819-1829.
- MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2019. *Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. OGM Comerciales*. (Disponible: <https://www.argentina.gob.ar/agricultura/alimentos-y-bioeconomia/ogm-comerciales> consultado: 28/11/2019).
- MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2019. *Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. Resolución 44/2019*. (Disponible: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=324699> consultado: 25/11/2019).
- MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2019. *Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. Resolución 36/2019*. (Disponible: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=324647> consultado: 25/11/2019).
- MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2018. *Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. Resolución 33/2018*. (Disponible: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-33-2018-311332> consultado: 25/11/2019).
- MOJICA, F.J.M.; C. DÍEZ-VILLASEÑOR; J. GARCÍA-MARTÍNEZ; E. SORIA. 2005. *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements*. *J. Mol. Evol.* 60:174-182.
- MOREAU, D.; J. BURSTIN; G. AUBERT; T. HUGUET; C. BEN; J.M. PRÓSPERI; C. SALON; N. MUNIER-JOLAIN. 2012. *Using a physiological framework for improving the detection of quantitative trait loci related to nitrogen nutrition in *Medicago truncatula**. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 755-768.
- MORGANTE, M.; A.M. OLIVIERI. 1993. *PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics*. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* 3 (1): 175-182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.t01-9-00999.x>
- MUN, J.H.; D.J. KIM; H.K. CHOI; J. GISH; F. DEBELLÉ; J. MUDGE; R. DENNY; G. ENDRÉ; O. SAURAT; A.M. DUDEZ; G.B. KISS; B. ROE; N.D. YOUNG; D.R. COOK. 2006. *Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: A resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps*. *Genetics* 172 (4): 2541-2555. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.054791>
- MUNJAL, G.; J. HAO; L.R. TEUBER; E.C. BRUMMER. 2018. *Selection mapping identifies loci underpinning autumn dormancy in alfalfa (*Medicago sativa*)*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 8 (2): 461-468. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300099>
- MUSIAL, J.M.; J.M. MACKIE; D.J. ARMOUR; H.T.T. PHAN; S.E. ELLWOOD; K.S. ALTKEN; J.A.G. IRWIN. 2007. *Identification of QTL for resistance and susceptibility to *Stagonospora meliloti* in autotetraploid lucerne*. *Theoretical and Applied Genetics* 114 (8): 1427-1435. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0528-y>

MUSIAL, J.M.; K.S. AITKEN; J.M. MACKIE; J.A.G. IRWIN. 2005. A genetic linkage map in autotetraploid lucerne adapted to northern Australia, and use of the map to identify DNA markers linked to resistance to *Phytophthora medicaginis*. *Australian Journal of Agricultural Research* 56 (4): 333-344. <https://doi.org/10.1071/AR04317>

NARASIMHAMOORTHY, B.; J.H. BOUTON; K.M. OLSEN; M.K. SLEDGE. 2007. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of aluminum tolerance in diploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics* 114 (5): 901-913. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0488-7>

NEKRASOV, V.; B. STASKAWICZ; D. WEIGEL; J.D. JONES; S. KAMOUN. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* 31: 691-693.

PANIEGO, N.; R. HEINZ; P. FERNÁNDEZ; V. LIA; C. FUSARI. 2010. *Bioinformática aplicada a la biotecnología vegetal*. En: LEVITUS, G.; V. ECHENIQUE; C. RUBINSTEIN; E. HOPP; L. MROGINSK (Eds.). *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. Capítulo 12. Ediciones INTA, Buenos Aires (Argentina). 170-181 pp.

PARAN, I.; R.W. MICHELMORE. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 985-993.

PECRIX, Y.; S.E. STATON; E. SALLET; C. LELANDAIS-BRIÈRE; S. MOREAU; S. CARRÈRE; T. BLEIN; M.F. JARDINAUD; D.L. MOHAMED ZOUINE; M. ZAHM; J. KREPLAK; B. MAYJONADE; C. SATGÉ; M. PEREZ; S. CAUET; W. MARANDE; C. CHANTRY-DARMON; C. LOPEZ-ROQUES; O. BOUCHEZ; A. BÉRARD; F. DEBELLÉ; S. MUÑOS; A. BENDAHMANE; H. BERGÈS; A. NIEBEL; J. BUITINK; F. FRUGIER; M. BENHAMED; M. CRESPI; J. GOUZY; P. GAMAS. 2018. Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. *Nature Plants* 4: 1017-1025. DOI: 10.1038/s41477-018-0286-7

PETERSON, B.K.; J.N. WEBER; E.H. KAY; H.S. FISHER; H.E. HOEKSTRA. 2012. Double Digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *Plos One* 7(5), e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>

PIERRE, J.B.; T. HUGUET; P. BARRE; C. HUYGHE; B. JULIER. 2008. Detection of QTLs for flowering date in three mapping populations of the model legume species *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 609-620.

POLAND, J.A.; T.W. RIFE. 2012. Genotyping by sequencing for plant breeding and genetics. *The Plant Genome* 5 (3): 92-102.

POLAND, J.A.; P.J. BROWN; M.E. SORRELLS; J.L. JANNINK. 2012. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *Plos One*, 7, e32253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032253>

POURCEL, C.; G. SALVIGNOL; G. VERGNAUD. 2005. *CRISPR elements in Yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. Microbiology 151: 653-663.*

RAY, I. 2017. *Genetics for alfalfa drought tolerance. Presentations of the 2017 Western Alfalfa and Forage Symposium. Reno, NV. Univ. of California, Davis.*

RAY, I. 2010. *Developing alfalfa varieties for a water-challenged future. Proceedings, 2010 California Alfalfa and Forage Symposium and Corn/Cereal Silage Mini-Symposium, Visalia, CA. 6 p.*

RAY, I.M.; Y. HAN; L.E.; C.D. MEENACH; N. SANTANTONIO; M.K. SLEDGE; C.A. PIERCE; T.M. STERLING; R.K. KERSEY; H.S. BHANDARI; M.J. MONTEROS. 2015. *Identification of Quantitative Trait Loci for Alfalfa Forage Biomass Productivity during Drought Stress. Crop Science 55 (5): 2012-2033. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.12.0840>*

RAY, I.; G. BABB; C. PIERCE. 2013. *DNA marker assisted breeding to develop alfalfa varieties for a water-challenged future. Proceedings, 2013 Western States Alfalfa and Forage Symposium, Reno (EUA). 6 p.*

REGISTRO NACIONAL DE OPERADORES CON OVGM. 2004. *Resolución 72506/04I. (Disponible: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/inase\\_roovgm\\_3.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/inase_roovgm_3.pdf) consultado: 25/11/2019).*

RICHARDSON, C.; G. RAY; M. DEWITT; G.L. CURIE; J.E. CORN. 2016. *Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. Nat. Biotechnol 34: 339-344.*

ROBINS, J.G.; J.L. HANSEN; D.R. VIANDS; E.C. BRUMMER. 2008. *Genetic mapping of persistence in tetraploid alfalfa. Crop Science 48: 1780-1786.*

ROBINS, J.G.; D. LUTH; I.A. CAMPBELL; G.R. BAUCHAN; C.L. HE; D.R. VIANDS; J.L. HANSEN; E.C. BRUMMER. 2007a. *Genetic mapping of biomass production in tetraploid alfalfa. Crop Science 47: 1-10.*

ROBINS, J.G.; G.R. BAUCHAN; E.C. BRUMMER. 2007b. *Genetic mapping forage yield, plant height, and regrowth at multiple harvests in tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.). Crop Science 47(1): 11-18. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.07.0447>*

RUBIALES, D. 2014. *Alfalfa: back to the future. J. Int. Legume Soc. ISSN: 2340-1559.*

SAKIROGLU, M.; E.C. BRUMMER. 2013. *Presence of phylogeographic structure among wild diploid alfalfa accessions (Medicago sativa L. subsp. microcarpa Urb.) with evidence of the center of origin. Genetic Resources and Crop Evolution 60 (1): 23-31. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9811-0>*

SAKIROGLU, M.; S. SHERMAN-BROYLES; A. STORY; K.J. MOORE; J.J. DOYLE; E.C. BRUMMER. 2012. *Patterns of linkage disequilibrium and association mapping in diploid alfalfa (M. sativa L.). Theoretical and Applied Genetics 125 (3): 577-590. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1854-2>*

- SAKIROGLU, M.; J.J. DOYLE; E.C. BRUMMER. 2010. *Inferring population structure and genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (Medicago sativa L.) accessions using SSR markers. Theoretical and Applied Genetics* 121 (3): 403-415. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1319-4>
- SANTANTONIO, N.; C.A. PIERCE; R.L. STEINER; I.M. RAY. 2019. *Genetic mapping of water use efficiency and carbon and nitrogen metabolism in drought-stressed Alfalfa. Crop Science* 59 (1): 92-106. <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.05.0307>
- SAUNDERS, J.; E. BINGHAM. 1972. *Production of alfalfa plants from callus tissue. Crop Sci.* 12: 804-808.
- SCHERER, A.; G.B. CHRISTENSEN. 2016. *Concepts and relevance of Genome-Wide Association Studies. Science Progress* 99 (1): 59-67. <https://doi.org/10.3184/003685016X14558068452913>
- SCHNABEL, E.; O. KULIKOVA; R.V. PENMETSÁ; T. BISSELING; D.R. COOK; J. FRUGOLI. 2003. *An integrated physical, genetic and cytogenetic map around the sunn locus of Medicago truncatula. Genome* 46 (4): 665-672. <https://doi.org/10.1139/g03-019>
- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESCA. 2011. *Resolución 763/11. (Disponible: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=185806> consultado:25/11/2019).*
- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESCA. 2011. *Resolución 510/2011. (Disponible: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=185853> consultado:25/11/2019).*
- SEGOVIA-LERMA, A.; R.G. CANTRELL; J.M. CONWAY; I.M. RAY. 2003. *AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasms using bulk DNA templates. Genome*, 46(1), 51-58. <https://doi.org/10.1139/g02-100>
- SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASA). 2002. *Resolución 412/2002. (Disponible: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=74376> consultado: 25/11/2019).*
- SHAN, Q; Y. WANG; J. LI; Y. ZHANG; K. CHEN; Z. LIANG; K. ZHANG; J. LIU; J.J. XI; J. QIU; C. GAO. 2013. *Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol.* 31: 686-688.
- SLEDGE, M.K.; I.M. RAY; G. JIANG. 2005. *An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.). Theoretical and Applied Genetics* 111 (5): 980-992. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0038-8>
- TANG, H.; V. KRISHNAKUMAR; S. BIDWELL; B. ROSEN; A. CHAN; S. ZHOU; L. GENTZ-BITTEL; K.L. CHILDS; M. YANDELL; H. GUNDLACH; K.F.X. MAYER; D.C. SCHWARTZ; C.D. TOWN. 2014. *An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume Medicago truncatula. BMC Genomics* 15: 312. DOI:10.1186/1471-2164-15-312
- TAVOLETTI, S.; F. VERONESI; T.C. OSBORN. 1996. *RFLP linkage map of an alfalfa meiotic mutant based on an F1 population. Journal of Heredity* 87 (2): 167-170. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a022978>

TEIXEIRA CAIXETA, E.; L.F. VENTORIM FERRÃO; E. MACIEL-ZAMBOLIM; L. ZAMBOLIM. 2014. *Molecular Markers*. En: BORÉM, A.; R. FRITSCHÉ-NETO (Eds.). *Biotechnology Applied to Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. Capítulo 2. Elsevier, EUA. 19-45 pp.

THORNSBERRY, J.M.; M.M. GOODMAN; J. DOEBLEY; S. KRESOVICH; D. NIELSEN; E.S. BUCKLER. 2001. *Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time*. *Nat Genet* 28 (3): 286-289.

TORREGROSA, C.; M. CAZAUX; D. DANESH; F. CHARDON; S.B. CANNON; M.T. ESQUERRÉ-TUGAYÉ; B. DUMAS; N.D. YOUNG; D.A. SAMAC; T. HUGUET; C. JACQUET. 2008. *Genetic dissection of resistance to anthracnose and powdery mildew in *Medicago truncatula**. *International Soc. for Molecular Plant-Microbe Interaction* 21 (1): 61-69.

TORREGROSA, C.; S. CLUZET; J. FOURNIER; T. HUGUET; P. GAMAS; J.P. PRÓSPERI; M.T. ESQUERRÉ-TUGAYÉ; B. DUMAS; C. JACQUET. 2004. *Cytological, genetic and molecular analysis to characterize compatible and incompatible interactions between *Medicago truncatula* and *Colletotrichum trifolii**. *International Society for Molecular Plant-Microbe Interaction* 17 (8): 909-920.

TOUIL, L.; F. GUESMI; K. FARES; A. FERCHICHI. 2008. *Genetic diversity of some Mediterranean populations of the cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) using ISSR markers*. *Bio Techniques* 7 (4): 808-812.

VARSHNEY, R.K.; A. GRANER; M.E. SORRELLS. 2005. *Genic microsatellite markers in plants: Features and applications*. *Trends in Biotechnology* 23 (1): 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005>

VOS, P.; R. HOGERS; M. BLEEKER; M. REIJANS; T. VANDELEE; M. HORNES; A. FRIJTERS; J. POT; J. PELEMAN; M. KUIPER; M. ZABEAU. 1995. *AFLP: A New Technique for DNA-Fingerprinting*. *Nucleic Acids Research* 23 (21): 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>

WANG, J.; L. KONG; G. GAO; J. LUO. 2013. *A brief introduction to web-based genome browsers*. *Briefings in Bioinformatics* 14 (2): 131-143. DOI: 10.1093/bib/bbs029

WANG, Y.; B. BI; Q.H. YUAN; X.L. LI; J.M. GAO. 2012. *Association of AFLP and SCAR markers with common leafspot resistance in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa*)*. *Genetics and Molecular Research* 11 (1): 606-616.

WELSH, J.; M. MCCLELLAND. 1990. *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. *Nucleic Acids Research* 18 (24): 7213-7218. <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/18/24/7213/2388413>

WILLIAMS, J.G.K.; A.R. KUBELIK; K.J. LIVAK; J.A. RAFALSKI; S.V. TINGEY. 1990. *DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Useful as Genetic Markers*. *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6531-6535.

XAVIER, J.R.; J. KUMAR; R.B. SRIVASTAVA. 2011. *Characterization of genetic structure of alfalfa (*Medicago* sp.) from trans-Himalaya using RAPD and ISSR markers*. *African Journal of Biotechnology*, 10(42), 8176-8187. <https://doi.org/10.5897/ajb10.2083>



XIE, K.; Y. YANG. 2013. *RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system*. *Mol. Plant* 6:1975-1983.

YANG, S.; F. TANG; E. TEIXEIRA CAIXETA; H. ZHU. 2013. *Epigenetic regulation of a powdery mildew resistance gene in Medicago truncatula*. *Molecular Plant* 6 (6): 2000-2003. <https://doi.org/10.1093/mp/sst106>

YANG, S.; M. GAO; S. DESHPANDE; S. LIN; B.A. ROE; H. ZHU. 2007. *Genetic and physical localization of an anthracnose resistance gene in Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 45-52.

YOU, Q.; X. YANG; Z. PENG; L. XU, J. WANG. 2018. *Development and applications of a high throughput genotyping tool for polyploid crops: Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Array*. *Frontiers in Plant Science* 9: 104. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00104>

YOUNG, N.; F. DEBELLÉ; G. OLDROYD; R. GEURTS; S.B. CANNON; M.K. UDVARDI; V.A. BENEDITO; K.F. MAYER; J. GOUZY; H. SCHOOF; Y. VAN DE PEER; S. PROOST; D.R. COOK; B.C. MEYERS; M. SPANNAGL; F. CHEUNG; S. DE MITA; V. KRISHNAKUMAR; H. GUNDLACH; S. ZHOU; J. MUDGE; A.K. BHARTI; J.D. MURRAY; M.A. NAOUMKINA; B. ROSEN; K.A. SILVERSTEIN; H. TANG; S. ROMBAUTS; P.X. ZHAO; P. ZHOU; V. BARBE; P. BARDOU; M. BECHNER; A. BELLEC; A. BERGER; H. BERGÈS; S. BIDWELL; T. BISSELING; N. CHOISNE; A. COULOUX; R. DENNY; S. DESHPANDE; X. DAI; J.J. DOYLE; A.M. DUDEZ; A.D. FARMER; S. FOUTEAU; C. FRANKEN; C. GIBELIN; J. GISH; S. GOLDSTEIN; A.J. GONZÁLEZ; P.J. GREEN; A. HALLAB; M. HARTOG; A. HUA; S.J. HUMPHRAY; D.H. JEONG; Y. JING; A. JÖCKER; S.M. KENTON; D.J. KIM; K. KLEE; H. LAI; C. LANG; S. LIN; S.L. MACMIL; G. MAGDELENAT; L. MATTHEWS; J. MCCORRISON; E.L. MONAGHAN; J.H. MUN; F.Z. NAJAR; C. NICHOLSON; C. NOIROT; M. O'BLENESS; C.R. PAULE; J. POULAIN; F. PRION; B. QIN; C. QU; E.F. RETZEL; C. RIDDLÉ; E. SALLET; S. SAMAIN; N. SAMSON; I. SANDERS; O. SAURAT; C. SCARPELLI; T. SCHIEX; B. SEGURENS; A.J. SEVERIN; D.J. SHERRIER; R. SHI; S. SIMS; S.R. SINGER; S. SINHAROY; L. STERCK; A. VIOLLET; B.B. WANG; K. WANG; M. WANG; X. WANG; J. WARFSMANN; J. WEISSENBACH; D.D. WHITE; J.D. WHITE; G.B. WILEY; P. WINCKER; Y. XING; L. YANG; Z. YAO; F. YING; J. ZHAI; L. ZHOU; A. ZUBER; J. DÉNARIÉ; R.A. DIXON; G.D. MAY; D.C. SCHWARTZ; J. ROGERS; F. QUÉTIÉ; C.D. TOWN; B.A. ROE. 2011. *The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses*. *Nature* 480: 520-524 DOI:10.1038/nature10625

YU, L.X. 2017. *Identification of single-nucleotide polymorphic loci associated with biomass yield under water deficit in alfalfa (Medicago sativa L.) using genome-wide sequencing and association mapping*. *Frontiers in Plant Science*, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01152>

YU, L.X.; P. ZHENG; S. BHAMIDIMARRI; X.P. LIU; D. MAIN. 2017. *The impact of genotyping-by-sequencing pipelines on SNP discovery and identification of markers associated with verticillium wilt resistance in autotetraploid alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Front. Plant Sci.* 8:89. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00089>

YU, L.X.; X. LIU; W. BOGE; X.P. LIU. 2016. *Genome-Wide Association Study Identifies Loci for Salt Tolerance during Germination in Autotetraploid Alfalfa (Medicago sativa*



L.) Using Genotyping-by-Sequencing. *Frontiers in Plant Science* 7. 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00956>

YULE, G.U. 1902. Mendel's laws and their probable relation to intra-racial heredity. *New Phytol.* 1: 193-207.

ZENG, A.; P. CHEN; K. KORTH; F. HANCOCK; A. PEREIRA; K. BRYE; C. WU; A. SHI. 2017. Genome-wide association study (GWAS) of salt tolerance in worldwide soybean germplasm lines. *Molecular Breeding* 37(3): 30. <https://doi.org/10.1007/s11032-017-0634-8>

ZHANG, F.; J. KANG; R. LONG; L.X. YU; Z. WANG; Z. ZHAO; T. ZHANG; Q. YANG. 2019. High-density linkage map construction and mapping QTL for yield and yield components in autotetraploid alfalfa using RAD-seq. *BMC Plant Biology* 19 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1770-6>

ZHANG, T.; L.X. YU; P. ZHENG; Y. LI; M. RIVERA; D. MAIN; S.L. GREENE. 2015. Identification of loci associated with drought resistance traits in heterozygous autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) using genome-wide association studies with genotyping by sequencing. *PLoS ONE* 10 (9): 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138931>

ZIETKIEWICZ, E.; A. RAFALSKI; D. LABUDA. 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20: 176-183.

## CAPÍTULO 8

### Evaluación de cultivares y panorama varietal

Valeria Arolfo y  
Ariel Odorizzi

## Introducción

En Argentina las primeras alfalfas fueron poblaciones introducidas que se adaptaron a los distintos ambientes dando origen a tres ecotipos regionales: pampeano, cordobés e invernizo (saladina). Más tarde, en la década de 1940, y sobre la base de estos ecotipos, se inició el mejoramiento genético en el país con la generación de los primeros cultivares nacionales: Nemagone, San Martín FAV, Fortín Pergamino, Bellocq MAA-CIC y Bordenave INTA. Posteriormente, y a consecuencia de la aparición de los pulgones verde y azul de la alfalfa, se produjo la introducción de variedades resistentes y la intensificación de los programas nacionales de mejoramiento genético. Como resultado de estos trabajos surgieron cultivares obtenidos por el INTA y por algunas compañías privadas. Sin embargo, la disponibilidad de estos materiales en el mercado no siempre fue la adecuada. En ese contexto, y ante la mayor demanda de variedades mejoradas por parte de los productores pecuarios, el mercado nacional experimentó una creciente importación de cultivares extranjeros, especialmente de EE. UU. (Rossanigo *et al.*, 1995).

Los cultivares asequibles durante la década de 1980 eran en su mayoría públicos, de libre utilización por parte de importadores, productores y usuarios. Con el transcurso de los años, el número de cultivares inscritos en el Registro Nacional de Cultivares (RNC) del Instituto Nacional de Semillas (INASE) fue incrementándose fruto de las importaciones y de los programas nacionales de mejoramiento. Esta creciente aparición de nuevas variedades marcó un notable incremento en el número de cultivares protegidos, que comenzaron a comercializarse con carácter de exclusividad o por medio de licencias (Dubois, 2004). Un total de 172 cultivares se inscribieron en la década de 1990, 130 cultivares durante la década de 2000, y desde entonces al presente solo 76 cultivares (Instituto Nacional de Semillas, 2019). Esta disminución fue mayormente marcada dentro del grupo de los cultivares con latencia.

Con tan vasta oferta de cultivares, se hace muy importante conocer la adaptación de cada cultivar a cada zona de cultivo. En ese sentido, el principal objetivo de las redes de evaluación, sean públicas o privadas, es estimar la producción potencial de los materiales evaluados. No obstante, la elección de los cultivares para sembrar por parte del productor

debe tener en cuenta no solo la producción potencial de forraje, sino también el grado de reposo, la persistencia y la resistencia a plagas y enfermedades. Todas estas variables deben considerarse en conjunto, dado que, en muchas ocasiones, la no detección de diferencias en producción potencial de forraje no es sinónimo de similitud entre variedades (Casler y Undersander, 2000). Se recomienda que la elección de los cultivares se base en los datos de evaluación que más se aproximen a la situación en que se quiere implantar el cultivo, ya que la expresión de todas estas características es dependiente de las condiciones ambientales locales.

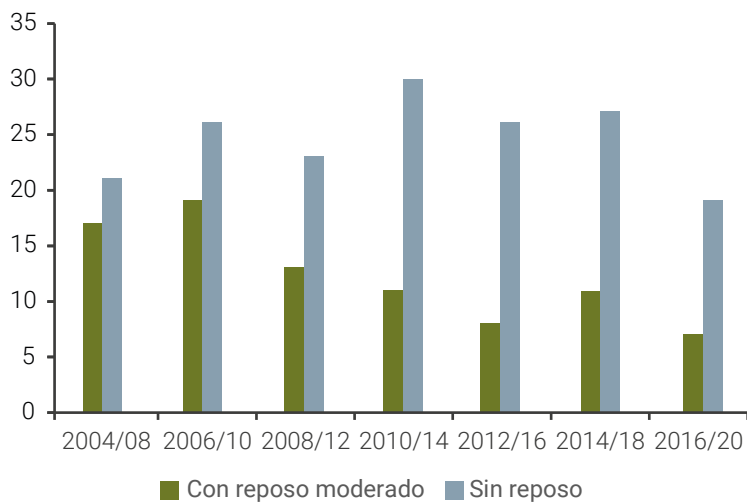
Desde el año 1980, el INTA conduce la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa (RECA INTA). La red, que se coordina desde la Estación Experimental INTA Manfredi (Córdoba), incluye la participación de 15 unidades del INTA repartidas en todo el territorio nacional. Los ensayos se conducen por cuatro temporadas tanto en condiciones de secano (región Pampeana y Chaco) como de regadío (NOA y Patagonia).

Solo en el período 2004-2020, la RECA INTA evaluó 197 variedades (Spada, 2004; 2008; 2012; 2014; Arolfo y Odorizzi, 2016; 2018). La máxima cantidad de materiales probados se registró en el período 2010-2014 (Figura 1) e incluyó principalmente a cultivares de reposo intermedio y sin reposo. Una situación similar se apreció en la red de evaluación de la Cámara de Semilleristas de la Bolsa de Cereales (CSBC), aunque –a diferencia de la red de INTA– esta última evaluó proporcionalmente una mayor cantidad de materiales con reposo invernal intermedio (Cámara de Semilleristas de la Bolsa de Cereales, 2008; 2012; 2014; 2016; 2018).

En este capítulo se presentará la información obtenida en los ensayos de la RECA durante el período 2004-2016. En estos ensayos, conducidos bajo condiciones de corte, se evalúan cultivares comerciales tanto de origen nacional como extranjero. Los ensayos están organizados en series, que se inician cada dos años y que agrupan a los cultivares en dos categorías de acuerdo a su grado de reposo invernal (GRI): con reposo intermedio (GRI 5 a 7) y sin reposo (GRI 8 a 10) (Spada, 2004; 2006; 2008; 2010; 2012; 2014; Arolfo y Odorizzi, 2016; 2018).

Las localidades que forman parte de la red son: 1) región Pampeana: a) zona semiárida: Anguil (La Pampa), Villa Mercedes (San Luis) y Manfredi (Córdoba); b) zona subhúmeda: General Villegas (Buenos Aires),

Casbas (Buenos Aires) y Marcos Juárez (Córdoba); y c) zona húmeda: Rafaela (Santa Fe) y Concepción del Uruguay (Entre Ríos); 2) áreas de riego: Santiago del Estero, Salta, Colonia 25 de Mayo (La Pampa), Trelew (Chubut), Esquel (Chubut) y Viedma (Río Negro); y 3) región extra-pampeana: Las Breñas (Chaco).



**Figura 1.** Evolución del número de cultivares incluidos en la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa de INTA durante el período 2004-2020. Los cultivares están discriminados por grupo de reposo invernal: reposo moderado (GRI 5-7) y sin reposo (GRI 8-10).

## Grados de reposo invernal

La alfalfa posee una característica particular: el reposo invernal, que está controlado genéticamente y que le permite adaptar su desarrollo a las variaciones de temperatura y fotoperíodo. Hacia fines del otoño, el crecimiento de la alfalfa normalmente se reduce hasta llegar a detenerse, en respuesta a la disminución de la temperatura y del fotoperíodo (McKenzie *et al.*, 1988). Esos factores ambientales desencadenan un proceso de aclimatación, que permite la supervivencia de las plantas hasta tanto se reinstalen las condiciones ambientales apropiadas para volver a crecer y desarrollarse. La teoría fisiológica más aceptada indica que durante este período de aclimatación se produce una acumulación de hidratos de carbono y compuestos nitrogenados en la raíz y la corona que posibilitarán el reinicio del crecimiento en primavera. De acuerdo

con Putnam *et al.* (2012), las temperaturas óptimas para la germinación y el crecimiento de las raíces oscilan entre 20 y 24 °C, mientras que para el crecimiento de la parte aérea están entre 22 y 24 °C. Con temperaturas inferiores a 5 °C prácticamente no hay crecimiento.

La clasificación original del reposo invernal en categorías fue propuesta por V. Marble (UC Davis) en California, EE. UU., e incluía solo 6 grados. Hacia mediados de la década de 1980, el propio Marble (1986) amplió dicha categorización a los 11 grados de reposo invernal (GRI) que se conocen actualmente. La definición de estos se basa en la altura de rebrote medido a los 25-30 días del último corte de otoño, de acuerdo a una escala que contempla incrementos de 5 cm entre grados sucesivos y que utiliza variedades testigos debidamente definidas para cada grado (Teuber *et al.*, 1998). En Argentina, el legajo para la inscripción de variedades de alfalfa aprobado por el INASE reconoce también 11 GRI y define los testigos a utilizar para la realización de las determinaciones, conforme se muestra en la Tabla 1.

■ **Tabla 1.** Grupos y grados de reposo invernal (GRI) y cultivares testigos definidos por el INASE(\*) para la clasificación del crecimiento otoñal de las variedades de alfalfa en Argentina.

Grupos de reposo	GRI	Cultivares testigo
Con Reposo	1	Norserman - Spredor 2
	2	Vernal – Alfagraze
	3	Painé INTA – Dekalb 120
	4	WL 320 – Cimarrón
Reposo Intermedio	5	P 205 - Cimarrón VR
	6	Victoria SP INTA – Meteor
	7	P 105 – Dekalb 170
Sin Reposo	8	WL 516 – Dekalb 187
	9	Cuf 101 – 5929
Extremadamente Sin Reposo	10	Hejazi
	11	Ne NAF 3

(\*) INASE = Instituto Nacional de Semillas, Argentina

En otoño, a medida que se acorta el día y disminuye la temperatura, los cultivares con reposo (GRI 1-4) detienen su crecimiento, como un mecanismo de protección contra el frío y las heladas. Contrariamente, aquellos sin reposo están menos subordinados al fotoperíodo y continúan su crecimiento, siempre que la temperatura se mantenga  $\geq 5$  °C (Poole *et al.*, 2003). De acuerdo con Brummer *et al.* (2000), los procesos de aclimatación no se activan en estos cultivares, por lo que las plantas continúan su crecimiento durante el otoño, por lo que –al no acumular suficientes reservas en la raíz y en la corona– se tornan susceptibles a las bajas temperaturas invernales. En igual sentido, Marble (1986) –al describir su clasificación de reposo invernal– considera que las plantas de GRI 1-3 no son afectadas por las heladas, mientras que los cultivares sin reposo son dañados por temperaturas  $\leq -1$  °C; en consecuencia, recomienda la utilización de estos últimos solo en áreas templadas. Por un lado, estudios realizados por Bertrand *et al.* (2017) indican que los cambios en la duración del día durante el período que precede a la exposición a bajas temperaturas podrían afectar el proceso de aclimatación al frío y la tolerancia a las heladas. Los cultivares con reposo intermedio presentan un comportamiento que se ubica obviamente entre ambos extremos.

Por otro lado, Sheaffer *et al.* (1992) consideran que, para las condiciones de Minnesota, en el límite norte de los EE. UU., el GRI se estima mejor sobre la proporción de plantas de una variedad que sobreviven al invierno que sobre cualquier otra característica relacionada con el reposo invernal. Para esos ambientes, en los que las extremadamente bajas temperaturas invernales provocan la muerte de los individuos sin reposo, el GRI se correlaciona muy significativamente con el porcentaje de supervivencia.

Teuber *et al.* (1995) establecieron que los cultivares de diferente GRI responden de manera distinta al fotoperíodo y a la temperatura, observando que los de GRI 1-3 son más sensibles a cambios de longitud del día y temperatura que los de GRI 7-9. De acuerdo con Cunningham *et al.* (1998), algo muy similar ocurre con los cultivares seleccionados en áreas templadas, que no responden a los cambios de longitud del día como lo hacen los seleccionados en áreas más extremas o de mayores latitudes. Teuber *et al.* (1995), basados en determinaciones realizadas en Davis (California), indicaron que la altura de rebrote para un mismo

material puede variar entre momentos de corte o localidades en donde se realice la medición y que, por lo tanto, no constituye un indicador totalmente confiable para la estimación del GRI. Como ejemplo de ello observaron que la variabilidad en la altura de rebrote de las variedades CUF 101 (GRI 9) y Lahontan (GRI 6) fue mayor que la detectada en las variedades Mesilla (GRI 7) y Ranger (GRI 3).

Con relación al reposo invernal, se ha observado en la RECA que algunos cultivares desarrollados en EE. UU. tienen diferente comportamiento en Argentina, lo que se explicaría por la interacción genotipo\*ambiente descrita anteriormente. En ese sentido, Reich (comunicación personal) sugiere que, si bien el GRI de las variedades desarrolladas en EE. UU. usualmente se mantiene en las condiciones de la región Pampeana, en algunas variedades pueden registrarse cambios, especialmente en los grupos de reposo superiores e inferiores. Por ejemplo, algunos cultivares de GRI 9 y GRI 5 de origen estadounidense pueden comportarse en Argentina como de GRI 8 y GRI 4, respectivamente. También sostiene que, por el contrario, algunos materiales seleccionados en Argentina pueden exhibir cambios de comportamiento cuando son evaluados posteriormente en EE. UU., citando como ejemplos a DK 194 y SPS 9000, que en la región Pampeana se caracterizaron como de GRI 9 y en EE. UU. como de GRI 8.

Otros aspectos que contribuyen a la caracterización productiva de las plantas como el vigor, la tasa de crecimiento, la producción de materia seca, la persistencia y la reacción a plagas y enfermedades también se relacionan, en cierta medida, con el GRI. En general, los cultivares con reposo exhiben en el otoño tallos cortos y postrados, y presentan durante el verano bajas tasas de elongación de rebrotes. Contrariamente, los cultivares sin reposo continúan creciendo durante el otoño y presentan tallos más erectos, con tasas promedio de crecimiento mayores, durante la primavera y el verano (Sheaffer *et al.*, 1992). Por su parte, los cultivares de reposo intermedio tienen picos de crecimiento primaverales más altos que los otros grupos. En general, las diferencias entre grupos de reposo no solo se observan en los caracteres ya mencionados, sino que también en el número y la longitud de los entrenudos. Los cultivares con reposo presentan mayor número de entrenudos, mientras que en los sin reposo estos son de mayor longitud (Liu *et al.*, 2015).



Independientemente de las diferencias de tasa de crecimiento entre cultivares de distinto GRI, también existe para este carácter una gran variabilidad dentro de cada grupo de reposo. Busbice y Wilsie (1965) sugirieron que existiría una relación lineal entre GRI y tasa de desarrollo, lo que determinaría que los cultivares con reposo crezcan y maduren más lentamente después del corte que los sin reposo. No obstante, Hall *et al.* (2000) no encontraron diferencias en estados de madurez entre cultivares de GRI 2 y 4 con similares días de crecimiento. Por un lado, resultados muy semejantes se registraron en la región central de Córdoba cuando se compararon cultivares de GRI 6 y 9 (Guzmán y Spada, comunicación personal). Por otro lado, en ese mismo estudio se verificó que para ambos grados de reposo la tasa de maduración (avance de estados fenológicos) fue más rápida bajo condiciones de deficiencia hídrica (estrés) que bajo condiciones favorables de humedad.

La calidad forrajera es otro aspecto que podría relacionarse con el reposo invernal. Knipe *et al.* (1997; 1998) sugirieron que las diferentes características morfológicas entre plantas de distinto GRI podrían afectar la calidad de forraje. En concordancia con esto, Brummer *et al.* (2002) indicaron que el tipo de tallo de los cultivares sin reposo, más erecto y fibroso que el de los de reposo intermedio, podría afectar negativamente la digestibilidad de la pastura. Con este concepto coinciden Putnam y Orloff (2003), ya que consideran que los cultivares sin reposo registran mayor contenido de fibra y menor contenido de proteína. De la misma manera, Demirbag y Ozkan (2016) observaron en Turquía un mayor contenido de proteína en los cultivares con reposo; en consecuencia, concluyeron que el grado de reposo es un buen estimador de la calidad del forraje, explicando el 80 % de la variación entre cultivares respecto de los contenidos de PB, FDN y FDA. No obstante, la regla no se aplica necesariamente en todos los casos y debe ser manejada con precaución cuando se trata de cultivares de otros grados de reposo invernal.

La expresión del GRI está gobernada por genes (Cunningham *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 2001) que se activarían cuando son expuestos a condiciones de bajas temperaturas y menor fotoperíodo (Brummer *et al.*, 2000). Si bien las bases fisiológicas del reposo invernal no están todavía totalmente dilucidadas, se especula que estos genes, al expresarse, desatarían una verdadera cascada de procesos metabólicos interrelacionados y complejos.

Los mecanismos fisiológicos, moleculares y bioquímicos específicos de la tolerancia a las heladas no están del todo determinados, pero hay suficiente evidencia para relacionarlos con la composición de los carbohidratos de reserva. En general, los cultivares adaptados a las bajas temperaturas poseen, en el otoño, mayores concentraciones de oligosacáridos en la corona y mayores niveles de sacarosa y rafinosa, aun cuando también existen diferencias entre cultivares dentro de ellos. Contrariamente, en los cultivares sin reposo los niveles de estos azúcares decrecen hacia el invierno (Haagenson *et al.*, 2003). De acuerdo con Bertrand *et al.* (2017), otro aspecto que se relaciona con la tolerancia a las heladas es la longitud del fotoperíodo que precede a la aclimatación al frío, que tiene un impacto en el nivel de estos carbohidratos clave. Días cortos previos a la exposición al frío mejoran la supervivencia a heladas extremas en las alfalfas con reposo. La tasa de acumulación de carbohidratos a lo largo del ciclo de crecimiento es variable, registrando los máximos valores en el otoño, particularmente para los cultivares con reposo (Castonguay *et al.*, 1995). Haagenson *et al.* (2003) concluyeron que la concentración de oligosacáridos en el otoño se correlaciona muy significativamente con el inicio del rebrote en la próxima primavera y que la concentración de azúcares otorga mayor resistencia a las heladas que la de almidón.

Además de los carbohidratos, la concentración de sustancias nitrogenadas cumple un rol importante en la resistencia a las bajas temperaturas. Durante el otoño, los cultivares sin reposo muestran pocos cambios en su concentración de proteínas y aminoácidos; por el contrario, los cultivares con reposo presentan en este mismo período mayores concentraciones de compuestos nitrogenados (Cunningham *et al.*, 2001). Por su parte, Haagenson *et al.* (2003) encontraron una correlación positiva entre la concentración de aminoácidos solubles y proteínas en la raíz y la resistencia a heladas, lo que significa que los cultivares de menor GRI poseen mayores concentraciones de compuestos nitrogenados en sus órganos de reserva.

Otro aspecto que se correlacionaría con el grado de reposo es la tolerancia a la sequía. Pembleton y Satish (2014), evaluando cultivares de un amplio rango de grados de reposo en regiones templadas frías de Australia, concluyeron que a menor reposo disminuye la adaptación a las condiciones de déficit hídrico leve. En apoyo de este hallazgo, los

transcriptos de dos genes asociados con la tolerancia al congelamiento aumentaron en abundancia en los cultivares con mayor latencia cuando se expusieron a un déficit hídrico leve, mientras que los transcriptos de un gen de sacarosa sintasa –asociada con la utilización de la glucosa producto de la degradación del almidón– disminuyeron en cultivares con latencia como una estrategia de mantenimiento de energía a largo plazo en condiciones de sequía.

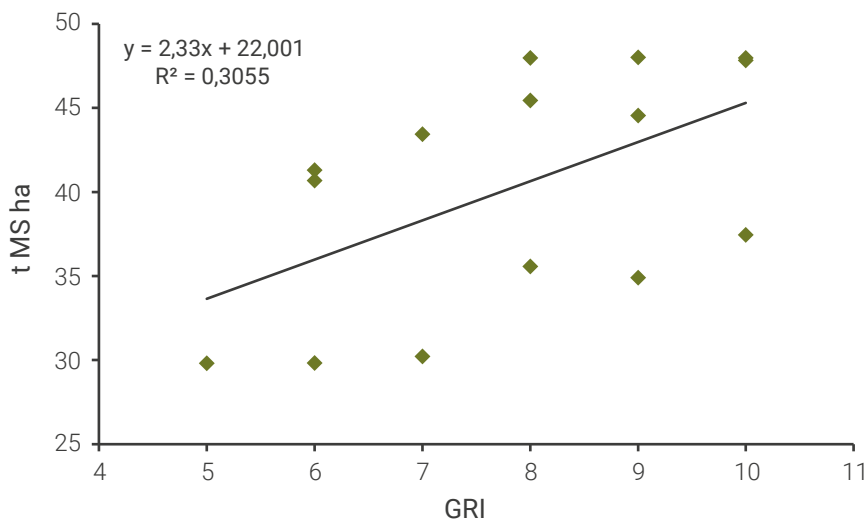
## Producción de forraje

Como consecuencia del mejoramiento genético, el rendimiento de materia seca (MS) de alfalfa en la Argentina se triplicó durante el período 1970-1993 (Hijano, 1993). Mientras que a principios de los 70 el promedio de producción de forraje en la región Pampeana se ubicaba alrededor de las 5 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, a principios de los 90 esos valores llegaban a las 16 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Bruno, 2004).

Volenc *et al.* (2002), realizando un análisis de la evolución durante las últimas décadas de los rendimientos de forraje en el Medio Oeste de EE. UU., concluyeron que la mejora productiva de los cultivares seleccionados en la década de 1980 era mayor que la registrada en los cultivares liberados en la de 1990. Además, sugirieron que los incrementos de producción de las últimas dos décadas eran en realidad el efecto indirecto de haber seleccionado por menor reposo, lo que aparejaba un significativo incremento de MS hacia el final del ciclo del crecimiento (otoño).

En Argentina, la productividad de los cultivares de alfalfa durante los últimos años se ha visto fuertemente afectada por las condiciones ambientales de cada zona agroecológica. Esta significativa interacción genotipo\*ambiente condicionó la estimación del avance genético logrado para los cultivares de reposo intermedio y sin reposo en las distintas localidades. En ese contexto, las producciones de forraje de casi todas las localidades presentaron durante el período 2004-2014 incrementos de aproximadamente 5 t MS ha<sup>-1</sup> entre series de ensayos (conducidos por cuatro años, pero implantados cada dos), tanto para los cultivares sin reposo como para los de reposo intermedio. Para el mismo período, las localidades de Anguil (zona semiárida) y Paraná (zona húmeda) no solo no registraron aumentos de producción, sino que, en algunos

casos, hasta se observaron disminuciones (Spada, 2004; 2006; 2008; 2010; 2012; 2014; Arolfo y Odorizzi, 2016; 2018). Evidentemente, esta variabilidad de respuesta está íntimamente ligada a las condiciones ambientales que se produjeron en cada caso (Figura 2).



■ **Figura 2.** Relación entre grado de reposo invernal (GRI) y producción acumulada (valores promedio de 12 temporadas) de materia seca ( $t MS ha^{-1}$ ) de alfalfa de la región Pampeana. Adaptado de Spada (Spada, 2004; 2006; 2008; 2010; 2012; 2014) y Arolfo y Odorizzi (2016; 2018).

Por un lado, este comportamiento de las variedades registrado en Argentina contrasta marcadamente con lo observado por Poole *et al.* (2003) en California, EE. UU., quienes estimaron un incremento de producción de  $0,581 t MS acre^{-1}$  ( $r^2=0,79$ ) por cada grado de aumento en el reposo invernal. No obstante, Putnam y Orloff (2003) consideran que por sí solo el grado de reposo no explica totalmente las diferencias de rendimiento entre variedades. Por otro lado, la producción conjunta de los cultivares de reposo intermedio (GRI 6-7) en California supera la media de rendimiento global de las variedades sin reposo (GRI 8-9). Ventroni *et al.* (2010) concluyeron que, en regiones templadas, la elección del cronograma de cortes provoca un impacto mayor en la productividad que el GRI del cultivar y que puede utilizarse la misma frecuencia de cortes tanto para cultivares con reposo, reposo intermedio o sin reposo.

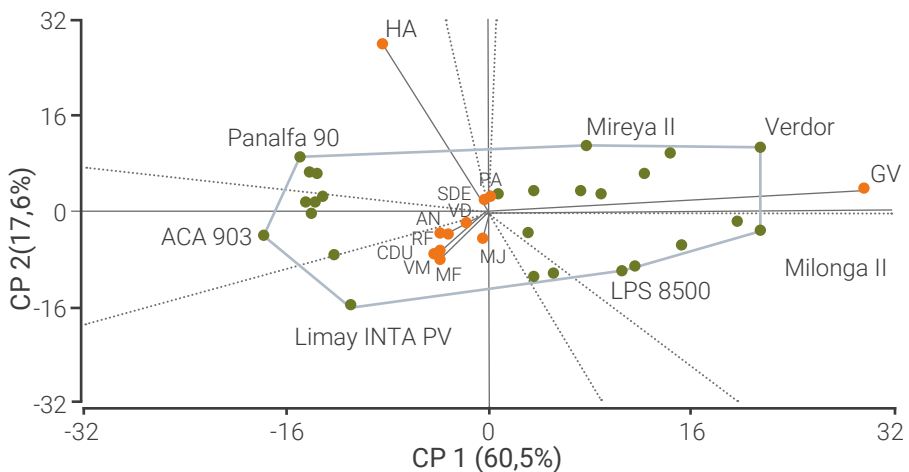
Una forma muy conveniente de visualizar la interacción genotipo\*ambiente es hacerlo a través un análisis de los componentes principales

(CP) que incluya las siguientes variables: producción acumulada a lo largo de todas las temporadas en cada localidad, variedades, localidades, promedio de producción de cada variedad en todas las localidades y promedio de rendimiento en cada localidad de todas las variedades. Luego, sobre la base de las dos CP que expliquen la mayor parte de la variabilidad, se puede confeccionar el tipo de gráfico denominado GGE biplot, que permite observar rápidamente el comportamiento de las variedades a lo largo de la red de evaluación. En general, la  $CP_1$  se relaciona fundamentalmente con el rendimiento de los cultivares, de modo que trazando un eje en el valor 0 de este componente se puede discriminar entre los cultivares de mayor (valores positivos) y menor (valores negativos) rendimiento, especialmente en las localidades que más cerca están en la representación. Además, este tipo de gráfico permite visualizar las variedades que se ubican en los vértices del polígono que conforma la distribución de los cultivares y también la distribución de las localidades en la figura. Considerando la cercanía entre ambas variables (variedades y localidades), se pueden identificar los macroambientes o grupos de localidades (usualmente delimitados en el gráfico por líneas de puntos) donde consistentemente algunos cultivares muestran mejor adaptación o comportamiento. El criterio de interpretación es que aquella variedad que se ubica en el vértice del polígono es la de mejor comportamiento en ese macroambiente. Obviamente, el agrupamiento de las localidades está en función de los datos disponibles, de modo que no necesariamente se forman los mismos macroambientes cuando se analizan diferentes conjuntos de ensayos (Yan *et al.*, 2000).

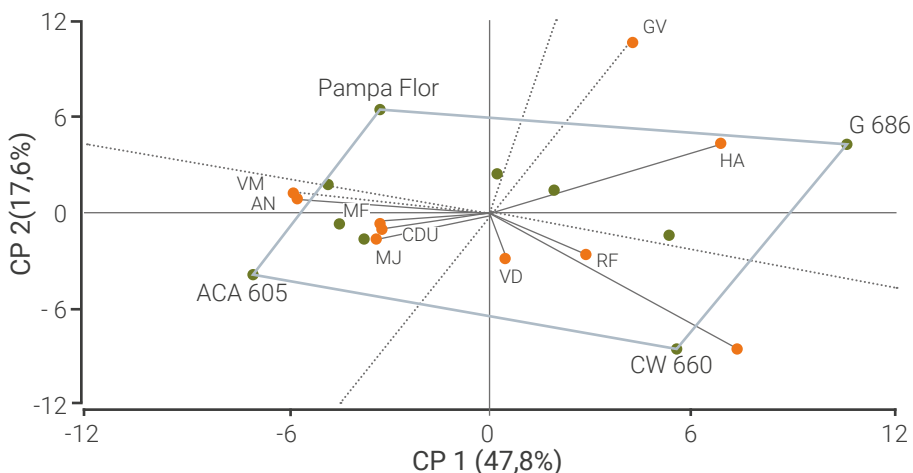
El tipo de análisis descripto precedentemente se aplicó a la serie 2012-2016 de la RECA INTA. Los resultados indicaron que entre los cultivares sin reposo invernal (Figura 3), aquellos ubicados en la extrema izquierda del biplot fueron los menos productivos en todas las localidades, destacándose, como vértices del polígono, Panalfa 90 y ACA 903. Se suman a este grupo menos productivo las variedades LPS 9500, Brava, EBC 90, Target 990, BAR 9242, Sofía y Neo Alfa, que, si bien no están identificados en la figura, corresponden a los puntos más cercanos a los vértices izquierdos del polígono. El caso de Limay INTA PV es algo diferente porque, si bien está en el sector de los menos productivos, tuvo en realidad valores promedio de rendimiento de nivel intermedio. Aquellos ubicados a la derecha fueron los más productivos, en particular Verdor y Milonga

II. Muy cerca de este último (no identificado en la figura) se ubicó WL 818. Entre las localidades, la que mayor aporte tuvo a la interacción fue General Villegas, no por haber sido la más productiva sino porque allí no se evaluaron todos los cultivares de la serie. El resto de las localidades se ubican del lado izquierdo de biplot, pero muy cercanas al centro de este, con excepción de Hilario Ascasubi. Esto indica que las localidades más cercanas al centro no tienen un gran aporte a la interacción y que, por ende, son las más estables. En cambio, Santiago del Estero fue la de mayor producción con escaso o nulo aporte a la interacción.

El análisis con los cultivares de reposo intermedio (Figura 4) indicó que los de mayor producción promedio en todas las localidades fueron G 686 y CW 660, que están a su vez asociados con las localidades Hilario Ascasubi y Paraná, que fueron las de mayor producción. Los cultivares de menor promedio acumulado se ubican a la izquierda del biplot, entre los que se destacan ACA 605, que fue el que mayor aporte tuvo en la interacción genotipo\*ambiente, y Pampa Flor. Le siguen (no identificados en la figura) Pro INTA Luján (que se asocia a Villa Mercedes y Anguil), Don Enrique y Pinto II, asociadas a Manfredi y Concepción del Uruguay.

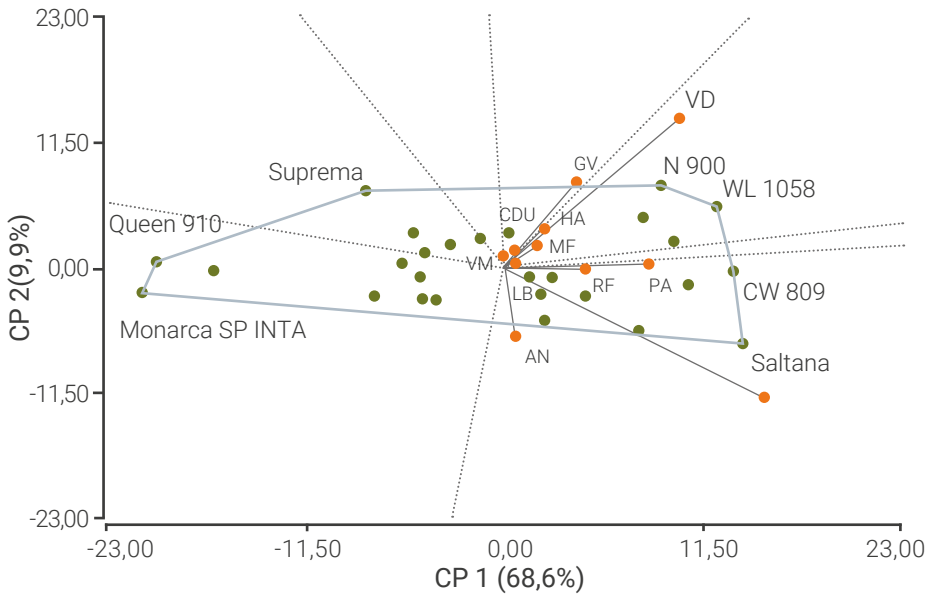


**Figura 3.** Representación (biplot) de la interacción cultivar\*localidad basado en el análisis de las componentes principales (CP) estimadas sobre el rendimiento de forraje acumulado de los cultivares sin reposo invernal incluidos en la serie de ensayos 2012-2016 de la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa del INTA. Ref.: AN: Anguil, CDU: Concepción del Uruguay, GV: General Villegas, HA: Hilario Ascasubi, MF: Manfredi, MJ: Marcos Juárez, PA: Paraná, RF: Rafaela, SDE: Santiago del Estero, VD: Viedma, VM: Villa Mercedes. Adaptado de Arolfo y Odorizzi (2016).



■ **Figura 4.** Representación (biplot) de la interacción cultivar\*localidad basado en el análisis de las componentes principales (CP) estimadas sobre el rendimiento de forraje acumulado de los cultivares de reposo invernal intermedio que se incluyeron en la serie de ensayos 2012-2016 de la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa del INTA. Ref.: AN: Anguil, CDU: Concepción del Uruguay, GV: General Villegas, HA: Hilario Ascasubi, MF: Manfredi, MJ: Marcos Juárez, PA: Paraná, RF: Rafaela, VD: Viedma, VM: Villa Mercedes. Adaptado de Arolfo y Odorizzi (2016).

Cuando se analizó la serie de ensayos 2014-2018 se observaron fuertes interacciones cultivar\*localidad, en gran medida debidas a las excesivas precipitaciones que se registraron durante la segunda temporada de evaluación (2015/16), que provocaron una gran pérdida de plantas y hasta de ensayos completos por anegamiento. En la Figura 5 se presentan los resultados del análisis realizado con los cultivares sin reposo invernal, donde se aprecia que la mayor producción del cultivar Saltana está asociada a Santiago del Estero, que fue la localidad de mayor producción promedio. Le siguieron los cultivares CW 809, WL 1058, N 900, CW 194 Premium y WL 818 (los dos últimos no identificados en la figura), también asociados a producciones altas en la mayoría de las localidades con mayor producción. Entre los de menor rendimiento se ubicaron Queen 910 y Monarca SP INTA, seguidos por ACA 903 y Patriarca (no identificados en la figura). El cultivar Suprema, aunque ubicado en el sector menos productivo, tuvo un buen comportamiento en Hilario Ascasubi y Concepción del Uruguay, lo que lo sitúa en una franja intermedia.

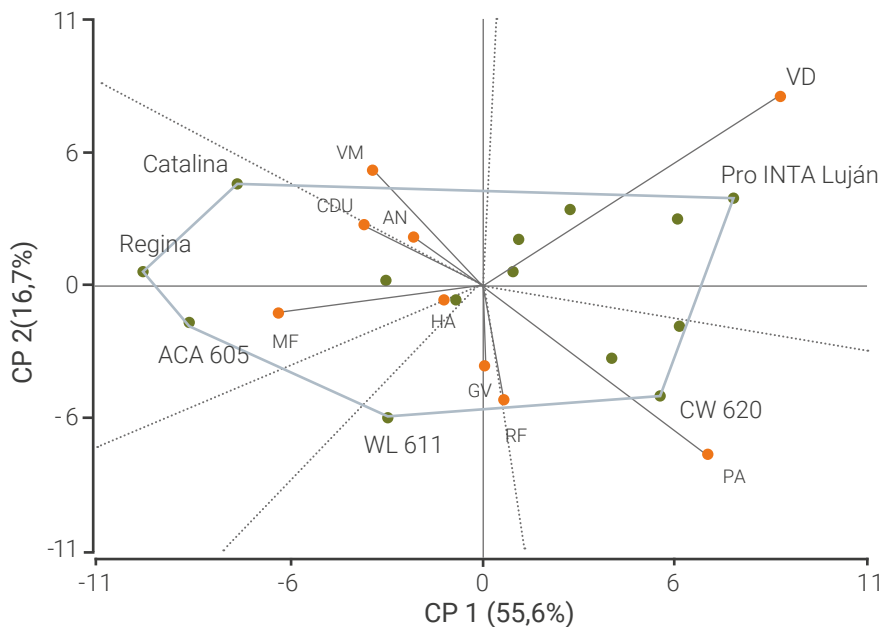


■ **Figura 5.** Representación (biplot) de la interacción cultivar\*localidad basado en el análisis de las componentes principales (CP) estimadas sobre el rendimiento de forraje acumulado de los cultivares sin reposo invernal de la serie de ensayos 2014-2018 de la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa del INTA. Ref.: AN: Anguil, CDU: Concepción del Uruguay, GV: General Villegas, HA: Hilario Ascasubi, LB: Las Breñas, MF: Manfredi, PA: Paraná, RF: Rafaela, SDE: Santiago del Estero, VD: Viedma, VM: Villa Mercedes. Adaptado de Arolfo y Odorizzi (2018).

Del análisis de los cultivares de reposo invernal intermedio evaluados en la serie 2014-2018 (Figura 6), se destacó Pro INTA Luján como el de mayor producción promedio en todas las localidades, ubicándose muy cercano a Viedma, la localidad de mayor producción. Otros cultivares destacados fueron CW 620 y CW 660 (no identificada en la figura), que se asociaron con Paraná. Los cultivares de menor producción promedio en todas las localidades fueron Regina y ACA 605, aunque este último tuvo una muy buena producción en Manfredi, lo que explica su cercanía en el biplot.

Aunque pueda resultar obvio, es importante aclarar que si bien en las Figuras 3 a 6 se indicaron solamente los cultivares de mejor adaptación en cada macroambiente (vértices de los polígonos), también existen grupos de cultivares con producciones de forraje intermedias en cada uno de ellos.





■ **Figura 6.** Representación (biplot) de la interacción cultivar\*localidad basada en el análisis de las componentes principales (CP) estimadas sobre el rendimiento de forraje acumulado de los cultivares de reposo invernal intermedio que se incluyeron en la serie de ensayos 2014-2018 de la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa del INTA. Ref.: AN: Anguil, CDU: Concepción del Uruguay, GV: General Villegas, HA: Hilario Ascasubi, LB: Las Breñas, MF: Manfredi, PA: Paraná, RF: Rafaela, VD: Viedma, VM: Villa Mercedes. Adaptado de Arolfo y Odorizzi (2018).

Otra observación interesante que se infiere del análisis de los datos que se obtienen de la red de evaluación de cultivares es que, a medida que se van sucediendo las temporadas de producción, se registra una disminución de la producción de forraje en todos los cultivares. Esta declinación del rendimiento puede encuadrarse dentro de uno de estos dos modelos alternativos: a) lineal, donde se verifica una disminución constante en el tiempo, que puede ser de aproximadamente  $2 \text{ t MS ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ , como la registrada en General Villegas para el período 2010-2014, o de aproximadamente  $5 \text{ t MS ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ , como la observada en Hilario Ascasubi para el mismo período; y b) cuadrática, donde se aprecia un pico de producción en el segundo año y luego un decrecimiento paulatino en la tercera y cuarta temporadas, tal como sucedió en la misma serie de ensayos y en líneas generales, en Marcos Juárez, Rafaela y Anguil. En

cualquier caso, la merma de productividad de forraje se asocia a una pérdida de densidad (número de plantas  $m^{-2}$ ) a lo largo de la vida del cultivo o a un debilitamiento de las plantas (Cangiano, 2002).

## Distribución estacional de la producción de forraje

Como se mencionó anteriormente, los cultivares con reposo detienen su crecimiento en otoño-invierno, a diferencia de las variedades sin reposo que presentan una estación de crecimiento más extendida y, por ende, un período de utilización más amplio en el tiempo (Sheaffer *et al.*, 1992; Spada, 2003; Weishaar *et al.*, 2002). No obstante, la expresión de la potencial distribución estacional del rendimiento de forraje que cada cultivar posee está altamente influenciada por las condiciones ambientales donde se lo cultive.

En la Figura 7 se muestran los resultados del análisis de la distribución estacional de producción de MS de los cultivares de reposo intermedio y sin reposo incluidos en la serie de ensayos 2012 de la RECA INTA en tres localidades agroecológicamente diferentes: Anguil (zona semiárida), General Villegas (zona subhúmeda) y Rafaela (zona húmeda). Se observa que mientras en Rafaela el ciclo de crecimiento de ambos grupos de reposo invernal incluyó el invierno, en las zonas subhúmeda y semiárida esos mismos cultivares no registraron crecimiento invernal, aun para los del grupo sin reposo. También se aprecia que en Anguil la producción de forraje de ambos grupos de cultivares se concentró predominantemente en la primavera. En General Villegas la producción de forraje fue diferente entre los grupos de cultivares: los sin reposo acumularon más forraje en verano que en primavera, mientras que los con reposo intermedio acumularon forraje de manera similar en ambas estaciones. En Rafaela, la acumulación de forraje se produjo de manera similar en ambas estaciones y en ambos grupos de reposo.

Estos resultados indicarían que el crecimiento de los grupos de reposo no solo está afectado por el fotoperíodo y las temperaturas, sino también por las condiciones de humedad disponibles en las distintas áreas de cultivo. De acuerdo con esto último, se ha observado que en Manfredi, zona semiárida, la escasez de precipitaciones en invierno/inicio de la primavera, además de las bajas temperaturas, impiden a los

cultivares de menor grado de reposo expresar completamente su potencial genético de mayor distribución de la producción, a punto tal que tanto las variedades de GRI 5 a 7 como las de GRI 8 a 10 concentran su producción en primavera-verano, con escasas diferencias entre grupos de reposo (Figura 8).

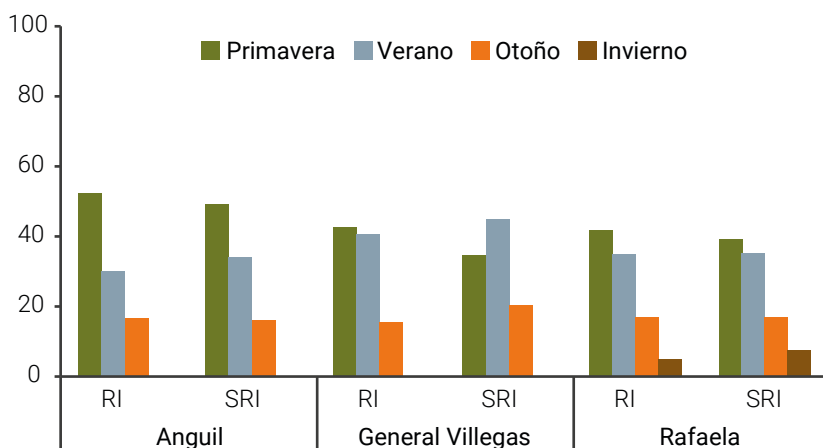
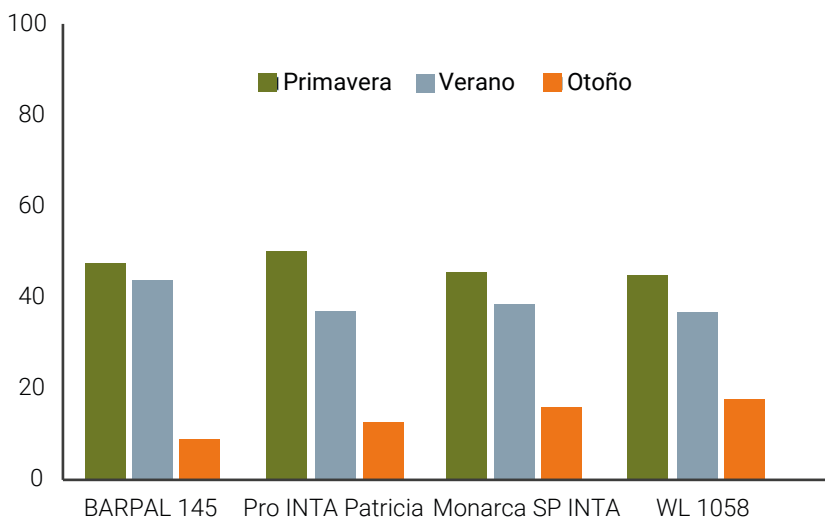


Figura 7. Distribución estacional de la producción de forraje (en %) de los mismos cultivares de reposo intermedio (RI) y sin reposo (SRI) evaluados en tres localidades de la región Pampeana: Anguil (semiárido), General Villegas (subhúmedo) y Rafaela (húmedo) durante del período 2012-2015. Adaptado de Spada (2013; 2014) y Arolfo y Odorizzi (2015).

Las diferencias de distribución de la producción a lo largo de la temporada entre los cultivares de reposo intermedio y sin reposo se relacionaron con sus respectivas tasas de crecimiento. En la Figura 9 se resumen las tasas de crecimiento calculadas para Anguil, General Villegas y Rafaela durante el período 2012-2015. Como era esperable, se observa un pico a mediados de primavera-principios de verano; posteriormente, las tasas comienzan a disminuir a partir de mediados de verano, como respuesta a la disminución en la longitud del día. Esto es coincidente con lo informado por Brummer *et al.* (2000).

En líneas generales, en Anguil los dos grupos de reposo registraron valores similares a lo largo del año, con valores máximos de 75 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Por el contrario, en General Villegas y Rafaela las tasas de crecimiento variaron entre años y estaciones; mientras que en la primera localidad

los valores máximos se alcanzaron durante el segundo ciclo y fueron del orden de 200 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> para los cultivares sin reposo, en Rafaela el mayor crecimiento se alcanzó durante la segunda temporada en los cultivares con reposo, llegando a 108 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>.

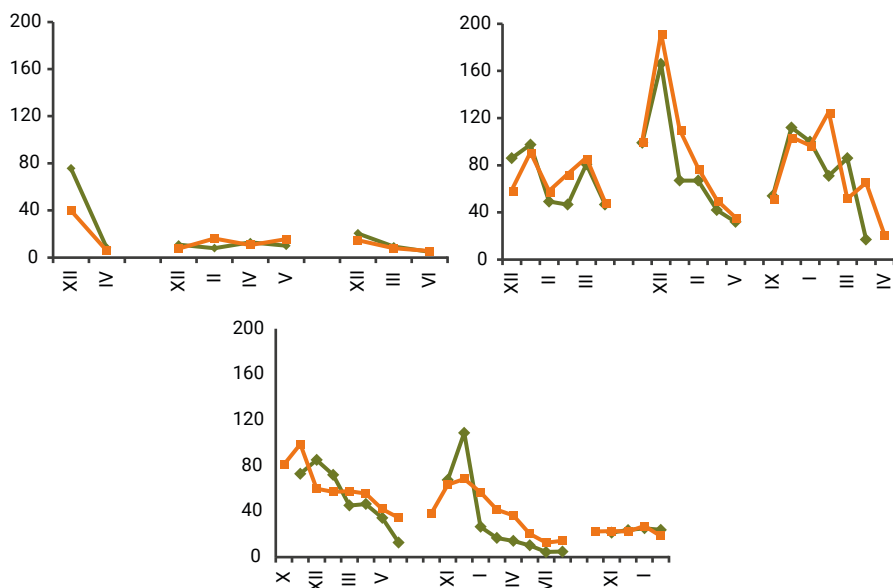


**Figura 8.** Distribución estacional de la producción de forraje (en %) de cuatro cultivares de alfalfa con distinto grado de reposo invernal: BARPAL 145 (GRI 5), Pro INTA Patricia (GRI 7), Monarca SP INTA (GRI 8) y WL 1058 (GRI 10) en la EEA INTA Manfredi durante el período 2014-2016. Adaptado de Arolfo y Odorizzi (2015; 2016).

A similitud de Anguil, Pece y Cangiano (2003) habían estimado en Balcarce que las tasas de crecimiento de Victoria SP INTA (reposo intermedio) y Monarca SP INTA (sin reposo) fueron muy próximas entre sí. Las mayores diferencias se produjeron entre y dentro de años de utilización, lo que –de acuerdo a los mismos autores– refleja un mayor efecto de las condiciones meteorológicas que de las características del reposo invernal. También sugirieron que la igualdad de tasas de crecimiento entre ambos grupos de reposo se relacionaría con una suerte de compensación entre tamaño y número de tallos por unidad de superficie.

En Manfredi el cultivar Barpal 145 (GRI 5) registró las menores tasas de crecimiento y si bien el inicio de su crecimiento coincidió con el de Pro INTA Patricia (GRI 7), ambos cultivares lo hicieron más tardíamente que

Monarca SP INTA (GRI 8) y WL 1058 (GRI 10) en las dos temporadas consideradas (Figura 10).



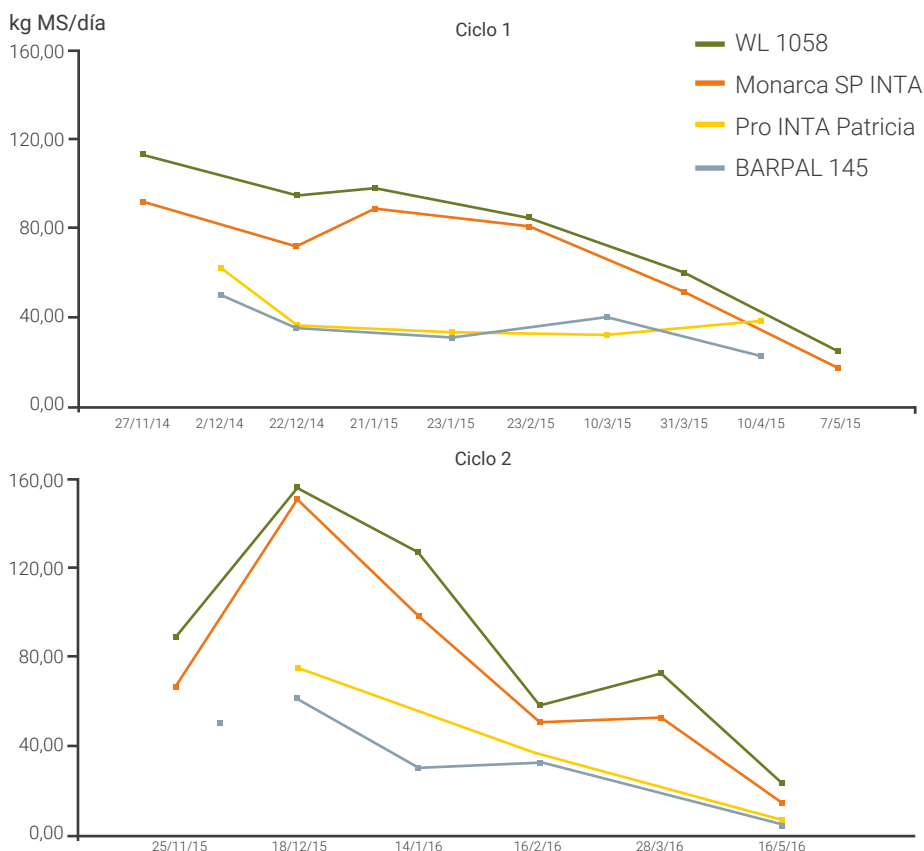
■ **Figura 9.** Valores promedio de tasas de crecimiento ( $\text{kg MS ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) calculadas en el período 2012-2015 para cultivares de reposo intermedio (línea verde) y sin reposo (línea anaranjada) en Anguil, General Villegas y Rafaela. En números romanos se indican los meses del año correspondientes a cada temporada de evaluación (2012/13, 2013/14, 2014/15). Adaptado de Spada (2012; 2014) y Arolfo y Odorizzi (2015).

De la Figura 10 se infiere que Monarca SP INTA y WL 1058 tuvieron las máximas tasas de crecimiento, con valores del orden de los  $155 \text{ kg MS ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$  durante la primavera; a partir de allí, se registró una declinación continua del crecimiento hacia el otoño, donde todos los cultivares crecieron a una tasa promedio de  $15 \text{ kg MS ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$ . Esta similitud de crecimiento otoñal entre todas las variedades se relaciona más con la falta de disponibilidad de agua que con los mecanismos de reposo invernal. Como ya fuera comentado, la deficiencia hídrica en ese período del año impide la expresión del mayor potencial de crecimiento que tienen los cultivares de menor reposo invernal.

Por su parte, Zaniboni y Dillon (1999) estimaron que en General Villegas, bajo condiciones de pastoreo, las tasas de crecimiento primaverales

de los cultivares de GRI 5-7 fueron superiores a las de los cultivares sin reposo (GRI 9), con valores máximos valores de 80 y 70 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, respectivamente. En el otoño, las tasas de crecimiento no solo disminuyeron, sino que revirtieron, llegando a los 7 y 14 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> para los cultivares de reposo intermedio y sin reposo, respectivamente.

Es importante señalar, como concepto general, que las diferencias en las tasas de crecimiento que pueden detectarse entre cultivares de distinto grado de reposo a lo largo de la temporada no siempre se traducen en diferencias de producción acumulada de forraje. Esto también fue señalado por otros autores para otras condiciones de cultivo (Weishaar *et al.*, 2002).



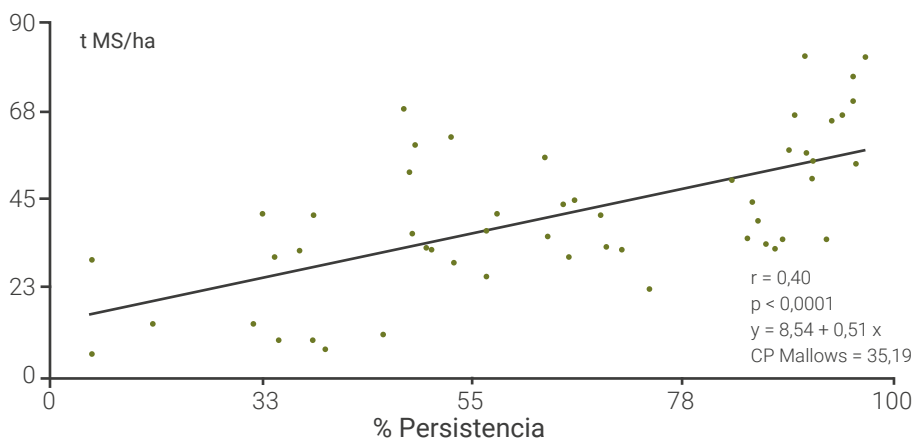
■ **Figura 10.** Tasas de crecimiento (kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) registradas en Manfredi durante el período 2014/16 en cuatro cultivares de alfalfa con distinto grado de reposo invernal: BARPAL 145 (GRI 5), Pro INTA Patricia (GRI 7), Monarca SP INTA (GRI 8) y WL 1058 (GRI 10). Adaptado de Arolfo y Odorizzi (2015; 2016).

## Persistencia

Varios factores determinan la persistencia de la alfalfa. Entre ellos, la tolerancia a las bajas temperaturas invernales y la resistencia a plagas y enfermedades suelen consignarse como los más importantes. Sin embargo, respecto de esto último, Volenec *et al.* (2002) no encontraron una alta correlación entre buenos niveles de resistencia a plagas y enfermedades y elevados porcentajes de persistencia del cultivo en una amplia zona de los EE. UU. Este hecho, que es coincidente con la experiencia de muchos años de ensayos en varios ambientes de la región Pampeana (Basigalup, comunicación personal), indicaría que la persistencia del cultivo es un fenómeno complejo donde el comportamiento sanitario sería solo uno de los factores. En ese contexto, la supervivencia de las plantas se basaría mayoritariamente en procesos fisiológicos interdependientes, que condicionarían la adaptación y el comportamiento a lo largo del tiempo.

El rendimiento de forraje está directamente relacionado con la densidad de plantas del cultivo. Al analizar la información producida por la RECA INTA durante el período 2004-2014, se detectó una relación lineal ( $r= 0,40$ ;  $p<0,0001$ ) entre la producción de forraje acumulada durante cuatro años y la persistencia de cultivares de distinto GRI (Figura 11). Esta observación coincide con lo detectado por Cangiano (2002) y por los ensayos de la CSBC (Cámara de Semilleristas de La Bolsa de Cereales, 2008; 2012; 2014; 2016; 2018).

Esta relación directamente proporcional entre mayor persistencia y mayor producción de forraje se observó en todas las localidades de la red. Más aún, en algunas de ellas –como Hilario Ascasubi, Santiago de Estero, Marcos Juárez y Anguil– la correlación fue más alta (datos no mostrados). No obstante, como lo señalaron Kallenbach *et al.* (2002), este tipo de relación no siempre se verifica, dado que el cultivo puede compensar la pérdida de plantas con un aumento del número de tallos en las plantas remanentes, lo que concuerda con lo expresado por Sheaffer *et al.* (1988). Esto explicaría la inconsistencia de algunos resultados que se registraron en los ensayos de la RECA INTA durante los ciclos 2006-2010 y 2014-2018.



■ **Figura 11.** Relación entre producción de forraje acumulada ( $t MS ha^{-1}$ ) y persistencia (%) de cultivares de alfalfa con distinto grado de reposo invernal incluidos en la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa del INTA, período 2004-2014.

Otro concepto que estaba muy difundido y aceptado hace unos años, es la existencia de una relación directa entre grado de reposo y persistencia, en virtud de la cual se decía que los cultivares de mayor reposo eran más longevos que los sin reposo (Rossanigo *et al.*, 1995). Sin embargo, el análisis de los últimos diez años de ensayos de la RECA INTA permite concluir que esta tendencia no es necesariamente aplicable en todos los casos. En Argentina, la persistencia en todos los grados de reposo fue similar en la mayoría de las localidades, alcanzando un promedio de 60 % de plantas de la población original al cabo de cuatro temporadas. Esto contrasta con la menor persistencia de los cultivares sin reposo que se observa en las altas latitudes en el hemisferio norte, donde se registran temperaturas mucho más bajas que en la mayor parte de la región alifera argentina. De cualquier manera, independientemente de esta diferencia ambiental entre ambas situaciones, Volenec *et al.* (2002) consideran que el mejoramiento genético tradicional por mayor resistencia a bajas temperaturas invernales realizado en EE. UU. no ha sido totalmente efectivo para aumentar la persistencia.

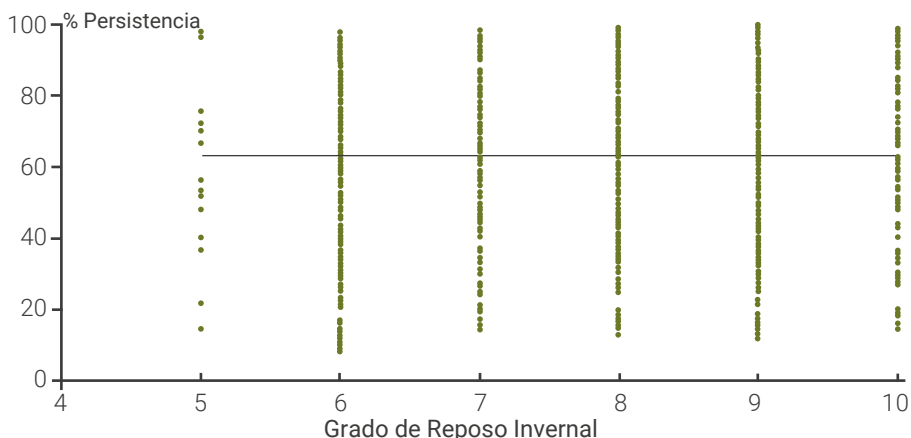
El análisis de los datos de la serie 2004-2016 de la RECA INTA indica que tanto la persistencia promedio de los cultivares de distinto GRI como la variabilidad entre cultivares dentro de cada grupo de reposo fueron muy similares (Figura 12). De la misma manera, la información recogida en la red de la CSBC indica que los cultivares de diferente GRI



se comportaron de manera similar (Cámara de Semilleristas de La Bolsa de Cereales, 2008; 2012; 2014; 2016; 2018).

Por un lado, al igual que en la producción de forraje, la persistencia también muestra una importante interacción variedad\*localidad. Si se asume que el comportamiento exhibido por dos cultivares de distinto grado de reposo, como Monarca SP INTA (GRI 8) y Pro INTA Luján (GRI 6), puede extrapolarse a los otros cultivares evaluados en la red del INTA durante 2004-2014, puede afirmarse que para una misma variedad la persistencia varió tanto entre períodos de utilización como entre localidades. Así, la persistencia de Monarca SP INTA en Paraná osciló entre 35 % y 93 % y en Anguil entre 45 % y 70 %. Por otro lado, la persistencia de Pro INTA Luján, con excepción de Manfredi y Rafaela, fue bastante más estable entre ciclos dentro de una misma localidad y aun entre localidades de una misma serie de ensayos. Durante todo el período considerado, tanto Pro INTA Luján como Monarca SP INTA tuvieron siempre una mayor proporción de supervivencia en Hilario Ascasubi que en el resto de las localidades. De todas maneras, si se considera la totalidad de los cultivares evaluados en ese período (2004-2014), se aprecia una gran influencia tanto de localidades como de años de evaluación, haciendo que en ninguna localidad ni en ninguna serie de ensayos se alcance una persistencia promedio superior al 40 %. No obstante, hubo cultivares –como Cautiva II, CW 194, Limay PV INTA, Mecha, Pintado, Saltana y WL 919– que registraron en la mayoría de las localidades una persistencia cercana o superior al 70 % (Spada, 2004; 2006; 2008; 2010; 2012; 2013; Arolfo y Odorizzi, 2015; 2016; 2017; 2018).

Como ya fuera señalado, la asociación entre persistencia y daño de enfermedades o plagas no sigue una tendencia clara. Sin embargo, en algunas ocasiones, la ocurrencia de condiciones ambientales muy favorables para los patógenos o para el estrés de las plantas puede condicionar grandemente la supervivencia de las variedades. Por ejemplo, en Rafaela y Concepción del Uruguay, durante las temporadas 2015-17 se observó que el anegamiento del suelo causado por intensas lluvias favoreció el ataque de enfermedades de raíz y corona, al punto de ocasionar una gran mortandad de plantas en el segundo y tercer año de evaluación de las series sembradas en 2012 y 2014 (Arolfo y Odorizzi, 2015; 2016; 2017).



■ **Figura 12.** Persistencia (%) de cultivares de alfalfa incluidos en la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa del INTA en el período 2004-2016 agrupados según su grado de reposo invernal (5 a 10).

Por un lado, bajo condiciones de pastoreo, Zaniboni y Dillon (1999) no registraron diferencias de supervivencia entre cultivares de GRI 5 y 9, logrando en General Villegas pasturas con una alta persistencia. Por otro lado, en el sur de la provincia de Buenos Aires y en asociaciones de alfalfa con pasto llorón (*Eragrostis curvula*), Aduriz *et al.* (1997) no detectaron diferencias de persistencia entre variedades de reposo intermedio y sin reposo, observando en ambos grupos una disminución paulatina y lineal de la población de plantas a través de los años.

## Resistencia a plagas y enfermedades

Además de afectar la productividad y persistencia de la alfalfa, las plagas y enfermedades disminuyen la calidad del forraje y pueden sensibilizar las plantas al efecto factores bióticos y abióticos de estrés. Por ello, al momento de elegir los cultivares de alfalfa para sembrar, es importante elegir aquellos que tengan altos niveles de resistencias a las plagas y enfermedades de mayor impacto económico en el área. Hijano *et al.* (1986) identificaron las principales enfermedades que, por difusión y grado de daño, afectan al cultivo en la región Pampeana. Este trabajo sirvió oportunamente de base para la fijación de los objetivos de mejoramiento genético para el desarrollo de variedades con resistencia múltiple a los principales problemas sanitarios del cultivo.

De acuerdo a su comportamiento frente al ataque de plagas y enfermedades, los cultivares se clasifican: a) resistentes: las plantas son capaces de restringir o eliminar la actividad de un patógeno; b) tolerantes: las plantas no impiden el avance ni el desarrollo del patógeno, pero lo soportan sin manifestar disminución significativa de su producción; y c) susceptibles: las plantas son incapaces de restringir la actividad del patógeno y sufren daños económicos o la muerte.

La forma usual de expresar el nivel de resistencia a plagas y enfermedades que posee un cultivar de alfalfa es a través de una categorización basada en el porcentaje de plantas resistentes presentes en la población (Tabla 2). Esos porcentajes de resistencia se determinan en pruebas estandarizadas bajo condiciones controladas y con participación de testigos resistentes y susceptibles (*North American Alfalfa Improvement Conference*, 1998).

■ **Tabla 2.** Categorías de resistencia basadas en los porcentajes de plantas resistentes a plagas y enfermedades. Adaptado de NAAIC (1998).

<b>AR</b>	altamente resistente	≥51 %
<b>R</b>	resistente	31-50 %
<b>MR</b>	moderadamente resistente	15-30 %
<b>BR</b>	baja resistencia	6 - 14 %
<b>S</b>	susceptible	≤5 %

Nótese que en la Tabla 2 no se incluye la categoría “inmune” y que la categoría “altamente resistente” supone la existencia de hasta 49 % de plantas susceptibles en la población. De ese modo, un primer análisis de la situación podría sugerir que esta categorización reflejara niveles de resistencia aparentemente insuficientes para proveer un adecuado nivel de protección al cultivo. No obstante, Miller (1993) estableció que una variedad necesita solo entre 31 y 50 % de plantas resistentes para interrumpir efectivamente el efecto de un patógeno –asumiendo que esas plantas resistentes estén distribuidas al azar en el lote– y mostrar una ventaja económica significativa.

En consecuencia, se recomienda que la elección de los cultivares para utilizar considere no solo el potencial de producción, la persistencia y el grado de reposo invernal, sino también el comportamiento frente a

plagas y enfermedades. Por ello, en la Tabla 3 se presenta la nómina de los cultivares que participaron en los ensayos de la red del INTA en el período 2004-2018, incluyendo su grado de reposo invernal y su caracterización de resistencia a las plagas y enfermedades económicamente más importantes, a saber: pulgón moteado (*Therioaphis trifolii*), pulgón verde (*Acyrtosiphum pisum*), pulgón azul (*A. kondoi*), fitóftora (*Phytophthora megasperma f sp medicaginis*), fusariosis (*Fusarium oxysporum f sp medicaginis*) y antracnosis (*Colletotrichum trifolii*).

■ **Tabla 3.** Nómina de cultivares ordenados por grado de reposo invernal (GRI) que fueron incluidos en los ensayos de la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa del INTA entre 2004 y 2018. Se incluye también la categorización de sus niveles de resistencia a pulgones y a enfermedades económicamente importantes. Adaptado de Spada (2004; 2006; 2008; 2010; 2012; 2014) y de Arolfo y Odorizzi (2016; 1018). Referencias: AR = alta resistencia (> 51 %); R = resistencia (31-50 %); MR = moderada resistencia (15-30 %); BR = baja resistencia (6-14 %) y S = susceptibilidad (<5 %).

Cultivar	GRI	Pulgón			Fitóftora	Fusariosis	Antracnosis
		Moteado	Verde	Azul			
BAR 580	5	R	R	R	AR	R	AR
BAR PAL 145	5	R	AR	AR	R	AR	AR
CANDELA	5	R	MR	R	MR	AR	BR
GRAZEKING	5	R	AR	AR	AR	AR	AR
KEY II	5	R	ME	R	AR	AR	AR
TITÁN 5	5	R	R	-	R	-	-
56 S 82	6	MR	AR	AR	AR	AR	AR
ACA605	6	R	R	AR	MR	AR	MR
ACA 605	6	R	R	AR	MR	AR	MR
AMÉRICA SD	6	AR	R	R	R	AR	AR
ANDINA	6	R	R	MR	AR	R	MR
ANGENTA	6	R	MR	R	R	R	R
AW mAR	6	MR	MR	AR	AR	AR	BR
BARPAL 236	6	AR	R	AR	R	R	R
CANDOMBE	6	AR	AR	AR	AR	AR	AR
CARABELLA	6	R	R	MR	MR	R	MR

Cultivar	GRI	Pulgón			Fitóftora	Fusariosis	Antracnosis
		Moteado	Verde	Azul			
CATALINA	6	R	R	AR	AR	AR	R
CW 620	6	AR	AR	AR	AR	AR	AR
CW 660	6	AR	AR	R	R	R	R
DK 166	6	AR	R	AR	AR	AR	AR
DON ENRIQUE	6	R	AR	R	R	-	MR
DORIVE	6	R	R	R	R	R	AR
EXP 2046	6	R	AR	R	MR	-	-
Exp LOS PRADOS	6	R	AR	R	R	AR	AR
G 686	6	AR	R	AR	AR	AR	AR
GALA	6	AR	AR	R	AR	AR	AR
GARUFA	6	AR	AR	R	AR	AR	AR
HUELLA	6	R	R	MR	ME	R	MR
MAGNA 601	6	AR	AR	AR	AR	AR	R
MARA	6	AR	R	-	AR	AR	BR
NOVEL 620	6	-	AR	-	AR	AR	R
OCCITANE	6	MR	AR	S	AR	R	BR
PAMPA FLOR	6	AR	MR	AR	MR	MR	MR
PICASSO 617	6	R	R	AR	AR	AR	MR
PINTADO	6	AR	AR	AR	R	AR	R
PINTO	6	AR	AR	R	AR	AR	AR
PINTO II	6	AR	AR	AR	AR	AR	AR
PRO INTA LUJÁN	6	R	AR	MR	MR	AR	BR
REGINA	6	R	-	AR	R	R	R
TABA	6	AR	R	R	BR	R	MR
TANGO	6	AR	AR	R	AR	AR	AR
VENUS	6	R	R	R	R	AR	R
VERZY	6	MR	R	R	MR	AR	AR
VICTORIA SP INTA	6	R	R	MR	MR	R	MR
WL 611	6	AR	AR	AR	AR	AR	AR
ZZ 506	6	R	R	R	R	R	R

Cultivar	GRI	Pulgón			Fitóftora	Fusariosis	Antracnosis
		Moteado	Verde	Azul			
ZZ506 H*	6	-	-	-	-	-	-
5681	7	R	R	S	R	R	S
5683	7	R	R	S	R	R	S
ALFA 70	7	AR	AR	AR	AR	AR	R
ANTARES	7	MR	R	R	AR	R	R
AW IND	7	AR	AR	AR	MR	MR	MR
BARMED	7	R	R	R	MR	R	R
CRIOULA	7	R	AR	-	AR	R	AR
LPS 681	7	R	-	MR	AR	AR	MR
MAGNA 787	7	R	R	R	R	AR	R
MEDALLION	7	R	R	AR	AR	AR	R
NOBEL 72	7	-	AR	-	AR	AR	AR
PASTORA	7	R	R	R	R	R	AR
PRO INTA PATRICIA	7	R	MR	MR	MR	MR	MR
PULMARI INTA PV	7	R	AR	R	R	AR	MR
ROBERTA	7	R	AR	R	R	AR	AR
SEMIT 711	7	R	AT	AT	R	-	AT
SUTTER	7	AR	AT	AR	AR	AR	BR
SW 7410	7	AR	R	R	R	AR	MR
TEQUILLA	7	BR	AR	BR	R	R	S
TITÁN 7	7	AR	R	-	R	-	-
VERDOR	7	R	R	R	R	AR	R
VERZY	7	MR	R	R	MR	AR	AR
WL 442	7	AR	AR	AR	AR	AR	AR
ALAZAN	8	AR	AR	AR	AR	AR	AR
ARMONA	8	AR	AR	R	MR	AR	MR
BACANA	8	AR	AR	AR	AR	AR	MR
BAR 814	8	AR	R	R	AR	AR	AR
BARALFA 85	8	AR	AR	AR	AR	AR	R
BARPAL 258	8	R	AR	MR	MR	MR	R

Cultivar	GRI	Pulgón			Fitóftora	Fusariosis	Antracnosis
		Moteado	Verde	Azul			
CS 01	8	R	MR	AR	R	-	BR
CS 02	8	MR	R	R	R	-	S
CW 809	8	R	AR	R	AR	AR	AR
CW 830	8	AR	AR	AR	AR	AR	AR
DK 189	8	AR	R	R	AR	R	AR
DK 194	8	AR	AR	AR	AR	AR	AR
DLF 894	8	AR	AR	R	R	R	R
ESTANZUELA CHANÁ	8	R	MR	R	AR	R	R
ETERNA	8	R	-	MR	MR	-	BR
EXP 1048	8	R	R	MR	R	MR	R
FG 814T030	8	AR	AR	AR	AR	AR	AR
FRANCA	8	AR	R	R	R	AR	R
FRANCESCA	8	AR	AR	R	AR	AR	AR
FULANA	8	AR	AR	AR	AR	AR	AR
G 810 +	8	AR	R	AR	AR	AR	AR
G 909	8	AR	AR	AR	AR	AR	AR
GATEADO	8	AR	AR	AR	AR	AR	R
LACTA 820	8	-	AR	-	MR	AR	MR
MAGNA 801	8	AR	AR	AR	AR	AR	R
MAGNA 804	8	AR	AR	AR	AR	AR	MR
MAGNA 860	8	AR	AR	AR	AR	AR	MR
MAGNA 868	8	AR	R	AR	AR	AR	R
MARICOPA	8	AR	AR	R	AR	R	AR
MARTINA	8	AR	AR	AR	R	AR	AR
MEDINA	8	R	R	R	AR	AR	-
MFE 803 **	8	AR	MR	MR	MR	AR	BR
MONARCA LAS PRADERAS	8	AR	AR	AR	R	R	MR
MONARCA SP INTA	8	AR	AR	AR	R	R	MR

Cultivar	GRI	Pulgón			Fitóftora	Fusariosis	Antracnosis
		Moteado	Verde	Azul			
PRO INTA CARMINA	8	AR	AR	MR	MR	AR	BR
PRO INTA SUPER MONARCA	8	AR	R	MR	MR	AR	MR
RD 69	8	R	AR	MR	-	R	S
RÍO GRANDE	8	AR	AR	-	-	AR	AR
SOFÍA	8	R	R	R	R	R	R
SORAYA	8	R	AR	MR	R	AR	AR
TOPPER	8	R	MR	MR	AR	AR	R
URUALFA 8	8	R	AR	AR	AR	AR	AR
VERDOR	8	R	R	R	R	AR	R
WL 818	8	AR	AR	AR	AR	AR	AR
YOLO	8	AR	AR	R	AR	MR	AR
5939	9	AR	AR	AR	AR	AR	R
59 N 59	9	AR	AR	MR	R	AR	R
ACA 903	9	R	-	AR	AR	AR	R
BACANA	9	AR	AR	AR	AR	AR	MR
BAR PAL 139	9	R	AR	R	AR	AR	AR
BAR PAL 149	9	R	MR	AR	MR	R	MR
BAR PAL 290	9	R	R	MR	R	R	MR
BAR VRD	9	AR	R	AR	R	AR	R
BARALFA 9242	9	AR	AR	AR	AR	R	R
BÁRBARA SP INTA	9	R	MR	R	R	AR	MR
BRAVA GS	9	MR	AR	AR	AR	MR	R
CATALINA (SW)	9	AR	R	ME	R	AR	-
CAUTIVA	9	R	AR	AR	MR	R	MR
CAUTIVA II	9	AR	AR	R	AR	AR	AR
CW 194	9	R	AR	AR	R	AR	R
CW 194 PREMIUM	9	AR	AR	AR	R	AR	R
CW 197	9	AR	AR	R	AR	MR	AR
DK 191	9	AR	AR	AR	AR	AR	AR



Cultivar	GRI	Pulgón			Fitóftora	Fusariosis	Antracnosis
		Moteado	Verde	Azul			
DK 192	9	R	R	R	R	R	T
DK 193	9	AR	AR	AR	AR	AR	MR
DK 194	9	AR	AR	AR	AR	AR	AR
EBC 90	9	MR	-	R	AR	-	R
EBC 909 Max	9	AR	AR	AR	R	AR	R
EXP LT 58-39	9	-	AR	AR	AR	AR	R
G 969	9	R	AR	AR	R	AR	AR
G 969 +	9	AR	AR	AR	AR	AR	AR
GALIA	9	AR	R	R	AR	AR	R
GITANA	9	R	R	R	MR	AR	R
HÉRCULES	9	MR	MR	-	R	-	-
LIMAY PV INTA	9	R	AR	R	MR	AR	R
LPS 8500	9	AR	AR	AR	AR	AR	MR
LPS 9500	9	AR	AR	AR	AR	AR	R
LPS 9501	9	AR	R	AR	R	AR	R
MAGNA 4 N 900	9	AR	-	AR	AR	AR	R
MAGNA 901	9	AR	R	R	AR	AR	R
MAITENA	9	AR	AR	AR	AR	AR	AR
MECHA	9	AR	AR	AR	AR	AR	AR
MH RD1 SS	9	-	-	-	-	-	-
MH RD1 SS*	9	-	-	-	-	-	-
MILONGA	9	AR	R	AR	AR	AR	R
MILONGA II	9	AR	AR	AR	AR	AR	AR
MILONGA III	9	AR	AR	AR	R	R	R
NEO ALFA	9	R	AR	AR	R	AR	AR
PANALFA 90	9	AR	AR	AR	AR	AR	R
PATRIARCA	9	AR	-	R	R	R	R
PF 9000	9	AR	AR	AR	AR	R	AR
PGW931	9	AR	R	R	AR	R	AR

Cultivar	GRI	Pulgón			Fitóftora	Fusariosis	Antracnosis
		Moteado	Verde	Azul			
PRO INTA MORA	9	R	MR	R	MR	R	R
QUEEN 910	9	R	AR	R	AR	AR	AR
SALINA PV	9	AR	R	AR	AR	MR	BR
SALTANA	9	AR	R	AR	R	AR	-
SUPERSONIC	9	R	R	AR	R	R	MR
SUPERSTAR	9	AR	AR	R	AR	AR	MR
SUPREMA	9	-	R	AR	MR	AR	R
SW 9215	9	AR	R	AR	R	AR	-
SW 9628	9	AR	R	R	R	R	-
TARGET 990	9	R	AR	AR	AR	AR	AR
TIGRESA	9	R	R	-	R	R	R
TITÁN 9	9	AR	R	-	AR	-	-
TRAFUL INTA PV	9	R	AR	AR	R	AR	MR
TRINIDAD 87	9	AR	AR	AR	MR	AR	S
URUALFA 9	9	AR	AR	R	AR	AR	AR
VILLA	9	MR	R	R	R	R	MR
WL 903	9	AR	AR	AR	AR	AR	MR
WL 919	9	AR	AR	AR	AR	AR	R
ZAINO	9	AR	AR	R	AR	AR	AR
ZZ 809 S	9	R	R	R	R	R	R
SALADO	9,5	R	MR	AR	-	R	-
BAL PAL 10	10	AR	R	R	MR	AR	R
CS 03	10	R	R	MR	R	-	BR
CS 04	10	R	R	R	BR	-	S
CS 05	10	MR	R	R	BR	-	S
CW 1010	10	AR	AR	AR	AR	AR	R
EXP G 10	10	AR	-	R	AR	AR	MR
MIREYA	10	AR	AR	AR	AR	AR	MR
MIREYA II	10	AR	AR	AR	AR	AR	R
ROSILLO	10	AR	AR	AR	R	AR	-

Cultivar	GRI	Pulgón			Fitóftora	Fusariosis	Antracnosis
		Moteado	Verde	Azul			
RUANO	10	AR	AR	AR	R	AR	R
SARDI 10	10	AR	R	R	MR	AR	R
SW 10	10	AR	R	R	R	AR	MR
URUALFA 10	10	AR	AR	R	AR	AR	AR
WL 1058	10	AR	AR	AR	AR	AR	AR
WL 1090	10	AR	R	AR	AR	R	MR

## Consideraciones finales

Si bien la información presentada en este capítulo ha sido generada en ensayos conducidos bajo condiciones de corte, es importante mencionar que existe suficiente evidencia en favor de que el ordenamiento de los cultivares por producción de forraje y persistencia bajo condiciones de pastoreo no difiere mayormente de observada bajo corte (Kallenbach et al., 2002; Miller, 1993; Mombelli y Spada, 1995). Esta información adquiere una gran trascendencia para el país, dado que gran parte de la superficie cultivada con alfalfa se utiliza en condiciones de pastoreo directo.

El alto número de cultivares actualmente disponibles en el mercado y la fuerte interacción cultivar\*localidad tornan imprescindible el poder contar con información sobre el comportamiento de cada variedad en el área específica donde se implantará el cultivo. A eso precisamente apuntan las redes de evaluación de cultivares, tanto públicas (INTA) como privadas. También sobre la base de la marcada influencia que el ambiente ejerce sobre el comportamiento de los cultivares, es importante que los programas de mejoramiento para el desarrollo de variedades incluyan como objetivos de selección de genotipos la adaptación a diferentes áreas ecológicas, o al menos a macroambientes particulares.

## AGRADECIMIENTOS

Este capítulo se pudo escribir gracias a la información producida por los responsables de la conducción de los ensayos y el personal de campo que participa en cada localidad de la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa del INTA. Un especial reconocimiento a los profesionales responsables en cada unidad: Laura Fontana, Luis Romero, Mario Funes, Mónica Cornacchione, Juan José Gallego, Fernanda Neira Zilli, María Cecilia Sardiña, Cristina Ugarte, Jessika Cavalieri, Alejo Ré, Damián Zamora, Dardo Fontanella, Agustín Pazos, Eduardo Matinatta, Miguel Amigone, Sebastián Chiacchiera, Juan Martín García, Elena Di Nucci de Bedendo y Verónica Casado.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADURIZ, M.A.; A.O. GALGANO; M.C. SALDUNGARAY. 1997. *Asociaciones de pasto llo-rón con alfalfas de diferente latencia*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 17(2): 125-137.
- AROLFO, V.; A. ODORIZZI. 2015. *Avances en Alfalfa. Ensayos territoriales*. EEA Manfredi, INTA, Año 25, N.º 25, 63 p.
- AROLFO, V.; A. ODORIZZI. 2016. *Avances en Alfalfa. Ensayos territoriales*. EEA Manfredi, INTA, Año 26, N.º 26, 83 p.
- AROLFO, V.; A. ODORIZZI. 2017. *Avances en Alfalfa. Ensayos territoriales*. EEA Manfredi, INTA, Año 27, N.º 27, 67 p.
- AROLFO, V.; A. ODORIZZI. 2018. *Avances en Alfalfa. Ensayos territoriales*. EEA Manfredi, INTA, Año 28, N.º 28, 91 p.
- BERTRAND, A.; M. BIPFUBUSA; A. CLAESSENS; S. ROCHER; Y. CASTONGUAY. 2017. *Effect of photoperiod prior to cold acclimation on freezing tolerance and carbohydrate metabolism in alfalfa (Medicago sativa L)*. *Plant Science* 264: 122-128.
- BUSBICE, T.H.; C.P. WILSIE. 1965. *Fall growth, winter hardiness, recovery after cutting and wilt resistance in F2 progenies of Vernal x DuPuits alfalfa crosses*. *Crop Sci.* 5: 429-432.
- BRUMMER, E.C.; M.M. SHAH; D. LUTH. 2000. *Re-examining the relationship between fall dormancy and winter hardiness in alfalfa*. *Crop Sci.* 40: 971-977.
- BRUMMER, C. K.; J. MOORE; C. BJORK. 2002. *Agronomic consequences of dormant-nondormant alfalfa mixtures*. *Agron. J.* 97: 782-785.
- BRUNO, O.A. 2004. *Estadísticas y evolución productiva de cultivares forrajeros. Leguminosas (alfalfa y tréboles)*. *Forrajes 2004-Cómo producir y aprovechar el forraje eficientemente en la empresa agropecuaria del futuro*. Seminario Técnico. Buenos Aires, Argentina. 81-84 pp.
- CÁMARA DE SEMILLERISTAS DE LA BOLSA DE CEREALES. 2008. *Pastura Test. Resultados de la campaña 2007/08*. Buenos Aires, Argentina, 96 p.
- CÁMARA DE SEMILLERISTAS DE LA BOLSA DE CEREALES 2012. *Pastura Test. Resultados de la campaña 2011/12*. Buenos Aires, Argentina, 40 p.

- CÁMARA DE SEMILLERISTAS DE LA BOLSA DE CEREALES 2014. *Pastura Test. Resultados de la campaña 2013/14*. Buenos Aires, Argentina, 60 p.
- CÁMARA DE SEMILLERISTAS DE LA BOLSA DE CEREALES 2016. *Pastura Test. Resultados de la campaña 2015/16*. Buenos Aires, Argentina, 27 p.
- CÁMARA DE SEMILLERISTAS DE LA BOLSA DE CEREALES 2018. *Pastura Test. Resultados de la campaña 2017/18*. Buenos Aires, Argentina, 32 p.
- CANGIANO, C.A. 2002. *Rendimiento y persistencia de cultivares*. En: CANGIANO, C.A.; L. ABDELHADI (Eds.). *Manual de Alfalfa (CD)*. INTA. Buenos Aires, Argentina. 111-159 pp.
- CASLER, M.; D.J. UNDERSANDER. 2000. *Forage Yield precision, experimental design, and cultivar mean separation for alfalfa cultivar trials*. *Agron. J.* 92: 1064-1071.
- CASTONGUAY, Y.; P. NADEAU; P. LECHASSEUR; L. CHOUINARD. 1995. *Differential accumulation of carbohydrates in alfalfa cultivars of contrasting winter hardiness*. *Crop. Sci.* 35: 509-516.
- CUNNINGHAM, S.M.; J.J. VOLENEC; L.R. TEUBER. 1998. *Plant survival and root and bud composition of alfalfa populations selected for contrasting fall dormancy* *Crop Sci.* 38: 962-970.
- CUNNINGHAM, S.M.; J.A. GANA; J.J. VOLENEC; L.R. TEUBER. 2001. *Winter hardiness, root physiology, and gene expression in successive fall dormancy selections from 'Mesilla' and 'CUF 101' alfalfa* *Crop Sci.* 41: 1091-1098.
- DEMIRBAG, N.S.; OZKAN, U. 2016. *Effects of Fall Dormancy and Cutting Times on Alfalfa's Forage Yield and Quality Components Under Central Anatolian Conditions*. *Journal of Applied Biological Sciences* 10 (3): 61-64.
- DUBOIS, M. 2004. *La evolución del mercado varietal forrajero y la red de ensayos de la cámara de semilleras*. *Forrajes 2004-Cómo producir y aprovechar el forraje eficientemente en la empresa agropecuaria del futuro*. Seminario Técnico. Buenos Aires, Argentina. 77-80 pp.
- HAAGENSON, D.M.; S.M. CUNNINGAM; J.J. VOLENEC. 2003. *Root physiology of less fall dormant, winter hardy alfalfa selections*. *Crop Sci.* 43: 1441-1447.
- HALL, M.; W.S SMILES; R.A. DICKERSON. 2000. *Morphological development of alfalfa cultivars selected for higher quality*. *Agron J.* 92: 1077-1080.
- HIJANO, E.H.; D.H. BASIGALUP; O.A. BRUNO; R.J. LEON; G. RINALDI; M. DEL C. SPADA. 1986. *Diagnósticos comparativos de problemas radiculares de alfalfa en tres localidades de la Argentina*. *Revista Agronómica de Manfredi (RAM)* 2 (2): 5-21.
- HIJANO, E.H. 1993. *Variedades mejoradas: ¿Superan a las alfalfas comunes?* *Anguil a Toda Alfalfa*. 3.º Jornada de Actualización para Productores Agropecuarios. EEA Anguil INTA. Anguil, La Pampa, Argentina. 1-3 pp.
- INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS, 2019. *Catálogo Nacional de Cultivares*. (Disponible: <https://gestion.inase.gov.ar/consultaGestion/gestiones consultado: 21/3/2019>).

- KALLENBACH, R.L.; C.J. NELSON; J.H. COUTTS. 2002. *Yield, quality, and persistence of grazing- and hay-type alfalfa under three harvest frequencies*. *Agron. J.* 94: 1094-1103.
- KNIPE, B.; P. REISEN; M. MCCASLIN. 1997. *The importance of fall dormancy to yield, persistence and forage quality*. *Proceedings 27th California Alfalfa Symposium*. University of California. (Disponible: <http://alfalfa.ucdavis.edu> consultado: 22/5/2019).
- KNIPE, B.; P. REISEN; M. MCCASLIN. 1998. *The relationship between fall dormancy and stand persistence in alfalfa varieties*. *Proceedings 28th California Alfalfa Symposium*. University of California. (Disponible: <http://alfalfa.ucdavis.edu> consultado: 22/5/2019).
- LIU, Z.; X. LI; Z. WANG; Q. SUN. 2015. *Contrasting strategies of alfalfa stem elongation in response to fall dormancy in early growth stage: the tradeoff between internode length and internode number*. *PLoS ONE* 10(8): e0135934. doi:10.1371/journal.pone.0135934
- MARBLE, V. 1986. *Relative advantages of different dormancies of alfalfa grown in Central and Northern California*. *Proceedings 18th California Alfalfa and Forage Symposium*. (Disponible: <http://alfalfa.ucdavis.edu> consultado: 27/6/2019).
- MCKENZIE, J.C.; R. PAQUIN; S.H. DUKE. 1988. *Cold and heat tolerance*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL, Jr. (Eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA/CSSA/SSSA, Agronomy Monograph 29. Madison, Wisconsin. 259-302 pp.
- MILLER, D.R. 1993. *Alfalfa disease and resistant varieties*. *Proceedings 23rd California Alfalfa and Forage Symposium*. (Disponible: <http://alfalfa.ucdavis.edu> consultado: 29/4/2019).
- MOMBELLI, J.C.; M. DEL C. SPADA. 1995. *Adaptación al pastoreo de cultivares de alfalfa con distinto grado de reposo*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 15 (1): 278-280.
- NORTH AMERICAN ALFALFA IMPROVEMENT CONFERENCE. 1998. FOX, C.; R. BERBERET; F. GRAY; C. GRAU; D. JESSEN; M. PETERSON (Eds.). *Standard Tests to Characterize Alfalfa Cultivars (3rd edition)*. (Disponible: <http://naaic.org> consultado: 21/3/2019).
- PECE, M.A.; C.A. CANGIANO. 2003. *Tasa de acumulación de la biomasa aérea en dos cultivares de alfalfa (Medicago sativa L.) en Balcarce*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 23(1)33-34.
- PEMBLETON; K.G.; P. SATHISH. 2014. *Giving drought the cold shoulder: a relationship between drought tolerance and fall dormancy in an agriculturally important crop*. *AoB PLANTS* 6: plu012. doi:10.1093/aobpla/plu012
- POOLE, G.; D. PUTNAM; S. ORLOFF. 2003 *Considerations in choosing an alfalfa variety*. *Proceedings 33rd California Alfalfa and Forage Symposium*. 191-200 pp. (Disponible: <http://alfalfa.ucdavis.edu> consultado: 29/4/2019).
- PUTNAM, D.; S. ORLOFF. 2003. *Using varieties or cutting schedules to achieve quality hay – What are the tradeoffs*. *Proceedings 33rd California Alfalfa and Forage Symposium*. 201-214 pp. (Disponible: <http://alfalfa.ucdavis.edu> consultado: 29/4/2019).
- PUTNAM, D.; S. MUELLER; C. FRATE; M. CANEVARI; AND S. ORLOFF. 2012. *Key practices for alfalfa stand establishment*. *Proceedings, California Alfalfa and Grain Symposium, Sacramento, CA*. UC Cooperative Extension, Agronomy Research and Extension

Center, Plant Sciences Department, University of California, Davis 95616. (Disponible: <http://alfalfa.ucdavis.edu> consultado: 25/7/2019).

ROSSANIGO, R.; M. DEL C. SPADA; O.A. BRUNO. 1995. *Evaluación de cultivares de alfalfa y panorama varietal en la Argentina*. En: HIJANO, H; A. NAVARRO (Eds.). *La alfalfa en la Argentina*. Enc. Agro de Cuyo, Manuales N.º 11. San Juan, Argentina. 78 pp.

SHEAFFER, C.C.; G.D. LACEFIELD; V.L. MARBLE. 1988. *Cutting schedules and stands*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL, Jr. (Eds.) *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA/CSSA/SSSA, Agronomy Monograph 29. Madison, Wisconsin. 412-430 pp.

SHEAFFER, C.C.; D.K. BARNES; D.D. WARNES; W.E. LUESCHEN; H.J. FORD; D.R. SWANSON. 1992. *Seedling-year cutting effects on winter survival and its association with fall growth score in alfalfa*. *Crop. Sci.* 32: 225-231.

SPADA, M. DEL C. 2003. *¿Cómo se acumula la producción de forraje de alfalfa?* Jornada Técnica *Todo Alfalfa*. Área de Producción Animal. EEA Manfredi, INTA, 18 p.

SPADA, M. DEL C. 2004. *Avances en Alfalfa*. Ensayos territoriales. EEA Manfredi, INTA, Año 14, N.º 14, 48 p.

SPADA, M. DEL C. 2006. *Avances en Alfalfa*. Ensayos territoriales. EEA Manfredi, INTA, Año 16, N.º 16, 70 p.

SPADA, M. DEL C. 2008. *Avances en Alfalfa*. Ensayos territoriales. EEA Manfredi, INTA, Año 18, N.º 18, 88 p.

SPADA, M. DEL C. 2010. *Avances en Alfalfa*. Ensayos territoriales. EEA Manfredi, INTA, Año 20, N.º 20, 89 p.

SPADA, M. DEL C. 2012. *Avances en Alfalfa*. Ensayos territoriales. EEA Manfredi, INTA, Año 22, N.º 22, 97 p.

SPADA, M. DEL C. 2013. *Avances en Alfalfa*. Ensayos territoriales. EEA Manfredi, INTA, Año 23. N.º 23, 75 p.

SPADA, M. DEL C. 2014. *Avances en Alfalfa*. Ensayos territoriales. EEA Manfredi, INTA, Año 24, N.º 24, 98 p.

TEUBER, L.R.; K.T. TAGGARD; L.K. GIBBS; S. ORLOFF. 1995. *Characterization of a Certified Alfalfa Cultivar: Importance and Evaluation of Fall Dormancy*. *Proceedings 25th California Alfalfa and Forage Symposium*. (Disponible: <http://alfalfa.ucdavis.edu> consultado: 2/5/2019).

TEUBER, L.R.; K.L. TAGGARD; L.K. GIBBS; M.H. MCCASLIN; M.A. PETERSON; D.K. BARNES. 1998 (revised). *Fall Dormancy*. En: FOX, C.; R. BERBERET; F. GRAY; C. GRAU; D. JESSEN; M. PETERSON. (Eds.). *Standard Test to Characterize Alfalfa Cultivars (3rd edition)*. Published by North American Alfalfa Improvement Conference. *Agronomic Tests*. A-1 p.

VENTRONI, L.M.; J.J. VOLENEC; CANGIANO, C.A. 2010. *Fall dormancy and cutting frequency impact on alfalfa yield and yield components*. *Field Crops Research* 119: 252-259. doi: 10.1016/j.fcr.2010.07.015

VOLENEC, J.J.; S.M. CUNNINGHAM; D.M. HAAGENSON; W.K. BERG; B.C. JOERN; D.W. WIERSMA. 2002. *Physiological genetics of alfalfa improvement: past failures, future prospects*. *Field Crops Research* 75 (2-3): 97-110. (Disponible: <http://Elsevier Science> consultado: 12/3/2019).

WEISHAAR, M.A.; C. BRUMMER; J.J. VOLENEC. 2002. *Selecting for Winter Hardiness in Non-Dormant Alfalfa*. *Proc. 38th NAAIC, Sacramento, CA*. 76 p. (Disponible: <http://naaci.org> consultado: 21/3/2019).

YAN, W.; L.A. HUNT; Q. SHENG; Z. SZLAVNICS. 2000 *Cultivar Evaluation and Mega-Environment Investigation Based on the GGE Biplot*. *Crop Sci.* 40: 597-605.

ZANIBONI, C.M.; A. DILLON. 1999. *Evaluación bajo pastoreo de cultivares de alfalfa con distinto reposo invernal*. *Publicación Técnica N.º 28*. EEA General Villegas, INTA, 2 p.



## CAPÍTULO 9

### Enfermedades de la alfalfa

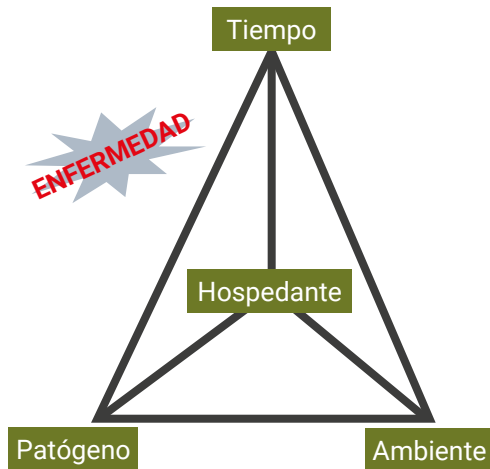
Valeria Arolfo, Verónica M.  
Trucco, Fabian J. Giolitti  
y Daniel H. Basigalup

## Introducción

La productividad y la persistencia del cultivo de alfalfa pueden ser afectadas por numerosos factores de tipo abiótico (salinidad, acidez, sequía, anegamiento, niveles tóxicos de aluminio, entre otros) y biótico. Las enfermedades representan uno de los factores bióticos más importantes provocando pérdidas económicas de dos tipos: directas, por menores rendimientos derivados de la mortandad de plantas o la disminución del vigor, pérdidas de calidad por manchas foliares y defoliación; e indirectas, debidas a disminución del valor nutricional del forraje por presencia de micotoxinas, disminución de la nodulación y de la consecuente fijación de  $N_2$ , mayor susceptibilidad al ataque de insectos y proliferación de malezas agresivas, entre otros.

De acuerdo con Stuteville y Erwin (1990), las enfermedades son el resultado de la interacción entre hospedantes susceptibles, patógenos virulentos y condiciones ambientales predisponentes, incluyendo entre estas no solo los aspectos edáficos y climáticos –como temperatura, humedad y lluvias–, sino también los vectores y las prácticas culturales. La relación entre los tres componentes hospedante-patógeno-ambiente fue inicialmente representada mediante el triángulo de la enfermedad, donde cada componente se ubicaba en un vértice. Luego, se sugirió la representación de estas interacciones mediante un tetraedro donde se agregó al tiempo como un cuarto elemento (Figura 1), ya que los tres primeros componentes no solo deben estar en condiciones favorables para la infección, sino que deben permanecer así por un período para que ocurra la enfermedad (Castaño Zapata, 2002).

En Estados Unidos (EUA) se han identificado alrededor de 50 agentes patógenos capaces de dañar a la alfalfa, entre los que se encuentran hongos, bacterias, nematodos, virus y fitoplasmas (Graham *et al.*, 1979). Obviamente, solo una parte de este universo de patógenos –por severidad, distribución y frecuencia de ataque– es responsable de pérdidas económicas en los lotes de producción. En Argentina, se ha señalado un número similar de patógenos que pueden afectar al cultivo, y la mayoría presenta diverso grado de importancia regional o zonal (Hijano y Pérez Fernández, 1995; Trucco *et al.*, 2018).



■ **Figura 1.** Tetraedro de la enfermedad. Adaptado de Castaño Zapata (2002).

En este capítulo se presentan las enfermedades más importantes que afectan al cultivo de alfalfa en Argentina, incluyendo una breve descripción de sus síntomas y algunas medidas de control. Además, se mencionan otras enfermedades que, si bien no han alcanzado un grado importante de difusión en el país, pueden eventualmente ocasionar cierto nivel de daño económico.

## Principales enfermedades de la alfalfa en Argentina

La alfalfa, al ser un cultivo perenne, se ve expuesta a numerosas enfermedades. Para facilitar su tratamiento estas pueden clasificarse –según el órgano de la planta que afectan en mayor proporción– en enfermedades de raíz y corona y enfermedades foliares (tallos y hojas). La naturaleza perenne de la alfalfa y la elevada supervivencia de muchos patógenos reducen la efectividad de la rotación de cultivos como práctica cultural en el control de enfermedades, siendo el uso de cultivares resistentes a patógenos e insectos vectores la práctica más importante para el control de las principales enfermedades.

A continuación, y con base en esta clasificación, se describirán brevemente los principales problemas sanitarios observados en el país. Por un lado, una revisión más profunda sobre el tema puede consultarse en Hijano y Pérez Fernández (1995) y en Ostazeski e Hijano (1986). Por otro lado, el tratamiento completo de todas las enfermedades que afec-

tan al cultivo puede encontrarse en Stuteville y Erwin (1990), en Leath et al. (1988) y en Graham et al. (1979).

### *Enfermedades de raíz y corona*

Los patógenos de este grupo al destruir directamente los tejidos de la corona y de la raíz reducen las capacidades de absorción y de anclaje, de fijación simbiótica del  $N_2$  y de almacenamiento de reservas. Por lo general estas enfermedades tienen un desarrollo lento que puede acelerarse en condiciones de estrés. En algunos casos los patógenos afectan principalmente el xilema –que es la vía para el transporte del agua dentro de la planta– y causan los llamados marchitamientos, con síntomas evidentes en el follaje.

Dentro de enfermedades de corona y raíz, las más significativas son las causadas por hongos, entre las que pueden mencionarse:

#### *Podredumbre húmeda o fitóftora*

Esta enfermedad es causada por el hongo *Phytophthora megasperma* Drechs. f. sp. *medicaginis*, que se ve favorecido por condiciones de suelo muy húmedo o inundado, ya sea por riego inadecuado, lluvias intensas o inundaciones naturales.

Cuando afecta a plántulas durante el establecimiento, causa necrosis de la raíz o base del tallo, provocando su muerte (*damping-off*). En plantas adultas los síntomas característicos se localizan en las raíces, donde se observan inicialmente lesiones pardas de márgenes difusos, que generalmente se sitúan en la inserción de las raíces laterales y que con el tiempo se oscurecen, llegando a pardo oscuras o negras. Estas lesiones provocan primero la muerte de las raicillas y finalmente la de la raíz principal, normalmente a la profundidad en que el drenaje de agua se encuentra interrumpido (Figura 2A1 y A2). A menudo la raíz principal desarrolla numerosas raíces secundarias y raicillas por encima de la lesión, extendiendo el período de supervivencia de la planta, que puede producir forraje si las condiciones de humedad se mantienen.

Si se practican cortes transversales de la raíz, se aprecia una coloración amarillenta a marrón clara tanto de los tejidos corticales como del

xilema. El follaje de las plantas afectadas adquiere una coloración marrón-rojiza y presenta un evidente retardo del rebrote luego del corte o pastoreo; en estadios más avanzados, el follaje se marchita y finalmente la planta muere. Si bien la infección puede producirse en cualquier época del año, la manifestación de los síntomas y los mayores daños se observan principalmente en primaveras y otoños húmedos.

El movimiento de las oosporas, que son las estructuras de dispersión del patógeno, se ve favorecido en suelos bajos y nutricionalmente pobres, con altos contenidos de arcilla y limo, mal drenados o de lenta percolación, que se tornan anegadizos en períodos de lluvias abundantes. Tanto la incidencia como la severidad de la enfermedad son mayores en los suelos saturados que en los insaturados, fruto de la asociación con factores físicos y químicos entre las zoosporas y las raíces (Kuan y Erwin, 1980). En consecuencia, la cuenca lechera de Santa Fe, caracterizada por la presencia de suelos muy arcillosos (horizonte B textural) y con problemas de drenaje, ofrece condiciones ideales para la supervivencia del patógeno y el desarrollo de la enfermedad. En otros casos, el patógeno se ve favorecido por el encharcamiento que suele producirse por la deficiente sistematización de los lotes que se riegan por inundación. Este hongo puede sobrevivir por tiempos prolongados como oosporas y, cuando las condiciones de alta humedad edáfica se presentan, es capaz de infectar a la alfalfa aun después de varios años de rotación con otros cultivos (Stack y Millar, 1985; El-Hamalawi y Erwin, 1986).

La forma más económica y eficaz de control es la utilización de cultivares resistentes. En la actualidad la mayoría de los cultivares que se ofrecen en el mercado nacional tienen de buenos a muy buenos niveles de resistencia genética a la enfermedad. En suelos pesados o con antecedentes graves de fitóftora, el tratamiento de las semillas con fungicidas (metalaxyl o mefenoxan) puede otorgar una protección adicional a las plántulas, previniendo el *damping-off* y favoreciendo una mejor implantación del cultivo. En suelos deficientes la fertilización con fósforo (P) y azufre (S) durante la implantación, a fin de promover un crecimiento rápido y vigoroso de la alfalfa, puede contribuir a mantener una buena población de plantas. La elección de lotes con buen drenaje o la realización de labores culturales que faciliten la infiltración o la eliminación de los excesos hídricos (cincelados, subsolados, canales

de drenaje, nivelación, etc.) pueden contribuir a la atenuación –no a la eliminación– del problema.

### *Fusariosis o marchitamiento*

Es una enfermedad causada por el hongo *Fusarium oxysporum* Schl. f. *sp. medicaginis* (Weimer) Syn. & Hans. Este patógeno sobrevive en restos de tejidos vegetales como micelio y en el suelo puede permanecer como clamidosporas por varios años sin perder su capacidad infectiva.

El follaje de las plantas severamente afectadas presenta el color verde-amarillento a pajizo típico del marchitamiento, con tallos cortos, escasos rebrotes basales y una evidente disminución en la velocidad de rebrote luego de un corte o pastoreo. Si se practica una sección transversal de la raíz se observa una coloración parda, en forma de anillo, originada por la necrosis de los tejidos vasculares; conforme avanza la enfermedad, la necrosis puede afectar todos los tejidos radiculares (Figura 2B1 y B2). Los daños de la raíz causados por insectos de suelo o por nematodos son una vía de entrada para el patógeno, lo que incrementa la incidencia de la enfermedad. Contrariamente a lo señalado para fitóftora, los suelos sueltos y bien drenados, con moderados contenidos hídricos, constituyen condiciones ideales para este patógeno; complementariamente, las elevadas temperaturas edáficas durante el verano favorecen su desarrollo y diseminación. En el cultivo la infección se distribuye en forma irregular, como parches dispersos o manchones. La única vía efectiva de control es el empleo de cultivares resistentes, de los cuales existe un alto número en el mercado.

### *Corchosis*

Esta enfermedad es causada por *Xylaria* spp., hongo identificado por primera vez en Argentina en 1985 y cuya incidencia fue estimada entre el 22 y el 42 % en alfalfares establecidos (Hijano y Huego, 1985). La infección puede producirse en el primer año de vida de la planta, necrosando inicialmente las raíces laterales, aunque los síntomas se hacen generalmente visibles a partir del segundo o tercer año. No se observan síntomas en follaje, aunque la ausencia de rebrote o su retraso son indicadores de la presencia de la enfermedad. Los síntomas

típicos se localizan en la raíz y la corona, donde es posible observar una podredumbre seca (cancro) de aspecto corchoso que caracteriza a la enfermedad (Figura 2C), a lo que se suma la ausencia de raíces laterales. Una vez iniciado, el cancro crece lentamente y va adquiriendo una coloración pardo clara a grisácea, usualmente asociada a regiones blanquecinas que corresponden al micelio del patógeno. A medida que la enfermedad progresa, el cancro va aumentando de tamaño y termina por desprenderse de la raíz. Finalmente, las plantas afectadas mueren y son invadidas totalmente por el micelio del hongo, que conforme envejece va adquiriendo una coloración verde oliva a negra.

La corchosis causa importantes daños en todo el país, principalmente en cultivos mayores a los dos años de edad. Además, el daño mecánico por cortes a muy baja altura o las heridas producidas en la corona por el pisoteo de los animales en pastoreo con condiciones de poco piso favorecen la penetración de *Xylaria* spp. En la actualidad, no existen cultivares de alfalfa con altos niveles de resistencia al patógeno, por lo que la rotación con cultivos no hospedantes –como gramíneas y *Melilotus* spp.– por un período de tres a cuatro años puede atenuar la presencia del patógeno en el lote.

Ante la ausencia de fuentes de resistencia genética y de protocolos de selección, la identificación de plantas libres de síntomas en alfalfares de tres o más años y su posterior inter cruzamiento constituye la única herramienta disponible para aumentar el número de plantas resistentes en una población de alfalfa. En ese contexto, los programas de mejoramiento nacionales ofrecen una apreciable ventaja frente a los cultivares que se desarrollan en el extranjero, donde la enfermedad no existe.

### *Complejo de podredumbres de corona y raíz*

Enfermedad que comprende un complejo de hongos de varios géneros y especies, entre las que se pueden mencionar: *Pythium* spp., *Phoma* spp., *Colletotrichum trifolii* Bain & Essary, *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *medicaginis*, *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. roseum* Link. Ex Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn. A este conjunto de hongos se suelen agregar otros organismos –tanto patógenos (bacterias y nematodos) como saprófitos– que, interactuando con el ambiente, confluyen sinérgica-

mente para producir las podredumbres de corona y raíz. Por lo tanto, es de lenta evolución y se inicia con la aparición en la corona de áreas necrosadas de coloración parda, que seguidamente se extienden al tejido cortical de la raíz. Conforme avanza la enfermedad, la necrosis se expande por la corona y hace disminuir el número de brotes basales y el vigor general de la planta (Figura 2D1 y D3). No se aprecian síntomas en el follaje, aunque la ausencia o el retraso de los rebrotes son indicios de la presencia de la enfermedad. En plantas de tres o más años es usual observar áreas huecas en la parte superior de las raíces o en la corona de las plantas afectadas. La producción de lesiones en la corona o en la raíz por diferentes motivos (gorgojos, gusanos blancos, cortes frecuentes y a muy baja altura, pisoteo por animales, etc.) facilitan la infección del complejo de patógenos antes mencionado. Asimismo, las condiciones de estrés que pueda sufrir la planta (enfermedades foliares, sequía, deficiencias nutricionales, etc.) favorecen la proliferación del problema.

En diferentes localidades de la región Pampeana se estimaron incidencias de la enfermedad entre 12 % y 30 % en alfalfares de cuatro años (Hijano *et al.*, 1986). La imposibilidad de definir protocolos de selección efectivos para este complejo de patógenos hace que no se cuente con cultivares resistentes. Sin embargo, la utilización de variedades con resistencia genética a algunos de los agentes indicados –como *Fusarium*, *Phoma* y *Colletotrichum trifolii*– puede contribuir a atenuar el desarrollo de la enfermedad. La adopción de prácticas culturales que eviten daños a la corona (no realizar cortes muy bajos, con cuchillas desafiladas; realizar los cortes o pastoreos respetando los ciclos de acumulación de reservas; no pastorear con falta de piso; etc.) disminuyen las vías de entrada de los patógenos y, por ende, reducen la difusión de la enfermedad.

### *Antracnosis*

Enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum trifolii* Bain & Essary. En Argentina se ha identificado solo la raza 1 de este patógeno, mientras que en Estados Unidos se identificaron cinco razas, de las cuales las 1 y 2 son las de mayor distribución y las tres restantes están circunscriptas a regiones puntuales (Rodgers *et al.*, 2016). Este hongo sobrevive de un año a otro en tallos, coronas y restos vegetales muertos en forma de picnidios. En plantas afectadas, se observan lesiones elípticas localizadas



en el tercio inferior de los tallos, de color pajizo y bordes oscuros, donde a menudo es posible apreciar unas puntuaciones negras y que son las fructificaciones del hongo (picnidios) (Figura 2E1 y E2). Los tallos afectados, al manifestar signos de deficiencia hídrica, adquieren primero la típica forma de bastón y luego, conforme avanza la infección, se marchitan completamente, pero conservando adheridas las hojas secas; finalmente, los tallos afectados acaban quebrándose. En estados avanzados de la enfermedad, la corona presenta áreas necrosadas de coloración azul-negruzca. En algunos casos, cuando la infección de la corona es muy severa, se puede producir la muerte de las plantas sin evidenciar síntomas en la parte aérea. Durante el período de establecimiento del alfalfar, el patógeno puede ocasionar la muerte de las plántulas (*damping-off*).

Las temperaturas elevadas y alta humedad edáfica favorecen el ataque del patógeno, por lo que es frecuente observar las primeras plantas afectadas luego del primer corte de primavera. La mayor incidencia de la enfermedad se verifica en veranos y otoños húmedos. Si se retrasa la utilización del alfalfar, el desarrollo del follaje ejerce la sombra suficiente como para aumentar las condiciones de humedad en la parte inferior de la canopia, lo que facilita la germinación de las esporas y la posterior penetración del patógeno en las plantas. Bajo estas condiciones, los daños pueden ser particularmente severos, a punto tal de producirse la necrosis completa de los tallos y de parte de la corona.

La forma más efectiva de control es mediante el empleo de cultivares resistentes, de los cuales hay muchos disponibles en el mercado. Además, el correcto manejo de la pastura, efectuando los cortes o pastoreos a principios de floración, puede disminuir su difusión. Cuando las condiciones de humedad ambiente son muy altas, adelantar los cortes o pastoreos también puede atenuar la difusión de la enfermedad. Asimismo, la eliminación de los residuos en los lotes y la rotación con gramíneas por un período de al menos dos a tres años pueden reducir la cantidad de inóculo disponible para futuras infecciones.

### *Rizoctonia*

Esta enfermedad, conocida también como manchón de los alfalfares, es causada por el hongo *Rhizoctonia croccorum* (Pers. ex Fr.) (sin. *R.*

*violacea* Tul. y *C. Tul.*), patógeno que puede subsistir en el suelo por períodos superiores a veinte años. Si bien en la actualidad a esta enfermedad se la suele detectar eventualmente en los lotes de alfalfa, no tiene la importancia que tuvo durante las primeras décadas del siglo XX. Las plantas afectadas manifiestan una típica podredumbre, en la que el micelio del patógeno invade completamente la zona radical. Las hifas del hongo forman una masa compacta de coloración violácea que envuelve externamente a la raíz (Figura 2F); la parte interna de esta se torna blanda y comienza a desagregarse. Sobre los tejidos necrosados es posible observar pequeños esclerocios de color negro. El follaje se marchita y se torna primero amarillento, luego castaño y finalmente se seca completamente, contrastando con el color verde de las plantas sanas circundantes. En el campo, el avance del patógeno se produce en forma irregular, observándose grandes círculos o manchones de plantas muertas en el lote.

Este hongo puede dispersarse rápidamente en condiciones de alta humedad, aunque es capaz de causar daños en una amplia gama de ambientes, inclusive en regiones semiáridas. La utilización de antecesores susceptibles –como los tréboles (*Trifolium* spp.) y el *Lotus corniculatus*– favorecen la aparición temprana del problema. Por lo tanto, la inclusión de gramíneas en la rotación puede contribuir a disminuir la incidencia de la enfermedad en suelos problemáticos; esta es la mejor medida de manejo ya que no existen variedades resistentes.





■ **Figura 2.** Síntomas de las principales enfermedades de la raíz y corona de alfalfa en Argentina. A) Podredumbre húmeda o fitóftora: lesiones típicas en raíces (A1); planta enferma (izquierda) versus planta normal (derecha) (A2). B) Fusariosis o marchitamiento: follaje afectado (B1); corte transversal de raíces y coronas afectadas (B2). C) Corchosis: corona y parte superior de la raíz mostrando la lesión característica de la corchosis; en el centro se aprecia el micelio del patógeno de color blanquecino. D) Complejo de podredumbre de corona y raíz: contraste entre planta sana (derecha) y plantas afectadas mostrando una evidente falta de rebrotes (D1); corte transversal de las plantas afectadas donde se observa la necrosis de corona que origina la ausencia de rebrote (D2) y diferentes grados de evolución de la enfermedad en corona y parte superior de la raíz (D3). E) Antracnosis: lesiones en el tercio inferior de tallos de alfalfa (E1); detalle de una lesión exhibiendo los picnidios (E2). F) Rizoctonia o manchón de los alfalfares: planta afectada por *Rhizoctonia croccorum*, exhibiendo la raíz principal totalmente envuelta por las hifas del patógeno. Imágenes tomadas de Gieco *et al.* (2007).

## Enfermedades foliares

Este tipo de enfermedades no ocasionan la muerte de la planta *per se*, pero al reducir su capacidad fotosintética disminuyen la energía total y promueven pérdidas del rendimiento y calidad forrajera. Aun cuando no produzcan defoliaciones importantes, pueden disminuir significativamente el contenido de carbohidratos no estructurales y de proteína en el forraje. Las defoliaciones severas, particularmente en el otoño, pueden causar un estrés general en las plantas y predisponerlas para el ataque de otros agentes patógenos, contribuyendo así a la pérdida de población durante el invierno. Como en el caso de las enfermedades de raíz y corona, se recomienda la rotación de cultivos con una no leguminosa para disminuir la carga de inóculo.

De modo general, las enfermedades foliares suelen ser particularmente dañinas en primaveras y otoños frescos y húmedos, siendo bastante frecuente encontrar a varios de estos patógenos infectando simultáneamente una misma hoja de alfalfa. Como norma general, los cultivares sin reposo invernal (GRI 8-10), que fueron originalmente desarrollados para ambientes secos, son más susceptibles a estos patógenos. No obstante, desde mediados de los años noventa, los programas de mejoramiento –particularmente nacionales– han logrado cultivares sin reposo con mejor sanidad de hoja.

A continuación, y atendiendo a su frecuencia y severidad, se describen las principales enfermedades foliares causadas por hongos, fitoplasma y virus; dentro de estas últimas, la mayoría son informadas en nuestro país por primera vez.

### Viruela

Enfermedad fúngica causada por *Pseudopeziza medicaginis* (Lib.) Sacc., patógeno considerado como uno de los más dañinos para el follaje de la alfalfa. Este hongo es capaz de sobrevivir en hojas muertas y causar infecciones secundarias cuando las condiciones ambientales son favorables para la germinación de sus esporas (ascosporas). Las plantas afectadas presentan manchas marrones o negras, pequeñas (2-3 mm de diámetro), de forma circular y de márgenes lisos o dentados, distribuidas más o menos uniformemente en los folíolos (Figura 3A). Estas

manchas constituyen el síntoma típico de la enfermedad. Sobre el haz de los folíolos, en las manchas más viejas, suelen desarrollarse estructuras de color castaño claro que corresponden a las fructificaciones del hongo (apotecios). Las ascosporas producidas por estas fructificaciones son difundidas por el viento o las gotas de lluvia, infectando así nuevas plantas en el cultivo, comenzando por las hojas inferior.

Los períodos prolongados de tiempo fresco y húmedo, particularmente durante la primavera y el otoño, constituyen condiciones ideales para el desarrollo de la viruela, pudiendo afectar prácticamente todo el follaje y provocar severas defoliaciones. Además, tanto el uso incorrecto del riego (sea por aspersión o por inundación) como el retraso de los cortes o pastoreos (que por efecto de sombreado aumentan la humedad de la parte inferior del canopeo), favorecen la proliferación de *P. medicaginis*. En lotes irrigados, la incidencia de la enfermedad es mayor, habiéndose registrado pérdidas superiores al 40 % de la producción de forraje (Morgan y Parberry, 1977). Existen en el mercado algunos cultivares que presentan una moderada resistencia al patógeno, pero su efectividad como medida de control no es muy alta. Por lo tanto, se recomienda no retrasar los cortes o pastoreos, aunque siempre respetando los ciclos fisiológicos de acumulación de reservas en la planta. En caso de tiempo muy húmedo puede ser necesario anticipar el corte o el pastoreo para evitar importantes pérdidas de calidad y rendimiento de forraje por defoliación, a la vez que se reduce sensiblemente la cantidad de inóculo para posteriores infecciones. La aplicación relativamente temprana de fungicidas sistémicos puede ser efectiva, aunque generalmente antieconómica.

### *Mancha ocular*

Enfermedad causada por el hongo *Leptosphaerulina briosiana* (Poll.) Graham & Luttrell. Este patógeno se difundió en todas las áreas alfalfadas del país a partir de la utilización masiva de los cultivares sin reposo invernal, cuya constitución genética los hace particularmente susceptibles. Los síntomas en las plantas afectadas comienzan con lesiones, generalmente en las hojas jóvenes, como pequeñas manchas de coloración oscura que luego se agrandan hasta alcanzar un diámetro de 1 a 3 mm y se rodean de un margen castaño oscuro circundado por un halo amarillento, lo que les confiere el aspecto similar a un ojo (Figura



3B). Conforme avanza la enfermedad, las lesiones van cubriendo todo el folíolo, hasta que este finalmente se desprende.

Los períodos de tiempo fresco y húmedo son predisponentes para el desarrollo y difusión de esta enfermedad. En ataques muy severos se ha observado una defoliación total del cultivo. Se recomienda tener las mismas consideraciones de manejo que las mencionadas para el caso de viruela.

### *Roya*

Enfermedad fúngica causada por *Uromyces striatus* Schroet., del que se han identificado varias razas. Además de la alfalfa, suele infectar otras leguminosas pertenecientes a los géneros *Medicago* y *Trifolium*, así como malezas del género *Euphorbia*. Forma uredosporos que pueden sobrevivir varios meses en condiciones de ambiente seco. En plantas afectadas, se observan pústulas circulares y pequeñas en ambas caras de las hojas (Figura 3C1 y C2), de color marrón-rojizo y que rompen la epidermis, síntomas inequívocos de diagnóstico de esta enfermedad. Las uredosporas se desprenden fácilmente de estas pústulas y, al ser transportadas por el viento, pueden infectar otros lotes de alfalfa localizados a varios kilómetros de distancia. Las hojas cubiertas de pústulas comienzan a encorvarse y finalmente se desprenden, pudiendo ocasionar defoliaciones totales bajo condiciones muy favorables para el patógeno. En ataques severos es posible observar pústulas elípticas desarrollándose sobre los tallos.

La mayor evolución de esta enfermedad se observa a partir de fines de verano y durante el otoño, cuando el clima es cálido y húmedo, condiciones que favorecen la aparición y proliferación de este patógeno. Caben las mismas recomendaciones de manejo que las realizadas para la viruela.

### *Tallo negro de primavera*

Enfermedad causada por el hongo *Phoma medicaginis* Malbr. & Roum var. *medicaginis boerema*, patógeno que puede sobrevivir varios meses en la forma de picnidios en restos vegetales, infectando posteriormente hojas y tallos cuando las condiciones ambientales favorecen su germina-

ción. La enfermedad comienza como manchas de tono marrón oscuro en las hojas que, al evolucionar el daño, se unen y llegan a afectar una gran superficie de los folíolos. En los tallos, esas manchas oscuras son primero individuales, pero luego, a medida que convergen, invaden amplios sectores de la base, confiriendo el color negro característico que da nombre a la enfermedad (Figura 3D1 y D2). Las hojas atacadas adquieren una coloración amarillenta y finalmente se desprenden del tallo. En primaveras frescas y húmedas, la defoliación puede ser total; y bajo condiciones muy favorables, el patógeno puede también colonizar las vainas y la corona de la planta. Se recomienda para su manejo la rotación con cultivos no hospedantes (gramíneas y *Melilotus* spp.) por al menos dos a tres años, además de las medidas señaladas para la viruela.

### *Tallo negro de verano*

Enfermedad causada por *Cercospora medicaginis* Ellis & Everth., hongo que pasa el invierno como micelio en tallos infectados, pero que para fructificar requiere necesariamente de temperaturas cálidas y humedad muy elevada. El daño en plantas infectadas se evidencia –primero en las hojas inferiores y posteriormente en las superiores– como manchas marrones o castañas, de forma redondeada o elíptica y con márgenes difusos. A medida que la enfermedad evoluciona, esas manchas se unen y se rodean de un gran halo clorótico de forma irregular. Cuando el hongo fructifica, se observa en las lesiones una tonalidad gris clara en la parte central. En la base de los tallos se producen manchas oscuras que pueden afectar una gran parte de estos y que son muy similares a las de la enfermedad anterior. Se recomienda evitar el retraso del corte o pastoreo en veranos cálidos y muy húmedos ya que puede agravar la enfermedad. Además, se sugieren las mismas medidas de manejo que las mencionadas para el tallo negro de primavera.

### *Manchón foliar amarillo*

Es una enfermedad fúngica, causada por *Leptotrochila medicaginis* (Fckl.) Schüepp. Los síntomas comienzan en el haz de los folíolos como pequeñas manchas de color amarillento que luego van creciendo en tamaño hasta invadir gran parte de las hojas, siguiendo más o menos el recorrido de las nervaduras y formando manchones amarillos en forma

de "V", con un área pardo-clara en su parte central (Figura 3E1 y E3). Bajo condiciones favorables, se pueden producir defoliaciones importantes. Las primaveras y otoños frescos y húmedos o períodos de abundantes precipitaciones seguidas de días nublados favorecen el desarrollo y la dispersión del patógeno. Entre fines del verano y principios del otoño el hongo forma sobre hojas muertas sus órganos de fructificación (apotecios), los que después de invernar liberarán las ascosporas en la primavera siguiente. Estas últimas son las encargadas de iniciar la infección en el cultivo. En Estados Unidos se han estimado pérdidas de hojas que van desde el 40 % (a principios de floración) hasta el 80 % (formación de vainas) (Semeniuk, 1979).

En el mercado no existen variedades resistentes o tolerantes que ayuden al manejo de esta enfermedad. Se recomienda tener en cuenta las medidas indicadas para las enfermedades foliares previamente tratadas y además evitar el retraso del aprovechamiento de la alfalfa (corte o pastoreo), ya que agravan los daños.

### *Mildiu o "mildew"*

Enfermedad fúngica causada por *Peronospora trifoliorum* De Bary. Este hongo sobrevive al invierno en tejidos vegetales vivos y únicamente fructifica en condiciones de oscuridad y muy alta humedad ambiental; el viento y la lluvia son los principales agentes de su diseminación. Este patógeno puede ocasionar infecciones localizadas o sistémicas. En el primer caso, en el haz de los folíolos se presentan sectores cloróticos o descoloridos, que se corresponden con eflorescencias de tono grisáceo en el envés y que corresponden a las hifas (conidióforos) del hongo (Figura 3F). Cuando la infección es sistémica, el patógeno invade tallos, yemas y hojas completas. Los tallos infectados adquieren mayor diámetro y presentan entrenudos más cortos, produciendo a menudo un brote terminal ramificado, con hojas superpuestas en forma de roseta. Los márgenes de las hojas totalmente infectadas se curvan hacia abajo. En alfalfares en implantación y bajo condiciones muy favorables, el mildiu puede provocar la muerte de las plántulas (*damping-off*).

Las primaveras y otoños frescos y húmedos favorecen la aparición y la proliferación del patógeno. El uso de cultivares de origen estadounidense con aceptables niveles de resistencia genética al patógeno



constituye una posible medida de manejo; de todos modos, el grado de reposo invernal no siempre es el adecuado para las condiciones de la región Pampeana. También, el tratamiento de la semilla con fungicidas sistémicos (como metalaxyl) puede ser de utilidad para la implantación en áreas tradicionalmente problemáticas. Ante ataques importantes, el adelantamiento del corte o pastoreo contribuye a evitar importantes pérdidas de calidad y rendimiento de forraje, a la vez que reduce sensiblemente la cantidad de inóculo para posteriores infecciones.

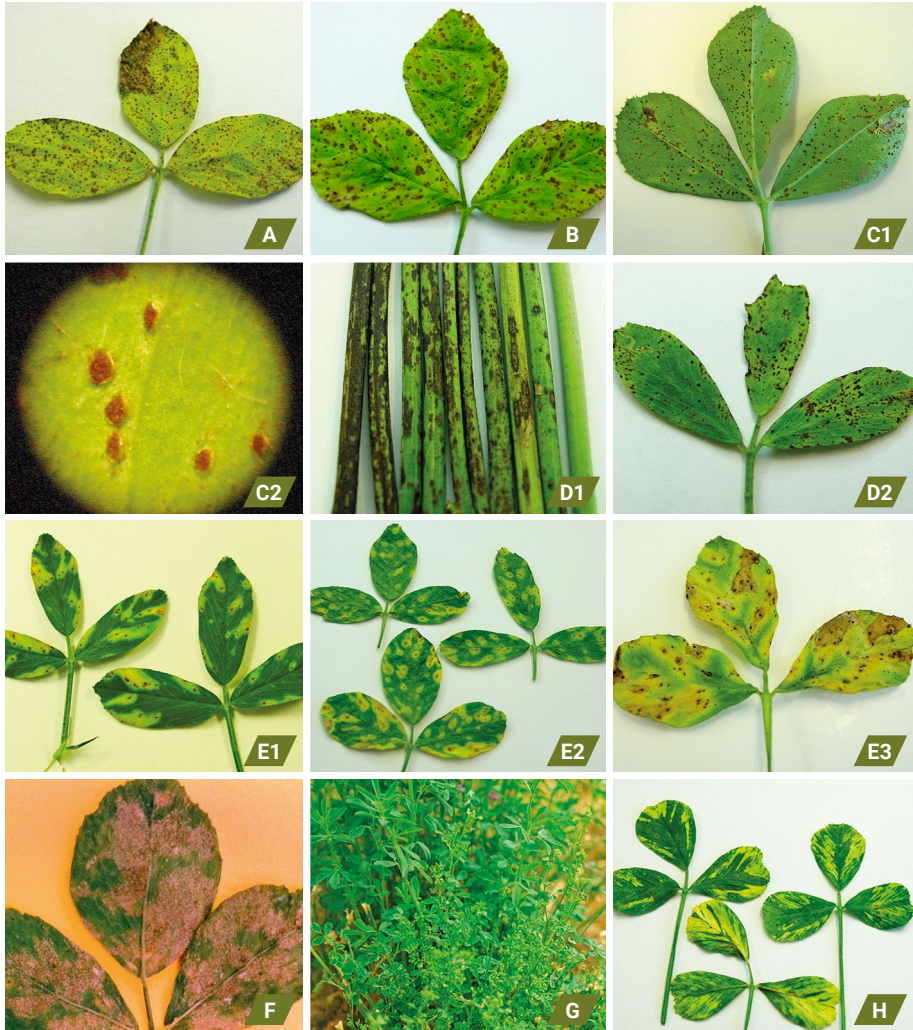
### *Escoba de bruja*

Esta enfermedad es causada por un fitoplasma que, de acuerdo a la taxonomía internacional, pertenece al grupo 16S rDNA Ash yellows ('Candidatus Phytoplasma fraxini'). Los fitoplasmas (procariotas sin pared celular) son un tipo de bacterias fitopatogénicas que habitan el floema y que son transmitidas por insectos, principalmente chicharritas (Homóptera: *Cicadellidae*), que se alimentan en esos vasos conductores de la planta. Basados en caracterizaciones moleculares, Conci *et al.* (2005) propusieron ubicar al agente causal de la escoba de bruja de la alfalfa en Argentina dentro de un nuevo subgrupo identificado como VII-C, que obviamente se incluye dentro del grupo mencionado al comienzo, denominado ArAWB (*Argentinean Alfalfa Witches' Broom*) (Meneguzzi *et al.*, 2006).

Las plantas afectadas manifiestan gran proliferación de tallos cortos y finos, hojas de tamaño severamente reducido, enanismo generalizado, clorosis y aborto de flores (Figura 3G); en algunos casos se observan flores verdes o reemplazo de las inflorescencias por estructuras de tipo vegetativo (Stuteville y Eriwn, 1990). En períodos frescos y con adecuada humedad las plantas afectadas pueden manifestar signos de recuperación, pero los síntomas vuelven ni bien aumenta la temperatura y la deficiencia hídrica. En consecuencia, los climas áridos y semiáridos parecen favorecer el desarrollo de la enfermedad, dado que los daños más severos se han observado en la región cuyana, particularmente en lotes destinados a la producción de semilla.

Las plantas enfermas disminuyen sus rendimientos de forraje y semilla. A medida que pasan los años el número de plantas infectadas en el lote se va incrementando. Las medidas recomendadas para atenuar la difusión

de la enfermedad son la inmediata remoción de las plantas enfermas y el control de los insectos vectores. No existen cultivares resistentes.



■ **Figura 3.** Síntomas de las principales enfermedades foliares de alfalfa en Argentina. A) Viruela. B) Mancha ocular: Foliolos de alfalfa exhibiendo las típicas manchas en forma de ojo causadas por *Leptosphaerulina briosiana*. C) Roya en envés de una hoja de alfalfa (C1) y detalle de las pústulas con uredosporas (C2). D) Tallo negro de primavera en tallos (D1) y hoja de alfalfa (D2). E) Manchón foliar amarillo en hojas de alfalfa según evolución de la enfermedad (E1-E3). F) Mildiu: envés de una hoja de alfalfa con eflorescencia grisácea del mildiu. Escoba de bruja (G): planta de alfalfa enferma (\*) en contraste con una normal (#). Mosaico de la alfalfa (H). Imágenes tomadas de Gieco *et al.* (2007).

## Enfermedades virales

A diferencia de otros patógenos que afectan a las plantas, no existe un método directo para el control de enfermedades virales. Para esto se aplican estrategias indirectas de manejo tendientes a evitar la infección, como lo son la exclusión (aislamiento de las plantas para evitar contacto con el patógeno), erradicación (eliminación del inóculo inicial en el agroecosistema), evasión (manejo del cultivo para evitar la coincidencia espacio-temporal con el patógeno), protección (control químico de vectores) y resistencia (utilización de cultivares resistentes o tolerantes al virus o vector) (March *et al.*, 2010).

### *Mosaico de la alfalfa*

Enfermedad viral causada por el virus del mosaico de alfalfa (AMV, por sus siglas en inglés: alfalfa mosaic virus), único miembro del género *Alfavirus* perteneciente a la familia *Bromoviridae* (Bujarski *et al.*, 2019; King *et al.*, 2012). Su genoma es de ARN compuesto por tres segmentos de distintos tamaños que se envuelven en proteínas conformando tres partículas baciliformes de 18 nm de diámetro y longitudes entre 30 y 57 nm; además pueden observarse hasta tres partículas esféricas aunque no son necesarias para la infección (ICTV, 2019a; Jaspars y Bos, 1980; Kumar *et al.*, 1997). Se trata de un complejo constituido por varias razas que difieren en infectividad, hospedantes y otras características. Este complejo puede infectar un gran número de especies vegetales, aunque parece que la alfalfa es el hospedante preferido por la mayoría de las razas (Hijano, 1979). La secuencia completa de los tres segmentos genómicos de un aislamiento argentino se obtuvo mediante secuenciación de nueva generación y su análisis demostró que es altamente similar a los secuenciados en otros países como Brasil, China e Italia (Trucco *et al.*, 2012; Trucco *et al.*, 2014). Además, se analizó el segmento génico que codifica para la proteína de la cubierta viral de 20 aislamientos argentinos y se observó escasa variabilidad genética en el país y en el mundo (Trucco *et al.*, 2012; Trucco *et al.*, 2017a).

Las plantas afectadas desarrollan un mosaico (cálico) de color amarillento a verde pálido, que se ubica entre las nervaduras de los folíolos y que puede o no estar acompañado de enanismo; esto constituye el síntoma

clásico de la enfermedad (Figura 3H). A veces, las plantas afectadas también presentan hojas enrolladas o acartuchadas, y otras veces la infección es asintomática. Una vez infectada, la planta contiene al patógeno por el resto de su vida. Los períodos con altas temperaturas durante el verano pueden enmascarar los síntomas del AMV. Se ha reportado que campos de alfalfa con incidencias del 53 y 76 % pueden tener pérdidas de rendimiento del 11 al 17 %, respectivamente (Yardimci *et al.*, 2007).

Este patógeno puede ser transmitido de manera no persistente por al menos 25 especies de áfidos (Cardin y Moury, 2000; Crill *et al.*, 1970; Hiruki y Hampton, 1990; Jaspars y Bos, 1980); los pulgones verde (*Acyrtosiphon pisum* Harris) y negro de las leguminosas (*Aphis craccivora* Koch.) son sus vectores más importantes para su distribución en el cultivo de alfalfa. Además, el AMV puede infectar a más de 600 especies vegetales (pertenecientes a 245 géneros de 68 familias), la mayoría de las cuales son de la familia *Fabaceae* (Yardimci *et al.*, 2007), que permiten la supervivencia del virus y pueden actuar como fuente de inóculo. Este mismo efecto lo produce la propia alfalfa, que por tratarse de un cultivo perenne en el que alternan lotes de distintas edades, las virosis pueden pasar de los más viejos infectados a los más jóvenes sanos. Este virus también puede transmitirse no solo por semilla, polen, o cuscuta, sino también mecánicamente; la tasa de transmisión por semilla puede alcanzar hasta el 12 %, dependiendo del cultivar y de las condiciones ambientales (Yardimci *et al.*, 2007). En consecuencia, tanto la presencia de hospedantes alternativos como las condiciones que favorezcan la proliferación de las poblaciones de áfidos vectores, contribuyen a la difusión de la enfermedad. Se recomienda el empleo de cultivares resistentes a pulgones y el control de los insectos vectores como medida preventiva que ofrece cierta efectividad. No existen cultivares resistentes al AMV.

### *Achaparramiento de la alfalfa*

Es una enfermedad que fue identificada en Argentina en 2010, siendo la primera vez que se la reporta en el continente americano (Bejerman *et al.*, 2011). Presenta una amplia distribución geográfica en las zonas de producción del país, ya que se la detectó en todas las provincias relevadas durante el período 2010-2018: Buenos Aires, Catamarca, Chaco, Córdoba,

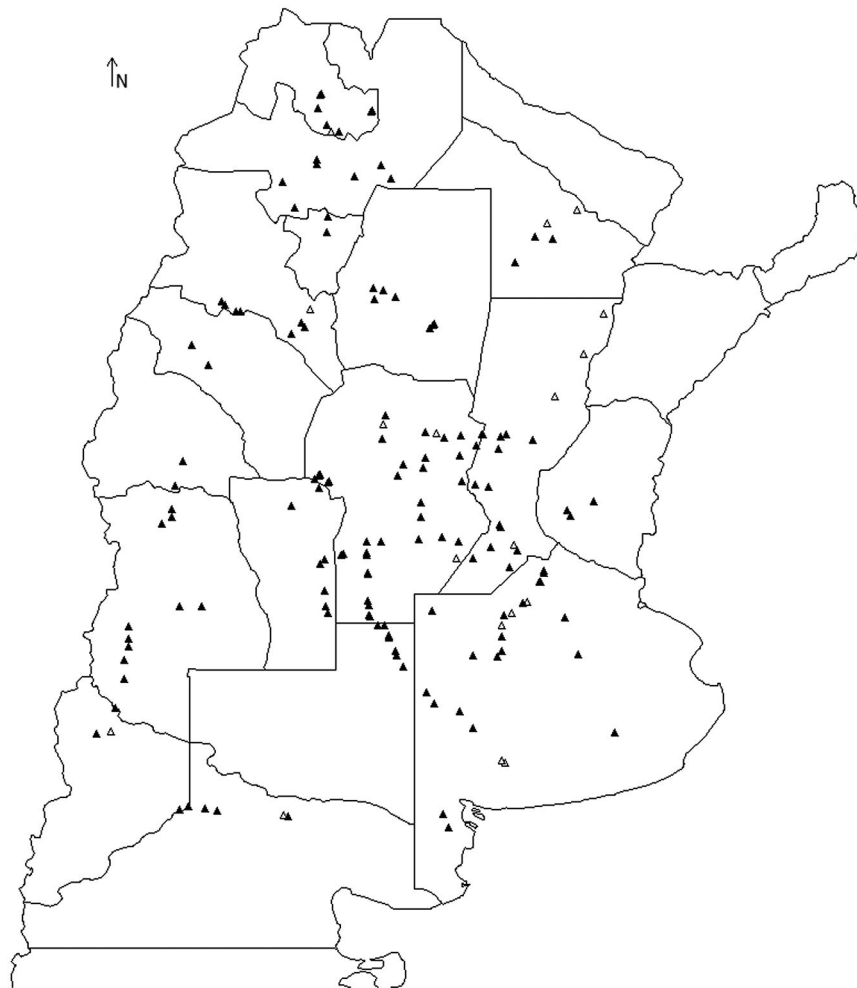
Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Neuquén, Río Negro, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán (Figura 4), registrando una prevalencia superior al 87 % (Trucco *et al.*, 2018).

La incidencia y severidad de los síntomas del achaparramiento fueron evaluadas en cultivares comerciales de alfalfa y relacionadas con variables climáticas en ensayos ubicados en dos ambientes contrastantes (Manfredi y Santiago del Estero). Se registraron incidencias medias del 50 % al 80 %. La severidad fue mayor en los cultivares evaluados en Santiago del Estero. Se observó que las variables que más influencia tuvieron en la incidencia fueron las precipitaciones y la temperatura máxima, mientras que la temperatura media es la que más afectó la severidad de la enfermedad (Odorizzi *et al.*, 2017). Además, en otro ensayo realizado en Guanacache (San Juan), una zona de producción de semillas, se observó una disminución del 38 % en el peso total de semillas por planta cuando se comparó la producción de individuos con síntomas versus la de individuos asintomáticos; mientras que el peso de cada semilla individual no fue afectado (Trucco *et al.*, 2017b).

El achaparramiento de la alfalfa es una enfermedad causada por un complejo viral, aunque aún no se ha esclarecido cuál es la combinación/combinaciones virales necesaria/s para producirla, debido a la complejidad de este patosistema y la progresiva detección de nuevos virus en las plantas afectadas. Al momento, se detectaron siete virus en alfalfas con achaparramiento: alfalfa mosaic virus-AMV (Trucco *et al.*, 2014), alfalfa dwarf cytorhabdovirus-ADV (Bejerman *et al.*, 2011; Bejerman *et al.*, 2015), alfalfa enamovirus 1-AEV-1 (Bejerman *et al.*, 2016), bean leaf roll virus-BLRV (Trucco *et al.*, 2016), alfalfa leaf curl virus-ALCV (Bejerman *et al.*, 2017), medicago sativa alphapartitivirus 1-MsAPV1 y medicago sativa alphapartitivirus 2-MsAPV2 (Bejerman *et al.*, 2019). Las plantas pueden estar coinfectadas con distintas combinaciones virales, aunque la más prevalente es la combinación AMV-ALCV (Trucco *et al.*, 2018).

Las plantas muy afectadas presentan acortamiento severo de entrenudos, reducción del tamaño de los folíolos con deformaciones (abolladuras), lámina foliar con mosaico suave verde pálido-amarillento en los bordes, folíolos curvados hacia abajo de consistencia carnosa/engrosada (coriáceos) y aclaramientos de nervaduras. Todo esto le da a la planta un aspecto achaparrado y amarillento. También, las hojas afec-

tadas presentan enaciones (verrugas) de diversas formas y tamaño en el envés de las hojas, ya sea sobre nervaduras primarias como secundarias, siendo un síntoma característico de la enfermedad (Figura 5).



■ **Figura 4.** Distribución del achaparramiento de la alfalfa en Argentina. La presencia y ausencia de la enfermedad, después de analizar las muestras tomadas en cada localidad, se indica con triángulos negros y blancos, respectivamente.

Se conoce que el pulgón negro de las leguminosas es capaz de transmitir esta enfermedad (Trucco *et al.*, 2018); de esta manera, las condiciones que favorezcan el incremento de las poblaciones de este áfido contribuyen a la difusión de dicha enfermedad. Otro factor de importancia para



tener en cuenta es que uno de los virus que mayor influencia tiene en la manifestación de síntomas es el AMV (Trucco *et al.*, 2018), que como ya se mencionó, tiene una importante tasa de transmisión por semilla.



■ **Figura 5.** Síntomas del achaparramiento de la alfalfa. Acortamiento de entrenudos y clorosis generalizada de la planta (A y B), deformaciones y disminución del tamaño de los folíolos (C-F), clorosis de nervaduras (D), y aparición de enaciones y papilas en las nervaduras de la cara inferior de las hojas (C-F).

Actualmente, no existe un método eficaz de control de la enfermedad. La mejor medida de control consistiría en minimizar la transmisión del virus a las plantas utilizando cultivares resistentes a los virus que inducen los síntomas o a los áfidos que los transmiten. Recientemente, se identificaron algunos cultivares comerciales de alfalfa que presentaron mejor comportamiento frente a la enfermedad (Odorizzi *et al.*, 2017). El control químico de los insectos vectores es una medida que podría ofrecer cierta efectividad en la reducción de su incidencia (Cook y Wilton, 1984).

Descripción de los virus detectados en alfalfas con achaparramiento:

- Alfalfa mosaic virus (AMV): este virus ya fue descrito como causante de la enfermedad del mosaico de la alfalfa.

- Alfalfa dwarf cytorhabdovirus (ADV): pertenece a la familia *Rhabdoviridae*, cuyos miembros se caracterizan porque sus partículas, además de estar compuestas por ácido nucleico y proteína, también tienen una envoltura lipídica. Su genoma consiste en una única molécula lineal de ARN. Esta familia de virus contiene miembros que afectan tanto a animales como a vegetales. Dentro de la familia hay 20 géneros, de los cuales cuatro infectan plantas (ICTV, 2019b). El ADV, miembro del género *Cytorhabdovirus*, se detectó en alfalfa en Argentina y no hay antecedentes de detección en otros países. Se encuentra ampliamente distribuido en alfalfares de nuestro país, con una prevalencia superior al 70 %. Se conoce poco acerca de este virus, pero se sospecha que es transmitido por pulgones y que en forma aislada no induce síntomas en alfalfa (Trucco *et al.*, 2018).
- Bean leaf roll virus (BLRV) y alfalfa enamovirus 1 (AEV-1): pertenecen a la familia *Luteoviridae*, géneros *Luteovirus* y *Enamovirus*, respectivamente. Las partículas virales de los miembros de esta familia son isométricas y tienen 25 a 30 nm de diámetro. Los genomas son una única cadena de ARN que codifica las distintas proteínas virales. Estos virus son transmitidos por áfidos (Hogenhout *et al.*, 2008). Por una parte, el BLRV, que fue inicialmente informado en Alemania afectando cultivos de arveja (*Pisum sativum* L.) y habas (*Vicia faba* L.) (Quantz y Völk, 1954), infecta varias especies de leguminosas y se encuentra ampliamente distribuido en el mundo (Ashby, 1984; Omier *et al.*, 2002). Cuando infecta a la alfalfa en forma individual solo induce un síntoma de clorosis leve en los ápices de los cultivos muy susceptibles, pero generalmente es asintomático (Ashby, 1984; Cockbain y Gibbs, 1973). Los análisis de la secuencia genómica completa del aislamiento argentino de este virus, obtenida con métodos de secuenciación de última generación, mostraron que está muy relacionado con los aislamientos descritos en EUA. Presenta una amplia distribución en los alfalfares argentinos, con una prevalencia que supera el 60 % (Trucco *et al.*, 2016 y 2018). Por otra parte, el AEV-1 es un virus descrito por primera vez infectando alfalfa en Argentina, lo cual se determinó con base en el análisis de su secuencia completa, obtenida mediante secuenciación de nueva generación (Bejerman *et al.*, 2016). Recientemente, se publicó el primer reporte de un insecto capaz de transmitirlo, identificán-



dose al pulgón negro de las leguminosas (*A. craccivora*) como su vector. Además, se lo detectó distribuido ampliamente en cultivos de alfalfa en nuestro país, con una prevalencia superior al 60 %; el análisis del gen que codifica la proteína de la cubierta viral de 16 aislamientos argentinos, mostró que este virus presenta baja variabilidad genética en el país (Trucco *et al.*, 2020). En 2017, se publicó un segundo aislamiento de este virus infectando alfalfa en Sudán (Nemchinov *et al.*, 2017).

- Alfalfa leaf curl virus (ALCV): pertenece a la familia *Geminiviridae* y es miembro del género *Capulavirus*, que presenta características particulares dentro de la familia, entre otras: genoma monopartito y transmisión por áfidos (Varsani *et al.*, 2017). Se detectó por primera vez en Francia y España, determinándose que en condiciones naturales podía infectar alfalfa y que en condiciones experimentales también podía infectar haba (*Vicia faba*); también se señaló que es transmitido por el pulgón negro de las leguminosas. En alfalfa induce síntomas de clorosis leve y enrollado de los folíolos en cultivares susceptibles (Bernardo *et al.*, 2016; Roumagnac *et al.*, 2015). Entre los virus que se identificaron infectando alfalfa en Argentina, este es el único que tiene genoma compuesto por ADN, que a su vez es simple cadena y circular. Los estudios genéticos realizados demostraron que los aislamientos argentinos son muy poco variables, pero difieren de los aislamientos europeos, africanos y asiáticos (Bejerman *et al.*, 2017; Davoodi *et al.*, 2018). Este virus presenta amplia distribución geográfica en Argentina con una prevalencia superior al 85 % (Trucco *et al.*, 2018) y se observó que junto con el AMV son los dos virus que mayor influencia tienen en la pérdida de producción de semillas en alfalfa y en la manifestación de síntomas del achaparramiento (Trucco *et al.*, 2017b).
- Medicago sativa alphapartitivirus 1 (MsAPV1) y medicago sativa alphapartitivirus 2 (MsAPV2): reanalizando datos obtenidos en secuenciaciones masivas de alfalfas con síntomas de achaparramiento, se lograron identificar recientemente dos nuevos virus, llamados tentativamente medicago sativa alphapartitivirus 1 y medicago sativa alphapartitivirus 2. Estos virus pertenecen a la Familia *Partitiviridae*, género *Alphapartitivirus* que comprende virus cuyo genoma está dividido en dos moléculas de ARN que se encapsidan

separadamente (Bejerman *et al.*, 2019). Los virus de este género infectan hongos o plantas. Los que infectan plantas producen infecciones en las que no hay manifestación de síntomas (infecciones latentes) y se transmiten con alta frecuencia vía óvulo o polen al embrión (Nibert *et al.*, 2014), distribuyéndose por el mundo mediante el comercio de las semillas.

### *Enfermedades de menor importancia en Argentina*

En esta sección se describen brevemente las enfermedades identificadas en Argentina que no han alcanzado un importante grado de difusión y daño en el país. En otros casos, la presencia del patógeno solo se estima que constituye una amenaza potencial para el cultivo.

El grupo de las enfermedades foliares se ve aumentado por la presencia de *Stemphylium botryosum* Wallr., hongos que se observan eventualmente cuando se presentan condiciones de temperaturas moderadas y alta humedad. Los síntomas típicos son la producción de manchas redondeadas u ovaladas, de color marrón con un halo clorótico circundante y de topografía algo hundida. Usualmente, esas manchas se tornan más oscuras y adquieren un aspecto de anillos concéntricos, con alternancia de sectores de diferente tonalidad (Hijano y Pérez Fernández, 1995). En el área de Paraná, Formento y Verzagnassi (2001) han señalado la presencia del patógeno en lotes de alfalfa durante la primavera, acompañando infecciones de viruela, mildiu, mancha ocular y tallo negro de primavera.

La esclerotiniosis (*Sclerotinia trifoliourum* Ricks.) es una enfermedad de la raíz que comienza con una decoloración de tono amarillento en los tejidos infectados y que posteriormente degenera en una podredumbre pardo oscura y de consistencia blanda. Los daños son más severos hacia fines de otoño, cuando la humedad del suelo aumenta; cuando la infección se produce en estado de plántula, puede producirse un apreciable nivel de mortandad en la población. A medida que las plantas se desarrollan, se van haciendo menos susceptibles, a punto tal que en un lote adulto se suele observar daño solo en individuos aislados (Hijano, 1979). Bajo condiciones de alta humedad es factible apreciar el micelio del hongo que, como una masa algodonosa, crece sobre la base de los tallos y las coronas infectadas. En los restos de tejidos vegetales ya

mueritos se suelen ver a simple vista unos granos oscuros y duros: son los esclerocios o estructuras de resistencia del patógeno.

Una enfermedad muy similar a la anterior, la esclerotia (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) fue detectada hace algunos años en Castelar (Itria y Basigalup, 1984). Se trata de una podredumbre húmeda en la corona y la base de los tallos, que ocasiona finalmente la necrosis de las partes afectadas. En condiciones de alta humedad ambiental, el hongo desarrolla su micelio blanquecino sobre el que es posible observar esclerocios pardos y de forma globosa. La distribución de la enfermedad en el lote es irregular, evolucionando en forma de manchones. En un ensayo de detección y frecuencia de plagas y enfermedades de la alfalfa en Castelar, Basigalup e Hijano (1986) señalaron a la esclerotia como la responsable del 1 % de la muerte de las plantas que pudieron diagnosticarse.

La verticilosis es un marchitamiento causado por el hongo *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berth. Las hojas de las plantas infectadas manifiestan una coloración amarillenta generalizada, con los extremos de los folíolos cubiertos por unas típicas manchas en "V" compuestas por un área central necrosada de color gris circundada por un margen clorótico. Aun totalmente necrosadas, las hojas quedan adheridas a los tallos, que permanecen verdes aunque con su crecimiento detenido. En un corte transversal, la raíz exhibe un anillo de color anaranjado a pardo claro que corresponde a los tejidos vasculares colonizados por el patógeno. Cuando la infección progresa y el hongo invade la corona y otros órganos, la planta finalmente muere. Si bien existe la sospecha de haberla observado en algunos lotes de alfalfa bajo riego, la enfermedad no fue fehacientemente detectada en el país (Hijano y Pérez Fernández, 1995). No obstante, el hecho de que las esporas del hongo puedan ser transportadas por la semilla, o por los restos vegetales que pueden acompañarla, le otorga un cierto grado de peligrosidad potencial.

Otra enfermedad detectada en zonas húmedas es la fomopsis, cuyo agente causal –*Phomopsis* spp.– es frecuentemente aislado en el área de influencia de INTA Paraná a partir de coronas necrosadas y de lesiones en las paredes del xilema (Figura 6) provenientes de plantas de alfalfa que manifiestan en los tallos un marchitamiento con forma de bastón (Formento y Verzegnassi, 2001). Este patógeno reviste una peligrosidad potencial para el sector oriental de la región Pampeana

por haber sido también detectado en pasturas de trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) y en cultivos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill.] y girasol (*Helianthus annuus* L.) del departamento Diamante en la provincia de Entre Ríos (Formento y Verzegnassi, 2001).



■ **Figura 6.** Lesiones en el xilema de una planta de alfalfa afectada por *Phomopsis* spp. Imagen tomada de Gieco et al. (2007).

El cancro radicular, causado por *Rhizoctonia solani* Kuhn, ha sido esporádicamente diagnosticado en zonas de regadío y durante períodos de altas temperaturas (Hijano y Pérez Fernández, 1995). El patógeno produce canchales en las raíces, que son lesiones oscuras y hundidas, con bordes elevados, que se ubican en los puntos de inserción de las raicillas. Esas lesiones se fusionan y terminan pudriendo la raíz principal, que se corta en forma similar al daño originado por fitóftora. Basados en las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de este hongo, Leath et al. (1988) han asociado al patógeno con un problema denominado “escaldadura”, que produce la muerte de plantas por una combinación de altas temperaturas e inundación del suelo.

El nematodo del tallo [*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev]] penetra a través de los brotes que se desarrollan en la corona y desde allí invade los tallos en crecimiento, que se engrosan y se decoloran en tanto que los nudos se hinchan y los entrenudos se acortan. Si la infección progresa, los tallos en crecimiento presentan un aspecto achaparrado para finalmente oscurecerse y morir. Bajo condiciones muy favorables, con tiempo cálido y húmedo, los nematodos pueden invadir también las hojas, que toman un aspecto encrespado como consecuencia de la dis-

torsión de sus tejidos internos. Durante las primeras décadas del siglo XX, este patógeno fue señalado como el problema sanitario más importante de la alfalfa en el país, al punto de promover varios esfuerzos para obtener cultivares resistentes. Sin embargo, a partir de los 50 sus daños han sido solo esporádicos y de escasa importancia. Actualmente en el mercado existen varios cultivares resistentes, todos de origen estadounidense.

El nematodo de las lesiones de raíz (*Pratylenchus* spp.) invade y destruye las raicillas y causa lesiones de color oscuro en la raíz principal. Esas lesiones sirven de puerta de entrada para otros microorganismos patógenos que agravan la situación de la planta afectada. Cuando la infección es importante, las raíces toman un color marrón generalizado y disminuyen su crecimiento; en ese contexto, el único signo aéreo de la infección es un desarrollo achaparrado del follaje. Si bien no hay referencias concretas de daño en el país, *Pratylenchus* spp. es un componente habitual de las muestras de suelo que se analizan por presencia de nematodos.

## BIBLIOGRAFÍA

- ASHBY, J.W. 1984. *Bean leafroll virus N.º 286. Description of Plant Viruses.* (Disponible: <https://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=286> consultado: 22/5/2019).
- BASIGALUP, D.H.; E.H. HIJANO. 1986. *Detección y frecuencia de plagas y enfermedades de la alfalfa en Castelar como base de la labor fitotécnica.* ACINTACNIA Año III, N.º 19: 35-41.
- BEJERMAN, N.; C. NOME; F. GIOLITTI; E. KITAJIMA; S. DE BREUIL; J. PÉREZ FERNÁNDEZ; D. BASIGALUP; M. CORNACCHIONE; S. LENARDON. 2011. *First Report of a Rhabdovirus Infecting Alfalfa in Argentina.* *Plant Disease* 95(6): 771-771. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-10-0764>
- BEJERMAN, N.; F. GIOLITTI; S. DE BREUIL; V. TRUCCO; C. NOME; S. LENARDON; R.G. DIETZGEN. 2015. *Complete genome sequence and integrated protein localization and interaction map for alfalfa dwarf virus, which combines properties of both cytoplasmic and nuclear plant rhabdoviruses.* *Virology* 483: 275-283. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.05.001>
- BEJERMAN, N.; F. GIOLITTI; V. TRUCCO; S. DE BREUIL; R.G. DIETZGEN; S. LENARDON. 2016. *Complete genome sequence of a new enamovirus from Argentina infecting alfalfa plants showing dwarfism symptoms.* *Archives of Virology* 161(7): 2029-2032. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2854-3>
- BEJERMAN, N.; V. TRUCCO; S. DE BREUIL; P.R. PARDINA; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2017. *Genome characterization of an Argentinean isolate of alfalfa leaf curl virus.* *Archives of Virology* 1-5. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3673-x>
- BEJERMAN, N.; H. DEBAT; C. NOME; D. CABRERA MEDEROS; V. TRUCCO; S. DE BREUIL; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2019. *Redefining the medicago sativa alphapartitiviruses genome sequences.* *Virus Research* 265: 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.021>
- BERNARDO, P.; B. MUHIRE; S. FRANÇOIS; M. DESHOUX; P. HARTNADY; K. FARKAS; S. KRABERGER; D. FILLOUX; E. FERNANDEZ; S. GALZI; R. FERDINAND; M. GRANIER; A. MARAIS; P. MONGE BLASCO; T. CANDRESSE; F. ESCRIU; A. VARSANI; G.W. HARKINS; D.P. MARTIN; P. ROUMAGNAC. 2016. *Molecular characterization and prevalence of two capulaviruses: Alfalfa leaf curl virus from France and Euphorbia caputmedusae latent virus from South Africa.* *Virology* 493: 142-153 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.016>
- BUJARSKI, J.; D. GALLITELLI; F. GARCÍA-ARENAL; V.B. PALLÁS; P. PALUKAITIS; M.K. REDDY; A. WANG. 2019. *ICTV Virus Taxonomy Profile: Bromoviridae.* *Journal of General Virology* 100: 1206-1207. (Disponible: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae) consultado: 18/6/2019).
- CARDIN, L.; B. MOURY. 2000. *First Report of Alfalfa mosaic virus in Pachysandra terminalis in Europe.* *Plant Pathology* 84(5): 594. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.5.594B>

- CASTAÑO ZAPATA, J. 2002. *Principios básicos de fitoepidemiología*. Manizales: Universidad de Caldas, Centro Editorial, Manizales. 398 p.
- COCKBAIN, A.J.; A.J. GIBBS. 1973. Host range and overwintering sources of bean leaf roll and pea enation mosaic viruses in England. *The Annals of Applied Biology* 73(1): 177-187. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1973.tb01323.x>
- CONCI, L.; N. MENEGUZZI; E. GALDEANO; L. TORRES; C. NOME; S. NOME. 2005. Detection and molecular characterization of an alfalfa phytoplasma in Argentina that represents a new subgroup in the 16S rDNA Ash Yellow group ('*Candidatus Phytoplasma fraxini*'). *European Journal of Plant Pathology* 113: 255-265.
- COOK, A.A.; A.C. WILTON. 1984. Alfalfa enation virus in the Kingdom of Saudi Arabia. *FAO Plant Prot. Bull. Vol. 32. N.º 4*.
- CRILL, P.; D.J. HAGEDOM; E.W. HANSON. 1970. Alfalfa mosaic, the disease and its virus incitant. *College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin. Bull. N.º 280: 40 p.*
- DAVOODI, Z.; N. BEJERMAN; C. RICHT; D. FILLOUX; S.G. KUMARI; E.K. CHATZIVASSILIOU; S. GALZI; C. JULIAN; S. SAMARFARD; V. TRUCCO; F. GIOLITTI; E. FIALLO-OLIVÉ; J. NAVAS CASTILLO; N. ASAAD; A. RAHMAN MOUKAHEL; J. HIJAZI; S. MGHANDEF; J. HEYDARNEJAD; H. MASSUMI; A. VARSANI; R. DIETZGEN; G.W. HARKINS; D.P. MARTIN; P. ROUMAGNAC. 2018. The Westward Journey of Alfalfa Leaf Curl Virus. *Viruses* 542(10): 1-16. <https://doi.org/10.3390/v10100542>
- DOMIER, L.L.; N.K. MCCOPPIN; R.C. LARSEN; C.J. D'ARCY. 2002. Nucleotide sequence shows that Bean leafroll virus has a Luteovirus-like genome organization. *The Journal of General Virology* 83(Pt 7): 1791-1798. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-7-1791>
- EL-HAMALAWI, Z.A.; D.C. ERWIN. 1986. Components in alfalfa root extract and root exudate that increase oospore germination of *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Phytopathology* 76:508-513.
- FORMENTO, N.; N. VERZEGNASSI. 2001. *La Alfalfa y sus Enfermedades en la Provincia de Entre Ríos*. INTA Paraná. Informe técnico s/n.
- GIECO, J.O.; M.V. MORENO; D.H. BASIGALUP. 2007. *Enfermedades de la alfalfa y abordaje molecular de la selección por resistencia*. En: BASIGALUP, D.H. (ed.). *El cultivo de alfalfa en Argentina*. Capítulo 19. Ediciones INTA, Buenos Aires. 449-476 pp.
- GRAHAM, J.H.; F.I. FROSHEISER; D.L. STUTEVILLE; D.C. ERWIN. 1979. *A compendium of alfalfa diseases*. American Phytopathological Society (1st ed.). St. Paul, MN, EUA.
- HIJANO, E.H. 1979. *Algunas enfermedades que afectan a la alfalfa en la República Argentina*. Programa Alfalfa INTA. Proyecto Alfalfa FAO-INTA Arg 75-006. Buenos Aires, Argentina.
- HIJANO, E.H.; M.P. HUEGO. 1985. *Corchosis: una nueva enfermedad de la alfalfa (Medicago sativa L.) en la República Argentina*. RAM 1, 2, 5-12.

- HIJANO, E.H.; D.H. BASIGALUP; O.A. BRUNO; R.J. LEON; G.V. RINALDI; M.C. SPADA. 1986. *Diagnósticos comparativos de problemas radiculares de alfalfa en tres localidades de la Argentina*. RAM 2, 2, 5-12.
- HIJANO, E.; J. PÉREZ FERNÁNDEZ. 1995. *Enfermedades de la alfalfa*. En: HIJANO, E.; A. NAVARRO. (Eds.). *La alfalfa en la Argentina*. San Juan, Argentina: INTA Enc. Agro de Cuyo, Manuales N.° 11. 125-142.
- HIRUKI, C.; R.O. HAMPTON. 1990. *Disease caused by viruses and viruses infectious to alfalfa*. En D. L. STUTEVILLE, D.L.; D.C. ERWIN (Eds.). *Compendium of Alfalfa Diseases*. St. Paul, MN. American Phytopathological Society. 51-58 pp.
- HOGENHOUT, S.A.; D. AMMAR; A.E. WHITFIELD; M.G. REDINBAUGH. 2008. *Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses*. *Annual Rev. of Phytop.* 46(1): 327-359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>
- ICTV. 2019a. *Genus: Alfamovirus*. *The online (10th) Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (Disponible: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae/1105/genus-alfamovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae/1105/genus-alfamovirus) consultado: 10/7/2019).
- ICTV. 2019b. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. (Disponible: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/introduction/w/9th\\_report\\_intro/87/virus-taxa-infecting-plants](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/introduction/w/9th_report_intro/87/virus-taxa-infecting-plants) consultado: 27/5/2019).
- ITRÍA, C.D.; D.H. BASIGALUP. 1984. *Alfalfa: enfermedades e insectos dañinos, nuevos o poco citados, para la Pampa Húmeda*. ACINTACNIA Año I, N.° 11: 21-27.
- JASPARS, E.M.; L. BOS. 1980. *Alfalfa mosaic virus*. N.° 229. En *Description of plant viruses*. (Disponible en <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=229> consultado: 18/6/2019).
- KING, A.M.Q.; M.J. ADAMS; E.B. CARSTENS; E.J. LEFKOWITZ. 2012. *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. London. Waltham: Academic Press.
- KUAN, T.L.; D.C. ERWIN. 1980. *Formae speciales differentiation of Phytophthora megasperma isolates from soybean and alfalfa*. *Phytopathology*. 70(4):333-338.
- KUMAR, A.; V.S. REDDY; V. YUSIBOV; P.R. CHIPMAN; Y. HATA; I. FITA; K. FUKUYAMA; M.G. ROSSMANN; L.S. LOESCH-FRIES; T.S. BAKER; J.E. JOHNSON. 1997. *The Structure of Alfalfa Mosaic Virus Capsid Protein Assembled as a T=1 Icosahedral Particle at 4.0-Å Resolution*. *Journal of Virology* 71(10): 7911-7916.
- LEATH, K.T.; D.C. ERWIN; G.D. GRIFFIN. 1988. *Disease and Nematodes*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL (Jr) (Eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, EUA. 621-670 pp.
- MARCH, G.J.; C.M. ODDINO; A. D. MARINELLI. 2010. *Manejo de enfermedades de los cultivos según parámetros epidemiológicos*. Córdoba, Argentina: INTA-UNRC.



- MENEGUZZI, N.; E. ECHEVERRÍA; C. BRUNO; M. BALZARINI; L.R. CONCI. 2006. *Distribución e incidencia de la enfermedad de escoba de bruja en alfalfa de la provincia de San Juan. XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Libro de Resúmenes: 266. Fac. de Cs Agrarias de Catamarca. 266- 267 pp.*
- MORGAN, W.C.; D.G. PARBERRY. 1977. *Effects of Pseudopeziza leaf spot disease on growth and yield in Lucerne. Aus. J. Agric. Res. 28: 1029-1040.*
- NEMCHINOV, L.G.; S.C. GRINSTEAD; D.S. MOLLOV. 2017. *First Report and Complete Genome Sequence of Alfalfa Enamovirus from Sudan. American Society for Microbiology, 4-5.*
- NIBERT, M.L.; S.A. GHABRIAL; E. MAISS; T. LESKER; E.J. VAINIO; D. JIANG; N. SUZUKI. 2014. *Taxonomic reorganization of family Partitiviridae and other recent progress in partitivirus research. Virus Research 188: 128-141. <https://doi.org/10.1016/j.virus-res.2014.04.007>*
- ODORIZZI, A.S.; M.V. CORNACCHIONE; V. AROLFO; D.H. BASIGALUP; M.L. MIJOEVICH; M. BALZARINI. 2017. *Evaluación de la virosis del achaparramiento de la alfalfa (Medicago sativa L.) en dos ambientes contrastantes de Argentina. Agrisciencia 34(II), 69-81.*
- OSTAZESKI, S.A.; E.H. HIJANO. 1986. *Enfermedades comunes de la alfalfa en la Argentina: revisión de sus síntomas, distribución e importancia. En: BARIGGI, C.; V.L. MARBLE; C.D. ITRIA; J.M. BRUN (Eds.). Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa. INTA, Colección Científica, Buenos Aires. 223-250 pp.*
- QUANTZ, L.; J. VÖLK. 1954. *Die blattrollkrankheit der ackerbohne und erbse, eine neue viruskrankheit bei leguminosen. Nachrichtenbl. Dtsch. PflSchDienst., Braunschweig 6: 177-182.*
- RODGERS, C.; D. WITTE; J. FERRELL; H. DEERY; M. MCCASLIN. 2016. *Breeding for Resistance to New Races of Anthracnose. Proceedings of 2016 Joint Conference NAAIC, Trifolium, & Grass Breeders. Madison, Wisconsin.*
- ROUMAGNAC, P.; M. GRANIER; P. BERNARDO; M. DESHOUX; R. FERDINAND; S. GALZI; E. FERNÁNDEZ; C. JULIAN; I. ABT; D. FILLOUX; F. MESLÉARD; A. VARSANI; S. BLANC; D.P. MARTIN; M. PETERSCHMITT. 2015. *Alfalfa Leaf Curl Virus: an Aphid-Transmitted Geminivirus. Journal of Virology 89(18): 9683-9688. <https://doi.org/10.1128/JVI.00453-15>*
- SEMIENIUK, G. 1979. *Yellow leaf blotch. En: GRAHAM, J.H.; F.I. FROSHEISER; D.L. STUTEVILLE; D.C. ERWIN (Eds.). A compedium of alfalfa diseases. American Phytopathological Society (1st Ed.). St. Paul, MN, EUA. 20 p.*
- STACK, J.P.; R.L. MILLAR. 1985. *Relative Survival Potential of Propagules of Phytophthora megasperma f. sp. medicaginis. Phytopathology 75:1025-1031.*
- STUTEVILLE, D.L.; D.C. ERIWN. 1990. *Compendium of alfalfa diseases. (2nd Ed.). American Phytopathological Society. 84 p.*

TRUCCO, V.M.; N. BEJERMAN; S. DE BREUIL; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2012. *Distribución geográfica y caracterización genómica del alfalfa mosaic virus (AMV) en alfalfa. XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Fitopatología. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. 41 p.*

TRUCCO, V.; S. DE BREUIL; N. BEJERMAN; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2014. *Complete nucleotide sequence of Alfalfa mosaic virus isolated from alfalfa (Medicago sativa L.) in Argentina. Virus Genes 48(3): 562-565. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1045-0>*

TRUCCO, V.; S. DE BREUIL; N. BEJERMAN; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2016. *Bean leafroll virus (BLRV) in Argentina: molecular characterization and detection in alfalfa fields. European Journal of Plant Pathology 146(1): 207-212. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0899-5>*

TRUCCO, V.M.; N. BEJERMAN; S. DE BREUIL; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2017a. *Dispersión temporo-espacial del alfalfa mosaic virus asociado al achaparramiento de la alfalfa en Argentina. 4.º Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza, Argentina. Asociación Argentina de Fitopatólogos. 397 p.*

TRUCCO, V.M.; N. BEJERMAN; S. DE BREUIL; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2017b. *Efecto del achaparramiento y virus asociados en la producción de semillas de alfalfa. 4.º Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza, Argentina. Asociación Argentina de Fitopatólogos. 394 p.*

TRUCCO, V.M.; N. BEJERMAN; S. DE BREUIL; D. CABRERA MEDEROS; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2018. *Alfalfa dwarf disease, a viral complex affecting alfalfa crop in Argentina. En: BASIGALUP, D.; M. del C. SPADA; A. ODORIZZI; V. AROLFO (ed.). Proceedings of the Second World Alfalfa Congress, INTA, Córdoba, Argentina. 84-87 pp. (Disponible: [www.worldalfalfacongress.org](http://www.worldalfalfacongress.org) consultado: 10/7/2019).*

TRUCCO, V.; D. CABRERA MEDEROS; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2020. *Geographical distribution, genetic studies and vector transmission of alfalfa enamovirus-1 infecting alfalfa crop in Argentina. Virus Genes 56(5): 662-667. doi: 10.1007/s11262-020-01783-z*

VARSANI, A.; P. ROUMAGNAC; M. FUCHS; J. NAVAS-CASTILLO; E. MORIONES; A. IDRIS; R.W. BRIDDON; R. RIVERA-BUSTAMANTE; F.M. ZERBINI; D.P. MARTIN. 2017. *Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. Archives of Virology 162(6): 1819-1831. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3268-6>*

YARDIMCI, N.; H. ERYIGIT; I. ERDAL. 2007. *Effect of alfalfa mosaic virus (AMV) on the content of some macro- and micronutrients in alfalfa. Journal of Culture Collections 5: 90-93.*

## CAPÍTULO 10

### Fertilización y encalado en alfalfa

Martín Díaz-Zorita,  
Sebastián Gambaudo y  
Alberto Raúl Quiroga

## Introducción

La alfalfa se desarrolla en condiciones ambientales diversas, desde regiones semiáridas/subhúmedas hasta húmedas, y prospera adecuadamente con rangos de precipitaciones anuales entre 500 y algo más de 1000 mm. El desarrollo profundo de su sistema de raíces le permite alcanzar mayores reservas de agua que otras especies con sistemas de raíces superficiales pudiendo así tolerar prolongados períodos de deficiencias hídricas. Sin embargo, es una especie muy sensible al anegamiento, que puede provocar reducciones en su crecimiento dependiendo del estado fisiológico de las plantas, de su nivel de reservas y de otras condiciones ambientales, como la temperatura. Es así como la presencia de la capa (napa) de agua freática puede contribuir tanto favorablemente al crecimiento de alfalfa como limitar su productividad. Según un estudio en Rafaela (Santa Fe, Argentina), que integró 20 años de estudios a campo, la máxima persistencia y producción de la alfalfa se alcanza cuando la capa de agua freática se ubicaba en promedio a más de 4 m de profundidad. La presencia más superficial de esta capa de agua afecta negativamente la producción acumulada de las pasturas (Berhongaray *et al.*, 2019). Si bien la alfalfa es reconocida como moderadamente sensible al estrés salino, los suelos con conductividad eléctrica superior a  $2,0 \text{ dS m}^{-1}$  reducen su productividad a razón aproximada de 7,3 % por cada  $\text{dS m}^{-1}$  de incremento en el contenido salino (Maas y Hoffman, 1977). Estudios recientes, bajo condiciones de riego en suelos profundos con textura franco-arcillosa, sugieren que esta especie tolera mayores condiciones de salinidad de hasta  $5,0 \text{ dS m}^{-1}$  (Cornacchione y Suarez, 2015; Benes *et al.*, 2018). Aunque, al regar con agua con alto contenido salino es importante considerar no solo sus efectos sobre su capacidad de producción de forraje, sino sobre las propiedades de los suelos e implementar prácticas de manejo de los suelos para evitar la formación de costras superficiales y limitaciones en la infiltración.

Es una especie que mantiene condiciones normales de producción en suelos con pH entre 6,0 y 7,5, mostrando mayores limitaciones ante condiciones de acidez que ante presencia de valores de pH por encima de 7,5, aunque dependiendo del tenor salino de los suelos y de su concentración de sodio (Na). Cuando la proporción de Na supera el 15 % del complejo

de intercambio, los riesgos de desestabilización de los agregados –y las consecuentes pérdidas de porosidad– se intensifican limitando la producción de la alfalfa. Por lo tanto, no se recomienda la siembra de alfalfa en suelos que tengan contenidos salinos superiores a  $8 \text{ dS m}^{-1}$  o niveles de Na en el complejo de intercambio  $\geq 15 \%$ , así como tampoco en condiciones de texturas finas y con presencia de capa de agua freática cercana a la superficie.

La adecuada elección de los sitios para la siembra de pasturas de alfalfa es un factor crítico que predispone no solo la capacidad productiva del cultivo sino también su potencial demanda de nutrientes y sus requerimientos de manejo de la fertilización. En la Tabla 1 se resumen algunas características de suelos representativos de la región semiárida-subhúmeda pampeana, frecuentemente destinados a la producción de alfalfa de secano, que presentan variada aptitud productiva limitada a veces en forma permanente por la profundidad explorable por las raíces (Lote 1), o de manera ocasional por riesgo de ascenso del agua freática (Lote 2). A partir del análisis de los niveles extractables de fósforo (P), y asumiendo similares condiciones iniciales, se estimaron diferentes intensidades de extracción de nutrientes para cada condición, que es de mayor intensidad en el Lote 1 (suelo superficial con limitación permanente en profundidad) y de menor intensidad en el Lote 2 (sitio con riesgo de anegamiento por ascenso del agua freática). En ese contexto, las diferencias entre los sitios de producción conducen a variaciones en la magnitud y en la oportunidad de demandas de nutrientes, lo que impacta en las estrategias de manejo de las pasturas y su fertilización. Por un lado, la profundidad de la capa freática puede incidir grandemente en la productividad de la alfalfa. Cuando la capa freática es profunda, la respuesta de la alfalfa a la aplicación de nutrientes es menor que cuando la capa freática está más cercana a la superficie (Soto *et al.*, 2000). Por otro lado, los excesos transitorios de agua reducen tanto la cantidad de raíces como los rebrotes, afectando su productividad y persistencia (Barta, 1988). Por lo tanto, en suelos con frecuentes riesgos de anegamientos, pero con posibilidades de normal implantación y persistencia de la pastura, la demanda inicial de nutrientes es mayor que en suelos profundos (Soto *et al.*, 2005).

■ **Tabla 1.** Caracterización de sitios representativos de la región semiárida-subhúmeda pampeana seleccionados para la implantación y producción de pasturas de alfalfa de secano. Adaptado de Quiroga (com. pers.).

Características del suelo	Lotes		
	1	2	3
Espesor (cm)	60	>200	>200
Presencia de capa freática (cm)	No	160	No
Arcilla (%)	15	10	20
Limo (%)	40	25	50
Arena (%)	45	65	30
Materia orgánica, MO (%)	1,7	1,8	2,1
Índice MO/"arcilla + limo"	3,1	5,1	3,0
Capacidad de Intercambio Catiónico (meq/100g)	15	10	20
Calcio intercambiable (meq/100g)	5	5	6
Magnesio intercambiable (meq/100g)	2	2	4
Potasio intercambiable (meq/100g)	2	2	3
Sodio intercambiable (meq/100g)	1	0,5	1
Fósforo extractable (ppm)	8	29	14
pH en agua (actual)	5,4	6,4	5,8
pH en KCl (potencial)	4,5	6,2	4,9
Agua útil hasta 200 cm (mm)	70	140 (+150)	180

## Requerimientos generales de nutrientes de la alfalfa

Las pasturas de alfalfa bien implantadas y adecuadamente manejadas convierten diariamente la energía solar en materia seca, acercándose a los niveles de productividad potencial propios de cada ambiente. Así como la duración del período libre de heladas regula la longitud del ciclo anual de crecimiento, la disponibilidad de agua y nutrientes condiciona la capacidad de conversión de la energía solar (radiación) en materia seca, con tasas dependientes de las temperaturas y otros factores según el manejo realizado (área foliar remanente, estación del año, etc.). Los nutrientes provistos por el suelo, la fertilización y otros procesos biológicos tienen un papel preponderante en la determinación del des-

tino productivo de una pastura. Del total de nutrientes consumidos por la alfalfa (Tablas 2 y 3), el nitrógeno (N), el fósforo (P) y, con menor frecuencia, el azufre (S) y el boro (B), son los elementos que –en ausencia de restricciones hídricas severas– usualmente más limitan su producción (Barrigi *et al.*, 1975; Darwich, 1992). Además de estos, la alfalfa se caracteriza también por presentar altos requerimientos de calcio (Ca) y una marcada sensibilidad a condiciones de acidez de los suelos. En consecuencia, una estrategia eficiente en el manejo nutricional de esta especie debe contemplar, siempre que fuere necesario, no solo la fertilización sino también las correcciones por encalado (Melgar *et al.*, 2000; Quintero *et al.*, 1999).

■ **Tabla 2.** Requerimientos nutricionales de macro (MACRO) y de micronutrientes (MICRO) para la producción de materia seca de alfalfa. Adaptado de García *et al.* (1999).

Requerimientos			
MACRO	kg t <sup>-1</sup>	MICRO	g t <sup>-1</sup>
Nitrógeno	28,0 <sup>†</sup>	Zinc	1,5
Fósforo	2,8	Boro	2,7
Potasio	22,0	Cobre	0,7
Azufre	3,8	Manganeso	2,5
Calcio	12,0	Molibdeno	0,5
Magnesio	3,0		

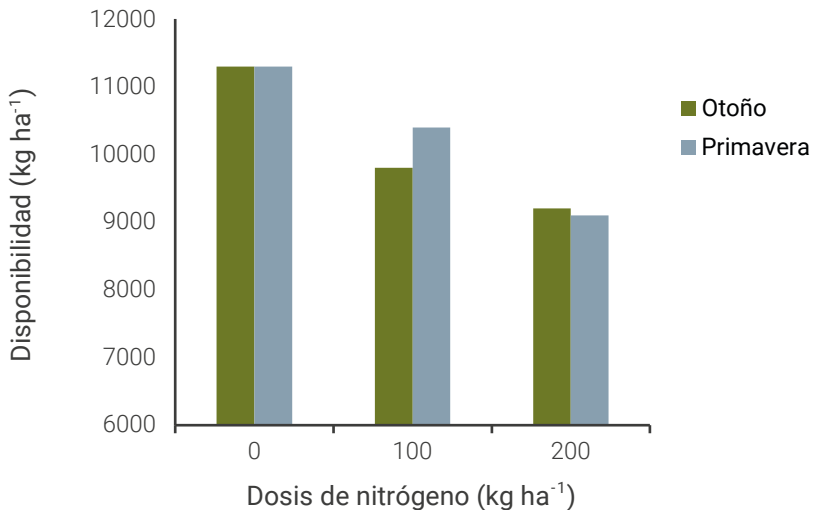
<sup>†</sup> Requerimientos mayormente provistos por la fijación biológica del N atmosférico

■ **Tabla 3.** Clasificación del estado nutricional de la alfalfa basada en rangos de concentración de nutrientes en hojas. Adaptado de Culot (1986).

Nutriente	Deficiente	Suficiente	Nutriente	Deficiente	Suficiente
	g kg <sup>-1</sup>			mg kg <sup>-1</sup>	
Nitrógeno	< 40,0	46,0 - 70,0	Manganeso	< 20,0	26 - 250
Fósforo	< 2,0	2,6 - 7,0	Hierro	< 20,0	31 - 300
Potasio	< 17,5	20,0 - 40,0	Boro	< 10,0	29 - 80
Calcio	< 2,5	5,1 - 30,0	Cobre	< 6,0	10 - 30
Magnesio	< 2,0	2,6 - 10,0	Molibdeno	< 0,5	1,1 - 4,0
Azufre	< 2,0	2,6 - 5,0	Zinc	< 10,0	21 - 70

## Nitrógeno (N)

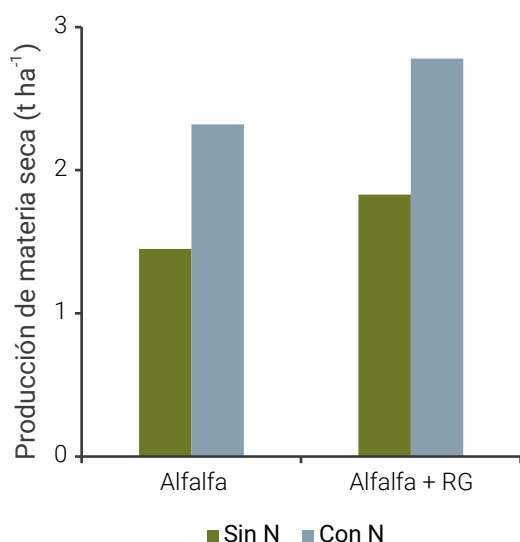
Por un lado, las grandes cantidades de N requeridas por la alfalfa son provistas mayoritariamente desde la atmósfera a través de la simbiosis con la bacteria *Ensifer meliloti*. Este proceso de fijación biológica de este elemento (FBN) se alcanza bajo adecuadas condiciones edáficas (aeración, profundidad, pH, etc.), incluyendo tanto una correcta provisión de agua y de nutrientes como también una inoculación eficiente de las semillas. Los detalles de todo el proceso de FBN se discuten en el capítulo 4 de esta publicación. Por otro lado, durante el año de implantación, y aun luego de su primer corte, la inclusión de *Azospirillum brasilense* en el tratamiento de inoculación con *Ensifer meliloti* contribuyó a mejorar las tasas de crecimiento en comparación con la de cultivos inoculados solamente con rizobios, sin que se hayan informado modificaciones significativas en los patrones de nodulación (Conti *et al.*, 1997). Dado que el N es el principal constituyente de las proteínas, una adecuada nutrición nitrogenada de la planta contribuye a la expansión del área foliar, a una mayor eficiencia en el uso de la radiación y a una mejor calidad del forraje.



■ **Figura 1.** Producción de biomasa aérea (kg ha<sup>-1</sup>) de una pastura consociada de alfalfa y gramíneas templadas bajo condiciones de fertilización nitrogenada (valores promedio de cuatro fuentes de N). Adaptado de Díaz-Zorita *et al.* (1998).



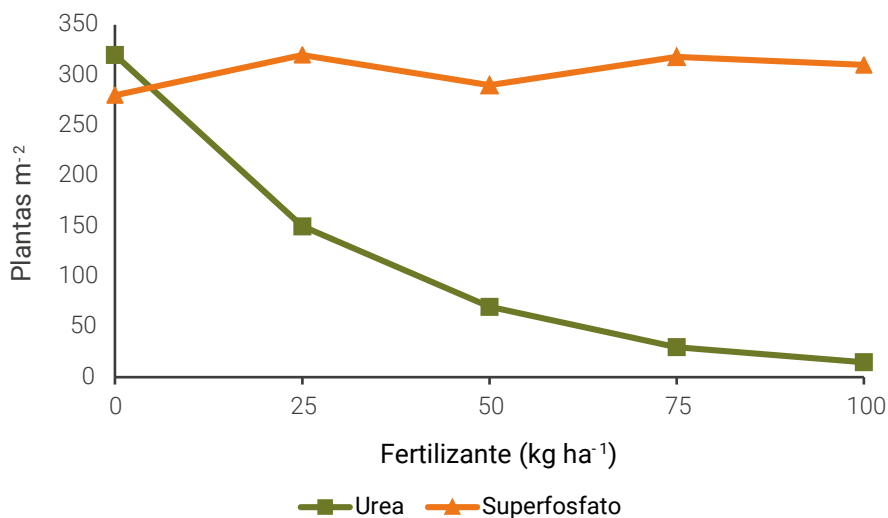
En la etapa de la implantación, la alfalfa responde negativamente al agregado de altas dosis de fertilizantes nitrogenados, disminuyendo no solo la densidad de plantas logradas y su capacidad de fijación simbiótica del N atmosférico (Hannaway y Shuler, 1993), sino también su posterior producción de forraje (Figura 1). Por el contrario, en pasturas ya implantadas se ha observado que la aplicación de N en el inicio de la primavera induce a una mayor tasa inicial de producción, con el consiguiente adelanto en la acumulación y la utilización del forraje (Figura 2). Este comportamiento, que se atribuye al decaimiento de la actividad de FBN, ha sido observado bajo condiciones de secano en varios ambientes. En esas condiciones, se ha recomendado la aplicación de fertilizantes nitrogenados, cuidando de hacerlo luego del pastoreo para evitar daños fitotóxicos al follaje (Raun *et al.*, 1999; Van Raij, 1991).



**Figura 2.** Producción de forraje de pasturas de alfalfa pura o en mezcla con raigrás (RG) fertilizadas con urea en su cuarto año de vida sobre un suelo Hapludol Típico del oeste de Buenos Aires. Adaptado de Díaz-Zorita *et al.* (2003).

Los efectos fitotóxicos de diferentes fertilizantes nitrogenados sobre la población de plantas de alfalfa es otro de los aspectos para considerar cuando se los utiliza durante la siembra de la pastura. Dosis relativamente altas de urea o de fuentes amoniacales aplicadas en la misma línea de siembra, reducen la cantidad de plantas logradas y la producción inicial de la pastura (Figura 3). El daño es de menor magnitud si se emplean otros fertilizantes o si se hacen aplicaciones incorporadas en

bandas y al costado de la línea de siembra. Los riesgos de fitotoxicidad son mayores si existen deficiencias hídricas en la capa de suelo donde se colocan las semillas y el fertilizante, y también en aquellos suelos con escasa capacidad de intercambio catiónico (CIC). Este último caso es muy frecuente en suelos de textura franca a arenosa y de moderado a bajo contenido de materia orgánica, lo que condiciona una baja capacidad para retener el amonio formado durante la disolución del fertilizante nitrogenado.



■ **Figura 3.** Efecto de la urea y del superfosfato sobre el número de plántulas de alfalfa emergidas. Adaptado de Vivas (1995).

## Fósforo (P)

El P es un elemento fundamental en la nutrición de la alfalfa porque interviene en múltiples procesos, como el desarrollo de la biomasa aérea y radical, la capacidad de nodulación y de fijación del nitrógeno atmosférico, el funcionamiento de regiones meristemáticas, la fotosíntesis, la síntesis de carbohidratos y proteínas, la transferencia de energía (ATP), entre otros. Una adecuada provisión de P es fundamental no solo para la productividad de la planta sino también para su tolerancia a factores de estrés (ej. sequía) y su persistencia. La adecuada provisión inicial

de P, cuando se fertilizan suelos potencialmente limitados en este elemento, muestra mejoras moderadas de la producción al inicio, pero de mayor magnitud en el segundo ciclo productivo (Bono y Alvarez, 2012). Este comportamiento, si bien independiente de la FBN, es un proceso que está estrechamente ligado al crecimiento de las plantas, habiéndose determinado que, bajo condiciones de limitación de P, el porcentaje de N derivado de la FBN no es afectado, pero sí la producción total de forraje (Racca *et al.*, 2001).

El análisis de suelo para determinar el nivel de P extractable es una herramienta de utilidad para diagnosticar ambientes con potenciales necesidades de fertilización fosfatada (Berardo, 1976). En general, la máxima productividad de gramíneas forrajeras se alcanza con menores niveles extractables de P del suelo que para leguminosas, y dentro de estas las exigencias de la alfalfa son mayores (Tabla 4).

■ **Tabla 4.** Rangos críticos de P extractable en el suelo (0 a 15 cm de profundidad), determinados por el método Bray Kurtz 1, para distintas especies forrajeras.

Especie	Rango crítico (ppm)	Fuente
Alfalfa	20-30	Quintero <i>et al.</i> (1999)
Trébol blanco	15-16	Bordoli (1998)
Trébol rojo	12-14	Bordoli (1998)
Lotus ( <i>L. corniculatis</i> )	10-12	Bordoli (1998)
Gramíneas	8-10	Bordoli (1998)

Suelos con niveles de P extractable (método de Bray Kurtz 1) inferiores a 25 ppm y pH neutro a ligeramente ácido requieren del agregado de fertilizantes fosfatados para la correcta implantación y el desarrollo de la alfalfa (Loewy y Ron, 1992; Loewy, 1994; Quintero *et al.*, 1993). La información generada en ensayos de invernáculo sugiere que, para lograr óptimos rendimientos de forraje, los niveles críticos de P en el suelo son mayores si están estimados con el agregado de otros elementos que cuando son calculados solo con la aplicación de P (Díaz-Zorita y Buschiazzo, 2004). Por lo tanto, estos niveles críticos son variables y dependen del nivel de producción y de la disponibilidad relativa de otros nutrientes (Vivas, 2000). Por ejemplo, el umbral de P extractable (método Bray Kurtz

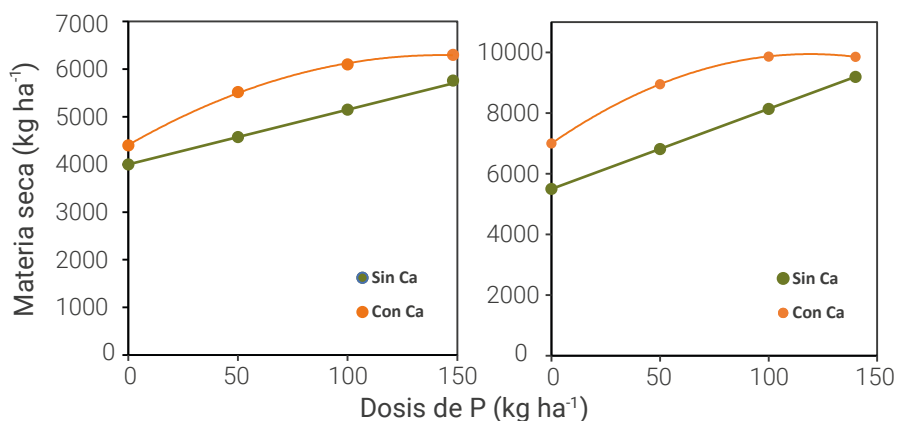
1) para obtener el 90 % de la producción relativa de alfalfa en molisoles de Entre Ríos es de 18,1 ppm (Pautasso y Barbagelata, 2017).

La efectividad de las distintas fuentes con P depende no solo de las propiedades del suelo (textura, pH y contenido de materia orgánica), sino también del tipo de fertilizante empleado y de su forma de aplicación. Además, las dosis para aplicar para el logro de aumentos en la producción de las pasturas dependen del nivel de P determinado en el suelo. En la Tabla 5 se presentan dosis orientativas de aplicación de superfosfato triple para la implantación o la fertilización de pasturas de alfalfa en producción, estimadas a partir de la integración de estas características edáficas (Quintero *et al.*, 1999). El efecto residual de los fertilizantes fosfatados depende fundamentalmente de la dosis aplicada, del tipo de suelo y de la fuente de fertilizante empleada (Boschetti *et al.*, 1996). En suelos con pH alcalino (mayor a 7,5) no se recomiendan aplicaciones con fuentes de baja solubilidad porque presentan una reacción muy lenta. Por el contrario, para condiciones de pH neutro o ligeramente ácido no existen restricciones significativas en cuanto a la solubilidad de las fuentes de P. Los mejores resultados en la utilización de rocas fosfóricas (fosfato natural o fosforitas) se obtienen en suelos de pH inferior a 5,5. En suelos de baja acidez (pH de 5,5 a 6,5), si se quieren obtener respuestas similares a las obtenidas con el uso de superfosfato triple (SPT), las dosis de aplicación de rocas fosfóricas deberían incrementarse entre 30 % y 50 % comparadas con las aconsejadas con SPT.

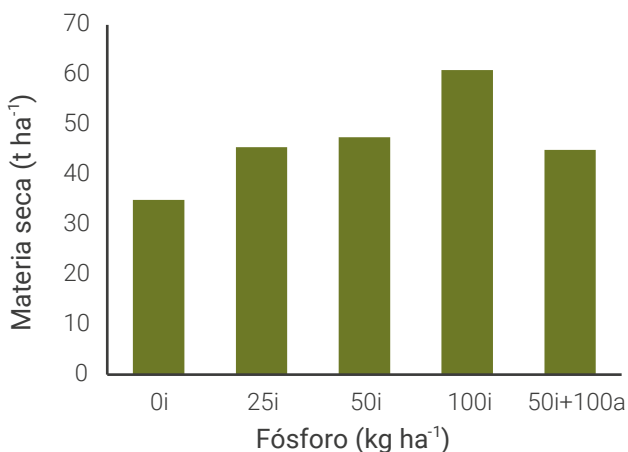
■ **Tabla 5.** Dosis orientativas de fertilización con superfosfato triple ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) para obtener una máxima producción de forraje de alfalfa en diferentes tipos de suelo. La refertilización indicada se refiere a suelos con contenidos de P extractable < 14 ppm.

P extractable (ppm)	Tipo de suelo		
	Franco arenoso a Arenoso (arcilla < 10 %)	Franco a Franco limoso (arcilla 10 a 30 %)	Franco arcilloso (arcilla > 30 %)
< 5	> 250	> 300	> 360
5 - 12	250 - 160	300 - 200	360 - 230
12 - 18	160 - 90	200 - 100	230 - 130
18 - 25	< 90	< 100	< 130
Refertilización	80	100	120

La acidez del suelo no solo condiciona la residualidad del fertilizante fosfatado, sino también la eficiencia de su aprovechamiento, tanto en aplicaciones localizadas en la siembra como en refertilizaciones (Figura 4). En general, dada la dinámica de movimiento del P en el suelo y el proceso de captación por las raíces (difusión), los tratamientos de refertilización fosfatada muestran menores niveles de productividad y de eficiencia de aprovechamiento que los de las correcciones aplicadas en el momento de la siembra (Figura 5).



■ **Figura 4.** Producción acumulada de materia seca de alfalfa en condiciones de fertilización (9 cortes) y refertilización (4 cortes) con P, con y sin enmienda cálcica (Ca). Adaptado de Vivas y Quaino (2000).



■ **Figura 5.** Producción acumulada de materia seca de alfalfa en Balcarce según dosis de fertilización superficial con P aplicado en la implantación (i) O en forma anual (a). Adaptado de Berardo (2000).

## Azufre (S)

En pasturas de alfalfa adecuadamente nutridas con N (eficientemente inoculadas) y con P (suelos con niveles de P extractable Bray Kurtz 1 superior a 20 ppm o fertilizadas con P) se pueden detectar deficiencias de otros elementos cuya corrección induce a mejoras en la producción forrajera. En este contexto y en suelos de textura gruesa, típicos de la región de La Pampa arenosa, se han descrito importantes contribuciones de aplicaciones de sulfato de amonio durante la implantación de alfalfares (Figura 6). En estos estudios también se determinó que el aporte por el uso de este fertilizante no solo sería por el mejoramiento de la nutrición de la pastura per se sino también por el estímulo sobre la capacidad de nodulación de las plantas y su consiguiente impacto en la FBN.

El S es un elemento con funciones afines a las del N, ya que integra la composición de varias proteínas y, por lo tanto, interviene en procesos asociados a la eficiencia de uso de la radiación y contribuye a la calidad del forraje, aportando proteínas esenciales para la nutrición animal. Es un elemento móvil que las plantas captan por el proceso de flujo de masas al tomar el agua del suelo. En ese contexto, la única alternativa de reposición en los sistemas agropecuarios es el uso de fertilizantes azufrados. Dado que aún no se han desarrollado métodos confiables para el diagnóstico de necesidades de este elemento, las recomendaciones de fertilización se sustentan en la consideración y el ajuste de experiencias regionales. En la región Pampeana se han informado efectos positivos de la aplicación de S en ambientes de La Pampa arenosa, con suelos profundos y de moderado contenido de materia orgánica, y en la región centro-este de Santa Fe sobre pasturas de alta producción (Fontanetto y Keller, 1999) (Figura 7). En el centro de Santa Fe –en suelos con 12 mg kg<sup>-1</sup> extractables de S y pH en agua de 7,5– la aplicación de yeso permitió aumentos de entre 9 y 12 kg de materia seca por cada kg de S aplicado; los efectos fueron de mayor duración con la dosis de 300 kg ha<sup>-1</sup> de S, la mayor que se usó en el ensayo (Miretti *et al.*, 2006).

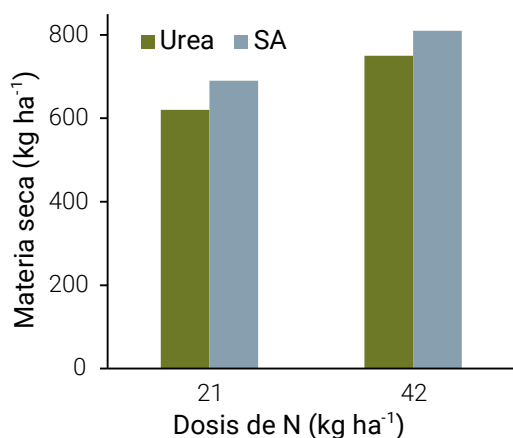


Figura 6. Efecto de la fertilización con urea o con sulfato de amonio (SA) sobre la producción inicial de pasturas con alfalfa en la región semiárida y subhúmeda pampeana. Adaptado de Díaz-Zorita y Fernández Canigia (1998).

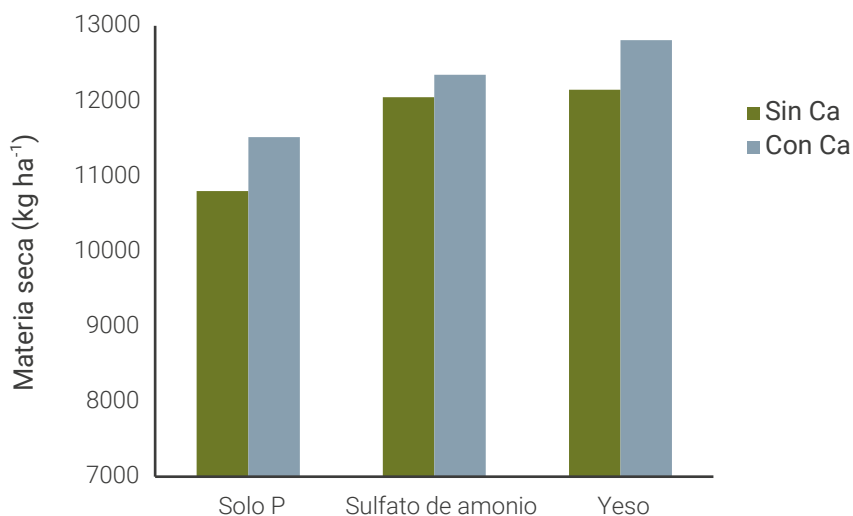


Figura 7. Producción de forraje de pasturas de alfalfa con y sin encalado (Ca) y fertilizadas con 40 kg ha⁻¹ de P y 24 kg ha⁻¹ de S según dos fuentes azufradas. Adaptado de Vivas y Fontanetto (2003).

## Otros nutrientes

Tal como se presentó en la Tabla 2, los requerimientos nutricionales de la alfalfa son altos y variados y no se circunscriben únicamente a N, P y S. No obstante, las experiencias sobre necesidades de fertilización con otros elementos en la región Pampeana no solo son escasas, sino

también de resultados variables. El potasio (K), además de intervenir en varios procesos metabólicos, juega un rol fundamental en el control no solo del equilibrio hídrico de las plantas sino también en la regulación del pH y en la acción de numerosas enzimas. Si bien los suelos de la región Pampeana destinados a la producción de alfalfa aún se encuentran en general bien provistos de este elemento, se observan reducciones significativas en sus niveles extractables superficiales que, en el mediano plazo, podrían limitar su normal capacidad de producción (Sainz Rozas *et al.*, 2019). Además, algunos estudios ya han descrito respuestas a la aplicación de fuentes potásicas en sistemas bajo riego de alta producción de esta pastura (Conti *et al.*, 1997).

Otro de los cationes que tiene un papel relevante en la producción de las plantas, principalmente por ser un componente crítico de la clorofila, es el magnesio (Mg), que también ha mostrado significativas reducciones en su nivel extractable en algunas áreas de la región Pampeana (Sainz Rozas *et al.*, 2019), aunque sin haberse registrado aún respuestas directas a su aplicación en alfalfa. En la siguiente sección de este capítulo sobre acidez y encalado se presentan y discuten los avances logrados respecto del manejo del Ca y del Mg para la corrección de la acidez edáfica en ambientes característicos de la región Pampeana.

La denominación genérica de micronutrientes, en contraposición a los macronutrientes, se aplica a un grupo de elementos que son requeridos en cantidades menores (Tabla 2), pero que desempeñan roles específicos en diversos procesos de regulación y de crecimiento de las plantas (García *et al.*, 2002). Tanto la expansión del área cultivada como la intensificación de los sistemas productivos, principalmente hacia el norte de la región Pampeana, han incrementado recientemente la frecuencia de detección de niveles deficitarios de microelementos (Melgar, 2004). El diagnóstico de estas condiciones potencialmente limitantes a la producción no es simple, particularmente al no disponerse de calibraciones locales de niveles críticos de referencia, tanto edáficos como foliares. En la Tabla 6 se resumen rangos sugeridos de niveles extractables de referencia para alcanzar para la normal producción de alfalfa como marco general para la interpretación de los análisis de suelos. La realización de diagnósticos de deficiencias con base en la sintomatología de las plantas es todavía más compleja, dado que en la mayoría de los



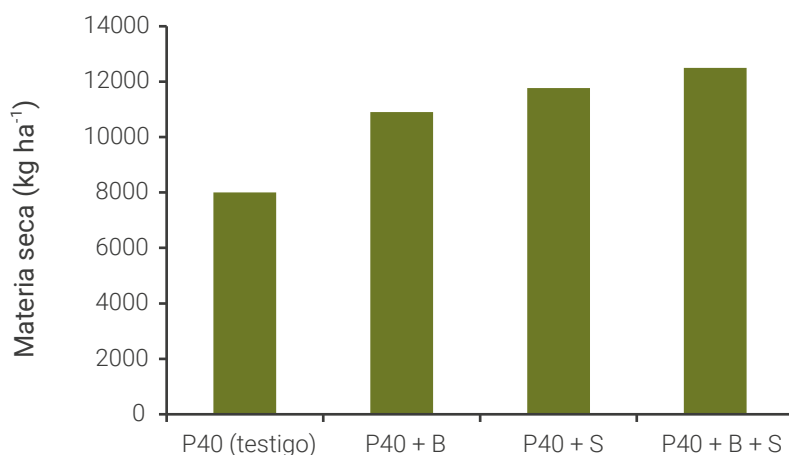
casos su clara manifestación es observable bajo condiciones extremas de deficiencias (Yamada, 2004), situación todavía poco frecuente en los suelos de la región Pampeana.

■ **Tabla 6.** Rangos aproximados de interpretación de niveles extractables de cinco micronutrientes de los suelos para la producción de alfalfa. En todos los casos extraídos con DTPA. Adaptado de Koenig *et al.* (1999).

Micronutrientes	Provisión		
	Baja	Marginal	Adecuada
	(ppm)		
Zinc (Zn)	< 0,8	0,8 - 1,0	> 1,0
Hierro (Fe)	< 3,0	3,0 - 5,0	> 5,0
Cobre (Cu)	< 0,2	-	> 0,2
Manganeso (Mn)	< 1,0	-	> 1,0
Boro (B)	< 0,25	0,25 - 0,5	> 0,5

Algunos ejemplos de aportes de la aplicación de micronutrientes para la eficiente producción de alfalfa se han descrito en ambientes de alta producción de la región centro-este de Santa Fe. En estas condiciones, se obtuvieron efectos positivos con aplicaciones de fuentes líquidas de boro (B), a razón de 2 kg ha<sup>-1</sup> fraccionados en cuatro aplicaciones durante el primer año de producción (Figura 8). El B interviene en los procesos de división celular y su deficiencia afecta directamente la capacidad de producción de forraje al limitar la tasa de crecimiento de las raíces y la nodulación del cultivo. También se han detectado resultados similares a la aplicación de este elemento en áreas del oeste de la provincia de Buenos Aires, en suelos de textura arenosa. No obstante, estas situaciones aún no son lo suficientemente generalizadas como para recomendar en forma justificada su inclusión en los planteos tradicionales de producción. Por ejemplo, en la EEA INTA Manfredi, la aplicación de un fertilizante foliar que contenía B, cobalto (Co), molibdeno (Mo) y zinc (Zn), no incrementó el rendimiento de forraje de la alfalfa a lo largo de una temporada de evaluación (Basigalup, comunicación personal). La conveniencia de fertilizar alfalfa con micronutrientes aún requiere intensificar sus estudios para detectar condiciones de potencial necesidad de uso, considerando no solo la oferta de estos según resultados de análi-

sis de suelos, sino también su interacción con el manejo, incluyendo por ejemplo correcciones con otros elementos, momento y frecuencia de la aplicación y fuentes de micronutrientes para aplicar.



■ **Figura 8.** Producción acumulada (8 cortes) de materia seca de alfalfa con una fertilización base de P (40 kg ha<sup>-1</sup>) y aplicaciones de S (12 kg ha<sup>-1</sup>) y de B líquido (2 kg ha<sup>-1</sup>) en la EEA INTA Rafaela. Adaptado de Vivas (2001).

## Acidez de suelos y encalado

Si bien los suelos de las zonas húmedas tienen la tendencia natural a incrementar su nivel de acidez, el fenómeno se acelera tanto con la intensificación de los ciclos agrícolas como con la introducción de modernas variedades de alfalfa que suponen una mayor extracción de cationes (Bruno y Romero, 1997; Suárez Fernández, 1992). El descenso de los contenidos de Ca y Mg se manifiesta en una disminución generalizada del pH, que en algunas zonas como el sur de Santa Fe y norte de Buenos Aires alcanza valores inferiores a 6. Cruzate y Casas (2003) indican que el 10 % de los lotes agrícolas de la región Pampeana tiene problemas severos de acidez, con valores de pH menores a 5; el 25 % presenta problemas menos severos, con niveles de pH entre 5,8 y 6,2; y el 30 % exhibe solo una ligera tendencia ácida, con rangos de pH entre 6,2 y 6,5. Esta situación conduce a considerar que para el logro de pasturas de alfalfa

de alta producción no es solo relevante considerar la condición general del sitio y su relación con ciclos de anegamiento o presencia de sales, sino también la oferta de nutrientes y la resolución de potenciales limitaciones asociadas a su acidificación (Gambaudo, 1998). Además de la intensificación en la extracción de nutrientes de los suelos por prácticas agrícolas intensivas, la producción de pasturas con base a variedades de alfalfa cada vez más productivas también contribuiría a los cambios descritos en los niveles extractables de cationes y en la acidez superficial actual de los suelos pampeanos (Sainz Rozas *et al.*, 2019).

Para elaborar recomendaciones de encalado son tres las preguntas a responder: 1) ¿es necesario corregir la acidez?, 2) entre los productos disponibles ¿cuál es la mejor fuente para la corrección? y 3) ¿cuánto hay que aplicar del producto elegido para la corrección? (Melo y Moreira, 2021). Para responder a cada una de estas preguntas, son varios los métodos y experiencias disponibles y en este capítulo presentamos algunos elementos que contribuyen a su análisis.

### *Acidez edáfica*

La determinación del pH es uno de los parámetros más importantes vinculados al conocimiento de la fertilidad química de un suelo, dado que permite interpretar la actividad que tendrán los iones presentes en la solución del suelo, que son los responsables de la nutrición mineral de las plantas y –en definitiva– del comportamiento de un cultivo. La capacidad de un suelo de oponerse a un cambio de pH dependerá de la composición química, física y físicoquímica del complejo absorbente. El rango de pH 6,5-6,8 (relación 1:2,5) es generalmente aceptado como el más apto para el desarrollo de los cultivos y de la flora microbiana del suelo. Son varios los procesos que pueden causar la acidificación edáfica, cuya ocurrencia dependerá del tipo de suelo, del cultivo y del manejo. Un conocimiento adecuado de estos procesos permitirá un mejor control de los factores que conducen al problema (Espinosa y Molina, 1999). Entre ellos, se describen brevemente:

- a) Extracción de cationes por parte de los cultivos. La saturación de bases que presenta un suelo en su capacidad de intercambio catiónico (CIC) es otra de las determinaciones importantes de la fertilidad química. Un suelo con un porcentaje adecuado de satura-

ción de bases debería contar con 65 % de Ca, 10 % de Mg, 8 % de K y 15 % de hidrógeno (H); el 5 % restante deberá repartirse entre sodio (Na), hierro (Fe), Mn, cobre (Cu) y Zn. La planta, para mantener su equilibrio interior, a medida que absorbe cationes libera  $H^+$  a la solución del suelo, lo que favorece la acidificación.

- b) Lavado de cationes en profundidad. El movimiento de cationes a horizontes subsuperficiales (lixiviación) también favorece la acidificación. Los aniones provenientes de la descomposición de la materia orgánica, al formar los llamados pares iónicos, se encargan de arrastrar cationes. También la actividad microbiológica, al generar anhídrido carbónico ( $CO_2$ ), que luego se transformará en bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) que se combinará con los cationes, favorece la acidificación.
- c) Uso de fertilizantes derivados del amoníaco. En el suelo, la reacción química que convierte el amoníaco ( $NH_3$ ) que contienen algunos fertilizantes –como la urea, el sulfato de amonio y el nitrato de amonio– en nitrato ( $NO_3^-$ ) también origina un exceso de protones ( $H^+$ ), lo que lleva a la acidificación del medio. Es necesario destacar que este es un proceso de largo tiempo, que se observa con un uso continuado de fertilizantes a dosis considerables. Este proceso es actualmente poco probable bajo las condiciones de producción de la región Pampeana, donde el uso (dosis y frecuencia) de estos fertilizantes es aún moderado.
- d) Descomposición de residuos orgánicos. La descomposición de importantes cantidades de residuos orgánicos, con la correspondiente liberación de ácidos y desprendimiento de  $CO_2$ , podría ser también responsable de la acidificación del suelo. Si bien este fenómeno es poco común, el uso cada vez más extendido de la siembra directa en forma continua –que aporta una importante masa de rastrojos al sistema– contribuye a su desarrollo. Sin embargo, desde un punto de vista agronómico, esta acidificación no sería tan indeseable como las anteriores y constituiría un menos desagradable problema para solucionar.

### *Encalado*

El encalado es la práctica que corrige la acidez edáfica a través de la aplicación de productos capaces de neutralizarla. Son varios los mate-

riales calcáreos de uso agropecuario que se pueden usar para corregir la acidez edáfica. Entre los más empleados se encuentran:

- Óxido de calcio ( $\text{CaO}$ ) o “cal viva” o “cal quemada”: es un polvo de color blanco y de muy difícil y desagradable manipulación. Al ser de reacción muy rápida, resulta de utilidad cuando se desea una pronta corrección de la acidez. Dada su naturaleza, debe mezclarse enseguida con el suelo para evitar su endurecimiento.
- Hidróxido de calcio [ $\text{Ca(OH)}_2$ ] o “cal apagada”: es un producto que se obtiene a partir de mezclar el óxido de calcio con agua. Tiene una granulometría muy fina que dificulta su manipulación y utilización. Al igual que el producto anterior, es de reacción muy rápida y debe incorporarse inmediatamente al suelo.
- Carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) o “cal agrícola”: es el material más utilizado para la corrección de la acidez del suelo. Se obtiene tanto a partir de las rocas caliza, calcita y calcárea como de conchillas marinas, las que son molidas y tamizadas hasta alcanzar la granulometría correspondiente. En general, no se trata de materiales puros, sino de productos que pueden contener un grado variable de impurezas como arcilla, arena y limo.
- Dolomita ( $\text{CaCO}_3 + \text{MgCO}_3$ ) o “doble carbonato de calcio y magnesio”: si bien tiene reacción más lenta que el carbonato de calcio, presenta la ventaja de suministrar magnesio además de calcio.
- Óxido de magnesio ( $\text{MgO}$ ): material de textura muy fina y de solubilidad lenta. Dado que aporta solamente magnesio, es un material adecuado para utilizar cuando la relación Ca:Mg no es la adecuada.
- Carbonato de magnesio ( $\text{MgCO}_3$ ) o “magnesita”: es una muy buena fuente de magnesio y es muy utilizado como corrector de acidez, especialmente cuando la relación Ca:Mg está desbalanceada.
- Escorias industriales: son silicatos de calcio ( $\text{CaSiO}_3$ ) y de magnesio ( $\text{MgSiO}_3$ ) que provienen, como residuos, de la industria del acero y del hierro. Pese a su muy lenta solubilidad, pueden utilizarse como correctores de la acidificación edáfica.

En la Argentina, los materiales calcáreos de uso agropecuario están definidos por la Norma IRAM 22451 (IRAM, 1997), que establece los requisitos, las condiciones de recepción y los métodos de ensayos para su uso y manipulación. En esa normativa, al material calcáreo se lo define como el producto constituido básicamente por calcio o por calcio y magnesio, que actúa como corrector de suelo y es fundamental para la nutrición vegetal.

La concentración y la granulometría de los materiales determinan el poder relativo de neutralización total (PRNT), que está compuesto por el poder neutralizador del material (PN) y su velocidad de reacción o eficiencia relativa (ER), quedando definido de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{PRNT (\%)} = \frac{\text{ER} \times \text{PN}}{100}$$

El poder neutralizador (PN) de la acidez se determina a través de una comparación con el valor neutralizante del carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), que actúa como valor de referencia. Por ese motivo se denomina "equivalente en carbonato de calcio" (ECC) y se expresa en g de  $\text{CaCO}_3$  por cada 100 g del producto evaluado. Este valor de comparación se determina a través de ensayos de laboratorio, donde se compara el material para evaluar con igual cantidad de  $\text{CaCO}_3$  puro y de similar granulometría. De esta manera se determinó el valor de neutralización de los diferentes óxidos, hidróxidos, bicarbonatos y carbonatos que están disponibles en el mercado (Tabla 7). Además, según los valores de PRNT, la normativa reconoce cuatro categorías de calidad entre los materiales disponibles para la corrección de la acidez (Tabla 8).

En función de su concentración, los materiales calcáreos se clasifican como: a) dolomíticos: cuando contienen más del 12 % de óxido de magnesio (MgO), b) magnesianos: cuando la concentración de MgO está entre el 5 y 12 %; y c) calcíticos: cuando contienen menos del 5 % de MgO. Los productos dolomíticos, por la presencia de Ca y de Mg, tienen un PN superior y su aplicación se recomienda cuando se deba corregir el nivel de ambos elementos en el suelo. En general, cuanto menor es el

valor de PN se requerirán mayores cantidades de producto para corregir un determinado nivel de acidez en el suelo. Además, es importante conocer en estos productos la presencia y el potencial aporte de otros elementos que puedan aumentar la eficiencia de corrección del problema de acidez. También se debe cuidar la presencia de metales pesados tóxicos atendiendo a la ley de Residuos Peligrosos (N.º 24051), donde se establecen niveles que se deben respetar para preservar la calidad y seguridad de los suelos.

■ **Tabla 7.** Designación, composición química y equivalente de carbonato de calcio ( $\text{CO}_3\text{Ca}$ ) en estado puro del poder neutralizador de materiales calcáreos de uso agropecuario según la Norma IRAM 22451 (30).  $x = \text{CaO}$  (%);  $y = \text{MgO}$  (%).

Tipo	Designación IRAM	Composición química	Equivalente en $\text{CaCO}_3$
I	Caliza	$\text{CaCO}_3$	100
II	Dolomita	$\text{CaCO}_3, \text{MgCO}_3$	$100x + 119y$
III	Conchilla	$\text{CaCO}_3$	100
IV	Cal viva cálcica	$\text{CaO}$	178
V	Cal viva dolomítica	$\text{CaO}, \text{MgO}$	$178x + 250y$
VI	Cal hidratada cálcica	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	135
VII	Cal hidratada dolomítica	$\text{Ca}(\text{OH})_2, \text{Mg}(\text{OH})_2$	$135x + 172y$

■ **Tabla 8.** Categorías reconocidas de calidad de los materiales calcáreos para uso agropecuario según su poder relativo de neutralización total (PRNT).

Calidad	PRNT (%)
Superior	Más del 90
Buena	Entre el 75 y 90
Regular	Entre el 60 y 74
Inferior	Entre el 45 y 59

La eficiencia relativa (ER), como ya fuera señalado, es la velocidad de reacción que el producto tiene en el suelo en función de su granulometría. Los materiales más finos reaccionan más rápidamente y tienen menor residualidad. La determinación de la ER se hace considerando la canti-

dad de material retenido en seis tamices estandarizados, a los que les corresponde un valor ya definido de eficiencia (Tabla 9).

■ **Tabla 9.** Nivel de eficiencia relativa de materiales calcáreos usados como enmiendas según su granulometría. Adaptado de Norma IRAM 22451 (García et al., 1999).

Tamiz IRAM (mm)	Eficiencia Relativa (%)
2,36	5
0,85	17
0,45	30
0,25	55
0,15	80
0,075	100
< 0,075	125

Los materiales de tamaño de partículas más finas ( $ER \geq 80\%$ ) tienen reacción inmediata, por lo que aplicándolos entre dos y cuatro meses antes de la siembra de los cultivos podrán corregir la acidez de manera oportuna. El resto de los materiales muestran reacciones más lentas y graduales, de forma que la corrección del problema de acidez llevará un tiempo mayor y variable, que en los casos de ER de aproximadamente el 5 % puede estar cercano a los tres años. Algunos productos calcáreos peletizados son elaborados con materiales muy finos (diámetro de partículas menores a 0,075 mm), lo que les confiere una alta ER.

### *Determinación de los requerimientos de encalado*

Son varios los criterios para decidir la cantidad de enmienda calcárea a agregar al suelo (Tisdale et al., 1993), dependiendo si el objetivo es: i) corregir la acidez hasta un nivel de neutralidad (pH 6,5-6,8); ii) disminuir la acidez hasta lograr un pH conveniente para el normal crecimiento del cultivo; iii) aportar los cationes  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  con el propósito de incrementar su saturación en el complejo de intercambio; o iv) favorecer la disponibilidad de P y Mo.

El pH es un buen indicador de la acidez edáfica, pero por sí solo no es suficiente para determinar los requerimientos de enmienda necesaria.



Por lo tanto, es también importante la cantidad de cationes extractables del suelo ya que, como se mencionó anteriormente, una menor concentración de estos es la causa principal de la acidez. Considerando el grado de saturación de tres de los cationes más importantes ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{K}^+$ ) y la capacidad de intercambio catiónico, se podría clasificar el estado de la relación entre ambas, como se resume en la Tabla 10:

■ **Tabla 10.** Categorización de la relación entre saturación de bases y la capacidad de intercambio catiónico de un suelo.

	Calcio (%)	Magnesio (%)	Potasio (%)
Baja	< 60	< 5	< 1,5
Moderada	60 - 70	5 - 6	1,5 - 3,0
Alta	> 70	> 6	> 3,0

Entre varios métodos para determinar las cantidades de enmienda calcárea para agregar a las condiciones edáficas predominantes en la región Pampeana se sugieren los siguientes (Fertilizar, 1996):

1) Método del cálculo de saturación de bases: asumiendo que existe una relación entre la saturación de bases y el pH deseado u objetivo, la necesidad de encalado se calcula a partir de la saturación de bases actual con respecto a la deseada. Es el método más utilizado y la corrección de la acidez surge de la siguiente fórmula:

$$\text{Necesidad de encalado (t ha}^{-1}\text{)} = \frac{\text{CIC} \times (\text{V2} - \text{V1})}{100}$$

donde CIC es la capacidad de intercambio catiónico extraído con acetato de amonio 1N; V1 el porcentaje actual de saturación de bases del suelo estimada según la relación porcentual entre la suma de bases con respecto a la CIC ( $\text{V1} = \text{suma de bases}/\text{CIC} \times 100$ ); y V2 el porcentaje de saturación de bases objetivo o deseado.

Finalmente, la cantidad de calcáreo para aplicar es ajustada según el PRNT (Melgar, 2004) del material utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Necesidad de calcáreo (t ha}^{-1}\text{)} = \frac{\text{CIC} \times (\text{V2} - \text{V1})}{100} \times f$$

donde el factor  $f$  es estimado como  $100/\text{PRNT}$ .

2) Método del buffer SMP: esta metodología, utilizando una suspensión del suelo en una solución reguladora ("buffer"), determina la reducción necesaria para corregir el valor de pH y, a partir de relaciones ya establecidas, estimar la cantidad de la enmienda recomendada para alcanzar un nivel objetivo de pH. Su uso en la región Pampeana es de escasa difusión porque, en general, indica mayores necesidades de encalado que las estimadas por el método de saturación de bases.

3) Método de curvas de neutralización: el cálculo de la necesidad de enmienda cálcica se realiza a partir de la incubación de una muestra del suelo para corregir con dosis crecientes de carbonato de calcio hasta alcanzar el equilibrio en los niveles de acidez. En general, este método es utilizado como patrón de ajuste de los otros dos métodos anteriores, pero no se emplea rutinariamente para el diagnóstico de necesidades de encalado dado la duración prolongada de su procedimiento analítico.

### *Resultados de experiencias locales de la aplicación de encalado en suelos con alfalfa*

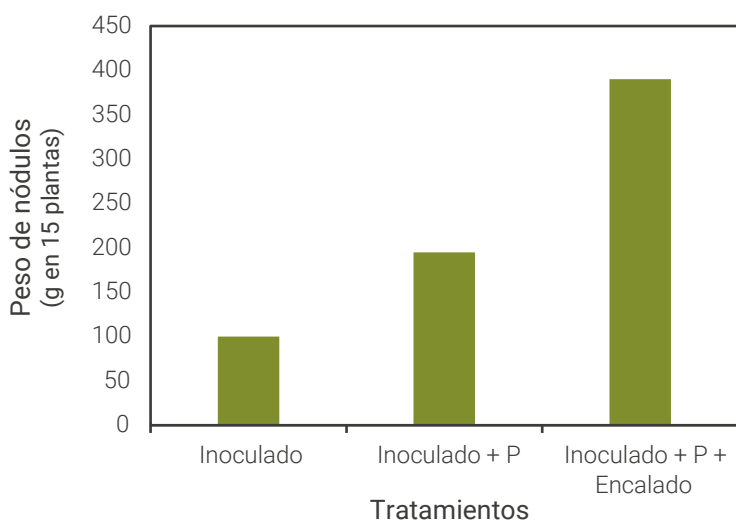
La corrección de la acidez de los suelos al encalar provee de mejoras físicas, químicas y biológicas que contribuyen a mejorar la implantación, producción y persistencia de pasturas de alfalfa (Gambaudo, 1998). Entre algunos de estos beneficios, se describen aumentos en los niveles extractables de P en la solución del suelo al reducirse la formación de compuestos de baja solubilidad ligados al hierro y al aluminio presentes en condiciones de acidez. En este sentido, al corregirse la acidez de los suelos, se mejora la eficiencia en el uso de fertilizantes fosfatados al limitarse la formación de precipitados que reducen su disponibilidad para las plantas. Indirectamente, al disminuir la acidez, se aumenta la liberación de nutrientes –como N, P y S– como consecuencia de la mayor actividad de microorganismos descomponedores de la materia orgánica (Honda y Honda, 1990). En cuanto a los aportes a la condición física de los suelos, el aumento de la cantidad de Ca en la solución del

suelo conlleva mayor estabilidad de los agregados, disminución de los riesgos de encostramientos y sellados superficiales que permiten mejorar las condiciones de emergencia e implantación de las plántulas de alfalfa. Además, al mejorar la estabilidad del sistema poroso se favorece la mayor aireación e infiltración del agua de lluvia. Pabón *et al.* (2003) determinaron que la aplicación de diferentes cantidades de escorias de siderurgia (PRNT= 97) produjo una mayor tasa de infiltración del agua comparada con la de un suelo sin enmendar. A los 18 meses de la aplicación, midieron valores de infiltración de 22, 27 y 37 mm h<sup>-1</sup> para las dosis de 1, 2 y 3 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente. La mejora relativa representó aumentos de 32 a 116 % con respecto a la tasa de infiltración del control sin aplicación de la enmienda (17 mm h<sup>-1</sup>).

La acidez limita la actividad de la mayoría de los microorganismos que participan del ciclado del N en procesos de amonificación, nitrificación, desnitrificación e inmovilización y, por lo tanto, impactan en su disponibilidad. También, la fijación del N atmosférico (N<sub>2</sub>), tanto simbiótica como no simbiótica, disminuye en suelos ácidos. Por ejemplo, el crecimiento y actividad de *Ensifer meliloti* es más eficiente en un rango de pH 6,8-7,0 (Honda y Honda, 1990). En condiciones de acidez, se describen limitaciones tanto sobre la supervivencia y la colonización de los rizobios como sobre la formación de nódulos y su funcionalidad. Toniutti *et al.* (1977) estudiaron el efecto de la nodulación sobre la producción de alfalfa en suelos de la zona central de Santa Fe con pH corregidos a valores entre 6,2 y 6,4, describiendo mayor nodulación al encalar (Figura 9). En este estudio la producción de alfalfa en el primer año superó en casi 150 % la producción de biomasa observada en el control sin encalar. Casas (1999) describió resultados similares de mejoras en nodulación y en producción inicial de alfalfa al aplicar dolomita como enmienda cálcica (Figura 10).

La acidez de los suelos, entre otros, es uno de los factores que explica la disminución en el número de plantas de alfalfa durante su implantación y los siguientes ciclos en producción. Según estudios en la región sur de Córdoba, al encalar y mantener niveles de pH superficial de los suelos superiores a 6, se describen mejoras en implantación y en persistencia de plantas de alfalfa (Tabla 11). Carta *et al.* (1997), en una experiencia realizada en Junín (Buenos Aires), mostraron que luego de tres años la

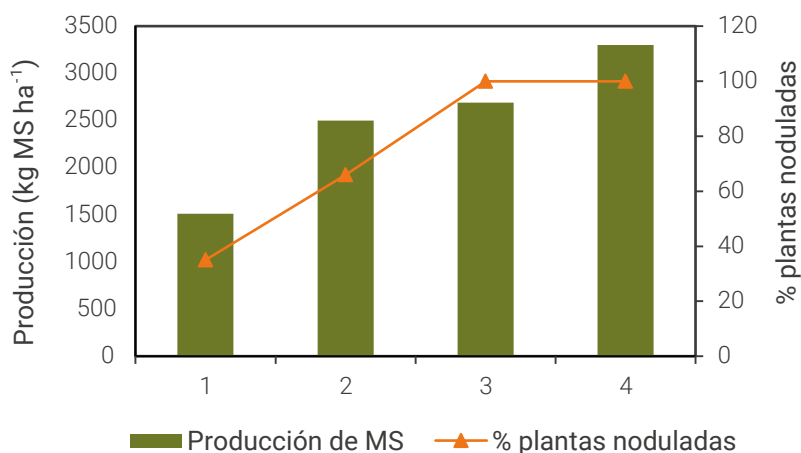
cobertura de una pastura de alfalfa fue mayor al encalar con  $2 \text{ t ha}^{-1}$  de caliza que la del control sin esta enmienda, alcanzando valores de 76 % y 46 %, respectivamente. Respecto de la no corrección de acidez, el encalado prácticamente duplicó la producción de forraje acumulado en los tres años de la pastura. Aumentos de similar magnitud se lograron al aplicar enmiendas calcíticas en varios estudios en la región central de Santa Fe, con mejoras en el rendimiento de forraje de entre 30 % (Pabón *et al.*, 2003) y 61 % (Fontanetto y Keller, 1999), equivalentes a la producción adicional de entre 5 y 9 rollos  $\text{ha}^{-1}$ .



■ **Figura 9.** Biomasa de nódulos en plantas de alfalfa luego de 5 meses de la siembra en plantas de alfalfa según tratamientos de inoculación, fertilización con P y encalado en la región central de Santa Fe. Adaptado de Toniutti *et al.* (1977).

Estudios desarrollados en Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba coincidieron en mostrar mejoras de hasta casi 19 % en la producción de materia seca de alfalfa con la aplicación de dosis de 700 a  $1000 \text{ kg ha}^{-1}$  de caliza o de dolomita. Estas mejoras se evidenciaron durante el año de implantación de las pasturas y hasta 27 meses luego de su aplicación, sin detectarse cambios en la concentración foliar de calcio y de magnesio y validando así la contribución integral sobre la producción que se hace al corregir la acidez de los suelos hacia niveles de neutralidad (Vazquez *et al.*, 2010). En este estudio, se observó que al encalar los niveles de P extractable tendieron a disminuir, siendo conveniente –para

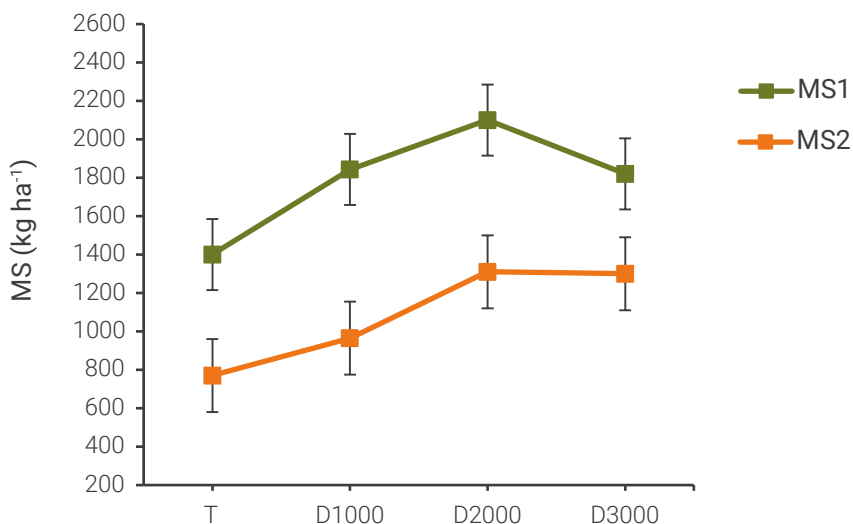
el logro de pasturas de alta producción– acompañar esta práctica con el adecuado diagnóstico y corrección de necesidades de fertilización fosfatadas. En un Hapludol del centro de Buenos Aires con 5,5 de pH, la aplicación de dosis crecientes de dolomita entre 1000 y 3000 kg ha<sup>-1</sup> incrementó los valores de pH a partir de los 9 meses y hasta los 21 meses de su incorporación, alcanzando valores de hasta 6,2 (Machetti *et al.*, 2018). En estas condiciones se describieron, hasta la aplicación de 2000 kg ha<sup>-1</sup> de la enmienda, aumentos en la producción de alfalfa, tanto durante la implantación como en los cortes siguientes (Figura 11).



■ **Figura 10.** Efecto del encalado sobre la producción de materia seca y la nodulación de alfalfa en el noroeste de Buenos Aires. Adaptado de Casas (1999).

■ **Tabla 11.** Efecto del encalado de suelos con pH inicial inferior a 6 sobre la población y persistencia de plantas de alfalfa luego de 540 días de su siembra. Adaptado de Jove (1977).

Sitio	Plantas m <sup>2</sup>		Persistencia relativa a la densidad de siembra (%)	
	Control sin encalar	Encalado	Encalado	Control sin encalar
1	51	60	37	18
2	53	59	43	29
3	53	62	53	40
Promedio	52	60	44	29



**Figura 11.** Producción acumulada de biomasa de alfalfa según niveles de dolomita aplicada en un Hapludol con pH inicial de 5,5. MS1: primeros 3 cortes, MS2: 4 cortes posteriores. Letras diferentes, en un mismo momento de análisis (MS1 o MS2), indican diferencias significativas entre dosis. Adaptado de Machetti et al. (2018).

## Consideraciones finales

La alta producción de forraje de alfalfa requiere de la elección de suelos profundos con bajo riesgo de anegamiento, salinidad o alcalinidad, además de considerar una adecuada y estratégica provisión de nutrientes. Nitrógeno, fósforo y azufre son los macroelementos que con mayor frecuencia y magnitud limitan la normal producción de alfalfa en la región Pampeana. La eficiente inoculación y el cuidado del activo crecimiento de las plantas contribuyen satisfactoriamente a la nutrición nitrogenada. Para el diagnóstico y recomendación de correcciones en la oferta de P, es importante evaluar los niveles extractables de los suelos y ajustar las dosis de corrección atendiendo a la textura del suelo y a las fuentes fosfatadas para aplicar. La incorporación de azufre es conveniente durante la implantación o al inicio del ciclo productivo estival. Sin bien en toda el área de producción se han descrito reducciones en los niveles extractables de otros elementos, la información de respuestas a la aplicación de elementos tales como potasio, magnesio y de micronutrientes

es aún limitada y requiere de mayor exploración para su incorporación efectiva en modelos de recomendaciones de fertilización.

La frecuencia de suelos con acidez moderada es creciente, por lo que es conveniente su evaluación y corrección para evitar condiciones de producción en suelos con valores de pH inferiores a 5,0-5,5. En estas condiciones, al encalar hasta niveles de pH próximos a 6,0 se observan mejoras sobre el suelo y sobre la implantación, la persistencia y la producción de forraje.

## BIBLIOGRAFÍA

- BARRIGI, C.; N. ROMERO; G. SCHENKEL. 1975. *Deficiencias nutricionales de suelos pampeanos para el cultivo de la alfalfa determinadas mediante experimentos en mace-tas*. EERA INTA Anguil. Proyecto FAO-INTA. 71/548. Documento de Trabajo N.º 2, 17 pp.
- BARTA, A.L. 1988. *Response of Field Grown Alfalfa to Root Waterlogging and Shoot Re-moval. I Plant Injury and Carbohydrate and Mineral Content of Roots*. Agronomy J. 80: 889-892.
- BENES, S.E.; G. GALDI; R.B. HUTMACHER; S.R. GRATTAN; I. CHAHAL; D.H. PUTNAM. 2018. *Alfalfa (Medicago sativa L.) is more tolerant to salinity than guidelines indicate: Implications of field and greenhouse studies*. En: Basigalup, D.; M. Spada, A. Odorizzi; V. Arolfo (Eds.). *Proceedings of the second world alfalfa congress*. Cordoba (Argenti-na).45-48 pp.
- BERARDO, A. 1976. *Método de diagnóstico para la fertilización fosfatada en los suelos del sudeste bonaerense*. IDIA (Supl.) 33: 337-50.
- BERARDO, A. 2000. *Dinámica del fósforo en el sistema suelo-planta: eficiencia, residua-lidad y manejo de la fertilización*. En: INPOFOS (org.). *Jornadas de Actualización Técnica para profesionales "Fertilidad 2000"*. Rosario. 4-10 pp.
- BERHONGARAY, G.; M. BASANTA; J.M. JAUREGUI. 2019. *Water table depth affects per-sistence and productivity of alfalfa in Central Argentina*. *Field Crops Research* 235: 54-58.
- BONO, A.; R. ALVAREZ. 2012. *Fertilización en pasturas asociadas con alfalfa en la región semiárida y subhúmeda pampeana*. *Actas XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo y XIX Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo*. Mar del Plata (BA, Argentina), en CD.
- BORDOLI, J.M. 1998. *Fertilización de pasturas de leguminosas y mezclas de gramíneas y leguminosas*. *Jornada de Fertilización en Cultivos y Pasturas*. EEA Concepción del Uru-guay-INTA, s/p.
- BOSCHETTI, G.; C. QUINTERO; R. BENAVIDEZ. 1996. *Residualidad del fertilizante fos-fatado en pasturas consociadas de Entre Ríos (Argentina)*. *Ciencia del Suelo* 14: 20-23.
- BRUNO, O.; L. ROMERO. 1997. *Evaluación de cultivares de alfalfa bajo corte*. *Informa-ción Técnica para Productores 1995-1996*. EEA Rafaela INTA. 1-2 pp.
- CARTA, H.; L. VENTIMIGLIA; L. CARLOS. 1997. *Efecto de la corrección de la acidez del suelo en la producción de forraje de alfalfa*. *Revista de Téc. Agropec*. INTA EEA Pergami-no Vol. II (4): 36-19.
- CASAS, R. 1999. *Enmiendas cálcicas en la producción de alfalfa*. *Agromercado*. *Cuader-nillo Lechero* 31: 59-63.
- CONTI, M.; A.M. DE LA HORRA; N.M. ARRIGO; A. MARCHI. 1997. *Fertilización e in-teracción K-P sobre el rendimiento de alfalfa en un Haplustol Típico (Zona Semiárida, Argentina)*. *Ciencia del Suelo* 15: 51-52.



- CORNACCHIONE, M.V.; D.L. SUAREZ. 2015. *Emergence, Forage Production, and Ion Relations of Alfalfa in Response to Saline Waters*. *Crop Science* 55: 444-457.
- CRUZATE, G.; R. CASAS. 2003. *Necesidades de nutrientes en la Agricultura Argentina. Jornadas Internacionales sobre Uso de Minerales para una Agricultura Sustentable – Fertilizantes y Correctores de Suelos. Organizada por Proyecto Fertilizantes de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo de la Cooperación Iberoamericana y la Cámara Argentina de Empresarios Mineros*. INTA Pergamino.
- CULOT, J.P.H. 1986. *Nutrición mineral y fertilización en el ambiente de la Región Pampeana*. En: Bariggi, C.; C.D. Itria; V.L. Marble; J.M. Brun (eds.). *Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa*. Colección Científica INTA, Cap. 4. Tomo XXII, Buenos Aires. 81-117 pp.
- DARWICH, N. 1992. *Fertilización de Praderas. Primer Congreso Mundial sobre Producción, Utilización y Conservación de Forrajes Empleados en la Alimentación de la Ganadería Vacuna – Forrajes '92*. Buenos Aires. 77-86 pp.
- DÍAZ-ZORITA, M.; M. FERNÁNDEZ CANIGIA. 1998. *Azufre y nitrógeno en la implantación de pasturas perennes en la región de la Pampa Arenosa*. *Ciencia del Suelo* 16: 103-106.
- DÍAZ-ZORITA, M.; O. PERALTA; G. GROSSO. 1998. *Fertilización nitrogenada en pasturas de alfalfa y festuca en el noroeste bonaerense*. *Rev. Arg. Prod. Animal* 18: 97-98.
- DÍAZ-ZORITA, M.; M. BARRACO; O. PERALTA. 2003. *Efecto de la fertilización nitrogenada y la interseembra con raigrás perenne en la acumulación de forraje de alfalfa en producción*. *Rev. Arg. Prod. Animal* 23: 120-121.
- DÍAZ-ZORITA, M.; D.E. BUSCHIAZZO. 2004. *Alfalfa production as a function of soil extractable phosphorus in the semi-arid Pampas*. *Better Crops Int.* 88: 24-27.
- DÍAZ-ZORITA, M.; R.M. BALIÑA; M.V. FERNANDEZ CANIGIA. 2012. *Azospirillum brasilense enhances alfalfa productivity: field evaluation*. *Proceedings of the 9th International and 1st Latin American PGPR Workshop, Medellin (Colombia)*. 75 p.
- ESPINOSA, J.; E. MOLINA. 1999. *Acidez y Encalado de Suelos*. INPOFOS. *Oficina Regional para el Norte de Latinoamérica*, 42 p.
- FERTILIZAR. 1996. *Encalado*. En: Melgar, R. (Ed.). *Proyecto Fertilizar*. Número especial. EEA Pergamino-INTA. 14 p.
- FONTANETTO, H.; O. KELLER. 1999. *Fertilización azufrada en alfalfa*. *Agromercado. Cuadernillo de Forrajeras* 30: 7-9.
- GAMBAUDO, S. 1998. *Encalado de suelos ácidos para la producción de alfalfa*. En: Melgar, R. (Ed.). *Proyecto Fertilizar*. EEA Pergamino-INTA. *Pasturas*: 24-26.
- GAMBAUDO, S.; A. ZAMPAR; L. TOMATIS; O. QUAINO. 2001. *Respuesta de la alfalfa a la aplicación de dos enmiendas calcáreas*. INPOFOS. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* 12: 4-6.

- GARCÍA, F.O.; M.L. RUFO; I.C. DAVEREDE. 1999. *Fertilización de pasturas y verdeos. INPOFOS. Informaciones Agronómicas de Cono Sur 1: 2-11.*
- GARCÍA, F.; F. MICUCCI; G. RUBIO; M. RUFFO; I. DAVEREDE. 2002. *Fertilización de forrajes en la Región Pampeana. INPOFOS Cono Sur (1.º Ed.), Buenos Aires. 76 p.*
- HANNAWAY, D.; P. SHULER. 1993. *Nitrogen fertilization in alfalfa production. J. Prod. Agric. 6 (1): 80-85.*
- HONDA, C.; A. HONDA. 1990. *Acidez. En: Honda, C.; A. Honda (Eds.). Cultura da Alfafa. Cambará, IARA Artes Gráficas Ltda., Brasil. 165-176 pp.*
- IRAM. 1997. *Instituto Argentino de Normalización. Norma 22451. Materiales calcáreos para uso agropecuario. Requisitos y Métodos de Ensayo. 18 p.*
- JOVE, P. 1977. *Experiencias de encalado de alfalfa en el sur de la Pcia. de Córdoba. II Jornadas Nacionales sobre Corrección y Mejoramiento de Suelos con Encalado. Convenio ENCaLAR- INTA-Universidad Nacional de Córdoba-Universidad Tecnológica Nacional. Vaquerías, Córdoba.*
- KOENIG, R.; C. HURST; J. BARNHILL; B. KITCHEN; M. WINGER; M. JOHNSON. 1999. *Fertilizer management for alfalfa. Utah State University. Ext. Electronic Publishing AG-FG-01. (Disponible: [https://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1006&context=extension\\_histall](https://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1006&context=extension_histall) consultado: 20/08/2019).*
- LOEWY, T.; M. RON. 1992. *Fertilización fosfórica de alfalfa en dos suelos del sudoeste bonaerense. Rev. Fac. Agron. UBA 13: 1-10.*
- LOEWY, T. 1994. *Fertilización de pasturas perennes. Boletín de Divulgación N.º 35. EEA INTA BORDENAVE.*
- MAAS, E.V.; G.J. HOFFMAN. 1977. *Crop salt tolerance: Current assessment. J. Irrig. Drain E-ASCE 103:115-134.*
- MACHETTI, NE.; A.E. PELLEGRINI; G. BRUBALLA; S. RIBADULLA; P.R. GELATI; Z. NICORA; D.A. FERRO; M.G. GARCÍA; M.E. VÁZQUEZ; D. COSENTINO. 2018. *Efectos del encalado sobre propiedades químicas y rendimientos en un Hapludol del Partido 25 de Mayo. Actas XXVI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, S.M. del Tucumán (Argentina), en CD.*
- MELGAR, R.; J. LAVANDERA; M. CAMOZZI. 2000. *Alfalfa: la fertilización balanceada es la clave para la alta productividad. AAPRESID (org.). Jornadas de Intercambio Técnico "Pasturas en Siembra Directa". 52-59 pp.*
- MELGAR, R. 2004. *Actual and Potential Use of Micronutrient Fertilizers in Argentina. IFA. International Symposium on Micronutrients. New Delhi. India, en CD.*
- MIRETTI, M.C.; M.A. PILATTI; O.M. FELLI. 2006. *Respuesta de alfalfa a implantada a elevadas dosis de azufre en argiudol del centro este de Santa Fe. Actas Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, en CD.*

- PABÓN, J.; E. STROBELT; J. MINA; C. RIVA; W. GRIVA; L. PEURGINI; M. SIBUET; N. GILARDONI; W. HOFER. 2003. *Utilización de escorias siderúrgicas en suelos agrícolas de la Región Pampeana*. INTA AER Roldán. Informe Interno. 22 p.
- PAUTASSO, J.M.; P.A. BARBAGELATA. 2017. *Actualización del umbral de fósforo Bray para el cultivo de alfalfa en Entre Ríos*. Simposio de Fertilidad, Rosario (SF, Argentina), 217-221.
- PILATTI, M.; J. MOLLO; C. TEMPLADO; A. QUIÑÓNEZ. 1998. *Alfalfa de alta productividad en suelos del centro de Santa Fe. I Respuesta productiva a la corrección del pH y adición de fósforo*. Revista CREA 209: 44-48.
- QUINTERO, C.; G. BOSCHETTI; R. BENAVIDEZ. 1993. *Respuesta a la fertilización fosfatada en pasturas*. Actas XIV Cong. Arg. de Ciencia del Suelo. Mendoza. 119-120 pp.
- QUINTERO, C.; G. BOSCHETTI; R. BENAVIDEZ. 1999. *Alfalfa - Refertilización Fosfatada: ¿cuándo, cómo y por qué?* Fertilizar 17: 8-11.
- QUINTERO, C.; G. BOSCHETTI; J. MAYER; M. BARRERA; R. BENAVIDEZ. 1999. *Alfalfares bien nutridos*. Fertilizar 14: 8-12.
- RACCA, R.; D. COLLINO; J. DARDANELLI; D. BASIGALUP; N. GONZALEZ; E. BRENZONI; N. HEIN; M. BALZARINI. 2001. *Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de alfalfa en la región pampeana*. Ediciones INTA, Buenos Aires (Argentina). 56 p.
- RAUN, W.R.; G.V. JOHNSON; S.B. PHILLIPS; W.E. THOMASON; J.L. DENNIS; D.A. COSSEY. 1999. *Alfalfa yield response to nitrogen applied after each cutting*. Soil Science Society of America Journal 63: 1237-1243.
- RODRIGUES DE MELO, T.; A. MOREIRA. 2021. *Recomendacao de calagem: exercicios resolvidose comentados. 1.ª ed. Cubo Multimedia, Sao Carlos, SP, Brasil*. 74 p.
- SAINZ ROZAS, H.; M. EYHERABIDE; G. LARREA; N. MARTINEZ CUESTA; H. ANGELINI; N. REUSSI CALVO; N. WYNGAARD. 2019. *Relevamiento y determinación de propiedades químicas en suelos de aptitud agrícola de la región pampeana*. Fertilizar AC. Actas del Simposio Fertilidad 2019, 141-157 pp.
- SOTO, P.; E. JAHN; I. MALDONADO; N. RODRIGUEZ. 2000. *Recuperación de una pradera de alfalfa (Medicago sativa L.) mediante fertilización en diferentes condiciones de nivel freático en el suelo*. Agricultura técnica (Chile) 60: 236-250.
- SOTO, P.; E. JAHN; R. VELASCO; S. ARREDONDO. 2005. *Especies leguminosas forrajeras para corto en suelos arcillosos de mal drenaje*. Agricultura técnica (Chile) 65: 157-164.
- SUÁREZ FERNÁNDEZ, D. 1992. *Antecedentes técnicos y económicos para el manejo de suelos ácidos del país: elección de fertilizantes y uso de enmiendas*. Panorama Económico de la Agricultura 81: 19-23.
- TISDALE, S.; W. NELSON; J. BEATON; J. HAVLIN. 1993. *Soil Fertility and Fertilizers*. Macmillan Publishing Company. Cap. 3 (Elements required in plant nutrition) & 10 (Soil acidity and basicity).

TONIUTTI, M.A.; L. FORNASERO; D. TENORIO. 1977. *La alfalfa: inoculación, fertilización y encalado. II Jornadas Nacionales sobre Corrección y Mejoramiento de Suelos con Encalado. Convenio ENCaLAR-NTA-Universidad Nacional de Córdoba, Universidad Tecnológica Nacional. Vaquerías.*

VAN RAIJ, E. 1991. *Fertilidade so Solo e Adubação. Ed. Agronômica Ceres Ltda-Associacao Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. Capítulos 8 (Acidez e calagem) y 16 (Correcao do solo).*

VAZQUEZ, M.; A. TERMINIELLO; A. CSCIANI; G. MILLAN; P. GELATI; F. GUILINO; J. GARCÍA DÍAZ; J. KOSTIRIA; M. GARCÍA. 2010. *Influencia del agregado de enmiendas básicas sobre la producción de alfalfa (Medicago sativa L.) en ámbitos templados argentinos. Ciencia del Suelo 28: 141-154.*

VIVAS, H. 1995. *Toxicidad de fertilizantes sobre plántulas de alfalfa. Información Técnica para Productores. EEA Rafaela-INTA. 2 p.*

VIVAS, H. 2000. *Alfalfa: Influencia del calcio en la eficiencia de la fertilización fosfatada en Departamento Las Colonias y Capital (Santa Fe). En: AAPRESID (ed.). Jornadas de Intercambio Técnico "Pasturas en Siembra Directa". 71-72 pp.*

VIVAS, H.; O. QUAINO. 2000. *Fertilización y refertilización fosfatada de alfalfa en un suelo del Centro-Este de Santa Fe, con y sin enmienda cálcica. INPOFOS. Jornadas de Actualización Técnica para Profesionales "Fertilidad 2000". Rosario. 11-13 pp.*

VIVAS, H. 2001. *Fertilización de alfalfa con azufre y boro en el área Centro-Este de Santa Fe. Revista Argentina de Producción Animal 21 (Supl. I): 114-115.*

VIVAS, H.; H. FONTANETTO. 2003. *Fuentes azufradas con y sin aplicación de calcio en la producción de alfalfa. INPOFOS. Simposio "El fósforo en la Agricultura Argentina". Rosario. 89-90 pp.*

YAMADA, T. 2004. *Micronutrient deficiencies: occurrence, detection, and correction. The successful Brazilian experience. IFA. International Symposium on Micronutrients. Nueva Delhi, India. En CD.*



## CAPÍTULO 11

Crecimiento y manejo de la defoliación

Carlos A. Cangiano y  
Leandro Ventroni

## Introducción

El crecimiento de un cultivo está dado por el incremento en peso, que –a su vez– es principalmente el resultado del intercambio neto de carbono entre la planta y su ambiente que se produce a través de la fotosíntesis. Posteriormente, el proceso se completa con la partición de los fotosintatos entre las porciones cosechables y no cosechables del cultivo.

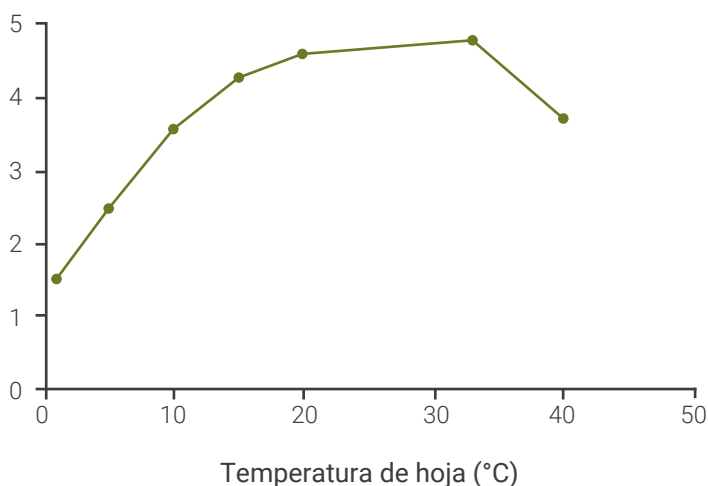
El órgano principal de intercambio de  $\text{CO}_2$  es la hoja (Wolf y Blaser, 1971). En la planta, la tasa de fotosíntesis neta disminuye progresivamente desde el ápice a la parte basal de los tallos, lo que implica que las hojas jóvenes tienen los mayores valores (Fuess y Tesar, 1968). En el canopeo, las hojas viejas están sujetas a una radiación fotosintética subóptima; también las hojas sombreadas tienen su capacidad fotosintética reducida, aun cuando –como sucede luego del pastoreo– puedan verse expuestas a alta radiación (Wolf y Blaser, 1971).

La tasa fotosintética también varía a través de la estación de crecimiento (Delaney *et al.*, 1974), pudiendo ser menor en los meses más cálidos, cuando la temperatura supera los  $30^\circ \text{C}$ . Esto, sumado al déficit hídrico que normalmente ocurre en esa época, podría explicar la disminución de valores que suele ocurrir en la alfalfa durante el verano. Además –y en comparación al resto de las leguminosas– la alfalfa es capaz de mantener altas tasas de fotosíntesis en un amplio rango de temperaturas (Figura 1), lo que sustentaría su adaptación a distintas regiones del mundo (Nelson y Moser, 1994).

El uso eficiente de la luz solar requiere un canopeo de hojas con alta capacidad para interceptar la máxima cantidad posible de radiación fotosintéticamente activa incidente (RFAi). La relación entre la RFAi y la fotosíntesis del canopeo está influenciada por el índice de área foliar (IAF). En alfalfa, a medida que el IAF se incrementa, la interceptación de la radiación aumenta hasta un valor máximo de 95 %, que corresponde a un  $\text{IAF} = 5$  (Heichel *et al.*, 1988); paralelamente con esta evolución, también aumenta la asimilación del  $\text{CO}_2$  (Sheehy *et al.*, 1979). No obstante, Woodward y Sheehy (1979) observaron que en un rebrote de primavera, el IAF puede alcanzar un valor de 6, en coincidencia con la aparición del botón floral. A partir de allí, el IAF comienza a disminuir por la reduc-

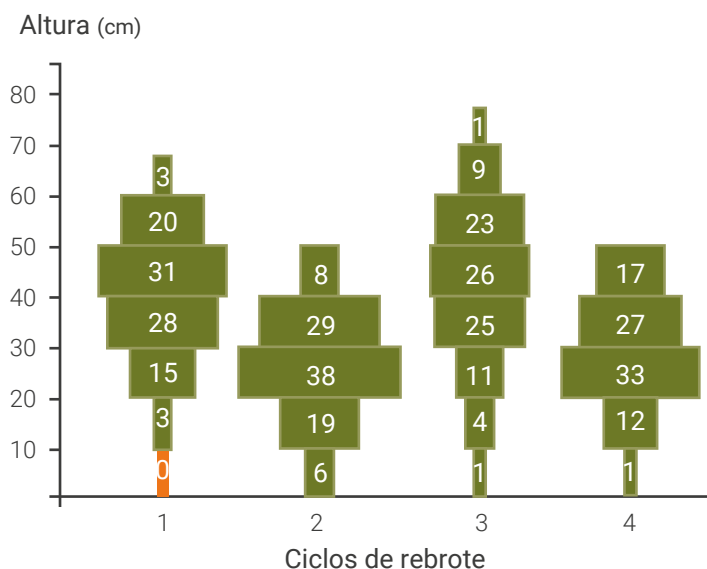
ción del tamaño de los folíolos y la pérdida de hojas por senescencia o defoliación, causadas por las enfermedades o el sombreado. En consecuencia, si bien el IAF llega a su máximo en un momento en que la RFA interceptada es prácticamente completa (Fuess y Tesar, 1968), la tasa de acumulación de la biomasa neta disminuye en respuesta a la pérdida de hojas.

Tasa de fotosíntesis  
(g CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)



■ **Figura 1.** Relación entre temperatura de hoja y tasa de fotosíntesis. Adaptado de Nelson y Moser (1994).

La eficiencia con la que el cultivo intercepta la RFAi está determinada también por la estructura del canopeo (Sheehy *et al.*, 1979). Una indicación de la estrategia desarrollada por la alfalfa para interceptar la radiación puede lograrse examinando el IAF en relación con la altura de la planta (Figura 2). Si bien la distribución del área foliar varía tanto a través del tiempo como entre los sucesivos rebrotes, se observa que hasta dos semanas antes del corte los canopeos vegetativos tienen generalmente la mayor concentración de hojas en los estratos superiores. A principios de floración, la distribución del área foliar tiene una marcada concentración en los estratos intermedios; algo similar ocurre con el peso de las hojas, expresadas tanto como porcentaje como peso por unidad de superficie.



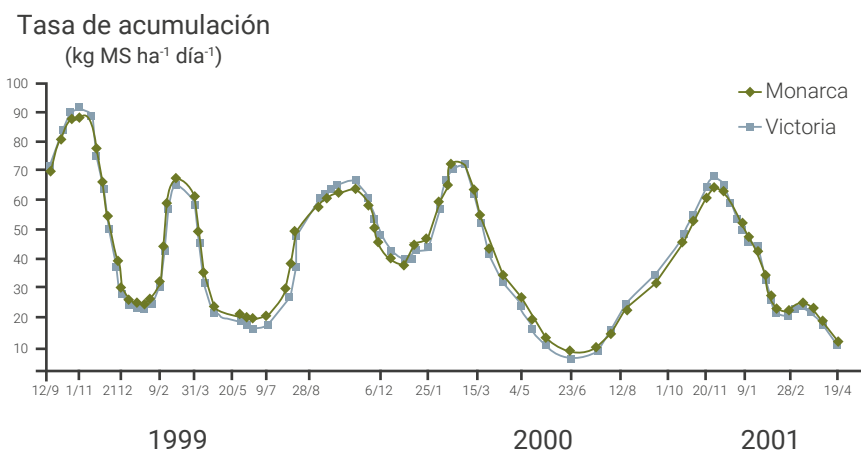
■ **Figura 2.** Distribución porcentual del índice de área foliar (IAF) por estratos de canopeo a través de ciclos de rebrote. Adaptado de Heichel *et al.* (1988).

Los cambios de distribución de área foliar en función de la altura a medida que la planta avanza en su fenología reflejan la falta de formación de hojas en los estratos superiores, el incremento en la caída de hojas basales y la reducción del crecimiento. Como resultado, aumenta la concentración de tallos en la base de la planta, lo que tiene un marcado efecto sobre la calidad del forraje y, por ende, sobre la selección de la dieta y el consumo por parte de los animales en pastoreo.

## Relación entre tasa de acumulación y fitomasa acumulada

Todo sistema ganadero que apunte a una alta productividad  $\text{ha}^{-1}$  debe considerar regularmente un método de presupuestación forrajera para la adecuada planificación de la alimentación animal. La oferta de forraje se puede visualizar a través de la estimación de la tasa diaria de acumulación del forraje (TA) (Cangiano, 1997). La distribución de la TA a través del año puede ser uni- o bimodal, de acuerdo principalmente a las precipitaciones, y si bien puede registrar importantes variaciones tanto entre años como dentro de cada año, las diferencias entre cultivares no serían mayormente importantes (Figura 3).





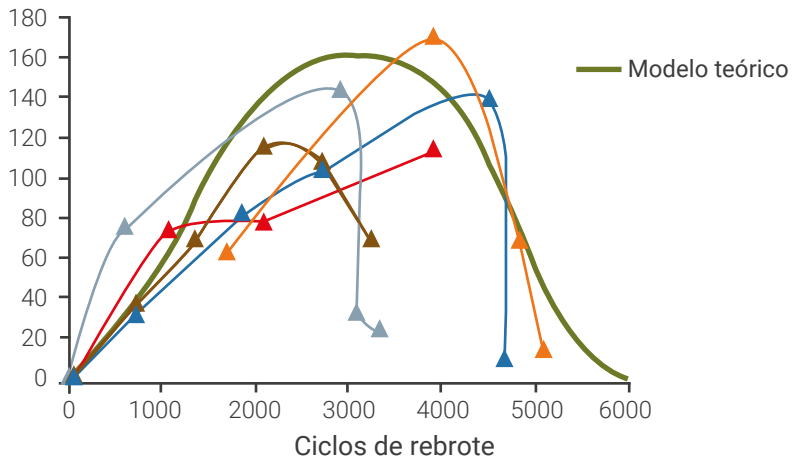
■ **Figura 3.** Tasa de acumulación de forraje (kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) en los cultivares de alfalfa Monarca SP INTA (M) y Victoria SP INTA (V). Adaptado de Pece y Cangiolo (2003).

En general, la relación entre TA y fitomasa adquiere la forma del modelo teórico mostrado en la Figura 4; sin embargo, cuando se intenta obtener un modelo conceptual que explique esa relación en alfalfa, se observan grandes variaciones. Comúnmente, las máximas TA se dan entre los 2.500 y 4.500 kg MS ha<sup>-1</sup>; a partir de esos valores, las TA disminuyen bruscamente. Los valores máximos de acumulación del forraje varían con la época del año, la longitud del período de acumulación y la altura del canopeo. Por ejemplo, a partir de una acumulación de 2.500-3.000 kg MS ha<sup>-1</sup> durante el otoño, las TA disminuyen marcadamente; por el contrario, en plena primavera esa disminución puede producirse recién a partir de los 4.000-4.500 kg MS ha<sup>-1</sup>.

## Relación entre acumulación de forraje y ambiente

La TA de un cultivo es función de la radiación incidente y de la eficiencia con que esta es interceptada y convertida en biomasa. Mientras la radiación solar, a través de la fotosíntesis, es la fuerza primaria que determina el límite superior de la productividad potencial, la temperatura y las lluvias cumplen un rol modulador en la determinación de la proporción del potencial productivo registrado en un sitio [Snaydon (1991), citado por Nelson y Moser (1994)].

Tasa de acumulación (kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>)



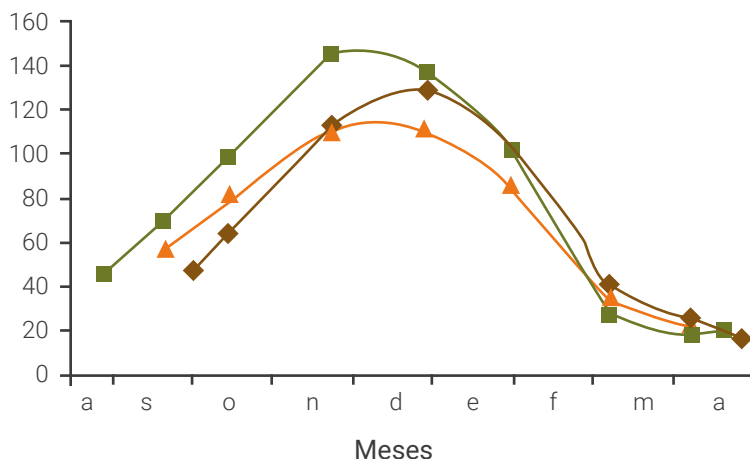
■ **Figura 4.** Tasa de acumulación de forraje en función de la fitomasa aérea acumulada. Adaptado de Woodward y Sheehy (1979), Baccaro (2000), Lattanzi (1998) y Pece (2000) [Tomado de Cangiano (2002c)].

### Temperatura y humedad

El área foliar en plena expansión es afectada por la temperatura, registrándose los valores máximos con temperaturas próximas a los 20-25 °C (Christian, 1977). A temperaturas más bajas, el área foliar disminuye gradualmente; y a temperaturas mayores, el área foliar disminuye más rápidamente (Bula, 1972; Fick *et al.*, 1988). Con un régimen térmico de 34/25 °C durante día/noche, la alfalfa exhibió una mayor respiración de tallos y raíces y una menor área foliar (Al-Hamdani y Todd, 1990). La temperatura también puede afectar las características anatómicas de hojas de alfalfa, dado que a los 20-25 °C las células y los espacios intercelulares son mayores que a los 30-35 °C. El menor tamaño y la mayor densidad de células en empalizada obtenidos con las mayores temperaturas podrían imponer una barrera a la difusión del CO<sub>2</sub> (Bula, 1972). Estas diferencias anatómicas podrían explicar –al menos parcialmente– la baja producción de la alfalfa con las elevadas temperaturas de verano. Sin embargo, de acuerdo con algunos estudios que se centraron en el déficit hídrico, se demostró que la alfalfa irrigada no disminuyó su producción estival (Carter y Sheaffer; 1983; Evans y Peaden, 1984), lo que reflejaría que el estrés hídrico –más que la alta temperatura– se-

ría el causante de la mencionada caída de la producción de forraje. En nuestro país, bajo condiciones de regadío (Bertin, 1997; Hansen, 2002) o de suficiente precipitación primavera-verano (Cangiano, 2002c), el modelo de acumulación de forraje es unimodal (Figura 5); por el contrario, bajo condiciones de sequías estacionales, la curva es generalmente bimodal (Santini *et al.*, 1975; Pece, 2000) (Figura 3).

Tasa de acumulación (kg MS ha<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup>)



■ **Figura 5.** Tasa estacional de acumulación de forraje en alfalfa bajo adecuadas condiciones hídricas durante primavera-verano en Balcarce. Tomado de Cangiano (2002c).

El déficit de agua tiene efectos distintos según el momento en que se produce. Si ocurre al inicio del rebrote, tanto la RFA interceptada como la producción de forraje serán severamente reducidas (Durand *et al.*, 1989); por el contrario, si ocurre hacia el final del rebrote, el efecto sobre la interceptación de la radiación y la producción será sensiblemente menor. En condiciones de campo, es común que en la región Pampeana se produzcan deficiencias de agua en distintos momentos del año, ya que la lluvia –por la variabilidad de su intensidad, duración y cantidad a lo largo del tiempo– presenta una distribución cambiante tanto entre años como dentro de cada temporada (Della Maggiora *et al.*, 1998). Estas variaciones determinan las marcadas diferencias de producción de forraje a lo largo del ciclo productivo y, por ende, condicionan la carga y la producción animal correspondiente.

### Radiación incidente

Debido a variaciones en latitud y en nubosidad, la cantidad de radiación que llega al canopeo de un cultivo difiere marcadamente entre regiones. Además, el largo del día y la duración de la estación de crecimiento tienen un efecto marcado sobre la acumulación de radiación diaria y anual. El largo de la estación de crecimiento está usualmente establecido por la temperatura o por el estrés hídrico (Nelson y Moser, 1994). La radiación solar incidente sigue un patrón estacional, presentando los máximos valores en la mitad del verano. La variación estacional de la radiación incidente se correlaciona con el cambio estacional de la temperatura ambiente. En Balcarce, y posiblemente en otras áreas templadas de la región Pampeana, las temperaturas medias durante el verano no alcanzan valores lo suficientemente altos como para afectar negativamente la TA; en consecuencia, la disminución estival de la TA se debería principalmente a la deficiencia de agua. En esta localidad, bajo condiciones no limitantes de agua durante la primavera, el otoño y el invierno (Pece, 2000), la radiación fotosintéticamente activa incidente (RFAi) explicó un alto porcentaje de la TA, de acuerdo con la siguiente ecuación (Cangiano, 2002c):

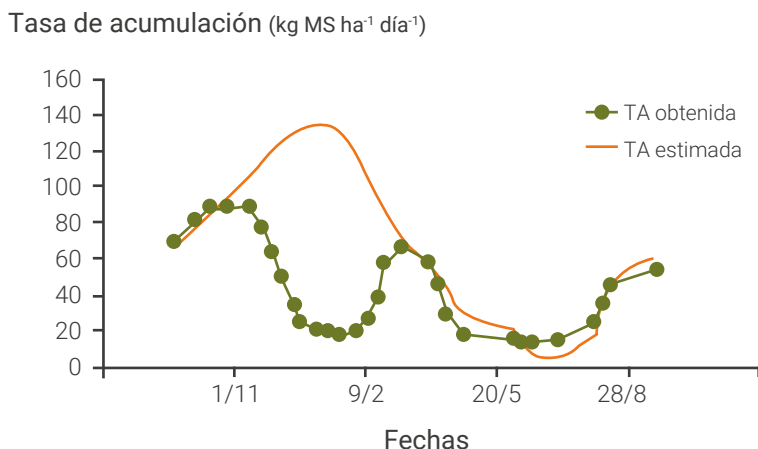
$$y = -49,5 + 17,2 \times \text{RFAi} \quad R^2 = 0,88$$

donde:  $y$  = tasa de acumulación ( $\text{kg MS ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$ );  $x$  = RFAi ( $\text{Mj m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ )

El rango de RFAi para este modelo fue de 3,01 a 7,62  $\text{Mj m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ . Con base en esta ecuación, y usando las RFAi observadas, se estimó la TA para todo el ciclo de producción (Figura 6). Para el período primavera-verano, tanto el patrón de distribución unimodal como las TA máximas observadas coincidieron no solo con lo esperado, sino también con los valores obtenidos en otras localidades del país (Bertin, 1997) y del extranjero (Carter y Sheaffer, 1983; Evans y Peaden, 1984).

Aun cuando la radiación es una de las variables más importantes, no se debe dejar de tener en cuenta el resto de los factores que pueden incidir sobre la TA del forraje. Pece *et al.* (2000), analizando información de cuatro años, concluyeron que el déficit hídrico y la radiación incidente

–como parámetros meteorológicos– y el grado de cobertura de suelo y la edad de la alfalfa –como parámetros del cultivo– explicaron la mayor parte de la TA obtenida.



■ **Figura 6.** Tasa diaria de acumulación de MS alfalfa obtenida y estimada en función de la radiación incidente (RFAi) en Balcarce en el ciclo 1998/99. Tomado de Cangiano (2002c).

## Relación entre morfología, desarrollo y rebrote

La dinámica de generación y expansión de las estructuras de la planta se conoce como morfogénesis (Chapman y Lemaire, 1993). En las especies forrajeras, esas estructuras determinan el porte o el hábito de crecimiento de la planta y afectan la disponibilidad del forraje para ser cosechado por el animal en pastoreo. A su vez, la morfología de las plantas individuales afecta la estructura y el funcionamiento de las comunidades y las poblaciones, determinando las interacciones competitivas entre especies e individuos. El pastoreo altera esa relación competitiva al defoliar a las especies de manera diferente y afectar su posterior rebrote. Esto acarrea cambios en la composición botánica, lo que puede afectar la cantidad, la calidad y la estacionalidad de la producción de la pastura y, consiguientemente, la producción animal (Briske, 1991). Por lo tanto, en la implementación de los diferentes sistemas de manejo de una pastura deben contemplarse, al menos en parte, las características morfogénicas de las plantas dominantes en ella.

Las estrategias de las plantas para preservarse del efecto de la defoliación son de dos tipos: 1) mecanismos para evitar el pastoreo; y 2) mecanismos para tolerar sus consecuencias (Briske, 1991). Mientras que los primeros reducen la probabilidad de que la planta sea defoliada y por lo general se basan en una disminución de la accesibilidad y de la palatabilidad, los segundos facilitan el rebrote luego de la defoliación a través de, por ejemplo, una rápida reposición de hojas. Por lo común, la capacidad de sobrevivencia de las especies luego del pastoreo resulta de una combinación de esas dos estrategias, aunque en algunas especies y bajo determinadas condiciones una puede ser más importante que la otra. En el caso de la alfalfa, las yemas o meristemas apicales están siempre por encima de la altura de defoliación, debido a la elongación que rápidamente se produce en los entrenudos de los tallos; en consecuencia, el rebrote después del corte o pastoreo se origina en las yemas de la corona o de la parte basal de los tallos remanentes. Estas características morfofisiológicas determinan que la defoliación tenga marcados efectos en el crecimiento, la producción y la persistencia de las plantas.

### *Componentes que definen la fitomasa aérea y su dinámica en el tiempo*

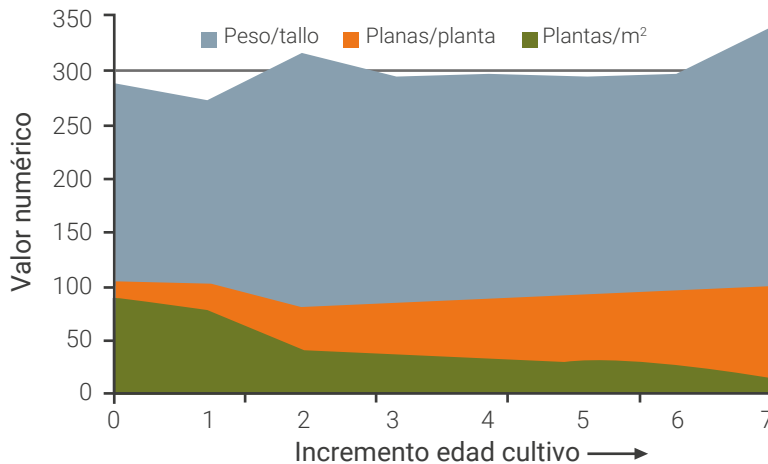
De manera similar al análisis del rendimiento en cereales, la fitomasa aérea de la alfalfa puede ser calculada por el producto de tres características (Volencic *et al.*, 1987):

$$\text{Fitomasa aérea} = \text{plantas m}^{-2} \times \text{tallos planta}^{-1} \times \text{peso tallo}^{-1}$$

Plantas  $\text{m}^{-2}$  x tallos  $\text{planta}^{-1}$  equivale a tallos  $\text{m}^{-2}$  y a su vez, el peso tallo<sup>-2</sup> puede ser descrito como el producto de la altura del tallo (cm por tallo) y peso por cm de tallo ( $\text{g cm}^{-2}$ ). Esta partición permite introducir la altura como un componente de importancia, como se mostrará más adelante.

En general, la alta población inicial de plantas declina rápidamente durante los primeros 2-3 años (Figura 7), posiblemente debido a la alta competición intraespecífica (Nelson *et al.*, 1986). Luego, esta disminución se hace menor, al tiempo que existe un incremento en el número

de tallos por planta que compensa el número de tallos por superficie (plantas superficie<sup>-1</sup> x tallos planta<sup>-1</sup>) y la fitomasa aérea, hasta que la declinación llega a un punto donde la producción de tallos por planta no llega a compensar la pérdida de plantas.

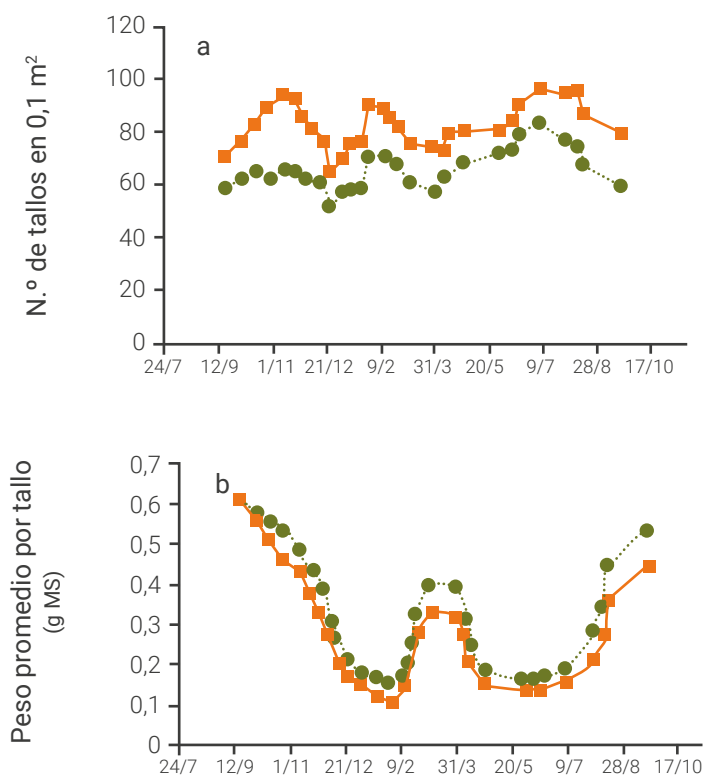


■ **Figura 7.** Cambios en los componentes del rendimiento de alfalfa con la edad del cultivo. Adaptado de Bolger y Meyer (1993).

Teixeira *et al.* (2007b), a lo largo de dos años, observaron algo similar: una disminución en el número de plantas que fue compensada por un aumento en el número de tallos por planta (de 6 a 13 tallos planta<sup>-1</sup>) y que no afectó el número de tallos por superficie (aproximadamente 780 tallos m<sup>-2</sup>). Este modelo general presentado en la Fig. 7 puede variar por factores ambientales (temperatura, fotoperíodo, precipitación), de manejo y de germoplasma. De los tres componentes del rendimiento, los que mayores variaciones pueden tener entre estaciones del año son el número de tallos por planta y el peso de los tallos. El número de plantas depende en gran medida de la acumulación de estrés, principalmente daños por manejo, enfermedades, insectos o sequías y, por lo tanto, las variaciones para esperar son a más largo plazo (Volenc, 1999; Volenc *et al.*, 2002).

Singh and Winch (1974) observaron que a medida que transcurría la estación de crecimiento (de primavera a otoño), el número de tallos por planta aumentó, pero el peso de estos disminuyó. En el año de establecimiento, McLaughlin y Christie (1980) observaron que el número de

tallos aumentó de 2,4 a 6,5 tallos planta<sup>-1</sup> en cuatro rebrotes sucesivos. Tanto Smith (Smith, 1969; Smith, 1970) como Cowett y Sprague (1962) no encontraron un efecto consistente de la temperatura sobre la producción de tallos. Por un lado, en verano y en dos cultivares con distinto grado de reposo, Pece (2000) observó una disminución en el número de tallos por superficie (Figura 8a) y en mayor medida en el peso de los tallos (Figura 8b) debido al déficit hídrico.



■ **Figura 8.** Número de tallos promedio (a) y peso por tallo (b) de alfalfa Monarca SP INTA (línea punteada) y Victoria SP INTA (línea continua).

Durante el ciclo de un rebrote, el número de tallos por superficie tendría un máximo alrededor de los 14 días para luego disminuir a medida que el cultivo madura (Singh y Winch, 1974; Leach, 1969). Sin embargo, Cangiano y Pece (2005) no observaron un patrón claro durante el cuarto ciclo de producción de dos cultivares de distinto grado de reposo



invernal, concluyendo que –en general– ambos alcanzaron el máximo número de tallos entre los 7 y los 10 días. Por otro lado, el peso por tallo aumentó prácticamente a lo largo de cada uno de los rebrotes y en los dos cultivares. En el rebrote otoñal, la tasa de aumento fue mucho menor por efecto de la disminución de la temperatura y el fotoperíodo. También se observó, a diferencia de Pece (2000), que durante el verano el peso de los tallos no disminuyó ya que no existió un déficit hídrico.

Los componentes interactúan entre sí en la determinación del rendimiento y son afectados por distintos factores. Entre ellos se encuentran las condiciones del medioambiente, principalmente las precipitaciones, ya que cuando existe déficit hídrico se produce una disminución del número de tallos por planta (Cohen *et al.*, 1972; Cowett y Sprague, 1962; Perry y Larson, 1974), en especial si el déficit se produce dentro de los 14 días de rebrote (Brown y Tanner, 1983). El déficit hídrico también produce un marcado descenso en el peso de los tallos de 3,4-4,7 a 0,1-0,13 g MS tallo<sup>-1</sup> (Cangiano y Pece, 2005). Distintas prácticas de manejo también afectan a los componentes del rendimiento, entre ellas se encuentran la densidad de siembra (Bolger y Meyer, 1993; Volenec *et al.*, 1987; Llovera *et al.*, 2008), fertilización (Berg *et al.*, 2005; Berg *et al.*, 2007), intensidad de defoliación (Leach, 1969), frecuencia de defoliación (Teixeira *et al.*, 2008; Ventroni *et al.*, 2010) y cultivares (Leach, 1969; Pece, 2000).

El rendimiento ha sido positivamente asociado con el número de tallos por superficie (tallos m<sup>-2</sup>). Por un lado, Undersander *et al.* (1982) indicaron que por encima de 592 tallos m<sup>-2</sup> no se limita el rendimiento de forraje y recomiendan reemplazar la pastura cuando la densidad de tallos está por debajo de 431 tallos m<sup>-2</sup>. Por otro lado, Berg *et al.* (2007), reanalizando a Suzuki (1991), observaron que el mayor rendimiento ocurrió a una baja densidad de tallos (212 tallos m<sup>-2</sup>) y concluyeron que el mayor rendimiento se produjo a una densidad de aproximadamente 260 tallos m<sup>-2</sup>. Evans y Peaden (1984) y Volenec (1985) observaron una fuerte asociación entre rendimiento y número tallos planta<sup>-1</sup>, al contrario de Berg *et al.* (2007). No obstante, numerosos trabajos han demostrado que el peso tallo<sup>-1</sup> es el componente de mayor contribución relativa en el rendimiento de la alfalfa (Volenec, 1985; Volenec *et al.*, 1987; Kitchen *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1997; Berg *et al.*, 2005; Berg *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2007b; Ventroni *et al.*, 2010).

Por un lado, utilizando la metodología denominada '*path analysis*' (Li, 1956), se estudió la correlación entre los componentes del rendimiento y el efecto directo de cada uno de ellos sobre el rendimiento final. De este modo, se estimó que la importancia relativa del peso tallo<sup>-1</sup> fue mayor que la del número de tallos m<sup>-2</sup> (Li *et al.*, 1997; Berg *et al.*, 2005; Berg *et al.*, 2007). Por otro lado, Volenec *et al.* (1987) observaron que cuando la densidad de plantas fue baja (11 plantas m<sup>-2</sup>), tanto el peso tallo<sup>-1</sup> como el número de tallos planta<sup>-1</sup> tuvieron la misma importancia relativa sobre el rendimiento; por el contrario, a elevada densidad de plantas (172 plantas m<sup>-2</sup>), el efecto directo del peso tallo<sup>-1</sup> fue un 30 % mayor.

La altura del tallo es una característica importante que explica la variación en el rendimiento (Griggs y Stringer, 1988; Pece, 2000). Basado esto, el rendimiento se puede expresar como: tallos por superficie (tallos m<sup>-2</sup>) x altura de tallo (cm tallo<sup>-1</sup>) x peso por centímetro de tallo (g cm<sup>-1</sup>). En este contexto, y a través del '*path analysis*', Ventroni *et al.* (2010) concluyeron que la altura fue el componente que tuvo el mayor efecto directo sobre el rendimiento de forraje.

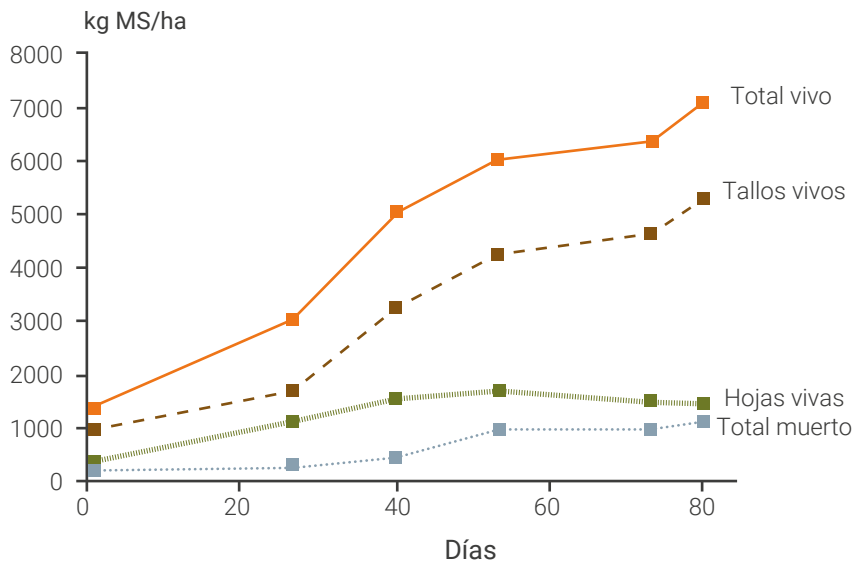
### *Curvas estacionales de acumulación de forraje*

El balance entre la tasa de crecimiento y pérdida de tejido de una pastura varía entre y dentro de las estaciones del año, acorde con las condiciones meteorológicas imperantes. El conocimiento de los cambios estacionales en la curva de crecimiento permite establecer el momento en el cual se deben utilizar los diferentes rebrotes de la alfalfa para maximizar el rendimiento de forraje de buena calidad.

La alfalfa, luego de una defoliación y a medida que avanza en su madurez, presenta un patrón típico de acumulación de forraje en el cual la cantidad de tallos se incrementa, la cantidad de hojas se detiene antes que la de tallos, y la presencia de material muerto comienza a aumentar (Figura 9).

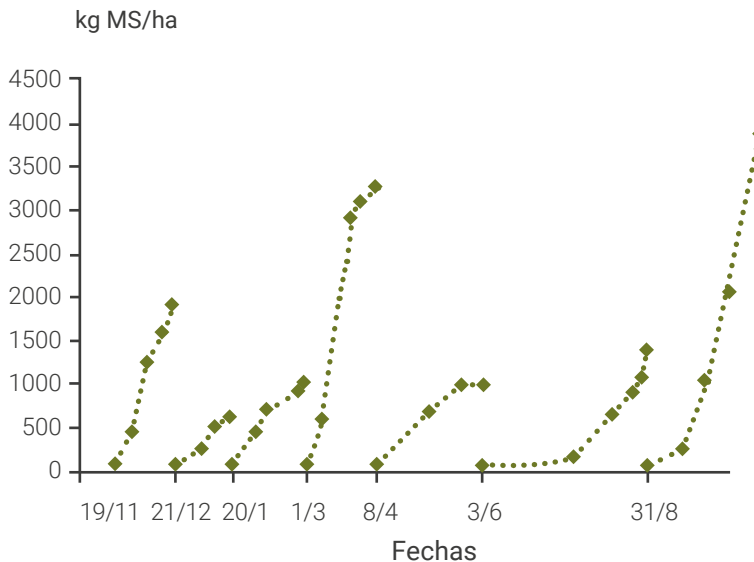
El mayor contribuyente de material muerto es la hoja, indicando que en un determinado momento (día 42 en el ejemplo de la Figura 9) se producen tantas hojas como las que mueren. En Balcarce (Bs. As.), durante un rebrote de inicio de primavera en condiciones no limitantes de agua y fertilidad, Baccaro (2000) obtuvo un patrón de acumulación de hojas

y tallos similar al presentado en la Figura 9. No obstante, bajo las cambiantes condiciones climáticas que se producen durante todo el ciclo de crecimiento, la acumulación de materia seca que se observa en los subsiguientes rebrotes luego de las defoliaciones es muy variable (Figura 10). Si bien en las especies de crecimiento indeterminado –como la alfalfa– la iniciación de las hojas desde el meristema terminal continúa a medida que las flores desarrollan desde las yemas axilares, la tasa de producción de área foliar es lenta (Brown y Tanner, 1983).



■ **Figura 9.** Patrón de acumulación de la materia seca en alfalfa durante un rebrote primaveral. Tomado de Woodward y Sheehy (1979).

En las especies de crecimiento indeterminado junto con el inicio de la floración se produce una reducción gradual de la relación hoja:tallo, lo que se debe a una menor producción de hojas, a un incremento de la senescencia foliar en la parte inferior del canopeo y a una producción de tallos de mayor peso (Nelson y Moser, 1994). Mientras que Albrecht *et al.* (1987) señalaron que en alfalfa la relación hoja:tallo decrece desde 1,5 en el estado vegetativo a 0,5 cuando las plantas alcanzan la madurez, Nordkvist y Åman (1986) registraron valores de 3,9 a 0,5, respectivamente. Obviamente, a medida que disminuye la relación hoja:tallo decrece la calidad del forraje.



■ **Figura 10.** Acumulación de materia seca en un cultivar de alfalfa sin reposo invernal (GRI 8) durante distintos rebrotes a lo largo del año. Tomado de Cangiano y Pece (2005).

### *Distintas combinaciones de rebrotes definen el rendimiento anual de forraje*

La curva típica de crecimiento de un rebrote de pastura luego de una defoliación se describe, en general, como sigmoidea. A medida que se comienza a acumular el tejido fotosintético, la TA va incrementándose lentamente hasta llegar a una tasa máxima (fase exponencial), que puede mantenerse por un período más o menos prolongado (fase lineal) (Harris, 1978). A continuación, si bien con una TA que declina rápidamente, la acumulación de materia seca continúa hasta llegar a un límite o “techo” de fitomasa. A partir de allí, cuando las pérdidas por respiración y descomposición igualan a las ganancias por fotosíntesis, la acumulación de forraje se hace nula (asintosis). A diferencia de otras especies, la alfalfa presenta una curva típica menos sigmoidea debido a una falta de la fase exponencial (ver Fig. 10) –sobre todo en primavera y verano– y una rápida disminución de la fitomasa a partir del “techo” (Cangiano y Pece, 2005). La fase lineal puede prolongarse tanto como 35 días y las tasas diarias de crecimiento llegar a  $180 \text{ kg MS ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$  (Baars et al., 1990).

Este modelo lineal fue comprobado, independientemente de la estación y duración del rebrote, en 17 experimentos de curvas de crecimiento en Balcarce (Cangiano, 2017), que se describen a continuación y que se resumen en la Tabla 1:

■ **Tabla 1.** Duración de los rebrotes en las distintas estaciones y ecuaciones de ajuste de la acumulación de materia seca en función de los días de rebrote.

Rebrote	N.º de experimento	Fecha	Días de rebrote	Ecuación*	R <sup>2</sup>	Acumulación kg MS/ha
Invierno	1	3/6 al 30/8	91	$y = -186 + 11,4 x$	0,71	1100
Invierno-principio primavera y riego	2	6/8 al 20/10	75	$y = -770 + 44,7 x$	0,76	2600
Invierno-principio primavera y riego	3	26/8 al 20/10	57	$y = -497 + 77,5 x$	0,89	3920
Primavera	4	24/10 al 5/12	42	$y = -393 + 94,5 x$	0,94	3600
Primavera	5	19/11 al 20/12	31	$y = 24,4 + 50,7 x$	0,94	1600
Primavera-verano	6	6/12 al 9/1	34	$y = -254,4 + 99,5 x$	0,97	3100
Primavera-verano	7	13/12 al 17/1	35	$y = -309 + 65,5 x$	0,88	1980
Verano	8	21/12 al 19/1	29	$y = -35,2 + 22,3 x$	0,91	610
Verano	9	15/1 al 14/2	30	$y = -6,3 + 74,6 x$	0,99	2230
Verano	10	20/1 al 26/2	37	$y = 42,9 + 28,9 x$	0,95	1072
Verano	11	22/1 al 3/3	40	$y = -210 + 46,1 x$	0,92	1630

Rebrote	N.º de experimento	Fecha	Días de rebrote	Ecuación*	R <sup>2</sup>	Acumulación kg MS/ha
Fin verano-principio otoño	12	21/2 al 22/3	29	$y = 70,5 + 52,7 x$	0,93	1460
Fin verano-principio otoño	13	1/3 al 30/3	30	$y = -103,5 + 109 x$	0,96	3170
Fin verano-principio otoño	14	3/3 al 12/4	40	$y = -339,5 + 83,6 x$	0,93	3310
Otoño	15	8/4 al 2/6	54	$y = 28,8 + 12,7 x$	0,71	660
Otoño	16	12/4 al 17/5	35	$y = -145,7 + 55,4 x$	0,97	1793
Otoño	17	9/4 al 4/6	55	$y = 71,9 + 10,3 x$	0,92	500

\*y= kg/ha de materia seca, x= días de rebrote

### *Rebrote de invierno (experimento 1)*

A fines de agosto el rendimiento de materia seca fue de 1.100 kg ha<sup>-1</sup> y la tasa promedio de acumulación de 11 kg ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. En estos momentos, el productor podría no utilizar la pastura y seguir acumulando forraje a tasas crecientes, salvo que lo necesite o que por razones de clima (daños de helada) o factores bióticos (plagas o enfermedades) decida utilizar el forraje y permitir un nuevo rebrote limpio. Si no se utilizara el forraje y se permitiera más tiempo de rebrote, las tasas y la acumulación serían mayores a principios de septiembre; y en esto reside precisamente lo subjetivo de las fechas de inicio y finalización de cada defoliación.

### *Rebrote fin de invierno-principio de primavera con riego (experimento 2)*

Desde principios de agosto y sin déficit hídrico, la acumulación de materia seca fue alta (algo más de 3.000 kg MS ha<sup>-1</sup>) con una duración del rebrote de 75 días y una tasa promedio de 44,7 kg ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>.

### *Rebrote fin de invierno-principio de primavera con riego (experimento 3)*

De manera similar, en otra experiencia desde fines de agosto se superaron los 4000 kg MS ha<sup>-1</sup> con una duración del rebrote de 57 días y una tasa promedio de 77,5 kg ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>

### *Rebrote de primavera (experimento 4)*

Con buenas condiciones de lluvia, la acumulación de materia seca en esta época fue alta, llegando a cerca de 4.000 kg ha<sup>-1</sup> de materia seca con una tasa de más de 90 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> y una duración de rebrote de 42 días.

### *Rebrote de primavera (experimento 5)*

En este caso hubo una sequía hacia el final del rebrote y por ello la acumulación es de solo 1.700 kg MS ha<sup>-1</sup> con una duración del rebrote de 31 días. En estas condiciones, y ya pasados los 30 días, no sería conveniente esperar por las lluvias que promuevan una mayor acumulación de forraje.

### *Rebrotos de primavera-verano (experimentos 6 y 7)*

Con buenas condiciones de humedad edáfica se lograron altas tasas de crecimiento –cercasas a los 100 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>– y una acumulación de 3.500 kg MS ha<sup>-1</sup>; mientras que con sequía solo se alcanzaron 1.800 kg MS ha<sup>-1</sup>, con una duración del rebrote de 34 y 35 días, respectivamente.

### *Rebrotos de verano (experimentos 8 y 10)*

Con sequía extrema se pueden observar los valores bajísimos de acumulación de materia seca, que se ubicaron alrededor de 600 y 1.000 kg MS ha<sup>-1</sup> en los experimentos 8 y 10, respectivamente. En el primero, dado el estado del cultivo, se optó por defoliar a los 29 días, mientras que en el segundo la duración del rebrote fue de 34 días.

### *Rebrotos de verano (experimentos 9 y 11)*

Con sequía moderada y una duración de rebrote de 40 días en el experimento 11, se obtuvieron 1.600 kg MS ha<sup>-1</sup>; mientras que sin sequía aparente, en el experimento 9 se lograron 2.200 kg MS ha<sup>-1</sup> en 30 días.

### *Rebrotes de fin de verano-principios de otoño (experimentos 12, 13 y 14)*

Al igual que en los otros períodos, en este se observa una gran variación en la acumulación de forraje, en función de los factores climáticos y de la duración del rebrote, entre otras causas posibles. Así, para una similar duración de rebrote de 30 días, se obtuvieron tasas promedios de acumulación de 53 y 109 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en los experimentos 12 y 13, respectivamente. En el experimento 14, con buenas condiciones de humedad edáfica, se superaron los 3.000 kg MS ha<sup>-1</sup>, con una tasa promedio de acumulación de 84 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en un rebrote de 40 días.

### *Rebrotes de otoño (experimentos 15, 16 y 17)*

Mientras que en los experimentos 15 y 17 las tasas rondaron los 10 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> y la acumulación llegó a los 600 kg MS ha<sup>-1</sup> en 55 días de rebrote, en el experimento 16 la tasa fue mucho más alta, alcanzando los 55 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, y la acumulación rondó los 2.000 kg MS ha<sup>-1</sup> a los 35 días de rebrote.

Basado en todo lo anterior, se concluye que las tasas de acumulación y la duración de los rebrotes varían de acuerdo a la estación y a las condiciones meteorológicas. Dadas estas condiciones, el rendimiento anual para obtener de la alfalfa será el que resulte de la combinación de los distintos rebrotes. Según datos experimentales generados en INTA Balcarce (Tabla 2), el rendimiento potencial de la alfalfa en el área es de alrededor de 22.000 kg MS ha<sup>-1</sup>, obtenido de siete rebrotes –cuya duración fue de los 30 a los 55 días– y sin considerar el período invernal. La tasa promedio máxima en primavera-verano superó los 125 kg ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. La duración del período invernal podría estimarse de junio a septiembre y alcanzaría los 100 a 120 días, aunque es difícil de precisar ya que, como se dijo anteriormente, la fecha de inicio y fin de cada rebrote es algo subjetivo.

En resumen, por un lado, las tasas promedio de acumulación de materia seca fueron muy variables, de 10 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en invierno, 50-100 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en primavera, 20-75 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en verano, 50-100 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> a fin de verano-principios de otoño y 10-55 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en otoño. Por otro lado, sin limitaciones de agua,



las tasas potenciales fueron de 34, 85, 126-122, 89, 31 y 20 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> para fin de invierno, principios de primavera, primavera-verano, fin de verano y otoño, respectivamente (Tabla 2), generando una curva unimodal de crecimiento (Figura 5), en contraste con los picos y baches de las curvas obtenidas en seco (Figura 6).

■ **Tabla 2.** Acumulación de materia seca, duración y tasas de acumulación promedio de los rebrotes de la alfalfa en Balcarce (Bs. As.).

Fecha	Acumulación kg MS ha <sup>-1</sup>	Días de rebrote	Tasa promedio (kg MS ha <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )
25/9	2598	55*	34
5/11	3908	40	85
11/12	5028	35	126
14/1	4510	33	122
20/2	3660	36	89
27/3	991	34	31
19/5	1114	52	20
Total	21809		
* Estimado a partir del 1/8			

Parece razonable estimar que la duración del rebrote en invierno debería ser cercana a los 100-120 días (junio a septiembre). Luego, en los 250 días restantes, sería posible distribuir otras seis utilidades en las que la duración de rebrote rondaría los 50 días al inicio de primavera y otoño y los 30-40 días en plena primavera y verano. La alfalfa es una especie muy adaptada a la sequía, pero resulta claro que el déficit de agua en primavera y verano causa una severa disminución de su alto potencial de rendimiento. Una herramienta adecuada para impedir esta situación sería el uso del riego.

## Reservas orgánicas en raíces

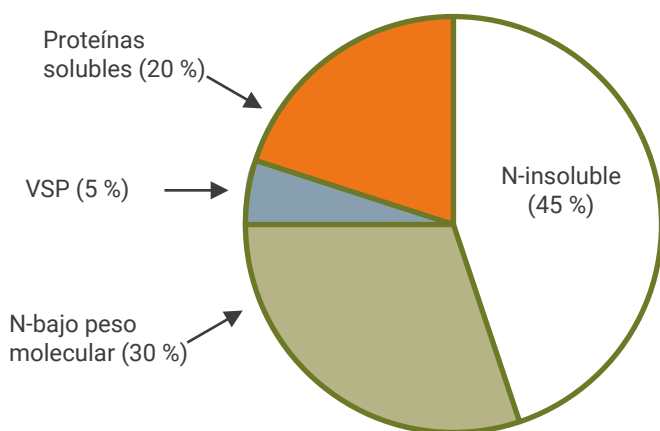
La remoción de forraje, sea por medio de un herbívoro o mecánicamente, produce grandes cambios a nivel fisiológico, bioquímico y molecular en las especies forrajeras (Volenc et al., 1996). La contribución de las

reservas orgánicas en la regeneración de nuevo forraje ha sido largamente reconocida en alfalfa por muchos años (Grandfield, 1935). Las reservas orgánicas son un componente fisiológico fundamental para satisfacer los requerimientos de respiración y crecimiento, los cuales impactan en el rendimiento (acumulación de biomasa) y en la persistencia de leguminosas forrajeras (May, 1960; Ta *et al.*, 2020; Volenec *et al.*, 1998; Avice *et al.*, 1996a; Barber *et al.*, 1996; Ourry *et al.*, 1994; Ventroni, 2009; Ventroni *et al.*, 2010). En alfalfa, las plantas almacenan las reservas orgánicas en las raíces y, en menor proporción, en la corona y en las hojas y tallos remanentes (Meuriot *et al.*, 2005). Esas reservas están compuestas por dos fracciones: carbohidratos no estructurales (CHNE) y compuestos nitrogenados.

Dentro de los CHNE se encuentran el almidón y los azúcares solubles, donde el primero de ellos puede representar hasta el 70 % del peso seco de raíz (Ourry *et al.*, 1994). El nivel de concentración de almidón varía entre 15 y 580 mg por g de peso seco raíz, mientras que la concentración de azúcares puede ir desde los 20 a los 200 mg por g de peso seco raíz; entre estos últimos, la sacarosa puede representar casi un 90 % del total (Fankhauser y Volenec, 1989; Li *et al.*, 1996).

Los compuestos nitrogenados se dividen en varias fracciones (Figura 11). Una gran cantidad (45 %) es nitrógeno (N) no soluble en buffer, siendo el resto N soluble en buffer, que a su vez se divide en N de bajo peso molecular –que se compone principalmente por aminoácidos, N inorgánico y otros compuestos y que puede llegar al 30 % del total– y proteínas solubles en buffer (25 % restante), dentro de las cuales se encuentran las proteínas vegetativas de almacenamiento (VSP), que pueden ser hasta 5 % del nitrógeno total.

La cantidad relativa entre los CHNE y los compuestos nitrogenados, como así también la concentración absoluta de cada componente de las reservas, depende principalmente de la estación del año, del momento dentro de un rebrote y de la frecuencia de la defoliación (Barber *et al.*, 1996; Cunningham y Volenec, 1998; Boyce y Volenec, 1992; Ventroni, 2009; Ventroni *et al.*, 2010).



■ **Figura 11.** Cantidad relativa de las fracciones de N en raíz de alfalfa expresadas de manera relativa al total de N en raíz. El N-insoluble es el que no se solubilizó en buffer fosfato (pH= 7); el N-bajo peso molecular es el que se solubiliza en altas concentraciones de ácido tricloracético para precipitar las proteínas. Los detalles de los procedimientos utilizados son reportados en Barber *et al.* (1996).

### *Carbohidratos no estructurales (CHNE)*

Dentro de lo CHNE se pueden diferenciar dos orígenes: 1) los compuestos asimilados a partir de la fotosíntesis actual; y 2) los compuestos acumulados en la raíz y la corona. La importancia de esta distinción se debe a que, bajo ciertas circunstancias, uno u otro origen pasa a ser la fuente principal de reservas para satisfacer los requerimientos de respiración y crecimiento de las plantas.

### *Partición. Relación fuente-destino*

El concepto de partición hace referencia a la relación existente entre dos sitios de la planta denominados “fuente” y “destino”. Se llama fuente a cualquier sitio que exhibe una exportación neta de asimilados, y destino a cualquier sitio que muestra una importación neta de asimilados. La partición de asimilados durante el ciclo de crecimiento de la alfalfa ha sido bien estudiada (Heichel *et al.*, 1988), determinándose que la principal fuente de carbono son los fotoasimilados producidos en las hojas a través de la fotosíntesis y los principales destinos son las regiones meristemáticas de los órganos vegetativos en crecimiento, los nódulos de fijación de nitrógeno y los tejidos de reserva en raíz y corona. Esta relación fuente-destino puede ser modificada por el efecto de

la defoliación, al cambiarse los requerimientos iniciales de los nuevos brotes y las necesidades de respiración de la planta entera. El proceso de acumulación de reservas consiste en la partición de fotoasimilados hacia los órganos de reserva, entre los cuales la raíz –principalmente en los primeros centímetros– y la corona resultan los más importantes. Todos aquellos factores que afecten la dinámica de esta partición afectarán directamente el nivel de reservas acumulado. Entre los factores más importantes que modifican la partición de los fotoasimilados originados por la fotosíntesis se encuentran la posición de las hojas y el estado de desarrollo y la competencia entre los órganos.

Tanto el tiempo que tardan los fotoasimilados en ser trasladados como las cantidades exportadas varían en relación con la posición de las hojas (Cralle y Heichel, 1985). Las hojas totalmente expandidas, ubicadas en los estratos inferiores del canopy, exhiben una mayor exportación de asimilados y tardan más tiempo en completarla que las hojas más nuevas y en crecimiento, situadas en la parte superior de la planta. Estas diferencias entre tipo y posición de hojas podrían ser explicadas a partir de la relación existente entre las tasas de fotosíntesis neta, las cantidades de carbono exportadas y los mayores requerimientos energéticos por parte de las hojas en expansión. A pesar de estas diferencias, las hojas superiores e inferiores contribuyen en forma simultánea al abastecimiento de carbohidratos hacia la raíz y la corona. Esto último es importante porque, al menos en la alfalfa, cuestiona el concepto generalizado de que la proximidad entre fuente y destino favorece la partición. Por el contrario, después de un corte, la proximidad entre fuente y destino parece favorecer la partición. En efecto, bajo esas condiciones, las hojas remanentes –si las hubiera– se constituyen en la principal fuente de asimilados para el desarrollo de los brotes que se producen a partir de las yemas axilares, y la raíz y la corona se transforman en la principal fuente para el desarrollo de brotes a partir de las yemas de la corona.

### *Acumulación y movilización*

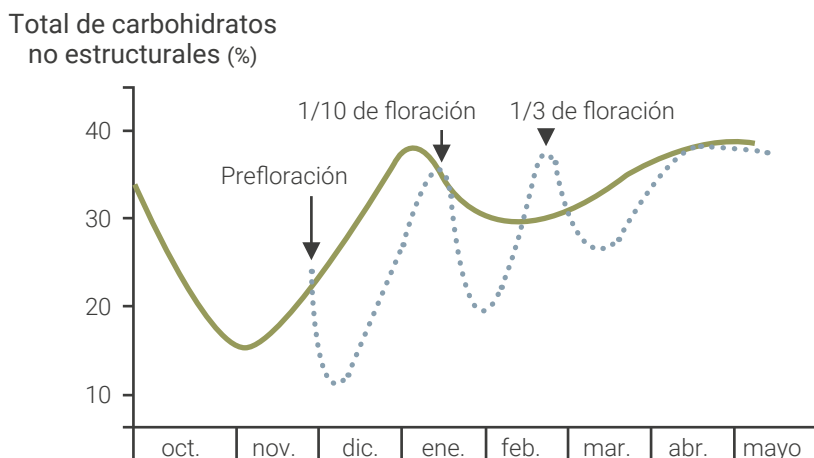
Como ya se comentó anteriormente, la acumulación de los CHNE se produce en varios tejidos y órganos dentro de la planta, siendo la raíz y la corona los de mayor importancia. A su vez, los niveles de CHNE acumulados son mayores en la raíz que en la corona, con valores de

75 % y 25 %, respectivamente (Ueno y Smith, 1970). La acumulación de CHNE en la raíz es alta en los primeros centímetros y luego va disminuyendo en profundidad (Escalada y Smith, 1972). Durante la mayor parte del ciclo de crecimiento de la planta, el almidón es el principal componente de los CHNE (60-90 %). Sin embargo, bajo ciertas condiciones –bajas temperaturas invernales, deficiencia hídrica o iniciación del rebrote primaveral–, la sacarosa pasa a ser el principal componente de los CHNE acumulados en la raíz y en la corona (Bula y Smith, 1954; Duke y Doehlert, 1981). Recientemente, Cunningham *et al.* (2001) indicaron que mientras los contenidos de azúcares y proteínas en raíces estuvieron correlacionados con una mayor tolerancia al frío y una más alta supervivencia invernal, las reservas de almidón no. La acumulación de los CHNE está afectada principalmente por las variaciones estacionales (luz y temperatura) y por la defoliación, además de otros factores comparativamente menores como la humedad o el nivel de fertilidad del suelo.

En respuesta a variaciones del fotoperíodo y temperatura, las mayores variaciones estacionales de CHNE se encuentran en el otoño, invierno y comienzo de la primavera (Bula y Smith, 1954; Volenec *et al.*, 1991). La acumulación de CHNE tiende a aumentar durante el otoño, en respuesta al acortamiento del fotoperíodo y a la disminución de la temperatura. En esas condiciones, las plantas tienen menor crecimiento, bajas tasas de respiración y relativamente altas tasas de fotosíntesis (Edmisten y Wolf, 1988). Cunningham y Volenec (1998) determinaron que la concentración de almidón tuvo un aumento al comienzo del otoño y luego sufrió una disminución hasta el comienzo de la primavera; mientras que la variación de azúcares fue inversa: disminuyó al comienzo del otoño, luego aumentó al doble hacia el final de otoño y permaneció constante hasta el comienzo de la primavera.

Durante la primavera, las adecuadas condiciones de luz y de temperatura promueven el desarrollo de brotes a partir de las yemas de la corona. En el caso de plantas intactas (sin defoliación), el crecimiento inicial se realiza a expensas de las reservas acumuladas en la raíz y en la corona y, por lo tanto, estas disminuyen (Figura 12); seguidamente, a medida que se va produciendo la expansión del área foliar y aumenta la interceptación de radiación solar, aumenta la tasa neta de fotosíntesis

(Fuess y Tesar, 1968). Por este motivo, la cantidad de carbono asimilado comienza a exceder las cantidades demandadas por los órganos vegetativos en crecimiento y por los requerimientos de respiración de la planta entera. En ese momento, finaliza el período de disminución de los niveles de reserva y, en consecuencia, cantidades crecientes de fotoasimilados pueden ser traslocados hacia la raíz y la corona y acumularse como reservas. La máxima acumulación de carbohidratos se alcanza a un 10 % de floración (Reynolds y Smith, 1962). La disminución de los niveles de reservas que se produce luego de haberse alcanzado el valor máximo es atribuida fundamentalmente a la actividad de dos destinos: el desarrollo de nuevos brotes a partir de yemas de corona y el comienzo del desarrollo de frutos (Dobrenz y Massengale, 1966).

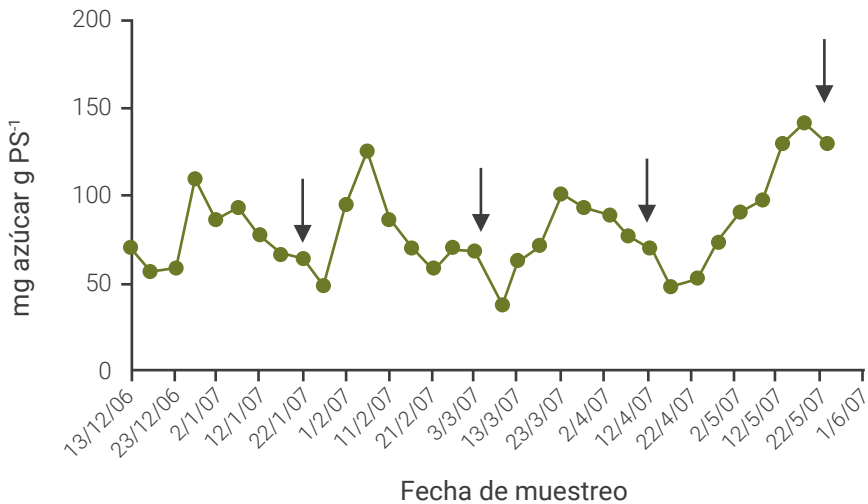


■ **Figura 12.** Variaciones estacionales de los carbohidratos no estructurales en raíces de alfalfa bajo corte (---) y sin cortar (—). Adaptado de Heichel *et al.* (1988).

Luego de una defoliación se observa un patrón cíclico de pérdida-ganancia de las reservas a través del tiempo (Figura 12). Inmediatamente después del corte o pastoreo, la disminución de las reservas se debe a las pérdidas por respiración de la planta y al desarrollo inicial de los nuevos brotes a partir de las yemas de corona; siendo estas las pérdidas de mayor magnitud (Ta *et al.*, 2020; Ta *et al.*, 1990). El nivel de reservas continúa descendiendo hasta que el área foliar es lo suficientemente alta como para que la fotosíntesis exceda los requerimientos y a partir

de allí comienza nuevamente a aumentar hasta un valor máximo, que es coincidente con la floración o con el inicio del rebrote basal (Figura 12); en ese momento, la planta está en condiciones de ser nuevamente defoliada. Este patrón general de gasto y acumulación fue similar al obtenido por otros autores (Smith, 1962; Nelson y Smith, 1968; Boyce y Volenec, 1992; Kalengamaliro *et al.*, 1997).

Fankhauser y Volenec (1989) observaron que durante los primeros 7 a 14 días después de la defoliación, las concentraciones de almidón y de azúcares disminuyeron 78 y 40 % respectivamente; luego, las concentraciones de ambas fracciones aumentaron hasta final del rebrote (28 días después del corte), alcanzando en el día 21 el mismo valor que tenían al inicio de rebrote. Ventroni (2009) no siempre observó este patrón de gasto y acumulación: en plena estación de crecimiento, la concentración de azúcares disminuyó rápidamente en los primeros 5 días, pero luego aumentó hasta aproximadamente los días 15 a 20, para nuevamente disminuir hasta finalizar el rebrote (Figura 13). En otoño, luego de la caída en los primeros 5 días, se produjo un constante aumento de su concentración.



■ **Figura 13.** Evolución de la concentración de azúcar (mg azúcar por peso seco raíz) en raíz de alfalfa en cada rebrote. La flecha indica fecha de corte y cada marca (◊) indica fecha de muestreo cada 5 días. Adaptado de Ventroni (2009).

En rebrotes de verano, después de cada corte, la concentración de almidón disminuyó hasta el día 10 a 20, para aumentar luego hasta el próximo corte (Figura 14); por el contrario, luego del corte en otoño se observa una leve disminución.

La disminución de ambas fracciones de CHNE en los primeros cinco días estaría explicada por la falta de capacidad fotosintética que posee la planta de alfalfa luego de una defoliación y por la necesidad de utilizar las reservas para principalmente respirar y en menor magnitud para crecer (Ta *et al.*, 1990; Avice *et al.*, 1996a). Más tarde, el aumento en la concentración de azúcar puede ser causado por la degradación del almidón, ya que su concentración disminuye, o por el azúcar producto de la fotosíntesis.



■ **Figura 14.** Evolución de la concentración de almidón (mg almidón por peso seco raíz) en raíz de alfalfa en cada rebrote. La flecha indica fecha de corte y cada marca (◊) indica fecha de muestreo cada 5 días. Adaptado de Ventroni (2009).

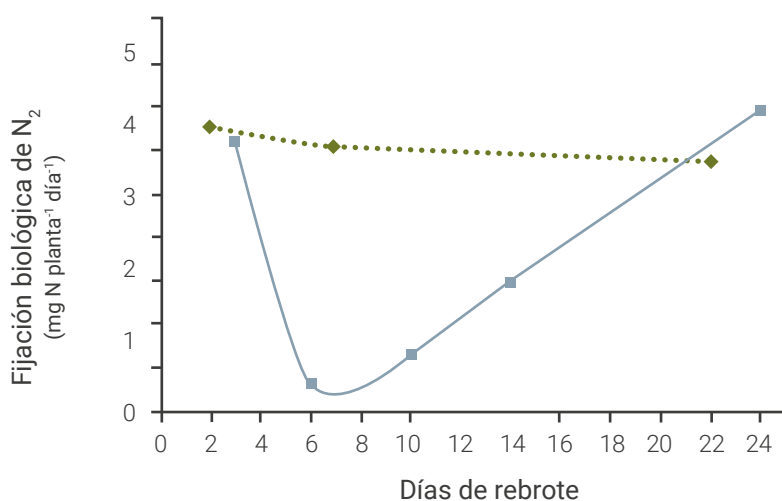
### Sustancias nitrogenadas

La alfalfa es una especie forrajera que está sujeta a reiterados ciclos de defoliación y crecimiento. A nivel de la planta, la defoliación produce: a) una drástica caída de la capacidad fotosintética, b) la reducción del crecimiento y respiración de la raíz, c) la rápida disminución de absorción y asimilación de nitrógeno por parte de las raíces y d) una vertiginosa



disminución de la fijación biológica de  $N_2$  (Richards, 1993). Esto indica que el crecimiento de forraje luego de una defoliación depende de la utilización del nitrógeno adquirido antes de la defoliación y almacenado principalmente en raíz, porque las dos fuentes de N que aportan al crecimiento, fijación y absorción de N, se ven reducidas.

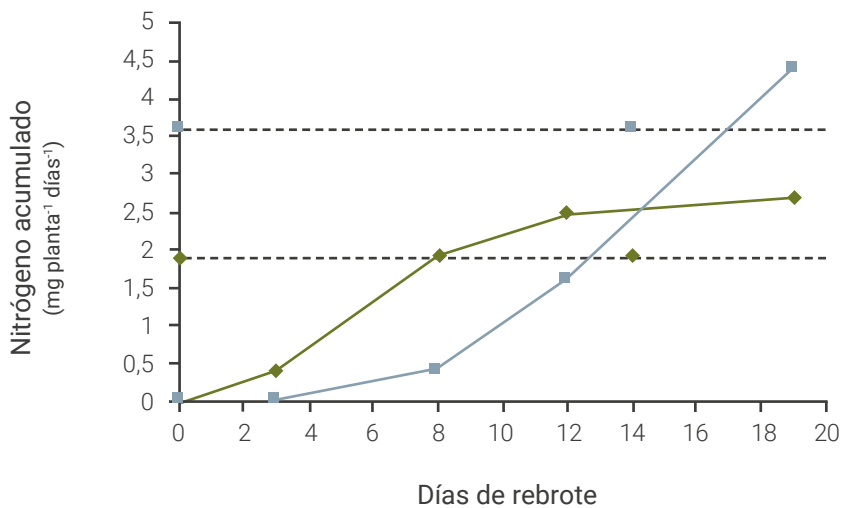
La fijación biológica declina aproximadamente un 88 % dentro de las 24 horas luego de la defoliación (Figura 15) y permanece baja por 13 días, aproximadamente (Vance *et al.*, 1979; Vance y Heichel, 1981; Kim *et al.*, 1993a; Kim *et al.*, 1993b).



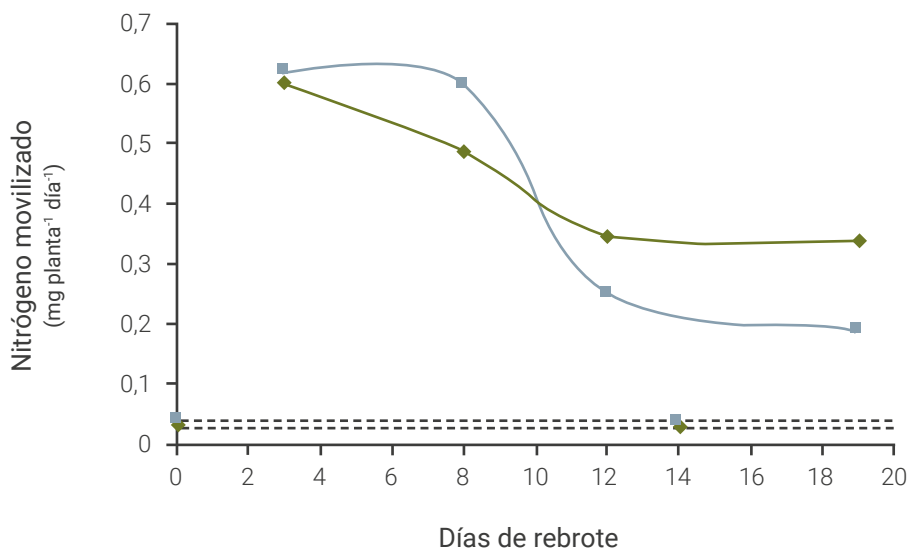
■ **Figura 15.** Evolución de fijación biológica de  $N_2$  a lo largo de un rebrote. La línea punteada pertenece a plantas no defoliadas y la continua a plantas defoliadas. Adaptado de Kim *et al.* (1993b).

La alfalfa tiene baja capacidad de absorber nitrógeno externo hasta los 5-6 días de iniciado el rebrote, aunque la absorción de nitrógeno se recupera antes que la fijación biológica del  $N_2$  atmosférico (Kim *et al.*, 1993a) (Figura 16).

Luego de una defoliación, la movilización de N desde los órganos fuentes (raíz y corona) hacia los nuevos brotes (destino) es elevada durante la primera semana, tanto en plantas noduladas como sin nodular (Cralle y Heichel, 1986), y luego disminuye, aunque más gradualmente en plantas noduladas (Figura 17).



■ **Figura 16.** Incremento del nitrógeno total en los nuevos brotes: derivado de la absorción de nitrógeno mineral (◆), o de la fijación biológica de  $N_2$  (■). Las líneas punteadas pertenecen a plantas no defoliadas y las continuas a plantas defoliadas. Adaptado de Kim *et al.* (1993a).



■ **Figura 17.** Movilización del nitrógeno de reserva en plantas de alfalfa noduladas (◆) y sin nodular (■). Las líneas punteadas pertenecen a plantas no defoliadas y las continuas a plantas defoliadas. Adaptado de Kim *et al.* (1993).

En función de la importancia del nitrógeno en la productividad de la alfalfa y que este cultivo tiene la capacidad de fijar  $N_2$ , es indispensable la inoculación con bacterias específicas (rizobios) para potenciar la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (ver capítulo 4 de este libro). En el sudeste de Buenos Aires se verificó que el rendimiento de la alfalfa inoculada fue 60 % mayor que el de la alfalfa no inoculada y que el N derivado de la atmósfera alcanzó en promedio el 69 %. De esa manera, la alfalfa inoculada fijó en dos años un total de  $250 \text{ kg N ha}^{-1}$ , valor que fue significativamente superior a los  $160 \text{ kg N ha}^{-1}$  fijados por la alfalfa no inoculada, cuyos nódulos estaban colonizados por rizobios nativos (Cangiano, 2012).

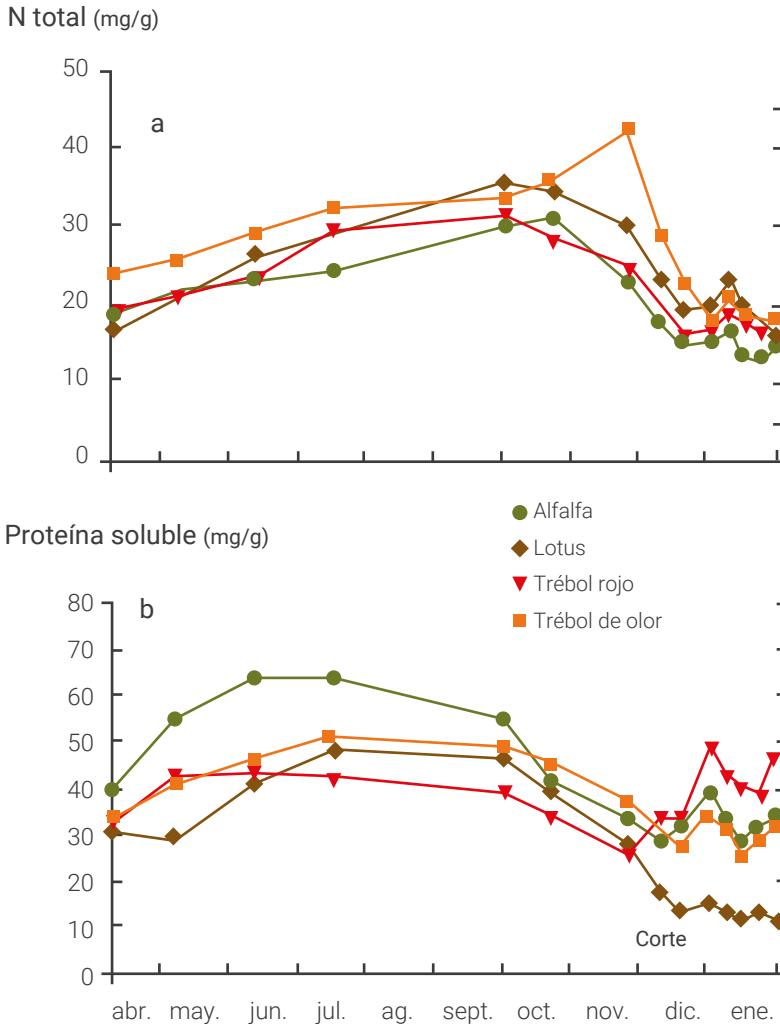
### *Acumulación y movilización*

En leguminosas forrajeras, los compuestos nitrogenados también poseen variaciones estacionales. Li *et al.* (1996) concluyeron que las variaciones estacionales de los niveles de reserva de estos compuestos en la raíz, tanto del nitrógeno total (N) como de las proteínas solubles (PS), siguen una tendencia similar a la de los carbohidratos. También señalaron que el patrón de variación de N (Figura 18a) es similar al de las PS (Figura 18b), con valores relativamente altos en otoño e invierno y menores en primavera y verano. La disminución de los niveles de reservas nitrogenadas se produce como consecuencia de la alta tasa de crecimiento que muestran las alfalfas durante la primavera y el verano.

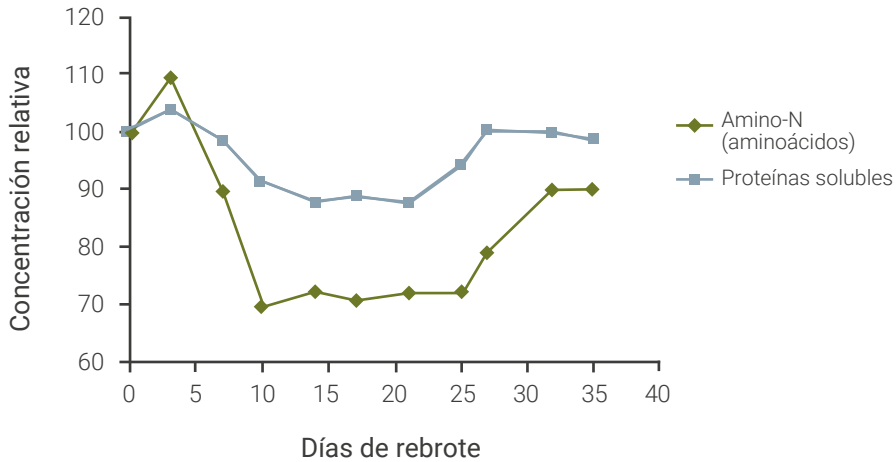
Luego de una defoliación, la concentración de proteínas y aminoácidos presenta un patrón general de gasto y acumulación. La concentración de ambas fracciones de reserva, pasado un aumento durante los primeros días, disminuye respectivamente en alrededor de 30 y 40 % hasta el día 10 a 20 del corte (Figura 19); a partir de allí, comienza un proceso de acumulación, alcanzando el valor inicial hacia el día 30 (Kim *et al.*, 1991; Hendershot y Volenec 1993b; Ourry *et al.*, 1994; Barber *et al.*, 1996; Meuriot *et al.*, 2004).

Estudios con nitrógeno marcado ( $^{15}N$ ) mostraron que después de una defoliación se produjo una disminución de las reservas de N (Kim *et al.*, 1991; Ourry *et al.*, 1994; Avice *et al.*, 1996b; Barber *et al.*, 1996; Meuriot *et al.*, 2005). Durante la primera semana después de la defoliación, casi

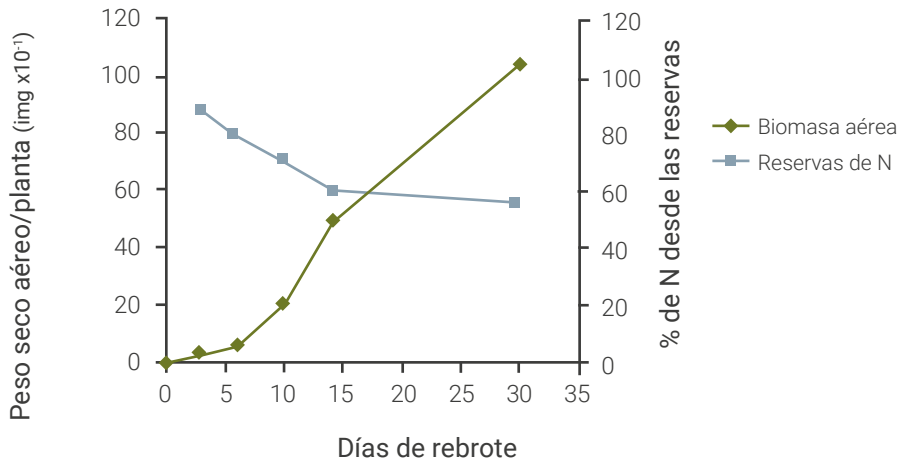
el 80 % del nitrógeno encontrado en los nuevos brotes fue derivado de las reservas de nitrógeno de raíz y corona (Figura 20). Seguidamente, esta proporción declinó cuando la absorción de nitrógeno mineral y la fijación de  $N_2$  fueron restauradas. Sin embargo, después de 30 días de rebrote, el 50 % del N encontrado en el material aéreo derivó de las reservas de N.



■ **Figura 18.** Cambios estacionales en la concentración de a: nitrógeno (N) y b: proteína soluble (PS) en raíces de alfalfa y otras especies leguminosas. Adaptado de Li *et al.* (1996).



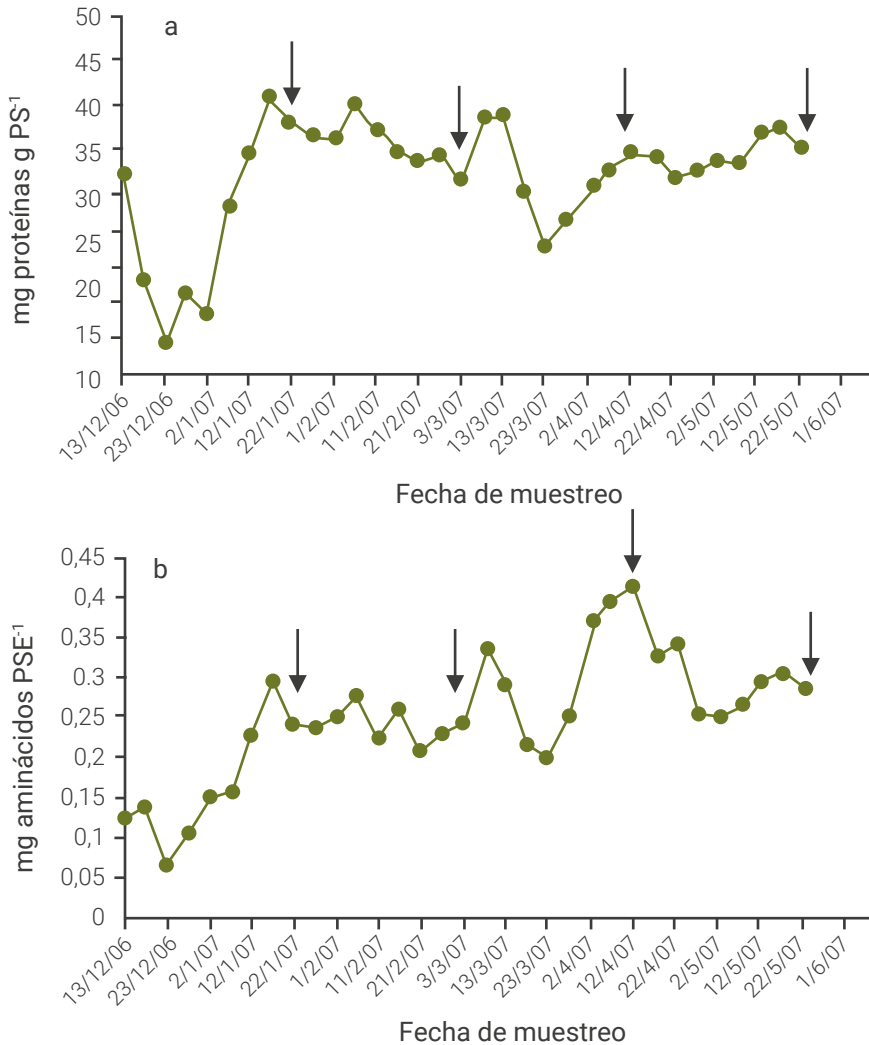
■ **Figura 19.** Variación en la concentración de aminoácidos y proteínas solubles después de una defoliación. Estas fracciones de reservas comenzaron a acumularse después del día 25 del rebrote. Las concentraciones de aminoácidos y proteínas al día cero del rebrote fueron 274 mmol g peso seco<sup>-1</sup> y 33 mg g peso seco<sup>-1</sup>, respectivamente. Adaptado de Hendershot y Volenec (1993b).



■ **Figura 20.** Cambios en la biomasa aérea y en el porcentaje de N en el material aéreo derivado de las reservas de raíz y corona después de una defoliación. Adaptado de Avice et al. (1996a).

Sin embargo, Ventroni et al. (190) no observaron con la misma claridad el patrón general de concentración de proteínas (Figura 21a) y de aminoácidos (Figura 21b) descrito anteriormente. En su estudio, observaron que la concentración de aminoácidos –en general– tuvo un

ciclo más definido de gasto y acumulación. En algunos rebrotes se produjo un aumento en los primeros 5 días y luego cayó hasta el día 10-15, para finalmente aumentar.



■ **Figura 21.** Evolución de la concentración de proteínas solubles (a) (mg proteínas por peso seco estructural de raíz) y de la concentración de aminoácidos (b) (mg aminoácidos por peso seco estructural de raíz) en raíz de alfalfa en cada rebrote. La concentración de proteínas y aminoácidos es expresada en relación con el peso seco estructural (PSE, peso del tejido menos la concentración de azúcar y almidón). La flecha indica fecha de corte y cada marca (◇) indica fecha de muestreo cada 5 días. Adaptado de Ventroni *et al.* (2009).

## Relación entre acumulación de forraje, reservas en raíces y manejo

Según Harris (1978), la caracterización de la defoliación involucra tres parámetros: 1) frecuencia, que es el tiempo transcurrido entre defoliaciones sucesivas; 2) intensidad, que mide la biomasa removida o porcentaje de utilización y que es un término amplio que incluye la severidad, la duración, la altura, el área foliar residual, las reservas, el estado fisiológico y la uniformidad (remoción diferencial de plantas o partes específicas de las plantas en pastoreo); y 3) momento, que se relaciona con el estado fenológico de las plantas y la época del año. En alfalfa, la combinación óptima de todos estos parámetros a fin de lograr el adecuado balance entre producción, calidad y persistencia ha sido motivo de numerosos trabajos tanto en el extranjero como en el país (Romero *et al.*, 1995). En el manejo de la alfalfa, la intensidad del corte o pastoreo reviste menos importancia que la frecuencia de utilización. Esto posiblemente se deba a que, como fuera mencionado anteriormente, los tallos remanentes tienen relativamente poca importancia como sitios de crecimiento para promover el próximo rebrote. Luego de una defoliación, la corona es la principal fuente de nuevos tallos; los tallos provenientes de las yemas axilares de las hojas remanentes adquieren mucha menos relevancia (Langer, 1990). No obstante, la preponderancia de una u otra fuente puede variar según el cultivar, el estado de madurez al momento de cosecha, la cantidad de forraje remanente o la frecuencia de utilización (Sheaffer *et al.*, 1988). Dejar alturas remanentes mayores a 10 cm con hojas residuales de baja eficiencia fotosintética no brinda ninguna ventaja dado que la mayoría del rebrote proviene de las yemas ubicadas en la corona (Langer *et al.*, 1970). En pastoreo, el impacto de la defoliación es complejo. En esas condiciones, la uniformidad de la defoliación afecta notablemente la productividad y la competencia por recursos. La capacidad de las plantas para compensar la defoliación que hace el animal disminuye cuando aumenta la competencia con otras plantas, sea esta intra- o interespecífica. El crecimiento de las plantas no defoliadas, cuando se hallan ubicadas cerca de otras plantas que han sido defoliadas, puede ser promovido por la mayor disponibilidad de recursos; por el contrario, si la planta es defoliada parcialmente, los nutrientes pueden

ser redistribuidos dentro de la planta entre los diferentes macollos o tallos (Gdara *et al.*, 1991), modificando la capacidad de recuperación de la planta y amortiguando el impacto de la defoliación.

La frecuencia de defoliación (FC) es un factor crítico de manejo que afecta la productividad y la persistencia del cultivo, y es la variable inequívoca que tiene el mayor efecto sobre el rendimiento de forraje (Keoghan, 1967; Marble, 1974; Marble, 1980; Hagemann y Marble, 1983; Lodge, 1986; Gramshaw *et al.*, 1993; Putnam *et al.*, 2003; Putnam *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2007a; Ventroni *et al.*, 2010). Esto se reafirma con el análisis del rendimiento estandarizado de materia seca para las distintas frecuencias experimentadas en la bibliografía (Figura 22).

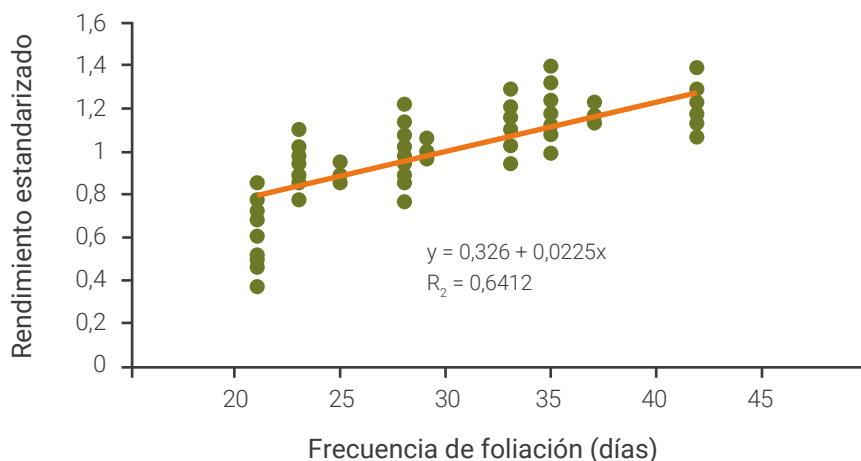
La frecuencia de defoliación posee un alto impacto sobre la acumulación y movilización de las reservas orgánicas (Gramshaw *et al.*, 1993; Avice *et al.*, 1997a; Dhont *et al.*, 2002; Dhont *et al.*, 2003; Haagenson *et al.*, 2003; Ventroni, 2009). Existen otras prácticas de manejo que pueden influir sobre las reservas, como la intensidad de corte y área foliar remanente (Meuriot *et al.*, 2004), cultivares de diferente grado de reposo (Avice *et al.*, 1997a; Dhont *et al.*, 2002; Dhont *et al.*, 2003; Haagenson *et al.*, 2003; Ventroni, 2009) y manejo de la nutrición del suelo (Berg *et al.*, 2005; Berg *et al.*, 2007), pero ninguna de ellas tiene la magnitud de la frecuencia de defoliación.

De acuerdo con Ta *et al.* (2020), la reducción del rendimiento con una frecuencia de defoliación alta (hasta 28 días) es debido principalmente al corto período de rebrote que impide la acumulación de materia seca a altas tasas lineales por más tiempo, en especial durante primavera-verano, cuando las tasa son más altas.

En plantas frecuentemente defoliadas, la concentración de CHNE disminuye, pero la respuesta de las dos fracciones de reserva que la conforman (azúcares y almidón) es inversa (Tabla 3), la concentración de azúcares aumenta y la del almidón disminuye (Avice *et al.*, 1997a; Meuriot *et al.*, 2004; Meuriot *et al.*, 2005; Ta *et al.*, 1990; Ventroni, 2009). Las causas de la mayor concentración de azúcares en la alta frecuencia pueden deberse a que se induce la hidrólisis de almidón, liberando azúcares que son acumulados en la raíz o a que se reduce la utilización de esta fracción de reserva por el menor crecimiento (Haagenson *et al.*, 2003). La caída en la concentración de almidón podría atribuirse a una



reducción en el suministro de carbono a la raíz o a que la planta necesita hidrolizar almidón para cubrir la demanda de energía que produce el crecimiento y respiración (Ta *et al.*, 1990).



■ **Figura 22.** Relación entre la frecuencia de corte y el rendimiento estandarizado de materia seca. Elaborado de Marble (1974; 1980), Gramshaw *et al.* (1993), Hagemann y Marble (1983), Putnam y Orloff (2003) y Putnam *et al.* (2005).

■ **Tabla 3.** Efecto de la frecuencia de corte sobre la concentración de carbohidratos no estructurales (CHNE), azúcares solubles y almidón en raíz de alfalfa. Datos expresados en mg reserva por peso seco raíz (PS). Letras diferentes entre filas son significativamente diferentes (LSD,  $p \leq 0,05$ ). Adaptado de Ventroni (2009).

Frecuencia de corte días	CHNE	Azúcares solubles	Almidón
	mg CHNE g PS raíz	mg azúcares g PS raíz	mg almidón g PS raíz
20	301 c	109 a	191 c
30	403 a	79 b	323 a
40	350 b	67 c	289 b

La concentración de nitrógeno total, proteínas solubles y aminoácidos disminuye en plantas defoliadas frecuentemente (Avice *et al.*, 1997a; Dhont *et al.*, 2002; Ta *et al.*, 1990). Ventroni (2009) estimó que en plantas cortadas cada 20 días, las reservas nitrogenadas disminuyeron casi 50 % comparadas con las de plantas cortadas con una frecuencia de 40 días (Tabla 4).

■ **Tabla 4.** Efecto de la frecuencia de corte sobre la concentración de proteínas solubles y aminoácidos en raíz de alfalfa. Datos expresados en mg de reserva por peso seco estructural (PSE) de raíz (PSE = peso del tejido menos la concentración de azúcar y almidón). Letras diferentes entre filas son significativamente diferentes (LSD,  $p \leq 0,05$ ). Adaptado de Ventroni (2009).

Frecuencia de corte días	Proteínas solubles mg proteínas g PSE raíz	Aminoácidos um aminoácidos g PSE raíz
20	18 b	0,09 c
30	32 a	0,14 b
40	35 a	0,17 a

Numerosos estudios han relacionado la concentración de CHNE y rendimiento o persistencia de alfalfa y de otras leguminosas (Graber *et al.*, 1927; Grandfield, 1943; Kust y Smith, 1961; Smith, 1962; Heichel *et al.*, 1988). Sin embargo, se ha cuestionado la relación causa-efecto entre los CHNE y el crecimiento luego de una defoliación (Márquez-Ortiz *et al.*, 1999; Ta *et al.*, 1990), habida cuenta de las bajas correlaciones entre concentración de CHNE y rendimiento aéreo (Volenc, 1985; Fankhauser y Volenc, 1989; Habben y Volenc, 1990; Boyce y Volenc, 1992).

Las reservas nitrogenadas poseen incidencia sobre el rendimiento y la tolerancia a diferentes estreses (Volenc *et al.*, 1998; Ourry *et al.*, 1994; Avice *et al.*, 1996a; Volenc *et al.*, 1996; Avice *et al.*, 1997a). Avice *et al.* (1996a) observaron que el 73 % del carbono total y el 34 % del nitrógeno total fueron removidos a los nuevos tejidos de crecimiento dentro de los 30 días de producido el corte. Todo el nitrógeno fue recuperado en los destinos, pero gran parte del carbono se perdió, principalmente como  $\text{CO}_2$ , en el proceso de respiración (61 % en raíz y 8 % en brotes), encontrándose solo el 5 % en el destino. En otro estudio, Avice *et al.* (1997b) observaron que la variación en el rendimiento aéreo fue explicada por la concentración de proteínas solubles ( $R^2= 0,76$ ) y de proteínas vegetativas de almacenamiento (VSP por sus siglas en inglés) ( $R^2= 0,88$ ) en raíz y no por la concentración de almidón ( $R^2= 0,18$ ). Meuriot *et al.* (2005) determinaron que el 60 % de la variabilidad en la acumulación de biomasa aérea en un rebrote fue explicado por las reservas de nitrógeno. Las VSP se movilizan preferentemente durante el rebrote en primavera

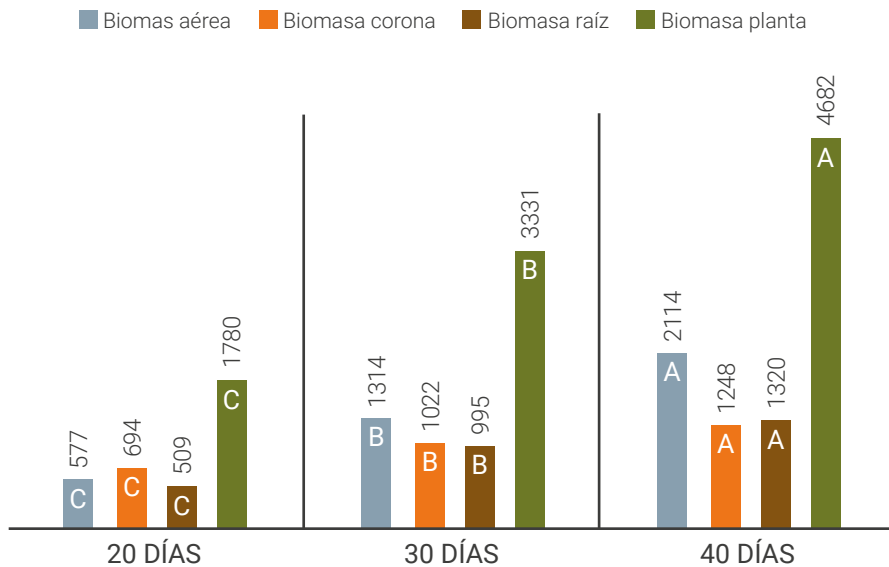
y verano (Heichel *et al.*, 1988; Hendershot y Volenec, 1993a; Avice *et al.*, 1997a; Jung *et al.*, 1996; Justes *et al.*, 2002).

Como se muestra en la Figura 23, el efecto negativo de una defoliación frecuente (cada 20 a 28 días) sobre el rendimiento se observa en la menor tasa inicial de acumulación de materia seca, determinada por una menor radiación interceptada producto de una caída en la capacidad fotosintética y en la tasa de expansión foliar, lo que determina una menor área foliar (Ta *et al.*, 2020; Teixeira *et al.*, 2007c).



■ **Figura 23.** Rebrote de once días en alfalfa defoliada cada 20 y 40 días (izquierda y derecha de la estaca, respectivamente).

Tanto la biomasa aérea como la de corona y de raíz son menores a una alta frecuencia de defoliación (cada 20 días), lo que lleva a que la biomasa total de la planta (Figura 24) sea entre 45 y 60 % menor en comparación con la de plantas cortadas cada 30 y 40 días, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2007a; Ventroni *et al.*, 2008). Ta *et al.* (2020) observaron que con una frecuencia de defoliación de 28 días, y cuando el fotoperíodo se acortaba, no hubo partición de materia seca a raíces en plantas de grado de reposo invernal (GRI) 10, lo que consecuentemente redujo el peso de sus raíces en mayor medida que en aquellas de GRI 2 y 5.



■ **Figura 24.** Efecto de la frecuencia de corte (20, 30 y 40 días) sobre la biomasa (kg materia seca ha<sup>-1</sup>) aérea, de corona, de raíz y de planta total en el primer año de producción de alfalfa. Letras diferentes por biomasa son significativamente diferentes. Tomado de Ventroni *et al.* (2008).

En resumen, la alta frecuencia de defoliación lleva a una menor biomasa de raíces (Figura 24) y a menor concentración de reservas (Tablas 3 y 4). La acumulación de biomasa aérea estaría más correlacionada con las cantidades de reservas de C y N (mg planta<sup>-1</sup>) que con las concentraciones (mg peso seco raíz<sup>-1</sup>). De las reservas orgánicas en raíces, el nitrógeno (proteínas solubles y aminoácidos) es lo que mejor explica la variación de la acumulación de biomasa (Tabla 5), en coincidencia con lo señalado por Dhont *et al.* (2002) y Teixeira *et al.* (2007a). Tanto la biomasa aérea como la de corona y de raíz son menores a una alta frecuencia de defoliación (cada 20 días), lo que lleva a que la biomasa total de la planta (Figura 24) sea entre 45 y 60 % menor en comparación con la de plantas cortadas cada 30 y 40 días, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2007a; Ventroni *et al.*, 2008). Ta *et al.* (2020) observaron que con una frecuencia de defoliación de 28 días, y cuando el fotoperíodo se acortaba, no hubo partición de materia seca a raíces en plantas de grado de reposo invernal (GRI) 10, lo que consecuentemente redujo el peso de sus raíces en mayor medida que en aquellas de GRI 2 y 5.

■ **Tabla 5.** Correlación simple entre la cantidad de azúcares solubles, almidón, proteínas solubles y aminoácidos en raíces de alfalfa al momento del corte (día 0 de cada rebrote) y el rendimiento al final de cada rebrote (n=117). Adaptado de Ventroni (2009).

Cantidad reservas en raíces	Coefficiente correlación	p-valor
Azúcares solubles	0,31	< 0,0001
Almidón	0,57	< 0,0001
Proteínas solubles	0,69	< 0,0001
Aminoácidos	0,65	< 0,0001

### *Interacción frecuencia de defoliación y grado de reposo*

Hay resultados equívocos sobre cómo los cultivares con distinta latencia otoñal o grado de reposo invernal (GRI) responden a la frecuencia de defoliación (FC). El reposo otoñal es definido como la reducción en el crecimiento de los tallos en otoño debido a la disminución de la temperatura y del largo del día (Teuber *et al.*, 1998).

En general, la bibliografía concuerda en que los cultivares con reposo largo tienen una elongación de los tallos reducida y una orientación decumbente en otoño y que son muy resistentes al frío (Sprague y Fueleman, 1941). Los cultivares sin reposo otoñal tienen alto rendimiento, rápida elongación orientación vertical de los tallos y generalmente menor supervivencia por frío. Estos cultivares son deseables por la mayor tasa de crecimiento de los tallos y una más rápida madurez después de la defoliación que los cultivares con reposo (Buller *et al.*, 1955; Leach, 1969). Por lo tanto, los cultivares sin reposo pueden tener un mayor rendimiento de forraje e históricamente ha habido interés en usarlos en regiones con inviernos benignos (Márquez-Ortiz *et al.*, 1999). Además, por definición, el rebrote otoñal es de mayor rendimiento que el de los cultivares con reposo largo, lo que representa una ventaja estacional. Estas diferencias en las tasas de crecimiento de los tallos y de madurez pueden influir en cómo los cultivares con GRI contrastantes responden a la FC. De este modo, entender la interacción entre FC x GRI es importante para ajustar el manejo de la defoliación.

En Manfredi (Córdoba), durante el período 1974-77, Cangiano (1992) observó que el cultivar Kanza (reposo largo) no manifestó diferencias

significativas de rendimiento entre frecuencias de defoliación, en tanto que Team (reposo intermedio-largo) produjo lo mismo con cortes al 10 % y al 50 % de floración, pero menos en prebotón, y WL 508 (reposo corto) y Polihíbrido Manfredi (reposo intermedio-corto) tuvieron mayores rendimientos al 50 % que al 10 % de floración o en prebotón. Marble (Marble, 1974; Marble, 1980) y Hagemann y Marble (1983) afirmaron que cultivares sin reposo pueden ser cortados más tempranamente y con menor reducción del rendimiento que cultivares con reposo intermedio o largo debido a una madurez más precoz y que, por lo tanto, son menos susceptibles de ser dañados por defoliaciones más frecuentes.

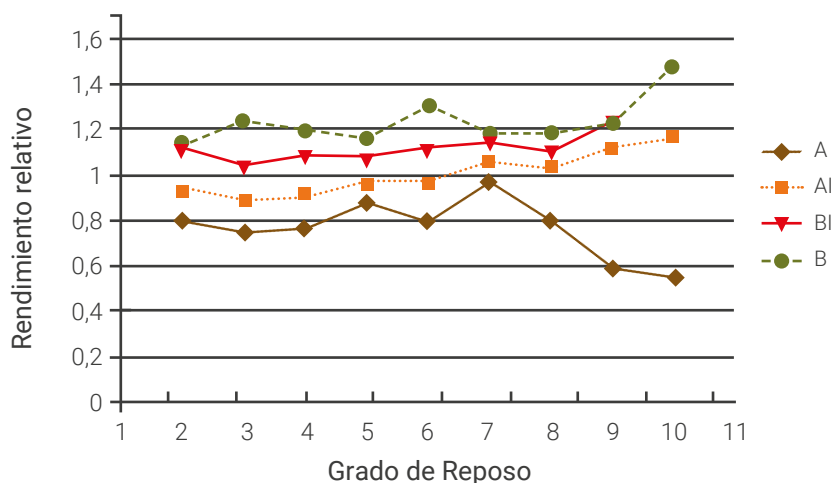
Putnam y Orloff (2003) y Putnam *et al.* (2005) observaron en el primer y segundo año una clara interacción FC x GRI, donde los cultivares sin reposo tuvieron una ventaja en rendimiento sobre los cultivares con latencia cuando fueron defoliados frecuentemente (cada 23 días). Otras experiencias demostraron que cultivares con distinto GRI respondieron de la misma manera a la FC en ambientes templados (Lodge, 1986) y subtropicales de Australia (Bishop y Gramshaw, 1977), en el norte (Sheaffer *et al.*, 1986; Sheaffer *et al.*, 2000) y medio-oeste de Estados Unidos (Kallenbach *et al.*, 2002), en el sudeste bonaerense (Ventroni *et al.*, 2010) y más recientemente en Nueva Zelanda (TA *et al.*, 2020).

En Australia subtropical, Gramshaw *et al.* (1993) observaron interacción FC x GRI. En el segundo año el rendimiento de todos los grados disminuyó cuando la frecuencia de corte fue menor de 35 días, siendo mayor la caída con frecuencias de 21 días y de mayor magnitud en los grados sin reposo.

En California, Putnam *et al.* (2005) analizaron el rendimiento, la calidad y la persistencia de 18 cultivares con distintos grados de reposo (GRI 2 a 10) cortados cada 24, 28 y 34 días. La frecuencia de corte tuvo un efecto mayor que el cultivar sobre el rendimiento y la calidad de forraje: a menor frecuencia el rendimiento fue mayor, pero de menor calidad. También observaron que los cultivares sin reposo tuvieron mayor rendimiento, pero menor calidad. Con respecto a la persistencia, en los cortes más frecuentes hubo una severa pérdida de plantas y que –en general– los cultivares sin reposo tuvieron menor persistencia, más aún con la defoliación más frecuente. En estudios más recientes en Nueva Zelanda, Ta *et al.* (2020) observaron que con alta frecuencia de defolia-

ción (cada 28 días), el rendimiento del cultivar sin reposo (GRI 10) fue más afectado que el de los de mayor grado (GRI 2 y 5). Harvey *et al.* (2014) concluyeron que cuanto más severo es el estrés por pastoreos frecuentes, menor es el rendimiento y la persistencia de los cultivares sin reposo.

Del análisis de la información bibliográfica (Figura 25) se concluye que el rendimiento relativo de los cultivares sin reposo es negativamente afectado por las defoliaciones frecuentes (25 días o menos), materializado por el deterioro de la población de plantas y la baja persistencia en el mediano plazo.



■ **Figura 25.** Rendimiento relativo de forraje en cultivares de diferentes grados de reposo otoñal con distintas frecuencias de defoliación. A = alta frecuencia (21-25 días), AI = alta-intermedia (28-29 días), BI = intermedia-baja (33-35 días), B = baja (37-42 días). Elaborado de Cangiano *et al.* (2008), Marble, (1974; 1980), Gramshaw *et al.* (1993), Hagemann y Marble (1983); Putnam y Orloff (2008); Putnam *et al.* (2003) y Teixeira *et al.* (2008).

Durante el otoño se inician en la planta dos procesos de importancia: el comienzo del reposo y la aclimatación al período invernal. La relación directa entre estos dos procesos y la acumulación de reservas, tanto en cantidad como en composición, llevó a considerar al otoño como un período crítico, donde cualquier práctica de defoliación –a fin de disminuir los riesgos de supervivencia y productividad futura de forraje– debe tener en cuenta la fisiología de la planta (Smith, 1972).



Investigaciones realizadas en latitudes con climas muy fríos han sugerido un “período crítico de descanso otoñal” de 4-6 semanas antes de la fecha probable (promedio histórico) de la primera “helada fuerte” (*killing frost*). Tanto la fecha de corte como el estadio fenológico al momento de corte en otoño afectaron significativamente los rendimientos de materia seca del primer corte en la primavera siguiente (Lloveras *et al.*, 1998). Otros autores sostienen que esas diferencias desaparecen cuando se analiza la producción anual de forraje (Herbert *et al.*, 1989; Mays y Evans, 1973).

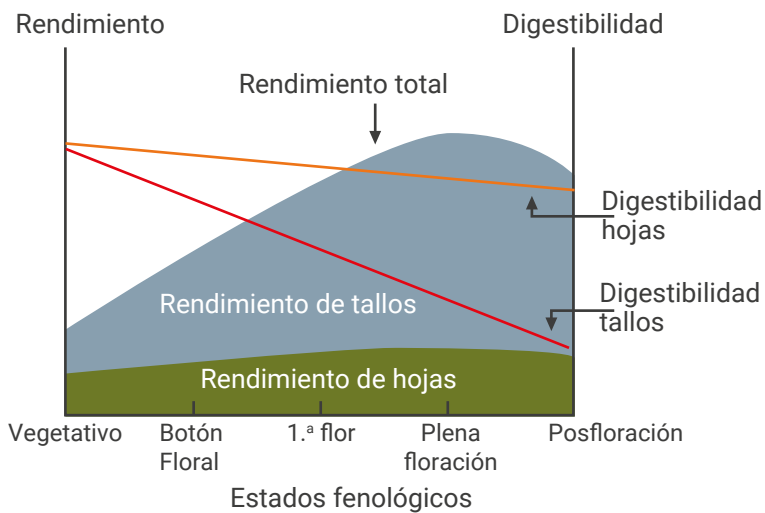
Los cortes durante el otoño pueden perjudicar la persistencia del alfalfa si no se contemplan adecuados períodos de recuperación previos al corte o se utilizan cultivares no adaptados (Mays y Evans, 1973; Belanger *et al.*, 1999). También se ha encontrado interacción manejo por cultivar, dado que los cultivares más tolerantes a las bajas temperaturas fueron menos afectados que los más susceptibles (Belanger *et al.*, 1999) en la supervivencia de plantas. También se observó que cultivares con mayor reposo fueron menos sensibles a la pérdida de plantas que los sin reposo (Bariggi *et al.*, 1979; Cragnaz, 1988; Rossi *et al.*, 1988; Cangiano, 2002a).

Las diferentes respuestas a los manejos otoñales que se observan entre cultivares y localidades hacen que los resultados no puedan ser generalizados o extrapolados en forma simple a distintas situaciones. Si en los cultivares sin reposo se utiliza el crecimiento de otoño-invierno, no debería esperarse que sus ventajas productivas se mantuvieran a principios de primavera, ya que la disminución de reservas debería llevar en esta época a menores producciones respecto de los cultivares con reposo (White y Lucas, 1989). Sin embargo, cuando la utilización durante la primavera no es crítica, el efecto depresivo del manejo otoño-invernal puede ser compensado por una demora en la defoliación (Janson, 1975). En este caso particular, como en otros períodos de crecimiento, puede aplicarse el concepto de Keoghan (Keoghan, 1967): un período breve de mal manejo tiene poco efecto en los rendimientos subsiguientes si luego se otorga a las plantas un período adecuado de descanso; mientras que con un período prolongado de mal manejo en primavera y verano, con defoliaciones frecuentes, la alfalfa no tiene la capacidad de recuperar su rendimiento (Ventroni *et al.*, 2010).



### La frecuencia de defoliación y el grado de reposo afectan la cantidad y la calidad de la alfalfa

Cuando, además de la producción de materia seca y de la longevidad de las plantas, se tiene en cuenta el valor nutritivo del forraje, se aconseja que el corte o pastoreo se realice en un estado próximo al 10 % de floración. Esto se basa en que la alfalfa, con el avance de la madurez, disminuye su calidad porque decrecen la digestibilidad y el contenido proteico y aumentan los contenidos de pared celular y de lignina. A medida que se avanza en los estados fenológicos, se acrecienta la proporción relativa de los tallos (que son de menor digestibilidad) por sobre la de hojas, que –si bien de alta calidad– se mantiene casi constante a través del tiempo (Figura 26). A su vez, el contenido de fósforo disminuye y el de calcio se mantiene alto (Bariggi y Romero, 1986; Berger *et al.*, 1986; Berger *et al.*, 1985).



■ **Figura 26.** Evolución del rendimiento y la calidad de tallos y hojas de alfalfa a medida que avanzan los estados de madurez.

Si bien la adopción del 10 % de floración para determinar el momento del corte o pastoreo resulta muy útil como recomendación de manejo para la alfalfa, su definición fenológica precisa presenta algunos inconvenientes. Como alternativas para manejar más objetivamente la frecuencia de uso se han sugerido otros estados de madurez, algunos

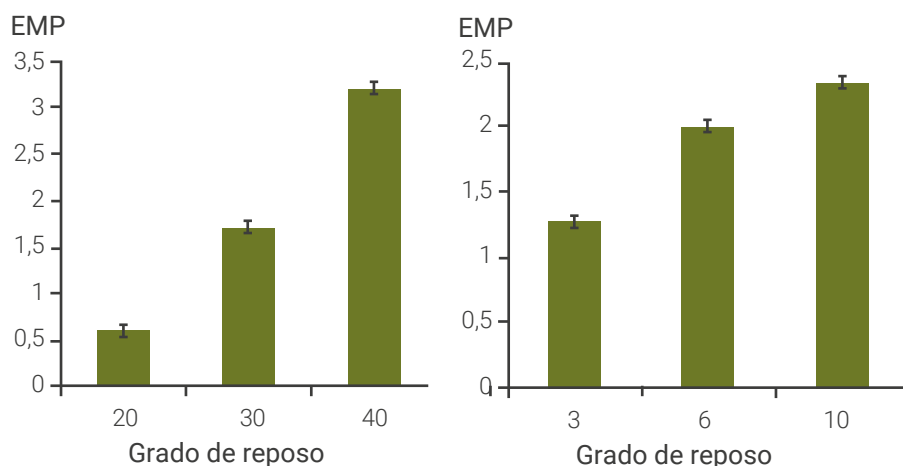
basados en la combinación del número de entrenudos y floración (Nordkvist y Åman, 1986) y otros en la complementación de altura de planta y floración (McLeod, 1978). Es muy común que se mencionen uno o varios estados fenológicos, pero que no se indique cómo fueron determinados (Evans y Peadar, 1984). Kalu y Fick (1981) propusieron un método para estimar el estado de madurez de la alfalfa en un momento dado, definido como como “estado medio por peso” (EMP) y que integra el estado fenológico de cada tallo individual de una muestra, categorizado según una escala definida previamente (ver capítulo 2). Este método, aunque de difícil aplicación práctica, es un mejor indicador de la calidad del forraje que el basado exclusivamente en la estimación del porcentaje de floración.

El estado medio de madurez (EMP) es afectado por la frecuencia de corte (FC) y por el grado de reposo invernal (GRI). Es lógico esperar que un grado de madurez mayor se corresponda con una alfalfa cortada menos frecuentemente (Figura 27a). Si las plantas se cortan con una misma frecuencia, el estado de madurez a la cosecha es mayor en los cultivares sin reposo (Figura 27b) (Ventroni *et al.*, 2010).

La calidad también es afectada por la frecuencia de defoliación y por el grado de reposo, donde a menor frecuencia (20 días) y menor reposo (GRI 10) menor es la digestibilidad (Tabla 6). El grado de reposo es un excelente predictor de la calidad del forraje (medida como fibra detergente ácida o FDA), según la ecuación:  $FDA = 0,62x + 24,3$  ( $R^2 = 0,93$ ), donde  $x$  = grado de reposo invernal, que toma valores de 4 a 9. Putnam *et al.* (2005) indicaron similares niveles de cambio para proteína y fibra detergente neutro (FDN). Esta relación entre el grado de reposo invernal y la calidad forrajera estaría explicada por el estado de madurez, como fuera explicado anteriormente (Fig. 27b).

Existe un compromiso entre cantidad y calidad, que es afectado tanto por la frecuencia de defoliación como por el grado de reposo invernal. El mayor rendimiento es acompañado por una menor calidad. También a menor reposo menor calidad. Pero muchas veces el grado de reposo pierde importancia y es la frecuencia de defoliación la que mayor efecto tiene sobre rendimiento y calidad. Mientras puede ser tentador elegir un cultivar sin reposo de mayor rendimiento y cortarlo frecuentemente, o bien elegir un cultivar con reposo de mayor calidad y cortarlo menos

frecuentemente, es obvio que no hay una única respuesta. En el largo plazo debería considerarse también la persistencia del cultivo, de manera de lograr un compromiso entre rendimiento, calidad y supervivencia de las plantas (Figura 28). Mientras que rendimiento y calidad están negativamente correlacionados, defoliaciones más frecuentes traen consecuencias negativas sobre la productividad y la persistencia y aumentan el riesgo de timpanismo. Cualquiera sea el régimen de defoliación, los cultivares con mayor reposo presentan un menor estado de madurez (fenología) que los sin reposo y esto explicaría su mayor calidad.



■ **Figura 27.** Efecto de la frecuencia de corte (a) y del grado de reposo (b) sobre el estado medio fenológico por peso (EMP). Letras diferentes entre columnas difieren estadísticamente ( $p \leq 0,05$ ).

■ **Tabla 6.** Efecto de la frecuencia de corte y del grado de reposo invernal (GR) sobre la digestibilidad in vitro del forraje. Tomado de Cangiano y Ventroni (2014).

GR	FC			
	20	30	40	Promedio
3	92,4	89	83,3	88,2 C
6	91,6	85,5	78,6	85,2 B
10	89,7	84,1	77,4	83,7 A
Promedio	91,2 c	86,2 b	79,8 a	



■ **Figura 28.** Correlación entre rendimiento de forraje, calidad y persistencia de las plantas. Los signos + y - indican el sentido de la correlación.

Cuando la alfalfa se utiliza en estados fenológicos inmaduros, hay ciertas consideraciones de “anticalidad” que deben tenerse en cuenta y que deben ser balanceadas a través de la suplementación (Abdelhadi y Cangiano, 2002; Cangiano *et al.*, 2008; Barbera y Cangiano, 2011). Esas consideraciones respecto del forraje de alfalfa son: 1) la alfalfa tiene una muy alta concentración de proteína (17-26 %), pero con una alta tasa de degradabilidad ruminal que excede los requerimientos microbianos de amonio. Este exceso debe ser eliminado como urea en orina y –en menor medida– elevando el tenor de urea en leche; 2) tiene una baja concentración de fibra efectiva, que desmejora la capacidad de masticación y las condiciones de salud ruminal; 3) por lo general, presenta desbalances minerales, como por ejemplo exceso de potasio o deficiencias de sodio, zinc, selenio o cobre; y 4) a menor estado de madurez es mayor riesgo de empaste.

## Alfalfa con gramíneas templadas

Las ventajas de las mezclas de gramíneas y leguminosas son más fáciles de visualizar cuando se considera que la leguminosa, entre otros factores, no solo aporta N atmosférico a través de la fijación biológica, sino también aumenta el valor nutritivo de la dieta por su alto contenido de N, su mayor digestibilidad y más alto contenido mineral, lo que se traduce en un significativo aporte a la nutrición de los animales. La base teórica de la formulación de estas mezclas está dada por la fijación y transferencia de N por parte de las leguminosas, lo cual determina que el rendimiento total de la mezcla sea, en muchos casos, transgresivo.

A continuación, se presenta un ejemplo particular de una mezcla de alfalfa y pasto ovillo para mostrar la interacción competitiva entre una gramínea y una leguminosa tanto en rendimiento total (Figura 29) como en las relaciones de competencia de acuerdo a los rendimientos totales relativos (Figura 30). En este caso se obtuvo un rendimiento transgresivo de las mezclas, si bien no siempre ocurre con alfalfa, ya que como cultivo puro tiene un muy alto potencial de producción *per se* (ver Porqueddu *et al.*, 2008).

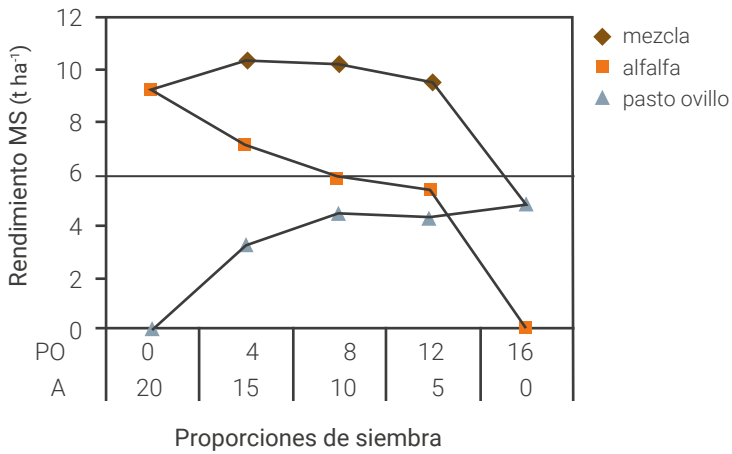


Figura 29. Rendimiento total de materia seca de alfalfa y pasto ovillo puros y en mezcla con distintas proporciones de densidades siembra. Adaptado de Frankow-Lindberg (1987a).

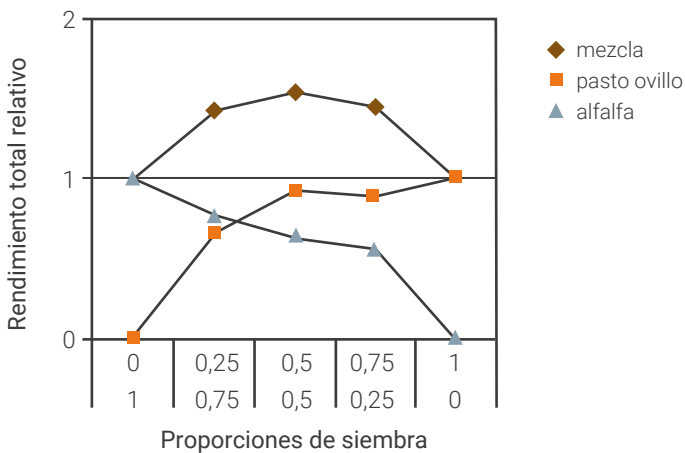


Figura 30. Rendimiento relativo de alfalfa y pasto ovillo puros y en mezcla. Adaptado de Frankow-Lindberg (1987b).

Al considerar la producción y utilización de estas mezclas se debe prestar particular atención a aquellos aspectos relacionados con los procesos de interferencia y competencia entre leguminosas y gramíneas. Es generalmente aceptado que las gramíneas tienen ventajas competitivas sobre las leguminosas, lo que hace que tiendan a dominar en las pasturas, por lo que los procesos citados deben ser controlados a fin de lograr un adecuado balance de las especies que componen la mezcla. Entre los factores para considerar, Haynes (1980) destaca: a) habilidad competitiva de las especies; b) posibles situaciones de alelopatía entre ellas; c) capacidad de fijación simbiótica y de transferencia de N por parte de las leguminosa; d) períodos y tasas de crecimiento diferenciales de las especies para una mayor estabilidad de la mezcla; e) tolerancia al sombreado de las especies; f) eficiencia diferencial en el uso del agua; g) capacidad de intercambio catiónico de las raíces para facilitar o atenuar condiciones competitivas; y h) aspectos morfológicos, como estructura de canopeo, hábito de crecimiento, ubicación de los puntos de crecimiento en relación con la superficie del suelo y estructura radicular.

Cuando se elige sembrar una pastura, la primera consideración debe ser el balance de nutrientes del suelo; luego, se tendrán en cuenta otras, tales como las condiciones de pH, el drenaje y la compactación del suelo y la duración prevista de la pastura. También es importante definir si la pastura se utilizará bajo pastoreo, para la confección de reservas, para ambos fines, o para el control de la erosión. Las leguminosas forrajeras son uno de los principales intervinientes para la "construcción" del suelo. Una pastura de tres a cuatro años que posea como componente a una especie de leguminosa mejorará la estructura del suelo e incrementará su nivel de fertilidad. Cuando se are la pastura, una gran proporción de los nutrientes será liberada en el primer año, pero el efecto residual puede durar por varios años. La cantidad de nitrógeno aportado al suelo a través de la fijación biológica (FBN) depende de una serie de factores, entre ellos: la especie de leguminosa, las condiciones de crecimiento, el suelo, el clima y la cepa bacteriana. De todos modos, y como promedio general, se estima que especies como la alfalfa y el trébol blanco pueden fijar un rango que va de 50 a 460 y de 74 a 280 kg N ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup>, respectivamente (Frame y Newbold, 1984; Vance *et al.*, 1988). En Argentina, Racca *et al.* (1998) estimaron en alfalfa una fijación del orden

de 124 (zona pampeana semiárida) a 596 (zona pampeana húmeda) kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, lo que representó entre 48 y 72 % del N total del forraje. No obstante, en otro estudio, López *et al.* (1997) estimaron que cuando el cultivo soportó un ciclo de sequía de 150 días, la FBN solo proveyó 26 % del N total del forraje. El N aportado por la FBN es la forma más económica de reducir los costos de fertilización, en comparación con el uso de pasturas de gramíneas fertilizadas con N (Gordon, 1980). Una proporción variable de esta cantidad de N quedará disponible para ser utilizado por los cultivos que siguen en la rotación agrícola, con el consecuente aumento del rendimiento de grano (Rixon, 1972).

Por una parte, con respecto a la producción animal, a igual digestibilidad del forraje, el consumo de materia seca es mayor en leguminosas que en gramíneas (Freer, 1981), lo que se refleja en mayores ganancias de peso y producción de leche, tanto en pasturas templadas (Thomson, 1984; Thomson, 1979) como en tropicales (ver Lascano, 2000). Por otra parte, aun con el avance de la madurez, las leguminosas mantienen un alto valor nutritivo, en especial en las hojas, que es a su vez el material seleccionado por los animales en pastoreo (Ulyatt, 1981; Frasinelli *et al.*, 1994). En general, las leguminosas son más ricas que las gramíneas en minerales bivalentes (por ej. Ca y Mg) y en elementos menores (por ej. Cu, Zn o Mn), lo cual puede incidir positivamente en la alimentación de los animales (Peeters, 2004).

Hasta ahora quedaron planteadas algunas ventajas de sembrar una mezcla gramínea-leguminosa respecto de la siembra de especies puras tales como mayor rendimiento de materia seca y mayor producción animal. Otras ventajas que generalmente se esgrimen para justificarlas son una mejor distribución de la producción de forraje dentro y entre años y una menor invasión de malezas. No obstante, también se pueden hacer algunas consideraciones sobre las desventajas, entre las que se cuentan un manejo de la defoliación más difícil que, por ende, complica el mantenimiento del balance entre los componentes de la mezcla; el riesgo de timpanismo o empaste, en comparación con una gramínea pura, en el caso de usar alfalfa, trébol rojo o trébol blanco; el desbalance en la relación energía-proteína en el rumen; los cambios en la calidad debido a la interacción entre el valor nutritivo, la fenología de las especies y la contribución relativa de ellas; la mayor dificultad en lograr

reservas de alta calidad (Cangiano, 2002b); y la pérdida de valor en la conversión a producto animal o venta (George *et al.*, 2000).

En Argentina, una alta proporción de la superficie con alfalfa se siembra en mezcla con gramíneas perennes tales como festuca (*Festuca arundinacea* Schreber), cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.), pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.), agropiro alargado [*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey) ex *Agropyron elongatum* (Host) P. Beauv.] y pasto llorón [*Eragrostis curvula* (Schrader) Nees]. Estas combinaciones, que pueden ser de una complejidad variable, por lo general incluyen dos o más gramíneas. A pesar de su difusión, la experimentación con mezclas en el ámbito nacional ha sido relativamente escasa (Romero *et al.*, 1995). Santini *et al.* (1975), en un ensayo de siembra otoñal conducido durante un año, observaron que la mezcla alfalfa + festuca presentó la menor acumulación de MS a lo largo del ciclo de producción, mientras que las mezclas más complejas (festuca + otras gramíneas sin especificar + trébol blanco + alfalfa), si bien exhibieron un bache estival, produjeron mayor acumulación de forraje en el otoño-invierno que la alfalfa pura. En ese sentido, está muy difundido el concepto de que una mezcla compleja ofrecería una situación ideal porque, al incluir especies que se adaptarían a una amplia gama de condiciones ambientales (clima, suelo, plagas, enfermedades, etc.), daría el máximo rendimiento posible durante toda la estación de crecimiento. Sin embargo, la realidad muestra que esto no suele suceder, ya que muchas especies pueden ser eliminadas durante las primeras etapas del establecimiento de la pastura, lográndose finalmente una población de plantas adaptadas, pero menos densa y no necesariamente de mayor rendimiento o calidad. Escuder y Cangiano (1975) encontraron que las mezclas complejas no superaron en rendimiento a las mezclas más simples. En comparación con la alfalfa pura, Chamblee y Collins (1988) midieron 10-15 % de incremento en el rendimiento de las mezclas con gramíneas. Bruno *et al.* (1988), comparando la producción de forraje de alfalfa pura y de mezclas bifíticas (alfalfa con festuca, pasto ovillo o cebadilla criolla), concluyeron que si bien no hubo diferencias en el rendimiento total de materia seca  $\text{ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ , las mezclas aportaron en promedio más forraje que la alfalfa pura en el período otoño-invierno (33 vs. 19 %, respectivamente). En otros casos, las gramíneas no se adaptan a la competencia de la alfalfa y al manejo de la defoliación basada



en esta y, por ende, su contribución al rendimiento de la pastura es bajo (Larrosa y Castaño, 1998). En Balcarce (Bs. As.), Cangiano (2002b) no obtuvo diferencias en la producción total de forraje entre alfalfa pura y su mezcla con festuca o con raigrás perenne (*Lolium perenne* L.). En las mezclas, la producción promedio del raigrás y la festuca fue 35 % y 40 % del total, respectivamente, y fue obtenida en su mayoría en los primeros cortes de primavera; desde enero en adelante, la contribución de las gramíneas fue prácticamente nula (Figura 31). La mayor contribución al rendimiento por parte de la alfalfa también se observó en la distribución estacional de forraje en la mezcla con pasto ovillo (Figura 32).

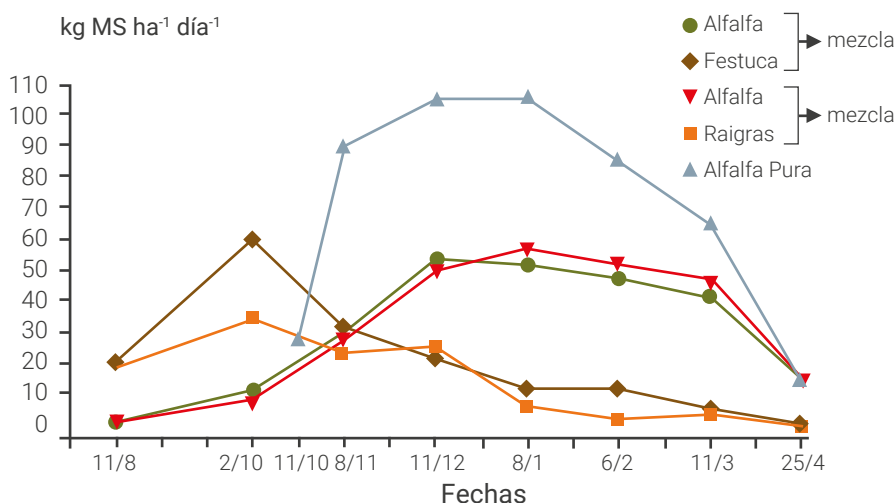
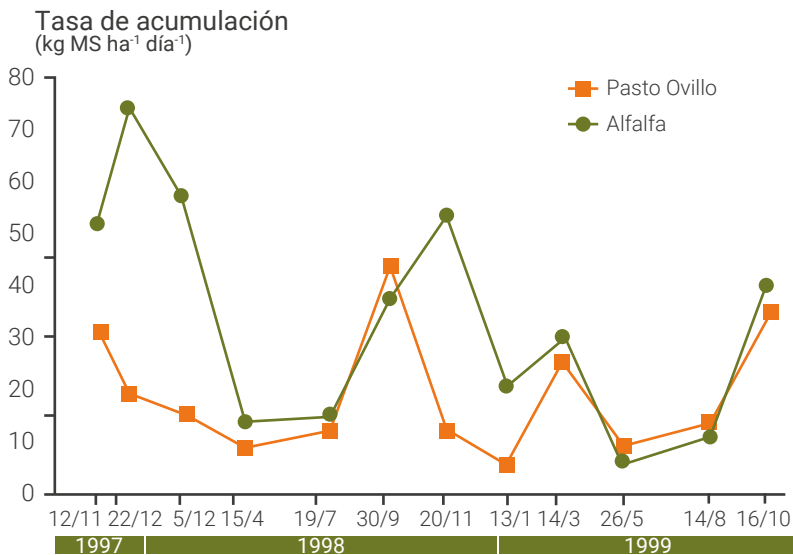


Figura 31. Tasa de acumulación de forraje (kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) en alfalfa pura y en mezclas de alfalfa con festuca o raigrás perenne a lo largo del año en Balcarce (Bs. As.). Tomado de Cangiano (2002b).

A pesar del relativamente bajo aporte que las gramíneas puedan ofrecer en los primeros años de vida de una pastura, su contribución aumenta generalmente a través del tiempo, a medida que se acentúa la pérdida de plantas de alfalfa. La composición botánica de las mezclas también depende del manejo de la defoliación y puede variar tanto dentro como entre años. En general, las mezclas con alfalfa son inestables en su composición botánica, convirtiéndose con el tiempo en poblaciones gramínea-dominantes o alfalfa-dominantes (Douglas, 1986). La bibliografía también es contradictoria en cuanto a los rendimientos de forraje

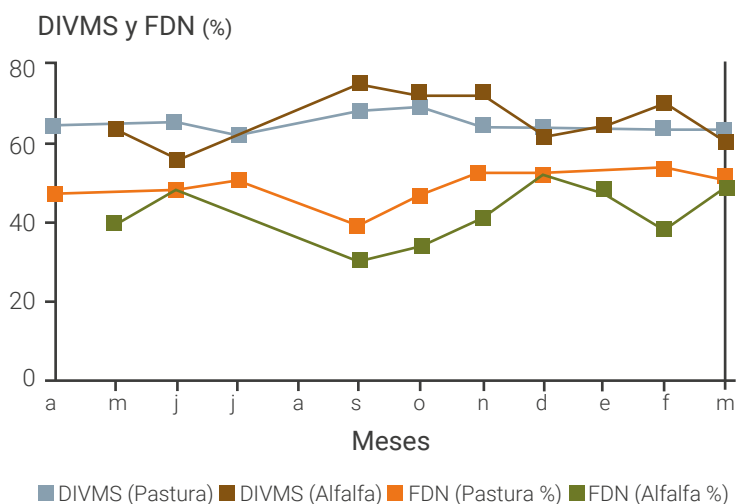
de las asociaciones, lo que posiblemente se relacione con la inestabilidad botánica antes mencionada. En estos casos, el manejo puede jugar un papel muy importante en el mantenimiento de un adecuado balance gramíneas-alfalfa, dado que una frecuencia de defoliación que se adecue a la alfalfa probablemente tenga efectos perjudiciales para las gramíneas y viceversa (Janson, 1975). Un factor asociado a la competencia entre la alfalfa y la gramínea es el efecto que puede tener la calidad de la luz que llega a la base de la pastura. Cuando el canopeo es muy denso el desarrollo de las yemas basales de la alfalfa puede ser inhibido por una baja relación de la radiación rojo:rojo lejano en la base de la pastura. Por lo tanto, la gramínea debería ser adecuadamente defoliada durante la primavera –época en la que probablemente ocupe mayor espacio en el canopeo– a fin de favorecer un mejor crecimiento de las yemas de la corona de la alfalfa.



■ **Figura 32.** Distribución estacional de la producción forraje de alfalfa y de pasto ovillo en una mezcla a lo largo de tres temporadas. Tomado de Cangiano (2002b).

Otro aspecto que se debe considerar cuando se siembra una pastura de gramíneas y leguminosas es la calidad forrajera. En general, como consecuencia de los cambios fenológicos que las distintas especies experimentan a través del tiempo, la calidad de las mezclas suele ser inferior a la del cultivo de alfalfa puro. En la Figura 33 se representa la

evolución a lo largo del año de la digestibilidad y del contenido de fibra de una alfalfa pura y de una pastura polifítica que incluye raigrás perenne, pasto ovillo, cebadilla y trébol rojo (*Trifolium pratense* L.). Se aprecia que la calidad de la alfalfa pura supera prácticamente en todo momento a la de la pastura mezcla, con promedios anuales de digestibilidad de 67 % y 65 % y de contenido de FDN de 40 % y 48 %, respectivamente. Algo similar sucedió con el contenido de proteína bruta cuyos promedios anuales para la alfalfa y la pastura mezcla fueron de 21 % y 17 %, respectivamente.



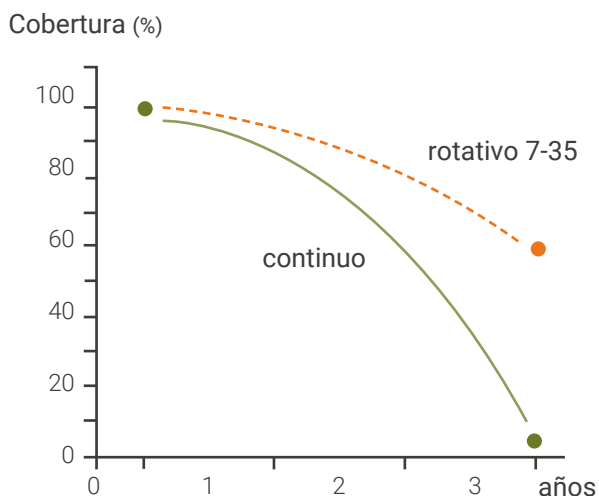
**Figura 33.** Evolución de la digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) y del contenido de fibra detergente neutro (FDN) en pasturas de alfalfa pura y de una mezcla polifítica en Balcarce.

## Manejo del pastoreo

Durante gran parte del año el uso de la alfalfa en el país complementa el pastoreo con cortes para heno. En ese contexto es común plantear el interrogante sobre el daño que puede causar a la longevidad de las plantas el animal en pastoreo. Delgado Enguita (1989) concluyó que con un manejo adecuado no hubo diferencias de producción de materia seca y persistencia entre pastoreo y corte mecánico. En sentido similar, numerosos trabajos han demostrado que la alfalfa utilizada bajo pastoreo

debe ser manejada con esquemas similares a los recomendados para corte. Pastoreos muy frecuentes o de rotación corta, cuyo caso extremo sería la combinación del pastoreo continuo con alta carga animal, producen un marcado deterioro de la producción y la persistencia de las plantas (Figura 34). En contraposición, el uso del pastoreo rotativo con adecuada frecuencia de defoliación aparece como el sistema de manejo más adecuado para la alfalfa.

La extensión del período de descanso a 35-42 días está avalada por numerosos trabajos nacionales (Bariggi y Romero, 1986; Romero, 1988; Romero *et al.*, 1995) y extranjeros (Douglas, 1986; Gramshaw *et al.*, 1993). Sin embargo, esos valores deberían modificarse durante períodos de sequía o de muy activo crecimiento con pérdida de valor nutritivo del forraje, aunque teniendo siempre especial cuidado de no pastorear los nuevos rebrotes desde corona.



■ **Figura 34.** Evolución de la cobertura de suelo en una pastura de alfalfa manejada bajo pastoreo rotativo (7 días pastoreo x 35 días de descanso) y bajo pastoreo continuo. Tomado de Bariggi y Romero (1986).

La duración del período de pastoreo es un aspecto algo más controvertido que la del período de descanso, ya que existe un desfase entre el pastoreo del canopeo y el crecimiento de los nuevos rebrotes basales. Un período prolongado de pastoreo, de acuerdo al grado de madurez y

a la velocidad de crecimiento de los rebrotes basales de un cultivar, puede disminuir la supervivencia de las plantas por el consumo de estos rebrotes. En consecuencia, el largo de ese período está influenciado por las condiciones ambientales, el estado fisiológico de las plantas y el tipo de cultivar. En el país se han realizado algunos trabajos para evaluar el efecto de la duración del pastoreo sobre la persistencia de distintos cultivares. Cagnaz (1988), en Marcos Juárez (Córdoba), y Zaniboni (1990), en General Villegas (Bs. As.), compararon el efecto de períodos de pastoreo de 2, 6, 12 y 18 días, con un período de descanso de 36 días, sobre la persistencia de los cultivares CUF 101, WL 318, Kanza y Painé INTA. Ambos trabajos concluyeron que un pastoreo de 6 días resultó ser el más apropiado para todos los cultivares. Dentro de estos últimos, los de menor reposo invernal (CUF 101 y WL 514) presentaron menor persistencia que los de mayor reposo (Painé INTA) bajo cualquier duración del pastoreo; por su parte, los de mayor reposo fueron prácticamente insensibles a duraciones de pastoreo de 6 a 18 días. En ambos trabajos, la menor persistencia que se observó en todos los cultivares con el uso de períodos muy cortos de pastoreo (2-3 días) es de difícil explicación. No obstante, por un lado, Douglas (1986) cita trabajos de Nueva Zelanda y Australia en los que se señala que el efecto negativo de malezas o de especies menos palatables sobre pasturas de alfalfa fue mayor en períodos pastoreo cortos (3-4 días). Por otro lado, Lodge (1991) indica que, mientras los períodos de descanso sean de al menos 35 días, una duración del pastoreo relativamente prolongada (10 días) no afectaría la productividad y la persistencia de la alfalfa ni la producción animal.

De todo lo anterior se infiere que la respuesta de los cultivares a los períodos de descanso y de pastoreo puede ser diferente, y que hay algunos cultivares de mayor reposo invernal que se adaptan mejor a manejos deficientes o menos intensivos. No obstante, para la mayoría de las situaciones, es razonable asumir que el período de descanso debe ser lo suficientemente largo como para que se recupere el nivel de reservas y se acumule una alta producción de forraje, aunque sin que se alcance un estado muy avanzado de madurez que sacrifique excesivamente la calidad forrajera. Obviamente, la longitud del período de descanso estará determinada principalmente por la tasa de acumulación de materia seca que tenga la pastura. Si esta última es rápida, como sucede en

primavera-verano bajo condiciones de buena humedad edáfica, el período de descanso será relativamente corto (30 días); por el contrario, si las condiciones ambientales determinan que la tasa de acumulación sea baja o variable, el período de recuperación será más largo.

Por lo expuesto, en el manejo de un pastoreo rotativo se deben tener en cuenta, además de la carga animal, el número de subdivisiones y la duración de los períodos de pastoreo y de descanso. La combinación de distintos valores de estos parámetros (Tabla 7), que definen la longitud del ciclo de pastoreo, genera diferentes alternativas de manejo del pastoreo rotativo para cada región, estación de crecimiento y cultivar. Del análisis de la Tabla 7 se aprecia la inconveniencia de usar más de 6-8 subdivisiones, dado el escaso efecto en los períodos de pastoreo y de descanso –con su consiguiente impacto sobre la producción animal– y el creciente grado de complejidad en infraestructura que implica un mayor número de subdivisiones.

■ **Tabla 7.** Relación entre número de subdivisiones y longitudes de períodos de pastoreo y de descanso para un ciclo de pastoreo rotativo de 40 días. Adaptado de Bransby y MacLaurin (2000).

N.º de subdivisiones	2	4	6	8	10	12	14	16
Longitud del período de pastoreo (días)	20	10	6,7	5	4	3,3	2,9	2,5
Longitud del período de descanso	20	30	33,3	35	36	36,7	37,1	37,5

En relación con el desarrollo de variedades con mayor adaptación al pastoreo, Smith *et al.* (1979) propusieron la selección de genotipos persistentes bajo condiciones de pastoreo continuo. Luego de dos ciclos de selección bajo estas condiciones obtuvieron el cv Alfagraze, que en un ensayo de evaluación en pastoreo continuo conducido por tres temporadas se comportó significativamente mejor que los cultivares Spreador y Travois (tipo pastoreo) y Florida 77 y Apollo (tipo corte). Esta línea de trabajo no solo abre un campo promisorio para la evaluación de germoplasma de alfalfa, sino que también demuestra que se pueden lograr cultivares adaptados a pastoreos más frecuentes que ofrezcan altos niveles de productividad de forraje y persistencia.

## Estructura de la pastura y comportamiento ingestivo

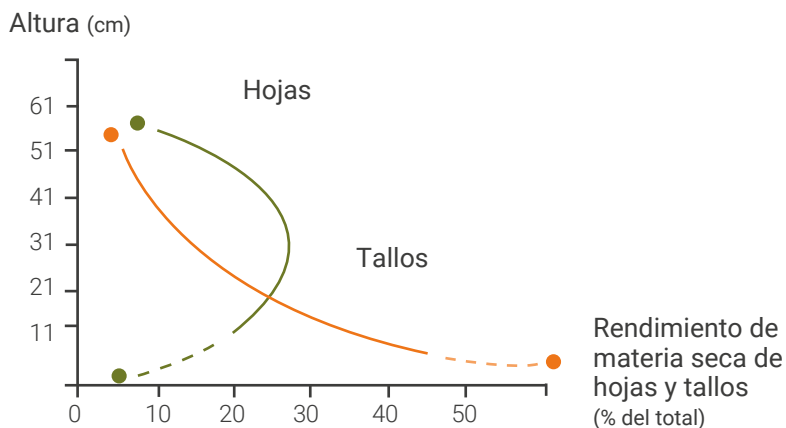
La estructura del canopeo se puede describir a través de la cantidad de forraje ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), del grado de cobertura (%), de la altura (cm) y de la densidad de forraje contenida en esa altura ( $\text{kg ha}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Un cambio en alguna de estas variables, aun cuando las otras queden constantes, puede producir modificaciones en la profundidad y en el área de bocado y, en consecuencia, afectar el peso de bocado y el consumo del animal. Otra complejidad adicional es la variación de calidad que las pasturas tienen tanto en sentido horizontal como vertical, lo que hace que el animal vaya generando distintas situaciones en función de lo que consume a lo largo del pastoreo. Quizás sea por ello que, a pesar de haberse encontrado en muchos trabajos una sólida relación entre características de la pastura (por ej.: cantidad o altura) y consumo animal, la información generada resulte insuficiente o contradictoria como para establecer una predicción general del consumo en condiciones de pastoreo. Si bien el consumo está afectado por muchos factores de la planta, del animal y del ambiente, se tratarán a continuación en forma muy somera algunas características de la cosecha del forraje por parte de bovinos en pastoreo, enfatizando ciertas particularidades de la alfalfa.

### *La planta*

Como ya fuera mencionado, a medida que la planta de alfalfa avanza en sus estados de madurez, desde rebrote a floración, va modificando no solo su forma de acumular forraje, sino también su digestibilidad y su composición química. Entre otros parámetros, la digestibilidad (DIVMS) y el contenido de proteína bruta (PB) varían en función de la distribución vertical de la materia seca presente en las hojas (h) y los tallos (t). En una planta de alfalfa próxima a floración el peso de sus hojas está concentrado en la parte media y disminuye hacia los extremos superior e inferior (de manera similar a lo señalado en la Figura 2 para el IAF), mientras que el peso de tallos aumenta gradualmente hacia la parte inferior (Figura 35).

Hacia la parte inferior de la planta no solo disminuyen la DIVMS y el contenido de PB de los tallos, sino también la relación hoja/tallo (h/t). No

obstante, el valor nutritivo de las hojas se mantiene relativamente alto y constante a través de todo el perfil de la planta (Tabla 8 y Figura 36). En consecuencia, y de acuerdo con Fletcher (1976), la digestibilidad de la planta entera es influenciada directamente por la digestibilidad de los tallos y su variación a través del tiempo. Esto último, en consonancia con los cambios de morfología y calidad en los distintos estratos, adquiere una gran importancia en la utilización del forraje bajo pastoreo.



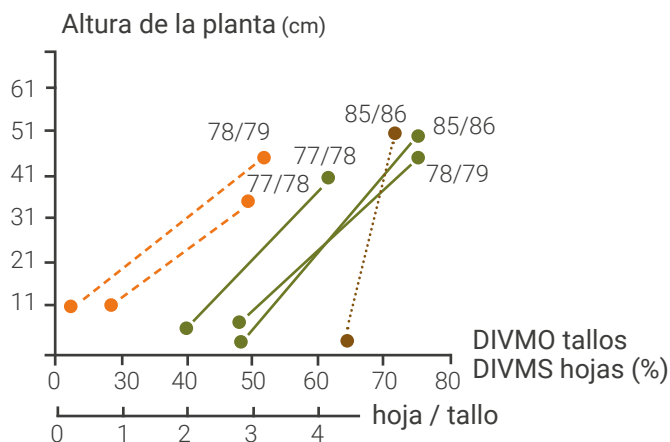
■ **Figura 35.** Distribución vertical del peso de hojas y tallos en una planta de alfalfa próxima a floración. Adaptado de Cangiano (1988).

**Tabla 8.** Digestibilidad in vitro de materia verde (DIVMS) y contenido de proteína bruta (PB) en hojas y tallos de alfalfa separados por estratos de 10 cm de altura. Adaptado de Frasinelli (1994).

Estratos (cm)	Hoja verde		Tallo verde	
	DIVMS (%)	PB (%)	DIVMS (%)	PB (%)
Más de 30	73	28,5	70	16
20 a 30	70,7	28,5	62,5	13
10 a 20	67	30	55,5	11

La digestibilidad de los tallos es muy variable tanto dentro como entre años, pudiendo llegar en verano a valores inferiores al 40 % (Briske, 1991). Según Vough y Marten (1971), esto último se relaciona directamente con las altas temperaturas y el aceleramiento de la madurez que se producen en esa estación.





■ **Figura 36.** Evolución de la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) de tallos (verde), de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de hojas (marrón) y de la relación hoja/tallo (naranja) en diferentes estratos de la planta de alfalfa. Tomado de Cangiano (1992).

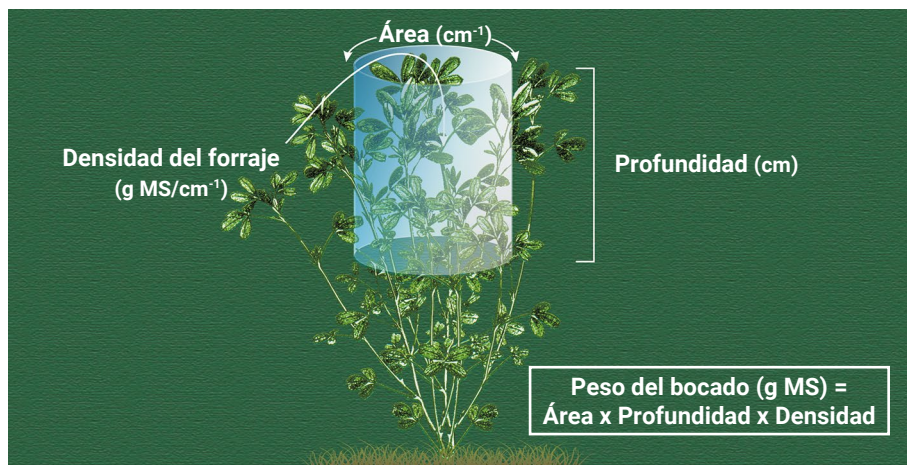
### El bocado animal

El bocado representa la unidad a partir de la cual el animal integra su consumo y produce el impacto de la defoliación a la planta. El bovino cosecha el forraje ofrecido en función de la profundidad y del área de bocado, definiendo el peso de este según la densidad del forraje contenida en ese volumen (Figura 37). Aunque lo expresado en esta sección se refiere a los bovinos en pastoreo, los conceptos generales que se abordan son también de aplicación a otros rumiantes domésticos.

### El pastoreo

En los sistemas intensivos de producción, y asumiendo condiciones de pasturas relativamente homogéneas, se puede considerar que el animal pastorea por horizontes, definidos a su vez por la profundidad de bocado. Dicha profundidad no adquiere una altura fija –como la que normalmente se define para los muestreos de las plantas (ver Tabla 8)–, sino que varía de acuerdo a la altura de la pastura, alcanzando generalmente una proporción más o menos constante y cercana al 50 % de la altura del forraje al momento de aprehender el bocado e independientemente del peso del animal (Cangiano *et al.*, 2002). A modo de ejemplo, en la Figura 38 se observa que para una pastura de 4.500 kg MS ha<sup>-1</sup> y 30 cm de

altura, el bovino define un primer horizonte (H1) de 15,6 cm; al comerlo, deja 2.625 kg MS ha<sup>-1</sup> y una altura de 14,4 cm, y a partir de esto define un segundo horizonte (H2) en el cual dará un bocado de solo 7,6 cm; y así sucesivamente.



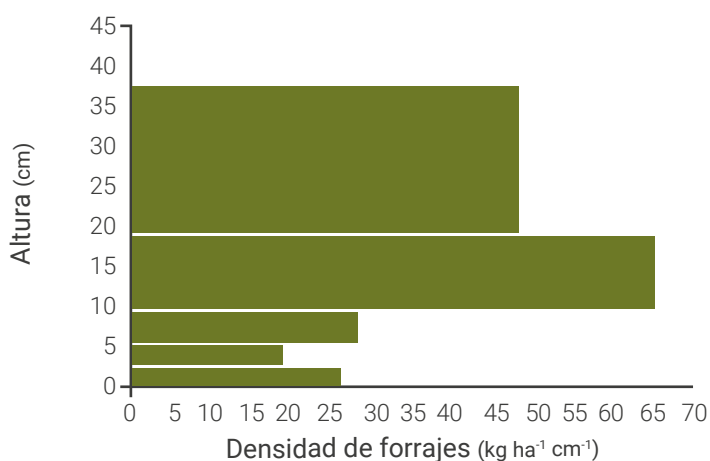
■ **Figura 37.** Dimensiones y peso del bocado de un bovino en pastoreo. Tomado de Cangiano (2002d).



■ **Figura 38.** Variación del volumen de bocado en cada horizonte de pastoreo (H) durante una defoliación de una pastura de alfalfa. Tomado de Cangiano (2002d).

Obviamente, cada vez que cambian los horizontes también varían el área de bocado y las otras variables de la pastura, como la fitomasa y la densidad. En consecuencia, dentro de un sistema de pastoreo rotativo,

a medida que el animal pastorea los horizontes más cercanos al suelo disminuye el peso del bocado, dadas la menor profundidad y la más reducida área de bocado. En alfalfa, esta disminución se ve acentuada porque en los horizontes basales también se reducen la densidad (Figura 39) y la calidad del forraje (Figura 40).



Intervalos de altura	Altura (cm)	Fitomasa (kg/ha)	Fitomasa acumulada (kg/ha)	% del total	% del remanente	Densidad (kg ha <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
19 a 38	19,00	921	1784	51,63	51,63	48,47
9,5 a 19	9,50	624	863	34,98	72,31	65,68
4,75 a 9,5	4,75	135	239	7,57	56,49	28,42
2 a 4,75	2,75	52	104	2,91	50,00	18,91
0 a 2	2,00	52	52	2,91	100,00	26,00

■ **Figura 39.** Variación vertical de la densidad de forraje por horizontes de pastoreo en alfalfa. Tomado de Cangiano (1999).

### *Pastoreo, consumo y producción animal*

A igualdad de digestibilidad del forraje el consumo de materia seca es mayor en las leguminosas que en las gramíneas (Freer, 1981), lo que desde el punto de vista de la producción animal se refleja en mayores ganancias de peso y más altas producciones de leche (Thomson, 1984; Thomson, 1979). Según Beever y Thorp (1996), ese comportamiento di-

ferencial estaría explicado por la mayor tasa de rotura de las partículas y la mayor tasa de digestión ruminal de las leguminosas. Además, aun con el avance de la madurez, las leguminosas son capaces de mantener un alto valor nutritivo, especialmente en las hojas, que es el material seleccionado por los animales en pastoreo (Ulyatt, 1981; Frasinelli *et al.*, 1994).

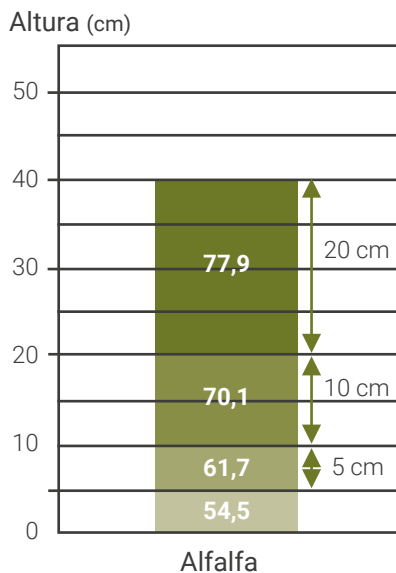


Figura 40. Variación vertical de la digestibilidad de alfalfa por horizontes de pastoreo. Tomado de Cangiano y Galli (1999).

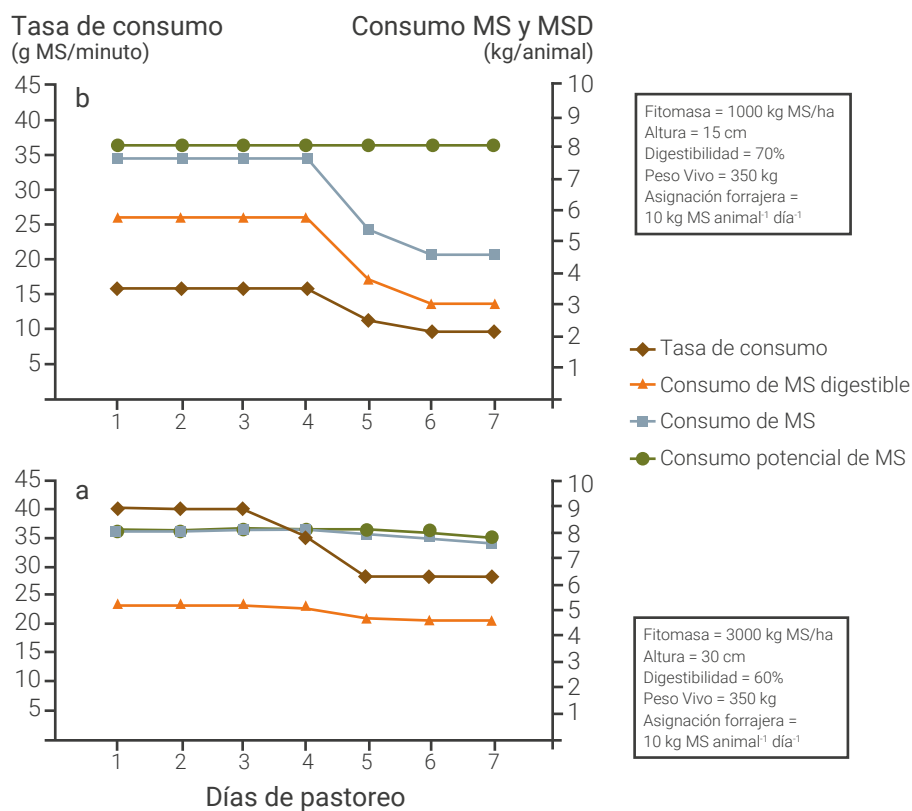
La comprensión del equilibrio existente entre los principales procesos que intervienen en el crecimiento y la utilización de las pasturas es básica para optimizar el manejo del pastoreo. Uno de los aspectos centrales es lograr un alto porcentaje de utilización del forraje presente a través del manejo de la presión de pastoreo. Si el forraje presente está compuesto por hojas de relativamente alta calidad y por tallos de menor valor nutritivo, el aumento de la presión de pastoreo provocará mayor eficiencia de cosecha, pero al precio de obligar a los animales a consumir una dieta con mayor porcentaje de tallos y, por ende, de menor calidad (Cangiano, 1992); en ese contexto, el consumo de forraje por parte de los animales se verá resentido (Frasinelli, 1994). A su vez, la respuesta de los animales frente a una menor oferta de forraje, que además tiene menor proporción de hojas, será la de aumentar el tiempo de pastoreo y la tasa de bocado a lo largo del día, pero disminuyendo el peso del bocado y, en consecuencia, el consumo diario (Freer, 1981). El resultado final de

esta concatenación de hechos será la disminución de la ganancia diaria de peso o de la producción de leche diaria. Esta situación no es solo privativa de la alfalfa, sino que también fue señalada por Chacon y Stobbs (1976) y por Hodgson (1982) para otras especies forrajeras. Cangiano *et al.* (2002) generaron diferentes situaciones en pasturas de alfalfa y de trigo a través de la combinación de igualdad de fitomasa y de altura con distinta distribución de materia seca de hojas y de tallos por horizontes, obteniendo diferentes pesos de bocado y tasas de consumo. En este estudio, cuando a comienzos de la defoliación se pastorearon los horizontes superiores, la alfalfa produjo los mejores resultados de producción animal; no obstante, cuando se pastorearon los horizontes más cercanos al suelo, se registró la situación inversa, con los mejores valores para el trigo. Todo ello demuestra el dinamismo con que se rigen las relaciones entre la planta y el animal, tanto durante las primeras horas de un pastoreo en franjas diarias como en los primeros días de un pastoreo de más duración (Cangiano, 1992; Romero *et al.*, 1995).

A medida que se profundiza el pastoreo de la alfalfa, el animal debe enfrentar condiciones más dificultosas para cosechar una dieta que presenta menor proporción de hojas y más bajo contenido de energía, lo que afecta negativamente el consumo y la producción animal. En un pastoreo rotativo, la asignación de forraje (AF) por animal y por día es, quizás, la variable de manejo de mayor importancia; sin embargo, no se puede definir un único valor de AF que se aplique a todas las condiciones de pastura y de requerimientos de los animales. A continuación, y a modo de ejemplo, se presentan en la Figura 41 dos casos de simulación generados con el programa ConPast 3.0 (Galli *et al.*, 1999), donde en un pastoreo rotativo de 7 días de duración se aprecia cómo varía el consumo a través de distintas condiciones de la pastura, pero dejando constante la AF animal<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. Si bien se observa la disminución de la tasa de consumo y del consumo diario de materia seca digestible a medida que transcurren los días de pastoreo y se van agotando los horizontes superiores, en uno de los casos los novillos prácticamente cubren su consumo potencial hasta el último día (Figura 41a), mientras que en el otro solo pueden hacerlo durante los primeros días, aun cuando la digestibilidad de la pastura fuese mayor (Figura 41b).

De lo anterior se infiere que, cuando se utiliza el pastoreo rotativo para la producción de carne o leche, los animales deberían pasar más rápida-

mente a otros potreros o franjas a fin de no afectar el nivel de ganancia individual o productividad vaca<sup>-1</sup>. Esto implica dejar un remanente de forraje relativamente alto, lo que dificulta la utilización posterior de la pastura por la presencia de un cultivo heterogéneo, con mezcla de material viejo (principalmente tallos) y nuevos rebrotes, que generalmente obligue a un emparejamiento a través de un corte u otras medidas similares. En ese contexto, un sistema de manejo más controlado, como el pastoreo con líderes y seguidores, que considere los distintos requerimientos de los animales, aparece como de mayor flexibilidad. De ese modo, se conseguiría mantener –o ligeramente incrementar– la producción ha<sup>-1</sup> (Blaser, 1982; Crosse y Fitzgerald, 1988).



■ **Figura 41.** Simulación de la tasa de consumo y consumo diario de forraje de novillos en pastoreo rotativo con dos condiciones de alfalfa: a) alta productividad, pero baja digestibilidad; y b) baja productividad, pero alta digestibilidad. En ambos casos el peso vivo de los animales y la asignación de forraje se asumieron constantes. Tomado de Cangiano (2002d).

## Consideraciones finales

A lo largo de este capítulo se han desarrollado conceptos que explican la influencia de los factores ambientales y del manejo en la tasa de acumulación de forraje de alfalfa. También se trató la dinámica con la que la especie acumula y utiliza sus sustancias de reserva, las implicancias del manejo de la defoliación y de cultivares con distinto grado de reposo, el mantenimiento del equilibrio en mezclas con gramíneas y algunos aspectos relacionados con la utilización del forraje y comportamiento ingestivo en pastoreo. El objetivo final es proponer pautas de manejo que, integrando todo lo anterior, lleven a una defoliación racional de la pastura, armonizando producción, calidad y persistencia. Uniendo a toda esa información las propias experiencias y el uso de programas de computación *ad hoc* que estuvieren disponibles, se espera propiciar la toma de decisiones de manejo sobre bases sólidas, realizando así una utilización eficiente de la alfalfa.

Valga el comentario de que sobre cada uno de los temas tratados se han escrito libros enteros y que la lectura de un libro, por vasto que sea su alcance, no ha convertido nunca a un lector en un especialista. Ahora, es tarea del lector reflexionar sobre lo que lee, tratando de que le sirva como una guía e incentivo para profundizar y aplicar sus conocimientos para un manejo de la alfalfa más eficiente. Para aquellos interesados, pero que empezaron por el final y quieren hacer solo una lectura rápida del contenido del capítulo, se resumen a continuación algunos de los aspectos sobresalientes.

La alfalfa es una especie forrajera que se utiliza para pastoreo y para confección de heno. Como tal, se encuentra sujeta a reiterados ciclos de defoliación y crecimiento. A nivel de la planta, la defoliación produce severas disminuciones de la capacidad fotosintética, del crecimiento y de la respiración de la raíz, de la absorción y asimilación de nitrógeno por las raíces y de la fijación biológica de nitrógeno.

La frecuencia de defoliación es la variable de manejo más importante. Tiene un alto impacto sobre el tamaño de planta (corona y raíces) y sobre la acumulación y movilización de las reservas orgánicas en raíces. La acumulación de biomasa aérea estaría más correlacionada con



las cantidades de reservas ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) que con las concentraciones ( $\text{mg peso seco raíz}^{-1}$ ) de carbono y nitrógeno. El nitrógeno (proteínas solubles y aminoácidos) es lo que mejor explica la variación de la acumulación de biomasa. El crecimiento de forraje luego de una defoliación depende de la utilización del nitrógeno adquirido antes de la defoliación y almacenado principalmente en raíz, porque las dos fuentes de N que aportan al crecimiento, fijación y absorción de N, se ven reducidas.

El menor rendimiento debido a una alta frecuencia de defoliación es explicado por una caída en los componentes tallos por  $\text{m}^2$ , peso de tallo y altura de los tallos. Esta reducción en los componentes podría ser debido a una disminución de energía capturada por fotosíntesis y a una disminución de las reservas orgánicas en raíces, principalmente de reservas nitrogenadas. La disminución de las reservas tendría un efecto negativo en la eficiencia de uso de la radiación de la planta por una declinación de la capacidad fotosintética de las hojas en los primeros días de rebrote, junto con una reducción en la tasa de expansión foliar disminuyendo el rendimiento.

Los principales determinantes de la cantidad de alfalfa disponible en un momento determinado son la estación del año y longitud del período de rebrote. La alfalfa es apta para cubrir principalmente los déficits de forraje durante primavera-verano y presenta una fase lineal de acumulación de materia seca que puede prolongarse, en estas épocas, tanto como 35 días, pudiendo llegar a tasas diarias de crecimiento superiores a  $100\text{-}150 \text{ kg ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$ . No obstante, estas tasas son muy variables dentro y entre años, en especial debido a las condiciones de lluvias imperantes. Debido a la prolongada fase lineal de acumulación y para maximizar el rendimiento, es conveniente respetar 30 días o más entre una defoliación y otra en primavera-verano. A medida que las temperaturas descienden en otoño, ese período se hace mayor.

Una alta frecuencia de defoliación trae aparejado menores rendimientos, mayor invasión de malezas, pérdida de vigor de las plantas y menor persistencia. En el largo plazo, frecuencias de defoliación cada 25 días o menos disminuyen significativamente el rendimiento de cultivares sin reposo (GRI 8-10), principalmente explicado por el efecto negativo sobre su persistencia.



A medida que el rebrote envejece aumenta el peso de los tallos y no de las hojas, que son las de mayor valor nutritivo. Cortados a una misma frecuencia, los cultivares sin reposo tienen un mayor estado de madurez y por ende menor calidad que los con reposo.

La finalidad del productor es maximizar tanto el rendimiento como la calidad, sin afectar la persistencia. Sin embargo, dada la incuestionable relación inversa entre rendimiento y calidad esto es difícil de lograr en la práctica.

Existen regiones cuyas condiciones ambientales permitan sembrar cultivares de distintos grados de reposo invernal. Esto debería verse como una ventaja, ya que de hacerlo se lograría una mayor flexibilidad de manejo del pastoreo y en la confección de reservas de forraje, a la par que el productor puede ir ganando en experiencia sobre aspectos del manejo de estos cultivares con distinto ciclo de crecimiento y producción a lo largo del año.

En el caso de mezclas con gramíneas, mantener el balance entre las especies es difícil. Por un lado, las gramíneas se ven afectadas cuando en primavera-verano son defoliadas al ritmo del crecimiento de la alfalfa; pero, por otro, si los cortes o pastoreos son muy espaciados, en especial en otoño, las gramíneas pueden afectar el rebrote de la alfalfa por sombreo y disminuir la calidad de la pastura.

La alfalfa es un forraje muy nutritivo y su potencial puede ser maximizado usando pastoreo rotativo. El pastoreo en primavera y otoño se hace necesario para utilizar el forraje cuando las condiciones climáticas impiden la confección de heno.

En ganadería es muy conocido el conflicto existente entre el mantenimiento de altos niveles de producción individual y de altos niveles de producción por superficie. Esta incompatibilidad debe ser manejada por el productor a través de la carga animal, la calidad y la asignación de forraje y la estructura del canopeo ofrecido. Todos estos factores interaccionan en forma dinámica, de modo tal que es muy difícil aceptar una única variable o relación que explique por sí sola el consumo y la producción animal en condiciones de pastoreo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABDELHADI, L.O.; C.A. CANGIANO. 2002. *Capítulo 12. Suplementación en pastoreo*. En: CANGIANO, C.A. (ed.). *Manual de Alfalfa*. CD-ROM INTA EEA Balcarce. 247-255 pp.
- ALBRECHT, K.A.; W.F. WEDIN; D.R. BUXTON. 1987. *Cell-wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves*. *Crop Science* 27:735-741.
- AL-HAMDANI, S.; G.W. TODD. 1990. *Effect of temperature regimes on photosynthesis, respiration and growth in alfalfa*. *Proc. Oklahoma Academy Science* 70:1-4.
- AVICE, J.C.; A. OURRY; G. LEMAIRE; J. BOUCAUD. 1996a. *Nitrogen and carbon flows estimated by <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C pulse-chase labeling during regrowth of alfalfa*. *Plant Physiol.* 112:281-290.
- AVICE, J.C.; A. OURRY; J.J. VOLENEC; G. LEMAIRE; J. BOUCAUD. 1996b. *Defoliation-induced changes in abundance and immuno-localization of vegetative storage proteins in taproots of Medicago sativa*. *Plant. Physiol. Biochem.* 34 (4):561-570.
- AVICE, J.C.; G. LEMAIRE; A. OURRY; J. BOUCAUD. 1997a. *Effects of the previous shoot removal frequency on subsequent shoot regrowth in two Medicago sativa L. cultivars*. *Plant and Soil* 188:189-198.
- AVICE, J.C.; A. OURRY; G. LEMAIRE; J.J. VOLENEC; J. BOUCAUD. 1997b. *Root protein and vegetative storage protein are key organic nutrients for alfalfa shoot regrowth*. *Crop Sci.* 37 (4):1187-1193.
- BAARS, J.A.; J.A. DOUGLAS; T. KNIGHT; C.G. JANSON. 1990. *Growth rates and relationships between weather and growth rates for lucerne (Medicago sativa L.) in Canterbury and the Rotorua-Taupo region*. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 52:45-49.
- BACCARO, K. 2000. *Crecimiento comparativo de cultivares de alfalfa con diferente grado de latencia invernal durante un rebrote invierno-primaveral*. Tesis Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 22 p.
- BARBERA, P.; C.A. CANGIANO. 2011. *Capítulo 14. Suplementación en pastoreo*. En: CANGIANO, C.A.; M.A. BRIZUELA (eds.). *Producción Animal en Pastoreo*. 377-402 pp.
- BARBER, L.D.; B.C. JOERN; J.J. VOLENEC; S.M. CUNNINGHAM. 1996. *Supplemental nitrogen effects on alfalfa regrowth and nitrogen mobilization from roots*. *Crop Sci.* 36:1217-1223.
- BARIGGI, C.; R. HERNANDEZ; N. ROMERO; M. ZANELLI; A. CRAGNAZ; R. ROSSANIGO. 1979. *Efecto de la frecuencia de corte en primavera y otoño en la longevidad y productividad de la alfalfa en la Región Pampeana argentina*. Buenos Aires, INTA. Proyecto PNUD-FAO-INTA Arg. 75/006. Documento de Trabajo N.º 5, 83 p.
- BARIGGI, C.; N. ROMERO. 1986. *Capítulo V. Crecimiento de la alfalfa y utilización en la Región Pampeana*. En: C. BARIGGI, C.; C.D. ITRIA; V.L. MARBLE J.M. BRUN (ed.). *Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa*. Tomo XXII. Colección Científica. INTA, Buenos Aires. 119-159 pp.

- BEEVER, D.E.; C. THORP. 1996. *Advances in the understanding of factors influencing the nutritive value of legumes. Occasional Symposium N.º 30, British Grassland Society, CAB International. 194-207 pp.*
- BELANGER, G.; T. KUNELIUS; D. MCKENZIE; B. PAPADOPOULOS; B. THOMAS; K. MCRAE; S. FILLMORE; B. CHRISTIE. 1999. *Fall cutting management affects yield and persistence of alfalfa in Atlantic Canada. Can. J. Plant Sci. 79:57-63.*
- BERG, W.K.; S.M. CUNNINGHAM; S.M. BROUDER; B.C. JOERN; K.D. JOHNSON; J. SANTINI; J.J. VOLENEC. 2005. *Influence of phosphorus and potassium on alfalfa yield and yield components. Crop Sci. 45 (1):297-304.*
- BERG, W.K.; S.M. CUNNINGHAM; S.M. BROUDER; B.C. JOERN; K.D. JOHNSON; J. SANTINI, J.; J.J. VOLENEC. 2007. *The long-term impact of phosphorus and potassium fertilization on alfalfa yield and yield components. Crop Sci. 47:2198-2209.*
- BERGER, M.E.; R.S. LEON; H.F. FENOGLIO. 1986. *Cambios en la digestibilidad in vitro, proteína bruta y materia seca de dos cultivares de alfalfa (Medicago sativa L.) con el avance a madurez. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 6 (7-8):423.*
- BERGER, M.E.; R.S. LEON; H.F. FENOGLIO. 1985. *Cambios en la concentración de elementos minerales en alfalfa (Medicago saliva L.) con el avance a madurez. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 5 (3-4):149.*
- BERTIN, O.D. 1997. *La producción de forraje de alfalfa bajo riego en el norte de la provincia de Buenos Aires. Seminario de riego. INTA-EEA Balcarce. Mar del Plata, Bs. As. 79-85 pp.*
- BISHOP, H.C.; D. GRAMSHAW. 1977. *Effect of sowing rate, grass competition and cutting frequency on persistence and productivity of two Lucerne (Medicago sativa) cultivars at Biloela, Queensland. Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 17:105-111.*
- BOLGER, T.P.; D.W. MEYER. 1993. *Influence of plant density on alfalfa yield and quality. Proc. Forage and Grassland Conference, Eau Claire, WI. American Forage and Grassland Council, Lexington, Kentucky, EUA.*
- BOYCE, P.J.; J.J. VOLENEC. 1992. *Taproot carbohydrate concentrations and stress tolerance of contrasting alfalfa genotypes. Crop Sci. 32:757-761.*
- BLASER, R.E. 1982. *Integrated Pasture and Animal Management. Trop. Grassl. 16 (1):9.*
- BRANSBY, D.I.; A.R. MACLAURIN. 2000. *Designing animal production studies. En: MAN-NETJE, L.T.; R.M. JONES (ed.). Field and Laboratory Methods for Grassland and Animal Production Research. CAB International. 327-352 pp.*
- BRISKE D.D. 1991. *Chapter 4. Developmental morphology and physiology of grasses. En: HEITSCHMIDT, R.K.; J.W. STUTH (ed.). Grazing Management. An Ecological Perspective. Timber Press, Portland, Oregon, EUA. 85-108 pp.*
- BROWN, P.W.; C.B. TANNER. 1983. *Alfalfa stem and leaf growth during water stress. Agronomy J. 75:799-805.*

- BRUNO, O.A.; L.A. ROMERO; J.L. FOSSATI; O.R. QUAINO. 1988. *Evaluación de mezclas simples de alfalfa (Medicago sativa) y gramíneas bajo pastoreo*. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 8 (Sup. 1):92.
- BULA, R.J. 1972. *Morphological characteristics of alfalfa plants grown at several temperatures*. Crop Science 12:683-686.
- BULA, R.J.; D. SMITH. 1954. *Cold resistance and chemical composition in overwintering alfalfa, red clover and sweetclover*. Agronomy J. 46:397-401.
- BULLER, R.E.; J.B. PITNER; M. RARNIREZ. 1955. *Behavior of alfalfa varieties in the Valley of Mexico*. Agron. J. 47:510-512.
- CANGIANO, C.A. 1988. *Estructura y calidad del canopeo de alfalfa bajo dos frecuencias de corte*. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 8 (Sup. 1):86.
- CANGIANO, C.A. 1992. *Alfalfa-Factores que afectan su producción y utilización*. Boletín Técnico N.º 107, EEA Balcarce, INTA. 55 p.
- CANGIANO, C.A. 1997. *Capítulo 8. Métodos de medición de la fitomasa aérea*. En: CANGIANO, C.A. (ed.). *Producción Animal en Pastoreo*. EEA Balcarce, INTA. 117-128 pp.
- CANGIANO, C.A. 1999. *Evaluación de la pastura*. En: CANGIANO C.A. (ed.). *ConPast 3.0, Programa de computación para la estimación del consumo de bovinos en pastoreo*. EEA Balcarce, INTA. I- 137-165.
- CANGIANO, C.A. 2002a. *Capítulo 5. Manejo de la defoliación*. En: CANGIANO, C.A. (ed.). *Manual de Alfalfa*. CD-ROM. INTA EEA Balcarce, INTA. 81-108 pp.
- CANGIANO, C.A. 2002b. *Capítulo 7. Rendimiento de forraje de mezclas*. En: CANGIANO, C.A. (ed.). *Manual de Alfalfa*. CD-ROM. EEA Balcarce, INTA. 160-174 pp.
- CANGIANO, C.A. 2002c. *Capítulo 8. Planificación y evaluación forrajera*. En: CANGIANO, C.A. (ed.). *Manual de Alfalfa*. CD-ROM. EEA Balcarce, INTA. 175-200 pp.
- CANGIANO, C.A. 2002d. *Capítulo 10. Utilización bajo pastoreo*. En: CANGIANO, C.A. (ed.). *Manual de Alfalfa*. CD-ROM. EEA Balcarce, INTA. 216-229 pp.
- CANGIANO, C.A. 2012. *Inoculación y fijación biológica de nitrógeno en alfalfa*. *Visión Rural* 93:16-19.
- CANGIANO, C.A. 2017. *Comportamiento de la alfalfa según estaciones en el sudeste bonaerense. Crecimiento estacional y utilización de alfalfa*. *Producir XXI* N.º 305.
- CANGIANO, C.A.; J.R. GALLI. 1999. *Consumo y comportamiento ingestivo de bovinos en pastoreo*. En: CANGIANO, C.A. (ed.). *ConPast 3.0 Programa de computación para la estimación del consumo de bovinos en pastoreo*. EEA Balcarce, INTA. I-21-66.
- CANGIANO, C.A.; M.A. PECE. 2005. *Análisis de la acumulación de materia seca en rebrotes de alfalfa*. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol 25 (1-2):39-52.
- CANGIANO, C.A.; L. VENTRONI, L. 2014 *La productividad y la calidad de la alfalfa se ven afectadas por el manejo de la defoliación y por el genotipo*. *Visión Rural* 100:16-18.

- CANGIANO, C.A.; A.R. CASTILLO; J. GUERRERO; D. PUTNAM. 2008. *Chapter 18. Alfalfa Grazing Management. En: C.H. SUMMERS, C.H.; D.H. PUTNAM (eds.). Irrigated Alfalfa Management for Mediterranean and Desert Zones. University of California, Agriculture and Natural Resources. Publication 3512. 281-297 pp.*
- CANGIANO, C.A.; J.R. GALLI; M.A. PECE; L. DICHIO; S.H. ROZSYPALEK. 2002. *Effect of live weight and pasture height on cattle bite dimensions during progressive defoliation. Aust. J. Agric. Res. 53:541-549.*
- CARTER, P.R.; C.C. SHEAFFER. 1983. *Alfalfa response to soil water deficits. I. Growth, forage quality, yield, water use and water-use efficiency. Crop Science 23:669-675.*
- CHACON, E.; T.H. STOBBS. 1976. *Influence of progressive defoliation of a grass sward on the eating behaviour of cattle. Aust. J. Agric. Res. 27:709-727.*
- CHAMBLEE, D.S.; M. COLLINS. 1988. *Chapter 13. Relationships with other species. En: HANSON, A.A., D.K. BARNES; R.R. HILL, Jr. (ed.). Alfalfa and Alfalfa Improvement. Agronomy Monograph N.º 29, CSSA-ASSA-SSSA, Madison, WI. 439-461 pp.*
- CHAPMAN, D.F.; G. LEMAIRE. 1993. *Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation. Proc. of the 17th International Grassland Congress, Nueva Zelanda-Australia. 95-104 pp.*
- CHRISTIAN, K.R. 1977. *Effects of the environment on the growth of alfalfa. Adv. Agron. 29: 183-227.*
- COHEN, Y.; H. BIELORAI; A. DOVRAT. 1972. *Effect of timing of irrigation on total non-structural carbohydrates levels in roots and on seed yield of alfalfa (Medicago sativa L.). Crop Sci. 10: 61-63.*
- COWETT, E.R.; SPRAGUE, M.A. 1962. *Factors affecting tillering in alfalfa. Agron. J. 54:294-297.*
- CRAGNAZ, A. 1988. *Investigaciones y progresos en el manejo de la alfalfa. 1. Efecto del periodo de pastoreo y descanso sobre la productividad. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 8 (6):501.*
- CRALLE, H.T. 1983. *Photosynthate partitioning in alfalfa populations selected for high nitrogen fixation capability. Ph.D. thesis. Univ. of Minnesota, St. Paul. Diss. Abstr. DA 8329508.*
- CRALLE, H.T.; G.H. HEICHEL. 1985. *Interorgan photosynthate partitioning in alfalfa. Plant Physiol. 79:381-385.*
- CRALLE, H.T.; G.H. HEICHEL. 1986. *Photosynthate and dry matter partitioning in effectively and ineffectively nodulated alfalfa. Crop Sci. 26:117-121.*
- CROSSE, S.; S. FITZGERALD. 1988. *The effect of a leader/follower system of grazing management on the performance of spring calving dairy cows. Proc. 12th General Meeting of the European Grassland Federation. Dublin, Irlanda. 435 p.*
- CUNNINGHAM, S.M.; J.J. VOLENEC. 1998. *Seasonal carbohydrate and nitrogen metabolism in roots of contrasting alfalfa (Medicago sativa L.) cultivars. Plant Physiol. 153 (1-2):220-225.*

CUNNINGHAM, S.M.; J.A. GANA; J.J. VOLENEC; L.R. TEUBER. 2001. *Winter hardiness, root physiology, and gene expression in successive fall dormancy selections from Mesilla and CUF 101 alfalfa*. *Crop. Sci.* 41:1091-1098.

DELANEY, R.H., A.K. DOBRENZ; H.T. POOLE. 1974. *Seasonal variation in photosynthesis, respiration, and growth components of nondormant alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Crop Sci.* 14:58-61.

DELGADO ENGUITA, I. 1989. *Effects of sheep grazing on dry matter production and persistence of a lucerne crop*. *Proc. 16th International Grassland Congress*. Niza, Francia. 1033 p.

DELLA MAGGIORA, A.; L. ECHARTE; A. IRIGOYEN; N. MARTÍN; V. SADRAS. 1998. *Capítulo 1. Radiación*. En: SADRASadras, V. (ed.). *Agrometeorología, Parte 1*. Fac. Cs. Agrarias, Univ. Nac. de Mar del Plata. 1-10 pp.

DOBRENZ, A.K.; M.A. MASSENGALE. 1966. *Change in carbohydrates in alfalfa (Medicago sativa L.) roots during the period of floral initiation and seed development*. *Crop Sci.* 6:604-607.

DHONT, C.; Y. CASTONGUAY; P. NADEAU; G. BÉLANGER; F.P. CHALIFOUR. 2002. *Alfalfa root carbohydrates and regrowth potential in response to fall harvests*. *Crop Sci.* 42:754-765.

DHONT, C.; Y. CASTONGUAY; P. NADEAU; G. BÉLANGER; F.P. CHALIFOUR. 2003. *Alfalfa root nitrogen and regrowth potential in response to fall harvests*. *Crop Sci.* 43:181-194.

DOUGLAS, J.A. 1986. *The production and utilization of lucerne in New Zealand*. *Grass and Forage Sci.* 41:81-128.

DUKE, S.H.; D.C. DOEHLERT. 1981. *Root respiration, nodulation and enzyme activities in alfalfa during cold acclimation*. *Crop Sci.* 21:489-495.

DURAND, J.L.; G. LEMAIRE; G. GOSSE; M. CHARTIER. 1989. *Analyse de la conversion de l'énergie solaire en matière sèche par un peuplement de luzerne (Medicago sativa L.) soumis à un déficit hydrique*. *Agronomie* 9:599-607.

EDMISTEN, K.L.; D.D. WOLF. 1988. *Fall harvest management of alfalfa. II The implications of photosynthesis, respiration, and tap-root nonstructural carbohydrate accumulation on fall harvest management*. *Agron. J.* 80:693-698.

ESCALADA, J.A.; D. SMITH. 1972. *Changes in nonstructural carbohydrates fractions at intervals down the tap root bark and wood of alfalfa (Medicago sativa L.) during regrowth*. *Crop Sci.* 12:745-749.

ESCODER, C.J.; C.A. CANGIANO. 1995. *Evaluación de mezclas de gramíneas y leguminosas bajo pastoreo*. *Rev. Arg. de Prod. Anim.* Vol. 15 (1): 105-108.

EVANS, D.W.; R.N. PEADEN. 1984. *Seasonal forage growth rate and solar energy conversion of irrigated Vernal alfalfa*. *Crop Sci.* 24:981-984.

- FAIREY, D.T.; L.P. LEFKOVITCH; N.A. FAIREY. 1996. *The relationship between fall dormancy and germplasm source in North American alfalfa cultivars*. *Can. J. Plant Sci.* 76:429-433.
- FICK, G.W.; D.A. HOLT; D.G. LUGG. 1988. Chapter 5. *Environmental physiology and crop growth*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL, Jr. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agronomy Monograph N.º 29, CSSA-ASSA-SSSA, Madison, WI. 163-194 pp.
- FLETCHER, L.R. 1976. *Effect of season and regrowth period on the in vitro digestibility of irrigated lucerne in Canterbury*. *New Zealand J. of Exp. Agric.* 4: 469.
- FRAME, J.; P. NEWBOLD. 1984. *Herbage production from grass/ white clover swards*. En: THOMSON, D.J. (ed.). *Forage Legumes, Occasional Symposium N.º 16, British Grassland Society*. 15-35 pp.
- FREER, M. 1981. *The control of food intake by grazing animals*. En: MORLEY, F.H.W. (ed.). *Grazing Animals, World Animal Science, B 1, Elsevier Scientific Publishing Company*. 105-124 pp.
- FANKHAUSER, J.J.; J.J. VOLENEC. 1989. *Root vs. shoot effects on herbage regrowth and carbohydrate metabolism of alfalfa*. *Crop. Sci.* 29:735-740.
- FRANKOW-LINDBERG, B.E. 1987a. *Lucerne-grass swards with defferent nitrogen application and grass components. 1. Yield of dry matter*. *Sweedish J. Agric. Res.* 17:179-184.
- FRANKOW-LINDBERG, B.E. 1987b. *Lucerne-grass swards with defferent nitrogen application and grass components. 2. Competition*. *Sweedish J. Agric. Res.* 17:185-191.
- FRASINELLI, C.A. 1994. *Influencia de algunas características de pasturas de alfalfa (Medicago sativa L.) sobre el comportamiento ingestivo de novillos en pastoreo*. Tesis Magister Scientiae, Fac. Ciencias Agrarias, Univ. Nac. de Mar del Plata, EEA Balcarce, INTA. 125 p.
- FRASINELLI, C.A.; C.J. ESCUDER; C.A. CANGIANO; S. CHIFFLET DE VERDE; H.M. FERNÁNDEZ. 1994. *Influencia de algunas características de cultivos de alfalfa sobre el consumo y comportamiento ingestivo de novillos en pastoreo*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol 14 (Sup. 1): NA47.
- FREER, M. 1981. *The control of food intake by grazing animals*. En: MORLEY, F.H.W. (ed.). *Grazing Animals. World Animal Science. Elsevier Scientific Publishing Co. Países Bajos, Ámsterdam*. 105-124 pp.
- FUESS, F.W.; M.B. TESAR. 1968. *Photosynthetic efficiency, yields and leaf loss in alfalfa*. *Crop Sci.* 8:159-163.
- GALLI, J.R.; C.A. CANGIANO; H.H. FERNÁNDEZ. 1999. *Manual operativo*. En: CANGIANO, C.A. (ed.). *ConPast 3.0 Programa de computación para la estimación del consumo de bovinos en pastoreo*. EEA Balcarce, INTA. II-1-49.
- GEORGE, J.R.; K.M. BLANCHET; R.M. GETTLE. 2000. *Growing legumes in mixtures with warm-season grasses*. En: MOORE, K.J.; B.E. ANDERSON (eds.). *Native Warm-Season Grasses: Research Trends and Issues*. CSSA Special Publication Number 30. 67-82 pp.

- GDARA, A.O.; R.H. HART; J.G. DEAN. 1991. *Response of tap and creeping rooted alfalfas to defoliation patterns. J. of Range Management* 44:22-26.
- GRABER, L.F.; N.T. NELSON; W.T. LUEKEL; W.B. ALBERT. 1927. *Organic food reserve in relation to growth of alfalfa and other perennial herbaceous plants. Univ. of Wisconsin, Madison, WI. Research Bull* 80. 129 p.
- GRANDFIELD, C.O. 1935. *The trend in organic food reserves in alfalfa roots as affected by cutting practices. J Agric Res* 50:696-709.
- GRANDFIELD, C.O. 1943. *Food reserves and their translocation to the crown buds as related to cold and drought resistance in alfalfa. J. Agric. Res.* 67:33-47.
- GRAMSHAW, D.; K.F. LOWE; D.L. LLOYD. 1993. *Effect of cutting interval and winter dormancy on yield, persistence, nitrogen concentration and root reserves of irrigated lucerne in the Queensland subtropics. Aust. J. Exp. Agric.* 33:847-854.
- GRIGGS, T.C.; STRINGER, W.C. 1988. *Predictions of alfalfa herbage mass using height, ground cover, and disk technique. Agron J.* 80: 204-208.
- GORDON, F.J. 1980. *Grass and fresh grass products. Proceedings of the Nutrition Society, 39:249-256.*
- HABBen, J.E.; J.J. VOLENEC. 1990. *Starch grain distribution in taproots of defoliated Medicago sativa L. Plant Physiol* 94:1056-1061.
- HAGEMANN, R.W.; V.L. MARBLE. 1983. *Variety response to cutting schedules in Imperial Valley. Proceeding, 13th Calif. Alfalfa Symposium Proceedings, Holtville, California.* 6-15 pp.
- HAAGENSON, D.M.; S.M. CUNNINGHAM; B.C. JOERN; J.J. VOLENEC. 2003. *Autumn defoliation effects on alfalfa winter survival, root physiology, and gene expression. Crop Sci.* 43:1340-1348.
- HANSEN, C.J. 2002. *Estimación del potencial de rendimiento de alfalfa (Medicago sativa) pura y en mezcla con pasto ovillo (Dactylis glomerata). Tesis Ingeniero Agrónomo. Fac. Ciencias Agrarias, Univ. Nac. de Mar del Plata, EEA Balcarce, INTA.* 41 p.
- HARRIS, W. 1978. *Defoliation as determinant of the growth, persistence and composition of pasture. En: WILSON, J.R. (ed.). Plant Relations in Pastures. CSIRO, Australia.* 67-85 pp.
- HARVEY, B.M.; K.H. WIDDUP; B.A. BARRETT. 2014. *An evaluation of lucerne for persistence under grazing in New Zealand. New Zealand Grassland Association,* 76:111-116.
- HAYNES, R.J. 1980. *Competitive aspects of the grass-legume association. Advances in Agronomy* 33:227-261.
- HEICHEL, G.H.; R.H. DELANEY; H.T. CRALLE. 1988. *Chapter 6. Carbon assimilation, partitioning and utilization. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL, Jr. (ed.). Alfalfa and Alfalfa Improvement. Agronomy Monograph N. ° 29, CSSA-ASSA-SSSA, Madison, WI.* 196-227 pp.



- HENDERSHOT, K.L.; J.J. VOLENEC. 1993a. *Taproot nitrogen accumulation and use in over wintering alfalfa (Medicago sativa L.)*. *J. Plant Physiol.* 141:68-74.
- HENDERSHOT, K.L.; J.J. VOLENEC. 1993b. *Nitrogen pools in taproots of Medicago sativa L. after defoliation*. *J. Plant Physiol.* 141:129-135.
- HERBERT, S.J.; M. DEMPSEY; D. COOLEY; G.V. LITCHFIELD. 1989. *Autumn management of lucerne*. *Proc. 16th International Grassland Congress*. Niza, Francia. 593-594 pp.
- HODGSON, J. 1982. *Ingestive behaviour*. En: LEAVER, J.D. (ed.). *Herbage Intake Handbook*. British Grassland Society. 113-138 pp.
- JANSON, C.G. 1975. *Influence of autumn winter lucerne management and overdrilled "Grasslands Tama" on spring herbage yields under irrigated and dry conditions*. *New Zealand J. of Exp. Agric.* 3: 229.
- JUNG, G.A.; J.A. SHAFFER; J.H. EVERHART. 1996. *Harvest frequency and cultivar influence on yield and protein of alfalfa-ryegrass mixtures*. *Agronomy J.* 88:817-822.
- JUSTES, E.; P. THIÉBEAU; J.C. AVICE; G. LEMAIRE; J.J. VOLENEC; A. OURRY. 2002. *Influence of summer sowing dates, N fertilization and irrigation on autumn VSP accumulation and dynamics of spring regrowth in alfalfa (Medicago sativa L.)*. *J. Exp. Botany.* 53 (366):111-121.
- KALENGAMALIRO, N.E.; J.J. VOLENEC; S.M. CUNNINGHAM; B.C. JOERN. 1997. *Seedling development and deposition of starch and storage proteins in alfalfa roots*. *Crop Sci.* 37:1194-1200.
- KALLENBACH, R.L.; C.J. NELSON; J.H. COUTTS. 2002. *Yield, quality, and persistence of grazing- and hay-type alfalfa under three harvest frequencies*. *Agron. J.* 94: 1094-1103.
- KALU, A.; G.W. FICK. 1981. *Quantifying morphological development of alfalfa for studies of herbage quality*. *Crop Sci.* 21:267-271.
- KEOGHAN, J.M. 1967. *Effects of cutting frequency and weight on topgrowth of pure lucerne stands*. En: LANGER, R.H.M. (ed.). *The Lucerne Crop*. A. H. & A. W. Reed, Wellington- Auckland-Sidney. 117-128 pp.
- KIM, T.H.; A. OURRY; J. BOUCAUD; G. LEMAIRE. 1991. *Changes in source-sink relationship for nitrogen during regrowth of lucerne (Medicago sativa L.) following removal of shoot*. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:593-602.
- KIM, T.H.; J. BIGOT; A. OURRY; J. BOUCAUD. 1993a. *Amino acid contents of xylem sap of regrowing Lucerne (Medicago sativa L.): relation with N uptake, N<sub>2</sub> fixation and reserves remobilization*. *Plant Physiol.* 149:167-174.
- KIM, T.H.; A. OURRY; J. BOUCAUD; G. LEMAIRE. 1993b. *Partitioning of nitrogen derived from N<sub>2</sub> fixation and reserves in nodulated Medicago sativa L. during regrowth*. *J. Exp. Bot.* 44:555-562.
- KITCHEN, N.R.; D.D. BUCHHOLZ; C.J. NELSON. 1990. *Potassium fertilizer and potato leafhopper effects on alfalfa growth*. *Agron. J.* 82:1069-1074.

- KUST, C.A.; D. SMITH. 1961. *The influence of harvest management on the level of carbohydrate reserves, longevity of stand, and yields of hay and protein from Vernal alfalfa*. *Crop Sci.* 1:267-269.
- LANGER, R.H.M. 1990. *Pasture plants*. En: LANGER R.H.M. (ed.). *Pastures: Their Ecology and Management*. Oxford University Press, Auckland, NZ. 39-74 pp.
- LANGER, R.H.M.; J.M. KEOGHAN. 1970. *Growth of lucerne following defoliation*. *Proc. of the New Zealand Grassland Assoc.* 32:98-107.
- LARROSA, M.A.; J.A. CASTAÑO. 1998. PRODUCCIÓN DE FORRAJE Y SEMILLA DE PASTO OVILLO (*DACTYLIS GLOMERATA* L.) EN BALCARCE. *REV. ARG. PROD. ANIM.* VOL. 18 (SUP. 1):146-147.
- LASCANO, C.E. 2000. *Selective grazing on grass-legume mixtures in tropical pastures*. En: LEMAIRE, G.; J. HODGSON; A. DE MORAES; C. NABINGER; P.C. DE F. CARVALHO (eds.) *Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology*, CABI International. 249-263 pp.
- LATTANZI, F. 1998. *Crecimiento de cultivares de alfalfa con y sin reposo invernal en respuesta a la fertilización con nitrógeno*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol. 18 (Sup. 1):115.
- LEACH, G.J. 1969. *Shoot numbers, shoot size, and yield of regrowth in three Lucerne cultivars*. *Aust. J. Agric. Res.* 20:425-434.
- LI, C.C. 1956. *The concept of path coefficient and its impact on population genetics*. *Biometrics* 12:190-210.
- LI, R.; J.J. VOLENEC; B.C. JOERN; S.M. CUNNINGHAM. 1996. *Seasonal changes in nonstructural carbohydrates, protein, and macronutrients in roots of alfalfa, red clover, sweetclover and birdsfoot trefoil*. *Crop Sci.* 36:617-623.
- LI, R.; J.J. VOLENEC; B.C. JOERN; S.M. CUNNINGHAM. 1997. *Potassium and nitrogen effects on carbohydrate and protein metabolism in alfalfa roots*. *J. Plant Nutr.* 20:511-529.
- LODGE, G.M. 1986. *Yield and persistence of irrigated lucernes cut at different frequencies, at Tamworth, New South Wales*. *Aust. J. Exp. Agric.* 26: 165-172.
- LODGE, G.M. 1991. *Management practices and other factors contributing to the decline in persistence of grazed lucerne in temperate Australia. A review*. *Aust. J. Exp. Agric.* 31:713-724.
- LÓPEZ, A.E.; D. COLLINO; J. DARDANELLI; R. SERENO; R.W. RACCA. 1997. *Efecto de diferentes niveles de sequía sobre la actividad del sistema de FBN en alfalfa (*Medicago sativa* L.) y su capacidad de recuperación*. *Proc. I Reunión Científico-técnica de Biología del Suelo del NOA. I Encuentro sobre Fijación Biológica de Nitrógeno*.
- LLOVERAS, J.; J. FERRARI; A. ALVAREZ; L. TORRES. 1998. *Harvest management effects on alfalfa (*Medicago sativa* L.) production and quality in Mediterranean areas*. *Grass & Forage Sci.* 53:88-92.

- LLOVERAS, L.; C. CHOCARRO; O. FREIXES; E. ARQUÉ; A. MORENO; F. SANTIVERI. 2008. *Yield, yield components, and forage nutritive value of alfalfa as affected by seeding rate under irrigated conditions*. *Agron. J.* 100:191-197.
- MCLEOD, C.C. 1978. *Influence of stage of growth at cutting on lucerne production*. *New Zealand J. Exp. Agric.* 6:285-288.
- MCLAUGHLIN, R.J.; B.R. CHRISTIE. 1980. *Genetic variation for temperature response in alfalfa (Medicago sativa sp)*. *Can. J. Plant Sci.* 60:547-554.
- MARBLE, V.L. 1974. *How cutting schedules and varieties affect yield, quality, and stand life*. *Proceeding, 4th California Alfalfa Symposium Proceedings*. Fresno, California. 47-57 pp.
- MARBLE, V.L. 1980. *Effect of harvest frequencies and varieties on yield, quality, and stand life*. *Proceeding, 10th California Alfalfa Symposium Proceedings*. Visalia, California. 22-38 pp.
- MARQUEZ-ORTIZ, J.J.; J.F.S. LAMB; L.D. JOHNSON; D.K. BARNES; R.E. STUCKER. 1999. *Heritability of crown traits in alfalfa*. *Crop Sci.* 39: 38-43.
- MAY, L.H. 1960. *The utilization of carbohydrate reserves in pasture plants after defoliation*. *Herb. Abstr.* 30:239-245.
- MAYS, D.A.; E.M. EVANS. 1973. *Autumn cutting effects on alfalfa yield and persistence in Alabama*. *Agron. J.* 65:290-292.
- MEURIOT, F.; J.C. AVICE; J.C. SIMON; P. LAINE; M.L. DECAU; A. OURRY. 2004. *Influence of Initial Organic N Reserves and Residual Leaf Area on Growth, N Uptake, N Partitioning and N Storage in Alfalfa (Medicago sativa) during Post-cutting Regrowth*. *Ann. Bot.* 94:311-321.
- MEURIOT, F.; M.L. DECAU; A. MORVAN-BERTRAND; M.P. PRUD'HOMÉ; F. GASTAL; J.C. SIMON; J.J. VOLENEC; J.C. AVICE. 2005. *Contribution of initial C and N reserves in Medicago sativa recovering from defoliation: impact of cutting height and residual leaf area*. *Functional Plant Biology* 32: 321-334.
- NELSON, C.J.; D. SMITH. 1968. *Growth of birdsfoot trefoil and alfalfa. II. Morphological development and dry matter distribution*. *Crop. Sci.* 8: 21-25.
- NELSON, C.J.; L.E. MOSER. 1994. *Plant factors affecting forage quality*. En: FAHEY, G.C. JR. (ed.). *Forage Quality, Evaluation and Utilization*. ASA-CSSA-SSA, Madison, WI. 115-154 pp.
- NELSON, C.J.; D.D. BUCHHOLZ; D.L. RAUSCH; COUTTS, I.G.C. 1986. *Managing alfalfa and alfalfa-grass mixtures for persistence*. *Proc. 16th Nat. Alfalfa Symposium*. Fort Wayne, Indiana. *Certified Alfalfa Seed Council, Woodland, California*.
- NORDKVIST, E.; P. ÅMAN. 1986. *Changes during growth in anatomical and chemical composition and in vitro degradability of lucerne*. *J. Sci. Food Agricultural* 37:1-7.
- OURRY, A.; T.H. KIM; J. BOUCAUD. 1994. *Nitrogen reserve mobilization during regrowth of Medicago sativa L.* *Plant Physiol.* 105:831-837.

- PECE, M.A. 2000. *Tasa de acumulación de la biomasa aérea en dos cultivares de alfalfa (Medicago sativa L.)*. Tesis Magister Scientiae. Fac. Cs. Agrarias, Univ. Nac. de Mar del Plata, EEA Balcarce, INTA. 108 p.
- PECE, M.A.; C.A. CANGIANO. 2003. *Tasa de acumulación de la biomasa aérea en dos cultivares de alfalfa (Medicago sativa L.) en Balcarce*. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol 23 (1):33-43.
- PECE, M.A.; C.A. CANGIANO; H.M. FERNÁNDEZ. 2000. *Tasa de acumulación de la biomasa aérea de alfalfa (Medicago sativa L.) y su relación con variables meteorológicas y cobertura de suelo*. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 20 (Sup. 1): 179-180.
- PERRY, L.J.; K.L. LARSON. 1974. *Influence of drought on tillering and internode number and length in alfalfa*. Crop Sci. 14: 693-696.
- PEETERS, A. 2004. *Wild and Sown Grasses: Profiles of temperate species selection: ecology, biodiversity and use*. FAO and Blackwell Publishing. 311 p.
- PORQUEDDU, C.; G.P. DETTORI; S. MALTONI; C. BROPHY; J. CONNOLLY. 2008. *Pure stands vs four-species mixtures: Agronomic and ecological implications in Mediterranean rainfed conditions*. Options Méditerranéennes. 153-156 pp.
- PUTNAM, D.; ORLOFF, S. 2003. *Using varieties or cutting schedules to achieve quality hay-what are the tradeoffs?* Proceedings, 33rd California Alfalfa and Forage Symposium. Monterey, CA, UC Cooperative Extension, University of California, Davis 95616.
- PUTNAM, D.; S. ORLOFF; L. TEUBER. 2005. *Strategies for balancing quality and yield in alfalfa using cutting schedules and varieties*. In Proceedings, 35th California Alfalfa and Forage Symposium, Visalia, CA. UC Cooperative Extension, Agronomy Research and Extension Center, Plant Sciences Department, University of California, Davies 95616.
- RACCA, R.W.; D. BASIGALUP; E. BREZONI; D. COLLINO; J. DARDANELLI; N. GONZÁLEZ; N. HANSEN; E. LÓPEZ; A. PERTICARI; A. QUADRELLI; E. RIVERO. 1998. *Cuantificación de la FBN en alfalfa y caracterización de los factores ambientales que la regulan*. Proc. XIX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Maturín, Venezuela.
- REYNOLDS, J.H.; D. SMITH. 1962. *Trend of carbohydrates reserves in alfalfa, smooth bromegrass, and timothy grown under various cutting schedules*. Crop Sci. 2:333-336.
- RICHARDS, J.H. 1993. *Physiology of plants recovering from defoliation*. En: BAKES, M.J. (ed.). 'Grassland for our world'. SIR Publishing: Wellington. 64-54 pp.
- RIXON, A.J. 1972. *Yield and quality of four wheat crops subsequent to annual and perennial irrigated pastures*. Australian Journal of Agricultural Research. 23: 561-571.
- ROMERO, N. 1988. *Investigaciones y progresos en el manejo de la alfalfa*. ILL. Producción y persistencia. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 8 (6): 519.
- ROMERO, N.A.; E.A. COMERON; E. USTARROZ. 1995. *Capítulo 8. Crecimiento y utilización de la alfalfa*. En: HIJANO, E.; A. NAVARRO (ed.). *La alfalfa en la Argentina*. Subprograma Alfalfa. Manuales 11. Enciclopedia Agro de Cuyo. INTA. 149-170 pp.

- ROSSI, J.L.; R. MORIYA; O.V. SATORRE. 1988. *Efecto del descanso sobre la productividad de la alfalfa*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol. 8 (Sup. 1):93.
- SANTINI, F.; E. GONZALEZ; J.C. AROSTEGUY. 1975. *Crecimiento estacional de gramíneas y leguminosas puras y en mezclas*. *Reunión Anual Departamento de Prod. Animal. EEA Balcarce, INTA.* s/p.
- SHEAFFER, C.C.; G.D. LACEFIELD; V.L. MARBLE. 1988. *Chapter 12. Cutting Schedules and Stands*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES R.R. HILL Jr. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement. Agronomy Monograph N.º 29, CSSA-ASSA-SSSA, Madison, WI.* 411-437 pp.
- SHEAFFER, C.C.; J.V. WIERSMA; D.D. WARNES; D.L. RABAS; W.E. LUESCHEN; J.H. FORD. 1986. *Fall harvesting and alfalfa yield, persistence and quality*. *Can. J. Plant Sci.* 66:329-338.
- SHEAFFER, C.C.; N.P. MARTIN; J.F.S. LAMB; G.R. CUOMO; J.G. JEWETT; R. QUERING. 2000. *Leaf and stem properties of alfalfa entries*. *Agron. J.* 92:733-739.
- SHEEHY, J.E.; F.I. WOODWARD; M.B. JONES; A. WINDRAM. 1979. *Microclimate, photosynthesis and growth of Lucerne (Medicago sativa L.). I. Microclimate and photosynthesis*. *Annals of Botany* 44:693-707.
- SMITH, D. 1962. *Carbohydrates root reserves in alfalfa, red clover, and birdsfoot trefoil under several management schedules*. *Crop. Sci.* 2:75-78.
- SMITH, D. 1969. *Influence of temperature on the yield and chemical composition of 'Vernal' alfalfa at first flower*. *Agron. J.* 61:470-472.
- SMITH, D. 1970. *Influence of temperature on the yield and chemical composition of five legume species*. *Agron. J.* 62:250-523.
- SMITH, D. 1972. *Chapter 22. Cutting schedules and maintaining pure stands*. En: HANSON C.H. (ed.). *Alfalfa Science and Technology*. ASA, Agronomy 15. Madison, WI. 481-496 pp.
- SMITH, S.R. JR.; J.H. BOUTON; C.S. HOVELAND. 1989. *Alfalfa persistence and regrowth potential under continuous grazing*. *Agron. J.* 81:960-965.
- SINGH, J.; J.E. WINCH. 1974. *Morphological development of two alfalfa cultivars under various harvesting schedules*. *Can. J. Plant Sci.* 54:78-87.
- SPRAGUE, M.A.; R.F. FUELLEMAN. 1941. *Measurements of recovery after cutting and fall dormancy of varieties and strains of alfalfa, Medicago sativa*. *Agron. J.* 33:437-447.
- SUZUKI, M. 1991. *Effects of stand age on agronomic, morphological, and chemical characteristics of alfalfa*. *Can. J. Plant Sci.* 71:445-452.
- TA, T.H.; E.I. TEIXEIRA; H.E. BROWWN; D.J. MOOT. 2020. *Yield and quality changes in lucerne of different fall dormancy ratings under three defoliation regimes*. *Eur. J. Agron.* 115: 126012.
- TA, T.C.; F.D. MACDOWALL; M.A. FARIS. 1990. *Utilization of carbon and nitrogenous reserves of alfalfa roots in supporting N<sub>2</sub> fixation and shoot regrowth*. *Plant & Soil* 127:231-236.

TEIXEIRA, E.I.; D.J. MOOT; M.V. MICKELBART. 2007a. *Seasonal patterns of root C and N reserves of lucerne crops (Medicago sativa L.) grown in a temperate climate were affected by defoliation regime.* *Eur. J. Agron.* 26 (1): 10-20.

TEIXEIRA, E.I.; D.J. MOOT; K.M. POLLOCK. 2007c. *How does defoliation management impact on yield, canopy forming processes and light interception of lucerne (Medicago sativa L.) crops?* *Eur. J. Agron.* 27:154-164.

TEIXEIRA, E.I.; D.J. MOOT; H.E. BROWN. 2008. *Defoliation frequency and season affected radiation use efficiency and dry matter partitioning to root of lucerne (Medicago sativa L.) crops.* *Eur. J. Agron.* 28:103-111.

TEIXEIRA, E.I.; D.J. MOOT; H.E. BROWN; A.L. FLETCHER. 2007b. *The dynamics of lucerne (Medicago sativa L.) yield components in response to defoliation frequency.* *Eur. J. Agron.* 26:394-400.

TEUBER, L.R.; K.L. TAGGARD; L.K. GIBSS; M.H. MCCASLIN.; M.A. PETERSON; D.K. BARNES. 1998. *Fall dormancy.* En: FOX, C.; R. BERBERET; F. GRAY; C. GRAU; D. JESSEN; M. PETERSON. (eds.). *Standard Test to Characterize Alfalfa Cultivars, 3rd ed.* North American Alfalfa Improvement Conference. *Agronomic Test. parte A-1.*

THOMSON, D.J. 1984. *The nutritive value of white clover.* En: D. J. THOMSON, D.J. (ed.). *Forage Legumes. British Grassland Society, Occasional Symposium N.º 16.* 78-92 pp.

THOMSON, D.J. 1979. *Effect of the proportion of legumes in the sward on animal output.* En: CHARLES, A.H.; R.J. HAGGAR (ed.). *Changes in Sward Composition and Productivity. British Grassland Society, Occasional Symposium N.º 10.* 101-109 pp.

UENO, M.; D. SMITH. 1970. *Growth and carbohydrate changes in the root wood and bark of different sized alfalfa plants during regrowth after cutting.* *Crop Sci.* 10:396-399.

ULYATT, M.J. 1981. *The feeding value of temperate pastures.* En: MORLEY, F.H.W. (ed.). *Grazing Animals. World Animal Science. Elsevier Scientific Publishing Co. Ámsterdam, Países Bajos.* 125-141 pp.

UNDERSANDER, D.J.; C. GRAU; D. COSGROVE; J. DOLL; N. MARTIN. 1998. *Alfalfa stand assessment: Is the stand good enough to keep?* *Univ. of Wisconsin, Madison, WI. Ext. Bull. A3620. sp.*

VANCE, C.P.; G.H. HEICHEL. 1981. *Nitrate assimilation during vegetative regrowth of alfalfa.* *Plant Physiol.* 68:1052-1056.

VANCE, C.P.; G.H. HEICHEL; D.A. PHILLIPS. 1988. *Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation.* En: HANSON, A.A. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement, Agronomy Monograph N.º 29, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, EUA.* 229-257 pp.

VANCE, C.P.; G.H. HEICHEL; D.K. BARNES; J.W. BRYAN; L.E. JOHNSON. 1979. *Nitrogen fixation, nodule development, and vegetative regrowth of alfalfa (Medicago sativa L.) following harvest.* *Plant Physiol.* 64: 1-8.

VENTRONI, L.M., 2009. *Efecto de la frecuencia de corte sobre el rendimiento, componentes del rendimiento y reserva orgánicas de raíces en tres cultivares de alfalfa (Medicago*

*sativa* L.) con diferentes grados de reposo invernal. Tesis Magister Scientiae, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce. 200 p.

VENTRONI, L.M.; J.J. VOLENEC; C.C. CANGIANO. 2008. Effect of cutting frequency in alfalfa cultivars differing in fall dormancy. 1: on total plant yield. 31. Congreso Argentino de Producción Animal, Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. Rev. Arg. Prod. Anim. 1, 391-392.

VENTRONI, L.M.; J.J. VOLENEC; C.A. CANGIANO. 2010. Fall dormancy and cutting frequency impact on alfalfa yield and yield components. *Field Crops Res.* 119:252-259.

VOLENEC, J.J. 1985. Leaf area expansion and shoot elongation of diverse alfalfa germplasm. *Crop Sci.* 25:822-827.

VOLENEC, J.J. 1999. Physiological control of alfalfa growth and yield. En: SMITH, D.L.; C. HAMEL (eds.) *Crop Yield, Physiological and Processes.* 425-442 pp.

VOLENEC, J.J.; J.H. CHERNEY; K.D. JOHNSON. 1987. Yield components, plant morphology, and forage quality of alfalfa influenced by plant population. *Crop Sci.* 27:321-326.

VOLENEC, J.J.; P.J. BOYCE; K.L. HENDERSHOT. 1991. Carbohydrate metabolism in taproots of *Medicago sativa* L. during winter adaptation and spring regrowth. *Plant Physiol.* 96:786-793.

VOLENEC, J.J.; A. OURRY; B.C. JOERN. 1996. A role for nitrogen reserves in forage regrowth and stress tolerance. *Physiol. Plant.* 97:185-193.

VOLENEC, J.J.; B.C. JOERN; S.M. CUNNINGHAM; A. OURRY. 1998. Molecular analysis of alfalfa root vegetative storage proteins. *Crop Science Society of America, 677 S. Molecular and Cellular Technologies for Forage Improvement. CSSA Special Publication Number 26. Segoe Rd., Madison, WI 53711, EUA.* 59-73 pp.

VOLENEC, J.J.; S.M. CUNNINGHAM; D.M. HAAGENSEN; W.K. BERG; B.C. JOERN; D.W. WIERSMA. 2002. Physiological genetics of alfalfa improvement: Past failures, future prospects. *Field Crop Res.* 75:97-110.

VOUGH, L.R.; G.C. MARTEN. 1971. Influence of soil moisture and ambient temperature on yield and quality of alfalfa forage. *Agron. J.* 63:40-42.

WHITE, J.G.H.; W.J. LUCAS. 1989. Cool season grazing of winter-active lucernes. *Proc. 16th International Grassland Congress. Niza, Francia.* 387-388 pp.

WOLF, D.D.; R.E. BLASER. 1971. Photosynthesis of plant parts of alfalfa canopies. *Crop Sci.* 11:55-58.

WOODWARD, F.I.; J.E. SHEEHY. 1979. Microclimate, photosynthesis and growth of Lucerne (*Medicago sativa* L.). II. Canopy structure and growth. *Annals of Botany* 44:709-719.

ZANIBONI, C. 1990. Niveles de subdivisiones y velocidad de rotación del pastoreo y su relación con la longevidad de la alfalfa. Informe presentado en Reunión Interna sobre Manejo de Alfalfa, EEA Anguil, INTA. La Pampa. s/p.

## CAPÍTULO 12

Manejo y utilización de pasturas  
de alfalfa para producción de carne

Andrés M. Kloster,  
Claudio M. Zaniboni  
y Cecilia Sardiña



## Introducción

Los sistemas de producción de carne sobre pasturas se destacan por su flexibilidad para adaptarse a distintas contingencias (climáticas, relaciones insumo/producto, demanda, etc.) sin necesidad de variar sustancialmente sus factores de producción. Por esta razón, la alimentación de tipo pastoril continúa siendo una característica muy ponderada en los sistemas de producción bovina argentina, fundamentalmente para los mercados externos de cortes de alto valor (Kloster *et al.*, 2003). En este marco, las pasturas base alfalfa constituyen uno de los principales recursos forrajeros de los planteos de base pastoril de recría y engorde bovino en la región Pampeana.

Una característica saliente de esta especie es su elevada capacidad de producción de forraje de calidad, fácilmente transformable en producto animal. Estos atributos sustentan la alta receptividad de las pasturas en las que interviene, las cuales, eficientemente utilizadas mediante un manejo adecuado, suelen generar excelentes resultados físicos y económicos. De hecho, la incidencia de la pastura en el costo unitario de carne producida puede disminuir sensiblemente cuanto más se favorezcan las condiciones que permiten la expresión de su capacidad de producción de forraje.

## La alfalfa como eje de las cadenas forrajeras

La alfalfa presenta una alta producción de forraje durante el período comprendido entre la primavera y el otoño; puede prosperar en un amplio rango de situaciones ecológicas (Douglas, 1986; Van Keuren y Matches, 1988), lo que permite integrarla en diferentes rotaciones dentro de los principales sistemas de producción agrícola-ganaderos (Romero *et al.*, 1995).

La productividad de forraje de esta leguminosa se encuentra fuertemente afectada por el ambiente ecológico. En la región Pampeana norte, las pasturas de alfalfa y sus mezclas pueden alcanzar, en condiciones de pastoreo, un rendimiento anual medio de 10,5 a 15 t MS (materia seca) ha<sup>-1</sup> durante el ciclo de vida útil de la pastura. En condiciones favorables

se han logrado, bajo pastoreo, producciones de hasta 15 t MS ha<sup>-1</sup> en el NO de la provincia de Buenos Aires (Ustarroz *et al.*, 1997) y de 17 a 23 t MS ha<sup>-1</sup> en el SE de Córdoba (Kloster *et al.*, 2003; Kloster *et al.*, 2017). Esta alta capacidad productiva de la alfalfa la coloca como eje de cualquier planteo forrajero en todas aquellas zonas con condiciones edafoclimáticas adecuadas para su implantación y desarrollo.

## Utilización de la alfalfa en condiciones de pastoreo

En la Argentina, una alta proporción de las pasturas base alfalfa se utilizan bajo pastoreo directo. El pastoreo continuo o alternado de esta especie, muy difundido en el pasado, ha sido sustituido por sistemas rotativos con grados variables de intensificación tanto en carga animal, intensidad de uso y número de subdivisiones de los potreros (Kloster *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 1995).

Un eficiente aprovechamiento de las pasturas base alfalfa debiera centrar el esfuerzo en lograr una alta producción de forraje en cantidad y calidad, con una buena distribución a lo largo del año y en la aplicación de criterios de manejo compatibles con la persistencia del cultivo (Kloster *et al.*, 2003).

Las particularidades del crecimiento de esta especie requieren especial consideración, pues de ello depende en gran medida la productividad de forraje. Tanto sus características morfológicas y fisiológicas como el grado de reposo invernal de cada cultivar condicionan el sistema de utilización. Bajo pastoreo, este proceso adquiere tal dinamismo que requiere, a su vez, ajustes frecuentes, cuando no permanentes.

El conocimiento del impacto de las distintas variables de manejo del pastoreo sobre la productividad, calidad y longevidad de las pasturas, así como sus efectos sobre el animal, aportan elementos decisivos para mejorar la eficiencia global de utilización de la alfalfa. En este sentido, la carga animal y el sistema de utilización constituyen dos pilares fundamentales de manejo que determinan el rendimiento de un sistema de producción animal (McMeekan y Walshe, 1963; Marten *et al.*, 1988; Kloster *et al.*, 2003; Ustarroz *et al.*, 1997).

La mayoría de los investigadores coinciden en que la alfalfa responde con mayor producción y persistencia cuando se la somete a un sistema de pastoreo rotativo que respete sus ciclos de crecimiento (Rossanigo y Aragon, 2003; Bariggi y Romero, 1986; Douglas, 1986; Moot, 2014; Hall, 1994; Romero *et al.*, 1995; Ustarroz *et al.*, 1997). En condiciones prácticas, la productividad animal dependerá de la carga, del cultivar implantado, de la intensidad y la frecuencia de defoliación y del tipo de animal utilizado (Romero *et al.*, 1995). La integración y el ajuste de estas variables con el resto de los componentes del sistema de producción constituyen uno de los mayores desafíos de los planteos de invernada intensificados, dentro de un marco de alta productividad y eficiencia.

### *Pastoreo rotativo: herramienta indispensable para el manejo de pasturas base alfalfa*

El efecto del sistema de pastoreo sobre la productividad tanto primaria como secundaria ha sido frecuentemente motivo de discusión, especialmente cuando se ha confrontado el pastoreo continuo con distintos sistemas rotativos en pasturas a base de gramíneas (McMeekan, 1960; Ernst *et al.*, 1980; Jung *et al.*, 1985; Thomet y Hadron, 2000) o pastizales naturales (Heitschmidt *et al.*, 1987).

Además de las particularidades ecológicas, biológicas y sesgos metodológicos subyacentes en este tipo de comparaciones, la plasticidad de las especies suele afectar marcadamente la respuesta al método de pastoreo. Así, por ejemplo, el raigrás (*Lolium perenne* L.) y el trébol blanco (*Trifolium repens* L.) tienen una gran plasticidad morfogénica que les permite soportar un amplio rango de frecuencias e intensidades de defoliación (Escuder, 1996). Por el contrario, las leguminosas erectas tipo alfalfa no toleran defoliaciones frecuentes, aunque estas sean relativamente laxas (Leach, 1979; Leach, 1983).

Bajo pastoreo continuo, las plantas individuales de alfalfa se encuentran sometidas a una defoliación tan frecuente que conduce a un debilitamiento general de estas, con menor producción de forraje y reducción de su sistema radicular. Esto acelera la muerte de la planta ante situaciones adversas como períodos de sequía, ataques de plagas o enfermedades, heladas intensas, etc. (Romero *et al.*, 1995; Wilman,

1977). En la Figura 1 puede apreciarse la disminución en el número de plantas por unidad de superficie en una alfalfa sometida al pastoreo continuo durante varias temporadas, y la aceptable densidad o cobertura de la misma pastura bajo pastoreo rotativo.

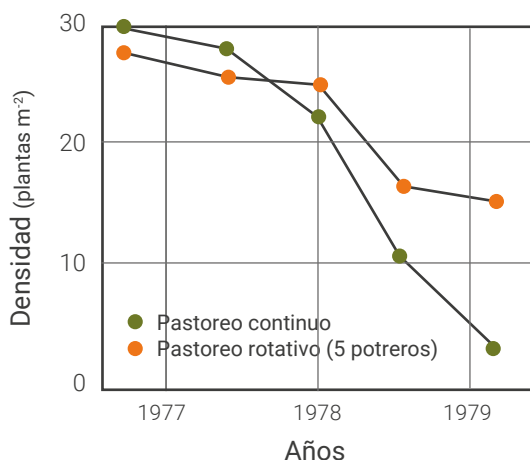


Figura 1. Evolución del número de plantas de alfalfa bajo dos sistemas de pastoreo: continuo vs. rotativo (6 parcelas). Adaptado de Romero (1981).

Por lo tanto, la implementación de un sistema rotativo en pasturas base alfalfa es un componente de manejo del pastoreo que admite pocas discusiones, al menos para el germoplasma actualmente más difundido en el país. Este método de pastoreo posibilita brindar a la alfalfa el descanso necesario entre defoliaciones para que la recomposición de reservas en las raíces y coronas permita rebrotes vigorosos y praderas longevas y productivas (Bariggi *et al.*, 1979; Cragnaz y Rossanigo, 1985; Romero *et al.*, 1995).

Uno de los pilares que sustenta un adecuado aprovechamiento de la alfalfa bajo pastoreo rotativo es el conocimiento de los procesos que gobiernan su crecimiento y la acumulación de forraje. En este sentido, resulta de gran importancia la dinámica de acumulación y movilización de los carbohidratos (CHO) de reserva. Estas sustancias son la fuente energética utilizada por la planta para sobrevivir en invierno, iniciar el crecimiento primaveral y sostener la primera fase del rebrote después de cada período de utilización (Bariggi y Romero, 1986; Blaser *et al.*, 1986). Una completa descripción de estos procesos se ofrece en el capítulo 11 de este libro.

En la alfalfa la acumulación y utilización de CHO obedece a un fuerte patrón cíclico, de crecimiento “por ondas”, que puede ser alterado por el sistema de utilización y que es muy sensible a los errores de manejo, pudiendo estos repercutir severamente sobre la persistencia de los alfalfares.

La principal ventaja del pastoreo rotativo radica en que permite respetar los ciclos de crecimiento de la planta, lográndose así un mayor rendimiento de forraje y longevidad de la pastura (Bariggi y Romero, 1986; Cragnaz y Rossanigo, 1985; Hall, 1994; Romero *et al.*, 1995). A esto deben sumarse sus beneficios secundarios o indirectos, como un mejor control de la cantidad de forraje ofrecido, la profundidad de defoliación y las pérdidas de forraje. Además, facilita la planificación de la confección de reservas y el monitoreo de las características del remanente a la salida de una parcela de pastoreo (Bariggi y Romero, 1986; CREA, 1995).

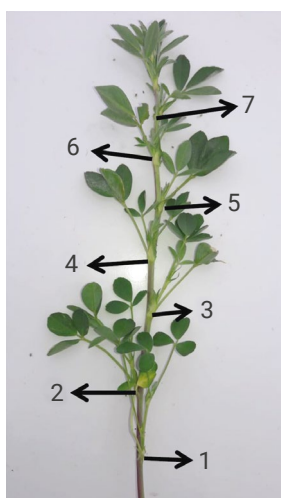
### *Crterios para determinar el momento de utilización de la alfalfa*

Se han propuesto diferentes criterios prácticos para establecer de manera simple el momento apropiado para el inicio del pastoreo de un rebrote de alfalfa. El indicador más generalizado para determinar el momento de uso es el inicio de floración, el cual tiene una alta correlación con la finalización de la acumulación de carbohidratos de reserva en las raíces. La dificultad de aplicación surge en determinadas épocas del año, en las cuales la alfalfa, aunque puede seguir creciendo, no florece, o bien el proceso se encuentra muy afectado por factores ambientales que vuelven sumamente errática la definición de períodos de descanso y de pastoreo basados solamente en este criterio. Por ello, se recomienda considerar también la aparición de rebrotes de la corona, especialmente durante fines de otoño, invierno y principios de primavera, dado que en este período las pasturas, a pesar de estar en condiciones de ser utilizadas, tienen la floración retardada por las bajas temperaturas y un fotoperíodo de días cortos (Romero *et al.*, 1995).

De este modo, el comienzo del pastoreo podría definirse como el momento en que ocurre el 10 % de floración o cuando los rebrotes basales (desde la corona) alcanzan 3 a 5 cm de altura. Procediendo así, resulta posible compatibilizar la productividad y la persistencia del alfalfar con

aceptables parámetros de calidad del forraje (Bariggi y Romero, 1986; Romero *et al.*, 1995; Rossanigo y Aragon, 2003). No obstante, en las praderas en que se suspende el pastoreo en invierno, el reinicio de un nuevo ciclo primaveral esperando un 10 % de floración determinaría que las primeras parcelas se cosechen con la calidad deseada, mientras que las subsiguientes –dadas las altas tasas estacionales de crecimiento– alcanzarían mayor madurez y, por ende, la progresiva pérdida de calidad de sus estructuras. Por lo tanto, en dicha circunstancia deberían establecerse reglas de compromiso que mitiguen esta pérdida de calidad adelantando el inicio del pastoreo de las primeras parcelas.

En la actualidad se está trabajando a nivel experimental sobre nuevos criterios de utilización del cultivo, como por ejemplo la observación del número de nudos en el tallo principal (Figura 2). Al respecto, para priorizar la producción secundaria se sugiere, en épocas de altas tasas de crecimiento, la utilización de la pastura con 8 a 10 nudos, con frecuencias dadas por 350-450 grados días acumulados (GDA=sumatoria de temperaturas medias diarias por encima de 5 °C) o bien ingresar con disponibilidades de 1.500-2.000 kg MS ha<sup>-1</sup>, en lugar de esperar el 10 % de floración durante primavera-verano (Kloster y Zurbriggen, 2019; Sardiña y Berone, 2017). Complementariamente, es apropiado permitir la floración del cultivo en otoño, o el uso de frecuencias de aproximadamente 550-600 GDA, a fin de priorizar la acumulación de reservas en raíces apuntando a una buena persistencia del cultivo (Moot, 2014).



■ **Figura 2.** Número de nudos en el tallo principal (tallo más alto de una planta de alfalfa), contados desde la base hasta la última hoja totalmente expandida.

Durante cada ciclo de crecimiento, a medida que la planta avanza en su estado de madurez, la composición química del forraje sufre cambios progresivos (Buxton *et al.*, 1985). Un tratamiento detallado de estos aspectos se ofrece en el capítulo 11 de este libro. Como regla general, puede decirse que los aprovechamientos tardíos de un rebrote aumentan la cantidad de MS acumulada en detrimento de su calidad y facilidad de cosecha (Smith, 1972; Popp *et al.*, 2000). En consecuencia, en los sistemas pastoriles, el consumo animal y las ganancias de peso normalmente se resienten, sobre todo en verano (Ustarroz *et al.*, 1997). Solo como excepción, esta estrategia de mayor acumulación de forraje podría aplicarse a la confección de reservas, en sistemas que circunstancialmente necesiten privilegiar volumen y toleren la inserción de henos de menor calidad.

Otra forma de estimar el descenso de la calidad del forraje con el avance del estado de madurez es determinar la relación hoja:tallo. Maddaloni y Solá (1985) estimaron que durante el primer verano de vida de una variedad de latencia intermedia, la relación hoja:tallo fue 1,14 al 10 % de floración y 0,40 al 100 % de floración, registrando una digestibilidad del tallo de 74,2 % en un rebrote de 4 semanas y de 48,7 % al 100 % de floración.

Como las hojas tienen mayor contenido de nutrientes que los tallos (Buxton *et al.*, 1985), el principal objetivo del manejo del pastoreo debiera estar orientado a cosechar principalmente esta fracción del forraje (Popp *et al.*, 2000). Pese a que las hojas sufren pocos cambios en su digestibilidad a medida que el rebrote envejece, su proporción en la planta decrece y, en consecuencia, la participación porcentual de los tallos aumenta (Moot, 2014; Romero *et al.*, 2002). Paralelamente, también se incrementa el contenido de fibra y el grado de lignificación de los tallos (Buxton *et al.*, 1985; Bariggi y Romero, 1986; Marten *et al.*, 1988), de modo que la digestibilidad del forraje y el consumo animal disminuyen (Popp *et al.*, 2000; Poppi *et al.*, 1987).

En contraposición, la utilización temprana –como en estado de prebotón floral– mejora la calidad, pero disminuye la cantidad de forraje acumulado durante el intervalo entre defoliaciones y, si estos manejos se repiten en el tiempo, atentan contra la persistencia del alfalfar (Bariggi y Romero, 1986; Romero *et al.*, 1995; Smith, 1972).

### *Duración del período de descanso, producción y persistencia de los alfalfares*

Ya se ha hecho referencia a la necesidad de utilizar un sistema de pastoreo rotativo que, con adecuados descansos entre pastoreos, permita recomponer el nivel de CHO de reserva para lograr rebrotes productivos y vigorosos.

Los parámetros que definen un sistema rotativo son los períodos de descanso y de pastoreo (Cragnaz, 1988; Romero *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 1981). Los primeros ensayos realizados en las estaciones experimentales del INTA en Anguil, Gral. Villegas, Marcos Juárez y Manfredi, durante otoño e invierno, usando variedades de grado de reposo invernal (GRI) largo (GRI 3-4), coincidieron en la necesidad de respetar períodos de descanso de 35 a 42 días a fin de mantener un alfalfar productivo y con una longevidad cercana a los 4 años (Bariggi *et al.*, 1979; Romero, 1981). También se realizaron experiencias a fin de comparar la producción de carne con distintos sistemas de utilización, fundamentalmente de pastoreo continuos versus rotativos con bajo número de parcelas. En general, se observó una mayor producción de carne durante el primer año con un sistema continuo, aunque asociado a una alta pérdida de plantas a partir del segundo año; finalmente, al cabo de tres temporadas, la productividad de carne fue netamente superior en el sistema de 6 parcelas (7 días de pastoreo x 35 días de descanso) (Romero *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 1995).

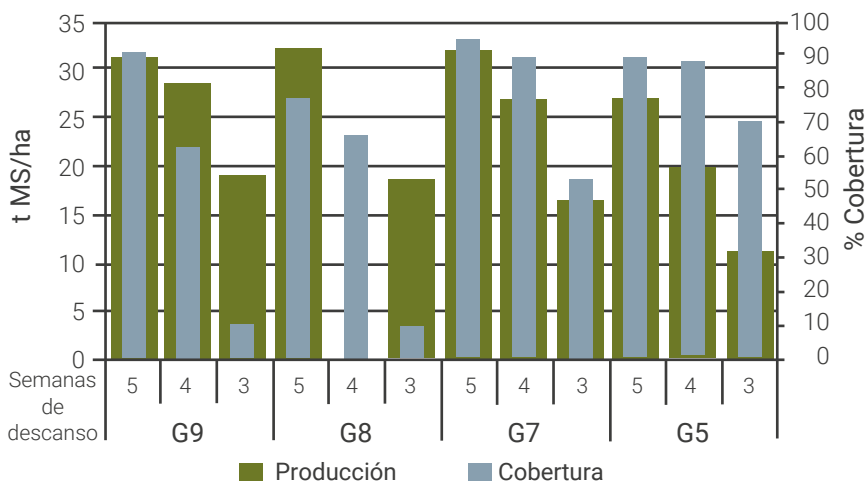
Con la introducción de los cultivares de reposo invernal intermedio y sin reposo, de hábito de crecimiento erecto, coronas de menor diámetro, menor número de tallos y mayor velocidad inicial de rebrote (Rossanigo y Aragon, 2003), numerosos autores coincidieron en la necesidad de redefinir pautas de manejo apropiadas para esta nueva situación. Para ello, se trabajó con cultivares de GRI 3 a 9 para evaluar el efecto de la frecuencia de corte y de la longitud del período de pastoreo sobre su producción y persistencia.

Respecto a la frecuencia de defoliación, considerada como cortes a intervalos prefijados cada 3, 4 o 5 semanas (Zaniboni, 1990a) o a distintos estados fenológicos (Maddaloni y Sola, 1985), se comprobó que ante la disminución de la frecuencia de cortes se incrementaba la produc-

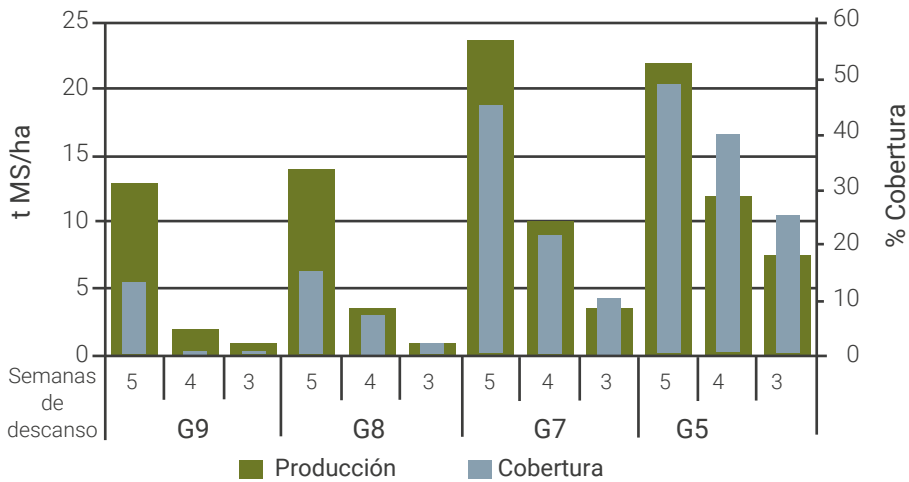


ción de MS y la persistencia, independientemente del grado de reposo del cultivar. En un ensayo conducido en General Villegas durante cinco años, los cultivares de menor reposo (GRI 8-9), a pesar de sus buenas producciones durante los primeros años, fueron los más afectados por el aumento de la frecuencia de defoliación, a punto tal que cuando se los cortó cada tres semanas solo se mantuvieron productivos durante dos años. En tanto, los materiales de reposo intermedio (GRI 5-7) presentaron mayor estabilidad (persistencia) en el rango de períodos de descanso evaluados (Figura 3a) y, a su vez, tuvieron mejor comportamiento productivo que aquellos sin reposo durante el tercer al quinto año del ensayo (Figura 3b), lo que se tradujo en una mayor acumulación total de materia seca a lo largo de la vida útil de la pastura.

Dada la asociación entre el contenido de carbohidratos de reserva en raíces y la longevidad del alfalfar, resulta fundamental que ante la aparición de los primeros fríos el nivel de reservas se encuentre lo más elevado posible. Esto último está afectado por el umbral térmico en que cada cultivar detiene su crecimiento. Las bajas temperaturas tienen menor influencia sobre la detención del crecimiento en las variedades sin reposo, lo que puede representar alguna desventaja puesto que al continuar creciendo siguen consumiendo reservas (Bruno, 1993).



**Figura 3a.** Efecto de la frecuencia de corte durante los dos primeros años de producción sobre la productividad (t MS ha<sup>-1</sup>) y el grado de cobertura (%) de cultivares de alfalfa de distinto grado de reposo invernal. Adaptado de Zaniboni (1990b).



**Figura 3b.** Efecto de la frecuencia de corte durante los tres últimos años de producción sobre la productividad (t MS ha<sup>-1</sup>) y el grado de cobertura (%) de cultivares de alfalfa de distinto grado de reposo invernal. Adaptado de Zaniboni (1990b).

En el pasado, el otoño era considerado un período crítico para la utilización de la alfalfa (Hernández, 1969; Romero, 1988), sobre todo cuando los pastoreos rotativos no estaban lo suficientemente difundidos. Los eventuales efectos perjudiciales del pastoreo en esta estación están afectados por la longitud del otoño, el grado de reposo de las variedades y el manejo previo durante el verano (Romero, 1988). En este sentido, las variedades con mayor reposo resultan menos sensibles a los efectos negativos del pastoreo en esta época (Romero *et al.*, 1995).

Otoños con altas temperaturas reducen el contenido de CHO de reserva, lo cual, asociado a defoliaciones frecuentes, ha sido correlacionado con menor producción y pérdida de plantas, especialmente en variedades sin reposo. Por el contrario, las temperaturas bajas en otoño y el consiguiente menor crecimiento bajo esas condiciones, favorecen la acumulación de reservas en raíces (Rossanigo y Aragón, 2003). Experiencias realizadas en INTA General Villegas indican que para cultivares de reposo intermedio a sin reposo es necesario disminuir la frecuencia de utilización a 45 días en otoño y hasta 70 días en invierno (Gonella, 1992). En ambientes con utilización de las alfalfas durante casi todo el año, tal como sucede en el sudeste de Córdoba o en el sur de Santa Fe,

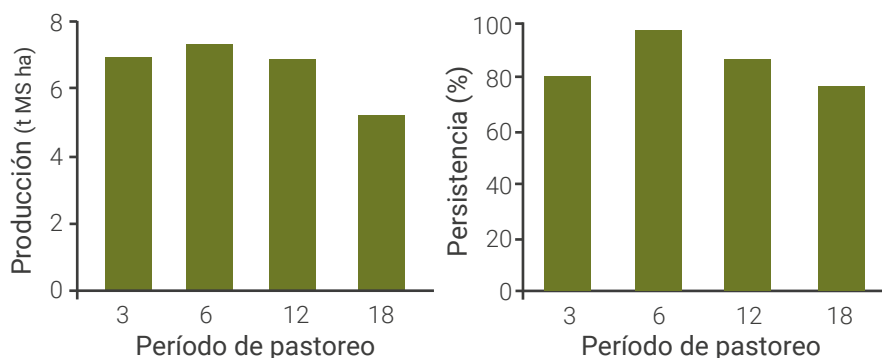
un adecuado manejo debiera contemplar descansos otoño-invernales no inferiores a 45 días (Rossanigo y Aragón, 2003).

### *Duración del período de permanencia por parcela*

Southwood y Robards (1975) sugirieron que períodos de pastoreo de 5 a 10 días serían suficientes para asegurar una alta producción y persistencia de la alfalfa, sin necesidad de utilizar sistemas con ocupación de parcela más cortos. Estos períodos, relativamente largos, también han sido aceptados como una guía adecuada de manejo por otros autores (Bariggi y Romero, 1986; Leach, 1983; Romero *et al.*, 1995; Douglas, 1986; Cosgrove y White, 1990; Van Keuren y Matches, 1988).

En las estaciones experimentales del INTA en Anguil, General Villegas y Marcos Juárez se ensayaron períodos de pastoreo de 3, 6, 12 y 18 días, con un descanso de 35 días. Coincidentemente, luego de cuatro temporadas, se logró la mayor persistencia con pastoreos de 6 y 12 días; los períodos de pastoreo extremos (3 y 18 días) redujeron el número de plantas, especialmente en cultivares sin reposo (Romero *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 1995) (Figura 4).

Si bien no se constató un patrón unívoco de productividad, en términos generales se concluye que la producción de forraje y la persistencia suelen reducirse con los pastoreos de duración extrema. En ese contexto, los cultivares sin reposo son los más afectados y los de reposo intermedio los menos perjudicados (Romero *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 1995a).



■ **Figura 4.** Producción de forraje ( $t MS ha^{-1}$ ) y cobertura (%) de alfalfas sometidas a distintos períodos de pastoreo (3, 6, 12 y 18 días). Adaptado de Romero *et al.* (1995).

A efectos de explicar los resultados anteriores, puede decirse que en los pastoreos de larga duración (ejemplo: 18 días), el animal consume rebrotes basales, provocando con ello el agotamiento de las reservas de raíz. Cragnaz y Rossanigo (1985), en un ensayo realizado en INTA Marcos Juárez, observaron que un período de pastoreo de 18 días disminuyó la población de plantas de una variedad sin reposo invernal, pero no afectó a los cultivares con reposo largo o intermedio. En cambio, comprobaron que un período de dos días de pastoreo no afectó la persistencia de ninguna de las variedades ensayadas.

En igual sentido, una posible explicación de porqué los pastoreos demasiado cortos pueden afectar negativamente la persistencia, podría estar vinculada a diferencias de comportamiento de la alfalfa frente a la defoliación por corte o pastoreo (Counce *et al.*, 1984). Mientras que en un sistema de utilización bajo corte la cosecha mecánica reduce el área foliar de manera drástica e instantánea (Ustarroz *et al.*, 1997), bajo pastoreo con una permanencia por parcela relativamente larga los animales realizan una defoliación gradual de la cubierta (White y Cosgrove, 1990). En este último caso, las hojas remanentes, que normalmente tienen una actividad fotosintética relativamente baja (Brown *et al.*, 1966), pueden recuperar esta capacidad frente a un mejor ambiente lumínico (Hodkinson, 1974) y así contribuir significativamente a la maduración de las yemas de la corona, que darán origen a un nuevo crecimiento. En este contexto, un período de pastoreo muy corto podría asimilarse a lo que sucede con un corte mecánico. No obstante, Spada y Mombelli (1995) compararon en INTA Manfredi durante cuatro años dos sistemas de utilización (corte versus pastoreo simulando de 7 días) en alfalfas de GRI 6 a 9 y no detectaron diferencias de persistencia entre grupos de reposo.

Según Cosgrove y White (1990), la generación y maduración de yemas de la corona se favorece con pastoreos de hasta 12 días, especialmente cuando la alfalfa es consumida en estados de madurez temprana. Según estos autores, la duración óptima de pastoreo por parcela depende también del estado fenológico del alfalfar al momento de la defoliación, a punto tal que la permanencia de los animales en una parcela debería acortarse si la alfalfa se encontrara en un estado relativamente avanzado de madurez.

De lo expuesto, se desprende la dificultad para definir una única recomendación de manejo para pasturas base alfalfa. Al concepto de que la alfalfa puede ser manejada con sistemas de ocupación de parcela relativamente largos, sin desmedro de su persistencia y productividad (Bariggi y Romero, 1986; Romero *et al.*, 1995), se oponen recomendaciones a favor de períodos de pastoreo más cortos (Hall, 1994). En consecuencia, el período de permanencia en la parcela debe adecuarse al sistema de producción, a las diferencias de crecimiento del cultivo, que son propias del lugar geográfico, de la época del año, de las condiciones climáticas, de la longitud del ciclo de utilización y del grado de reposo invernal del cultivar.

### *Productividad de carne en sistemas con distinta duración del período de pastoreo*

En términos generales, se acepta que las diferencias de productividad animal entre sistemas de pastoreo parecen relacionarse directamente con la capacidad de lograr una mayor acumulación de MS global en la oferta de forraje (Ernst *et al.*, 1980; Heitschmidt *et al.*, 1987).

Ya ha sido analizado el evidente efecto detrimental del pastoreo continuo sobre la persistencia y la productividad de la pastura (Bariggi y Romero, 1986; Romero, 1981; Romero *et al.*, 1995). Sin embargo, las variantes entre sistemas rotativos *per se* no producen diferencias (Barker *et al.*, 1999; Bertelsen *et al.*, 1993; Rossanigo y Aragon, 2003; Smith *et al.*, 2000), o solo podrían explicar incrementos muy pequeños en productividad de carne cuando el resto de los componentes de un buen manejo de la pradera se mantienen inalterados (CREA, 1995; Kloster *et al.*, 2000).

Cuando se respeta un adecuado descanso entre pastoreos en cada época del año, el grado de subdivisiones o el período de ocupación de una parcela no constituye un factor de alto impacto sobre la productividad de las pasturas base alfalfa, siempre que este no supere la semana de duración. En este sentido, la elección de la carga animal apropiada juega un rol mucho más decisivo sobre las ganancias individuales de peso y la productividad por unidad de superficie (Kloster *et al.*, 2000).

En INTA Marcos Juárez se comparó un sistema de pastoreo rotativo convencional (7 días de ocupación por parcela) con otro de 2 días de

pastoreo por franja, manteniendo un descanso medio de 35 días entre defoliaciones e igual asignación de forraje entre sistemas. Los resultados promedio de tres ciclos de pastoreo de 12 meses (otoño a otoño) se presentan en la Tabla 1.

■ **Tabla 1.** Rendimiento de forraje y producción de carne en dos sistemas de pastoreo (SP) rotativo con períodos de ocupación de parcela de 2 y 7 días en la EEA INTA Marcos Juárez. Adaptado de Kloster *et al.* (2003).

Variable	SP-7 días	SP-2 días	Diferencia (%)	Signific. (p<0,05)
Producción de MS (kg ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> )	10.582	11.888	+ 12,3	**
Asignación (g MS kg p.v. <sup>-1</sup> )	27,9	27,8	-	NS
Carga animal (kg ha <sup>-1</sup> )	1099	1241	+ 12,9	**
Consumo (g MS kg p.v. <sup>-1</sup> )	18,0	18,5	-	NS
Eficiencia de cosecha (%)	64,8	66,9	-	NS
AMD (g día <sup>-1</sup> )	564	544	-	NS
Productividad (kg ha <sup>-1</sup> )	660	734	+11,2	*
Referencias: MS = materia seca; p.v. = peso vivo; AMD = aumento medio diario				

El efecto positivo que el sistema de dos días de ocupación tuvo sobre la producción primaria puede explicarse por su mayor número de defoliaciones (+ 1,17 por año), que generó un ciclo de pastoreo + descanso de 36 días (2 + 34), a diferencia del ciclo de 42 días (7 +35) del sistema control. En este sentido, Cosgrove y White (1990), tomando como escala de comparación unos pocos rebrotes, no detectaron diferencias en productividad de MS entre sistemas con 3 y 12 días de pastoreo, pero igual período de descanso. No obstante, dichos autores sugieren que, en el largo plazo, podrían ocurrir diferencias a favor de los sistemas de corta ocupación, dado que estos permiten incrementar ligeramente la cantidad de pastoreos por temporada (Cosgrove y White, 1990).

Al estar equiparados ambos sistemas en asignación de forraje (Tabla 1), la diferencia en productividad de MS a favor del SP-2d justificó en este un aumento medio de carga de 12,9 % con respecto al SP-7d. Con este planteo, a igualdad de asignación de MS y al no detectarse diferencias en AMD entre sistemas, la productividad de carne por ha de SP-2d superó en 11,2 % a la del SP-7d. Esta brecha, más que una situación

común, parece ser un punto casi extremo de la expectativa de beneficio logvable por modificación del sistema de pastoreo, manteniendo constante el resto de los factores de manejo. En general, en este tipo de pasturas, hay concordancia en otorgar al efecto aislado del sistema de pastoreo una chance muy baja para modificar la productividad de carne por unidad de superficie (Ernst *et al.*, 1980; Heitschmidt *et al.*, 1987; Thomet y Hadron, 2000).

### *Carga animal e intensidad de utilización de la pastura*

Se define como carga animal al número de animales en pastoreo por unidad de superficie, sin consideración alguna sobre la cantidad de forraje disponible en esta. En cambio, la presión de pastoreo se refiere al número de animales por unidad de forraje disponible (McMeekan, 1960). Esta última expresión o su inversa, la asignación de forraje, resulta mucho más indicativa de la intensidad de uso de la pastura que la carga. Como las variaciones de suelo y clima tornan muy difícil predecir la producción forrajera, el modo de extrapolar la producción animal a distintas condiciones de crecimiento de la alfalfa debería basarse en la relación entre la productividad individual y la asignación de forraje, o el porcentaje de utilización de la pastura, y no relacionarse solamente con la carga (Ustarroz *et al.*, 1997).

La carga animal es una variable de gran impacto sobre la producción de un sistema (McMeekan, 1960; Schlegel *et al.*, 2000; Ustarroz *et al.*, 1997; White, 1987). Esta junto con la cantidad de forraje producido, su valor nutritivo, el consumo y la eficiencia de transformación del forraje definen la productividad de un sistema ganadero (McMeekan y Walshe, 1963). Según Hodgson (1983), la mayor productividad por unidad de superficie que suele lograrse con un aumento de carga se relaciona, en buena medida, con una mayor eficiencia de utilización del forraje producido.

Por una parte, entre los efectos negativos del animal sobre la pastura, es necesario contabilizar la pérdida de plantas de alfalfa ante cargas instantáneas muy altas, sobre todo si el sistema de pastoreo no es el adecuado (White y Cosgrove, 1990). Por otra parte, también pueden afectarse algunas propiedades físicas del suelo conforme la presión de pastoreo se incrementa (Kloster y Gudelj, 2000).

La comprensión del equilibrio existente entre los principales procesos que intervienen en el crecimiento y la utilización de las pasturas es fundamental para optimizar el manejo del pastoreo. Un objetivo central de este consiste en lograr un alto porcentaje de utilización del forraje a través de un manejo adecuado de la presión de pastoreo o asignación de forraje.

Desde el punto de vista de la respuesta animal, debe considerarse que el efecto de la intensidad de utilización de la pastura sobre las ganancias individuales es diferente en las distintas épocas del año. En invierno, en estado vegetativo, las pasturas ofrecen gran facilidad de cosecha y la respuesta animal suele acompañar el nivel de asignación de forraje, dado que este normalmente es limitante. A principios de primavera esta situación de facilidad de cosecha persiste, la oferta de pasto aumenta y las ganancias individuales se independizan relativamente de la cantidad de forraje ofrecido. En verano, en cambio, las pasturas mixtas pierden calidad rápidamente y adquieren una estructura que dificulta su cosecha en pastoreo. Por ello, para obtener aceptables ganancias individuales en esta época del año, es necesario trabajar con una eficiencia de cosecha menor que la tolerada en primavera temprana. En la Tabla 2 puede apreciarse el diferente comportamiento de las ganancias individuales en dos estaciones del año (primavera vs. verano), y cómo el efecto de la asignación de forraje resulta más sensible en verano (Ustarroz *et al.*, 1997).

■ **Tabla 2.** Asignación de forraje, eficiencia de cosecha y respuesta animal en dos épocas de pastoreo. Adaptado de Ustarroz *et al.* (1997).

Época	Asignación MS (% de p.v.)	Eficiencia de cosecha (%)	Ganancia de peso (g día <sup>-1</sup> )
Primavera	3,3	75	1002
	4,4	64	1032
	7,9	39	1097
Verano	2,4	84	565
	2,8	78	595
	4,9	60,5	699

Referencias: MS = materia seca; p.v. = peso vivo.



Esta situación pareciera ser bastante general, ya que coincide con la información obtenida por el INTA General Villegas en el NO de Buenos Aires (Tabla 3), donde se reitera un panorama de similares ganancias de peso entre niveles de asignación de forraje durante la primavera y un quiebre notorio de estas en el verano (Tabla 3 Período 4).

■ **Tabla 3.** Ganancia de peso vivo y producción de carne en el período primavero-estival comparando distintos niveles de asignación de forraje en pasturas de alfalfa y gramíneas. EEA INTA General Villegas, Guía Práctica de Ganadería Vacuna (INTA-SAGPyA, 1998).

Asignación de forraje	Carga Animal	Ganancia diaria de peso (kg animal <sup>-1</sup> )					Producción en 105 días (kg ha <sup>-1</sup> )
		Períodos				Media	
		% de p. v.	kg p.v. ha <sup>-1</sup>	octubre	noviembre		
3,5	954	0,670	1,060	0,810	0,510	0,760	252
4,25	810	0,720	0,900	0,750	0,530	0,725	203
5,0	721	0,810	0,890	0,750	0,680	0,780	197

Referencias: p.v. = peso vivo.

Cuando se planifican aumentos de carga en el sistema, debiera tenerse en cuenta la particular estructura de las pasturas base alfalfa. La diferente distribución vertical de hojas y tallos en esta especie se traduce en diferencias de calidad (Tabla 4), facilidad de cosecha y consumo (Dougherty *et al.*, 1990), parámetros que suelen resentirse en primavera avanzada y verano. La porción superior de la cubierta vegetal posee mayor riqueza de hojas, más proteína y mayor digestibilidad (Buxton *et al.*, 1985; Frasinelli, 1994). A su vez, la mayor densidad de hojas de los estratos superiores facilita la cosecha y aumenta la tasa de consumo (Dougherty *et al.*, 1987, Dougherty *et al.*, 1990); lo opuesto ocurre cuando se profundiza la cosecha hacia planos más basales de la pastura (Dougherty *et al.*, 1990), mucho más ricos en tallos, de inferior calidad nutritiva (Buxton *et al.*, 1985).

Estas particularidades de estructura de la pastura tienen muchas implicancias prácticas sobre la respuesta a la intensidad de utilización de las pasturas base alfalfa, fundamentalmente en primavera avanzada y vera-

no. Con frecuencia, en esta época resulta necesario encontrar un punto de equilibrio entre la eficiencia de cosecha, la productividad por unidad de superficie y el nivel de ganancias individuales (Kloster *et al.*, 2003).

■ **Tabla 4.** Digestibilidad y contenido proteico del forraje de alfalfa en distintos estratos del canopeo durante el mes de diciembre. Adaptado de Frasinelli (1994).

Estratos del canopeo (cm)	Hoja verde		Tallo verde	
	DIVMS (%)	PB (%)	DIVMS (%)	PB (%)
+ de 30	74 a	26 a	67 a	14 a
20 a 30	69 b	27 a	58 b	9 b
10 a 20	69 b	28 a	54 b	9 b
0 a 10	68 b	28 a	41 c	8 b

Referencias: DIVMS = digestibilidad in vitro de la materia seca; PB = proteína bruta

A una escala temporal mayor, cuando Kloster *et al.* (2003) compararon la respuesta animal sobre pasturas de alfalfa consociada con gramíneas durante tres años, observaron que una mayor eficiencia de cosecha –lograda por medio de una asignación de forraje más baja– trajo aparejada una disminución de las ganancias individuales. En consecuencia, aunque la productividad por hectárea se incrementó, no lo hizo en la misma proporción que la variación de la asignación forrajera (Tabla 5).

La relación entre la carga animal, la ganancia de peso individual de los animales y la productividad de carne por hectárea resulta conocida y aceptada (Mott, 1960; Jones y Sandland, 1974), pero dada la multiplicidad de otros factores subyacentes resulta difícil de predecir en condiciones prácticas. Así, con porcentajes de utilización similares a los empleados en Marcos Juárez (Kloster *et al.*, 2003), Kugler y Barbarossa (1995) no encontraron diferencias en ganancia de peso entre dos niveles de carga bastante contrastantes en pasturas bajo riego. Estas respuestas poco convencionales podrían estar en sintonía con otros trabajos que no detectaron efectos de la carga sobre el consumo y la calidad del forraje consumido, posiblemente por una selección de dieta de los animales (Popp *et al.*, 1997a; Popp *et al.*, 1997b).

Resulta evidente que los sistemas con altas cargas permiten optimizar la producción por hectárea, justificando a menudo cierta disminución

del desempeño individual. Sin embargo, más allá de ciertos límites, esto conduce a una baja en las ganancias individuales, prolongando la duración de la invernada, lo cual repercute negativamente sobre la duración del ciclo productivo, la productividad y la velocidad de retorno del capital invertido en hacienda (Kloster *et al.*, 2003). Con todo, en el rango de cargas de uso práctico, puede esperarse cierto grado de compensación entre las ganancias individuales y la productividad por unidad de superficie. Desde luego, el ritmo de ganancias afectará –entre otros aspectos– el momento de venta de los animales, su grado de terminación y la reposición de terneros, cuyas implicancias a nivel de sistema habrá que analizar para cada empresa y situación en particular.

■ **Tabla 5.** Carga animal, eficiencia de cosecha y ganancias individuales de peso en un planteo pastoril permanente sobre pasturas base alfalfa (de otoño a otoño) en la EEA INTA Marcos Juárez INTA. Adaptado de Kloster *et al.* (2003).

Indicador	3,4 cab ha <sup>-1</sup> Media ± sd	4,8 cab ha <sup>-1</sup> Media ± sd	Diferencia (%)	Significancia (p<0,05)
Producción MS (kg ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> )	11685 ± 518	10785 ± 1066	- 9,1	**
Asignación (g MS kg p.v. <sup>-1</sup> )	32,3 ± 0,7	23,4 ± 0,6	- 27,5	**
Eficiencia de cosecha (%)	58,9 ± 5,5	72,4 ± 4,1	+ 22,9	**
Carga (kg ha <sup>-1</sup> )	1024	1364	+ 33,2	**
Peso inicial (kg)	188,3 ± 9,0	188,3 ± 9,0	-	NS
Peso final (kg)	414 ± 13,4	380 ± 7,8	- 8,2	**
AMD (g día <sup>-1</sup> )	609 ± 32,5	520 ± 5,3	- 14,6	**
Productividad (kg HG <sup>-1</sup> )	654 ± 62,4	752 ± 61,5	+ 15,0	**
Venta a 12 m invernada (%)	93,3 ± 2,9	61,7 ± 3,5	- 33,9	**

Referencias: MS = materia seca; cab = cabezas; p.v. = peso vivo; AMD = aumento medio diario; m = meses; HG= ha ganadera

### *Sistemas de pastoreo particulares. Líderes y seguidores*

Ya se ha analizado cómo las variaciones en la estructura de la cubierta vegetal de las praderas pueden tener gran influencia sobre el compor-

tamiento ingestivo de los animales en pastoreo y, por ende, sobre el consumo y la utilización del forraje (Hodgson, 1982; Poppi *et al.*, 1987; Dougherty *et al.*, 1990).

Frasinelli (1994) estudió la dieta y la composición morfológica de pasturas de alfalfa con un manejo que simulaba distintas condiciones de estado de la pastura, propias de un sistema de pastoreo rotativo con cambio semanal de parcela. El ensayo se realizó en primavera avanzada y, conforme disminuía la oferta de forraje, se modificaba el comportamiento ingestivo y la dieta, con un rango de variación del consumo de 101 a 61 g de MS kg de peso metabólico<sup>-1</sup>. La respuesta del animal, ante una menor disponibilidad de forraje y fundamentalmente un menor contenido de hojas, fue un aumento del tiempo de pastoreo y de la tasa de bocado que, sin embargo, no alcanzaron a compensar la disminución del consumo por reducción del peso del bocado (Tabla 6).

■ **Tabla 6.** Efecto de la biomasa aérea de una pastura de alfalfa sobre el consumo y las características de la dieta a fines de primavera con un manejo del pastoreo que simulaba distintas condiciones de la pastura. Adaptado de Frasinelli (1994).

Biomasa aérea kg ha <sup>-1</sup>	Consumo g MS kg <sup>-75</sup>	DIVMS (%)	Hojas (%)	PB (%)
4100	101 a	70 a	72 a	23 a
2900	80 ab	57 b	32 b	16 b
1000	61 b	49 c	19 c	16 b

Referencias: MS = materia seca; DIVMS = digestibilidad *in vitro* de la MS; PB = proteína bruta. Valores seguidos por la misma letra dentro de columnas no son estadísticamente significativos (p>0,05).

Esta respuesta no es una característica exclusiva de la alfalfa, ya que también se observó en leguminosas tropicales (Hendricksen y Minson, 1980), y se asemeja al patrón general descrito por Chacón y Stobbs (1976) para otras forrajeras. Esto ilustra las grandes variaciones en comportamiento ingestivo y consumo que ocurren durante la permanencia del animal en una parcela, bajo pastoreo rotativo, a medida que la cosecha de forraje avanza hacia los estratos más bajos del canopeo (Frasinelli, 1994).

En el período primavero-estival, cuando más abundante es la producción de la alfalfa, se impone obtener el mayor beneficio de la utilización

de este recurso. Sin embargo, en los sistemas pastoriles, el período estival suele ser crítico para sostener altos ritmos de engorde debido –entre otros factores– a esta particular arquitectura de la alfalfa, que se expresa con una relación hoja:tallo aún más adversa en primavera avanzada y verano (Zaniboni, 1990b). Para sortear este problema, además de otras prácticas, se han explorado algunas variantes del manejo del pastoreo como el sistema “líderes y seguidores”, en la búsqueda de una mejor utilización global de las alfalfas en esta época del año.

El método de pastoreo de líderes y seguidores fue concebido como un intento de particionar, por calidad y facilidad de cosecha, la oferta de forraje de una determinada área de pastoreo asignando cada fracción o componente de la oferta según los requerimientos de las distintas categorías de animales involucradas (Blaser, 1982). Dos condiciones deben ser satisfechas para lograr el máximo beneficio de la técnica: a) que las especies, o sus componentes morfológicos, ofrezcan un razonable gradiente de calidad y facilidad de cosecha en su perfil vertical; y b) que las categorías de animales en pastoreo tengan diferentes demandas nutricionales. La particular distribución vertical de hojas y tallos de leguminosas erectas tipo alfalfa, que concentran una mayor densidad de hojas en los estratos superiores (Buxton *et al.*, 1985; Frasinelli, 1994), satisface plenamente el primer requisito. Por su parte, la utilización de rodeos lecheros en distinta fase de lactancia (Archibald *et al.*, 1975; Campling, 1975), el pastoreo con animales de distinta edad (Redmon, 1995; Drennan, 1999), o aun la utilización de diferentes especies animales (Boswell y Cranshaw, 1978) son ejemplos de combinaciones que buscan aprovechar eficientemente cada fracción del forraje en oferta tratando de aumentar la productividad del conjunto.

La utilización de pasturas base alfalfa ofrece algunas oportunidades para aplicar este sistema de pastoreo. En un estudio realizado en INTA Marcos Juárez durante primavera avanzada y verano, Kloster *et al.* (2003) confrontaron un sistema rotativo convencional (con ocupación por franja de 6 días), con otro de líderes y seguidores en el que cada grupo ocupaba en forma sucesiva cada parcela durante 3 días. En la Tabla 7 se resumen los resultados obtenidos.

Para categorías con similares requerimientos y con niveles de asignación de forraje como los mostrados en la Tabla 7, resulta importante

lograr que el porcentaje de remoción parcial de los líderes se ubique en valores cercanos al 50 % de la disponibilidad inicial, a fin de evitar restricciones importantes en el consumo de los animales seguidores (Blaser, 1982). Precisamente, el manejo de la asignación forrajera del rodeo de seguidores, para evitar una subalimentación, es una de las dificultades para resolver en la aplicación rutinaria de este sistema (Campling, 1975). En ese sentido, Redmon (1995) sugirió, como límite práctico, cosechar con los animales líderes solo un tercio del forraje inicialmente ofertado. De todos modos, los valores orientativos que se definan no pueden independizarse de la carga y de la asignación de MS que se fije para los animales seguidores, a fin de no perjudicarlos en exceso.

■ **Tabla 7.** Peso vivo inicial, peso vivo final, ganancia diaria de peso y producción de carne por hectárea en dos sistemas de pastoreo: rotativo convencional (6 días de ocupación) y "líderes y seguidores" (3 días de ocupación de cada grupo). Adaptado de Kloster *et al.* (2003).

Variable	Sistema convencional	Sistemas líderes y seguidores	
		Líderes	Seguidores
Disponibilidad (kg MS ha <sup>-1</sup> )	1448 a	1447 a	855 b
Remanente (kg MS ha <sup>-1</sup> )	545 b	855 a	467 b
Asignación (g MS kg p.v. <sup>-1</sup> )	24,5 b	48,5 a	29,3 b
Relación hoja:tallo (oferta)	1,25 a	1,22 a	0,41 b
Eficiencia cosecha (%)	62,7 a	40,7 b	45,9 b
Consumo (g MS kg p.v. <sup>-1</sup> )	15,3 b	19,9 a	13,4 b
Peso final (kg. p.v.)	408 b	424 a	397 b
AMD (g día <sup>-1</sup> )	635 b	784 a	533 c
Productividad (kg carne ha <sup>-1</sup> ) (*)	295 ab	364 a	248 b

Referencias: MS = materia seca; p.v. = peso vivo; AMD = aumento medio diario. Letras diferentes entre columnas dentro de una fila indican diferencias significativas (p<0,05); en (\*) p<0,10.

De la información contenida en la Tabla 7 se advierte que la mayor asignación relativa de forraje al grupo de líderes, algo inherente a este sistema de pastoreo, incrementó su consumo de MS respecto del registrado en los seguidores. El menor consumo relativo de estos últimos pudo responder a la inferior calidad del forraje remanente o a dificultades de accesibilidad y cosecha en comparación con la situación de

líderes. Resulta conocido que, cuando la disponibilidad de forraje ofrece limitaciones, las características estructurales de la pastura anteponen una regulación no nutricional al consumo de forraje, siendo el comportamiento ingestivo el nexo entre las características de la pastura y el consumo (Poppi *et al.*, 1987).

La diferencia en ganancia de peso entre líderes y seguidores mostró que la técnica permitió mejores ganancias de peso en los primeros que aventajaron al grupo rotativo convencional, aunque a expensas del deterioro de las ganancias individuales del lote seguidor. No obstante, en esta situación, la ganancia de peso amalgamada de líderes y seguidores no se diferenció del sistema convencional, al igual que la productividad por unidad de superficie.

Las implicancias productivas de esta experiencia podrían resumirse en que, para categorías de requerimientos poco diferenciados, la técnica de "líderes y seguidores" puede ser de utilidad para privilegiar las ganancias individuales de una fracción del rodeo, asumiendo las dificultades del grupo postergado para lograr un desempeño similar al que obtendría la totalidad de los animales bajo la alternativa de un pastoreo conjunto. La utilización de categorías con marcadas diferencias de requerimientos (por ejemplo: novillos y vacas de cría) contribuiría a acrecentar los beneficios esperados. Con todo, la clásica división del rodeo de invernada en tropas "cabeza" y "cola" continúa siendo el espacio natural de aplicación de esta técnica, que siempre debiera contemplar un detenido análisis de los reales beneficios de su inserción en el manejo global del planteo productivo.

## Producción y manejo de alfalfa asociada con gramíneas templadas

La implantación de pasturas mixtas tiene virtudes de tipo agronómico que las tornan muy beneficiosas para el sistema de producción en su conjunto. El aporte de nitrógeno que realizan las leguminosas a través de la fijación biológica permite un significativo ahorro de fertilizantes. Por su parte, las gramíneas hacen un importante aporte de materia orgánica y mejoran la estabilidad estructural del suelo a través de su

sistema radicular en cabellera (Romero *et al.*, 1995; Rossanigo y Aragón, 2003; Scheneiter y Bertin, 1996; Zubizarreta, 1999).

La baja producción invernal y la concentración primavera-estival de la producción de las alfalfas puras (Bruno, 1993; Ustarroz *et al.*, 1997; Zaniboni y Dillon, 1999; Kloster *et al.*, 2003) son los primeros escollos para remover mediante la planificación e instrumentación de cadenas forrajeras de alta productividad y estabilidad (Ustarroz *et al.*, 1997). La articulación de planteos ganaderos eficientes, en los cuales los requerimientos nutricionales coincidan en oportunidad y magnitud con la oferta de las pasturas, determina la necesidad de recurrir a distintas alternativas tecnológicas para sortear el bache invernal de menor crecimiento de las praderas perennes (Kloster *et al.*, 2003).

Una de las opciones para mejorar la curva de la oferta de forraje de las pasturas de alfalfa es la incorporación de gramíneas perennes templadas (Kloster *et al.*, 2003; Scheneiter y Bertin, 1996; Thomet y Hadron, 2000). La utilización de una o más de estas especies asociadas a la alfalfa posiblemente no signifique una gran contribución a la producción total de materia seca con respecto al cultivo puro, pero constituye una alternativa para mejorar la oferta invernal de forraje (Kloster *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 1995; Rossanigo y Aragón, 2003). El manejo del pastoreo de estas pasturas mixtas debe orientarse al logro de una alta producción y calidad de forraje, además del mantenimiento del equilibrio de la mezcla a través del tiempo (Chamblee y Collins, 1988; Scheneiter y Bertin, 1996; Kloster y Zurbriggen, 2019).

Por una parte, la forma de crecimiento y los requerimientos fisiológicos de las especies componentes de una mezcla de leguminosas y gramíneas suelen ser muy distintos. En festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.), pasto ovilla (*Dactylis glomerata* L.) y otras gramíneas el crecimiento está asociado no solo a las reservas almacenadas en las raíces, rizomas y base de los macollos, sino también al área foliar remanente (Korte y Harris, 1987; White, 1973). Un crecimiento vigoroso de las gramíneas, por lo general, ocurre con altos niveles de reservas y remanentes de cierta cuantía. Pastoreos severos de estas especies conducen a rebrotes lentos, debilitamiento general y pérdida de macollos (Jones, 1983; Korte y Harris, 1987; Romero *et al.*, 1995). Un manejo inadecuado puede hacer desaparecer alguna de las especies compo-



nentes de la mezcla (Romero *et al.*, 1993). Por otro lado, las condiciones ambientales pueden hacer que el manejo óptimo de la mezcla difiera en cada estación de crecimiento (Scheneiter y Bertin, 1996; Zubizarreta, 1999; Kloster y Zurbriggen, 2019).

La información disponible muestra variaciones en el comportamiento productivo de la alfalfa pura frente a las asociaciones con otras forrajeras. Las mezclas con gramíneas templadas pueden manifestar o no incrementos en la producción de materia seca en comparación con la alfalfa pura. En casos favorables, el más típico incremento fue de 10-15 % para la mezcla (Chamblee y Collins, 1988). Los rendimientos obtenidos con alfalfas puras versus mezclas simples con festuca alta, pasto ovillo o agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey) en Anguil, General Villegas y Marcos Juárez, variaron entre 86 % y 104 % en relación con el rendimiento de la alfalfa pura, considerada como base 100 (Romero *et al.*, 1995).

En el área central de Santa Fe, Bruno *et al.* (1987) evaluaron bajo pastoreo la producción de mezclas simples de una alfalfa de reposo intermedio con festuca alta, cebadilla criolla (*Bromus catharticus* Vahl.) y pasto ovillo. Los resultados de cuatro años indicaron que la mezcla con festuca alta produjo 21 % más que la alfalfa pura, siendo esta diferencia mucho menor cuando el acompañante fue pasto ovillo. Las diferencias entre las mezclas y la alfalfa fueron más importantes en el tercer año (Tabla 8). Además, existieron diferencias entre las mezclas y el cultivo puro según las estaciones del año: en otoño e invierno las pasturas mixtas superaron a la alfalfa pura en 23,2 y 38,4 %, respectivamente; mientras que en verano la diferencia se redujo a solo 4,7 % (Tabla 9).

Otro aspecto para considerar en la comparación de las mezclas y la alfalfa pura es la evolución de las malezas (Bruno *et al.*, 1987). Si bien los resultados mostraron variaciones según la gramínea acompañante y la estación del año, en general, las pasturas mixtas tendieron a controlar mejor la invasión de malezas que la alfalfa pura (Tabla 9).

Entre las gramíneas perennes comúnmente usadas en asociación con la alfalfa, la festuca alta también fue la especie con mejor adaptación de acuerdo a un trabajo conducido en INTA Manfredi (Romero *et al.*, 1995) en el que se mostró mayor índice de área foliar y mayor número y tasa de producción de macollos que el resto de las gramíneas incluidas en

el estudio. En dicho trabajo, las alfalfas de reposo invernal intermedio ofrecieron mejores condiciones de crecimiento para las gramíneas que las alfalfas sin reposo. Las mayores tasas de muerte de hojas y macollos de las gramíneas se produjeron a principios del verano, por lo cual se concluyó que el manejo en esta época debe ser muy cuidadoso para no perjudicar este componente, sobre todo en las regiones templadas con veranos secos y calurosos.

■ **Tabla 8.** Producción de materia seca (MS) bajo pastoreo de una alfalfa de reposo invernal intermedio en cultivo puro o en mezclas simples con gramíneas templadas. Adaptado de Bruno *et al.* (1987).

Tipo de pastura	Períodos				Total
	1982/83	1983/84	1984/85	1985/86	
kg MS ha <sup>-1</sup>					
Alfalfa pura	11.519	11.080	4.844	4.862	32.305
Alfalfa + cebadilla	11.837	12.550	6.557	7.031	37.975
Alfalfa + festuca alta	12.406	12.904	6.358	6.780	38.448
Alfalfa + pasto ovillo	12.239	13.097	5.305	5.036	35.677

■ **Tabla 9.** Composición botánica (% de MS) de la biomasa aérea cosechada bajo pastoreo durante dos estaciones del año en pasturas de alfalfa pura y consociada con gramíneas templadas. Adaptado de Bruno *et al.* (1987).

Tipo de pastura	Época	Composición porcentual		
		Alfalfa	Gramíneas	Malezas
Alfalfa pura	Otoño	65,1	-	34,9
	Primavera	86,4	-	13,6
Alfalfa + cebadilla criolla	Otoño	50,9	33,6	15,5
	Primavera	56,2	41,2	2,6
Alfalfa + festuca alta	Otoño	44,9	47,5	7,6
	Primavera	71,2	26,4	2,4

El incremento del uso de variedades sin reposo registrado en los ambientes más húmedos de la región Pampeana norte dificulta aún más el mantenimiento de mezclas relativamente estables, debido a la alta frecuencia e intensidad de utilización de estos cultivares, lo cual colo-

ca a las gramíneas en situación de competencia con la alfalfa cada vez más crítica. En este sentido, la mezcla binaria de alfalfa y festuca alta tiene ventajas, en la región Pampeana, debido a su buena adaptación, productividad y complementariedad. No obstante, el manejo de la frecuencia e intensidad de defoliación resultan claves para mantener un balance estable entre especies. Trabajando con una mezcla de alfalfa sin reposo invernal y una festuca tipo norte europea, Kloster y Zurbriggen (2019) compararon durante dos años cuatro tratamientos resultantes de combinar dos asignaciones de forraje o intensidades de remoción (23 vs. 34 g MS kg p.v.<sup>-1</sup>) y dos frecuencias de pastoreo establecidos por diferentes sumas térmicas (GDA 350 °C vs. GDA 450 °C). El consumo de MS total (kg MS ha<sup>-1</sup>), utilizado como medida de rendimiento de la pastura efectivamente aprovechada por el animal, arrojó los resultados expuestos en la Tabla 10.

■ **Tabla 10.** Consumo de MS (kg MS ha<sup>-1</sup>) y cobertura basal final (%) de festuca y de alfalfa para una mezcla simple de alfalfa y festuca alta durante 23 meses de pastoreo. Adaptado de Kloster y Zurbriggen (2019).

Variable	23 g MS kg p.v. <sup>-1</sup> 350° GDA (T1)	34 g MS kg p.v. <sup>-1</sup> 350° GDA (T2)	23 g MS kg p.v. <sup>-1</sup> 450° GDA (T3)	34 g MS kg p.v. <sup>-1</sup> 450° GD (T4)
Consumo mezcla (Kg MS ha <sup>-1</sup> )	23.925 a	22.882 bc	21.960 b	19.795 c
Cobertura basal final alfalfa (%)	2,44 bc	2,17 b	5,53 a	5,95 a
Cobertura basal final festuca (%)	6,22 b	9,38 a	3,42 c	6,58 ab

En términos generales, por una parte, los pastoreos frecuentes y laxos lograron una buena participación de la gramínea en la biomasa prepastoreo (T2), lo cual también se pudo corroborar por la buena cobertura final de la gramínea. En cambio, si el efecto buscado fuera lograr una mayor producción total de la mezcla, el mejor tratamiento sería T1 porque combinó una alta remoción de forraje con pastoreos más frecuentes, aunque en detrimento de la persistencia del componente alfalfa. Finalmente, T4 –que combinó pastoreos laxos con frecuencias largas– fue la peor alternativa en términos de consumo o acumulación

netas de biomasa, aunque logró preservar los mayores niveles de persistencia en ambos componentes de la mezcla.

Por lo tanto, la producción de las mezclas y el aporte de las gramíneas dependerán de las condiciones de suelo y clima de la región, del cultivar de alfalfa, de la especie y del cultivar de gramínea utilizado, del sistema y la densidad de siembra y del manejo impuesto (Romero *et al.*, 1995). Por otra parte, las gramíneas permiten alargar la vida útil de la pastura cuando se registran condiciones desfavorables para la persistencia de la alfalfa (Scheneiter y Bertin, 1996) y reducen los riesgos de meteorismo (Romero *et al.*, 1995; Popp *et al.*, 2000), un aporte particularmente importante para los sistemas de producción más extensivos.

## Integración del manejo de la alfalfa al sistema de producción

Como ya se ha destacado, el manejo del pastoreo juega un rol fundamental en los resultados obtenidos en la utilización de pasturas base alfalfa. En condiciones ideales, un buen manejo debiera asegurar no solo la persistencia de una pastura de buena producción, sino también la cosecha de una alta proporción de pasto por parte del animal y un razonable nivel de consumo voluntario. Todo eso debería traducirse en buenas ganancias de peso individuales y altos valores de producción de carne por unidad de superficie.

El patrón de la curva de crecimiento de la alfalfa está determinado por las condiciones ecológicas (suelo, humedad y temperatura) de cada zona. El sitio geográfico impone las principales limitantes, condicionando incluso la expresión del grado de reposo invernal que genéticamente posea cada cultivar. En los ambientes templado-húmedos, más favorables, el crecimiento suele presentar dos picos de producción: uno en primavera y otro en otoño. Por el contrario, en zonas con más limitantes hídricas o térmicas, el crecimiento de la alfalfa está prácticamente concentrado en un período de 4 a 5 meses, donde se registra más del 60-65 % de la producción total anual del cultivo.

En la planificación del sistema de producción resulta indispensable conocer la distribución de la oferta de forraje a lo largo del año. De esta

forma se pueden diseñar planteos ganaderos que copien de la mejor manera posible la curva de oferta forrajera. Las variaciones estacionales de producción en pasturas base alfalfa son de tal magnitud que solo se podría realizar un total aprovechamiento del forraje producido mediante el uso de un esquema de carga animal variable. Esto resultaría no solo impráctico, sino también poco factible de implementar en explotaciones comerciales, dado que solo dentro de ciertos límites se puede variar la carga o destinar el excedente de forraje para la confección de reservas.

Altas eficiencias de cosecha en primavera solo se logran con cargas superiores a la receptividad invernal de las pasturas perennes. Para ello, en un sistema de producción real, con las ya mencionadas restricciones para modificar la carga, lo aconsejable sería instrumentar una estrategia de alimentación tal que permita sortear el invierno con una carga relativamente alta de animales de bajos requerimientos, a fin de contar en primavera-verano con las bocas suficientes para cosechar eficiente y oportunamente todo el pasto producido en esta época del año (Kloster *et al.*, 2003).

Desde 1971 funciona en INTA una Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Alfalfa que, conducida bajo condiciones de corte, abarca un amplio rango de suelos y climas y cuyos últimos resultados se detallan en el capítulo 8 de este libro. La red ofrece información acerca de la estabilidad del comportamiento productivo y sanitario de las distintas variedades, así como valores de productividad potencial de MS en cada zona. Esta información es de fundamental utilidad para la elección de los materiales para sembrar en una determinada área. Además, permite disponer de estimaciones acerca de las producciones medias por estación y de la variación del intervalo entre cortes para las distintas estaciones, variedades y años en cada localidad (Spada, 2004).

El desglose de la información proporcionada por esos ensayos de evaluación reafirma la marcada estacionalidad productiva de la alfalfa, cuyas tasas de crecimiento pueden ser inferiores a 10 kg de MS por ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en el invierno, o superiores a 90-100 kg de MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en primavera. Esta asimetría en la distribución estacional de la producción de MS constituye uno de los mayores desafíos para el manejo de la carga en un sistema productivo que busca optimizar, bajo pastoreo, la utilización de una alta proporción del forraje producido.

En este sentido, Bruno (1993) y Zaniboni y Dillon (1999), comparando cultivares de distinto grado de reposo invernal bajo pastoreo, no encontraron diferencias significativas en producción total de materia seca entre grupos de reposo, pero sí en tasa de crecimiento diario ( $\text{kg MS ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ). Esto significa que entre grupos de diferente reposo invernal pueden alcanzarse producciones semejantes, pero con diferente número de cortes o pastoreos anuales, lo que se traduce en distintos patrones de distribución de la producción. En otoño-invierno, los cultivares sin reposo presentaron tasas de crecimiento de aproximadamente  $10 \text{ kg MS ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$  superiores a los de reposo intermedio; por su parte, estos últimos produjeron en primavera-verano entre 10 y 20  $\text{kg MS ha}^{-1} \text{ día}^{-1}$  más que los primeros (Figura 5). Este comportamiento genera curvas de producción con una distribución algo más equilibrada que la de los cultivares de mayor reposo invernal, lo cual facilita el manejo de la carga animal (Zaniboni y Dillon, 1999).

Como ya se mencionó, la eficiencia de utilización de pasturas base alfalfa mejora con altos índices de cosecha, para lo cual la carga animal constituye una importante herramienta de manejo. No obstante, en el proceso global de transformación del forraje en carne, tampoco se debe perder de vista la eficiencia de conversión del forraje consumido.

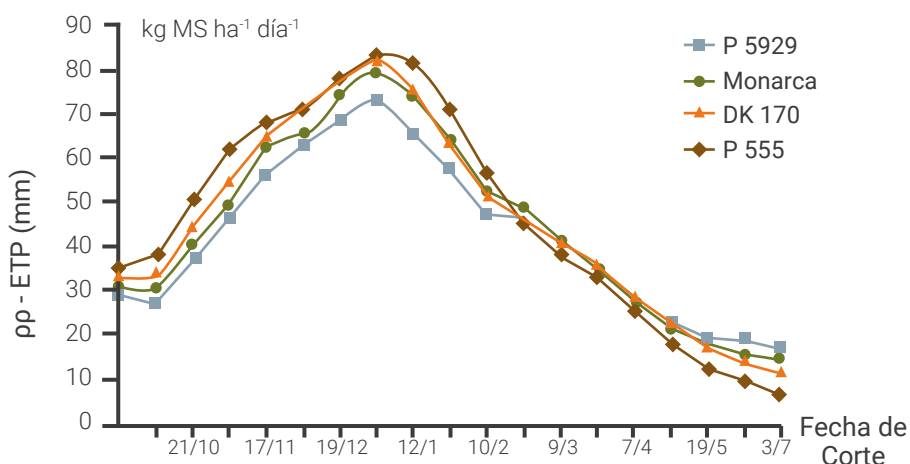
En condiciones de pastoreo, la respuesta animal está determinada por la cantidad de nutrientes cosechados desde la pastura (Popp *et al.*, 2000). El valor nutritivo es uno de los principales factores de la pastura que afectan el consumo voluntario y, a través de él, la respuesta animal (Popp *et al.*, 2000; Marten *et al.*, 1988). En esto incide negativamente el normal incremento de la proporción de tallos con respecto a las hojas conforme avanza el estado de madurez (Romero *et al.*, 2002). En el mismo sentido, aumenta la proporción de lignina de la pared celular y decrece el contenido proteico, reduciéndose así la digestibilidad y el consumo.

La lignina no solo es indigestible *per se*, sino que también baja la digestibilidad de los compuestos que con ella se combinan. Habitualmente se acepta que la digestibilidad del forraje decrece alrededor del 10 % por cada unidad de incremento en el porcentaje de lignina.

El proceso de pérdida de calidad que ocurre conforme avanza la temporada de utilización o la duración de cada rebrote es variable en magnitud según la época del año, el grado de reposo del cultivar y la edad del culti-

vo. Durante primavera-verano, cuando la tasa de crecimiento es de 70 a 90 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, en un período de 30 a 35 días se pueden acumular más de 2500 kg de MS ha<sup>-1</sup> y el cultivo puede alcanzar los 60-70 cm de altura; en estas condiciones, la relación hoja:tallo es más alta que en el otoño (Figura 6), cuando el cultivo solo alcanza los 30-40 cm de altura y tiene una tasa de crecimiento de 40 kg MS ha<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. A partir de la primavera avanzada, la merma de calidad es muy gravitante por cada día de retraso en la cosecha desde el estado vegetativo hasta la primera floración.

Además de la presión de pastoreo o la asignación de forraje por animal, debe establecerse un esquema que permita, para cada estación climática, la utilización en estados de madurez adecuados, a fin de favorecer la producción de forraje de calidad y atenuar las clásicas fluctuaciones estacionales que generalmente marcan sus efectos negativos en primavera avanzada y verano.



■ **Figura 5.** Tasas de crecimiento diario a lo largo de la temporada de alfalfas de distinto grado de reposo invernal. Adaptado de Zaniboni y Dillon (1999).

Está ampliamente aceptado que la utilización de la alfalfa al 10 % de floración resulta un punto de compromiso para equilibrar alta producción, buena persistencia y aceptable calidad (Smith, 1972; Van Keuren y Matches, 1988). Sin embargo, varios autores (Bariggi y Romero, 1986; Maddaloni y Sola, 1985; Popp *et al.*, 2000), al estudiar la longitud del período entre cortes o pastoreos, han concluido que el momento óptimo de uso de la alfalfa para compatibilizar rendimiento, persistencia y

una mejor calidad, es el estado de prebotón floral durante la primavera-verano y cuando los rebrotes basales alcanzan los 5 cm en el otoño (Romero *et al.*, 1995; Rossanigo y Aragon, 2003). También ha sido propuesto como meta que durante la primavera-verano, la dieta ofrecida debería tener valores de digestibilidad cercanos al 70 %, lo que conduciría a niveles razonables de incremento calórico (Reynolds *et al.*, 1991), a buenos valores de concentración energética en el alimento y a un buen balance energético-proteico (Marten *et al.*, 1988).

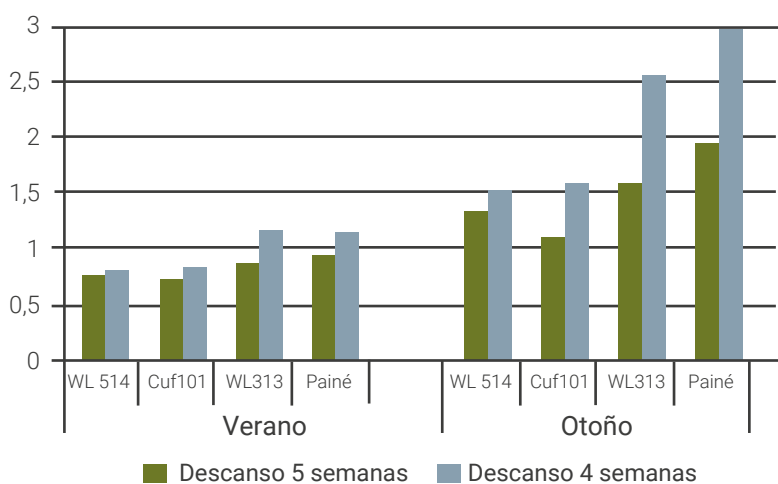


Figura 6. Relación hoja:tallo durante verano y otoño en alfalfas de distintos grados de reposo invernal sometidas a dos frecuencias de corte. Zaniboni (1990b).

En la práctica, son relativamente bajas las posibilidades de compatibilizar la eficiencia de cosecha de nutrientes con la planificación de los primeros pastoreos de la alfalfa en primavera (fase exponencial de la curva de crecimiento). Una manera de atenuar el problema podría ser la anticipación programada de cortes para henificación, pero cambiando su rol de transferencia de excedentes por el de una herramienta para disminuir las pérdidas de calidad. Otra medida de manejo consiste en acelerar el avance de los pastoreos rotativos (por ejemplo: rotaciones de 28 días), cuidando de no acortar demasiado el período de pastoreo en pasturas de 1-2 años; se tratará, en todos los casos, que la alfalfa salga del invierno con suficientes reservas. Esto se logra con adecuados descansos para cada estación y tratando de que la cosecha de forraje no supere el crecimiento diario.



Las recomendaciones del INTA Manfredi concuerdan en que una alta carga en primavera mejora la eficiencia de uso del forraje, pero cuando esta última supera el 70-75 % se resienten las ganancias individuales. Un elemento adicional del manejo en primavera avanzada y verano, cuando los remanentes de forraje en las parcelas son relativamente importantes, es el “desbrozado” mecánico de las pasturas. En esta época, los altos residuos pos pastoreo transfieren poco forraje valioso al pastoreo siguiente y perjudican notoriamente la cantidad y calidad del rebrote (Leach, 1979).

El siguiente ejemplo ilustra las ventajas de disponer de datos prediales propios o zonales para el cálculo de la receptividad de una pastura base alfalfa. El mismo supone un caso hipotético para la zona NO de la provincia de Buenos Aires, con muy buenas pasturas, estratificadas de 1 a 4,5 años de vida, en suelos de buena aptitud y con producciones medias del orden de 15 t de MS ha<sup>-1</sup>año<sup>-1</sup>. Se asumen metas definidas de productividad individual (550-600 g día<sup>-1</sup> de AMD), utilización de las pasturas en estados fenológicos apropiados y eficiencias de cosecha próximas al 80 % en invierno y al 65-70 % en primavera y verano. Se propone que la carga animal sea la consecuencia de la tasa de crecimiento del forraje en las distintas estaciones, con una asignación de forraje prefijada en cada época del año en función de las metas productivas y los requerimientos de la alfalfa. Es decir,

$$\text{Carga animal (kg p.v. ha}^{-1} \text{ d}^{-1}) = \text{Tasa media de crecimiento (g MS ha}^{-1} \text{ d}^{-1}) / \text{asignación de forraje (g MS Kg pv}^{-1})$$

En ese contexto, a título de ejemplo, se estima como criterios de orientación para el NO de la provincia de Buenos Aires y NE de La Pampa:

- De marzo a junio (120 días), con un máximo de tres pastoreos y con descansos de 35-40 días:

$$\text{Carga animal} = 30.000 \text{ g MS ha}^{-1} \text{ d}^{-1} / 32,5 \text{ g MS kg pv}^{-1} = 923 \text{ kg p.v. ha}^{-1}$$

- De julio a septiembre (70-80 días), normalmente con un solo pastoreo y con un descanso de 60-70 días:

$$\text{Carga animal} = 15.000 \text{ g MS ha}^{-1} \text{ d}^{-1} / 25 \text{ g MS kg pv}^{-1} = 600 \text{ kg p.v. ha}^{-1}$$

- De septiembre a febrero (160-170 días), con cinco pastoreos y con algunos descansos de 28 días:

$$\text{Carga animal} = 60.000 \text{ g MS ha}^{-1} \text{ d}^{-1} / 37,5 \text{ g MS kg pv}^{-1} = 1600 \text{ kg p.v.ha}^{-1}$$

En primavera avanzada y verano, asumiendo la dificultad de cosecha en esta época y la necesidad de transferencia de forraje, y para evitar riesgos de bajas ganancias individuales (Zaniboni y Dillon, 1999), se podría trabajar con una carga de 1200-1300 kg p.v. ha<sup>-1</sup>. En este caso, quedaría disponible una cantidad suficiente de forraje excedente que es necesario remover por desbrozado mecánico o aumentando la confección las reservas de heno que demandaría el sistema.

Por lo tanto, la cuantificación del crecimiento y de la calidad del forraje serían elementos fundamentales para diseñar y ajustar la estrategia de utilización de las pasturas base alfalfa. Por un lado, la tasa de crecimiento debería ser un insumo básico en la determinación de la carga para utilizar; por el otro, el seguimiento de la calidad debería constituir la guía para el manejo cotidiano de la presión de pastoreo, de los remanentes y de la necesidad de suplementación (Kloster *et al.*, 2003). En este sentido, el personal a cargo de las pasturas y de los animales podría protagonizar un impacto positivo, en la medida que se lo capacite y se lo dote de herramientas y criterios simples y sólidos para realizar la conducción y seguimiento del pastoreo.

Por último, independientemente de la superficie que ocupen las pasturas base alfalfa, para su correcto aprovechamiento resulta igualmente importante la eficiencia con que se maneja el sistema en su conjunto. Esto supone la adecuación de los planteos ganaderos a las posibilidades de manejo reales, el diseño de cadenas de pastoreo, el uso de reservas y suplementación y el seguimiento cotidiano del equilibrio entre dieta y requerimientos.

## Consideraciones finales

Algunos aspectos particulares del crecimiento de la alfalfa requieren especial consideración, pues de ello depende la productividad del cultivo. La morfología, las características fisiológicas y el grado de latencia

invernal de cada cultivar condicionan el sistema de utilización, cuyo dinamismo bajo pastoreo requiere, a su vez, ajustes permanentes.

La alfalfa presenta ciclos de crecimiento bien definidos, pero íntimamente relacionados con las condiciones climáticas. La madurez fisiológica, aun con sus limitaciones, sería el criterio ideal para determinar el momento apropiado de uso. La aparición de rebrotes de corona o el número de días entre cortes o pastoreos son indicadores que, tomando ciertos recaudos, también pueden ser utilizados. La mejor estrategia consiste en aplicar una combinación de criterios que permita tener un mejor control sobre el volumen y la calidad del forraje producido.

Un eficiente aprovechamiento de las pasturas base alfalfa debiera centrar el esfuerzo en lograr una alta producción de forraje de calidad, una buena distribución a lo largo del año y un manejo que comprometa de la menor manera posible su persistencia. El corolario de un buen aprovechamiento, en todos los casos, debiera traducirse en una alta productividad de carne por unidad de superficie.

La compatibilización de buenos ritmos de ganancias individuales con una alta productividad por unidad de superficie constituye el eje de los planteos de intensificación de las invernadas pastoriles. Por lo tanto, para llevar a cabo invernadas cortas sobre pasturas base alfalfa, se recomienda operar con valores medios de eficiencia de cosecha no superiores al 70 %, permitiendo así mantener ganancias individuales promedio de 500-600 g día<sup>-1</sup>. Para ello, resulta fundamental realizar un ajustado manejo del pastoreo en las distintas épocas del año, con todo lo que ello implica en lo relativo a carga, intensidad y frecuencia de defoliación, categoría de animales, etc. Este proceso, junto con la correcta utilización de los excedentes forrajeros como reservas y un uso estratégico mínimo de concentrados, permitirá aspirar en las zonas de mayor potencial forrajero a invernadas con una productividad de 550 a 800 kg de carne por hectárea ganadera.

## BIBLIOGRAFÍA

- ARCHIBALD, K.A.E.; R.C. CAMPLING; W. HOLMES. 1975. *Milk production and herbage intake of dairy cows kept on a leader and follower grazing system. Anim. Prod.* 21:147-156.
- BARIGGI, C.; A. CRAGNAZ; R. ROSSANIGO; M. ZANELLI; R. HERNÁNDEZ; N. ROMERO. 1979. *Estudio de la persistencia y producción de la alfalfa sola y consociada con gramíneas bajo tres sistemas de siembra. INTA. Proyecto PNUD-FAO-INTA Arg. 75/006. Doc. de Trabajo N.º 6. 66 p.*
- BARIGGI, C.; N. ROMERO. 1986. *Capítulo 5. Crecimiento de la alfalfa y utilización e la región pampeana. En: BARIGGI, C.; C.D. ITRIA; V.L. MARBLE; J.M. BRUN (eds.). Investigación, tecnología y producción de alfalfa. Colección Científica del INTA, Buenos Aires. 119-159 pp.*
- BARKER, J.M.; D.D. BUSKIRK; H.D. RITCHIE; S.R. RUST; R.H. LEEP; D.J. BARCLAY. 1999. *Intensive grazing management of smooth bromegrass with or without alfalfa or birdsfoot trefoil. Heifers performance and sward characteristics. The Professional Anim. Scientist. Vol 15:130-135.*
- BERTELSEN, B.S.; D.B. FAULKNER; D.D. BUSKIRK; J.W. CASTREE. 1993. *Beef cattle performance and forage characteristics of continuous, 6-paddock, and 11-paddock grazing systems. J. Anim. Sci.* 71: 1381-1389.
- BLASER, R.E. 1982. *Integrated pasture and animal management. Tropical Grassland* 16:19-23.
- BLASER, R.E.; R.C. HAMMES; J.P. FONTENOT; H.T. BRYANT; C.E. POLAN; D.D. WOLF; F.S. MCCLAUGHERHERTY; R.G. KLINE; J.S. MOORE. 1986. *Forage-Animal Management Systems. Virginia Agric. Exp. Station. Virginia Polytechnic Institute and State University. Bulletin 86-7. 91 p.*
- BOSWELL, C.C.; L.J. CRANSHAW. 1978. *Mixed grazing of cattle and sheep. Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 38: 116-120.
- BROWN, R.H.; R.B. COOPER; R.E. BLASER. 1966. *Effect of leaf age on efficiency. Crop Sci.* 6: 206-209.
- BRUNO, O.; L.A. ROMERO; J.L. FOSSATI; O.R. QUAINO. 1987. *Evaluación de mezclas simples de alfalfa y gramíneas bajo pastoreo. Producción de pasturas para engorde y producción de leche. IICA-PROCISUR, Montevideo (Uruguay). Diálogo* 19. 121-125 pp.
- BRUNO, O. 1993. *Distribución de la producción y valor nutritivo de la alfalfa. Resúmenes IV Jornadas Nacionales de Alfalfa y I Simposio Nacional de Alfalfa. Villa María, Córdoba. 22 p.*
- BUXTON, D.R.; J.S.HORNSTEIN; W.P. WEDIN; G.C. MARTEN. 1985. *Forage quality in stratified canopies of alfalfa, birdsfoot trefoil, and red clover. Crop Sci.* 5: 273-279.
- CHACON, E.; H. STOBBS. 1976. *Influence of progressive defoliation of a grass sward on the eating behavior of cattle. Aust. J. Agric. Res.* 27: 709-727.
- CAMPLING, R.C. 1975. *Systems for grazing management for dairy cows. Occ. Symp. N.º 8. Br. Grassld. Soc.* 113-117 pp.

- CHAMBLEE, D.S.; M. COLLINS. 1988. *Relationships with other species in a mixture*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. Hill (Jr.). (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, Wisconsin. EUA. 439-461 pp.
- COMERON, E.A.; L.A. ROMERO; O.A. BRUNO. 1997. *Efecto del nivel de carga animal sobre la pastura de alfalfa en un sistema de pastoreo rotativo*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 17 (Sup. 1): 82.
- COSGROVE, G.P.; J.G.H. WHITE. 1990. *Lucerne grazing management. 1. Effect of grazing duration on herbage accumulation*. *N. Z. J. Agric. Res.* 33: 615-620.
- COUNCE, P.A.; J.H. BOUTON; R.H. BROWN. 1984. *Screening and characterising alfalfa for persistence under mowing and continuous grazing*. *Crop. Sci.* 24: 282-285.
- CRAGNAZ, A.G. 1988. *Investigaciones y progresos en el manejo de la alfalfa. I. Efecto del período de pastoreo y descanso sobre la productividad (Conferencia)*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol 8: 501-516.
- CRAGNAZ, A.G.; R.O. ROSSANIGO. 1985. *Informe de progresos en producción de pasturas de alfalfa. Período 80/85. Documento interno. EEA INTA Marcos Juárez*.
- CREA. 1995. *De pasto a carne y leche*. *Revista CREA Año XXX, N.º 178*: 60-61.
- DOUGHERTY, C.T.; N.W. BRADLEY; P.L. CORNELIUS; L.M. LAURIAULT. 1987. *Herbage intake rates of beef cattle grazing alfalfa*. *Agron. J.* 79: 1003-1008.
- DOUGHERTY, C.T.; M. COLLINS; N.W. BRADLEY; P.L. CORNELIUS; L.M. LAURIAULT, L.M. 1990. *Moderation of ingestive behaviour of beef cattle by grazing-induced changes in lucerne swards*. *Grass and Forage Sci.* 45: 135-142.
- DOUGLAS, J.A. 1986. *The production and utilisation of lucerne in New Zealand*. *Grass and Forage Sci.* 41: 81-128.
- DRENNAN, M.J. 1999. *Development of a Competitive Suckler Beef Production System*. *Irish Agriculture and Food Development Authority. Grange Research Centre, Dunsany, Co. Meath.* 21 p.
- ERNST, P.; Y.L.P. LE DU; L. CARTIER. 1980. *Animal and sward production under rotational and continuous grazing management. A critical appraisal*. En: PRINS W.H.; G.H. ARNOLD (Eds). *The rol of nitrogen in intensive grasslands production*. Pudoc. Wageningen. Países Bajos 119-126 pp.
- ESCUDE, C.J. 1996. *Manejo de la defoliación. Efecto de la carga y métodos de pastoreo*. En: CANGIANO, C.A. (ed.). *Producción animal en pastoreo*. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce. Balcarce, Argentina. 65-83 pp.
- FRASINELLI, C.A. 1994. *Influencia de algunas características de pasturas de alfalfa (Medicago sativa L.) sobre el comportamiento ingestivo de novillos en pastoreo*. Tesis de Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP, Argentina. 125 p.
- GONELLA, C.A. 1992. *Producción de carne sobre pasturas perennes en el Noroeste de la Provincia de Buenos Aires*. *Publicación Técnica N.º 10*. EEA Gral. Villegas, INTA. 17 p.

- HALL, M.H. 1994. *Grazing alfalfa in Pennsylvania*. Agronomy Facts 42. College of Agricultural Sciences. The Pennsylvania State University. 2 p.
- HEITSCHMIDT, R.K.; S.L. DOWHOWER; J.W. WALKER. 1987. 14- vs. 42- paddock rotational grazing. Aboveground biomass dynamics, forage production and harvest efficiency. *J. Range. Management* 40: 216-223.
- HENDRICKSEN, R.; D.J. MINSON. 1980. The feed intake and grazing behaviour of cattle grazing a crop of *Lablab purpureus* cv. Rongai. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 95: 547-554.
- HERNANDEZ, O.A. 1969. Efecto del descanso otoñal y primaveral de alfalfares sobre la producción animal y longevidad del cultivo. Sus relaciones con el control del pasto puna (*Stipa brachichaeta* Godr.). RIA. Serie 2: Biología y Producción Vegetal. Vol 6 (25): 383-405.
- HODGSON, J. 1982. Variations in the surface characteristics of the sward and the short-term herbage intake by calves and lambs. *Grass and Forage Sci.* 36: 49-57.
- HODGSON, J. 1983. La relación entre la estructura de las praderas y la utilización de plantas forrajeras tropicales. En: PALADINES, O.; C.E. LASCANO (ed.). Germoplasma forrajero bajo pastoreo en pequeñas parcelas. Metodología de Evaluación. CIAT. 33-47 pp.
- HODKINGSON, A. 1974. Influence of partial defoliation on photosynthesis, photorespiration, and transpiration by lucerne leaves at different ages. *Austr. J. Pl. Phys.* 1: 561-578.
- INTA-SAGPYA. 1998. *Guía Práctica de Ganadería Vacuna. Región Pampeana*. EEA General Villegas. 56 p.
- JONES, E.L. 1983. The production and persistency of different grass species cut at different heights. *Grass and Forage Sci.* 38: 79-87.
- JONES, R.J.; R.L. SANDLAND. 1974. Relations between animal gain and stocking rate. Derivation of the relation from the results of grazing trials. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 83: 335-342.
- JUNG, H.G.; R.W. RICE; I.J. KOONG. 1985. Comparison of heifer weight gains and forage quality for continuous and short duration grazing systems. *J. Range Manage.* 38:144-148.
- KLOSTER, A.M.; N.J. LATIMORI; M.A. AMIGONE. 2000. Evaluación de dos sistemas de pastoreo rotativo a dos niveles de asignación de forraje en una pastura de alfalfa y gramíneas. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol 20 (3-4): 1-12.
- KLOSTER, A.M.; O.E. GUDELJ. 2000. Indicadores físicos del suelo en una pastura de alfalfa y gramíneas bajo dos sistemas rotativos y dos presiones de pastoreo. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol 20 (Supl.1): 228-229.
- KLOSTER, A.M.; N.A. LATIMORI; M.A. AMIGONE. 2003. Efecto del sistema de pastoreo y de la carga sobre la productividad de carne en una pastura base alfalfa. Informe Técnico N. ° 129, EEA Marcos Juárez. 14 p.
- KLOSTER, A.M.; N.J. LATIMORI; M.A. AMIGONE. 2003. Comparación de sistemas de pastoreo (convencional vs líderes y seguidores) en una pastura de alfalfa y gramíneas. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol 23 (1): 25-32.

KLOSTER, A.M.; N.J. LATIMORI; M.A. AMIGONE; C. GHIDA DAZA. 2003. *Capítulo VII Invernada de alta producción sobre pasturas base alfalfa*. En: LATIMORI, N.J.; A.M. KLOSTER (ed.). *Invernada bovina en zonas mixtas*. INTA Marcos Juárez. Agro de Córdoba 12. Editorial Editor S.A., San Juan, Arg. 226-247 pp.

KLOSTER, A.M.; N. LATIMORI; G. ZURBRIGGEN; M. GARIS. 2017. *Comparación de dos alternativas de invernada intensiva con biotipos británicos*. *Información para Extensión en línea* N.º 25, EEA Marcos Juárez, INTA. 9 p.

KLOSTER, A.M.; G. ZURBRIGGEN. 2019. *Producción y persistencia de una mezcla de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) bajo intensidades y frecuencias de pastoreo contrastantes*. *Rev. RIA*. Vol. 45 (1): 46-53.

KORTE, C.J.; W. HARRIS. 1987. *Effects of grazing and cutting*. En: SNAYDON, R.W. (ed.). *Managed Grasslands. B. Analytical Studies*. Elsevier Science Publishers B.V. Ámsterdam, Países Bajos. 71-79 pp.

KUGLER, N.M.; R.A. BARBAROSSA. 1995. *Engorde de vaquillonas en una pastura de alfalfa y agropiro con dos niveles de uso*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol 15: (1): 59-62.

LEACH, G.J. 1979. *Regrowth characteristics of lucerne under different systems of grazing management*. *Aust. J. Agric. Res.* 30: 445-465.

LEACH, G.J. 1983. *Influence of rest interval, grazing duration and mowing on the growth, mineral content and utilization of a lucerne pasture in a subtropical environment*. *J. Agric. Sci. (Camb.)*101: 169-183.

MADDALONI, J.; S. SOLA. 1985. *Frecuencia de corte en alfalfa*. Informe Técnico N.º 206, EEA Pergamino, INTA.

MCKINNEY, G.T. 1974. *Management of lucerne for grazing of the southern tablelands of New South Wales*. *Aust. Exp. Agric. Anim. Husb.* 14: 726-734.

MCMEEKAN, C.P. 1960. *Grazing management*. *Proceedings of the 8th International Grasslands Congress*. 21-27 pp.

MCMEEKAN, C.P.; M.J. WALSHE. 1963. *The inter-relationships of grazing method and stocking rate in the efficiency of pasture utilisation by dairy cattle*. *J. Agric. Res. (Camb.)* 61: 147-166.

MARTEN, G.C.; D.R. BUXTON; R.F. BARNES. 1988. *Feeding Value (Forage Quality)*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL (Jr.) (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, Wisconsin. EUA. 463-491 pp.

MOOT, D.J. 2014. *A review of recent research and extension on dryland lucerne in New Zealand*. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. Vol 74: 86-93.

MOTT, G.O. 1960. *Grazing pressure and the measurement of pasture production*. *Proceedings of the 8th International Grasslands Congress*. 606-611 pp.

POPP, J.D.; W.P. MCCAUGHEY; R.D.H. COHEN. 1997a. *Effect of grazing system, stocking rate and season of use on diet quality and herbage availability of alfalfa grass*

PASTURES. CAN. J. ANIM. SCI. 77: 111-118.

POPP, J.D.; W.P. MCCAUGHEY; R.D.H. COHEN. 1997b. *Effect of grazing system, stocking rate and season of use on herbage intake and grazing behaviour of stocker cattle grazing alfalfa-grass pasture. Can. J. Anim. Sci. 77: 677-682.*

POPP, J.D.; W.P. MCCAUGHEY; R.D.H. COHEN; T.A. MCALLISTER; W. MAJAK. 2000. *Enhancing pasture productivity with alfalfa. A review. Can. Plant Sci. 88: 513-519.*

POPPI, D.P.; T.P. HUGHES; P.J. L'HUILLER. 1987. *Intake of pasture by grazing ruminants. En: NICOL, A.M. (ed.). Livestock Feeding of Pasture. Occ. Publication N.º 10. N.Z. Soc. Anim. Production. Hamilton, N. Z., 55-63 pp.*

REDMON. L.A. 1995. *Grazing Systems for Pastures. Extension Facts: F-2567. Oklahoma Cooperative Extension Service. Oklahoma State University, 4 p.*

REYNOLDS, C.K.; H.F. TYRRELL; P.J. REYNOLDS. 1991. *Effects of diet forage-to-concentrate ratio and intake on energy metabolism in growing beef heifers: Whole body energy and nitrogen balance and visceral heat production. J. Nutr. 121 (7): 994-1003.*

ROMERO, N.A. 1981. *Conceptos sobre manejos de los alfalfares. Boletín de Divulgación Técnica N.º 21, EEA Anguil, INTA. 27 p.*

ROMERO, N.A. 1988. *Investigaciones y progresos en el manejo de la alfalfa. II. Manejo otoñal. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol 8 (6): 517-519.*

ROMERO, L.A.; M.S. ARONNA; A. CUATRIN. 2002. *Producción estacional de forraje y relación hoja tallo de alfalfas multifoliadas. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 22 (Supl. 1): 134-135.*

ROMERO, L.A.; O.A. BRUNO; J.L. FOSSATI. 1993. *Evaluación de cultivares de pasto ovillo en mezcla con alfalfa bajo pastoreo. Metodología de evaluación de pasturas. Diálogo XXXVIII. IICA-PROCISUR, Montevideo (Uruguay). 103-106 pp.*

ROMERO, N.A.; E.A. COMERON; E. USTARROZ. 1995. *Capítulo 8. Crecimiento y utilización de la alfalfa. En: HIJANO, E.H.; A. Navarro (ed.). La alfalfa en la Argentina. INTA Subprograma Alfalfa. Enciclopedia Agro de Cuyo, Manuales 11. 149-170 pp.*

ROMERO, N.A.; R. HERNÁNDEZ; A. CRAGNAZ; R.O. ROSSANIGO. 1981 *Sistema de pastoreo en alfalfa. Rev. Arg. Prod. Anim. 1 (5): 371-373.*

ROMERO, N.A.; N.A. JUAN; C.V. CASTELL; A.D. GONZALEZ. 1995a. *Efecto de la duración del período de pastoreo sobre la persistencia y producción de alfalfas con distinto reposo invernal. Publicación Técnica N.º 46, EEA Anguil, INTA. 19 p.*

ROSSANIGO, R.O.; J.R. ARAGON. 2003. *Capítulo I. Alfalfa. En: LATIMORI, N.J.; A.M. KLOSTER (ed.). Invernada bovina en zonas mixtas. INTA Marcos Juárez. Agro de Córdoba 12. Editorial Editar S.A., San Juan, Arg. 6-53 pp.*

SARDIÑA, C.; G.D. BERONE. 2017. *Aumentos en producción de carne en alfalfa por cambio en el manejo de la defoliación. Revista Argentina de Producción Animal. (37) 1: 90.*



- SCHLEGEL, M.L.; C.J. WACHENHEIM; M.E. BENSON; W.J. MOLINE; H.D. RITCHIE; G.D. SCHWAB; S.R. RUST. 2000. *Grazing methods and stocking rates for direct-seeded alfalfa pastures. I. Plant productivity and animal performance. J. Anim. Sci.* 78: 2192-2201.
- SCHENEITER, J.O.; O. BERTIN. 1996. *Mezclas forrajeras para la región pampeana húmeda. Curso sobre pasturas. EEA Pergamino, INTA.* 11-17 pp.
- SMITH, D. 1972. *Chapter 22. Cutting schedules and maintaining pure stands. En: HANSON, H. (ed.). Alfalfa. Science and Technology. ASA, Agronomy 15. Madison, Wisconsin, EUA.* 481-496 pp.
- SMITH, S.R. (JR.); J.H. BOUTON; A. SINGH; W.P. MCCAUGHEY. 2000. *Development and evaluation of grazing-tolerant alfalfa cultivars. A review. Can. Plant Sci.* 80: 503-512.
- SOUTHWOOD, O.R.; G.E. ROBARDS. 1975. *Lucerne persistence and productivity of ewes and lambs grazed at two stocking rates with different management systems. Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 15: 747-752.
- SPADA, M.DELC. 2004. *Avances en alfalfa. Ensayos territoriales. Año 14, N.º 14, EEA Manfredi, INTA.* 47 p.
- SPADA, M.DELC.; J.C. MOMBELLI. 1995. *Adaptación al pastoreo de cultivares de alfalfa con distinto grado de reposo. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 15 (1):* 278-280.
- THOMET, P.; M. HADRON. 2000. *Leistungsvergleich zwischen Kurzrasen- und Umtriebsweide mit Ochsen. Agrarforshung* 7 (10): 472-477.
- USTARROZ, E.; A.M. KLOSTER; N.J. LATIMORI; M. ZANIBONI; D. MENDEZ. 1997. *Intensificación de la invernada sobre pasturas base alfalfa. Primer Congreso Argentino de Producción Intensiva de Carne (Memorias). SAGPyA-INTA-Forrajes y Granos. Buenos Aires.* 181-202 pp.
- VAN KEUREN, R.W.; A.G. MATCHES. 1988. *Pasture production and utilization. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL (Jr.). (ed.). Alfalfa and Alfalfa Improvement. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, Wisconsin. EUA.* 515-538 pp.
- WHITE, D.H. 1987. *Stocking rate. En: SNAYDON, R.W. (ed.). Managed Grasslands. B. Analytical Studies. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Países Bajos.* 227-238 pp.
- WHITE, J.M. 1973. *Carbohydrate reserves of grasses. A review. J. Range. Manage. Vol. 26(1):* 13-18.
- WHITE, J.G.H.; G.P. COSGROVE. 1990. *Lucerne grazing management. 2. Effect of grazing duration on defoliation pattern by ewes. N. Z. J. Agric. Res.* 33: 621-625.
- WILMAN, D. 1977. *The effect of grazing compared with cutting at different frequencies on a lucerne-coocksfoot ley. J. Agric. Sci. (Camb.)* 88: 483-492.
- ZANIBONI, C.M. 1990a. *Niveles de subdivisiones y velocidad de rotación del pastoreo y su relación con la longevidad de la alfalfa. Informe final de Plan de Trabajo N.º 4002. EEA General Villegas, INTA (inédito).*

ZANIBONI, C.M. 1990b. *Efecto de la frecuencia de corte en primavera y otoño en la longevidad y productividad de la alfalfa. Informe final del Plan de Trabajo N.º 4004. EEA General Villegas, INTA (inédito).*

ZANIBONI, C.M.; A. DILLON. 1999. *Evaluación bajo pastoreo de cultivares de alfalfa. Publicación Técnica N.º 28, EEA General Villegas INTA. 21 p.*

ZUBIZARRETA, J. 1999. *Eficiencia en la utilización de pasturas consociadas. Experiencia de los grupos CREA. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 19 (1): 71-77.*

## CAPÍTULO 13

Producción de heno, silaje y  
henolaje de alfalfa

Gastón Urrets Zavalía,  
Néstor Juan y  
Enrique Viviani Rossi

## Introducción

Por su gran potencial de producción de forraje con altos niveles de proteína y energía, la alfalfa es uno de los pilares sobre los que se asienta la ganadería argentina. En los sistemas de producción intensivos, que utilizan una variada gama de confinamiento animal, la alfalfa constituye también la principal fuente de fibra efectiva de calidad. A esto debe sumarse, entre otras virtudes, su alto contenido de vitaminas (o sus precursores) A, E y K y de la mayoría de los minerales requeridos por el ganado productor de leche y carne, en especial calcio, potasio, magnesio y fósforo (Berger *et al.*, 1985; Berger *et al.*, 1986) (Tabla 1). Por un lado, todas estas características justifican los esfuerzos dedicados a conservar el forraje de alfalfa, sea para transferir la producción primavera-estival a otras épocas del año o para aumentar la eficiencia de cosecha de nutrientes, lo que permite tanto una mayor carga animal como una mayor producción de carne o leche por unidad de superficie. Por otro lado, las reservas de alfalfa posibilitan un manejo más preciso de la alimentación a través de la conformación de raciones totalmente mezcladas (TMR) o raciones parcialmente mezcladas (PMR). Además, el forraje conservado se puede exportar a otras regiones fuera de su área de cultivo. Para ello, se utilizan diversas técnicas de conservación, tanto en seco como en húmedo, que serán descriptas y analizadas en el presente capítulo.

■ **Tabla 1.** Composición nutritiva del heno de alfalfa en función del corte en diferentes estados fenológicos. Adaptado de Holland y Kezar (1990).

Estado Fenológico	PB	LIG	Ca	Mg	P	K	TND
	% sobre MS						
Vegetativo tardío	23	5	1,8	0,26	0,35	2,21	66
Botón floral	20	7	1,5	0,24	0,29	2,56	63
Floración temprana	18	8	1,4	0,33	0,22	2,52	60
Floración media	17	9	1,4	0,31	0,24	1,71	58
Floración tardía	15	10	1,2	0,31	0,22	1,53	55

PB: proteína bruta; LIG: lignina; Ca: calcio; Mg: magnesio; P: fósforo; K: potasio; TND: total de nutrientes digestibles.

El rol de los forrajes conservados en los sistemas de producción de carne y leche de la Argentina ha ido evolucionando a través del tiempo. En el pasado, la producción y almacenamiento de reservas forrajeras eran considerados como un “seguro” contra emergencias que pudieran disminuir la producción de forraje, tales como períodos prolongados de sequía, anegamiento, temperaturas extremas o ataques de plagas y enfermedades. En la actualidad los forrajes conservados de alta calidad son considerados un componente vital en los sistemas de alimentación animal que buscan aumentar la producción ganadera mediante el incremento de la carga animal, la producción individual, o ambas (Juan *et al.*, 1995).

La principal forma de conservación de la alfalfa en el mundo es la henificación. En Estados Unidos cerca del 25 % del total de alfalfa conservada se hace en forma de silaje y henolaje, mientras que el 75 % restante se hace en forma de heno. Según las estadísticas del USDA (2019), el volumen total de alfalfa conservada como heno –principalmente pura, pero también en mezcla con otras especies– alcanza los 52,6 millones de toneladas anuales, que se producen en 6,7 millones de hectáreas y con un rendimiento promedio de 7,84 t ha<sup>-1</sup>. La producción de silaje de alfalfa alcanza los 19,14 millones de t (MS), que se generan en 1,09 millones de hectáreas con un rendimiento promedio de 17,5 t ha<sup>-1</sup>.

En Argentina, el aprovechamiento directo de la alfalfa a través del pastoreo predomina sobre la cosecha mecánica, lo que hace que la superficie destinada a la producción de forraje conservado de calidad sea inferior a la de otros países productores. Si bien no existen estadísticas oficiales, Bragachini *et al.* (2018), por un lado, estimaron que en 2018 se produjeron en nuestro país cerca de 5,5 millones de toneladas de heno de alfalfa, provenientes de unas 800.000 hectáreas (70 % como rollos, 18 % como megafardos y 12 % como fardos, heno picado y embolsado, y otros formatos). Por otro lado, estimaban también una producción de 130.000 toneladas de silaje de alfalfa (principalmente en el formato de silobolsa), generadas en una superficie menor a 60.000 hectáreas.

No obstante, si se analiza la evolución que tuvo en Argentina la producción de forraje conservado de alfalfa, se aprecia un aumento sostenido basado en el avance tecnológico que ha tenido lugar en las últimas décadas, principalmente en materia de maquinarias específicas para tal fin. La aparición, en la década de 1980, de las enrolladoras revolucionó

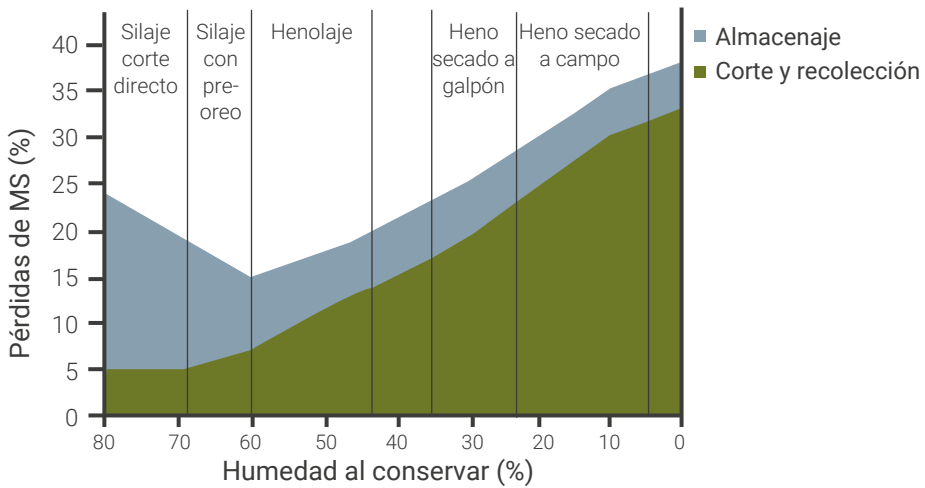
la henificación del cultivo permitiendo reemplazar el alto requerimiento de mano de obra de otrora por medios mecánicos de gran capacidad de trabajo. Posteriormente, a partir del año 2008, con la instalación en nuestro país de empresas exportadoras de heno, comienza la adopción de las megaenfardadoras y la consiguiente producción de megafardos, que mejoran sustancialmente los aspectos logísticos relacionados con el flete y el almacenamiento, favoreciendo así tanto el comercio interno como el de exportación de heno. Este tipo de maquinaria trajo también aparejada la adopción paulatina del sistema de corte tipo segadora-acondicionadora, que aporta grandes beneficios para la obtención de forrajes conservados de calidad. En la década de 1990 irrumpieron masivamente los equipos para producción, almacenamiento y suministro de silajes y henolajes (picadoras, embolsadoras, empaquetadoras, extractores mecánicos, carros mezcladores, etc.), lo que dio un nuevo impulso a la conservación de recursos forrajeros, entre ellos la alfalfa (Bragachini, 1995; Bragachini *et al.*, 1995). Complementariamente, tanto la disponibilidad de nuevas variedades de alfalfa –con mayor producción, persistencia, sanidad y valor nutritivo– como el desarrollo de insumos químicos –desecantes, conservantes y aditivos– contribuyen también al aumento de la producción de forrajes conservados.

Cualquiera sea el método de conservación de alfalfa que se elija, es muy importante tener en cuenta que ninguno de ellos puede incrementar la cantidad ni la calidad del forraje en pie que se quiere conservar. Esto es así porque a partir del corte se producen pérdidas por diversos motivos (respiración, lixiviación, fermentaciones indeseables, caída de material, insolación, contaminación con microorganismos y suelo, etc.) que afectan, en mayor o menor grado, el volumen y la calidad de la reserva producida. Demarquilly y Jarrige (1970) demostraron este concepto cuando –al analizar 117 muestras de forraje en pie, 108 de henos y 56 de silajes– hallaron que el proceso de henificación había hecho disminuir, respecto de los cultivos en pie, el consumo animal voluntario hasta 32,6 % y la digestibilidad de la materia seca hasta 15 %. En la Tabla 2 se presenta una estimación de la magnitud de las pérdidas de calidad y cantidad que tienen lugar durante los procesos de henificado y ensilado. Según Rotz y Muck (1994), las pérdidas promedio en la producción de heno oscilan entre 24 y 28 % (de las cuales solo el 10-20 % ocurren en la etapa de almacenamiento); y en la producción de silaje, entre 14 y 24 %

(de las cuales el 50-80 % ocurren durante el almacenamiento) (Figura 1). Las distintas técnicas de conservación de forrajes, tanto en seco como en húmedo, apuntan a minimizar el deterioro de cantidad y de calidad que se produce desde el momento del corte hasta el momento del suministro a los animales.

■ **Tabla 2.** Pérdidas de materia seca y cambios en la concentración de nutrientes durante la producción de heno y silaje de alfalfa. Adaptado de Rotz y Muck (1994).

Causa de pérdida	Pérdida de MS (%)		Cambios en la concentración de nutrientes (% de MS)		
	Rango	Normal	PB	FDN	TND
Respiración	1-7	4	0,9	1,7	-1,7
Lluvias					
5 mm	3-7	5	-4,0	1,4	-1,5
25 mm	7-27	17	-1,7	6,0	-7,0
50 mm	12-50	31	-3,5	14,0	-14,2
Corte y acondicionado	1-4	2	-0,7	1,2	-1,4
Aireado andanas	2-8	3	-0,5	0,9	-1,2
Volteo andanas	1-3	1	0	0	0
Rastrillado	1-20	5	-0,5	1,0	-1,2
Recolección					
Fardo	2-6	4	-0,9	1,5	-1,9
Rollo	3-9	6	-1,7	3,1	-3,8
Picado (silaje)	1-8	3	0	0	0
Almacenamiento heno					
Intemperie	6-30	15	0	5,0	-7,0
Bajo techo	3-9	5	-0,7	2,2	-2,1
Tipo de silo					
Hermético	6-14	8	1,4	0,7	-3,7
Vertical	7-17	10	1,8	1,7	-4,7
Trinchera	10-16	12	2,3	2,7	-5,6
MS: materia seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra detergente neutro; y TND: total de nutrientes digestibles					



■ **Figura 1.** Estimación de las pérdidas de materia seca (MS) durante el corte y el almacenamiento de forrajes conservados con distintos contenidos de humedad. Adaptado de Holland y Kezar (1990).

## Estimación de la calidad de forraje de alfalfa conservado

Considerando que el costo de la alimentación representa el egreso más significativo en la mayoría de las explotaciones ganaderas, es fundamental que los forrajes conservados que se produzcan sean de la más alta calidad posible, entendiéndose por calidad al valor nutritivo que ofrecen a los animales. Por ello, una correcta valoración química de la calidad de los forrajes conservados es esencial para elaborar en forma precisa dietas que satisfagan los requerimientos nutricionales de los distintos rodeos de carne y leche. A continuación, se definirán brevemente los parámetros más comúnmente utilizados para evaluar el valor nutritivo del forraje de alfalfa conservado.

### *Evaluación organoléptica*

Es la evaluación hecha a través de los sentidos de la vista, el olfato y el tacto. Si bien este método es válido como una primera apreciación, no brinda adecuada información acerca del potencial nutritivo del forraje y debe ser complementado con otros parámetros menos subjetivos (Ho-



Iland y Kezar, 1990; Juan *et al.*, 2001). Las evaluaciones organolépticas más usadas en alfalfa son:

### *Heno*

Madurez o estado fenológico: aunque de no fácil estimación en forraje ya enfardado (fardo o rollo), la presencia de botones florales, flores y frutos (vainas o carretillas) da una idea del estado de madurez en que fue cortado el cultivo. Ya ha sido descrita (Tabla 1) la relación que existe entre desarrollo fenológico y valor nutritivo de la alfalfa.

Foliosidad: la estimación de la proporción de hojas presentes es un buen indicador, ya que las hojas son la porción de mayor calidad, conteniendo aproximadamente el 70 % de la proteína, el 90 % del caroteno y más del 65 % de la energía digestible de la planta de alfalfa.

Materiales extraños: estima el grado de contaminación con malezas, rastros de alfalfa y de otros cultivos, rocas, tierra y otros materiales con poco o ningún valor como alimento y que, eventualmente, pueden ser peligrosos para la salud animal.

Olor y presencia de hongos: un buen heno de alfalfa no debería presentar olores desagradables (producto de fermentaciones indeseables) ni desarrollo fúngico visible. Estos parámetros junto con el color están estrechamente relacionados con la humedad a la que se enfardó y con la temperatura alcanzada durante el almacenamiento. Calentamientos por encima de 50 °C, consecuencia de respiración microbiana, son seguramente provocados por un enfardado con excesiva humedad.

Color: un color verde brillante es un indicador de que el forraje fue secado rápida y adecuadamente, sin sufrir daño por lluvias o por exceso de temperatura. El color amarillo indica un exceso de exposición al sol durante el secado, mientras que la intercalación de capas blanquecinas en el heno verde indica desarrollo fúngico como consecuencia de haberse enfardado con exceso de rocío sobre la andana. Henos que alcanzaron temperaturas de 55 °C muestran un color marrón acaramelado, mientras que si la temperatura sobrepasó los 60 °C se verá color marrón oscuro a negro. A pesar de que el color es un parámetro indicativo de calidad, no es confiable como estimador de la digestibilidad del heno.

## *Silaje y henolaje*

Madurez, foliosidad y materias extrañas: en silajes y henolajes de picado fino, debido al pequeño tamaño de partícula resultante, no es posible determinar visualmente estos parámetros. En cambio, sí es posible hacerlo en henolaje de rollos confeccionados con forraje entero, aunque con menor precisión que en heno. En este caso, se aplican los mismos conceptos descriptos para heno.

Color: un buen silaje de alfalfa debe ser de color verde oscuro a marrón-verdoso. Un color marrón oscuro o marrón-negro estaría indicando que hubo un calentamiento excesivo, como consecuencia de llenado lento del silo, entrada de aire, humedad insuficiente, tamaño de partícula demasiado grande o insuficiente compactación.

Olor: debe ser agradable y levemente ácido. El olor atabacado indica exceso de temperatura en el silo; el olor rancio indica una fermentación clostridial no deseable, productora de ácido butírico; el olor avinagrado indica alta presencia de ácido acético en lugar de ácido láctico; y el olor a alcohol indica una fermentación dominada por levaduras indeseables.

Presencia de hongos: dado que los hongos solo pueden vivir en presencia de oxígeno, su aparición en el silaje en forma de polvillo blanco u oscuro nos indica un sellado inapropiado del silo o una deficiente compactación.

## *Evaluación mediante análisis de laboratorio y animales experimentales*

Los métodos de laboratorio se basan en reacciones químicas y procesos de secado e incinerado que permiten estimar el contenido de los componentes químicos del forraje. En general, demandan mucho tiempo, mano de obra y drogas, pero tienen una masiva difusión a nivel mundial y sus resultados son ampliamente aceptados. Existen numerosos parámetros para caracterizar la calidad del heno de alfalfa, pero los principales desde el punto de vista práctico son: proteína bruta, digestibilidad de la materia seca y consumo animal voluntario de materia seca.

Proteína Bruta (PB): es el principal nutriente que aporta la alfalfa a la dieta animal y su concentración es comúnmente estimada mediante el método Kjeldahl o el método de combustión Dumas. Dichas téc-

nicas miden el contenido de nitrógeno (N) total del forraje que al ser multiplicado por el factor 6,25 da una estimación del % PB. En forraje conservado que ha sufrido un calentamiento excesivo parte de la PB puede ligarse fuertemente a componentes de la pared celular, lo que la hace no digestible por el animal; en estos casos, además del % de PB total, es necesario contar con una estimación del % PB insoluble o indigestible (Coblentz *et al.*, 2004; Linn y Martin, 1985).

Materia Seca Digestible (DMS): estima la proporción del forraje consumido que es retenida en el cuerpo del animal y que provee los nutrientes necesarios para las funciones de mantenimiento, crecimiento y producción. Puede estimarse mediante métodos directos e indirectos.

#### *Métodos directos de estimación:*

- Digestibilidad *in vivo* (en animal): se mide en ensayos que relacionan la cantidad de materia seca consumida por animales mantenidos a corral durante 10-15 días y la cantidad de heces producida. La diferencia entre ambas mediciones, llevada a porcentaje, define la digestibilidad aparente del forraje.
- Digestibilidad *in vitro* (en tubos de ensayo): es un procedimiento que consta de dos etapas: en la primera, la muestra de forraje es degradada usando líquido ruminal de un animal donante, a fin de simular la digestión en el rumen; en la segunda, la muestra es degradada con una solución enzimática a efectos de simular la digestión en el intestino delgado. La diferencia entre el peso seco inicial de la muestra y el peso del residuo final indica la digestibilidad del forraje (Tilley y Terry, 1963).
- Degradabilidad *in situ*: las muestras de forraje, contenidas en pequeñas bolsas de nylon (dacron), son colocadas en el rumen de animales fistulados que consumen una dieta similar al forraje evaluado. La diferencia entre la cantidad de materia seca inicial y el residuo que se obtiene luego de una determinada cantidad de horas de permanencia en el rumen proporciona el porcentaje de degradabilidad ruminal.

#### *Método indirecto de estimación:*

Entre las formas indirectas utilizadas para estimar la DMS del forraje se encuentra la técnica de determinación de pared celular de Van Soest, o

método de detergentes (Goering y Van Soest, 1970). En este método, la muestra es degradada por una hora en una solución detergente a pH=7, lo que produce la solubilización de los contenidos celulares altamente digestibles –como azúcares, almidón, pectinas, carbohidratos solubles, proteínas, nitrógeno no proteico, vitaminas y minerales–. La porción insoluble –compuesta por hemicelulosa, celulosa, lignina y sílice– es la fracción llamada fibra detergente neutro (FDN) o, más comúnmente, pared celular. Cuando la muestra es tratada con detergente ácido, que disuelve la hemicelulosa, el residuo insoluble –que ahora se compone de celulosa, lignina y sílice– recibe el nombre de fibra detergente ácido (FDA). Considerando que la proporción de FDA de un forraje está negativamente correlacionada con su DMS, esta última puede ser estimada mediante la fórmula:

$$\% \text{ DMS} = 88,9 - (0,7790 \times \% \text{ FDA})$$

Consumo animal voluntario de materia seca (CMS): es uno de los principales parámetros que determinan la productividad animal. Al igual que en el caso de DMS, el CMS puede ser estimado directa o indirectamente. En el primer caso, mediante ensayos con animales, se mide el suministro y el rechazo de materia seca; desafortunadamente, estos métodos son lentos y demandan mucha mano de obra. Entre los indirectos, una forma de estimar el CMS (como % del peso vivo) es calcular primero el valor de FDN a través del método de Van Soest, y luego –dada la fuerte correlación negativa entre FDN y CMS– inferir el consumo voluntario mediante la fórmula (Linn y Martin, 1985):

$$\% \text{ CMS} = \frac{120}{\% \text{ FDN}}$$

Otros parámetros de calidad: además de los anteriores, la calidad también puede estimarse a través de la determinación del contenido de lignina detergente ácido (LDA), del total de nutrientes digestibles (TND) y del valor nutritivo relativo (VNR).

La lignina es un componente que se incrementa con la madurez y que, por ser prácticamente indigestible e interferir con la digestión de la celu-

losa y la hemicelulosa, está negativamente correlacionado con el valor nutritivo del forraje. Para determinar el valor de LDA, se estima primero la concentración de FDA; del residuo que queda, compuesto por lignocelulosa, se disuelve y separa la celulosa por medio de una solución de ácido sulfúrico al 72 %, quedando un nuevo residuo de lignina y ceniza no soluble en ácido.

El TND, que es calculado en función de la FDA, es un parámetro indicativo de la suma total de nutrientes aprovechables por el animal y se expresa como valor de porcentaje.

$$\text{TND} = 82,38 - (0,7515 \times \text{FDA})$$

El VNR se calcula relacionando los valores estimados de DMS y de CMS a través de la siguiente fórmula:

$$\text{VNR} = \frac{\% \text{DMS} \times \% \text{CMS}}{1,29}$$

El VNR, que no posee unidades absolutas, es una manera simple de cuantificar el potencial alimenticio de un forraje. El VNR es ampliamente usado en EE. UU. para balancear raciones y para fijar el precio de comercialización del heno. En Argentina se propuso una escala similar (Tabla 3).

**Tabla 3.** Categorización del heno de alfalfa en base a su valor nutritivo relativo propuesta para Argentina por Urrets Zavalía *et al.* (2018a).

CATEGORÍA	FDA (%)	FDN (%)	VNR	TND (%)	PB (%)
Superior	< 27	< 34	> 185	> 62	> 22
Premium	27-29	34-36	170-185	60,5-62	20-22
Primera	29-32	36-40	150-170	58-60	18-20
Segunda	32-35	40-44	130-150	56-58	16-18
Tercera	> 35	> 44	< 130	< 56	< 16

FDA: fibra en detergente ácido, en % base seca; FDN: fibra en detergente neutro, en % base seca. VNR: valor nutritivo relativo del forraje,  $\text{VNR} = [88,9 - (0,779 \times \% \text{FDA})] \times [(120/\% \text{FDN})]/1,29$ ; TND: total de nutrientes digestibles, en % base Seca,  $\text{TND} = 82,38 - (0,7515 \times \% \text{FDA})$ ; PB: proteína bruta, en % base seca.

La clasificación de henos de alfalfa utilizada en España también utiliza una escala de VNR pero define solo tres categorías (Tabla 4), que se corresponden bastante (aunque no totalmente) con las tres categorías inferiores del sistema estadounidense.

■ **Tabla 4.** Categorización de heno de alfalfa utilizada en España.

CATEGORÍA	FDA (%)	FDN (%)	VNR	TND (%)	PB (%)
Extra	29-32	36-40	150-170	58-60	> 18
Primera	32-35	40-44	130-150	56-58	16,5-18
Segunda	> 35	> 44	< 130	< 56	15--16,5

En 2017, el Grupo Alfalfa del INTA Manfredi propuso para la Argentina una escala de tipificación de heno de alfalfa muy similar a la de EE. UU., aunque ajustando la denominación de las categorías de acuerdo a los usos y costumbres del país. El objetivo fue compatibilizar estas categorías con las clasificaciones más difundidas a nivel mundial, a fin de facilitar la exportación de alfalfa y de ordenar simultáneamente el mercado interno. La tipificación propuesta se detalla en el capítulo 16 de este libro.

### *Evaluación mediante análisis instrumental*

Una técnica alternativa para estimar el valor nutritivo de los forrajes es la espectroscopía en infrarrojo cercano, conocida como NIRS por sus siglas en inglés (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy*). Este método computarizado permite estimar en forma rápida, económica y no destructiva de la muestra, el contenido de PB, FDN, FDA, DMS, lignina, carbohidratos solubles y otros compuestos del forraje. Para ello, utiliza la radiación electromagnética de infrarrojo cercano en lugar de reacciones químicas. La técnica se basa en el hecho de que cada componente orgánico de una muestra presenta patrones diferentes de absorción, reflexión y transmisión de las distintas longitudes de onda de la radiación infrarroja. En ese contexto, la muestra es iluminada con esta clase de radiación y la información producida es transmitida a una computadora que la compara con la información espectral de muestras previamente analizadas por métodos convencionales de laboratorio. Finalmente, el contenido de los

diferentes nutrientes es estimado mediante ecuaciones matemáticas de predicción (Marten *et al.*, 1990; Shenk y Westerhaus, 1994).

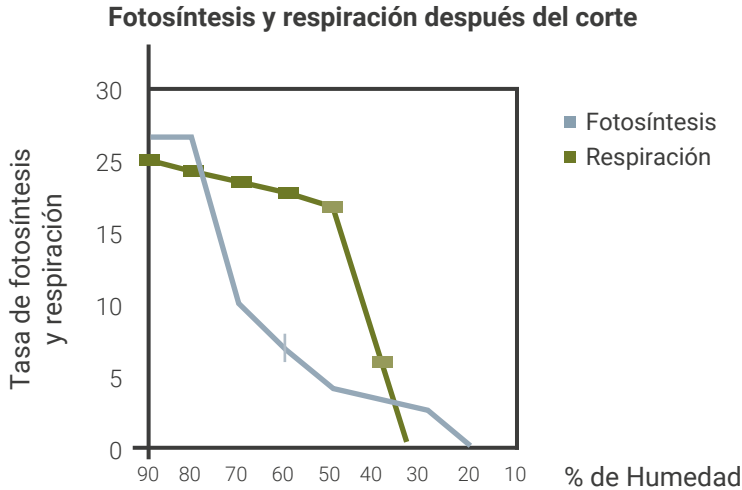
De acuerdo a experiencias realizadas en el Laboratorio de Calidad de Forrajes de INTA Anguil, la granulometría y la manipulación de las muestras son factores que impactan sobre la variabilidad de las lecturas y la repetitividad de los valores. Es por tanto que se sugiere tener estas consideraciones a la hora de calibrar y utilizar equipos NIRS.

## Henificación

La henificación es un método de conservación del forraje basado en el principio físico del secado que inactiva la respiración de los tejidos vegetales y la actividad microbiana. El objetivo es reducir lo más rápidamente posible el contenido de humedad del forraje fresco y cortar así el proceso de respiración celular que continua en los tejidos luego del corte de la pastura; de esta manera, se busca preservar lo más posible la concentración de azúcares solubles y demás nutrientes a fin de que alcancen la boca del animal y se transformen en mayor producción de carne y leche. En el caso de la alfalfa, y partiendo de un contenido de humedad que oscila entre 70 y 85 %, el objetivo es llegar a 18-20 %, nivel en que la respiración celular y la actividad de los microorganismos descomponedores son casi nulas. Esta rápida desecación permite no solo capturar la mayoría de los nutrientes presentes en el forraje, sino también almacenarlos por largos períodos, impidiendo que se produzcan cambios sustanciales en su composición. A partir del corte del forraje, la fotosíntesis y la consiguiente producción de hidratos de carbono se detienen rápidamente (Figura 2), pero el consumo de estos compuestos a través de la respiración de los tejidos continúa hasta que el contenido de humedad cae por debajo del 50 %. Es por todos estos motivos que el secado debe ser lo más veloz posible.

La henificación fue el primer proceso utilizado por el hombre para conservar forraje, lo que permitía aprovechar los excedentes de primavera y verano para utilizarlos luego durante el invierno u otros períodos de escasez. En la actualidad, este método de conservación es utilizado no solo para cubrir baches forrajeros, sino también como componente permanente de raciones totalmente mezcladas (TMR) o bien como com-

plemento aislado en sistemas de producción bovina con distintos grados de intensificación, buscando dar estabilidad a los sistemas y aumentar su productividad a través de aumentos de carga y productividad individual.



■ **Figura 2.** Evolución de la fotosíntesis y la respiración de la alfalfa, una vez que es cortada, en función del contenido de humedad de los tejidos. Fuente: Adaptado de Greenhill por Bragachini *et al.* (1995).

Una gran cantidad de factores, manejables en menor o mayor medida por el hombre, influye sobre el proceso de henificado y son la causa de los resultados tan variables que se observan en cuanto a la calidad final del producto obtenido. Romero *et al.* (1986) realizaron una evaluación preliminar de la calidad de rollos realizados con pasturas base alfalfa en campos de la zona central de Santa Fe y concluyeron que al momento de su utilización la calidad de esas reservas fue baja, con contenidos de FDN entre 63 % y 74 % y con valores de digestibilidad *in vitro* (DIVMS) de 45 % a 55 %. También Zubizarreta (1992), analizando muestras de alfalfa conservada tomadas en tambos y campos de invernada en la zona de Trenque Lauquen (Bs. As.), observó una gran variabilidad de calidad, con rangos de 71 % a 52 % en digestibilidad y de 23 a 10 % en el contenido de PB. Evaluaciones realizadas por Barrenechea y Pozzo (1993) en la cuenca lechera de Villa María (Cba.) indicaron que el 80 % de los henos de alfalfa muestreados eran de calidad mediana a baja y solo el 20 % eran adecuados para lograr un consumo de materia seca lo suficientemente alto y compatible con planteos lecheros de alta producción.



Esta baja calidad promedio del heno de alfalfa producido en el país se debe a varios factores concurrentes. Uno de los más importantes es la falta de incentivo por parte del mercado interno, que no solo evalúa la calidad en forma subjetiva a través de únicamente criterios organolépticos (color, olor, presencia de hojas, presencia de malezas, etc.), y no a través de parámetros objetivos y analíticos (PB, FDA, FDN, lignina, DIVMS, VNR, etc.), sino que además los compradores de rollos o megafardos pagan generalmente por peso y no por calidad. Esta situación ha generado que se extienda una serie de prácticas de henificación no recomendables, tales como cortes tardíos (que aumentan al rendimiento de MS ha<sup>-1</sup>, pero que disminuyen notablemente la calidad), deficiente control de malezas, uso de maquinaria de corte inadecuada, rastrillado de excesiva velocidad, manipulación de andanas excesivamente secas (con la consiguiente pérdida de hojas), estiba inadecuada, etc. (Figura 3). El resultado de todo lo anterior se traduce en los valores promedio de calidad obtenidos por los laboratorios de INTA Rafaela e INTA Manfredi, que se ubican en torno a 16 % PB (rango: 13-24 %), 56 % FDN (excesivamente alto) y 58 % DIVMS (muy baja), cifras que están muy lejos de los parámetros de calidad exigidos por el mercado internacional.



■ **Figura 3.** Principales causas de pérdida de calidad del heno de alfalfa en Argentina: 1-momento tardío de corte; 2- cultivos enmalezados; 3-corte con hélice desmalezadora; 4- rastrillado y confección en condiciones excesivamente secas; 5-lluvia sobre andanas; y 6- estiba inapropiada en condiciones de intemperie.

## *Factores que modifican el rendimiento y la calidad del heno*

El proceso de henificación involucra básicamente cuatro etapas: 1- corte; 2- secado; 3- recolección; y 4- almacenaje. A lo largo de todo el proceso es esencial conservar la mayor proporción posible de hojas –en particular cuando nos referimos a heno de alfalfa, ya que en ellas se encuentra entre 65 y 70 % de los nutrientes que ofrece el cultivo–.

### *1- Corte*

#### *Estado de madurez*

El estado de madurez de la planta o estado fenológico es el factor individual más importante para tener en cuenta para determinar el momento del corte a fin de producir forraje conservado de alta calidad, ya que expresa el efecto acumulado que el medio ambiente y el genotipo tienen sobre la planta (Marten *et al.*, 1988). Si bien el desarrollo fenológico de la alfalfa puede caracterizarse de varias formas, en términos generales se habla de cuatro estados básicos: vegetativo, botón floral, floración y semillazón. En este contexto, existen otras clasificaciones que incluyen estados intermedios entre esos cuatro estados. Kalu y Fick (1983) desarrollaron una escala numérica –luego perfeccionada por Fick y Mueller (1989)– que incluye tres estados vegetativos, dos de botón floral, dos de floración y tres de semillazón. Esta escala, que brinda un sistema más preciso y menos subjetivo que otras clasificaciones propuestas, se describe detalladamente en el capítulo 2 de este libro.

Numerosos trabajos han demostrado no solo los cambios que se producen en la composición química de la alfalfa asociados a cambios en el estado de madurez (Barnes y Gordon, 1972; Kalu y Fick, 1983), sino también la alta correlación existente entre la calidad del forraje en pie y la calidad del heno (Collins, 1990). En los estados maduros, la alfalfa es menos digestible y posee menor potencial de consumo voluntario y de producción animal que en los estados inmaduros; estos cambios están asociados a una declinación en el contenido de PB y a un incremento en la concentración de fibras (FDA y FDN) y lignina (Tabla 5). Kalu y Fick (1983) estimaron una disminución promedio de 4 % en la DMS por cada unidad de disminución del estado de madurez según su escala. Otros estudios determinaron disminuciones diarias de 0,3 % en DMS

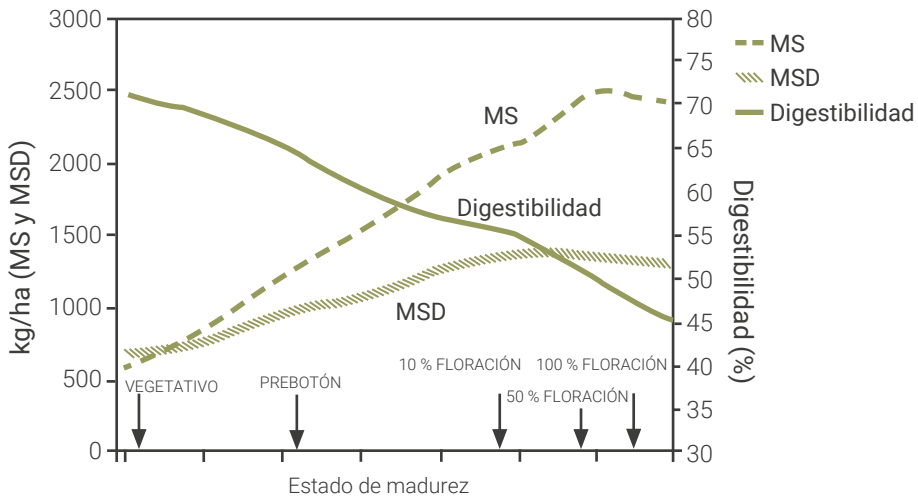
y de 0,2 % en PB durante los crecimientos de primavera. Por su parte, Berger *et al.* (1986; 1985) calcularon que por cada día de desarrollo del cultivo, la DMS y la PB disminuían 0,6 % y 0,5 %, respectivamente. La disminución de calidad es generalmente más rápida en el verano que en la primavera, debido a la aceleración del desarrollo fenológico y a las mayores pérdidas de carbohidratos no estructurales por respiración que se producen durante el período estival.

La relación que existe entre madurez, valor nutritivo y rendimiento de materia seca de la alfalfa se representa en la Figura 4. A medida que se posterga el corte y la alfalfa avanza hacia el estado de floración, por un lado, el rendimiento por hectárea aumenta linealmente debido al incremento en peso de la fracción tallo; a su vez, esto va asociado a una disminución de la relación hoja:tallo y a cambios en la composición química que determinan un menor valor nutritivo (Sheaffer *et al.*, 1988). A partir del estado de floración tardía, el valor nutritivo sigue declinando y el rendimiento también comienza a disminuir debido a la caída de las hojas basales (Buxton *et al.*, 1985). Por otro lado, los cortes en estados muy inmaduros (vegetativo a prebotón floral) producen forraje de alta calidad, pero –además de producir menores rendimientos– pueden comprometer la supervivencia del cultivo por no permitir una suficiente acumulación de reservas en las raíces.

■ **Tabla 5.** Efecto del estado de madurez sobre la concentración de proteína bruta, la digestibilidad de la materia seca y el potencial de consumo animal de materia seca del forraje de alfalfa. Adaptado de Undersander *et al.* (1991) y de Holland y Kezar (1990).

Madurez	PB	DMS	CMS
	(% sobre MS)		(% PV)
Prebotón floral	> 20	> 65	> 3,0
Botón floral	19-20	62-65	3,0-2,6
10 % floración	16-19	58-61	2,5-2,3
50 % floración	13-16	56-57	2,2-2,0
100 % floración	11-13	53-55	1,9-1,8
Principios semillazón	< 11	< 53	< 1,8

PB: proteína bruta; DMS: digestibilidad de la materia seca; CMS: consumo de materia seca; PV: peso vivo.

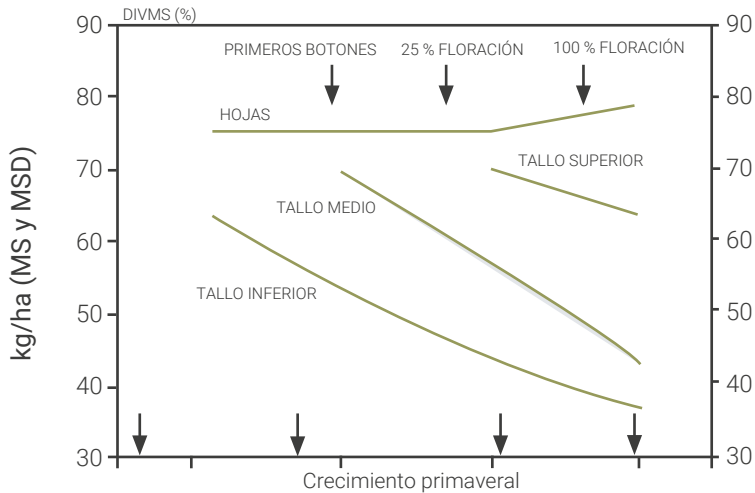


■ **Figura 4.** Variación de la producción de materia seca (MS), del rendimiento de materia seca digestible (MSD) y del porcentaje de digestibilidad total (digestibilidad) de la alfalfa en función de los estados de madurez a lo largo de un ciclo de crecimiento primaveral. Adaptado de Wilken *et al.* (1978).

El porcentaje de hojas (expresado en peso seco) puede ser tan alto como 70 % en estado de prebotón floral y tan bajo como 30 % en estado de semillazón temprana. Esta disminución de la relación hoja:tallo con el avance de la madurez tiene un alto impacto sobre el valor nutritivo de la alfalfa, ya que las hojas son más digestibles, tienen un contenido de proteína dos a tres veces mayor que los tallos (aun en estados inmaduros) y su calidad se deteriora mucho más lentamente con la madurez que la de los tallos (Buckmaster *et al.*, 1990) (Figura 5).

No existe un estado de madurez óptimo para cortar alfalfa, dado que este dependerá del objetivo de producción al que se destina el forraje conservado y de los requerimientos de los animales (Juan, 1996; Juan *et al.*, 2001; Juan *et al.*, 2001). Por lo común, se trata de alcanzar un equilibrio entre el rendimiento de materia seca y su valor nutritivo, relación que se expresa como el rendimiento de nutrientes por unidad de superficie. En términos generales, el punto de mayor rendimiento de nutrientes  $\text{ha}^{-1}$  del cultivo de alfalfa se ubica entre botón floral y principios de floración. No obstante, esto no es una regla fija ya que, por ejemplo, para lograr similar calidad bajo condiciones que favorezcan la caída de hojas (zonas húmedas, variedades susceptibles a enfermeda-

des foliares, o ambas) es necesario hacer cortes más tempranos que bajo condiciones que favorezcan la retención de hojas (regiones más secas o alfalfas resistentes).



■ **Figura 5.** Variación del porcentaje de digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de hojas y segmentos (inferior, medio y superior) de tallos de alfalfa en función de los estados de madurez a lo largo de un ciclo de crecimiento primaveral. Adaptado de Buxton *et al.* (1985).

### Maquinaria de corte e hilerado

La maquinaria más conveniente es aquella que realiza un corte de alta calidad y que combina alta capacidad de trabajo y adaptación a distintas situaciones del cultivo (diferencias en rendimiento de forraje, presencia de malezas, etc.). Por corte de alta calidad se entiende que la máquina realice un corte neto y sin deshilar, evitando al máximo el efecto de repicado, que es el recorte del material en trozos menores a 7 cm y la generación de un vuelo de hojas que no podrán ser recolectados por la maquinaria de recolección (megaenfardadora, rotoenfardadora o enfardadora) al momento de la confección. A su vez debe facilitar un rápido secado mediante el acondicionado o quebrado de tallos, dejando una andana esponjosa, aireada y uniforme en ancho y densidad. Existen distintos sistemas y máquinas de corte (Bragachini, 1995; Bragachini *et al.*, 1995), que pueden agruparse en dos tipos generales:

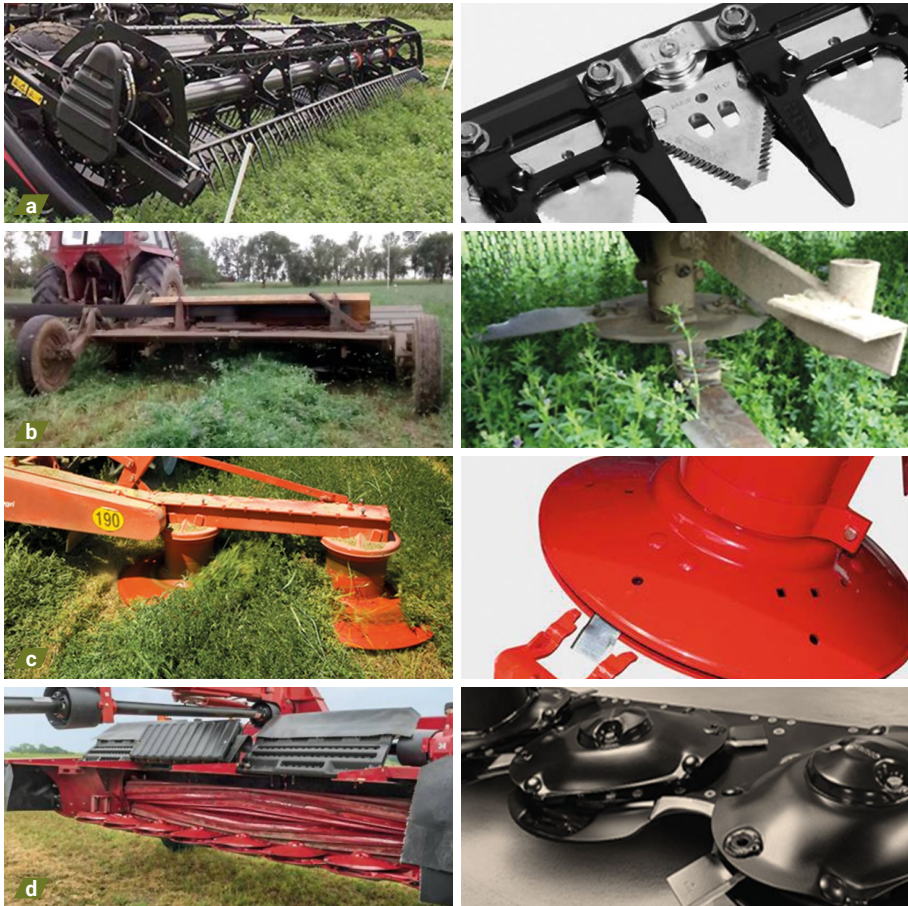
a- Segadoras de movimiento alternativo: cortan con secciones de cuchillas triangulares montadas sobre una barra que se desplaza al-

ternativamente (Figura 6a). Cuando las secciones y las contracuchillas están correctamente afiladas realizan un corte muy neto y sin repicado, lo que prácticamente no supone pérdidas de material vegetal. Como desventajas se mencionan su baja velocidad de avance, sus frecuentes atascamientos en cultivos densos o enmalezados, su poca adaptación a terrenos desparejos y sus altos costos de mantenimiento.

b- Segadoras de movimiento rotativo: cortan por sistema de impacto, siendo su efectividad dependiente de la velocidad tangencial de la cuchilla y de su filo. Según el tipo de elemento cortante, se dividen en: i) de hélice: constan de dos ejes verticales que poseen en su extremo dos cuchillas "locas" y opuestas a 180° (Figura 6b). Tienen bajos requerimientos de mantenimiento y gran capacidad de trabajo, aun en cultivos densos, volcados o enmalezados, pero pueden producir un corte deshilachado, ya que pierden fácilmente su filo, así como también producen un excesivo efecto de repicado, con pérdidas de pequeños trozos de forraje y caída de hojas, especialmente si la alfalfa está en madurez avanzada; ii) de tambor: constan de dos rotores con cuchillas "locas" de dos o cuatro filos (Figura 6c). Si bien poseen una alta capacidad de trabajo y de adaptación a cultivos densos y enmalezados, realizando un corte de mayor calidad y con menores pérdidas que las máquinas de hélice, es un sistema que actualmente está muy poco difundido; y iii) de discos: poseen pequeñas cuchillas montadas sobre varios discos que giran a alta velocidad (Figura 6d); producen un corte neto, con muy bajo efecto de repicado y con escaso desprendimiento de hojas, ofreciendo una alta velocidad de trabajo y un buen copiado del terreno. Estos equipos entregan un flujo de material cortado que se complementa muy bien con los sistemas acondicionadores, que quiebran los tallos y aceleran así el secado de la fibra. El sistema de discos es el de mayor uso en Europa y EE. UU. En Argentina fueron introducidas a mediados de la década de 1990, pero aún no han logrado una difusión masiva.

Pese a todo lo mencionado anteriormente, se estima que aun más del 60 % de la superficie de alfalfa del país continúa cortándose con hélices, a pesar de las grandes desventajas que estas presentan frente a las segadoras acondicionadoras.





■ **Figura 6.** Distintos sistemas de corte de forraje: a- barra alternativa con cuchillas triangulares (fotos gentileza McDon); b- movimiento rotativo de hélice; c- movimiento rotativo de tambor (fotos gentileza Minos Agri); y d- movimiento rotativo de discos. Fotos: gentileza Case IH y Claas.

De acuerdo a ensayos realizados por el Grupo de Maquinaria Agrícola de INTA Manfredi (Sánchez *et al.*, 2016), el reemplazo del sistema de corte de hélice por el de la segadora de discos con acondicionadores permite obtener los siguientes beneficios esenciales (Figura 7):

- Efecto sobre el rebrote del cultivo: la segadora acondicionadora, al realizar un corte prolijo, con un mínimo deshilachado de los tallos, favorece la recuperación de las plantas, acelerando el rebrote posterior y, por acumulación de efecto positivo, incrementó en aproximadamente 8 % la producción de forraje a lo largo del

año. En la zona central de Córdoba, esto último se traduce en unos 900 kg MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> más de forraje de alfalfa.

- Efecto sobre el repicado: el corte con segadora de discos y acondicionador genera mínimas pérdidas por repicado, disminuyendo hasta 62 % la cantidad de hojas y de trozos de tallos menores a 7 cm que quedan tirados en el lote, material que no será tomado por el recolector de la rotoenfardadora o megaenfardadora. En el ensayo que se comenta, el corte con hélice dejó tirado en el campo –a lo largo de los 5 cortes evaluados– un total de 1.487 kg MS ha<sup>-1</sup>, mientras que la segadora sólo dejó 568 kg MS ha<sup>-1</sup>.
- Efecto del acondicionador: mediante el quebrado y aplastado de los tallos, los acondicionadores generan vías de escape al agua contenida en ellos, logrando así disminuir el lapso de tiempo que transcurre desde el corte hasta que la humedad llegue al 50 %, momento en que se detiene la respiración de los tejidos. De esta forma, como ya se explicara anteriormente, el forraje es capaz de conservar mayor proporción de calidad nutritiva. Los datos de INTA Manfredi indican que, al momento de la recolección, el forraje cortado con segadora y acondicionador poseía 23,5 %PB y 2,6 Mcal kg MS<sup>-1</sup>, mientras que la franja cortada con una segura sin acondicionador alcanzó 21,9 % PB y 2,5 Mcal kg MS<sup>-1</sup>.

En resumen, el beneficio acumulado de cortar la pastura de alfalfa con segadora y acondicionador respecto de hacerlo con hélice, para las condiciones de Manfredi, fue una disponibilidad “adicional” por hectárea de aproximadamente 1.800 Kg MS, 557 Kg PB y 5.263 Mcal EM en una campaña de trabajo. Este mayor aprovechamiento de la pastura equivale a una producción extra de aproximadamente 123 kg carne ha<sup>-1</sup>. A estos beneficios económicos, debe sumarse que las segadoras posibilitan una mayor eficiencia de copiado de terreno, lo que brinda uniformidad en la altura de corte, evitando dañar los meristemas de rebrote; también permiten conformar andanas más uniformes y menos densas, derivado de la facilidad para regular los faldones traseros, lo que mejora el secado (Sánchez *et al.*, 2016).

### *Altura de corte*

La alfalfa presenta marcadas diferencias en el valor nutritivo de las porciones superior e inferior de la planta. La DMS, el contenido de car-



bohidratos no estructurales y el contenido de PB disminuyen desde el ápice hacia la base de la planta. Estas diferencias se deben a una menor proporción de hojas y a una mayor concentración de lignina y de pared celular en la porción inferior de los tallos (Bruno *et al.*, 1993) (Tabla 6). Según Buxton *et al.* (1985), la DMS de los tallos disminuye hacia la base a razón de 2 % por cada nudo, siendo las concentraciones de lignina y de pared celular las responsables del 95 % de la variación en DMS entre entrenudos del tallo (Figura 8).



**Figura 7.** Beneficios esenciales del corte rotativo de segadora a discos con acondicionadores, respecto al corte con sistema tipo hélice. Tomado de Sánchez *et al.* (2016).

Desde el punto de vista de la supervivencia de las plantas y de la velocidad de rebrote, no existen ventajas que justifiquen dejar remanentes de más de 5-7 cm de altura. La decisión sobre a qué altura cortar para henificar alfalfa debe basarse, al igual que en el caso del estado de madurez, en un compromiso entre calidad y rendimiento de materia seca.

■ **Tabla 6.** Calidad del forraje del alfalfa según época del año y mitad (superior o inferior) de la planta. Adaptado de Bruno *et al.* (1993).

Época	Fracción planta	PB	FDN	FDA	LDA	DMS
Primavera	Mitad inferior	15,8	55,9	39,3	10,1	59,6
	Mitad superior	27,9	37,6	22,0	6,2	76,9
Verano	Mitad inferior	17,0	53,6	38,6	10,5	61,5
	Mitad superior	27,4	38,1	23,0	6,5	75,5

PB: proteína bruta; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido; LDA: lignina detergente ácido; y DMS: digestibilidad de la materia seca.

### Presencia de malezas

La presencia de malezas en cultivos destinados a henificación tiene efectos directos e indirectos. Los efectos directos se relacionan con el valor nutritivo per se de las malezas presentes, que depende de la especie de que se trate y de su estado fenológico. En general, las malezas tienen un valor nutritivo inferior al de la alfalfa, aunque algunas especies –particularmente en estados inmaduros– pueden alcanzar contenidos similares o aun superiores de PB, DMS y CMS. Ejemplos de este tipo de malezas son el “diente de león” (*Taraxacum officinale* Weber), el “girasol guacho” (*Helianthus tuberosus* L.), el “yuyo colorado” (*Amaranthus quitensis* H.B.K.), la “quinoa” (*Chenopodium album* L.) y la “ambrosia” (*Ambrosia artemisiifolia* L.) (Marten y Andersen, 1975).

Los efectos indeseables indirectos, comunes en el caso de malezas suculentas y de tallos gruesos, están relacionados con las dificultades que presentan para la maquinaria de corte (atascamientos, rotura de cuchillas, etc.) y con su lenta tasa de secado, inferior a la de la alfalfa. Esto último impide el secado rápido y parejo de la andana, con las consiguientes pérdidas de MS y de nutrientes y con el aumento del riesgo por factores climáticos adversos. Las malezas también pueden afectar la calidad del heno si son no palatables, presentan espinas que ocasionan el rechazo de los animales, o contienen compuestos tóxicos para el ganado; además, el forraje conservado se convierte en una fuente de diseminación de semillas de especies indeseables (Rainero *et al.*, 1995). Por ello, independientemente del valor nutritivo que puedan tener las malezas, su presencia en alfalfares destinados a la producción de re-

servas de calidad debe ser evitada. Se espera que la aparición en el mercado legal de variedades tolerantes al herbicida glifosato ("alfalfas RR") contribuya a lograr este objetivo (Orloff *et al.*, 2003).

### *Plagas y enfermedades*

El rendimiento y la calidad del heno pueden ser reducidos por la presencia de diversas plagas y enfermedades, que causan la caída de hojas y consecuentemente la reducción de la relación hoja:tallo, el incremento en el contenido de fibra y la disminución en el contenido de PB y caroteno. Por ejemplo, hojas de alfalfa con una infección de tallo negro de verano (*Cercospora medicaginis* Ell. & Ev.), cuyas lesiones cubran del 25 al 50 % de la superficie foliar, presentan no solo un contenido de PB considerablemente menor que el de hojas no infectadas (18 % vs. 33 %, respectivamente), sino también un mayor contenido de fibra cruda. En otro caso, un cultivo moderadamente infectado con tallo negro de primavera (*Phoma medicaginis* Malbr. & Roum) produce, respecto de un cultivo no afectado, un forraje con menores valores de DMS, PB y carbohidratos no estructurales y mayores contenidos de FDA, FDN y lignina. Otras enfermedades foliares que afectan la producción de heno en nuestro país son la mancha ocular de la hoja (*Leptosphaerulina briosana* (Poll.) Graham & Lutrell) y el manchón foliar amarillo [*Leptotrochila medicaginis* (Fuckel) H.Schuepp] (Hijano, 1993). Una más completa descripción de estas y otras enfermedades se ofrece en el capítulo 9 de este libro.

Existe abundante evidencia de que ataques severos de pulgones, una de las principales plagas del cultivo en la Argentina (Aragón y Imwinkelried, 1995), producen un aumento en el contenido de lignina y una reducción en el contenido de PB y caroteno. El ataque de esta plaga también ha sido correlacionado negativamente con la DMS del forraje. Un efecto indirecto de la plaga lo constituyen las secreciones azucaradas que dejan sobre las hojas, lo cual favorece el desarrollo de hongos que disminuyen la calidad del heno. Otras plagas importantes en nuestro país –como la isoca de la alfalfa (*Colias lesbia*), la isoca medidora (*Rachiplusia nu* y *R. includens*) y la isoca militar tardía (*Spodoptera frugiperda*)– también afectan negativamente la producción de heno por pérdida de materia seca y disminución de la fracción hoja, especialmente en ataques severos (Villata, 1993).

Otros efectos de la incidencia de plagas y enfermedades, que aunque menos conocidos no menos importantes, son los relacionados con la acumulación de compuestos estrogénicos en el forraje. Ataques de pulgón verde (*Acyrtosiphon pisum* Harris) (Loper, 1968) y de enfermedades foliares de origen fúngico o viral han sido correlacionados con aumentos en la concentración de cumestrol y de otros compuestos fenólicos, los que pueden producir desórdenes en el ganado que posteriormente se alimenta con ese heno.

### *Variedades*

Aun cuando la alfalfa es una de las especies forrajeras de más alto valor nutritivo, igualmente se llevan a cabo trabajos para incrementar su calidad a través del mejoramiento genético (Basigalup, 2007). El objetivo principal es la obtención de cultivares que no solo alcancen altas DMS y PB, sino que esos elevados niveles se mantengan a medida que avanza su desarrollo fenológico; eso permitiría un manejo más flexible del cultivo, pudiendo retrasar los cortes sin perder calidad. No obstante, la selección por mayor calidad resulta frecuentemente en una disminución del rendimiento de materia seca (Hill *et al.*, 1988). Durante la década de 1990 se lanzaron, primero en los EE. UU. y más tarde en Argentina, las alfalfas de alta calidad o "HQ" (por su denominación inglesa *High Quality*), seleccionadas por mayor VNR (Huset *et al.*, 1991). También data de la misma época la introducción en el mercado de variedades de alfalfa multifoliolada (hojas con más de tres folíolos) que apuntan a ofrecer un mayor valor nutritivo (Juan *et al.*, 1993; Juan *et al.*, 1990; Volenec y Cherney, 1990). Por un lado, más recientemente, el INTA inscribió en 2019 la variedad Amaya PV INTA, que es extremadamente sin reposo invernal (GRI 10) y posee una alta expresión multifoliolada (78 % de las plantas presentan una alta proporción de hojas con 5-6 folíolos), lo que le otorga un mayor ( $p < 0,05$ ) contenido de PB y una mayor ( $p < 0,05$ ) hoja:tallo (62). En marzo de 2019, una empresa multinacional lanzó al mercado argentino la tecnología conocida como "HarvXtra"®, que provee –a través de un proceso de silenciamiento génico– un menor contenido de lignina, lo que permite retrasar cortar la alfalfa en estados avanzados de floración sin sacrificar digestibilidad. Por otro lado, hay otras empresas que buscan desde hace tiempo mejorar la calidad de la alfalfa por medio

de la selección por mayor digestibilidad de tallos, mayor proporción de brotes axilares, mayor resistencia al vuelco, mayor retención de hojas y mayor resistencia al tránsito de maquinaria (Johnson *et al.*, 2002).

No obstante, fuera de los avances puntuales en mejoramiento genético señalados en el párrafo anterior, la calidad del forraje conservado de alfalfa sigue actualmente dependiendo en mayor medida de las técnicas de confección y manejo que de las características de la enorme mayoría de las variedades presentes en el mercado.

### *Hora del día*

La influencia de este factor sobre la calidad de la alfalfa henificada se relaciona con dos aspectos: la velocidad de secado y la composición química del forraje. Con respecto al primero, los cortes en horas de la mañana –luego de disipado el rocío– facilitan un rápido secado de la andana y minimizan las pérdidas; por el contrario, los cortes en las últimas horas de la tarde no aprovechan las horas de mayor temperatura e insolación, aumentan las pérdidas por respiración y alargan el período de secado. En relación con la composición del forraje, los cortes a última hora de la tarde tienden a tener una mayor digestibilidad y energía que los cortes a la mañana (Mayland *et al.*, 1998). Esto es así porque durante el día, a través de la fotosíntesis, las plantas acumulan energía en forma de azúcares (carbohidratos solubles no estructurales o CHNE) y almidón, los que alcanzan su máxima concentración hacia el final de la tarde; durante la noche, una parte de ellos es consumida por la respiración, alcanzando su contenido mínimo al amanecer. Las fracciones fibrosas (FDA y FDN) y proteicas no sufren cambios diurnos, pero –por un efecto de dilución– registran menores concentraciones porcentuales en cortes al final del día. Mayland *et al.* (1998) demostraron que los rumiantes son capaces de detectar esas variaciones y de preferir henos de alfalfa con mayores niveles de CHNE, lo que puede aumentar su consumo hasta en 10 %.

Cualquiera sea la hora elegida, la superficie para cortar en un día no debe ser mayor de la que se puede enfardar o arrollar en el mismo período; de lo contrario, se aumenta innecesariamente el tiempo de exposición de la andana a factores climáticos adversos (Oddino, 1993; Whitney *et al.*, 1969).

## *Volumen de forraje*

Por un lado, la disponibilidad de forraje al momento del corte influye de manera indirecta sobre la calidad del heno de alfalfa. Por ejemplo, un cultivo de alto rendimiento producirá, para un mismo ancho de corte, andanas de mayor densidad que uno de rendimiento inferior. Las andanas densas demoran más tiempo en secarse, lo que aumenta las pérdidas y el riesgo de exposición a factores climáticos adversos que disminuyen la calidad. Por otro lado, un cultivo de bajo rendimiento producirá andanas de baja densidad, que deben ser juntadas mediante rastrillado para aprovechar la capacidad de trabajo de la máquina recolectora (enfardadora o arrolladora), con el riesgo de pérdida de hojas.

## *2 - Secado*

La deshidratación o secado implica la eliminación, en el menor tiempo posible y con mínimas pérdidas de MS y nutrientes, de la mayor parte del agua presente en el forraje. Para dar una idea de la magnitud de este proceso, puede mencionarse que en una hectárea de alfalfa cortada a principios de floración con un rendimiento de 10.000 kg de materia verde, debe eliminar alrededor de 7.500 kg de agua para transformar dicho forraje en heno. Como ya fuera mencionado, el objetivo en alfalfa es secar rápido y retener las hojas. La etapa de secado a campo dura normalmente entre 2 y 4 días, aunque –dependiendo de las prácticas de manejo y de las condiciones climáticas– este período puede extenderse desde 1 hasta más de 15 días. Diversos modelos de predicción han identificado a la radiación solar y al potencial de evapotranspiración como los factores ambientales de mayor influencia en el secado, asignando también importancia al tenor de humedad del suelo y a la densidad de andana (MacDonald y Clark, 1987).

### *Fases en el secado a campo de alfalfa cortada*

De acuerdo con Boden (1965) y Macdonald y Clark (1987) se pueden distinguir las siguientes fases de secado a campo:

i) Desde el corte a 60 % de humedad: la alfalfa elimina por evaporación el agua depositada en la superficie de la planta (rocío, lluvia) y, a través de los estomas, el agua contenida en las células exteriores de los tejidos.

La desecación en esta fase es rápida y fácil, siempre que se permita la llegada del aire al forraje. Para facilitar esto último, pueden realizarse tratamientos mecánicos, como el rastrillado o el aireado, que aceleran el secado sin que se produzcan pérdidas importantes de hojas, siempre que se realicen en condiciones adecuadas.

ii) Desde 60 % hasta 30 % de humedad: para poder evaporarse, el agua menos superficial necesita moverse por difusión desde las células interiores hacia el exterior, atravesando la cutícula (de composición serosa) que recubre hojas y tallos y que constituye una verdadera barrera contra la desecación. La diferente tasa de secado de hojas y tallos hace que, por ejemplo, cuando la andana tiene una humedad promedio de 40 %, la mayoría de las hojas ya estén cerca del 20 %, lo que las hace quebradizas y susceptibles a pérdidas si se aplicaran tratamientos mecánicos para favorecer el secado.

iii) Desde 30 % hasta 18-20 % de humedad: la pérdida de agua se hace más difícil, requiere más energía y depende en mayor medida de las condiciones atmosféricas. Cualquier tratamiento mecánico aplicado en esta fase provocará una alta pérdida de hojas.

### *Pérdidas de MS y nutrientes durante el secado*

Las pérdidas de materia seca (MS) y nutrientes que afectan al forraje de alfalfa cortado pueden ser de varios tipos:

Pérdidas por respiración: como fuera comentado anteriormente, a partir del momento en que la planta es cortada, la tasa de fotosíntesis disminuye abruptamente. Por el contrario, el proceso de respiración celular disminuye a una tasa mucho menor, manteniéndose casi constante hasta que el forraje alcanza una humedad  $\leq 50$  %. A partir de allí, la respiración cae abruptamente hasta hacerse insignificante cuando la humedad baja a 25-30 %. El proceso de respiración implica oxidación completa de hidratos de carbono solubles (principalmente glucosa y fructosa), con eliminación de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y energía. Esto resalta una vez más la importancia de lograr un secado rápido y parejo de la andana para minimizar la respiración. La magnitud de estas pérdidas de MS puede variar entre 3 % bajo buenas condiciones atmosféricas y 20 % bajo condiciones de alta humedad o lluvias, que alargan la etapa de se-

cado. Por otro lado, este tipo de pérdidas tiene el agravante de que los carbohidratos respirados son los de mayor calidad, es decir, los más fácilmente digeribles por el animal (Rotz *et al.*, 1987; Whitney *et al.*, 1969).

Pérdidas por lixiviación o lavado de nutrientes: la alfalfa es un cultivo particularmente susceptible al lavado de nutrientes hidrosolubles por acción de las lluvias durante la etapa de secado. Esto tiene un efecto directo sobre el rendimiento de heno y, principalmente, sobre su calidad, ya que los componentes lixiviados son mayoritariamente carbohidratos no estructurales (60 %) y proteínas solubles (30 %), todos ellos de alta digestibilidad (Collins, 1990; Fannesbeck *et al.*, 1986). El forraje en estados avanzados de desecación absorbe mayor cantidad de agua que el forraje recién cortado, pero también pierde esa humedad absorbida con mayor facilidad que este; por ello, las pérdidas por lixiviación de nutrientes son mayores cuando llueve sobre una andana casi seca que sobre una andana fresca (Rotz y Muck, 1994; Rotz *et al.*, 1991).

Pérdidas mecánicas: están ligadas principalmente a la caída de hojas como consecuencia de la acción de vientos o lluvias fuertes y de la acción de la maquinaria utilizada para uniformar y acelerar el secado, juntar las andanas y otras labores similares.

### *Técnicas para acelerar el secado*

Existen distintas técnicas que pueden emplearse para acelerar la etapa de secado del forraje a campo. Entre ellas se pueden mencionar:

Acondicionado mecánico: acelera el deshidratado al hacer pasar el forraje recién cortado entre dos rodillos que rotan en dirección opuesta y a una velocidad mayor que la de avance. Estos rodillos causan fricción, aplastamiento y quebradura de tallos a intervalos regulares (Figura 8). La fricción reduce, por abrasión, la cutícula serosa que dificulta la difusión de agua, especialmente desde los tallos. Los rodillos pueden ser de superficie lisa, estriada, acanalada o romboidal y pueden estar hechos de caucho, metal o plástico. La separación entre ellos y la velocidad de rotación puede ser ajustable. En la actualidad, la mayoría de los acondicionadores mecánicos van incorporados a la máquina de corte, ya sea esta de movimiento alternativo o rotativo. Numerosos trabajos han demostrado la posibilidad de reducir entre 30 y 50 % el tiempo de se-



cado de la alfalfa utilizando acondicionadores mecánicos; no obstante, debe considerarse que su uso, aun en las mejores condiciones, provoca pérdidas de MS del 1 al 5 % (Savoie *et al.*, 1982; Shinnors *et al.*, 1991). En alfalfa, estas pérdidas son mayores a medida que el forraje es cortado a estados que van desde el vegetativo tardío hasta la floración, posiblemente por el menor contenido de humedad y la mayor debilidad con que las hojas se unen al tallo en estados de madurez avanzados (Shinnors *et al.*, 1991).

Uso de rastrillos: estos implementos pueden ser de tipo estelar, de cabezales rectos u oblicuos, de peines giratorios (rastrillos giroscópicos) o invertidores de andana, que cuentan con un recolector de dientes y una lona tipo draper que desplaza el material hacia un costado o el centro. Los rastrillos tienen dos objetivos fundamentales: 1) juntar hileras para ganar capacidad de trabajo y reducir pérdidas durante la confección de rollos y megafardos cuando las andanas son de bajo volumen; y 2) acelerar el proceso de secado, facilitando la pérdida de los últimos puntos de humedad a partir de la exposición al sol y mayor aireado de las fracciones de fibra que se encuentran en el inferior de la hilera.

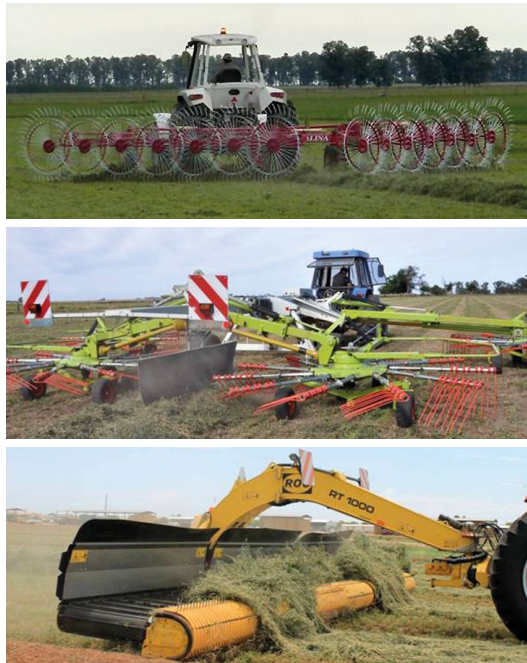


■ **Figura 8.** Rodillos acondicionadores (arriba) que quiebran los tallos generando nuevos puntos de escape del agua (abajo, izquierda y derecha), acelerando el secado y permitiendo conservar mejor la calidad de la fibra para enrollar o enfardar.

Los aspectos críticos para considerar durante la operación de rastrillado son: i) humedad de trabajo, que no debe ser inferior a 30 %, con una ventana óptima de trabajo entre 30 y 40 %. Cuando la operación se realiza en condiciones de menor humedad, se incrementan considerablemente las pérdidas, principalmente de hojas, que es donde se encuentra el 70 % de los nutrientes que pretendemos alcancen la boca del animal; ii) velocidad de avance, que no debe superar los 7 km h<sup>-1</sup>. Según un estudio de la Universidad de Michigan (MSU), EE. UU., por cada km de incremento por encima de la velocidad óptima indicada se incrementan 5 % las pérdidas de forraje (hojas); y iii) altura del rastrillo, que debe encontrarse el equilibrio entre la máxima recolección de material y el cuidado de no generar contacto con el suelo para evitar lo más posible la incorporación de tierra y el arrancado de plantas, que puede ocasionar disminuciones de la población (*stand*) de plantas del cultivo.

En cuanto al horario de trabajo, es conveniente realizar el rastrillado por la tarde, con los primeros puntos de humedad de rocío, o bien durante la mañana antes que se levante el rocío. De este modo, la humedad medida corresponderá a humedad de rocío, rápidamente evaporable, y no a la humedad interna de los tejidos. Es muy importante evitar el rastrillado cuando las hojas se encuentren muy secas, aun cuando la humedad promedio de la andana se encuentre dentro del rango óptimo.

Para el trabajo de hilerado, los rastrillos giroscópicos ofrecen grandes ventajas frente a los rastrillos estelares de tiro lateral o en "V". En primer lugar, logran un copiado de terreno muy superior ya que cuentan con un gran número de ruedas pequeñas próximas a los dientes de recolección, evitando así el contacto con el suelo y la incorporación de tierra a la hilera. En segundo lugar, tienen un tratamiento del material notablemente más suave, en el que el forraje es recogido en el punto de contacto y soltado justo en la línea de hilera conformada, sin recibir sucesivos golpes como en el caso de los rastrillos estelares. El cuidado que debe tenerse con estos equipos giroscópicos es la regulación de la toma de potencia, de forma tal que en vez de entregar las usuales 540 rpm entregue solo entre 350 a 400, de acuerdo a la cantidad y estado del material, garantizando de este modo un trato suave de la fibra. Una tercera alternativa a los dos tipos mencionados, si bien de alto costo pero de alta calidad de trabajo, la constituyen los rastrillos recolectores hileradores de cinta. Los tres tipos se ilustran en la Figura 9.



■ **Figura 9.** Rastrillo estelar en "V" (arriba), rastrillo giroscópico (centro) y recolector hilador de cinta (abajo); herramientas que permiten acelerar el deshidratado del material y juntar andanas. Fotos: gentileza de Baime, Claas y Roc.

Acondicionado químico: el objetivo de este método es remover o alterar la cutícula serosa. Consiste en pulverizar el forraje, en el momento del corte, con sustancias desecantes como carbonato de potasio ( $\text{CO}_3\text{K}_2$ ) y carbonato de sodio ( $\text{CO}_3\text{Na}_2$ ), que tienen un efecto solubilizador de la cutícula (Manitoba Agriculture, 2005). La efectividad de esta técnica depende en gran medida de que la humedad relativa del ambiente sea lo suficientemente baja como para permitir la rápida evaporación del agua de los tejidos tratados (Iwan *et al.*, 1993). En algunos estudios se mencionan incrementos de hasta 40 % en la tasa de secado de alfalfa, pero en otros no se obtuvieron ventajas significativas. En general, la combinación de los métodos de acondicionado mecánico y químico es más efectiva que cualquiera de los dos por separado. Sin embargo, en Argentina –al menos por el momento– es prácticamente nulo el uso de acondicionadores químicos o desecantes.

### 3- Recolección y compactación

Una vez finalizada la etapa de secado a campo, el heno de alfalfa está listo para ser recolectado y compactado. Entre los factores que más influyen en esta etapa sobre la calidad final del producto se encuentran:

#### *Humedad del forraje*

El contenido de agua en el forraje al momento de la confección de rollos, fardos o megafardos es de vital importancia ya que tiene efectos sobre las pérdidas ocurridas durante esta operación, tanto como aquellas ocurridas durante el almacenamiento. De acuerdo a ensayos realizados por INTA Manfredi (Bragachini *et al.*, 2018), la confección debe realizarse con estos rangos de humedad: 13-17 % para megafardos, 14%-20 % para rollos y 13-22 % para fardos. Por encima de dichos valores ocurren problemas de aceleración de la respiración celular y actividad microbiana, calentamiento y pérdida de calidad del material. Por debajo de dichos valores, es decir, cuando el procesamiento se realiza en condiciones excesivamente secas, se incrementan notablemente las pérdidas de material –fundamentalmente hojas– tanto durante la recolección como en la cámara de compactación.

En las distintas pruebas a campo realizadas por INTA en confección de rollos y megafardos, se debe destacar que la fracción vegetal recogida como pérdidas durante esta etapa del proceso de henificación estaba constituida básicamente por brotes y hojas de alto valor nutritivo, con una calidad media en torno a 25 % de proteína bruta (Figura 10).

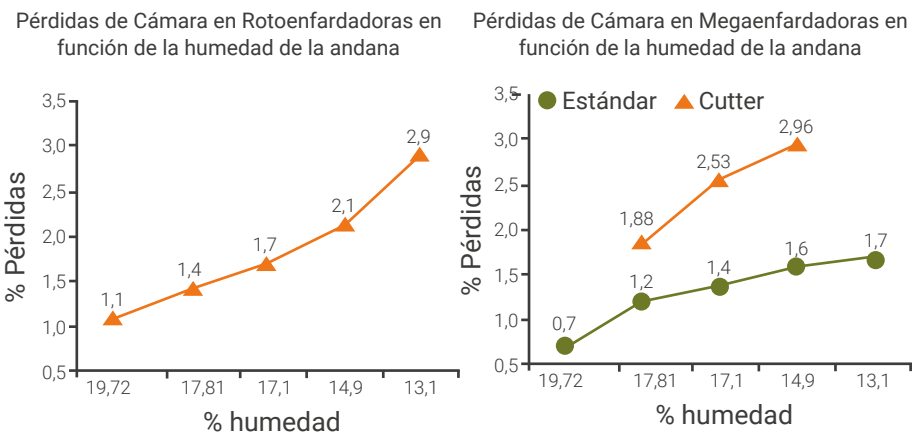
Por un lado, cuando se confeccionen rollos, si la humedad de la andana es inferior al 13 %, debe detenerse la tarea de enrollado, ya que de lo contrario las pérdidas de hojas superarán el límite de tolerancia de 3 % del material empaquetado aconsejado por INTA para obtener rollos de alfalfa de calidad (Bragachini *et al.*, 2018). De continuarse con la operación, se obtendrá un forraje con bajo contenido de proteína y altos valores de fibra (Figura 11, izquierda).

De acuerdo con evaluaciones realizadas por Bragachini *et al.* (2018), las megaenfundadoras ofrecen niveles inferiores de pérdidas de hoja en cámara de compactación en comparación a las enrolladoras, pudiéndose trabajar hasta niveles de humedad de andana en torno al 12 %. Esto se

debe fundamentalmente a la mayor hermeticidad de sus cámaras de compactación. Como contrapartida, debido a la alta densidad de compactación que producen en el heno estos equipos, no es recomendable confeccionar los megafardos cuando la humedad de la andana está por encima del 18 %. De esta forma, la ventana óptima de henificación de megafardos queda comprendida entre 17 % y 12 % de humedad.



■ **Figura 10.** Pérdidas de forraje recolectadas durante la confección de rollos y megafardos en ensayos realizados por el Grupo de Mecanización de INTA Manfredi.



■ **Figura 11.** Incremento de las pérdidas en % de materia seca ocurridas en cámara de compactación de enrolladoras (izquierda) y megaenfardadoras (derecha), a medida que se va reduciendo la humedad de la andana durante la confección.

Otro factor importante para tener en cuenta es si las megaenfardadoras utilizan el sistema procesador de fibra, dado que en este caso las pérdidas por cámara se incrementaron notablemente a medida que disminuye la humedad del forraje henificado. Estimaciones hechas por el INTA Manfredi indican que cuando se trabajó con 13 % de humedad, las pérdidas llegaron a 3 %, que –como ya fuera señalado– es el límite máximo de tolerancia establecido como razonable (Bragachini *et al.*, 2018). La agresividad mecánica a la que es sometido el forraje por acción del procesador la fibra genera un incremento notable de pérdidas de hoja y proteína cuando se trabaja con valores de humedad < 13 % (Figura 11, derecha).

En general, se recomienda enfardar o arrollar durante la noche, con los primeros puntos de humedad de rocío, o bien durante la mañana, después que el rocío se haya disipado en gran medida. En ambos casos, el forraje presenta condiciones de humedad muy cercanas al óptimo. Se desaconseja enfáticamente efectuar la operación durante las horas del mediodía ni de las primeras horas de la tarde, cuando el ambiente está caluroso y seco. Para definir si se debe iniciar, continuar o interrumpir la confección, se sugiere medir en forma continua la humedad de la andana o de las unidades de heno que se van confeccionando, y contrastar los valores obtenidos con los umbrales críticos definidos anteriormente.

- Valoración objetiva del contenido de humedad

Existen varios métodos subjetivos para estimar la humedad del heno, como por ejemplo determinar que una andana de alfalfa está lista para enfardar si al retorcer un manajo este se corta fácilmente, pero sin deshojarse; o cuando ya no es posible pelar la cutícula de los tallos con la uña. No obstante, estos métodos son poco confiables ya que carecen de precisión. En consecuencia, es recomendable acudir a otros métodos más confiables, como la utilización de humidímetros que trabajan por conductividad eléctrica (Figura 12). También se pueden incorporar humidímetros en megaenfardadoras o rotoenfardadoras, a fin de censar automáticamente el contenido de humedad del material (Figura 13).

Los medidores de uso manual permiten medir la humedad directamente sobre una muestra tomada de la andana y comprimida dentro de un recipiente, o bien del interior de un rollo o megafardo confeccionado para prueba (Bragachini, 1995).



Si el forraje no fue secado adecuadamente y es recolectado con un contenido de humedad superior al nivel crítico de 18-20 %, se producirá un deterioro en la calidad del heno (Rogers, 2005). Según Macdonald y Clark (1987), en heno de alfalfa almacenado con 20 % de humedad, las pérdidas por respiración no deberían superar el 5 % de la MS, mientras que con 25 % de humedad esas pérdidas podrían llegar al 10 %, y con 35-40 % de humedad llegarían a 15-20 %. Lechtemberg y Holt (1982) estimaron las pérdidas de MS en 1 % por cada punto porcentual de humedad en el heno por encima de un umbral crítico de 18 %.



■ **Figura 12.** Distintos modelos de humidímetros manuales, que estiman el porcentaje de humedad de la fibra a partir de los valores de conductividad eléctrica que miden. En general, trabajan con precisión adecuada dentro de un rango de contenido de materia seca y compactación de la fibra.



■ **Figura 13.** Sensor de humedad incorporado en la garganta de ingreso de material en una megaenfadadora.

El excesivo contenido de humedad favorece la respiración celular y el desarrollo de hongos (por ejemplo *Aspergillus glaucus*), que consumen los carbohidratos de alta calidad del forraje y generan calor a través de su respiración. Además, el desarrollo de hongos actinomicetes ter-

mofílicos (como *Micropolyspora faeni* y *Thermoactinomyces vulgaris*), responsables de enfermedades respiratorias, constituyen un riesgo para la salud humana y animal. Las temperaturas elevadas que se alcanzan en un heno húmedo pueden disminuir la digestibilidad de la proteína al producirse la Reacción de Maillard, que por un proceso de polimerización genera un fuerte ligamiento entre los aminoácidos, azúcares y otros carbohidratos. La formación de proteína indigestible es proporcional al número de °C días<sup>-1</sup> que el heno está por encima de 35 °C. En el caso de heno enfardado con elevada humedad (más de 30 %), la temperatura generada por el desarrollo de hongos puede alcanzar hasta 70 °C, pudiendo llegar hasta la combustión espontánea del fardo o rollo (Rogers, 2003).

- Tecnologías que permiten trabajar con un rango de humedad más amplio

Existen nuevas tecnologías que permiten operar con un mayor rango de humedad de trabajo permitiendo confeccionar rollos, fardos o megafardos durante más cantidad de horas al día y sin pérdidas significativas de forraje. Algunas de ellas se basan en la aplicación de vapor, posibilitando así la operación en condiciones de andanas más secas, mientras que otras se basan en la aplicación de conservantes con propiedades antimicrobianas y antifúngicas, lo que permite la confección bajo condiciones de humedad mayores a las comúnmente recomendadas.

- Aplicación de vapor en condiciones de excesiva deshidratación de la fibra

Esta tecnología, aún poco difundida a nivel mundial, consiste en la aplicación de vapor sobre la andana en el mismo momento de la recolección del forraje, justo por encima y por debajo del recolector de la megaenfardadora. El equipo vaporizador, denominado DewPoint®, fue desarrollado en Estados Unidos por la firma Staheli West y permite confeccionar megafardos o rollos en condiciones de andana muy seca ( $\leq 12\%$ ), manteniendo niveles mínimos de pérdida de material (Figura 14).

El implemento se ubica, conformando un tren, por detrás del tractor y por delante de la megaenfardadora. No demanda transmisión mecánica ni hidráulica de parte del tractor, sino que opera en forma autónoma, requiriendo solamente ser trasladado. Debido a que se ubica entre tractor y megaenfardadora, la vaporizadora tiene previsto un túnel por donde

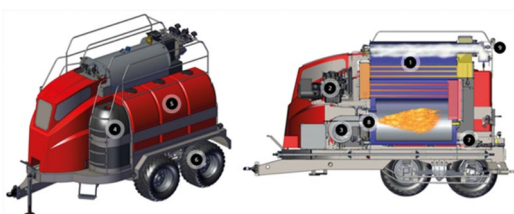


pasa la transmisión desde el tractor (mecánica/cardánica e hidráulica/mangueras) a la megaenfardadora. Posee un motor Isuzu de 21 HP, que está alimentado a gasoil y que acciona una caldera que vaporiza el agua contenida en los depósitos. El vapor es conducido a presión, mediante mangueras, hacia el recolector de la megaenfardadora. La aplicación de vapor a presión directamente a la andana permite incrementar entre 1 y 6 % la humedad del material, permitiendo trabajar aun en condiciones de andanas muy secas, sin que se generen mayores pérdidas de hoja.

El equipo (Figura 15) cuenta con seis depósitos de agua, que producen una capacidad total de 3.000 l y un tanque de gasoil de 1.200 l. El peso de la máquina cargada, esto es con la capacidad completa tanto de combustible como de agua, supera los 13.000 kg.



■ **Figura 14.** Vaporizadora DewPoint®, de la firma Staheli West (EE. UU.), en plena operación de megaenfardado de andanas excesivamente secas. Foto: gentileza AGCO Argentina.



■ **Figura 15.** Esquema con detalles de la máquina vaporizadora DewPoint® de la firma Staheli West. Imagen: gentileza Staheli West.

La vaporizadora DewPoint® tiene una autonomía de trabajo de 5 a 6 h. Cuenta con cuatro toberas ubicadas próximas al recolector de la megaenfardadora: dos de ellas entre los dientes recolectores, que hidratan el material desde la parte inferior de la andana, y dos a la parte superior, que lo hidratan desde arriba. La configuración de las toberas permite variar la dosis y zonas-objetivo de humedecimiento. La dosificación se

maneja desde una pantalla táctil, ubicada en la cabina del tractor. Un sensor de humedad, ubicado en la cámara de compactación, indica al operario el nivel de humedad logrado; de esta forma, se pueden realizar los ajustes necesarios según sea el objetivo de humedad que se haya fijado. La caldera tiene un consumo promedio de 2 l gasoil t MS<sup>-1</sup> henificada. La demanda extra de potencia de tractor es de 20 a 40 HP, según las condiciones de relieve del suelo (pendientes) (Bragachini *et al.*, 2018).

Hasta el momento, el mayor impedimento para la difusión de esta tecnología es su elevado costo. Sin embargo, la empresa proveedora está trabajando en el desarrollo de equipos que, basados en el mismo principio, tengan un costo menor. También está diseñando equipos de este tipo para trabajar con rotoenfardadoras.

- Uso de aditivos conservantes

La utilización de preservantes o conservantes químicos permite recolectar el forraje con alta humedad (20-30 %), a efectos de disminuir la pérdida de hojas y evitar el efecto negativo de las lluvias, sin sufrir las consecuencias indeseables propias de henos húmedos. Productos como ácido propiónico, ácido propiónico + ácido acético (en dosis de 1 % de la MS), propionato de amonio, urea (en dosis de 5-7 % de la MS) o anhídrido de amonio (en dosis de 1-2 % de la MS), se aplican sobre el forraje en el momento de la recolección y tienen el efecto de prevenir el crecimiento fúngico (Holland y Kezar, 1990; Manitoba Agriculture, 2005). Su uso no se ha difundido aún en Argentina, principalmente por su alto costo y por su doble efecto de corrosión sobre la maquinaria y toxicidad para las personas (al menos en algunos casos). Actualmente se ofrecen en el mercado productos menos corrosivos e irritantes, así como los accesorios necesarios para equipar a las megaenfardadoras con esta tecnología. Otros conservantes, menos tóxicos, pero no siempre efectivos, son las sales ácidas (como diacetato de sodio y propionato de sodio, en dosis de 0,2-0,7 % de la MS) y los inoculantes basados en bacterias anaeróbicas productoras de ácido láctico y ácido propiónico (Holland y Kezar, 1990).

Desde el año 2010, las empresas New Holland y AGCO ofrecen en EE. UU. y Europa (Figura 16) un mecanismo que actúa en función de las lecturas que realiza el sensor de humedad y que permite ir aplicando un

aditivo denominado “Crop Saver Buffered Acid ®”, que tiene pH 6 y que está elaborado a partir de ácido propiónico (64,5 %) y ácido cítrico (5 %). Esta aplicación no elimina el agua, sino que la neutraliza a través de una reacción de hidrólisis, lo que inhibe el desarrollo de hongos. Esta tecnología está disponible en todos los equipos de henificación de estas dos empresas. Desde el año 2017, ambas marcas ofrecen estos equipos en Argentina y se pueden utilizar aplicando ácido orgánico Lupro Grain®, que comercializa la empresa Basf, el cual es un ácido orgánico, compuesto por 90 % ácido propiónico, 4 % propilenglicol, 4 % amonio y 2 % de agua. El ácido propiónico es ampliamente conocido por sus propiedades antifúngicas (hongos y levaduras) y bacterias (Bragachini *et al.*, 2018).



■ **Figura 16.** Equipo aplicador de conservantes colocado en megaenfardadoras New Holland y AGCO, capaz de realizar la pulverización de los productos directamente sobre el heno al momento de su recolección. Fotos: Farm Progress Show 2017.

### *Volumen de andana, tecnología operativa y densidad del producto*

Otros puntos críticos para considerar durante la etapa de recolección y empaquetado (enrollado o enfardado), además de la humedad de la andana, son el volumen o rendimiento de la andana (expresado en kg MS por metro lineal), la tecnología utilizada y la densidad del heno logrado.

Contar con un buen volumen de andana, de entre 3 o 4 kg MS m<sup>-1</sup> lineal de avance, es fundamental para reducir las pérdidas, ya que cuando las andanas son poco densas se produce un efecto de pérdida de hojas (deshoje o desflecado) que disminuye la calidad y la cantidad del producto obtenido.

El tipo de maquinaria empleada también influye directamente en la calidad del heno obtenido. Si el recolector de la roto- o megaenfardadora

es más ancho que la cámara de compactación, permite la confección de unidades de heno bien formadas, dándole la estructura necesaria para tenga una mejor conservación cuando se vea posteriormente expuesto a las condiciones ambientales. Esto cobra mayor importancia cuando se trata de rollos, dado que evita que queden “aplastados contra el suelo”. A su vez, mientras más herméticas sean las cámaras de compactación, se reducirán en mayor medida las pérdidas por cámara. Este es el motivo por el que las megaenfardadoras generan menores pérdidas durante la confección. Entre las rotoenfardadoras, aquellas que cuentan con menor número de cintas compactadoras son las que logran mayor hermeticidad, consiguiendo así reducir las pérdidas.

Los sistemas procesadores de fibra (cutter), que permiten obtener henos “instantáneos” con fibra ya cortada a 8 o 4,5 cm, son un factor que puede incrementar las pérdidas, especialmente cuando el forraje se encuentra excesivamente seco. No obstante, en la mayoría de los casos, estas mayores pérdidas no se manifiestan debido al sistema de atado que exigen los rollos de fibra procesada, que es el atado mediante red. Sin embargo, este sistema de atado también puede ser un factor que incremente las pérdidas cuando la andana está muy seca (<14 % de humedad). Respecto del atado con hilo, el atado con red reduce las fricciones sufridas por la superficie del rollo durante el atado, debido a que el atado con red demanda solo de 2,5 a 3 vueltas para completarse, mientras que el atado con hilo demanda 32 vueltas, o bien 16 vueltas si se realiza con el sistema de doble aguja, como ocurre en la mayoría de los casos actualmente. El atado con red también otorga mayor hermeticidad, lo que favorece no solo la operación de atado, sino también las condiciones de almacenaje.

Respecto al grado de compactación logrado, no tiene un efecto inmediato sobre la calidad del fardo o rollo, pero influye sobre su hermeticidad a las lluvias durante la etapa de almacenamiento. Experiencias realizadas por Kjelgaard (1979) demostraron que las pérdidas de materia seca durante el arrollado de alfalfa ascendían en promedio al 10 %, mientras que Whitney *et al.* (1969) estimaron las pérdidas por recolección con máquina de fardos prismáticos en 3,8 %. Otros estudios (Koegel *et al.*, 1985) indican que las pérdidas de hoja en la cámara de compactación son 40 % mayores en arrolladoras que en enfardadoras tradicionales.

### Máquinas recolectoras-compactadoras

Hasta mediados de la década de 1980, la maquinaria más común para recolectar y compactar heno de alfalfa en Argentina era la enfardadora, que produce fardos prismáticos de aproximadamente 45 x 55 x 100 cm, con un peso de 25 a 30 kg por unidad y atados con alambre o hilo plástico (Bragachini, 1995; Bragachini *et al.*, 1995). La mayor desventaja de este sistema es la alta demanda de mano de obra requerida para juntar y almacenar los fardos en forma manual. No obstante, este formato de henificación tiene todavía su mercado específico, particularmente para equinos de alto valor.

Desde la segunda mitad de la década de 1980, la adopción de rotoenfardadoras experimentó un crecimiento sostenido, debido fundamentalmente a su mayor capacidad de trabajo y al alto grado de mecanización que otorgan al proceso de henificación, con la consiguiente baja demanda de mano de obra (Figura 17). Según los modelos, las rotoenfardadoras pueden producir rollos de alfalfa de 400 a 800 kg, de 1,20 o 1,50 m de diámetro y de hasta 1,80 m de altura, y atados con hilo plástico o red.



■ **Figura 17.** Rotoenfardadora (mitad superior) y megaenfardadora (mitad inferior) de la firma AGCO utilizadas en distintos ensayos realizados en conjunto con el INTA Manfredi.

A partir del año 2008, con la instalación de empresas exportadoras de heno de alta calidad, comienzan a difundirse las megaenfardadoras. Entre las ventajas de este sistema, en comparación con el rotoenfardado, se mencionan su mayor capacidad de trabajo, la menor pérdida de hojas en cámara, la mayor presión de compactado –y en consecuencia, la mayor densidad del fardo–, la mayor eficiencia para el transporte y almacenamiento, y la posibilidad de dividirlo en ‘panes’ para su suministro. En los últimos años se han difundido en el país algunas megaenfardadoras de alta compactación, que tienen la capacidad de confeccionar megafardos de aproximadamente 700 kg y con densidades cercanas a los 300 kg m<sup>-3</sup>.

Basados en la evolución de las técnicas de henificación en el país, puede decirse que en la actualidad la adopción de tecnología se orienta hacia lo siguiente:

- Predominancia de rotoenfardadoras de cámara de 1,2 m de ancho, con beneficios para el transporte en camión dado que permite la colocación de dos rollos en paralelo de forma de respetar los 2,4 m de ancho de transporte permitidos por ley. A su vez, la masiva adopción de carros mezcladores (mixers) para la conformación de raciones hizo disminuir notoriamente el empleo aros comederos, que se usaban para el suministro libre por parte del animal y que demandaban rollos de 1,5-1,6 m de ancho.
- Creciente difusión de megaenfardadoras, que posibilitan la producción de heno a gran escala, sea para mercado externo o interno. Estos equipos ofrecen megafardos de diferentes dimensiones para abastecer distintas necesidades de mercado.
- Marcada tendencia hacia el uso de sistemas recolectores más anchos que la cámara de compactación, lo que facilita el correcto y parejo llenado de esta, y la utilización de sistemas de atado de doble aguja (doble brazo).
- Significativa adopción del sistema cutter, tanto en rotoenfardadoras como en megaenfardadoras, que corta la fibra en trozos de 8 cm (comunes en un principio) o 4,5 cm de largo (tendencia actual). Este trozado facilita grandemente las tareas diarias en los comederos.
- Difusión de la red como sistema de atado, que se traduce en un notable aumento de la capacidad de trabajo de las rotoenfardadoras



y que es indispensable para el atado de rollos de fibra troceados ("cutteados").

En el futuro cercano se espera una mayor utilización de adelantos tales como:

- Megaenfardadoras y rotoenfardadoras con incorporación de humidímetros y sistemas de aplicación de ácido propiónico y de otros productos conservantes del heno. Estas tecnologías, si bien todavía de muy baja difusión en nuestro país, posibilitan trabajar con mayor contenido de humedad en el forraje.
- Empleo de sistemas de rotulación ("ticketeado") en megaenfardadoras para la identificación individual de cada megafardo, alineado con la adopción de eficientes sistemas de trazabilidad de producto.
- Comunicación inteligente entre el tractor y la megaenfardadora o la rotoenfardadora, de forma tal que se pueda ajustar el ritmo de trabajo de acuerdo al nivel de exigencia, la cantidad de material presente o el contenido de materia seca censado por el implemento.

### *Alternativas de compactación de heno*

Otra forma de compactar forraje seco de alfalfa es la producción de pequeños cubos (3-4 cm de lado) o pellets cilíndricos (1,5-2 cm de diámetro x 3-5 cm de largo) de alta densidad. La materia prima es la alfalfa deshidratada, ya sea secada a campo (henificación) o en forma artificial. Esta técnica de conservación utiliza máquinas compactadoras, tanto móviles (que trabajan a campo) como estacionarias (en galpón o planta industrial), que muelen el heno a un tamaño de partícula de 2-3 mm, lo humectan o no y lo comprimen en cubos que luego son llevados a un contenido de humedad no mayor del 14 % (Pauli *et al.*, 1988). La densidad de un cubo o de un pellet es el doble o más de la de un fardo convencional (400 vs. 200 kg m<sup>-3</sup>, respectivamente), lo que facilita y abarata su transporte, almacenamiento y suministro. Debido a su alta demanda energética, este sistema representa solo una pequeña parte de la alfalfa conservada en Argentina y se destina a la formulación de alimentos especiales para conejos, chinchillas, equinos y porcinos, y solo eventualmente para vacas lecheras. Un tratamiento más detallado de la producción de cubos y pellets se ofrece en el capítulo 16 de este libro.

#### 4- Transporte y almacenamiento

El heno de alfalfa es un producto perecedero y como tal su manejo durante el transporte y almacenamiento influirá en la calidad final del forraje suministrado al ganado. En Argentina, los fardos prismáticos son recolectados del campo en forma manual, ya que no existe una mecanización de esta tarea, como es común en otros países. Una alta proporción de los fardos prismáticos son almacenados bajo techo, en estructuras permanentes o temporarias, lo que garantiza mínimas pérdidas de calidad. Por el contrario, en el caso de los rollos y los megafardos, el traslado es mecanizado y demanda escasa mano de obra, ya que pueden ser cargados y transportados por un solo operario con un tractor (Bragachini, 1995; Pauli *et al.*, 1988).

Casi la totalidad de los rollos de alfalfa producidos en el país son almacenados a la intemperie, lo que los hace susceptibles a pérdidas de materia seca y de valor nutritivo por efecto de los factores ambientales. El almacenamiento en lugares altos, sobre pallets, postes o grava, bajo cubierta plástica y en estibas separadas entre sí y orientadas de norte a sur para que los bañe la luz del sol durante todo el día, ayudan a minimizar estas pérdidas (Bragachini, 1995) (Figura 18). Como ya se mencionó, las enrolladoras que poseen atador con red ofrecen beneficios durante el almacenaje de rollos a la intemperie, retardando –pero no impidiendo– su deterioro, la actividad microbiana y la generación de micotoxinas. Bruno *et al.* (1991), analizando en el área de Rafaela (Santa Fe) rollos almacenados sin tapar durante nueve meses, determinaron pérdidas de 14 % de MS; en cambio, cuando los rollos fueron tapados con una cubierta plástica, las pérdidas disminuyeron a solo 4,5 % de MS. Para la misma zona, Romero *et al.* (1991) estimaron pérdidas de MS en rollos tapados y sin tapar del orden de 5,5 % y 8,6 %, respectivamente. En otro trabajo, Romero *et al.* (1991) también encontraron que la capa periférica de rollos tapados durante 6 meses, en los que recibieron 605 mm de lluvia, presentaba una mayor DMS (69 %) que la de los rollos sin tapar (59 %), aunque la DMS del núcleo fue similar en ambos casos (67 %). En un trabajo similar (Romero *et al.*, 1991) se señala que en los rollos sin tapar, la DMS del núcleo (59 %) fue mayor que la de la periferia (55 %), que la de la capa enmohecida (49 %) y que la de la capa en contacto con el suelo (50 %). Es importante tener en cuenta las pérdidas



en la capa exterior de los rollos, ya que esta representa una alta proporción del peso total. Por ejemplo, en un rollo de 1,80 m de diámetro, los primeros 15 cm de la periferia equivalen al 30 % del volumen total y los primeros 30 cm al 55 % (Romero *et al.*, 1991).



■ **Figura 18.** Sistema simple y económico de almacenamientos de rollos de heno de alfalfa logrados con calidad, aislados de la intemperie mediante cubierta plástica y del suelo mediante pallets.

Cuando se trata de megafardos es esencial su almacenamiento bajo cubierta –sea tinglado, galpón o cobertura plástica– ya que su alta densidad (comúnmente 250 a 280 kg m<sup>-3</sup>) torna sumamente difícil el secado luego de una lluvia o ingreso de humedad, condensación superficial, lo que a su vez genera la reactivación microbiana y la descomposición de la fibra, con pérdidas de cantidad y calidad de materia seca.

Cuando se cubran rollos o megafardos con lonas se debe tener la precaución de primero dejar preostrar unos días entre el momento de la confección y el tapado; luego, durante 15 días o hasta ver que no se generan más condensaciones de humedad en el interior, se recomienda taparlos a la noche y destaparlos durante el día, obviamente, siempre que no llueva.

## Conservación en húmedo: silaje y henolaje

El ensilaje es una técnica de conservación de forrajes por la vía húmeda, basada en el desarrollo de un proceso fermentativo provocado por la actividad de microorganismos en ausencia de aire (anaerobiosis) y que tiene por finalidad limitar las pérdidas del valor nutritivo y evitar la formación de sustancias tóxicas para los animales. La conservación de alfalfa como silaje y henolaje tiene en nuestro país una difusión consi-

derablemente menor a la conservación como heno (Hijano y Basigalup, 1995). En la década de 1960, el silaje de alfalfa tuvo una cierta difusión entre productores de avanzada de la región Pampeana, pero más tarde su uso decayó. Sin embargo, en los últimos años se ha renovado el interés en esta técnica y se han llevado a cabo también trabajos de experimentación, impulsados por la aparición de nueva maquinaria, productos químicos y variedades forrajeras.

Se denomina silaje de alta humedad o silaje de corte directo cuando el forraje es almacenado con más de 70 % de humedad; y se denomina henolaje, silaje premarchitado o silaje preoreado cuando el forraje es almacenado con un rango de humedad de 40 a 60 %. Durante los últimos años, la producción de silaje y henolaje de fibra larga ha progresado en forma importante en los Estados Unidos, particularmente en zonas donde ocurren frecuentes lluvias durante la época de crecimiento del cultivo, que dificultan la obtención de henos de alta calidad. Bajo esas condiciones de alta humedad, estas técnicas de conservación posibilitan la reducción de pérdidas y la mayor calidad de forraje conservado.

En cualquiera de los casos anteriores, la alfalfa ensilada sufre un proceso fermentativo a bajo pH (condiciones de acidez). Entre las principales ventajas de este tipo de conservación se incluyen la escasa pérdida de hojas desde el corte hasta el ensilado, la baja pérdida de nutrientes por respiración, la corta exposición a factores climáticos adversos luego del corte (importante sobre todo en zonas de régimen pluvial húmedo o subhúmedo concentrado durante la etapa de crecimiento del cultivo), el alto grado de mecanización del proceso y la posibilidad de conservarlo por períodos prolongados con pérdidas mínimas de calidad (Viviani Rossi *et al.*, 1995). Sin embargo, la alfalfa no es un cultivo ideal para el ensilado debido a que posee un bajo tenor de carbohidratos solubles (precursores de los ácidos orgánicos) y una alta concentración de proteínas y cationes (que actúan como atenuadores de los cambios de pH). Las pérdidas totales de materia seca y de nutrientes durante el proceso de ensilado de la alfalfa pueden variar desde valores mínimos de 3 %-6 % bajo condiciones adecuadas hasta el 70 % o más cuando el forraje ensilado sufre serias alteraciones (Dulphy y Demarquilly, 1981).

No obstante las limitaciones descritas, el empleo de una serie de técnicas de manejo y de productos específicos, que serán detallados

posteriormente, permiten conservar forraje de alfalfa en húmedo con muy buenos resultados en cuanto a la preservación de su valor nutritivo.

### *Principales transformaciones bioquímicas durante el ensilado*

En el forraje verde cortado, picado y posteriormente ensilado, se produce una serie de transformaciones bioquímicas que dependen de factores externos e internos de la planta, y cuya acción conjugada orienta el desarrollo de la flora bacteriana y la evolución de la fermentación. Esta transformación del forraje fresco, que se efectúa en varias fases, finaliza con la obtención de un producto denominado silaje. Las características fermentativas del silaje le confieren la posibilidad de ser conservado a través del tiempo con mínimas pérdidas (O'Kiely, 1991; Seale *et al.*, 1981). En la Figura 19 se esquematizan los principales procesos que tienen lugar durante el ensilado. Muy sintéticamente, esas fases pueden describirse como sigue:

Acción de las enzimas de la planta: como consecuencia de que el forraje ensilado continúa respirando, en la masa ensilada se producen intercambios gaseosos. Este fenómeno se produce mientras existan azúcares o glúcidos solubles y presencia de oxígeno.

Hidrólisis de glúcidos: los glúcidos solubles de la planta son transformados rápidamente por las enzimas en glucosa y fructosa, que constituyen el principal sustrato de los microorganismos presentes en la superficie de la planta. Existen otros glúcidos, como el almidón, que no pueden ser utilizados directamente por los microorganismos porque es improbable que existan enzimas que lo degraden; de todos modos, el contenido de almidón en alfalfa es poco importante.

Respiración: los glúcidos solubles son rápidamente atacados, debido a que mientras exista oxígeno en la masa ensilada forman parte del sustrato que posibilita los intercambios gaseosos. La respiración provoca liberación de gas carbónico, que poco a poco va reemplazando al oxígeno en el silo; además, hay producción de calor y agua. Según Devuyst y Van Belle (1964), al cabo de 5 a 6 h un silo puede estar totalmente privado de oxígeno, siempre que haya sido sellado rápidamente. Si el sellado ocurre a las 48 h de haber terminado el silo, el proceso respiratorio continúa por 72 h.

Proteólisis: si durante al inicio de la fermentación no se alcanza rápidamente un valor de pH lo suficientemente bajo, se puede producir la degradación de las proteínas, con formación de amoníaco y aminas. La degradación proteica en silajes varía según la especie forrajera, el estado fenológico, la composición química, el contenido de materia seca y el tratamiento previo que se haya dado al forraje (Carpintero *et al.*, 1979; McKersie, 1985). McDonald *et al.* (1991) señalan que uno de los procesos más importantes que ocurren durante el ensilado es la degradación enzimática de la proteína (proteólisis) a nitrógeno no proteico soluble (NNPS), esto es péptidos, aminoácidos libres, nitrógeno amoniacal, etc. Estos procesos ocurren durante los primeros 3 a 7 días de la fermentación y pueden dar como resultado que si las condiciones de acidez favorecen la actividad de las proteasas vegetales y la solubilidad de las proteínas, el 85 % de la PB de los silajes de alfalfa se encuentre en forma de NNPS.

Acción de los microorganismos: luego de la actividad enzimática se produce el rápido desarrollo de la microflora presente en el forraje al momento de la cosecha, que se alimenta de los jugos celulares liberados por la planta. Esta flora bacteriana comprende varios géneros y especies, que se caracterizan por su reacción frente a determinadas condiciones ambientales. Al comienzo de la fermentación se desarrollan bacterias aeróbicas estrictas, que no tienen interés para el ensilaje y que desaparecen rápidamente cuando el medio se empobrece de oxígeno. Luego, a medida que se acentúa la anaerobiosis, comienzan a multiplicarse las bacterias anaeróbicas. Entre estas últimas, las primeras en desarrollarse son las bacterias coliformes (o enterobacterias), organismos anaeróbicos facultativos que provocan un comienzo de acidificación del medio, produciendo esencialmente ácido acético, anhídrido carbónico y alcohol. Este grupo deja de actuar cuando el pH llega a valores inferiores a 4,5. Seguidamente intervienen las bacterias lácticas (BAL), que al comienzo son poco abundantes pero que luego se desarrollan rápidamente no solo porque su resistencia a la acidez es muy grande, sino también porque la acidez que provocan impide el desarrollo de otros microorganismos indeseables. Existen importantes diferencias entre las especies bacterianas que intervienen en la fermentación láctica, tanto entre las homofermentativas como en las heterofermentativas. Otras bacterias que participan, con mayor o menor eficacia, en la fermentación láctica son: *Pedicoccus* spp., *Streptococcus* spp. y *Leuconostoc* spp.

También puede ocurrir que se desarrolle otro tipo de microorganismos indeseables durante el ensilaje, que utilizan elementos nutritivos de alta calidad, como azúcares solubles, ácido láctico, proteínas y compuestos nitrogenados más simples. Estos microorganismos se denominan colectivamente bacterias butíricas (anaeróbicas esporuladas) y pueden producir ácidos grasos volátiles (propiónico, butírico, etc.), amoníaco y anhídrido carbónico.

Actividad posfermentativa: en principio, en ausencia de oxígeno y a un  $\text{pH} \leq 4,0$  (dependiendo del contenido en materia seca) el silaje (o he-nolaje) correctamente fermentado se estabiliza. Sin embargo, en caso de que se introduzca aire en la masa ensilada –tanto por pérdida de hermeticidad del silo o por apertura en el momento de la distribución en los comederos– existe el riesgo de actividades posfermentativas. Estos riesgos son aún mayores cuando existen cantidades importantes de azúcares en el forraje. Los agentes causantes de estas degradaciones son mohos y levaduras, que pueden actuar aun en ambientes muy ácidos. Los mohos son aeróbicos estrictos y sus esporas existen en grandes cantidades en el forraje; las levaduras, en cambio, pueden desarrollarse con o sin la presencia de aire.

Fases	Transformaciones bioquímicas
ENZIMÁTICA	Hidrólisis de glúcidos Azúcares → glucosa-fructosa
	Respiración Glucosa-fructosa + O <sub>2</sub> → CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O + n calorías
	Proteólisis Proteínas → aminoácidos
	Comienzo de la acidificación (acción de bacterias coliformes o enterobacterias)
	azúcares → ácido acético + alcohol + CO <sub>2</sub>
	Aminoácidos → amoníaco + AGV (ácidos grasos volátiles)
FERMENTATIVA	Acidificación del medio (acción de bacterias lácticas)
	Azúcares { bacterias homofermentativas → ácido láctico bacterias heterofermentativas → ácido láctico + ácido acético + alcohol
	Desvíos fermentativos (acción de bacterias butíricas)
POSFERMENTATIVA	Azúcares residuales y ácido láctico → CO <sub>2</sub> + ácido butírico + AGV
	Aminoácidos { AGV + NH <sub>3</sub> Aminas
	Desarrollo de mohos
	Azúcares + O <sub>2</sub> → CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O + calorías
	Ácidos orgánicos + O <sub>2</sub> → Enmohecimiento
POSFERMENTATIVA	Desarrollo de levaduras
	Azúcares → Alcohol + CO <sub>2</sub>
	Ácido láctico + O <sub>2</sub> → Ácido acético + CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O

■ **Figura 19.** Síntesis esquematizada de las principales transformaciones bioquímicas que ocurren durante las fases del desarrollo de la fermentación en el ensilado de alfalfa.

## Factores que afectan el desarrollo de la fermentación

### Propios de la planta

Estado de madurez y variedad: en la producción de silaje estos factores ejercen un efecto idéntico al descrito anteriormente para la producción de heno.

Concentración de carbohidratos solubles no estructurales (CHNE): la formación de ácido láctico, necesario para la obtención de un pH bajo, exige la presencia de azúcares en el forraje verde. El contenido en este tipo de carbohidratos dependerá de la especie forrajera dominante en la pastura (las gramíneas son más ricas que las leguminosas), de la fertilización con nitrógeno, etc. Según Carpintero *et al.* (1969), para lograr un silaje de alfalfa de alta calidad fermentativa, la concentración en CHNE que compense la elevada capacidad buffer de la alfalfa debe ser de entre 12,6 % y 16,1 %. En la Tabla 7 se muestran los valores de CHNE de diversas forrajeras en comparación con alfalfa.

■ **Tabla 7.** Contenido de carbohidratos no estructurales solubles (CHNE) en algunas especies forrajeras utilizadas para la producción de silajes y henolajes empaquetados.

Especie Forrajera	Estado fenológico	CHNE (% MS)	Observaciones
Raigrás anual	Elongación	28	Sin fertilización
Raigrás anual	Elongación	15	Fertilizado (150 kg de N ha <sup>-1</sup> )
Festuca alta	Principio de panojamiento	10	
Maíz	Grano lechoso a pastoso	30	
Pasto ovillo	Espigazón	8	
Trébol rojo	Botón floral	10	
Alfalfa	Principio de floración	8	

Capacidad buffer o tampón: es la capacidad de la planta para resistirse a los cambios o variaciones de pH, y en particular a la acidificación. Este factor depende de la forrajera utilizada, de la concentración de compuestos nitrogenados, del contenido de ácidos orgánicos y sales minerales, del estado fenológico, de la naturaleza e importancia de los productos resultantes de la degradación durante la fermentación, etc.

(Grum *et al.*, 1991). McDonald *et al.* (1991) señalaron que la capacidad buffer de la alfalfa es alta, con valores que van de 39 a 57 mE 100 g MS<sup>-1</sup>.

Contenido en materia seca: el agua representa el componente mayoritario de la planta de alfalfa con valores entre 70 % y 85 % del material apto para ensilar. Además de ser parte esencial de los jugos celulares, el agua es el vehículo de los componentes nutritivos, cuya concentración determina la presión osmótica en la célula. Los microorganismos que actúan durante el ensilado tienen distintas sensibilidades a esta última, a punto tal que, en la práctica, su elevación favorece la presencia de bacterias lácticas y desalienta la de las de tipo butírico. En consecuencia, este efecto beneficioso se puede conseguir con la disminución de la cantidad de agua contenida en el forraje a través del preoreo o premarchitado. En alfalfa, las pérdidas de MS son más severas en el caso de silajes que en el de henolajes. Rotz *et al.* (1993), utilizando el modelo de simulación DAFOSYM creado por Buckmaster *et al.* (1990), estimaron que las pérdidas de MS de alfalfa son menores en silo de forraje premarchitado que en silo de forraje proveniente de corte directo (Tabla 8).

■ **Tabla 8.** Valores simulados de pérdidas promedio de materia seca (MS) durante almacenamiento de silaje de alfalfa premarchitada (65 % de humedad) y de corte directo (más de 75 % de humedad). Adaptado de Rotz *et al.* (1993).

Tipo de pérdida	Pérdida de MS (%)	
	Premarchitado	Corte directo
Efluentes	0,0	4,7
Respiración aeróbica en llenado	0,8	1,3
Fermentación	0,7	1,5
Respiración aeróbica en almacenamiento	5,0	4,7
Respiración aeróbica en vaciado	5,2	3,8
Total	12,1	17,7

En síntesis, la estabilidad de un silaje con un forraje preoreado puede ser mayor aun a valores de pH superiores a los necesarios para estabilizar un ensilaje de alfalfa de corte directo. Sin embargo, en prácticamente todas las forrajeras, para que el preoreo tenga un efecto significativo,



es necesario alcanzar al menos 30 % de MS (Tabla 9). A las pérdidas fermentativas deben sumarse las pérdidas de nutrientes solubles (azúcares, productos fermentativos, proteínas solubles, nitrógeno no proteico y minerales) que se originan por el drenaje de líquido o efluentes producidos como consecuencia de roturas celulares. Las pérdidas por efluentes son directamente proporcionales al tenor de humedad del forraje al ensilar, aunque también dependen del tipo de silo utilizado (Stalings *et al.*, 1981).

■ **Tabla 9.** Variación del pH de estabilidad en función del tenor de materia seca (MS) del forraje de alfalfa ensilado.

% MS del forraje	pH de estabilidad
15 - 20	4,0
20 - 25	4,0 - 4,2
25 - 30	4,2 - 4,4
30 - 35	4,4 - 4,6
35 - 40	4,6 - 4,8

Aptitud de algunas forrajeras para el proceso de ensilado: esta característica es el resultado de las propiedades químicas propias de cada especie forrajera. Si bien el contenido en materia seca es un factor importante, su modificación a través del preoreo puede influir radicalmente en la fermentación láctica. Sin embargo, para los silajes de corte directo, la concentración de carbohidratos no estructurales y la capacidad buffer o tampón condicionan la aptitud de las plantas para al ensilado.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Viviani Rossi y Gutiérrez (1998), la alfalfa presenta una alta probabilidad de obtener un pH inestable en la masa ensilada, lo que provocará el desarrollo de fermentaciones indeseables. Por el contrario, el maíz –por sus características químicas de alto contenido en azúcares solubles y baja capacidad buffer o tampón– asegura un buen proceso de ensilado. Utilizando como criterio de evaluación de la calidad fermentativa y estabilidad de la masa ensilada la relación MS:pH (Tabla 10), se infiere que en el silaje de alfalfa –a diferencia de lo que ocurre en el maíz– de corte directo se produce una intensa degradación proteolítica.

■ **Tabla 10.** Perfiles fermentativos de los silajes de alfalfa y maíz de corte directo en función del tenor de materia seca (MS), la producción de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) como porcentaje del nitrógeno total (% NT) y el valor de pH alcanzado en la masa ensilada.

Tipo de Silaje	MS (%)	N-NH <sub>3</sub> (%NT)	pH
Alfalfa	26	33	5,3
Maíz	25	7	3,8

### *Externos a la planta*

Malezas, plagas, enfermedades y altura de corte: su efecto en la producción de silaje, al igual que el de la maquinaria de corte e hilerado, es similar al descrito para la producción de heno.

Tamaño de picado: el efecto del tamaño de partícula sobre el desarrollo de la fermentación es bien conocido. El picado fino, de 15 a 25 mm, favorece la dispersión de los jugos celulares, y por lo tanto de azúcares solubles, en la masa de forraje; a su vez, favorece también la eliminación del aire a través de una mejor compactación en comparación con forraje sin picar o picado grueso. Esa rápida liberación de azúcares solubles, al servir de sustrato a las bacterias lácticas, también favorece el descenso del pH y la consiguiente aceleración en el comienzo de la fermentación láctica.

Eliminación del oxígeno contenido en la masa del forraje: la adecuada compactación del material ensilado y la rápida eliminación del oxígeno presente crean las necesarias condiciones de anaerobiosis para el rápido comienzo de la fermentación. La creación de un ambiente sin oxígeno es esencial para detener la respiración del material vegetal, prevenir el desarrollo de bacterias aeróbicas y estimular el desarrollo de bacterias anaeróbicas deseables. Para ello es necesario controlar el tamaño de picado, poseer una buena organización operativa para trabajar rápida y coordinadamente, lograr la suficiente compactación acorde al tipo de silo y asegurar la hermeticidad y la duración del sellado posterior.

Contaminación con tierra: la introducción accidental de tierra junto con el material para ensilar es una fuente probable de desarrollo de microorganismos clostridiales, cuyas esporas en condiciones adecuadas de acidez, humedad y temperatura germinan y degradan el ácido láctico, los azúcares residuales y los compuestos nitrogenados.

Uso de aditivos correctores para silajes y henolajes: la utilización de correctores en los silajes y henolajes no es una práctica tecnológica generalizada en la Argentina, aunque sí en países con mucha tradición en la confección de forrajes conservados de alta calidad. Originalmente, el objetivo de estos productos fue asegurar durante el ensilaje el dominio de las bacterias productoras de ácido láctico (BAL), asegurando una buena preservación del proceso fermentativo. La melaza, que estuvo disponible comercialmente a principios del siglo XX, se utiliza como fuente de carbohidratos rápidamente fermentecibles. Posteriormente, Virtanen (1933) adoptó un enfoque diferente y recomendó el uso de ácidos minerales para lograr la rápida acidificación del medio (pH 3,5-4,0) y prevenir la actividad bacteriana y enzimática indeseable. Hoy en día, el desarrollo de aditivos para silaje pone su énfasis en el control de la fermentación, mejorando el valor nutritivo y reduciendo las pérdidas de materia seca. Sin embargo, es importante señalar que la decisión sobre el uso de aditivos debe estar basada no solo en resultados comprobados científicamente, sino también en la evaluación económica de sus beneficios (Latrille y Alomar, 1993; Polan *et al.*, 1998).

Los aditivos correctores han sido clasificados en seis grandes grupos, cuyas características más salientes se resumen a continuación:

Grupo 1: cultivos bacterianos o inoculantes biológicos. Un organismo para ser utilizado en silajes como cultivo bacteriano debe reunir una serie de condiciones: poseer un vigoroso crecimiento y una gran capacidad competitiva respecto de otros microorganismos; ser homofermentativo y capaz de una rápida producción de ácido láctico a partir de hexosas; ser ácido-tolerante; ser capaz de producir un pH final de <4; ser capaz de fermentar la glucosa, fructosa, sucrosa y fructosanos; no actuar sobre ácidos orgánicos; crecer con temperaturas de hasta 50 °C y sobre materiales de baja humedad; y no poseer actividad proteolítica (Dumon *et al.*, 1995; Pitt y Leinbensperger, 1987; Polan *et al.*, 1998). Uno de los primeros inoculantes bacterianos comercialmente utilizado contenía *Lactobacillus acidophilus*. Posteriormente se desarrollaron inoculantes a base de *Lactobacillus plantarum*, *Pedococcus pentosaceus* y *Lactobacillus burchneri*.

Grupo 2: fuentes azucaradas. Algunos materiales ricos en carbohidratos se agregan al silaje con la finalidad de incrementar la disponibilidad

de energía para el crecimiento de las BAL, siendo particularmente útiles en silajes de leguminosas como la alfalfa. Entre ellos pueden mencionarse los siguientes:

- Melaza: este subproducto de la remolacha azucarera o de la caña de azúcar tiene un tenor de materia seca del orden del 70 al 75 % y un contenido de CHNE de 65 % de la MS. Su principal componente es la sucrosa.
- Enzimas que degradan la pared celular: el uso de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas incrementa la proporción de azúcares fermentecibles en la masa del forraje ensilado.
- Cereales (maíz, cebada, avena, etc.): los granos de cereales se utilizan con el doble propósito de mejorar el proceso fermentativo y la calidad nutritiva del silaje. Como el principal carbohidrato de los cereales es el almidón (polisacárido no disponible para las BAL), se sugiere que en el momento de agregar los granos se adicione una fuente de enzima amilasa (por ejemplo: malta).

Grupo 3: biostáticos o inhibidores de desvíos fermentativos. Los más usados son:

- Ácidos minerales: el agregado de ácidos minerales –como el fosfórico, sulfúrico, etc.– tiene por objetivo hacer descender rápidamente el pH para preservar el silaje.
- Ácido fórmico: la utilización de este ácido orgánico fuerte está ampliamente difundida en otros países desde hace muchos años (Carpintero *et al.*, 1969). La dosis normal de aplicación es de 0,5 %, pero puede variar en función de la forrajera para conservar. Su efecto es hacer descender rápidamente el pH a valores de aproximadamente 4. La acción bactericida del ácido fórmico inhibe el crecimiento de *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. y otros géneros del grupo Gram-negativo. Viviani Rossi *et al.* (2001) indicaron que el uso del ácido fórmico (formulado al 85 %) en dosis de 5 l t de peso fresco<sup>-1</sup> provoca un descenso significativo del pH y una disminución del nitrógeno amoniacal, al inhibir el desarrollo de fermentaciones secundarias. Los resultados, que se resumen en la Tabla 11, son consistentes con los informados por otros autores (Gutiérrez *et al.*, 1996; Haigh y Chapple, 1998). Se aprecia que los elevados valores de PB y de DIVMS y la baja concentración de FDN indican que

la alfalfa no tiene limitantes nutritivas para rodeos de altos requerimientos; sin embargo, la baja concentración en CHNE asociada a su elevada capacidad buffer hacen suponer que existirían limitantes para su ensilado inmediatamente después del corte. A conclusiones similares llegaron Gutiérrez *et al.* (1998) trabajando en nuestro país con silajes de gramíneas templadas fertilizadas.

■ **Tabla 11.** Valor nutritivo y perfil fermentativo del silaje de alfalfa.

SILO DE ALFALFA	VALOR NUTRITIVO					PERFIL FERMENTATIVO					
	DIVMS (%)	FDN (%)	NT (%)	PB (%)	CHNE (%)	MS (%)	N-NH3 (%NT)	pH	Ácido Acético (g kg MS <sup>-1</sup> )	Ácido Propiónico (g kg MS <sup>-1</sup> )	Ácido Butírico (g kg MS <sup>-1</sup> )
Con ácido fórmico	69	34	2,9	18	4	27	4	4,5	12	0,4	0,4
Sin ácido fórmico	63	37	2,6	16	3	26	33	5,3	22	1,8	3,9

Referencias: DIVMS = digestibilidad in vitro de la materia seca; FDN = fibra detergente neutro; NT = nitrógeno total; PB = proteína bruta; CHNE = carbohidratos no estructurales solubles; MS = materia seca; N-NH3 = nitrógeno amoniacal.

- Ácido acético: su utilización como aditivo ha sido desalentada debido a que su presencia en altas concentraciones se asocia con un pobre rendimiento productivo.
- Formaldeído: a pesar de que su efecto bacteriostático es conocido, su empleo es desaconsejable por su efecto perjudicial para la salud humana.

Grupo 4: inhibidores del deterioro aeróbico. Los mayores responsables del deterioro aeróbico de los silajes son los mohos, las levaduras y las bacterias aeróbicas. Para su control se pueden utilizar:

- Acido propiónico: tradicionalmente ha sido muy utilizado como inhibidor microbiano en la preservación de granos almacenados. Su efecto es mayor cuando se usa en altas dosis y su efecto fungistático se incrementa cuando el pH disminuye.

- Acido sórbico: si bien algunos investigadores han destacado el potencial uso del ácido sórbico como un inhibidor del deterioro, se carece de información conclusiva sobre sus verdaderos efectos.

Grupo 5: nutrientes. Son sustancias que, agregadas al material ensilado, contribuyen a satisfacer los requerimientos nutritivos de los animales. Algunos de los aditivos mencionados precedentemente como las fuentes azucaradas y los cereales cumplen con esta finalidad en los silajes de alfalfa.

Grupo 6: absorbentes. El ensilado de forrajeras con alto contenido de agua incrementa notablemente la excesiva producción de efluentes. Aunque el agregado de productos absorbentes puede ayudar a solucionar este problema, su eficiencia de absorción dependerá de las características físicas del cultivo, del método de aplicación, del tipo de silo, etc. Algunos ejemplos de productos usados con este fin son:

- Pulpa de remolacha azucarera: el efecto reductor sobre la producción de efluentes y la mejora en el proceso fermentativo de este aditivo ha sido señalada por varios autores.
- Paja: si bien su empleo está aceptado para reducir la producción de efluentes, se señala una serie de efectos negativos sobre la fermentación y la calidad nutritiva del silaje.
- Bentonita: aunque algunos trabajos experimentales han destacado su efectividad como absorbente, también se ha indicado su posible efecto en la reducción del valor nutritivo del silaje.

### *Sistemas de confección de silajes y henolajes de alfalfa*

Básicamente existen dos grandes sistemas de conservación de alfalfa húmeda: forraje picado y forraje sin picar. A continuación se describirán algunas características generales de cada tipo.

#### *Forraje picado*

Como se explicó anteriormente, no es recomendable realizar silaje de alfalfa de corte y picado directo porque el elevado contenido de humedad aumenta las pérdidas por efluentes y diluye la concentración de azúcares necesaria para una buena fermentación (Bragachini *et al.*, 1995). La alternativa más práctica es cortar e hilerar la pastura con la misma

maquinaria e idénticas técnicas que las recomendadas para la henificación, permitiendo un preoreo o premarchitado del material en la andana hasta que su humedad se haya reducido alrededor de 50-60 %. El uso de acondicionadores mecánicos de rodillos ayuda a evaporar agua y alcanzar rápidamente ese nivel de humedad. El lapso de tiempo para lograr el preoreo deseado variará de acuerdo a las condiciones ambientales (humedad relativa, viento, temperatura, etc.) y a otros factores, como estado fenológico, nivel de fertilización, etc. Al igual que para la henificación, deben destinarse a silaje cultivos limpios de malezas, de buena sanidad y volumen, y en el estado fenológico más adecuado para lograr un compromiso entre calidad y cantidad.

La tarea de recolección de la andana es realizada por la misma máquina picadora (Figura 20), sea esta de arrastre o automotriz, pero equipada con un cabezal recolector de rodillos con peines o dientes metálicos para minimizar la pérdida de hojas. El picado es realizado por la acción de rotores de alta velocidad provistos de cuchillas móviles opuestos a contracuchillas fijas. El tamaño de picado recomendado para pasturas de alfalfa es de 15 a 25 mm, lo que favorece el compactado del silo y el posterior aprovechamiento animal.



■ **Figura 20.** Picado de alfalfa previamente cortada y preoreada para la confección de silaje o henolaje. Foto: gentileza de la firma New Holland.

Existen dos tipos básicos de silo para forraje picado:

Silo tradicional. Según la modalidad de construcción, puede ser de tipo puente (aéreo), trinchera (subterráneo), torta (aéreo), etc. Lo fundamental es ubicarlo en una zona alta y, en lo posible, con alguna pendiente para favorecer el drenaje. Debe ser llenado y compactado en el menor tiempo posible para cortar la respiración celular y favorecer el inicio de la fermentación bacteriana. Una vez llenado y compactado, es recomendable tapar el silo con algún material plástico para asegurar su hermeticidad. Cuando el volumen para ensilar es inferior a 400-500

toneladas de materia verde, la mejor opción no es confeccionar silos tradicionales, por su elevado nivel de pérdidas; en ese caso, se recomienda utilizar el silobolsa.

Silobolsa. A mediados de la década de 1990 hizo su aparición en nuestro país la práctica de ensilar el material picado en grandes bolsas de nylon, conocidas como *silobag*. Estas bolsas, con diámetros de 1,40 a 3,0 metros, largos de 30 a 90 metros y espesores de pared de 250 a 500 micrones, permiten almacenar de 100 a 300 toneladas de forraje. El llenado y la compactación se realizan con máquinas especialmente diseñadas para tales fines. El sistema presenta varias ventajas en comparación con el silo tradicional: alta capacidad de trabajo (más de 45 t hora<sup>-1</sup>), baja demanda de personal (la embolsadora no necesita atención permanente), posibilidad de detener temporalmente la tarea de ensilado para continuar más tarde sin afectar la fermentación, y factibilidad de abrir y cerrar la bolsa de silo las veces que sean necesarias para adecuarse a las necesidades de suministro manteniendo la calidad inicial.

#### *Forraje sin picar: rollos húmedos empaquetados (silopaq y siloline)*

Como alternativa a las anteriores existe una tecnología que es masivamente utilizada en Inglaterra, Francia, Alemania, Italia y Estados Unidos, pero que todavía tiene muy poca incorporación en nuestro país: el heno-laje empaquetado o "silopaq" (Figura 21, izquierda). El principio básico del "silopaq" es la confección de rollos de forraje húmedo preoreado (40-60 %), que luego son envueltos individualmente en film plástico por máquinas empaquetadoras para permitir la fermentación anaeróbica. Entre las ventajas de este sistema se incluyen el uso más eficiente de la maquinaria para confección de rollos, la posibilidad de cortar y conservar superficies reducidas, la independencia respecto al servicio de picado (que en muchas zonas cuesta conseguir, fundamentalmente cuando se trata de pequeñas superficies) y la mayor facilidad de suministro en comparación con el silaje picado.

Existen en el mundo equipos que permiten la confección de silopaq a partir de megafardos, provistos de bandejas especialmente diseñadas para la envoltura con film de este formato de heno.

Una variante al silopaq es la técnica conocida como "siloline", por la que –en lugar de hacer paquetes individuales con cada rollo– se realiza el



empaquetado conjunto de una serie de rollos (Figura 21, derecha), que se van cargando en una bandeja de encintado y se van alineando y arriando uno contra otro por sus caras planas, al mismo tiempo que se van recubriendo las superficies cilíndricas con polietileno; de esta forma van confeccionando un cilindro continuo dentro de un tubo plástico. Esto último permite ahorrar hasta un 40 % de film y bajar así el costo por kilogramo de materia seca.

Otra modalidad del siloline es el embolsado de rollos confeccionados con alta humedad (similares a los utilizados para silopaq), pero en una bolsa de polietileno de alta densidad que se va desplegando a medida que se va llenando. El espesor del polietileno es de 200-250 micrones y la bolsa tiene un diámetro (y por ende el rollo) de 1,20 a 1,50 m y un largo de 30 a 60 m. La capacidad de trabajo de estas embolsadoras oscila entre 40 y 100 rollos hora<sup>-1</sup>. Para crear las condiciones necesarias de anaerobiosis, el aire dentro de la bolsa se extrae por medio de bombas de vacío que se accionan una vez terminado el llenado, o a través del uso de bolsas elaboradas con plástico contraíble (*streech*), o por una combinación de ambos.



■ **Figura 21.** Confección de forrajes conservados húmedos sin picar como silopaq (izquierda) o siloline (derecha). Fotos: gentileza de McHale y Anderson.

El silopaq comenzó a difundirse en la Argentina a mediados de la década de 1990, cuando se produjo el ingreso de las primeras empaquetadoras de rollos. Estos equipos se presentaban como una alternativa para aquellas zonas donde se dificulta lograr henos de calidad por condiciones ambientales inadecuadas. También aparecieron en un momento en el que existían muy pocos equipos y servicios de picado para ensilaje, que se destinaban masivamente al picado de maíz. En ese contexto, las empaquetadoras de rollos se presentaban como una alternativa que posibilitaba obtener forraje de alta calidad con equipos de bajo costo y sin

depender de un contratista, que además muchas veces no cubría el servicio por tratarse de superficies de poca relevancia (Bragachini *et al.*, 2018).

La difusión del silopaq en nuestro país comenzó a limitarse cuando el picado fino de forraje comenzó a expandirse en forma acelerada, a la vez que lo hacía el concepto de TMR (ración totalmente mezclada) realizada en un mixer, más aún cuando los mixers disponibles en aquel entonces no permitían –en general– desmenuzar un rollo de heno, particularmente si se trataba de rollos de alta humedad.

No obstante, a partir de la difusión durante los últimos años en la Argentina de las rotoenfardadoras con sistema procesador de fibra (*cutter*), que permiten aprovechar los rollos de silopaq en un acoplado mezclador (*mixer*), y de la aparición en el mercado de diferentes opciones de mixers trozadores de fibra, los equipos de henolaje comenzaron a recuperar cierta. Sin embargo, la mayor o menor adopción de estos equipos puedan tener en el futuro estará ligada al costo de importación y al efecto que sobre este tendrán las políticas cambiarias que se vayan sucediendo.

Según la información generada en nuestro país, las pérdidas en cantidad y calidad de forraje a partir de la confección de silopaq serían menores que en el caso de los rollos de heno. Romero y Bruno (INTA Rafaela, comunicación personal), analizando la calidad de henolajes empaquetados de pasturas base alfalfa confeccionados en campos de productores en el área central de Santa Fe, observaron que los valores promedio de PB variaron entre 16 y 24 %, los de FDN entre 44 y 60 %, los de FDA entre 33 y 41 % y los de DIVMS entre 60 y 65 %. Las características fermentativas presentaron valores normales en la parte interior del rollo (pH entre 5,0 y 5,8 y proporción de amoníaco sobre nitrógeno total entre 9 y 14 %), mientras que en la capa exterior, en contacto con el plástico, dichos valores fueron superiores a lo normal. Si bien muchos factores que afectan el proceso de henificación actúan en forma similar sobre los procesos de ensilaje y henolaje, la producción de henolaje empaquetado de alfalfa requiere del conocimiento y del manejo correcto de ciertas técnicas específicas (Ranking, 2019). En ese contexto, diversos factores deben ser tenidos en cuenta para lograr silopaqs de alta calidad:

- Procedimiento

Una vez realizado el corte y el premarchitado a campo, y habiendo ya alcanzado el %MS deseado, se procede al enrollado del forraje tomando

las siguientes precauciones para confeccionar los rollos: tamaño pequeño (0,90 a 1,10 m de diámetro), forma cilíndrica, buenas (firmes) ataduras y fundamentalmente muy buena compactación. Como en todo proceso fermentativo, el aire es un agente que provoca el deterioro de la masa ensilada y debe ser desalojado del rollo por la alta presión que ejerce la propia rotoenfardadora; posteriormente, una mesa empaquetadora toma el rollo y lo recubre en forma individual con la película (film) de polietileno, lográndose las condiciones de anaerobiosis adecuadas y esenciales para el desarrollo del proceso fermentativo.

- Características del film de polietileno

La película o film de polietileno debe reunir ciertas condiciones: resistencia al “envejecimiento” provocado por los rayos UV, las oxidaciones y la temperatura ambiental; capacidad de estiramiento; adhesividad entre capas; “memoria”; y resistencia mecánica a las perforaciones, los desgarros y los frotamientos. Además, Gaillard y Berner (1988) señalaron que el film no solo debe mantener sus propiedades, sino también la hermeticidad durante el almacenamiento (lo que se denomina estabilidad a largo plazo), que –según estos autores– puede llegar a los seis meses e incluso a un año. Las bobinas de polietileno tienen usualmente 500 o 750 mm de ancho, 1.500 o 1.800 m de largo y un film de 25 micrones de espesor.

- Estiramiento del film

El estiramiento del film permite envolver integralmente al rollo sin que quede espacio entre el forraje y el film. El estiramiento convencional tiene lugar entre el rollo y la bobina de polietileno, aunque puede modificarse deteniendo la bobina con un freno axial o tangencial. El preestiramiento, que consiste en estirar el film entre dos rodillos de goma paralelos antes de adherirlo al rollo, tiene como fin activar la memoria de este de manera que una vez adherido al material tienda a contraerse y de este modo elimine el aire superficial. En general, se aconseja un preestiramiento del 50 al 70 %.

- Cobertura del rollo

La tasa de recubrimiento determina el número de capas de polietileno que deben colocarse simultáneamente. Para obtener buena hermeticidad, la cobertura del film debe ser al menos del 50 %.

- Rendimiento del empaquetado

El rendimiento del proceso dependerá del sistema que se haya elegido para trabajar en el campo. Si la empaquetadora se mantiene fija en el lugar de estiba y es abastecida con algún sistema de transporte, se pueden lograr rendimientos de 28 a 32 rollos hora<sup>-1</sup>. Por el contrario, si la empaquetadora sigue a la arrolladora, empaquetando y descargando sobre el lote, se conseguirán rendimientos de 15 a 18 rollos hora<sup>-1</sup>. Existen en el mercado rotoempacadoras capaces de confeccionar rollos mientras simultáneamente van empacando el rollo anterior (Figura 22). Estos equipos permiten lograr iguales, e incluso mayores, capacidades de trabajo que la opción de alimentación permanente con rollos en la bandeja de encintado estacionaria.



■ **Figura 22.** Rotoempacadora con gran capacidad de trabajo para la confección de silopaq. Foto: gentileza de Kverneland.

- Estiba o almacenamiento de los rollos empaquetados

Es aconsejable estibar los rollos empaquetados en lugares altos, alejados de montes de árboles y con buen drenaje del agua de lluvia. La estiba debe aislarse en todo su perímetro para que los animales no puedan acceder y el lugar debe conservarse limpio, con la finalidad de evitar la presencia de roedores y peludos. Se recomienda la verificación periódica de los rollos para reparar con parches plásticos específicos las perforaciones que pudieren producirse.

## Consideraciones finales

En este capítulo se reseñaron diversos aspectos de importancia para la producción de forraje conservado de alfalfa de alta calidad en Argentina. De los conceptos vertidos se desprende que existe un gran número de factores que afectan, en mayor o menor medida, la calidad y la cantidad de la alfalfa conservada y que actúan desde antes del momento de corte hasta el momento del suministro a los animales. El éxito final

dependerá del grado de conocimiento que el productor, el contratista y el profesional tengan sobre cómo, cuándo y en qué magnitud influye cada uno de estos factores. De esta manera, podrán utilizarse eficaz y eficientemente las técnicas de producción y manejo que mejor se adecuen en cada caso.

Respecto de posibles investigaciones futuras, se señalan la generación de información local sobre la utilización de nuevas técnicas de manejo, maquinaria, variedades seleccionadas por mayor calidad forrajera y distintos productos que se desarrollen, evaluando su adaptación a las condiciones agroecológicas y a los sistemas de producción de nuestro país.

## BIBLIOGRAFÍA

ARAGÓN, J.R.; J.M. IMWINKELRIED. 1995. *Plagas de la alfalfa*. En: HIJANO, E.; A. Navarro (ed.). *La Alfalfa en la Argentina*. INTA, Subprograma Alfalfa. Enciclopedia Agro de Cuyo, Manuales 11. 83-104 pp.

BARNES, R.F.; C.H. GORDON. 1972. *Feeding Value and On-Farm Feeding*. En: HANSON, C. (ed.). *Alfalfa Science and Technology*. ASA, Agronomy 15, Madison, WI, EUA. 601-630 pp.

BARRENECHEA, A.; L. POZZO. 1993. *Reservas de Forraje: Alfalfa para Animales Lecheros*. INTA EEA Manfredi. Proyecto MEPROLE, 7 p.

BASIGALUP, D.H. 2007. *Capítulo 5. Mejoramiento genético y desarrollo de variedades*. En: BASIGALUP, D. (Ed.). *El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina*. Ediciones INTA, Buenos Aires. 81-108 pp.

BERGER, M.E.; R.J. LEÓN; H.F. FENOGLIO. 1986. *Cambios en la digestibilidad in vitro, proteína bruta y materia seca de dos cultivares de alfalfa (Medicago sativa, L.) con el avance a madurez*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol. 6(7-8): 423-427.

BERGER, M.E.; R.J. LEÓN; H.F. FENOGLIO. 1985. *Cambios en la concentración de elementos minerales en alfalfa (Medicago sativa, L.) con el avance a madurez*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 5(3-4): 149-155.

BODEN, S.M. 1965. *Técnica de la Henificación Acelerada*. Ed. Acirbia, Zaragoza, España, 135 p.

BRAGACHINI, M. 1995. *Heno de Calidad. Cuaderno Actualización N.º 1, Proyecto PROPEFO, EEA Manfredi, INTA*. 84 p.

BRAGACHINI, M.; P. CATTANI; E. RAMÍREZ. 1995. *Todo Forraje: Manual de maquinaria para la producción de forrajes conservado de alta calidad. Proyecto PROPEFO, EEA Manfredi, INTA*. 189 p.

BRAGACHINI, M.; F. SÁNCHEZ; G. URRETS ZAVALÍA. 2018. *Dossier de Maquinaria Forrajera. Informe especial del rubro maquinaria forrajera elaborado por técnicos del INTA Manfredi*. (Disponible: [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_reservas/reservas\\_en\\_general/53-maquinas-forrajeras.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_en_general/53-maquinas-forrajeras.pdf) consultado: 4/6/2019).

BRUNO, O.A.; L.A. ROMERO; M.C. GAGGIOTTI. 1991. *Influencia del período de almacenamiento sobre la calidad de los henos*. *Jorn. Inf. Téc. para Prod., EEA Rafaela, INTA*. 53-54 pp.

BRUNO, O.A.; L.A. ROMERO; M.C. GAGGIOTTI; O.R. QUAINO. 1993. *Chemical composition of two lucerne cultivars*. XVII Int. Grassland Congress, N. Zealand. Summary Sessions 1-24: 45-46.

BUCKMASTER, D.R.; C.A. ROTZ; J.R. BLACK. 1990. *Value of alfalfa losses on dairy farms*. *Trans. ASAE* 33: 351-360.

BUXTON, D.R.; J.S. HORNSTEIN; W.F. WEDIN; G.C. MARTEN. 1985. *Forage quality in stratified canopies of alfalfa, birdsfoot trefoil, and red clover*. *Crop Sci.* 25: 273-279.

CARPINTERO, C.M.; A.R. HENDERSON; P. MCDONALD. 1979. *The effect of some pre-treatments on proteolysis during the ensiling of herbage*. *Grass and Forage Sci.* 34: 311-315.

CARPINTERO, M.C.; A.J. HOLDING; P. MCDONALD. 1969. *Fermentation studies on Lucerne*. *J. Sci. Fd. Agric.* 20: 678-681.

COBLENTZ, W.; J. JENNINGS; K. COFFEY. 2004. *Biology and effects of spontaneous heating in hay*. *Proceedings of the National Alfalfa Symposium, Univ. of California, Davis, San Diego, CA. EUA.*

COLLINS, M. 1990. *Composition and yields of alfalfa fresh forage, field cured hay, and pressed forage*. *Agron. J.* 82: 91-95.

DEMARQUILLY, C.; R. JARRIGE. 1970. *The effect of method of forage conservation on digestibility and voluntary intake* *Proc. Of the 11th Int. Grassland Congress. Surfers Paradise, Queensland, Australia.* 733-737 pp.

DEVUYST, A.; M. VAN BELLE. 1964. *Les bases scientifiques de l'ensilage*. *Agriculture Vol. XII. 2.º serie N.º 1.* 125-140 pp.

DULPHY, J.; C. DEMARQUILLY. 1981. *Problemes particulieres aux ensilages. Prévision de la valeur nutritive des aliments de Ruminants*. *INRA Publ.* 81-104 pp.

DUMON, M.G.; E.M. VIVIANI ROSSI; E.M. MORENO; M.G. MONTERUBBIANESI, L.M. GUTIERREZ; E. DELPECH. 1995. *Efecto del agregado de un inoculante biológico y del premarchitado sobre la calidad del silaje de una pastura de trébol rojo (Trifolium pratense L.)*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 15 (1): 153-156.

FICK, G.W.; S.C. MUELLER. 1989. *Alfalfa: quality, maturity, and mean stage of development*. *Information Bulletin 217. Cornell University, Dept. of Agronomy, NY, EUA.* 13 p.

FONNESBECK, P.V.; M.M. GARCÍA DE HERNÁNDEZ; J.M. KAYKAY; M.Y. SAIADY. 1986. *Estimating yield and nutrient losses due to rainfall and field drying alfalfa hay*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 16: 7-15.

GAILLARD, F.; J.L. BERNER. 1988. *La technique de l'ensilage en balles rondes sous film tirable*. *BTMEA, CEMAGREF.* 33: 34-44.

GOERING, H.K.; P.J. VAN SOEST. 1970. *Forage Fiber Analysis: Apparatus, reagents, procedures and some applications*. *USDA Agric. Handbook N 379. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, EUA.*

GRUM, D.E.; W.L. SHOCKEY; W.P. WEISS. 1991. *Electrophoretic examination of alfalfa silage proteins*. *J. of Dairy Sci.* 74(1): 146-174.

GUTIÉRREZ, L.M.; G. ROLDÁN; E.M. VIVIANI ROSSI; A. MAUTI; E. DELPECH. 1996. *El ácido fórmico y la fertilización nitrogenada sobre el silaje de avena cv Bonaerense Pay*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 16 (Supl. 1): 225-226.

GUTIÉRREZ, L.M., E.M. VIVIANI ROSSI; H.E. LABORDE; E. DELPECH. 1998. *Efecto de un aditivo orgánico al silaje de avena y trébol rojo*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 18 (Sup. 1): 141-142.

HAIGH, P.M.; D.G. CHAPPLE. 1998. *The effect of formic acid with formaline addition and wilting on silage fermentation and intake, and on liveweight change of young cattle.* *J. Agric. Engng Res.* 69: 179-183.

HIJANO, E.H. 1993. *Enfermedades de la alfalfa. SubPrograma Alfalfa (ed) Alfalfa: Protección de la pastura. Agro Manuales de Cuyo 4, EEA Manfredi, INTA.* 9-28 pp.

HIJANO, E.H.; D.H. BASIGALUP. 1995. *El cultivo de la alfalfa en la Republica Argentina. En: HIJANO, E.; A. Navarro (ed.). La Alfalfa en la Argentina. Subprograma Alfalfa. Enciclopedia Agro de Cuyo, Manuales 11, INTA.* 11-18 pp.

HILL, R.R.; J.S. SHENK; R.F. BARNES. 1988. *Breeding for yield and Quality. En: HANSON, A.; D. BARNES; R. HILL. Jr. (ed.). Alfalfa and Alfalfa Improvement. Agronomy, Series 29, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, EUA.* 809-825 pp.

HOLLAND, C.; W. KEZAR. 1990. *Pionner Forage Manual: A Nutritional Guide. Pionner HI-Bred International, Des Moines, Iowa, EUA.* 55 p.

HUSET, D.E.; D.A. SCHNEBBE; J.L. KUGLER; M.A. PETERSON. 1991. *Registration of 'WL 322 HQ' alfalfa.* *Crop Sci.* 31: 1699-1670.

IWAN, J.M.; J.F. SHANAHAN; D.H. SMITH. 1993. *Impact of environmental and harvest management variables on alfalfa forage drying and quality.* *Agron. J.* 85: 216-220.

JOHNSON, L.; D. JOHNSON; J. REICH. 2002. *Alfalfa varieties now and in the future from CAL/WEST Seeds. Proceedings 32nd Western Alfalfa & Forage Conference. Univ. of California, Davis, Reno, Nevada, EUA.* 215 p.

JUAN, N.A. 1996. *Resultados de Ensayos sobre Utilización de Forrajes Conservados en INTA Anguil en 1994-1995. Resúmenes Jornada de Actualización para Productores, Proyecto PROPEFO, EEA Anguil, INTA.* 6-11 pp.

JUAN, N.A.; M.P. AZCÁRATE; A.J. PORDOMINGO. 2001. *Valor nutritivo de los forrajes, granos y suplementos disponibles en la región de influencia del INTA Anguil. Bol. Div. Técnica N.º 71, EEA Anguil INTA.* 88-93 pp.

JUAN, N.A.; R. JOULI; A.J. PORDOMINGO; F. BABINEC. 2001. *Utilización de henos de alfalfa y de avena para sustituir verdeo de avena en invernada. Bol. Div. Técnica N.º 71, EEA Anguil INTA.* 96-99 pp.

JUAN, N.A.; A.J. PORDOMINGO; R. JOULI. 2001. *Engorde de vaquillonas a corral con silaje de maíz y heno de alfalfa. Bol. Div. Técnica N.º 71, EEA Anguil INTA.* 159-162 pp.

JUAN, N.A.; L.A. ROMERO; O.A. BRUNO. 1995. *Conservación del forraje de alfalfa. En: HIJANO, E.; A. NAVARRO (ed.). La Alfalfa en la Argentina. Subprograma Alfalfa. Enciclopedia Agro de Cuyo, Manuales 11, INTA.* 173-192 pp.

JUAN, N.A.; C.C. SHEAFFER; D.K. BARNES; D.R. SWANSON; J.H. HALGERSON. 1993. *Leaf and stem traits and herbage quality of multifoliolate alfalfa.* *Agron. J.* 85: 1121-1127.

JUAN, N.A.; C.C. SHEAFFER, D.K. BARNES. 1990. *Alfalfa multileaflet expression and its relation to forage quality. Report 32nd. North American Alfalfa Improvement Conference, Pasco, WA, EUA.* 32 p.



- KALU, B.A.; G.W. FICK. 1983. *Morphological stage of development as a predictor of alfalfa herbage quality*. *Crop Sci.* 23: 1167-1172.
- KJELGAARD, W. 1979. *Energy and time needs in forage systems*. *Trans. ASAE.* 22: 3.
- KOEGEL, R.G.; R.J. STRAUB; R.P. WALGENBACH. 1985. *Quantification of mechanical losses in forage harvesting*. *Trans. ASAE* 28: 1047-1051.
- LATRILLE, L.; D. ALOMAR. 1993. *Experiencias en el uso de aditivos de ensilajes*. *Ciencias e Investigación Agraria (Chile)* 20 (2): 345-371.
- LECHTEMBERG, V. L.; V.A. HOLT. 1982. *Innovations in hay harvesting and storing*. *Proc. Natl. Alfalfa Symp., Lexington, KY. Certified Alfalfa Seed Council, Woodland, CA, EUA.* 38-47 pp.
- LINN, J.; N.P. MARTIN. 1985. *Using Forage Test Results in Dairy Rations*. *Agric. Extension Service Bulletin, AG-FO-2637, Univ. of Minnesota, EUA.* 5 p.
- LOPER, G.M. 1968. *Effect of aphid infestation on the coumestrol content of alfalfa varieties differing in aphid resistance*. *Crop Sci.* 8: 104-106.
- MACDONALD, A.D.; E.A. CLARK. 1987. *Water and quality loss during field drying of hay*. *Advances in Agronomy* 41: 407-437.
- MANITOBA AGRICULTURE, 2005. *The breakdown on hay preservatives and additives, Manitoba Agric., Food and Rural Initiatives, Manitoba, Canadá,* 7 p.
- MARTEN, G.C.; R.N. ANDERSEN. 1975. *Forage nutritive value and palatability of 12 common annual weeds*. *Crop Sci.* 15: 821-827.
- MARTEN, G.C.; J.S. SHENK; F.E. BARTON. 1990. *Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): Analysis of forage quality*. *USDA-ARS Agric. Handbook N.º 643. U.S. Government, Washington D.C., EUA.* 110 p.
- MARTEN, G.C.; D.R. BUXTON; R.F. BARNES. 1988. *Feeding Value (Forage Quality)*. En: HANSON, A.; D. BARNES; R. HILL. Jr. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. *Agronomy, Series 29, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, EUA.* 463-491 pp.
- MAYLAND, H.F.; G. SHEWMAKER; J. BURNS; D. FISHER. 1998. *Morning and evening harvest effects on animal performance*. *Proc. California Alfalfa Symposium. Univ. of California, Davis. Reno, NV, EUA.*
- MCDONALD, P.; A.R. HENDERSON; S.J.E. HERON. 1991. *Biochemistry of Silage (2nd ed.)*. *Chalcombe Publishers, Reino Unido.* 340 p.
- MCKERSIE, B.D. 1985. *Effect of pH on proteolysis in ensiled legume forage*. *Agronomy Journal.* 77: 81-86.
- O'KIELY, P. 1991. *Factors affecting silage fermentation*. *Proc. 5th Annual European Animal Production Congress. Dublin. Irlanda.* 79-119 pp.
- ODDINO, C. 1993. *Principales aspectos a tener en cuenta para lograr rollos de calidad*. 1.ª *Jornadas Nac. de Reservas Forrajeras. EEA Manfredi INTA.* 1-6 pp.

- ODORIZZI, A.; E. MAMANÍ; P. SIPOWICZ; B. JULIER; J. GIECO; D. BASIGALUP. 2015. *Effect of phenotypic recurrent selection on genetic diversity of non-dormant multifoliate lucerne (Medicago sativa L.) populations. Crop and Pasture Science. 66. 1190. 10.1071/CP14280.*
- ORLOFF, S.; R. VARGAS; W. CANEVARI; K. HEMBREE. 2003. *Progress in Roundup Ready alfalfa. Proc. California Alfalfa Symposium. Monterrey, CA. UC Cooperative Extension, Univ. of California, Davis.*
- PAULI, A.W.; V.L. LECHTEMBERG; W.F. WEDIN. 1988. *Equipment for harvesting, transporting, storing and feeding. En: HANSON, A.; D. BARNES; R. HILL. Jr. (ed.). Alfalfa and Alfalfa Improvement. Agronomy, Series 29. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, EUA. 567-594 pp.*
- PITT, R.E.; R.Y. LEINBENSBERGER. 1987. *The effectiveness of silage inoculants: A systems approach. Agricultural Systems 25: 27-49.*
- POLAN, C.E.; D.E. STIEVE; J.L. GARRETT. 1998. *Protein preservation and ruminal degradation of ensiled forage treated with heat, formic acid, ammonia, or microbial inoculant. J. Dairy Sci. 81: 765-776.*
- RAINERO, H.P.; N.E. RODRÍGUEZ; J.A. LÓPEZ; N.M. RODRÍGUEZ. 1995. *Manejo de las malezas en el cultivo de alfalfa. En: HIJANO, E.; A. NAVARRO (ed.). La Alfalfa en la Argentina. Subprograma Alfalfa. Enciclopedia Agro de Cuyo, Manuales 11. INTA. 108-122 pp.*
- RANKING, M. 2019. *Make great baleage. Hay & Forage, EUA. (Disponible: <https://hayandforage.com/article-2440-Make-great-baleage.html> consultado: 5/10/2019).*
- ROGERS, J. 2003. *Is your hay cut right but baled wrong? Ag News & Views. The Samuel Roberts Noble Foundation.*
- ROGERS, J. 2005. *The costs of hay waste add up. Ag News & Views. The Samuel Roberts Noble Foundation.*
- ROMERO, L.; O. BRUNO; M. DÍAZ; M. GAGGIOTTI. 1995. *Efecto del momento de empaquetado sobre la calidad de henolajes de alfalfa. Información Técnica para Productores. EEA Rafaela INTA. 10 p.*
- ROMERO, L.A.; O.A. BRUNO; M.C. GAGGIOTTI. 1991. *Alimentación de vaquillonas con rollos de alfalfa tapados y sin tapar. Jorn. Información Técnica para Productores. EEA Rafaela INTA. 65-66 pp.*
- ROMERO, L.A.; O.A. BRUNO; M.C. GAGGIOTTI. 1991. *Sistemas de almacenamiento de rollos. Jorn. Información Técnica para Productores. EEA Rafaela INTA.*
- ROMERO, L.A.; O.A. BRUNO; J.L. FOSSATI; H.F. FENOGLIO. 1986. *Comparación de rollos y fardos: evaluación de la calidad. EEA Rafaela INTA. Información para Extensión N.º 57. EEA Rafaela INTA. 4 p.*
- ROMERO, L.A.; O.A. BRUNO; J.L. FOSSATI; M.J. MONDINO; O.R. QUAINO. 1986. *Calidad de rollos: evaluación preliminar. Información para Extensión N.º 67. EEA Rafaela INTA. 6 p.*

- ROTZ, C.A.; R.E. MUCK. 1994. *Changes in forage quality during harvest and storage*. En: FAHEY, M. COLLINS; D. MERTENS; L. MOSER (ed.). *Forage quality, evaluation and utilization*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, EUA. 828-868 pp.
- ROTZ, C.A.; R.E. PITT; R.E. MUCK; M.S. ALLEN; D.R. BUCKMASTER. 1993. *Direct-cut harvest and storage of alfalfa on the dairy farm*. *Trans. ASAE* 36(3): 621-628.
- ROTZ, C.A.; R.J. DAVIS; S.M. ABRAMS. 1991. *Influence of rain and crop characteristics on alfalfa damage*. *Trans. ASAE* 34: 1583-1591.
- ROTZ, C.A.; S.M. ABRAMS; R.J. DAVIS. 1987. *Alfalfa drying, loss and quality as influenced by mechanical and chemical conditioning*. *Trans. ASAE* 30: 630-635.
- SÁNCHEZ, F.; G. URRETS ZAVALÍA; J. GIORDANO; P. CATTANI. 2016. *Segadoras acondicionadoras. El secreto de la rentabilidad en el corte de alfalfa*. *Revista Tecno Forrajes INIA Manfredi*. (Disponible: <https://inta.gob.ar/documentos/especial-corte-de-alfalfasegadoras-acondicionadoras> consultado: 4/3/2019).
- SAVOIE, P.; C.A. ROTZ; H.F. BUCHOLTZ; R.C. BROOK. 1982. *Hay harvesting system losses and drying rates*. *Trans. ASAE* 25: 581-585.
- SEALE, D.R.; C.M. QUINN; P.A. WHITTAKER. 1981. *Microbiological and chemical changes during the first 22 days of ensilage of different grasses*. *J. Agric. Res.* 20: 61-71.
- SHEAFFER, C.C.; G.D. LACEFIELD; V.L. MARBLE. 1988. *Cutting schedules and stands*. En: HANSON, A.; D. BARNES; R. HILL. Jr. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agronomy, Series 29, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, EUA. 411-437 pp.
- SHENK, J. S.; M.O. WESTERHAUS. 1994. *The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis*. En: FAHEY, G.; M. COLLINS; D. MERTENS; L. MOSER (ed.). *Forage quality, evaluation and utilization*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, EUA. 406-449 pp.
- SHINNERS, K.J.; R.G. KOEGEL; R.J. STRAUB. 1991. *Leaf loss and drying rate of alfalfa as affected by conditioning roll type*. *Appl. Eng. Agric.* 7: 46-49.
- STALINGS, C.C.; R. TOWNES; B.W. JESSE; J.W. THOMAS. 1981. *Changes in alfalfa haylage during wilting and ensiling with and without additives*. *J. Anim. Sci.* 53: 765-773.
- TILLEY, J.M.; R.A. TERRY. 1963. *A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops*. *J. Br. Grassl. Soc.* 18: 104-111.
- UNDERSANDER, D.; N. MARTIN; D. COSGROVE; K. KELLING; M. SCHMITT; J. WEDBERG; R. BECKER; C. GRAU; J. DOLL. 1991. *Alfalfa Management Guide*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, EUA. 41 p.
- URRETS ZAVALÍA, G.; N.A. JUAN; D.H. BASIGALUP; A. ODORIZZI; V. AROLFO; S. OLIVO. 2018a. *Tipificación de Heno de Alfalfa Argentino*. (Disponible: <https://inta.gob.ar/documentos/tipificacion-del-heno-de-alfalfa-argentino> consultado: 18/9/2019).
- USDA - NATIONAL AGRICULTURAL STATISTICS SERVICE. 2019. *Crop Production 2018: Summary*. (Disponible: [https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays\\_Reports/reports/cropan19.pdf](https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays_Reports/reports/cropan19.pdf) consultado: 4/8/2019).

- VILLATA, C.A. 1993. *Bioecología y control de plagas en alfalfa. SubPrograma Alfalfa. Alfalfa: Protección de la pastura. Agro Manules de Cuyo 4, EEA Manfredi, INTA. 31-76 pp.*
- VIRTANEN, A. 1933. *The A.I.V. method of preserving fresh fodder. Emp J Exp Agric 1: 143-155.*
- VIVIANI ROSSI, E.M.; L.M. GUTIÉRREZ; C. CANGIANO. 2001. *Efecto del ácido fórmico sobre el perfil fermentativo en silajes de alfalfa. Avances en Producción Animal (Chile) 26 (1-2): 175-180.*
- VIVIANI ROSSI, E.; L. GUTIÉRREZ. 1998. *Aditivos para silajes y henolajes. Últimos avances en silajes. Curso de Actualización para Profesionales. INTA PROPEFO. EEA Manfredi INTA. 15-20 pp.*
- VIVIANI ROSSI, E.M.; E. MORENO; S. SAN MARTINO; L.M. GUTIÉRREZ. 1995. *Evaluación de henolajes empaquetados de alfalfa (Medicago sativa L.) en el sudeste bonaerense. Rev. Arg. Prod. Anim. 15(1): 156-158.*
- VOLENEC, J.J.; J. CHERNEY. 1990. *Yield components, morphology, and forage quality of multifoliate alfalfa phenotypes. Crop Sci. 30: 1234-1238.*
- WHITNEY, L.; H. AGRAMAL; R. LIVINGSTON. 1969. *Stomatal effects on high temperature, short time drying of alfalfa leaves. Trans. ASAE. 769-771 pp.*
- WILKEN, L.; F.C. GIORDANI; C. MARÍN MORENO; N. NOACCO; L. GONZÁLEZ VICTORICA; E. SERRANTES; F. ELIZALDE. 1978. *Reserva de Forrajes: Henificación. Rev. Nuestro Holado (Arg.). Fascículo de Orientación Técnica N.º 6. 14 p.*
- ZUBIZARRETA, J. 1992. *Reservas: Uso y Análisis. Rev. CREA. Junio/Julio. 90-97 pp.*



## CAPÍTULO 14

### Meteorismo espumoso (empaste)

Patricio Davies,  
Daniel Méndez  
y Alicia Dillon

## Introducción

Frente a otras actividades de las empresas agropecuarias pampeanas, los sistemas ganaderos pastoriles se ven sujetos a un elevado nivel de exigencia en cuanto a resultados económicos. Esto ha generado la necesidad de aumentar los niveles de producción y la calidad de los recursos forrajeros e intensificar su utilización.

La principal especie forrajera que responde a esta necesidad es la alfalfa que, como pastura pura o en mezcla con otras especies, está ampliamente difundida en grandes áreas de producción de carne y leche de la Argentina. Los altos niveles de producción que es capaz de generar esta forrajera están asociados al problema del empaste o meteorismo espumoso de los vacunos, que se ha extendido a gran parte del período de utilización de la especie por la difusión de cultivares con bajo o nulo reposo invernal.

Si bien no se dispone de estadísticas sobre pérdidas promedio anuales, tanto directas como indirectas (subclínicas), estas suelen ser elevadas cuando prevalecen condiciones de alto riesgo. También deben considerarse las pérdidas emergentes por no utilizar especies forrajeras valiosas o hacerlo cuando han perdido calidad.

## Mecanismo del empaste

El forraje consumido, tras la primera masticación e insalivación, ingresa al rumen donde sufre un proceso de fermentación a partir del cual se originan gases (anhídrido carbónico y metano) que normalmente se separan del resto del contenido ruminal y son eructados.

Las leguminosas meteorizantes como alfalfa (*Medicago sativa*), trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y trébol rojo (*Trifolium pratense* L.), de muy buena calidad nutricional, tienen una velocidad inicial de desaparición ruminal 25-30 % más rápida que la de las leguminosas no meteorizantes, lo que hace que en las etapas tempranas de la digestión produzcan un elevado volumen de gases y una gran acumulación de partículas vegetales en el rumen (Howarth y Horn, 1984). Estas últimas, junto con proteínas vegetales y polisacáridos microbianos, dan origen a una

masa espumosa formada por pequeñas burbujas estables que retienen los gases e inhiben la eructación, provocando un aumento progresivo de la presión en el rumen. Las consecuencias varían entre una disminución en el consumo en los casos leves hasta la muerte por asfixia en los cuadros graves (Howarth *et al.*, 1983; Laby, 1991).

## Factores de riesgo

Los factores de riesgo involucrados en la aparición del empaste se relacionan con la pastura, el animal, el manejo y las condiciones ambientales (Figura 1).



■ **Figura 1.** Factores de riesgo que predisponen a la ocurrencia de empaste o meteorismo espumoso.

### *Composición de la mezcla forrajera y estado fenológico*

La alfalfa es la leguminosa meteorizante más peligrosa, seguida por los tréboles blanco y rojo. Dado que el predominio de estas especies en una pastura consociada aumenta el riesgo de empaste, se recomienda que las gramíneas representen el 50 % o más del forraje disponible en la mezcla (Howarth, 1975; Carruthers, 1991). El estado fenológico o de

madurez en el que se encuentra la alfalfa en un momento dado es la variable que mejor se asocia con la aparición del empaste (Howarth, 1975). En etapas tempranas, como el estado vegetativo, el pasto disponible presenta una alta relación hoja/tallo (más de 2,0), un elevado contenido de proteína bruta (más de 20 %), un bajo contenido de pared celular (40 %) y una gran fragilidad de las hojas, características que se relacionan directamente con un alto nivel de riesgo de empaste.

A medida que la alfalfa madura se aminora su potencial meteorizante debido a que disminuye el contenido de proteína bruta, aumenta la proporción de pared celular (fibra) y, principalmente, desciende la relación hoja/tallo, de manera tal que, al llegar al 10 % de floración, esos parámetros alcanzan valores de 18 %, 50 % y 1,30, respectivamente. Si bien la pastura es menos peligrosa cuando está "pasada", también disminuye su calidad y, por consiguiente, su valor nutritivo (Sanderson y Wedin, 1989). Sumado a esto, aumenta la biomasa de rebrotes basales, que pueden ser seleccionados por el animal y constituir así una situación de alto riesgo.

### *Susceptibilidad de los animales*

Con respecto a los animales, existe una susceptibilidad individual hereditaria frente al empaste (Morris, 1991). Las diferencias observadas entre razas no son tan importantes como las que ocurren entre individuos de una misma raza. En este sentido, se ha observado una mayor susceptibilidad en los animales jóvenes, que tiene relación con el mayor volumen del rumen con respecto al resto del cuerpo. Este argumento también podría explicar la menor susceptibilidad observada entre novillos de razas índicas con respecto a aquellos de razas británicas.

En cuanto a las diferencias identificadas en los animales propensos a empastarse, en general se ha visto menor producción de saliva y un ambiente ruminal de composición particular, con menor pH (ambiente más ácido), mayor capacidad de producción de gas y más altas concentraciones de proteínas solubles, de clorofila y de partículas de forraje en digestión. Además, se ha hallado una más lenta tasa de pasaje del contenido ruminal, que resulta ser una característica importante ya que es factible, como se verá más adelante, operar sobre esta a través del manejo de la alimentación para disminuir el riesgo de empaste.



### *Manejo de la alimentación*

El ayuno previo al pastoreo, como cuando se retiran los animales de la pastura durante la noche, provoca en el reingreso tasas de consumo más altas y, por consiguiente, mayor peligro de empaste. Además, en el rumen de animales ayunados se ha encontrado una disminución de la actividad de degradación proteica por parte de las bacterias, lo que favorece la formación de espuma (Fay *et al.*, 1986). En los sistemas de pastoreo rotativo suele darse esta situación, aunque con magnitud variable según la cantidad de pasto asignada a cada animal; cuando esta es baja puede derivar en escasa disponibilidad de forraje hacia el final de la utilización de cada franja.

La alimentación previa contribuye a determinar las características del ambiente ruminal haciendo que esté más o menos “predispuesto” al empaste. En ese contexto, cuando el animal consume leguminosas de muy alta calidad, se establece en el rumen una fase o estrato superior de material compuesto por partículas finas que, cada vez que el animal come, facilita la estabilización de la espuma (Howarth y Horn, 1984). Esta es una razón por la cual se recomienda la sustitución del forraje base como medida para el control del empaste. En ese sentido, la suplementación con fibra de alta calidad, como el silaje de maíz, contribuye a disminuir el riesgo (Bretschneider, 2000). Con ese mismo fin se ha sugerido el uso de concentrados, aunque estos son más útiles para vehiculizar el suministro de ionóforos o tensioactivos, para lo cual se requieren bajas cantidades de suplemento; cabe agregar que el suministro de granos, sobre todo si están procesados, puede contribuir a acidificar aún más el medio ruminal y, por lo tanto, a mantener las condiciones predisponentes antes mencionadas.

### *Condiciones ambientales*

El riesgo de empaste está asociado con la tasa de crecimiento del pasto y esta, a su vez, con las condiciones ambientales. Los períodos con temperaturas moderadas, alta radiación solar y adecuada humedad, que generan altas tasas de crecimiento, son los de mayor riesgo (Walgenbach *et al.*, 1981). Un comentario similar puede hacerse con respecto a la fertilidad de los suelos.

También son de alto riesgo las épocas de sequía, sobre todo en pasturas mixtas con alfalfa, debido a la mayor capacidad de crecimiento de esta con respecto a las gramíneas. Estas últimas también pueden sufrir pérdidas de plantas por estrés hídrico, dejando así espacios vacíos que luego pueden ser ocupados por el trébol blanco, integrante habitual –por siembra o presencia espontánea– de las pasturas en zonas húmedas y subhúmedas.

Las heladas o el rocío aumentan la fragilidad celular de las hojas facilitando la masticación y, por consiguiente, la rápida disponibilidad de los componentes solubles del forraje en el rumen, lo que incrementa el riesgo de empaste (Majak *et al.*, 1995).

## Integración de una estrategia de prevención y control

En vista de la diversidad de factores que intervienen en la aparición del empaste, lograr una prevención eficaz no solo es difícil sino también un problema recurrente en cada ciclo de utilización de las pasturas. Esto hace que, en la práctica, las “recetas” de control suelen tener resultados variables.

En condiciones de campo el factor central en el armado de una estrategia para disminuir el umbral de riesgo es la elección de alguno de los insumos de eficacia comprobada que están disponibles. Complementariamente, se deben tener en cuenta la composición y estado de la pastura, el manejo de la alimentación (sistema de pastoreo y suplementación) y el entrenamiento del personal a cargo de los animales. En lo referente al manejo, los puntos relevantes son:

### *Vigilancia de las tropas*

Una significativa proporción del éxito en la prevención del empaste depende de un alto nivel de dedicación y experiencia del personal de ganadería que debe tomar decisiones rápidas y precisas en cuanto al manejo del pastoreo y de los animales. Entre las cuestiones para decidir, se pueden mencionar: el momento de ingreso a la parcela de pastoreo y el tiempo de permanencia en esta, manejando el forraje remanente para evitar grandes variaciones de consumo; la identificación de ani-

males susceptibles y el movimiento de los animales en función de la detección temprana de problemas. Frente a algunas situaciones de alto riesgo que suelen ocurrir en las primeras horas de ingreso a una nueva franja, este tipo de acciones pueden determinar el éxito o el fracaso en el manejo del problema.

### *Detección de animales susceptibles*

En todos los rodeos existe un porcentaje, usualmente bajo, de animales muy susceptibles que deben ser identificados y apartados para facilitar el manejo del resto de la tropa. En función de los objetivos de producción, estos animales pueden integrar una tropa de invernada lenta, ya sea cosechando los excedentes forrajeros de menor calidad o utilizando recursos forrajeros con baja, o ninguna, participación de alfalfa; o bien ingresando a corrales de recría o engorde. También se pueden implementar distintas combinaciones de estas u otras alternativas, incluyendo el suministro de bolos intrarruminales con monensina, como se verá más adelante. Lo importante es no supeditar el manejo de toda la tropa a la existencia de unos pocos animales susceptibles que impidan una solución razonable del problema.

### *Manejo del pastoreo*

El manejo del pastoreo para la prevención del empaste supone tener en cuenta los siguientes aspectos:

#### *Consumo y calidad del forraje*

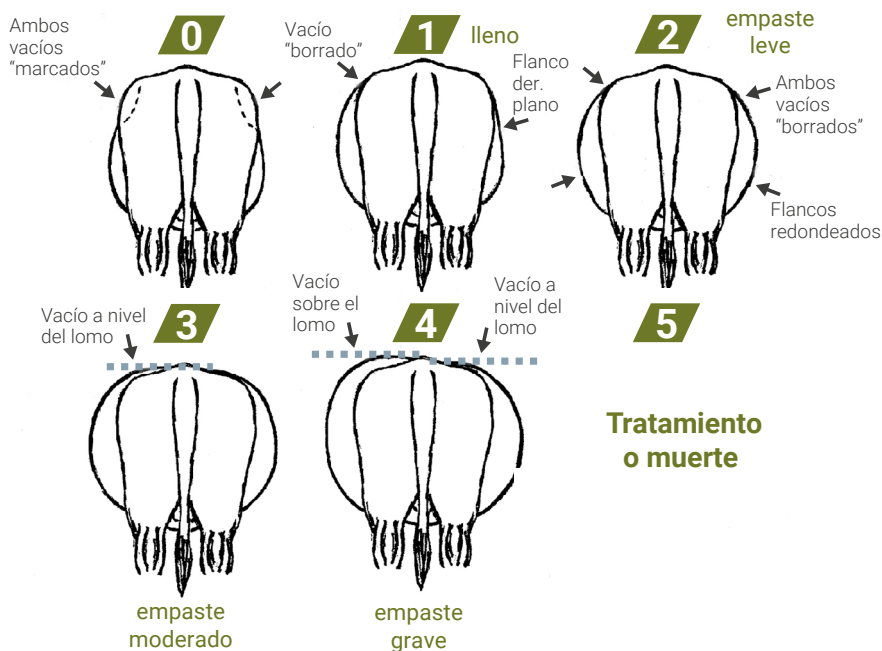
En un esquema que apunte a la alta performance de los animales se debe mantener, tanto como sea posible, una dieta constante en calidad y cantidad, que permita alcanzar altos niveles de consumo y evite los altibajos que provoquen cambios drásticos en el ambiente ruminal y aumentan así el riesgo de empaste (Majak *et al.*, 1995). Este objetivo es factible de lograr utilizando alfalfa en prefloración con un esquema de pastoreo donde los cambios de franja se produzcan a intervalos cortos, que permitan controlar mejor la cantidad y calidad del forraje disponible. Actualmente se propone la utilización de la alfalfa contabilizando la acumulación de grados-día (°C-día), estimada como la sumatoria de las

temperaturas medias diarias por sobre los 5 °C. En primavera y verano se sugiere ingresar a una nueva franja cada vez que se acumulen entre 350 y 400 °C-día (unos 25-30 días en promedio). Esto posibilita obtener la mayor cantidad de forraje de buena calidad, favoreciendo además la eficiencia de cosecha sin disminuir el consumo (Sardiña, 2019). El nivel de asignación forrajera sobre base seca no debería ser inferior al 3,0 % del peso vivo.

En cuanto al manejo del pastoreo, se puede implementar un esquema de bajo riesgo realizando el cambio a una nueva franja durante el día, preferentemente después del mediodía, para hacer el “despunte” sin rocío y bajo vigilancia; al atardecer, los animales pueden volver a la franja anterior con el fin de pasar la noche en un lugar seguro, con disponibilidad suficiente como para mantener el nivel de consumo sin restricciones; esto permite tener un llenado ruminal más parejo en el tiempo, haciendo que los animales pasen a la próxima franja sin excesivo apetito. El sistema se puso a prueba en el INTA de General Villegas (Buenos Aires), utilizando una pastura base alfalfa con una asignación de forraje equivalente al 3,5 % del p.v. y en la que se comparó un sistema de pastoreo de tres días de permanencia en cada franja versus un sistema intensivo de pastoreo diario (Davies *et al.*, 2000). En este último, cada franja estaba dividida en cuatro sectores que se utilizaban sucesivamente cada dos horas, con lo que se lograba que los animales dispusieran del horizonte superior de la pastura durante la mayor parte del día y del forraje menos peligroso durante la noche. Si bien el nivel de empaste, medido de acuerdo a una escala visual de 0 a 5 (Figura 2), no superó el grado leve en ambos tratamientos, el promedio de los registros efectuados fue significativamente menor en el pastoreo intensivo (1,05) con respecto al pastoreo tradicional (1,44).

### *Alteraciones del sistema de pastoreo*

Para disminuir el riesgo de empaste es fundamental mantener el esquema de pastoreo con la menor cantidad posible de alteraciones; en consecuencia, es importante programar todos los movimientos de los animales. En las épocas de alto riesgo, se deben evitar los encierres prolongados para el manejo sanitario o las pesadas; en caso de ser necesario, conviene hacer tropas pequeñas para que los animales no se desbasten.



■ **Figura 2.** Escala visual de estimación del grado de empaste en novillos (Davies et al., 2001).

### Selección del forraje en pastoreo

Tradicionalmente, se ha recomendado restringir la capacidad de selección de los animales pastoreando con un bajo nivel de asignación para lograr altas eficiencias de cosecha (70-80 %). Esto es lo indicado cuando la alfalfa se utiliza en avanzado estado de floración, porque el pastoreo con alta carga impediría que el animal seleccione los rebrotes basales y aumente el riesgo de empaste. Sin embargo, en este caso, la dieta consumida no tendría la calidad requerida para sostener altos ritmos de engorde.

Cuando se trata de alfalfa en estados fenológicos más tempranos, la mayor parte del forraje ofrecido es de alta calidad, con lo cual no existe el beneficio de la técnica. Además, un sistema de pastoreo con bajos remanentes suele provocar, hacia el final de la estadía en cada franja, restricción en la disponibilidad y, por ende, en el consumo, lo cual aumenta el riesgo de empaste (ver lo comentado previamente en Manejo de la alimentación).

### *Pastoreo con lluvia, rocío o heladas*

Se debe evitar el pastoreo con lluvia, rocío o heladas a fin de restringir el ingreso excesivo de agua en el rumen, que predispone a la formación de grandes volúmenes de espuma. Además, en dichas condiciones el pasto se torna más frágil y se mastica más fácilmente, disminuyendo el estímulo para la salivación. Es importante recordar que la saliva actúa en el rumen como antiespumante.

Si los fenómenos meteorológicos obligan a sacar a los animales de la pastura, se debe contar con reservas forrajeras de alta calidad, como heno o silaje de pastura o silaje de planta entera de maíz o sorgo. Al retomar el esquema de pastoreo es necesario tener en cuenta que si los cambios en la dieta fueron muy pronunciados, el rumen no recupera rápidamente las condiciones ideales; en consecuencia, durante las primeras horas de pastoreo se debe extremar la vigilancia de los animales (Fay *et al.*, 1986).

### *Suplementación con alimentos fibrosos de alta calidad*

La sustitución de forraje peligroso por otro alimento que aporte volumen y calidad es una herramienta tradicionalmente recomendada y eficaz para la prevención del empaste. Normalmente se propone la utilización de heno de pasturas, pero la calidad de esta reserva suele ser muy variable; en condiciones de campo en general es baja y no supera el 50 % de digestibilidad. Dado que la sustitución de pastura por este forraje puede originar una depresión del consumo y afectar la ganancia de peso de los animales, es conveniente disponer de otro tipo de reservas. El silaje de maíz, que al tener una digestibilidad promedio de alrededor de 65 % ofrece una calidad más alta que la del heno, aparece como una mejor alternativa y se recomienda utilizar un tamaño de picado de 1,5-2 cm.

Por un lado, Bretschneider (2000) probó la suplementación con silaje de maíz a niveles equivalentes al 0,5 y al 1 % del p.v. y registró un grado promedio de empaste moderado (1,8) y leve (1,5), respectivamente, sin diferencias entre ambos niveles de suministro. Considerando que el testigo sin suplementar alcanzó un grado promedio de timpanismo entre moderado y severo (2,7), se concluyó que la técnica es eficaz para la reducción del empaste.

Por otro lado, el silaje es de gran ayuda para cubrir eventualidades que complican la prevención del empaste, como por ejemplo las lluvias. En tales circunstancias, se puede pasar del pastoreo a la alimentación con silaje en confinamiento sin necesidad de realizar acostumbamiento a la nueva dieta y, al restablecerse las condiciones normales, volver rápidamente al pastoreo.

### *Composición de la pastura*

Como se dijo antes, por una parte, se ha establecido que las pasturas con alta proporción de gramíneas (mayor de 50 %) son menos peligrosas, lo que sugiere que disminuir el stand de plantas de alfalfa a la siembra ayudaría a bajar el nivel de riesgo de empaste. Una primera objeción a esto se relaciona con la productividad primaria de las pasturas consociadas, que depende en gran medida de la participación de la alfalfa. Por otra parte, en condiciones de carga moderada, la mayor proporción de gramíneas frente a la alfalfa no necesariamente disminuye la proporción de esta en la dieta, ya que los animales pueden ejercer un alto nivel de selección.

También se recomienda modificar la distribución de las especies en la pastura, aunque esta práctica solo podría tener éxito si las gramíneas y las leguminosas se sembraran en la misma línea; aun así, la época del año y las condiciones climáticas pueden inducir distintas velocidades de crecimiento de las especies que, además, concentran la mayor parte de su biomasa a diferentes alturas del canopeo, lo cual incide en la capacidad de selección por parte de los animales.

En las pasturas base alfalfa, la presencia de trébol blanco puede ser problemática al no tenerse en cuenta su selección por lo animales; además, cuando se usan tratamientos preventivos aplicados por aspersión, el producto no siempre alcanza los niveles más bajos del canopeo, donde se encuentra esta especie.

## Uso de técnicas e insumos para prevenir el empaste

Dada la variabilidad del problema, siempre conviene anticipar medidas apuntando al máximo nivel de seguridad y usar una estrategia que

sume manejo y alguno de los productos o tratamientos de prevención disponibles. La elección de estos dependerá de las posibilidades operativas y económicas de cada empresa, pero siempre se deberá tener en cuenta el nivel de eficacia del procedimiento en cuestión.

Una consideración adicional debe hacerse con respecto a las técnicas que implican trabajos sobre la pastura. En este caso, cuanto mayor sea la receptividad del recurso forrajero, menor será el costo de aplicación de la técnica, ya que este se diluirá en una mayor cantidad de animales por unidad de superficie. Cabe aclarar que, en este caso, el concepto de receptividad apunta a tener en la pastura una elevada proporción de plantas de alfalfa de buena calidad y no a utilizar la pastura excesivamente madura (“pasada”), con un alto nivel de acumulación de materia seca, pero de una calidad inferior a la recomendable.

### *Premarchitado del forraje*

Una técnica que se adapta bien a los planteos intensivos –dado que demanda maquinaria, personal y tiempo– es el marchitamiento del forraje por corte o por aplicación de un desecante. Esta técnica puede ser muy eficaz si se usa el procedimiento correcto, pero también puede producir pérdidas en cantidad y calidad de forraje, cuya magnitud depende de la forma de implementación.

a) Marchitamiento por corte. En este caso, el forraje se corta y se deja orear en las andanas el tiempo suficiente para que alcance un contenido de agua inferior al 50 %, que equivale al punto en el que luego de apretar un manojo de alfalfa en la mano, este se expande lentamente y la palma queda seca (prueba del puño). El tiempo de oreo varía en función de la temperatura y la humedad relativa del ambiente, pero se puede acelerar con el uso de maquinaria de corte provista de rodillos acondicionadores y también obteniendo andanas amplias y poco profundas.

Cuanto más rápido sea el proceso de secado, más fácil resulta mantener la calidad original de la alfalfa ya que las pérdidas por respiración, o eventualmente por lavado, son menores. *Alli et al.* (1985) midieron, entre las 0 y las 52 horas desde el momento del corte, una disminución del contenido de proteína bruta de 18,5 a 15,1 %, de carbohidratos totales de 9,1 a 8,0 % y de carbohidratos solubles de 44,6 a 37,3 %.



Estas pérdidas fueron atribuidas, en el caso de los carbohidratos, a la respiración poscorte y a la caída de hojas en la manipulación del forraje al enfardarlo; y en el caso de las proteínas, a esto último. Cuando los animales remueven el forraje al pastorear directamente de las andanas, se produce un efecto similar al descrito. Como recomendación general se sugiere que la superficie para cortar debe proporcionar una cantidad de forraje tal que sea consumida dentro de los 2 días subsiguientes al corte.

Como esta técnica se basa en el consumo directo, durante los primeros días se puede observar una disminución de este, pero luego, al acostumbrarse los animales, el consumo resulta igual o superior al esperable con la utilización de la alfalfa en pie (Guaita y Gallardo, 1997). De lo anterior se desprende la conveniencia de realizar esta práctica en forma continua. Además de prevenir el empaste, el corte sistemático de la pastura permite mantener una adecuada limpieza de esta, que es importante para la obtención de reservas forrajeras de alta calidad. Si por algún motivo el lapso entre el corte y la utilización se prolonga, se debe verificar la existencia de sectores con trébol blanco o rebrotes de alfalfa, que pueden representar riesgo de empaste.

b) Desecamiento con herbicidas. Esta es una técnica que genera menos complicaciones operativas que el método anterior y que también es de alta efectividad si se realiza adecuadamente. Uno de los productos más usados es el paraquat, que es asperjado sobre la pastura 48 horas antes del pastoreo, en dosis que oscilan entre 150 y 250 cc/ha<sup>-1</sup> (producto formulado al 27,6 %), según se use o no un surfactante no iónico al 0,2 % como agente humectante (Latimori *et al.*, 1995). Dado que este último facilita el contacto del producto con las hojas, su uso es recomendable. El paraquat debe ser aplicado sobre la superficie de las hojas en condiciones de alta luminosidad y ausencia de humedad (rocío, lluvia). Para una correcta aplicación, se recomienda usar un volumen de agua de 100 a 120 l/ha<sup>-1</sup>, con una presión de 45 libras cm<sup>-2</sup>. Es conveniente emplear equipos que copien el terreno y eviten el "cabeceo" de los botallones, que deja áreas sin tratamiento. También es recomendable utilizar la tecnología antideriva, que facilita la aplicación del producto. En resumen: es fundamental lograr una buena calidad de aplicación, tanto en la uniformidad de distribución como en el mojado de los niveles inferiores de la pastura; esto último es especialmente importante cuando hay trébol blanco o gran cantidad de rebrotes basales en la alfalfa.

Por una parte, es necesario tener en cuenta que el forraje tratado con paraquat sufrirá una disminución en su calidad nutricional. Al respecto, se ha medido una digestibilidad de 70 % en hojas de alfalfa tratadas con el producto mencionado, mientras que las hojas del testigo sin tratar alcanzaron valores de 75,2 % (Davies, 1994). Por otra parte, Latimori *et al.* (1992) comprobaron que el desecamiento de la alfalfa con herbicidas registró un promedio de 98 kg/ha<sup>-1</sup> de hojas caídas, en tanto que en el testigo sin tratar registró 65 kg/ha<sup>-1</sup>. Los mismos autores también observaron que una lluvia de 141 mm causó una defoliación equivalente a 356 kg/ha<sup>-1</sup> en la alfalfa desecada y de solo 67 kg/ha<sup>-1</sup> en el testigo sin tratar. Esta significativa defoliación fue asociada a pérdidas en la productividad animal, lo que implica que la técnica, si bien no tendría restricciones higiénicas, ya que no detectaron residuos del principio activo en la carne, podría no ser compatible con los objetivos de alta producción planteados en los sistemas intensivos de invernada.

### *Productos antiempaste*

En el mercado se dispone de una serie de productos que han demostrado distintos niveles de eficacia en la prevención y el control del empaste, y que incluyen tensioactivos sintéticos (poloxaleno y alcohol etoxilado), antiespumantes (dimetilpolisiloxano) y antibióticos (ionóforos). Los tensioactivos y antiespumantes pueden suministrarse en forma individual o colectiva (Figura 3).

Como se puntualizó antes, la elección de un producto no debería basarse solamente en su costo directo, ya que un producto barato pero de baja eficacia puede resultar muy caro en función de las pérdidas productivas que puede ocasionar. Además, cuando se piensa en ajustar una técnica de suministro, debe incluirse en la comparación de alternativas el costo en horas/hombre y uso de maquinaria que puede insumir su correcta implementación. Si bien estos factores inciden de modo importante en el costo total, cuando se realiza el cálculo por dosis, las diferencias entre los productos más eficaces tienden a nivelarse.

a-) Antiespumantes: los más difundidos son las siliconas (dimetilpolisiloxano), que tienen un bajo costo por dosis. Impiden la formación de espuma al mezclarse con las partículas de forraje y los solubles pre-

senten en el rumen. El método de suministro tradicional ha sido el de agregarlas en el agua de bebida, asegurando la concentración del producto con dosificadores automáticos o mediante el cierre del paso de agua al bebedero cada vez que se prepara la mezcla. El sistema resulta poco confiable ya que el consumo de agua de los animales es muy variable y depende del contenido de agua del forraje, de la existencia de fuentes alternativas (charcos) y de las condiciones ambientales (lluvias y temperaturas). Todo esto obliga a realizar frecuentes estimaciones del consumo para corregir la dosis.



Figura 3. Ventajas y desventajas de las formas de suministro de productos tensioactivos y antiespumantes ordenadas según el grado seguridad que ofrecen en el control del empaste.

b-) Tensioactivos: cualquiera sea la vía de suministro, los tensioactivos han demostrado ser más eficaces y de efecto más persistente que los antiespumantes (Howarth *et al.*, 1986). Por ser detergentes, facilitan la humectación del forraje y emulsionan los lípidos de este, que a su vez

ejercen un efecto antiespumante. En el mercado local se dispone de poloxaleno y de alcohol etoxilado, formulados como líquidos y en polvo. El suministro de estos productos en el agua de bebida tiene las mismas restricciones mencionadas en el punto anterior. Cuando la dosificación y el consumo de agua están bien controlados, el uso de estos productos puede tener un impacto muy positivo en la prevención y el control del empaste. La forma de aplicación más difundida en los sistemas de invernada pastoril es la aspersion de las pasturas con equipos terrestres; en este caso, al igual que con los desecantes, la eficacia depende de la buena calidad del procedimiento. Una vez aplicado y oreado el tensioactivo, los animales pueden ingresar a la pastura inmediatamente, siendo conveniente no esperar más que uno o dos días para iniciar el pastoreo ya que, en función de las condiciones climáticas, puede ocurrir un escurrimiento del producto. La dosis se ajusta en función de la cantidad de animales y de los días de permanencia en cada franja; por ejemplo: si los animales permanecieran tres días en cada franja, se debería preparar la mezcla con la cantidad de producto equivalente a tres dosis por animal.

Dado que la aplicación encarece el costo por dosis, se ha intentado reducirlo mediante el asperjado de una superficie menor a la de la franja de pastoreo, pero sin disminuir la dosis de producto; sin embargo, los resultados informados han sido variables. Para aislar el efecto de los diversos factores que pueden producir la variación en los resultados de la técnica antes mencionada, en el INTA General Villegas se llevó a cabo una prueba utilizando un sistema de pastoreo rotativo con tres días de permanencia en cada franja, con un nivel de asignación de forraje equivalente al 3,0 % del p.v., y aplicando la dosis para tres días de un agente tensioactivo comercial (alcohol etoxilado 25 % p.a.) en la mitad de la superficie de cada franja de pastoreo (Davies *et al.*, 2001). Los animales pastoreaban la mitad del tiempo allí y luego accedían a la mitad restante, que no había sido pulverizada. De acuerdo con los resultados obtenidos, la técnica no fue efectiva para disminuir la incidencia y la severidad del empaste.

c-) Ionóforos: en el mercado local se ofrecen productos basados en monensina, un modificador de la microbiota ruminal cuyo principal efecto final, en relación con el empaste, es una reducción de la producción de gases en el rumen, principalmente de metano. Se formula

en polvo para suministrar en la ración o en cápsulas de liberación lenta (bolos) que se colocan en el rumen y se usa a una dosis máxima de 300 mg animal<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>. En el primer caso, hay que controlar que el mezclado sea homogéneo para evitar intoxicaciones por sobredosisificación y lograr un consumo parejo del producto que asegure la eficacia de la técnica. Si bien la dosis letal es mucho más alta que la terapéutica, no son raros los incidentes por sobredosisificación. La intoxicación se evidencia por disminución del consumo, decaimiento, debilidad y eventualmente la muerte del animal.

El suministro de bolos es adecuado para los sistemas de producción pastoriles, en cuanto a la facilidad de uso, pero no asegura prevención total. Según los fabricantes, los bolos son eficaces para prevenir hasta el 80 % de las muertes por empaste y la duración de su efecto protector es de aproximadamente 100 días (Lowe, 1991).

Otra aplicación práctica es la de suministrar bolos únicamente a los animales susceptibles de cada tropa, identificándolos por un número de caravana y de bolo con el fin de facilitar el control de pérdida o agotamiento de dispositivos. De esta manera se reduce el costo de aplicación y se evita separar del resto de la tropa a los susceptibles para darles otro destino, como pasturas de menor calidad o engorde a corral.

### *Utilización de leguminosas de bajo potencial meteorizante*

Desafortunadamente, las leguminosas que no son meteorizantes (*Lotus* spp., *Vicia* spp.) no se adecuan a los requerimientos de alta producción de materia seca que presentan la mayoría de los sistemas de invernada. En consecuencia, y pese a su potencial timpanizante, la alfalfa continúa siendo en el país la base de los sistemas pastoriles para la producción de carne y leche. Para corregir el problema existen, tanto a nivel nacional como internacional, líneas de investigación que buscan desarrollar alfalfas de bajo potencial meteorizante.

En el país, en la década de 1990 se desarrolló en la EEA INTA Manfredi el cultivar de alfalfa ProINTA Carmina (GRI 8), seleccionado por menor potencial timpanizante (Basigalup, 2004; Basigalup *et al.*, 2004). Como promedio general de todos los estudios realizados, dicho cultivar disminuyó la incidencia de timpanismo en un rango de 5 % a 23 %, manteniendo

similares niveles de productividad y calidad que otros cultivares de su grupo 8 (Basigalup *et al.*, 2007; Bernáldez *et al.*, 2009). En Canadá, y como resultado de un programa de selección por menor digestibilidad inicial que se había implementado desde 1979, se inscribió en el año 2000 la variedad de marcado reposo invernal (GRI 3) AC Grazeland Br (Coulman *et al.*, 2000), que logró disminuir en 62 % (valor promedio) la incidencia de empaste (Coulman *et al.*, 1998). Si bien el material tiene un muy bajo potencial meteorizante, por sus características no se adapta a los sistemas de producción locales.

## Tratamiento de los animales empastados

El tipo de tratamiento del empaste depende del grado de meteorización que presenten los animales. En una escala de 0 a 5, como la presentada en la Figura 2, los animales con un grado 2 (meteorización leve) deben ser vigilados. Si la meteorización avanza a un grado 3 (moderado), deben ser retirados de la pastura en forma lenta y llevados hasta un bebedero con agua tratada con tensioactivo; seguidamente, se debe aguardar hasta que se deshinchén, lo que generalmente ocurre dos o tres horas después. Además, la recomendación tradicional específica suministrar un tensioactivo por vía oral o intrarruminal, en dosis de tratamiento y en un vehículo de 100 ml de agua para favorecer la difusión del producto en el rumen; sin embargo, en condiciones de campo, esta medida es impracticable en la mayoría de los casos, ya que implica correr a los animales para sujetarlos, lo que puede resultar contraproducente.

Para tratar a los animales que presenten una meteorización de grado 4 (grave), con síntomas de asfixia, se deberá realizar una incisión en el centro de la fosa paralumbar izquierda ("hueco del vacío"), en sentido perpendicular a la línea del lomo. Esto tiene como fin perforar el saco dorsal del rumen y provocar la salida del gas libre. Para esta maniobra conviene utilizar un cuchillo preparado especialmente, con una hoja de 5-7 cm de largo, con punta aguda y 3 cm de ancho en la base. Si el volumen de espuma es muy grande, esta medida puede resultar insuficiente, en cuyo caso debe agrandarse la incisión hasta el tamaño de un puño para extraer contenido ruminal hasta aliviar la presión. Luego de esta maniobra, un profesional veterinario debe limpiar y suturar la

herida y suministrar una medicación adecuada para evitar infecciones posteriores. Este procedimiento debe ser realizado en todos los casos ya que, de no ser así, un alto porcentaje de los animales punzados muere por esta causa.

## Consideraciones finales

La importancia de la alfalfa como recurso forrajero de alta calidad y elevado rendimiento obliga al productor ganadero a convivir con el empaste en los sistemas intensivos de producción de carne y leche. Si se tienen en cuenta los factores que modifican el riesgo y se conocen los criterios que aseguran la eficacia de una determinada técnica de prevención, se puede lograr un razonable nivel de control del problema.

La selección de una estrategia preventiva debe responder a las posibilidades operativas y económicas de cada empresa. En producción de leche, por ejemplo, la posibilidad de suministrar productos en forma individual en la sala de ordeño facilita la prevención. En los sistemas de producción pastoril de carne siempre conviene tomar medidas de prevención apuntando al máximo nivel de riesgo que podría producirse. A la estrategia elegida se le debe sumar calidad de aplicación y continuidad en su ejecución, asignando alto valor a la experiencia del personal involucrado.

El uso de tensioactivos asperjados sobre la pastura ofrece en general muy buenos resultados y se adapta a los recursos disponibles en la mayoría de los sistemas de invernada. El suministro en el agua de bebida, si se realiza con precisión, también es eficaz y actualmente es la modalidad más utilizada. Esta técnica, usada en combinación con las medidas de manejo que aumentan la eficacia en la prevención, constituye una alternativa viable para enfrentar el problema.

### *En resumen:*

- Capacitar al personal de ganadería en el manejo del empaste.
- Identificar y dar tratamiento especial a los animales más susceptibles.

- Controlar estrictamente la dosis y la aplicación del principio activo elegido para la prevención, asegurando el consumo por parte de los animales.
- Evitar el ayuno (por encierre prolongado) y los altibajos en el consumo (por deficiente asignación de forraje).
- Evaluar la disponibilidad de pasto, si es posible, antes del ingreso a cada franja, y asignar una cantidad diaria por animal tal que no ocurran restricciones en el consumo en ningún momento.
- Cambiar a nueva franja de pastoreo alrededor del mediodía, sobre todo en caso de helada o rocío, con vigilancia en las primeras horas.
- Evaluar si hay rebrotes basales de alfalfa o manchones de trébol blanco que puedan ser consumidos en cantidad por los animales.
- Prever la disponibilidad de reservas forrajeras de buena calidad para situaciones de emergencia.



## BIBLIOGRAFÍA

- ALLI, I.; E. ROBIDAS; E. NOOROZI; B.E. BAKER. 1985. *Some changes associated with the field drying of lucerne and timothy*. *Grass and Forage Science* (40):221-226.
- BASIGALUP, D.H. 2004. *Control del empaste a través del mejoramiento genético*. *Cuadernillo Agro Mercado (Producción Animal)*. Año 24 N.º 84. 26-28.
- BASIGALUP, D.H.; C.V. CASTELL; C.D. GIAVENO. 2004. *Response to selection for lower initial rate of dry matter disappearance in the development of a bloat-tolerant non-dormant alfalfa population*. *Journal of Genetics and Breeding* 57 (1): 31-38.
- BASIGALUP, D.H.; J. MARTÍNEZ FERRER; A. ODORIZZI; V. ADOLFO; E. USTARROZ; M.L. BERNÁLDEZ; N. LATIMORI; A. KLOSTER; P. DAVIES; D. MÉNDEZ; M. CORREA LUNA. 2007. *ProINTA Carmina: Variedad de Alfalfa con Menor Potencial Timpanizante*. *IDIA Año VII, N.º 9*: 32-37.
- BERNÁLDEZ, M.L.; D.H. BASIGALUP; J. MARTINEZ FERRER; M. BALZARINI; D. ALOMAR. 2009. *Bloat Reduction Potential of an Alfalfa Cultivar Selected for Low Initial Ruminant Disappearance*.
- BRETSCHNEIDER, G. 2000. *Efectos de la suplementación con distintos niveles de silaje de maíz previo al pastoreo de alfalfa sobre la presentación de meteorismo espumoso bovino*. Tesis MSc, UNMdP, FCA.
- CARRUTHERS, V.R. 1991. *Pasture composition and grazing management in dairy farms differing in the incidence of bloat*. *Dairy Research and Development Corporation (DRDC) (ed.)*. *Bloat. DRDC Bloat Workshop*. Ellinbank, Australia. 8 p.
- COULMAN, B.E.; C. DUNCAN; B.P. GOPLEN. 1998. *Response to four cycles of selection for low initial rate of digestion in alfalfa*. *Report of the 36th North American Alfalfa Improvement Conference, Bozeman, MT*. 74 p.
- COULMAN, B.E.; M. GRUBER; T.A. MCALLISTER; W. MAJAK; D. THOMPSON. 2000. *Future of alfalfa as a grazing crop: Bloat*. En: BOUTON, J.; G. BAUCHAN (ed.). *Report of the 37th North American Alfalfa Improvement Conference*. Madison, WI, EUA. 351-358.
- DAVIES, P. 1994. *Efecto del marchitamiento sobre variables asociadas al potencial meteorizante de la alfalfa*. Tesis MSc., UNMdP, FCA.
- DAVIES, P.; A. DILLON; D.G. MENDEZ. 2000. *Control del meteorismo espumoso mediante la intensificación del pastoreo rotativo con novillos en pastoreo de alfalfa*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 20 (1):19-20.
- DAVIES, P.; A. DILLON; D.G. MENDEZ. 2001. *Aplicación de un tensioactivo en área reducida de una pastura de alfalfa y riesgo de meteorismo espumoso (empaste)*. *EEA Gral. Villegas. Informe Anual Proyecto Macroregional*.
- DAVIES, P.; A. DILLON; D.G. MENDEZ. 2001. *Control del empaste en invernada*. *Publicación Técnica N.º 34*. EEA Gral. Villegas.

FAY, J.P.; G.L. MICHEO; G. SANTUCHO; A. GARCIA ASTRADA. 1986. *Effect of fasting on digestion of white clover leaflets by rumen microorganisms and possible implications in cattle bloat. J. of Veterinary Medicine* 23:781-787.

GUAITA, M.S.; M. GALLARDO. 1997. *Utilización de la alfalfa en las unidades intensivas de producción de leche de la EEA Rafaela. Información técnica para productores 1995-1996. Publicación miscelánea N.º 82, EEA INTA Rafaela.*

HOWARTH, R.E. 1975. *A review of bloat in cattle. Can. Vet. J.* 16 (10):281-294.

HOWARTH, R.E.; G.W. HORN. 1984. *Wheat pasture bloat of stocker cattle: a comparison with legume pasture bloat. En: HORN, G.W. (ed.). Proceedings of the Nat. Wheat Pasture Symposium. Animal Sci. Dept., Oklahoma State University, Stillwater, OK, EUA.*

HOWARTH, R.E.; K.J. CHENG; J.P. FAY; W. MAJAK; G.L. LEES; B.P. GOPLEN; J.W. COSTERTON. 1983. *Initial rate of digestion and legume pasture bloat. Proceedings XIV Int. Grassl. Cong., Westview Press, Boulder, Co., EUA.*

HOWARTH, R.E.; K.J. CHENG; W. MAJAK; J.W. COSTERTON. 1986. *Ruminant bloat. En: MILLIGAN, L.P.; W.L. GROVUM; A. DOBSON (ed.). Control of digestion and metabolism in ruminants. Englewood Cliffs, EUA.*

LABY, R.H. 1991. *Bloat: Its etiology and significance to the Australian dairy industry. Dairy Research and Development Corporation (DRDC) (ed.). Bloat. DRDC Bloat Workshop. Ellinbank, Australia.*

LATIMORI, N.J.; A.M. KLOSTER; M.A. AMIGONE. 1995. *Evaluación de algunas técnicas actualmente disponibles para el control del meteorismo. Meteorismo bovino. Jornada de Actualización para Productores y Profesionales. EEA Marcos Juárez, INTA.*

LATIMORI, N.J.; A.M. KLOSTER; M.A. AMIGONE; L. CUERPO; A. PIZZI. 1992. *Marchitamiento con paraquat en el control de meteorismo: efecto sobre la ganancia de peso y residuos en tejido animal. Revista Argentina de Producción Animal* 12: 217-222.

LOWE, L.B. 1991. *Monensincontrolled-release anti-bloat capsule. Dairy Research and Development Corporation (DRDC) (ed.). Bloat. DRDC Bloat Workshop. Ellinbank, Australia.*

MAJAK, W.; J.W. HALL; W.P. MCCAUGHEY. 1995. *Pasture management strategies for reducing the risk of legume bloat in cattle. J. Anim. Sci.* 73: 1493-1498.

MORRIS, C.A. 1991. *The genetics of susceptibility to bloat in cattle. Dairy Research and Development Corporation (DRDC) (ed.). Bloat. DRDC Bloat Workshop. Ellinbank, Australia.*

SANDERSON, M.A.; W.F. WEDIN. 1989. *Phenological stage and herbage quality relationships in temperate grasses and legumes. Agron. J.* 81: 864-869.

SARDIÑA, C. 2019. *Aprovechamiento del cultivo de alfalfa. (Disponible: <https://inta.gov.ar/sites/default/files/aprovechamientoalfalfa.pdf> consultado: 20/12/2019).*

WALGENBACH, R.P.; G.C. MARTEN; G.R. BLAKE. 1981. *Release of soluble protein and nitrogen in alfalfa. I. Influence of growth temperature and soil moisture. Crop Sci.* 21: 843-849.

# CAPÍTULO 15

## Producción de semilla de alfalfa

Eduardo M. Echeverría,  
Carlos J. Moschetti,  
Enrique M. Martínez  
y Daniel H. Basigalup

## Introducción

La producción de semilla de alfalfa en la Argentina ha sido generalmente de importancia secundaria por ser uno de los subproductos de la producción de forraje. En consecuencia, el mercado nacional, en gran parte, se ha abastecido en forma irregular de una producción de semillas aleatoria, de bajos rendimientos y de usualmente baja calidad. La mayoría de las áreas donde la alfalfa puede ser cultivada con éxito para la obtención de forraje no son precisamente las adecuadas para una eficiente producción de semilla.

Durante años, la producción de semilla como tal no fue comprendida en su totalidad. En las últimas dos décadas, las investigaciones y experiencias realizadas han permitido identificar los factores más relevantes que influyen en sus rendimientos. Esta situación junto a la existencia de un importante mercado demandante de semilla de calidad y de cultivares reconocidos determinan que el país necesite imperiosamente contar con una industria especializada en este rubro, que acompañe a su vez el desarrollo de la actividad pecuaria.

Las diferencias en clima y suelo así como las variaciones en infraestructura y tradición agropecuarias que se presentan en nuestro país requieren de la aplicación de sistemas de producción de semilla adaptados a cada situación específica. A lo largo de este capítulo se discutirán los conceptos técnicos básicos que deben tenerse en cuenta para una adecuada producción de semilla de alfalfa, los que en muchos casos deberán ajustarse a las particularidades zonales o regionales.

## Producción de semilla como industria especializada

Cuando se desean altos rendimientos la producción de semilla debe considerarse como una industria especializada, separada totalmente de la producción de forraje (Marble, 1987). Un análisis de la evolución de la industria de la semilla de alfalfa en EE. UU. es válido para una mejor comprensión de esta situación.

Antes de la década de 1940, el 80 % de la semilla estadounidense se producía en regiones subhúmedas y semiáridas que, como subproducto

del heno, coincidían con las áreas de producción y consumo de forraje. Durante esta etapa, la oferta de semilla estuvo sujeta a la demanda de forraje, a la ocurrencia de condiciones climáticas favorables para la producción de semilla, al ataque de insectos perjudiciales y a la ausencia de un sistema de mercado organizado. Entre 1940 y 1958, los aportes de la investigación y de los programas de mejoramiento originaron nuevas variedades y prácticas de manejo, lo que incrementó la producción forrajera y generó una mayor demanda de semilla de calidad genética y física. Una abrupta transformación se inició en 1945, cuando los productores de California, Nevada, Oregon, Idaho y Washington, concentrados en áreas ecológicamente aptas, comenzaron a especializarse en la producción de semilla de alfalfa.

El grado de evolución que alcanzaron fue tal que en 1975 ya producían el 85 % del mercado nacional. Todo esto fue consecuencia de la introducción de nuevas variedades, del desarrollo de novedosas y específicas tecnologías en el manejo de los cultivos –principalmente el uso de polinizadores– y de la organización de los productores en compañías capaces de procesar y comercializar sus semillas (Hijano, 1993; Itria y Bariggi, 1980; Marble *et al.*, 1986; Olmstead *et al.*, 1987; Smith, 1988).

En Argentina, la existencia de un mercado que en 2018 consumió un total aproximado de 4.700 t año<sup>-1</sup> de semilla fiscalizada, cantidad de la que cerca del 50 % provenía de la importación, indica claramente que el desarrollo de una industria especializada no solo es posible, sino también necesaria. Esta actividad, al exigir una tecnología específica y compleja, requiere de productores con un determinado grado de especialización y de empresas que se “dediquen” a la industria de la semilla. Hasta mediados de la década de 1990, la semilla de origen nacional presentaba serias deficiencias en cantidad y calidad (Cragnoz, 1990; Dell’Agostino, 1993). Durante los últimos años, como consecuencia de la información técnica disponible, las normas legales vigentes y la mayor selectividad de la demanda, la semilla fiscalizada producida en el país ha mejorado en cantidad y calidad. No obstante, aún reviste cierta importancia el volumen de semilla que se produce y se comercializa en forma ilegal y que se conoce con el nombre de “bolsa blanca”.

## Áreas de producción en la Argentina

Tradicionalmente, cerca del 70 % de la superficie nacional dedicada a producción de semilla de alfalfa se ha ubicado en áreas de secano, como alternativa de la producción de forraje. En ese marco, los rendimientos han sido muy bajos y la calidad de la semilla generalmente pobre.

En Argentina, la superficie cultivada con alfalfa –tanto en pasturas mono como polifíticas– asciende actualmente a un poco más de tres millones de hectáreas. Las necesidades anuales de semilla se estiman en función de la tasa de renovación anual de las pasturas y de la densidad de siembra utilizada en cada área. Durante el período 2015-2017, los volúmenes de importación de semilla promediaron las 2.748 t año<sup>-1</sup> de semilla desnuda (que pildorada o “peleteada” se convirtieron en unas 4.120 t), mientras que la media de producción nacional de semilla fiscalizada pildorada rondó las 1.906 t año<sup>-1</sup>. La combinación de las dos cifras anteriores hizo un promedio de semillas fiscalizada cercano a las 6.000 t año<sup>-1</sup>. Como se señalara anteriormente, se suma a esto una considerable cantidad de semilla ilegal (“bolsa blanca”), estimada hace un tiempo en 900 a 1.200 t año<sup>-1</sup> (Basigalup *et al.*, 2007).

La oferta mundial de semilla de alfalfa viene registrando cambios importantes desde fines de los 90, basados principalmente en una marcada disminución de la producción en algunas zonas de EE. UU. Esta situación se ha visto en parte atenuada por el incremento de la producción en otras regiones, como por ejemplo Australia, pero sin llegar a compensar esa menor disponibilidad de semilla a nivel global. Esta situación se ha visto agravada por el aumento de la superficie cultivada con alfalfa en otros países, tales como México, Sudáfrica y –al menos hasta unos pocos años atrás– Arabia Saudita.

La creciente demanda de semilla de cultivares reconocidos que se ha observado desde mediados de la década de 1990 no constituye, por sí sola, un factor determinante para el desarrollo de una industria eficiente en aquellas áreas con elevado potencial productivo. El país ofrece posibilidades muy variables, condicionadas no solo por el suelo y el clima, sino también por muchos otros factores: la polinización, el manejo del cultivo, las prácticas de cosecha, la disponibilidad y el manejo del agua de riego,

la carencia o no de infraestructura adecuada, etc. (Cragnaz, 1990). En la Figura 1 se identifican las áreas productoras de semilla en el país, indicando en cada una el potencial productivo que podría esperarse.

Cuando se considera el país en forma global, el valor promedio de 150 kg ha<sup>-1</sup> indica que los rendimientos reales difieren considerablemente de los potenciales, con los rindes más altos en zonas áridas bajo riego y con escasas precipitaciones estivales. Si se observa cada provincia en particular, y con más detalle zonas determinadas dentro de algunas de ellas, es posible encontrar áreas de producción que se destacan por su mayor potencial (Marble *et al.*, 1986): más de 500 kg ha<sup>-1</sup> en Catamarca (Amorena, 1993), San Juan (Echeverría, 1993a; Echeverría, 1993b), Santiago del Estero, Salta y La Rioja (Ochoa, 1980); y alrededor de 400 kg ha<sup>-1</sup> en Mendoza, Choele Choel y el Valle Inferior del Río Colorado (Marble *et al.*, 1986). En San Juan, por ejemplo, ha sido posible obtener rendimientos de 1.000 kg ha<sup>-1</sup> a nivel de producciones comerciales, y donde rendimientos de 500 kg ha<sup>-1</sup> son relativamente fáciles de conseguir si se siguen ciertas pautas de manejo y se aplica la tecnología disponible. No obstante, los rendimientos promedio de la provincia no superan los 220 kg ha<sup>-1</sup> (Echeverría, 1993b; Echeverría y Cerezo, 1990).

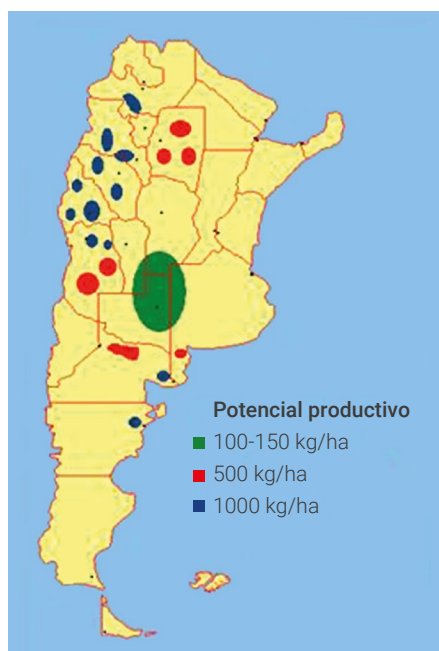


Figura 1. Ubicación y rendimientos potenciales de las áreas productoras de semilla de alfalfa en Argentina.

Las diferencias significativas entre los rendimientos potenciales y los reales se pueden explicar por el mal manejo de muchos de los factores que afectan a la producción de semilla. Exceptuando las condiciones climáticas, el productor de semilla puede controlar, en gran medida, muchos de los factores biofísicos (biológicos y de manejo) y socioeconómicos. Entre los factores biofísicos, pueden citarse como ejemplos la elección de la variedad –que debe ser reconocida y de buena aptitud semillera–, un adecuado control de malezas e insectos perjudiciales, la disponibilidad y el manejo de polinizadores [abejas melíferas o megachiles (*Megachile rotundata*) o polinizadores naturales], oportuna realización de las labores culturales, la utilización de maquinaria apropiada y el manejo adecuado del suelo y del riego. Entre los factores socioeconómicos, pueden incluirse la falta de conocimientos en el manejo ideal del cultivo, la ausencia de “tradición y mentalidad” semillera en este tipo de cultivos, la no disponibilidad de insumos (herbicidas, insecticidas, etc.) y de maquinaria apropiada en los momentos precisos, la falta de definición acerca del sistema apropiado de multiplicación más conveniente a cada realidad, la inestabilidad en la oferta de semilla, etc. La consideración de estos factores debe ser de relevancia para obtener un significativo aumento en los rendimientos actuales (Echeverría, 1993b).

Para muchos de los factores arriba mencionados, el país ya cuenta con suficiente información y experiencia sobre su empleo exitoso a nivel de productor. Para otros, si bien se dispone de información calificada sobre su uso, aún no se ha logrado una difusión masiva. Tal es el caso de la polinización con megachiles, donde el alto costo de implementación y el requerimiento de un manejo especializado han dificultado su adopción por parte de los productores. Para solucionar esto, una empresa privada ofrece el servicio de polinización con este insecto en el Valle Inferior del Río Colorado. No obstante, su utilización en el país se ha visto dificultada en los últimos años porque –al tratarse de una especie exótica– su importación desde EE. UU. y Canadá ha sido prohibida por los organismos nacionales competentes ante el eventual impacto ambiental que podría ocasionar su introducción.

El estudio del comportamiento de *M. rotundata* y su uso en la producción de semilla de alfalfa comenzaron en el país en 1975, a través del



Proyecto FAO-INTA 75/006. En la década de 1980, CORFO Río Colorado (Corporación de Fomento del Valle Bonaerense del Río Colorado), con asiento en Pedro Luro (Bs. As.), apoyó el programa “Manejo de Megachiles” e introdujo al país una importante cantidad de celdas de esta abeja. Posteriormente, en la década de 1990, algunas cooperativas y semilleros privados, interesados por los altos rendimientos obtenidos con el uso de este polinizador, y a través del INTA y de otros organismos nacionales, importaron millones de celdas para ser utilizadas no solo en la zona de CORFO, sino también en Tinogasta (Catamarca); Mendoza; 25 de Mayo (La Pampa); General Conesa (Río Negro) y Salta. En aquel entonces, para la importación de estos insectos bastaba con un certificado oficial de inspección sanitaria del país de origen (mayoritariamente Canadá), que era oportunamente solicitado por la empresa proveedora de esos materiales. Algunos años después, se hizo intervenir al IMYZA-INTA en Castelar para constatar, mediante una cuarentena, el estado del material introducido.

Es importante señalar que la especie *M. rotundata* no solo se ha naturalizado en Argentina, sino que también existen especies autóctonas del género *Megachile* en distintas zonas del país. En consecuencia, es válido inferir que los enemigos naturales más comunes –entre los que se cuentan parásitos, enfermedades y predadores– ya están presentes en los hábitats naturales o en las áreas de uso comercial de estas abejas. A lo largo de todos estos años de uso de megachiles, si bien carentes del necesario rigor científico, no se han determinado posibles daños ambientales motivados por el uso de este insecto ni tampoco se han observado impactos negativos evidentes en fauna y flora de distintas regiones. Tampoco se han registrado comentarios adversos respecto a competencia de los megachiles con la industria apícola. Utilizando esta información empírica, se está tratando de que la prohibición que pesa sobre la importación de *M. rotundata* sea revisada, a fin de favorecer la producción nacional de semilla de alfalfa. Esta medida también podría contribuir a disminuir la deriva de polen desde alfalfas transgénicas, habida cuenta del significativamente menor radio de vuelo del megachile comparado con el de la abeja melífera.

## Requerimientos climáticos

El clima determina la distribución exitosa de la producción comercial de semilla de alfalfa en las diferentes regiones del mundo y es el factor más importante para definir la potencialidad de rendimiento de una zona (Dell' Agostino *et al.*, 1987; Marble *et al.*, 1986). En ese sentido, mientras que la disponibilidad de riego y de un verano seco, con días calurosos y soleados inciden positivamente en la producción de semilla, las precipitaciones estivales la reducen seriamente (Rincker *et al.*, 1987). Las condiciones climáticas que favorecen la producción de semilla son:

- a) un período de crecimiento de por lo menos 150 días;
- b) temperaturas promedio de 24-25 °C durante el día y más de 18 °C en la noche a lo largo del período de floración;
- c) aire relativamente seco (< 50 % de HR), tanto en el día como en la noche, durante el momento de floración;
- d) alta heliofanía y ausencia de vientos fuertes durante la floración, con un mínimo de días nublados y frescos;
- e) días largos, con un mínimo de 14 horas de luz; y
- f) una distribución de lluvias o riegos que provea de la adecuada humedad al suelo para promover un crecimiento vegetativo temprano y una reducción gradual de la humedad edáfica a partir del momento de la floración.

Estas características rigen la producción en regiones áridas y semiáridas, donde se alcanzan los rendimientos promedio más altos y se concentra la producción comercial de semilla de alfalfa en el mundo (Marble *et al.*, 1986). En zonas con alta humedad atmosférica y lluvias frecuentes en los períodos de maduración y cosecha, se obtienen rendimientos bajos, del orden de 50 a 150 kg ha<sup>-1</sup>. En climas áridos, donde se puede controlar el riego, la producción puede llegar a 1.000 kg ha<sup>-1</sup> o aun más. En zonas semiáridas, con lluvias en la época de cosecha, los rendimientos son significativamente más bajos (Echeverría, 1993a; Marble *et al.*, 1986). Es importante mencionar que una lluvia de tan solo 5 mm puede provocar pérdidas de semilla por dehiscencia de vainas, mientras que lluvias de 10 a 20 mm pueden producir pérdidas impor-

tantes, de hasta 75 %, si la semilla está seca y lista para ser cosechada (Marble, 1987; Marble, 1980).

Si bien la alfalfa es una especie de día largo, no es completamente sensible al fotoperíodo, existiendo considerables diferencias entre genotipos. La respuesta a la longitud del día también está influenciada por la radiación y la temperatura (Fick *et al.*, 1988). En líneas generales, la formación de flores es favorecida por un mínimo de 12 horas de luz, con alta intensidad luminosa y temperaturas mínimas por encima de 20 °C (Fick *et al.*, 1988; Hacquet, 1986; Mable *et al.*, 1986). La duración del día afecta el número de días entre floraciones sucesivas, decreciendo de 38 a 28 y de 28 a 24 días con un incremento de la duración de luz de 12 a 14 y de 14 a 16 horas, respectivamente (Marble *et al.*, 1986). La luz y la temperatura condicionan no solo el desarrollo de las inflorescencias y la fertilidad del polen y de los óvulos, sino también la actividad de los polinizadores, la fecundación, el desarrollo embrionario y el crecimiento y la maduración de las vainas (Hacquet, 1986). Hely y Zorin (1977) observaron que en algunos genotipos el aumento de temperatura y la disminución de la humedad relativa incrementaban el desenlace floral. Además, las altas temperaturas durante la formación de la semilla aumentan la proporción de semillas duras y podrían afectar también su vigor (Fick *et al.*, 1988). Situaciones climáticas extremas, como por ejemplo el viento zonda en San Juan y Mendoza, pueden afectar los procesos de floración.

Se debe tener en cuenta que si el ambiente favorece el crecimiento vegetativo, de manera que no se alcancen las condiciones para la iniciación del proceso reproductivo, tanto la formación de flores como la producción de semilla se verán reducidas. En condiciones de campo, las plantas de alfalfa no se transforman de completamente vegetativas en completamente reproductivas, sino que ambos estados se desarrollan en forma conjunta (Marble *et al.*, 1986).

## Requerimientos de suelo

La alfalfa tiene una considerable tolerancia a la sequía, a la salinidad y al frío, adaptándose a un amplio rango de condiciones climáticas (Mar-

ble *et al.*, 1986). No obstante, para alcanzar un óptimo de producción requiere suelos bien drenados, con bajo contenido de álcalis y sales solubles, y de una profundidad de más de 1 m. La falta de drenaje y el exceso de humedad en el suelo son considerados factores adversos para la producción de semilla, por favorecer un excesivo desarrollo vegetativo y producir muerte de plantas por asfixia radicular y por desarrollo de enfermedades de raíz (Cabral *et al.*, 1985).

La salinidad es un problema en muchas de las áreas productoras de semilla bajo riego. La alfalfa es considerada como moderadamente tolerante a la concentración de sales en el suelo en sus primeros estados, aumentando su resistencia a los cloruros a medida que completa su desarrollo (Smith *et al.*, 1982).

Por su mejor capacidad de retención de agua, son preferibles los suelos arcillosos, arcillo-limosos o franco-arcillo-limosos a los arenosos. Se deben evitar suelos extremadamente arenosos, gravillosos y los que poseen una capa arcillosa endurecida a poca profundidad (Marble, 1987; Marble *et al.*, 1986). Una textura uniforme en todo el perfil permitirá asegurar una retención equilibrada de humedad, lo que favorece un activo crecimiento de las plantas durante un largo período y un secado rápido y uniforme antes de la cosecha (Marble, 1987; Marble *et al.*, 1986; Rincker *et al.*, 1988).

La producción de semilla en suelos escasamente irrigados puede tener éxito si estos están bien aireados y tienen por lo menos 1 m de profundidad, si la napa freática no es fluctuante, y si se presta especial cuidado en incrementar la eficiencia de las prácticas de riego y manejo (Marble, 1987; Marble *et al.*, 1986; Rincker *et al.*, 1988). En San Juan se obtuvieron rendimientos de 1.100 kg ha<sup>-1</sup> en suelos franco-arenosos, bien drenados y con una napa freática estable a una profundidad de 1,80 a 2,00 m. En esos casos, una vez establecido el cultivo, son suficientes 4 a 5 riegos en el año de implantación, sin requerimientos adicionales durante el ciclo, dado que las raíces extraen sus requerimientos de agua de la napa. Brase (1987) también ha descrito experiencias exitosas de producción de semilla en California, en suelos con napa freática a 1,80 m y con manejo del riego y del cultivo muy cuidadosos.

Aunque generalmente con rendimientos menores que en áreas bajo riego, la producción de semilla también puede hacerse bajo condiciones

de secano, en suelos profundos ( $\geq 2$  m), que presenten una alta capacidad de retención de humedad y en áreas con precipitaciones anuales por encima de los 300-380 mm (Marble, 1980; Marble *et al.*, 1986; Rinker *et al.*, 1988).

## Establecimiento del cultivo

### *Elección y preparación del suelo*

El primer criterio para la elección del lote para sembrar se basa en las características edáficas, que –en la medida de lo posible– deben aproximarse al ideal descrito en la sección anterior. Deben descartarse aquellos lotes que presenten serios problemas de suelo. En segundo lugar, debe considerarse la presencia de malezas problemáticas, como la cuscuta (*Cuscuta* sp.), el gramón (*Cynodon dactylon* L.), el pasto puna (*Stipa brachychaeta* G.), el sorgo de Alepo (*Sorghum halepense* L.), la enredadera (*Polygonum convolvulus* L.), el trébol de olor (*Melilotus* sp.), etc. La presencia importante de alguna de las malezas mencionadas, como la cuscuta, debería ser motivo suficiente para buscar otro lote. Otras malezas pueden ser perfectamente controladas antes de la siembra, como es el caso del sorgo de Alepo.

Por un lado, el concepto del aislamiento, definido como la distancia o separación de cultivos contiguos de alfalfa, es otro factor importante para considerar en la elección de un lote, debiendo armonizarse con los multiplicadores vecinos a fin de evitar problemas de contaminación. Este aspecto es contemplado, con más detalle, en la sección Normas de Fiscalización para la Producción de Semilla de Alfalfa de este mismo capítulo. Por otro lado, la desregulación en el país de variedades transgénicas de alfalfa en 2018 plantea la necesidad de establecer mayores distancias de aislamiento, en función del tipo de polinizador predominante en los lotes, a fin de evitar la presencia indeseada de estos eventos –a través de la deriva génica ocasionada por polen– en lotes de semillas convencionales o “no OGM” (organismos genéticamente modificados), como comúnmente se las denomina.

Las prácticas de preparación de suelo no solo deben ofrecer una cama de siembra fina y firme, sino que deben hacerse con la suficiente antelación

para posibilitar un barbecho apropiado. Las capas duras que pudieren existir (pisos de arado, horizontes densificados, etc.) deben destruirse con labores profundas antes de iniciar la preparación definitiva.

En áreas bajo riego, la adecuada sistematización del lote es de enorme relevancia. Una pendiente de alrededor de 0,2-0,52 % facilitará la uniforme distribución del agua e impedirá el encharcamiento. La pendiente debe definirse en función del relieve, la textura y profundidad del suelo y la longitud de la unidad de riego. Riegos con 0 % de pendiente pueden dificultar la aplicación de una lámina baja a intervalos cortos o favorecer el encharcamiento en suelos pesados.

### *Época de siembra*

En la mayoría de las zonas aptas para la producción de semilla, la época de siembra apropiada es el otoño: fines de febrero-principios de abril en el Valle Inferior del Río Colorado (Dell' Agostino *et al.*, 1987), mediados de marzo-fines de abril en el Valle de Tulum (San Juan) y fines de marzo-fines de mayo en Santiago del Estero (Ochoa, 1980). En las zonas de temperaturas muy bajas en el invierno, como los valles precordilleranos de San Juan y Mendoza, la siembra debe efectuarse a fines del verano o bien demorarse hasta la primavera, cuando el peligro de heladas severas haya pasado.

Un cultivo sembrado temprano en el otoño podrá producir semilla en el año de implantación, con rendimientos similares a los de años posteriores, cuando el cultivo ya esté establecido (Rincker *et al.*, 1987). Por el contrario, las siembras de primavera producirán cultivos de bajos rendimientos en el año de implantación; por ello, esta práctica se recomienda únicamente para las áreas donde las malezas de invierno ofrecen excesiva competencia, las temperaturas invernales permanecen bajo cero durante períodos prolongados o las excesivas lluvias invernales dificultan el establecimiento del cultivo (Bolton, 1956; Kolar y Torell, 1970; Kolar *et al.*, 1968; Marble, 1987; Marble, 1980).

### *Densidad de siembra*

Las dosis de semilla utilizadas en semilleros de alfalfa deben ser considerablemente más bajas que las empleadas en siembras para la

producción de forraje. Existe abundante bibliografía que demuestra la ventaja de usar bajas densidades de siembra en los cultivos destinados a la producción de semilla. En Utah se demostró la conveniencia de usar  $0,5 \text{ kg ha}^{-1}$  respecto de densidades superiores a  $13 \text{ kg ha}^{-1}$ , con distancias entre hileras de 0,20, 0,60 y 1,20 m (Orloff *et al.*, 1989). En California, las densidades varían entre  $0,3$  y  $2 \text{ kg ha}^{-1}$ , utilizando sembradoras de precisión que permiten depositar 3 a 4 semillas cada 0,15 o 0,30 m en hileras distanciadas a 0,75-1,0 m (Marble, 1976). En Washington, una adecuada densidad de plantas fue obtenida con densidades de siembra de  $0,5$  a  $1 \text{ kg ha}^{-1}$  y Rincker *et al.* (1987) señalaron que con densidades de  $0,25$  a  $0,5 \text{ kg ha}^{-1}$  se obtuvieron rendimientos por encima de  $1.000 \text{ kg ha}^{-1}$ . En nuestro país, en las zonas de riego de Cuyo y del NOA, se recomienda sembrar no más de  $1 \text{ kg ha}^{-1}$  en hileras distanciadas 0,70-1 m, dependiendo fundamentalmente del tipo de sembradora que se utilice. En el Valle Inferior del Río Colorado, la densidad de siembra aconsejada es de  $1$  a  $2 \text{ kg ha}^{-1}$  en hileras separadas a 0,50-0,75 m (Figura 2) (Dell'Agostino *et al.*, 1987; Moschetti y Dell'Agostino, 1980).

Las densidades de siembra de  $0,5$  a  $1 \text{ kg ha}^{-1}$  son suficientes para establecer entre 5 y 10 plantas cada 0,30 m de hilera, cuando las hileras están distanciadas entre sí a 0,90-1 m (Marble, 1987). Si bien la mayoría de las sembradoras comunes pueden ser modificadas para sembrar bajas densidades, es más recomendable la utilización de sembradoras de precisión (tipo Stanhay, Planet, etc.). La siembra puede hacerse con sistema de camellones (o surcos) o en plano, dependiendo la elección de cada uno de las características del suelo, del tipo de sembradora a utilizar y del sistema de riego disponible.



■ **Figura 2.** Siembra de alfalfa con sembradora de precisión.

La profundidad óptima de siembra no debe exceder los 1,5-2 cm de profundidad en suelos franco-arenosos y los 0,6-1,5 cm en suelos francos o franco-arcillosos. A profundidades de 2,5 a 3,5 cm la emergencia se reduce significativamente, y es casi nula a partir de los 5 cm (Sheesley y McClellan, 1978). La siembra profunda incrementa el número de días hasta la emergencia, lo que aumenta los riesgos de pérdida de plantas por tiempo desfavorable, invasión de malezas y planchado de suelo (Marble, 1980; Marble, 1976).

Son conocidos los beneficios aportados por una eficiente nodulación en alfalfa (Vance *et al.*, 1988), por lo que es recomendable la inoculación de la semilla con el rizobio específico (*Sinorhizobium meliloti*). Para una mayor información, se recomienda consultar el capítulo 4 de este libro. En los últimos años se ha convertido en una práctica usual que los criaderos y semilleros ofrezcan sus semillas “peleteadas” o “pildoradas”, lo que ofrece las siguientes ventajas: a) cantidad apropiada de la cepa de rizobio; b) protección contra hongos e insectos en las primeras etapas del desarrollo del cultivo; c) aporte equilibrado de nutrientes y pH para el desarrollo temprano del rizobio y la plántula; y d) protección de la semilla frente a posibles daños mecánicos durante su manipulación y siembra (Tickes y Ottman, 1991).

### *Siembras densas versus hileras distanciadas*

Los agricultores de las zonas semiáridas y de secano, que cultivan alfalfa con el doble propósito de producir forraje y semilla, utilizan principalmente el sistema de siembra al voleo y un alto número de plantas m<sup>2</sup>. Para esas condiciones, el reemplazo de la siembra al voleo por la siembra en líneas distanciadas a 0,35-0,70 m podría –en determinadas situaciones– incrementar los rendimientos y la calidad de la semilla de alfalfa (Vieyra, 1993).

La investigación y la experiencia en áreas bajo riego han demostrado que las siembras en hileras distanciadas producen mayores rendimientos de semilla que las siembras densas utilizadas para la producción de forraje (Goplen, 1976; Goplen, 1975; Hart, 1980; Jones y Pomeroy, 1962; Kolar y Torell, 1970). En diferentes zonas de EE. UU., Europa y México se han registrado incrementos de rendimiento de semilla de 120 % en



cultivos sembrados en hileras respecto de los sembrados al voleo (Marble, 1980).

La mayor producción de semilla de las siembras en líneas puede ser atribuida a diversos cambios fisiológicos y morfológicos que ocurren en la planta (Kolar y Torell, 1970). Algunos autores determinaron que los menores rendimientos de los cultivos densos se deben a la más baja producción de néctar y a la menor atracción de sus flores y a su mayor índice de abortos florales (Hagemann, 1987; Marble, 1980; Rincker *et al.*, 1988). Entre las ventajas de las siembras en hileras distanciadas se pueden mencionar las siguientes (Marble, 1987; Marble, 1976; Rincker *et al.*, 1987):

- a) plantas más abiertas y con crecimiento más erecto, que permiten a los polinizadores un mejor acceso a las flores, una mejor penetración de la luz y un aumento de la temperatura del suelo;
- b) disminución del vuelco y reducción de la humedad en la canopia de la planta, que reduce la incidencia de las enfermedades de hoja y el manchado o "ardido" de las semillas;
- c) reducción de la caída de flores y vainas;
- d) aumento de la penetración de los productos químicos para el control de malezas e insectos y del defoliante para la cosecha directa;
- e) mayor flexibilidad en el manejo de los riegos y el control de malezas; y
- f) mejor control de las plantas de resiembra natural, lo que contribuye a asegurar la identidad genética y la pureza varietal del cultivo.

### *Distancia entre hileras*

La distancia entre las hileras depende principalmente de la profundidad, textura y salinidad del suelo, de la cantidad de agua disponible, de la longitud de la estación de crecimiento, del grado de reposo invernal del cultivar, de la maquinaria disponible para la realización de los trabajos culturales entre hileras (trocha de tractor, tipo de cultivador, etc.) y de la interacción de todos estos factores que puedan afectar el tamaño de la planta.

En Prosser, Washington (EE. UU.) se obtuvieron rendimientos mayores a 1.000 kg ha<sup>-1</sup> con distancias entre hileras de 0,45, 0,56 y 0,91 m. Es

interesante notar que las menores distancias produjeron altos rendimientos en el año de implantación, pero no en los posteriores (Rincker *et al.*, 1988). En los sistemas de producción bajo riego de Catamarca, San Juan y Mendoza, las distancias entre líneas más empleadas oscilan entre 0,8 y 1 m, ya que distancias menores suelen producir problemas en el manejo de los cultivos (Figura 3). En el área de riego del Valle Inferior del Río Colorado se emplean distanciamientos de 0,50-0,75 m.

Para las condiciones de algunas regiones de EE. UU., Marble (1987) concluyó que el distanciamiento óptimo para suelos arcillo-limosos es de 0,90-1 m en áreas con períodos de crecimiento largos y de 0,70-0,80 m en áreas con períodos de crecimiento cortos; y en suelos arenosos y profundos, donde las plantas son más vigorosas y de mayor tamaño, la distancia óptima entre hileras es de 1-1,5 m.



■ **Figura 3.** Cultivo para producción de semilla en hileras distanciadas.

### *Distancia en la hilera. Raleo*

La distancia entre plantas dentro de la hilera está directamente relacionada con el tipo de máquina sembradora utilizada. Cuando no es posible una siembra de precisión, puede hacerse necesario la eliminación de plantas en la hilera para que, una vez establecido el cultivo, se provea de la densidad de plantas adecuada. Por el contrario, si se usan sembradoras de precisión, que permiten depositar de 4 a 5 semillas cada 0,20 o 0,30 m de hilera, la práctica del raleo no es necesaria. En esos casos es más común referirse a “grupos de plantas” que a “plantas individuales”.

Hay muchos trabajos que demuestran que el raleo es una práctica beneficiosa para la producción de semilla. Algunos autores mencionan

la conveniencia de contar con 17.500 a 55.000 grupos de plantas hectárea<sup>-1</sup>, siendo cada grupo de 0,15 m de largo y separado del siguiente por 0,30 m (Jones y Pomeroy, 1962; Marble, 1976; Pederson *et al.*, 1959; Rincker, 1976). Dovrat *et al.* (1969) concluyeron que los rendimientos de semilla fueron considerablemente mayores en alfalfas con una adecuada distancia entre y dentro de las hileras. Respecto de los cultivos con alta densidad en la hilera, los cultivos ralos tuvieron mayor número de tallos reproductivos, de inflorescencias tallo<sup>-1</sup> y de vainas inflorescencia<sup>-1</sup>. En experiencias realizadas en Italia, los rendimientos de semilla disminuyeron en el primer año de producción a medida que aumentó el número de semillas sembradas metro<sup>-1</sup>, lo que fue atribuido a la competencia entre plantas (Lovato y Montanari, 1987). Jones y Pomeroy (1962) demostraron que el raleo tuvo efectos positivos no solo en el año de implantación, sino también en el segundo y en el tercer año de producción. El raleo permite, en cultivos establecidos, eliminar las malezas y las plantas de resiembra que se desarrollan entre las plantas del cultivo.

El raleo en la hilera produce en la planta los mismos cambios morfológicos y fisiológicos que los señalados cuando se compararon las siembras en hileras distanciadas y las densas (Marble, 1987). En siembras densas, el raleo es aconsejable cuando las plantas tienen de 2 a 4 hojas (Marble, 1976; Sheesley, 1977), pudiendo realizarse en forma mecánica con una labranza cruzada (45° o 90°) a las líneas de siembra y utilizando un cultivador, cincel, azadón o rastra de discos; también puede realizarse en forma manual. La agresividad del raleo requerida para incrementar rendimientos dependerá de la distancia entre hileras y de los años del cultivo. Por ejemplo: si se consigue una separación variable entre coronas dentro de la hilera de 0,15 a 0,45 m, pero la distancia entre hileras es considerable, se aumentan las posibilidades de vuelco, de pérdidas de semilla por manchado, de dificultades de recolección en la cosecha y de invasión de malezas en los espacios vacíos.

### *Cultivos acompañantes*

En algunas zonas con condiciones ambientales rigurosas, la siembra de alfalfa suele hacerse en combinación con cereales de invierno como cultivos acompañantes, que además de proteger a las plántulas de la acción del viento y del frío tienen por objetivos controlar las malezas

y ofrecer un retorno económico relativamente inmediato. En cultivos especializados para la producción de semilla, tanto en áreas de secano como bajo riego, los cultivos acompañantes no se recomiendan, porque ocasionan mermas significativas en los rendimientos del primer año del cultivo y dificultan su manejo (Pederson *et al.*, 1959; Rincker *et al.*, 1987).

### Fertilización

No se conocen experiencias en el país de resultados de fertilizaciones en cultivos de alfalfa para producción de semilla. Si en el lote a implantar se detectaran deficiencias de un determinado nutriente, estas deberían corregirse antes de la siembra del cultivo.

Las aplicaciones de fertilizantes realizadas en el momento del establecimiento del cultivo en las áreas más importantes de producción de semilla de los EE. UU. y Canadá no se tradujeron en incrementos de rendimiento, excepto en los casos en que los suelos presentaban serias deficiencias nutricionales. La aplicación a la siembra de nitrógeno y fósforo, en dosis de 15 a 20 kg ha<sup>-1</sup> en cada caso, fue beneficiosa para la implantación del cultivo, pero no tuvo incidencia directa en los rendimientos de semilla (Jones y Pomeroy, 1962; Rincker *et al.*, 1987). Las aplicaciones foliares de nutrientes no produjeron incrementos en los rendimientos, con la sola excepción del boro en ciertas áreas (Rincker *et al.*, 1988).

### Riego del cultivo

La cantidad y los momentos de aplicación del riego constituyen una de las prácticas más difíciles de manejar en la producción de semilla de alfalfa. El exceso de agua causa un desmedido desarrollo vegetativo y un aumento en el vuelco de las plantas, una pobre producción de flores y un ambiente no demasiado atractivo para los polinizadores. La excesiva deficiencia de agua origina plantas con muy poco desarrollo vegetativo, pobre producción de flores y semillas muy pequeñas.

El manejo del agua de riego en las distintas áreas productoras se basa en una serie de principios fundamentales y que deben aplicarse a cada situación particular, debiendo considerarse: variabilidad de los suelos (profundidad y textura), precipitaciones, evaporación, diferentes siste-

mas de riego, cantidad y calidad del agua disponible, rotación con otros cultivos, grado de reposo del cultivar y duración del cultivo (Marble, 1976; Marble *et al.*, 1986; Rincker, 1979; Rincker *et al.*, 1987; Sheesley, 1977; Tysdal, 1946). Una producción exitosa de semilla estará dada por la forma en que cada una de estas variables interacciona dentro del sistema de manejo; no obstante, esas interacciones solo son válidas y aplicables para una situación específica y para un determinado productor. La diversidad de ambientes y de suelos presentes en el país hace casi imposible establecer un esquema de riego de aplicación general.

En la mayoría de las áreas de riego de la Argentina, la distribución del agua de riego es superficial, por surco o inundación. En ese contexto, la adecuada sistematización del suelo adquiere una gran relevancia y el diseño de un apropiado sistema de riego debe ser una de las primeras consideraciones para tener en cuenta una vez elegido el lote. Una mala sistematización del riego no puede ser compensada por otras prácticas de manejo. Si se tiene una correcta sistematización del terreno, el uso de sifones portátiles de PVC permite uniformizar el caudal de agua a aplicar en cada surco de riego (Figura 4).



■ **Figura 4.** Cultivo para producción de semilla en hileras distanciadas.

En Argentina no se utiliza el riego por aspersión para semilleros de alfalfa. Cultivos realizados en San Juan utilizando este sistema de riego no lograron los rendimientos esperados, con dificultades en el manejo del riego, asociado a las características particulares de los suelos y al estado fenológico del cultivo.

Experiencias realizadas en el Valle Imperial de California demostraron que el riego por aspersión influyó negativamente sobre los rendimien-

tos, debido probablemente a un efecto adverso sobre las abejas y la polinización. No obstante, podría ser una alternativa válida para suelos arenosos y con aplicaciones nocturnas en momentos críticos del cultivo (Hagemann, 1987; Rincker *et al.*, 1988). En Idaho, Oregon y Washington es utilizado con éxito por los productores de semilla de alfalfa. Experiencias similares se han observado en Australia, en los estados de South Australia y Victoria.

En los últimos años se ha empleado con éxito en nuestro país otra tecnología de riego presurizado: el riego por goteo, con el que se han obtenido rendimientos de hasta 1.200 kg ha<sup>-1</sup> en producciones comerciales de San Juan (Figura 5). Es importante considerar este sistema para situaciones donde la disponibilidad de agua para regadío es cada vez más escasa y más costosa.



■ **Figura 5.** Germinación de la alfalfa en un sistema de riego por goteo.

Respecto de los otros sistemas, el riego por goteo ofrece las siguientes ventajas:

- alta eficiencia de uso (se aplica directamente a la zona radicular) y distribución uniforme del agua;
- menor incidencia de malezas;
- mayor eficiencia y facilidad de aplicación de herbicidas, insecticidas y fertilizantes, que se inyectan directamente a través del sistema;
- considerable disminución del número de labores culturales entre hileras;
- incorporación de lotes marginales (problemas de infiltración, salinidad, etc.);
- no requiere trabajos de sistematización; y
- menores requerimientos de mano de obra.

Por un lado, estas ventajas son de consideración cuando el objetivo es cultivar superficies importantes y obtener una alta producción de semilla de excelente calidad. No obstante, su principal inconveniente es el alto costo inicial de equipos y de instalación, cosa que, por otro lado, puede verse atenuada por los altos rendimientos de semilla que produce y por la disminución o eliminación de otros costos (sistematización del terreno, mano de obra, pulverizaciones, etc.) (Figura 6). De cualquier modo, por tratarse de una tecnología nueva para la producción de semilla de alfalfa en nuestro país, se debe todavía generar la información necesaria que permita adecuar su uso a los requerimientos de cada situación.



■ **Figura 6.** Cultivo establecido con riego por goteo.

## Manejo del riego

Cualquiera sea el sistema de riego empleado, es fundamental que durante el establecimiento del cultivo se controle frecuentemente la humedad del suelo, cuidando de manera especial que las raicillas estén en permanente contacto con suelo húmedo. Contrariamente a lo que muchos productores efectúan, no es apropiado dejar que las plantas en sus primeros estadios sufran deficiencias de humedad. Durante la implantación, es aconsejable la realización de riegos cortos y frecuentes, a efectos de mantener un buen nivel de humedad en el área de exploración de las raíces y reponer solamente la humedad del suelo perdida por evaporación y transpiración. Las lluvias o los riegos de presiembra



realizados para mojar el perfil del suelo favorecen el desarrollo y establecimiento del cultivo.

Los mayores rendimientos de semilla se logran empleando prácticas de riego que tiendan a promover un crecimiento lento y continuo, sin estimular excesivamente el desarrollo vegetativo y evitando el estrés severo de humedad. La estimulación excesiva del desarrollo vegetativo afecta directamente los rendimientos de semilla, aumentando el vuelco y provocando un retardo y una disminución en la producción de flores. Una vegetación densa y tendida favorece la acción de insectos perjudiciales, al mismo tiempo que reduce la producción de flores, afecta el desarrollo de vainas y semillas y estimula el rebrote vegetativo (Goplen y Sonmor, 1976; Marble, 1980; Sheaffer *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 1959). El exceso de humedad reduce el contenido de azúcar en el néctar de las flores y las hace menos atractivas para los polinizadores (Hagemann, 1987; Marble, 1980).

Durante el año de implantación, la demanda de agua del cultivo es de aproximadamente 900 mm en todo el ciclo, incluyendo la humedad almacenada en el suelo durante el ciclo precedente y la proveniente de los riegos de presembrado. Los cultivos establecidos, como norma general, deben recibir entre 1.100 y 1.200 mm de agua  $\text{ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ , ya sea en forma de riego o de lluvias (Marble, 1980; Marble *et al.*, 1986; Yamada *et al.*, 1973). Los riegos combinados de otoño, invierno y principios de primavera deben mojar el perfil del suelo hasta los 3 o 4 m de profundidad y proveer del 50 al 60 % de las exigencias totales del cultivo en suelos profundos y de textura mediana a pesada. Durante la temporada de desarrollo del cultivo, desde mediados de primavera a fines de verano, deberá cubrirse el resto de los requerimientos de acuerdo a las necesidades, tratando de promover un crecimiento lento y constante y evitando un estrés severo de humedad. Un drenaje apropiado es esencial para evitar las enfermedades de raíz (Laemmlen, 1987) y un excesivo crecimiento vegetativo (Marble, 1980). Las plantas de alfalfa pueden llegar a morir después de estar en suelos saturados de humedad por más de 24 horas (Erwin y Lehman, 1974).

En suelos arenosos o pocos profundos, con poca capacidad de retención de agua, el concepto de acumular humedad en el perfil carece de validez. Por lo tanto, la realización de riegos regulares durante todo el



ciclo del cultivo, incluyendo la floración, adquiere gran relevancia. La finalidad de esos riegos frecuentes es proveer el agua necesaria para satisfacer los requerimientos del cultivo en al menos los primeros 0,60 m de profundidad (Krogman y Hobbs, 1977). En Australia, Taylor y Marble (1986) obtuvieron rendimientos de 1.105 kg ha<sup>-1</sup> en suelos poco profundos cuando el cultivo fue regado cada vez que la evapotranspiración acumulada entre riegos alcanzaba los 75 mm. Los rendimientos disminuyeron a 528 kg ha<sup>-1</sup> cuando el intervalo entre riegos aumentó y se redujo la cantidad de agua aplicada a una evapotranspiración acumulada de 300 mm al momento de floración.

Henderson y Yamada (1979) determinaron que las producciones de forraje y de semilla estaban directamente relacionadas y que un moderado estrés no era beneficioso para la producción de semilla, ya que las plantas no sujetas a estrés presentaban más inflorescencias y más flores y, en consecuencia, más semilla. Taylor *et al.* (1959), en Utah, demostraron que los riegos en floración reducían los rendimientos. En Fresno, California, se evidenció que los riegos durante la floración tenían un efecto negativo sobre la frecuencia de visitas de los polinizadores a las flores por un período de 3 a 6 días posteriores a la aplicación (Marble, 1987; Sheesley, 1987). Contrariamente, experiencias realizadas en Argentina, Australia, Canadá e Israel concluyeron que los riegos moderados durante la floración incrementaban los rendimientos de semilla (Castro *et al.*, 1990; Goldman y Dovrat, 1980; Sheaffer *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 1959).

En California se han obtenido rendimientos de 1.050 kg ha<sup>-1</sup> con riegos por surco cada 7 días durante el período de crecimiento vegetativo de las plantas. Posteriormente, se emplearon intervalos más largos y un riego inmediatamente después de iniciada la floración, a fin de prevenir el marchitamiento y facilitar el llenado de la semilla (Hagemann *et al.*, 1978; Taylor *et al.*, 1959).

Algunos investigadores recomiendan el uso de tensiómetros para determinar el momento del riego (Hagemann, 1987; Hagemann *et al.*, 1975; Taylor *et al.*, 1959), mientras que otros se basan en datos recogidos en tanques de evaporación para estimar el agua perdida y decidir así los momentos de riego (Rincker *et al.*, 1988). Los productores experimentados se guían por el color de la planta para determinar la necesidad de agua en el cultivo. La alfalfa con deficiencias de humedad adquiere

una tonalidad verde-azulada, que se torna más evidente durante el alba que en cualquier otro momento del día; en esta modalidad, el momento del riego es aquel en que los 10-12 cm del centro de cada hilera permanecen verdes y lozanos, mientras el resto de las plantas aparece de tono azulado (Marble, 1980). Con conocimientos básicos del tipo de suelo, el clima y la información del agua consumida por el cultivo, un productor podría fácilmente aplicar un esquema de riego más científico y ser capaz de anticiparse a las demandas del cultivo. Se han desarrollado programas de simulación computarizados que permiten definir calendarios de riego para muchos cultivos, incluyendo la alfalfa para producción de forraje; lamentablemente no hay aún disponibles para producción de semilla.

Independientemente del sistema que se utilice para definir los calendarios de riego, la premisa fundamental debe ser evitar las deficiencias hídricas severas (estrés). No obstante, existen interpretaciones diferentes de este concepto, que se reflejan en el manejo de los cultivos. Suele definirse erróneamente al estrés hídrico como la posibilidad que tienen las plantas de poder marchitarse, mostrar una cierta flacidez y permanecer así por largos períodos. No obstante, para diferenciar un estrés suave de uno severo se requiere experiencia. Un estrés severo y prolongado puede detener el crecimiento de los tallos, impedir la formación de nuevos tallos y provocar la caída de hojas y flores. Por el contrario, un estrés suave, apenas perceptible, induce a la producción de flores con mayor concentración de azúcares en el néctar, lo que –al hacerlas más atractivas para los polinizadores– permite lograr mayores rendimientos de semilla (Fick *et al.*, 1988; Marble *et al.*, 1986).

## Control de malezas

El control de malezas en todo semillero de alfalfa debe ser permanente, desde antes del establecimiento del cultivo hasta el proceso final de limpieza y clasificación de la semilla. La presencia de malezas constituye un factor condicionante del cultivo afectando directamente su rendimiento. Su efecto adverso se manifiesta en la reducción o pérdida de plantas de alfalfa, principalmente en los primeros estadios de desarrollo del cultivo;

en la competencia por luz, agua y nutrientes; en la interferencia sobre la labor de los polinizadores; en la dificultad para las prácticas de cosecha; y en el aumento de los costos de producción y del trabajo y las pérdidas durante el procesamiento de la semilla (Dawson y Rincker, 1982; Dell' Agostino, 1990; Dell' Agostino *et al.*, 1987; Fisher, 1977; Goplen, 1975). En cultivos ya establecidos e incluidos dentro de un programa de certificación, las plantas de alfalfa de resiembra o "voluntarias" también deben considerarse malezas y, como tales, deben ser controladas.

Es más sencillo y económico eliminar las malezas en el lote que hacerlo luego durante el procesamiento de la semilla cosechada. Si se permite a las malezas madurar y ser cosechadas junto con la alfalfa, indefectiblemente deberán ser eliminadas en el proceso de limpieza, lo que no solo aumenta los costos, sino que produce mermas de rendimiento.

Las semillas de malezas más difíciles de separar de la semilla de alfalfa son las de sorgo de Alepo, rúcula (*Eruca sativa* G.), yuyo colorado (*Amaranthus* sp.), roseta (*Cenchrus* sp.), lengua de vaca (*Rumex crispus* L.), cuscuta, porotillo (*Hoffmanseggia falcaria*) y tréboles de olor. La separación de muchas de ellas requiere el uso de máquinas adicionales a las comunes, incrementando los costos de limpieza y la pérdida de semilla apta de alfalfa, que puede llegar al 11 % (Rincker *et al.*, 1988).

Los problemas de malezas, que aparecen en diferentes etapas del cultivo, deben solucionarse con un manejo racional que combine medidas de prevención y métodos de control tanto culturales como mecánicos y químicos.

### *Medidas de prevención*

Dado que las malezas bien establecidas son difíciles de controlar, la mejor estrategia de manejo es anticiparse y prevenir los problemas que puedan ocasionar. En ese sentido, los factores para tener en cuenta son:

- Elección apropiada del lote: en campos infestados con malezas perennes, como sorgo de Alepo, gramón, cebollín (*Cyperus rotundus* L.), pasto puna, flor amarilla (*Diplotaxis tenuifolia* L.), sanguinaria (*Polygonum aviculare* L.) y yuyo sapo (*Wedelia glauca* H.), el control es más eficiente y económico si se realiza antes de la siembra. En

lo posible, deben descartarse los lotes infestados con malezas problema, como la cuscuta (Fisher, 1977).

- Preparación adecuada del terreno y de la cama de siembra: la germinación rápida y uniforme de la semilla será estimulada por una cama de siembra bien preparada. Las labores anticipadas, realizadas criteriosamente, limpian al suelo de malezas y evitan interferencias en la implantación del cultivo (Rainero *et al.*, 1993). Un terreno bien nivelado y con un buen lecho de siembra es esencial para una distribución uniforme y eficiente del agua de riego, lo que aumenta y prolonga la acción de los herbicidas selectivos y facilita el uso apropiado de los implementos de labranza (Fisher, 1980; Fisher, 1977).
- Elección correcta de la fecha de siembra: los lotes sembrados muy tarde en el verano pueden ser infestados por malezas estivales, mientras que los sembrados muy tarde en el otoño germinarán y crecerán más lentamente, permitiendo que las malezas de invierno desarrollen antes que el lote esté en condiciones de ser tratado con herbicidas. Una fecha apropiada de siembra favorecerá una implantación y un crecimiento competitivo a la invasión de malezas.
- Mantenimiento de la limpieza: el control de malezas debe efectuarse no solo en el lote de alfalfa, sino también en sus alrededores, incluyendo los canales y las acequias de riego. Todos los equipos de labranza y cosecha deben limpiarse cuidadosamente después de finalizar los trabajos a fin de prevenir la diseminación de semillas u otras partes vegetativas a otros lotes.

### *Control cultural*

La competencia que ejerce un cultivo sano y vigoroso puede minimizar el efecto de las malezas, y hasta prevenir la germinación de sus semillas. Por un lado, en ese contexto, todas aquellas prácticas de manejo que tiendan a promover el crecimiento de la alfalfa, incluyendo el control efectivo de insectos dañinos y la menor incidencia de enfermedades, pueden contribuir a controlar las malezas. Por otro lado, una efectiva implementación de los riegos favorece la acción de muchos herbicidas.

### Control mecánico

La eliminación de las malezas por medios mecánicos suele ser un método de control económico. El cultivo en hileras distanciadas facilita la utilización de diferentes implementos, tales como rastra de discos, escardillo, carpidores, cultivadores rotativos, vibro cultivadores, etc. (Figura 7). La labor entre hileras se realiza las veces que sea necesario, dejando sin cultivar una franja de 0,15 m a cada lado de la planta. Para decidir el momento y la frecuencia de las labores mecánicas, debe tenerse en cuenta el desarrollo de las plantas y el daño por pisoteo que se ocasiona al cultivo, que en algunos casos puede ser de consideración. Es conveniente que el tractor esté provisto de rodados angostos, para evitar el excesivo pisoteo de tallos y la compactación del suelo.



Figura 7. Control mecánico de malezas.

El cultivado mecánico entre hileras no solo es útil para el control de malezas anuales, sino también para la eliminación de plantas de alfalfa de resiembra y para el mejoramiento de la infiltración del agua de riego en el perfil. En cultivos establecidos, y cuando la alfalfa está en estado de reposo invernal, el pasaje de rastras cruzadas ( $45^\circ$  o  $90^\circ$  respecto de las hileras) permite un muy buen control de malezas y de plántulas de resiembra.

El control manual de malezas es una práctica que no puede ignorarse, especialmente durante el año de implantación del cultivo. Tanto la falta de herbicidas selectivos en alfalfa para controlar trébol de olor como la similitud existente entre las semillas de ambas especies, hacen que las plantas de esta maleza, en la hilera, deban eliminarse manualmente.

En casos extremos, la realización de un corte es otra práctica que puede utilizarse en el control de malezas. El quemado de residuos de cosecha

proporciona cierto control en malezas de hoja ancha y una reducción en el número de semillas de malezas en el suelo.

### Control químico

El empleo de herbicidas selectivos permite un control efectivo y prolongado, tanto en la implantación como en cultivos establecidos. El uso efectivo de un importante número de herbicidas, que difieren ampliamente en su acción y en sus métodos de aplicación, exige mayores grados de planificación y de conocimiento que los requeridos para la implementación de labores mecánicas. La textura y humedad del suelo, el contenido de materia orgánica y las especies de malezas presentes influirán en la elección de los productos y dosis a usar.

Recomendaciones específicas sobre los productos y dosis para usar se presentan en varios trabajos citados en la bibliografía de este capítulo (Burril *et al.*, 1988; Dell' Agostino, 1990; Fisher, 1980; Fisher, 1977; Raineiro *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 2007).

### Control químico en el establecimiento

Antes de la siembra, y en camas ya preparadas, la aplicación de paraquat (500 a 750 g i.a. ha<sup>-1</sup>) [i.a.= ingrediente activo] permite controlar malezas de hoja ancha en estado de plántula y gramíneas anuales (Fisher, 1977). La trifluralina (550 a 900 g i.a ha<sup>-1</sup>), aplicada en presiembra e incorporada con rastra de discos, vibrocultivador o riego, ha sido eficaz en el control de malezas como pasto puna, capiquí (*Stellaria media* L.), sanguinaria, enredadera, quinoa (*Chenopodium album* L.), cardo ruso (*Salsola kali* L.), raigrás anual (*Lolium* sp.), avena negra (*Avena fatua*) y cebadillas (*Bromus* sp.); no obstante, en algunas circunstancias, se ha observado algún grado de fitotoxicidad en la alfalfa. El methazole (1.500 a 1.800 g i.a. ha<sup>-1</sup>), aplicado inmediatamente después de la siembra, pero antes de la emergencia de la alfalfa y de las malezas, realiza un buen control de latifoliadas otoño-invernales (Burril *et al.*, 1988; Dell' Agostino, 1990). También el flumetsulam (50 a 70 g i.a. ha<sup>-1</sup>), aplicado en preemergencia, es un herbicida selectivo eficaz para el control de malezas de hoja ancha. Es importante mencionar que el uso del riego

por surco puede disminuir considerablemente la eficiencia de los herbicidas preemergentes (Fisher, 1977).

La acción de los herbicidas indicados previamente puede ser complementada con otros productos aplicados en posemergencia. Entre estos, puede mencionarse al 2,4-DB (750 a 1.000 g i.a. ha<sup>-1</sup>), que resulta eficaz para el control de malezas latifoliadas que escapan a la acción de trifluralina o EPTC, como las crucíferas, los cardos (*Carduus* sp.), la quinoa, el yuyo colorado, la morenita (*Kochia scoparia* S.) y el cardo ruso. Otros herbicidas, como el bromoxinil (350 a 550 g i.a. ha<sup>-1</sup>), el flumetsulam (35 g i.a. ha<sup>-1</sup>) y el bentazón (300 a 500 g i.a. ha<sup>-1</sup>) controlan especies de hoja ancha y normalmente se aplican en combinación con 2,4-DB para controlar malezas poco sensibles o resistentes a este último, como el apio cimarrón (*Ammis majus* L.), la ortiga mansa (*Lamium amplexicaule* L.), la manzanilla (*Anthemis cotula* L.) y la bowlesia (*Bowlesia incana* R.), etc. (Dell' Agostino, 1990; Rainero et al., 1993).

Para el control de gramíneas anuales y perennes se cuenta con un número importante de herbicidas selectivos: *clatodim*, *fenoxaprop-p-etil*, *fluazifop-p-butil*, *haloxifop-metil*, *quizalofop-etil*, *quizalofop-p-etil* y *setoxidim* (Cragnez, 1990; Rainero et al., 1993).

### *Control de malezas en cultivos establecidos*

En cultivos de más de un año de implantación y con la alfalfa en reposo invernal, generalmente el laboreo mecánico provee un buen control de malezas. Sin embargo, junto con el rebrote y el desarrollo del cultivo, suele comenzar una notable emergencia de malezas. Las principales malezas de aparición primavera-verano que invaden los semilleros en esta etapa son, entre otras, quinoa, morenita, cardo ruso, yuyo colorado, roseta (*Cenchrus* sp.), pasto cuaresma (*Digitaria sanguinalis* L.) y capín (*Echinochloa crusgalli* L.).

Varios productos no recomendados en cultivos de primer año pueden emplearse en lotes ya establecidos durante el reposo invernal o a la finalización del invierno (Figura 8). Pueden aplicarse inmediatamente después de efectuada una labor mecánica y en posemergencia de las malezas. Diurón (2,0-2,4 kg i.a. ha<sup>-1</sup>), terbacil (800 a 1.000 g i.a. ha<sup>-1</sup>) y metribuzín (550 a 750 g i.a. ha<sup>-1</sup>) pueden realizar un buen control de

malezas de hoja ancha; además, como ventajas adicionales, poseen un adecuado poder residual y son capaces de cierto nivel de control de plántulas de resiembra (Burril *et al.*, 1988; Dell' Agostino, 1990). La propizamida (1 a 2 kg i.a. ha<sup>-1</sup>) fue efectiva cuando se aplicó en preemergencia o posemgerencia temprana y con muy buena humedad de suelo, controlando especies anuales de gramíneas y algunas latifoliadas (Burril *et al.*, 1988).

Los sistemas de control con herbicidas postemergentes (2,4-DB, bromoxinil, etc.) son similares a los mencionados para el control en implantación, agregándose otros productos como flumetsulam (25 a 35 g i.a. ha<sup>-1</sup>), imazetapir (80 a 100 g i.a. ha<sup>-1</sup>), clorimurón etil (5 a 7,5 g i.a. ha<sup>-1</sup>) y bentazón (300 a 500 g i.a. ha<sup>-1</sup>). Distintos trabajos han concluido que el éster del 2,4-DB –según la dosis usada y el grado de crecimiento de la alfalfa– puede provocar daños al cultivo, como reducción del crecimiento, quemaduras de hojas y disminución de la floración (Marble *et al.*, 1986; Waddington, 1977).

Las gramíneas perennes, como gramón y sorgo de Alepo, pueden ser controladas con aplicaciones de los herbicidas selectivos mencionados anteriormente. También la aplicación de glifosato (500 a 1000 g i.a. ha<sup>-1</sup>) durante los meses de bajas temperaturas y sin rebrote activo de la alfalfa ha dado resultados satisfactorios.



■ **Figura 8.** Control químico de malezas.

### *Control de la cuscuta*

La cuscuta es una especie anual y parásita y constituye una de las malezas más problemáticas que se pueden encontrar en lotes de alfalfa para semilla, siendo mucho más grave en estos cultivos que en aquellos destinados a forraje. Las características de manejo de los cultivos para



semilla favorecen el crecimiento y desarrollo de la cuscuta, permitiéndole completar su ciclo y producir semilla. Cuando la semilla de cuscuta germina, la plántula que emerge comienza a rotar lentamente en el sentido de las agujas del reloj en búsqueda de la planta hospedante; una vez que la encuentra, se adhiere y la penetra por medio de haustorios para extraer su savia. A partir de ese momento, la plántula pierde todo contacto con el suelo y comienza a vivir a expensas de la planta hospedante. La cuscuta parasita no solo a la alfalfa, sino también a otras especies cultivadas (cebolla, papa, tomate, tréboles, zanahoria, etc.) y a malezas (cardo ruso, quinoa, etc.) (Dawson *et al.*, 1984).

La cuscuta es una especie que se caracteriza por presentar semillas “duras” (tegumento impermeable) que pueden permanecer en el suelo por períodos de 10-20 años. Una vez infestado un lote, es necesario un largo tiempo para su control efectivo. Se reproduce y difunde exclusivamente por semillas, que tienen la particularidad de presentar forma, peso y tamaño muy similares a las de la alfalfa, lo que dificulta su separación con las máquinas tradicionales y encarece el proceso de limpieza posterior.

La cuscuta aparece generalmente en forma de manchones aislados que, si no son controlados, pueden llegar a invadir todo el lote. Para su control es importante considerar las acciones de tipo preventivo y el control químico. Las medidas preventivas para tener en cuenta son:

- a) no sembrar un cultivo para semilla en lotes que hayan tenido infestaciones importantes de esta maleza;
- b) no sembrar semillas de alfalfa infestadas con semillas de cuscuta;
- c) asegurar una adecuada limpieza de la cosechadora, especialmente cuando provenga de lotes infestados;
- d) controlar todas las plantas de cuscuta y las malezas de hoja ancha (posibles hospedantes) que se desarrollen a lo largo de caminos, alambrados y canales de riego; y
- e) no permitir la entrada de animales que hayan pastoreado un lote contaminado con cuscuta (Dawson *et al.*, 1984; Dell' Agostino, 1990; Moschetti *et al.*, 1994).

Se debe analizar la pureza físico-botánica de toda partida de semilla de alfalfa a fin de garantizar la ausencia de cuscuta. Para lotes de semilla destinados a la comercialización, la tolerancia para semillas de cuscuta que marca la Ley Nacional de Semillas y Creaciones Fitogenéticas (Nº 20.247), a través de la Disposición SNS Nº 12/88, es muy baja: a) para categoría segunda multiplicación: 1 semilla cada 50 g de semilla de alfalfa; y b) para categorías original y primera multiplicación: totalmente libre de cuscuta (Moschetti *et al.*, 1994).

En caso de detectarse su presencia en lotes ya cosechados, la separación de esta maleza puede hacerse mediante un equipo especial conocido como “descuscutadora”, cuyo principio de funcionamiento aprovecha la rugosidad propia de la semilla de cuscuta para hacer que se le adhieran limaduras de hierro; luego, ese conjunto –hierro y semillas– es separado mediante un electroimán. Este proceso es efectivo pero costoso, no solo operativamente, sino también por la pérdida de semilla de alfalfa agrónomicamente apta que –por pequeñas quebraduras o deformaciones a las que se adhieren también limaduras de hierro– es separada durante el proceso de limpieza. Esto último ocasiona mermas a menudo importantes, que en ocasiones pueden llegar al 30 % (Moschetti *et al.*, 1994).

El método que se emplee para el control de los manchones de cuscuta dependerá del grado de infestación. Si se tiene varios manchones, pero se trata a cada uno en forma individual, debe tenerse en cuenta que ninguno de los métodos disponibles controla totalmente el problema (Dawson, 1986a). Si la cuscuta aparece en manchones aislados, es aconsejable controlarla antes que florezca y produzca semilla; para ello, se deberán cortar las plantas de alfalfa por debajo del lugar donde la cuscuta está adherida y dejarlas secar, retirando luego fuera del lote ese material vegetal cortado y seco. Una alternativa es rociar con gasoil el sector problema y quemarlo luego cuando se seque. Otra opción es quemar directamente el sector invadido con un lanzallamas o aplicarle un herbicida de contacto (*paraquat*) y, una vez desecado, quemarlo. En todos los casos, es muy conveniente el tratamiento de una superficie mayor a la del sector realmente invadido, a fin de evitar el “escape” de algunos tallos parasitados que pudieren pasar inadvertidos (Dawson *et al.*, 1984; Dell’ Agostino, 1990).

Algunas experiencias realizadas en Washington han demostrado que la aplicación de dosis extremadamente bajas de glifosato (75 a 150 g i.a ha<sup>-1</sup>) permite ejercer un control selectivo de la cuscuta cuando esta ya está adherida en el hospedante (Dawson, 1986b).

En infestaciones generalizadas, con una importante cantidad de semillas de cuscuta en el suelo, se recomiendan aplicaciones de herbicidas preemergentes, que eliminan las semillas o las plántulas de la maleza antes que se adhieran a la alfalfa. La propizamida, en dosis de 1 a 2 kg i.a. ha<sup>-1</sup> y aplicada en preemergencia de la cuscuta y antes del desarrollo de la alfalfa, posibilitó niveles de control cercanos al 80 % (Burril *et al.*, 1988; Dell' Agostino, 1990). Otros productos, como la trifluralina (granulada) en muy altas dosis, el cloroprofán, el pendimetalín y la dinitroanilina también han sido utilizados con considerable efectividad en las áreas de producción de semilla de los EE. UU. (Burril *et al.*, 1988; Dawson, 1986a; Orloff, 1985; Orloff *et al.*, 1989). En el Valle Inferior del Río Colorado se han obtenido controles de 98 a 100 % de efectividad con pendimetalín, aplicado en octubre-noviembre y en dosis de 2 a 3,3 kg i.a. ha<sup>-1</sup> con incorporación mecánica (Moschetti *et al.*, 1994); complementariamente, se ha podido controlar también la invasión de otras malezas que están usualmente presentes en esa fecha.

## Control de insectos

Un factor que debe considerar el productor de semilla es el control de los insectos que reducen los rendimientos. Cuando se efectúan tratamientos de control químico al cultivo, deben tomarse las precauciones para evitar las aplicaciones innecesarias de plaguicidas de amplio espectro. El objetivo de los tratamientos es alcanzar una reducción significativa de la población de la plaga con un efecto mínimo sobre los insectos polinizadores y la fauna benéfica (predadores, parásitos, etc.) (Aragón, 1990, Marble, 1980). En este sentido, es fundamental el uso de los umbrales de daño económico como punto de referencia para la decisión de realizar o no los tratamientos en un contexto de manejo de plagas (Aragón, 1990; Aragón y Imwinkelried, 2007).

Existen prácticas de manejo que tienden a reducir considerablemente el uso de insecticidas en cultivos para producción de semilla, como por

ejemplo la multiplicación de variedades resistentes; el corte de primavera y la quema de rastrojos (Schaber y Entz, 1988), que disminuyen la reproducción de insectos perjudiciales; la aplicación de insecticidas en estado de botón floral o antes de la entrada de los polinizadores (Rincker *et al.*, 1988) y la elección adecuada del insecticida (espectro de control, especificidad, dosis, residualidad, etc.). El concepto de control integrado debe tenerse muy en cuenta, especialmente en aquellas áreas donde el cultivo de alfalfa para semilla es una nueva alternativa de producción para evitar la ruptura del equilibrio dinámico que existe en todo ecosistema natural.

Los tipos y las densidades de las plagas varían de acuerdo con las zonas productoras, de modo que los programas de control deben definirse según las necesidades de cada una (Marble, 1980). Es importante saber identificar las especies perjudiciales y también reconocer sus enemigos naturales. Respecto de estos últimos, los más comunes pueden agruparse en predadores, parásitos y hongos entomopatógenos. Dentro de los predadores se encuentran larvas y adultos de coccinélidos, llamados comúnmente "vaquitas" (*Hippodamia convergens* G., *Adalia bipunctata* L., *Eriopis connexa* G., *Coccinella ancoralis* G.); larvas de moscas sírfidas (*Allograpta exotica* W., *Bacha* sp., *Syrphid* sp.); larvas de crisopas (*Chrysopa lannata* Banks.); ninfas y adultos de chinches predadoras, como la "chinche pirata" (*Orius insidiosus*), la "chinche ojuda" (*Geocoris* sp.) y otras (*Nabis* sp., *Podisus nigrispinis* D., *Podisus chilensis* y *Atrachelus* sp.); arañuelas predadoras; mantoideos o "tata-dios" y diversas arañas (Aragón y Imwinkelried, 2007; Dughetti *et al.*, 1982; Villata, 1993). Los parásitos son insectos muy pequeños, de menor tamaño que el hospedante, que cumplen su ciclo dentro de este. Los parásitos más comunes en alfalfa son las avispidas *Aphidius smithi*, *Aphidius ervi* y *Praon volucre*, cuyas larvas se alimentan de los órganos internos de los pulgones. Las avispidas *Trissolcus basal* y *Telenomus mormideae* llegan a parasitar entre el 50 y el 90 % de los huevos de chinches (Aragón, 1990; Aragón y Imwinkelried, 2007). Los parásitos del género *Ophion* atacan poblaciones de isocas cortadoras (Villata, 1993). Finalmente, entre los enemigos naturales de las plagas también hay entomopatógenos, que son virus, hongos o bacterias capaces de provocar enfermedades mortales en los insectos (Dughetti *et al.*, 1982). El hongo *Entomophthora aphidis* puede

causar, bajo condiciones de alta humedad, una mortalidad cercana al 90 % en las poblaciones de pulgón verde (Bacon, 1980).

Si bien los problemas de insectos son esencialmente los mismos en un lote para producción de forraje que en uno para producción de semilla, en este último debe prestarse especial atención a los insectos capaces de producir daños en las etapas de floración, fructificación y maduración de las semillas. En la etapa vegetativa de la alfalfa es posible utilizar un espectro mayor de insecticidas que en floración, aunque siempre debe procurarse la preservación de la fauna útil. La aplicación de insecticidas en floración debe realizarse al atardecer o a la noche a fin de preservar los polinizadores. Los insecticidas biológicos, preparados sobre la base de bacterias entomopatógenas –como *Bacillus thuringiensis*– pueden aplicarse a cualquier hora del día, sin perjuicio para los insectos benéficos y polinizadores (Sheesley, 1987).

Aun cuando existen unas 25 especies de insectos y arañuelas citadas como perjudiciales para la alfalfa en el país (Bacon, 1980), muchas menos son las que se pueden encontrar afectando a los cultivos destinados a la producción de semilla. Entre las plagas de mayor importancia se incluye a:

- Pulgones: pulgón verde de la alfalfa (*Acyrtosiphon pisum* H.), pulgón azul de la alfalfa (*Acyrtosiphon kondoi* S.), pulgón negro de las leguminosas (*Aphis craccivora* K.) y pulgón moteado de la alfalfa (*Therioaphis trifolii* M.).
- Isocas defoliadoras: isoca de la alfalfa (*Colias lesbia* F.), isoca medidora (*Rachiplusia nu* G.), isoca militar tardía (*Spodoptera frugiperda*), oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis* H.) y oruga bolillera (*Heliotis* sp., *Helocoverpa gelotopoeon*) (Aragón y Imwinkelried, 2007).
- Chinchas: chinche verde (*Nezara viridula* L.) y chinche parda de la alfalfa (*Piezodorus guildinii* W.).
- Avispita de la alfalfa: *Bruchophagus roddi* G.
- Arañuelas: arañuela roja (*Tetranychus desertorum* B.) y arañuela bimaclada (*Tetranychus urticae*).

Entre las plagas ocasionales se pueden mencionar las siguientes:

- Orugas cortadoras: orugas ásperas o grasientas (*Agrotis* sp., *Poro-sagrotis* sp., *Euxoa* sp.).

- Trips: *Frankfaniella australis* M. y *Thrips tabaci* L.
- Enruladora de hojas: *Eulia* sp.
- Gorgojos de la raíz: varias especies (*Naupactus* sp., *Pantomorus* sp., etc.).
- Tucuras (*Dichroplus* sp.) y grillos (*Gryllus* sp.).

La descripción de varias de estas plagas y su control se detalla en publicaciones específicas (Aragón, 1990; Aragón y Imwinkelried, 2007; Dughetti *et al.*, 1982; Villata, 1993). Brevemente se destaca lo siguiente:

### *Pulgonas de la alfalfa*

Por medio de su aparato bucal chupador, estos insectos inyectan toxinas y extraen savia de las plantas, produciendo una reducción del crecimiento, a punto tal que, en ataques severos pueden llegar a detenerlo completamente. Las plantas susceptibles presentan un marcado acortamiento de los entrenudos y cambios de color del follaje. Además de toxinas, los pulgones segregan sustancias melosas, sobre las que se desarrollan hongos saprofitos. El ataque puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo y ante ataques muy severos las plantas pueden llegar a morir (Aragón, 1990; Aragón y Imwinkelried, 2007).

Las poblaciones en el cultivo no son uniformes, por lo que es necesario realizar muestreos en varios sectores para obtener una estimación válida (Dughetti *et al.*, 1982). La aparición de variedades resistentes o muy tolerantes a diferentes áfidos es uno de los mayores avances logrados desde muchos años atrás (Aragón y Imwinkelried, 2007; Villata, 1993). En el control químico debe considerarse que, además de las aplicaciones que sean necesarias, la mayoría de los productos aconsejados, excepto el pirimicarb, tienen reducida selectividad hacia los enemigos naturales (Aragón, 1990). Es importante considerar también la oportunidad del tratamiento, dado que los productos y dosis pueden variar según el estado fenológico del cultivo, el número de pulgones por tallo, el nivel de daño, las condiciones climáticas y la presencia de parásitos y predadores (Aragón y Imwinkelried, 2007; Villata, 1993).

### *Isoca de la alfalfa*

Se alimenta del follaje, racimos florales y vainas en desarrollo, aunque los mayores daños se producen desde la mitad hasta el final de

la estación de crecimiento. El muestreo para determinar umbrales de daño económico se efectúa semanalmente, desde que la alfalfa tiene 0,10 m de altura hasta momentos previos a la cosecha, utilizando una red de arrastre. Si el número de insectos recolectados estuviera próximo al daño económico, se debe recurrir a la aplicación de insecticidas (Dughetti et al., 1982). Las formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis*, aplicando 100 a 120 g de producto formulado a 32.000 UI, han tenido muy buen control de *C. lesbia*, preservando la fauna útil (Aragón, 1990). Deben utilizarse dosis adecuadas y productos que tengan cierta selectividad para disminuir la plaga a niveles inferiores al umbral económico y afectando levemente a los insectos benéficos (Villata, 1993).

Suele suceder que la isoca de la alfalfa ataque asociada con otras especies, como la militar tardía, la bolillera o la medidora. Si bien los umbrales de daño son semejantes, las técnicas de control difieren. En estos casos deberán seleccionarse con cuidado los productos y dosis para aplicar, ya que las tolerancias de estas otras isocas a los insecticidas son diferentes (Villata, 1993). Las isocas militar tardía, bolillera y medidora han sido detectadas alimentándose de ramilletes florales (Bacon, 1980).

En áreas de San Juan se observaron daños severos ocasionados por la isoca bolillera (*Helicoverpa gelotopoeon*) (Figura 9). Cuando el cultivo llega a su estado reproductivo, esta plaga –que tiene gran capacidad de destrucción– puede producir daños muy importantes en las inflorescencias. La combinación de su capacidad para presentar varias generaciones anuales y la dificultad para poder observar las larvas en las plantas, hacen muy problemático su tratamiento. Se cuenta en el mercado con insecticidas disponibles para su control, teniendo en cuenta que al ser ataques en floración se debe ser muy cuidadoso al momento de seleccionar el producto.

### *Chinches de la alfalfa*

Es de destacar la peligrosidad del ataque de chinches en cultivos destinados a producción de semilla y la problemática que representa su control, dado que el uso de insecticidas no selectivos en floración puede ocasionar un severo impacto en los polinizadores.

Las chinches, por medio de su aparato bucal picador-chupador, succionan savia de las inflorescencias, vainas y granos en formación, produciendo abortos y deformaciones o vaneo de semillas; además, introducen toxinas y hongos patógenos en los tejidos de la planta (Aragón, 1990). En San Juan se han detectado pérdidas de semilla de hasta el 90 % provocados por ataques severos de chinches.

Si bien existe una gran diversidad de parásitos –como el microhimenóptero *Trissolcus basalís* y la mosca *Trichopoda giacomelli*– y varios predadores (nábidos, geocóridos, coccinélidos, carábidos, hormigas y arácnidos) que destruyen huevos y ninfas de chinches, su efectividad aún no ha sido establecida (Aragón, 1990).

Se sugiere efectuar tratamientos de control cuando se detecte la presencia promedio de al menos una (1) chinche adulta (o ninfa mayor de 5 mm) por golpe de red, sobre un mínimo de 20 golpes distribuidos en el lote según un esquema de 4-5 golpes por estación de muestreo. Esta tarea debe repetirse cada semana, con mayor frecuencia en los períodos críticos de fructificación y maduración.



■ **Figura 9.** Ataque de isoca bolillera (*Helicoverpa geltopoeon*).

### *Avispita de la alfalfa*

Este microhimenóptero afecta la producción de semilla principalmente en el sur de la región Pampeana, aunque también se la detectó en Cuyo.



En algunas zonas de EE. UU., y según las condiciones, puede destruir desde el 2 % al 80 % de la semilla de alfalfa (Manglitz y Ratcliff, 1988).

La avispa adulta mide 1,5-2 mm y es de color negro, con partes de las patas marrón o amarillo. Las hembras colocan sus huevos en las vainas inmaduras y las larvas, una vez nacidas, se introducen en las semillas y se nutren de ellas, vaciándolas. Cuando la larva completa su desarrollo, se transforma en pupa y a los pocos días emerge el adulto a través de una perforación de la semilla vacía (Dughetti, 1981). Ante una presencia importante de la plaga en un lote de alfalfa, se tornan fácilmente observables las vainas ya maduras con perforaciones ocasionadas por la emergencia del adulto. Se estima que en Argentina el insecto tiene al menos tres generaciones año<sup>-1</sup> y que pasa el invierno como larva dentro de las semillas (Aragón, 1990).

Por un lado, las pérdidas ocasionadas por este insecto suelen pasar desapercibidas para el productor, dado que las semillas afectadas al ser más livianas que el resto se pierden junto con los residuos de trilla, impulsadas por el ventilador de la cosechadora. De esta manera, la plaga queda en el lote y constituye la fuente de infestación o recolonización para el siguiente año (Dughetti, 1981). Por otro lado, y como consecuencia de los órganos vegetales que ataca y de su ciclo biológico, las pulverizaciones con insecticidas no son efectivas para su control. En ese contexto, para reducir los daños se aconseja: quemar el rastrojo o los restos de cosecha o bien enterrar las semillas infestadas que quedan en el suelo después de la cosecha por medio de labores mecánicas; eliminar todas las plantas con semillas maduras en los alrededores del lote; y evitar la siembra de semillas infestadas (Aragón, 1990; Manglitz y Ratcliff, 1988).

### *Arañuelas*

Es poco conocido el efecto de estos ácaros sobre el rendimiento de semilla, aunque se ha observado que una alta población produce amarillamiento del follaje, secado de las hojas y prematura caída de folíolos (Rincker *et al.*, 1988). La plaga se presenta por lo general en manchones, que van aumentando de tamaño a medida que la infestación se propaga. Aunque no se ha determinado todavía su nivel de daño económico,

el control es más efectivo cuando se realiza en etapas tempranas del desarrollo del ácaro y cuando se perciben los primeros manchones en el lote. Un control tardío generalmente no es necesario, a menos que las arañas infesten los racimos florales aun potencialmente capaces de producir semilla. Existen en el mercado acaricidas efectivos que no perjudican a los insectos benéficos, pero su aplicación no debe ser postergada ya que estos productos son más efectivos previendo infestaciones que controlando las ya existentes (Marble *et al.*, 1986).

### *Trips*

Si bien la presencia de estos insectos en las flores de alfalfa es usual, no es generalmente detectada por el observador común (Villata, 1993). El daño que provocan en las inflorescencias de alfalfa se manifiesta a través de decoloración y marchitamiento de las flores, aborto floral y alteraciones en la formación de semilla (Manglitz y Ratcliff, 1988). La aplicación de deltametrina (1,5-8 g i.a. ha<sup>-1</sup>) demostró ser efectiva hasta los 11 días posteriores al tratamiento (Dughetti y Moschetti, 1990).

### *Enrulador de la hoja*

Estas pequeñas isocas producen una tela que enrolla y envuelve las hojas ubicadas en las partes apicales de las plantas, incluidas las inflorescencias. De ese modo, los hilos sedosos que producen pueden impedir que las flores queden expuestas para la polinización. Hasta el presente, la información producida acerca de las medidas de control de esta plaga ocasional es muy escasa (Bacon, 1980; Marble *et al.*, 1986).

### *Tucuras y grillos*

Las tucuras y los grillos suelen alimentarse del follaje de la planta, pero también lo hacen de las flores y las semillas en formación, especialmente cuando están en estado lechoso. El daño que causan se puede detectar a través de la observación en el suelo de pequeños grupos de vainas cortadas, de las que la plaga extrae la semilla. El control puede efectuarse con cebos tóxicos (más recomendado) o con aplicaciones foliares de numerosos insecticidas fosforados y carbamatos.

## Chicharritas

En lotes de producción de semilla bajo riego en algunas áreas de Cuyo se ha detectado la presencia de “chicharritas”, que si bien no causan daños por sí mismas se sospecha son transmisoras de micoplasmas. Las plantas afectadas presentan una proliferación de tallos muy finos, con folíolos muy pequeños y una coloración verdosa en las flores. Todos esos síntomas se engloban en una enfermedad denominada “escoba de bruja”, que hace que las plantas atacadas generalmente no produzcan semilla. Por el momento no existe información acerca de la implementación de medidas directas de control, por lo que lo más aconsejable son la eliminación de plantas afectadas y el control del insecto vector.

## Polinización

La alfalfa requiere de la polinización cruzada (alogamia) para producir semilla en cantidad y calidad, la que se lleva a cabo por intermedio de insectos que actúan como agentes de intercambio de polen (Arretz y Martínez, 1988). La alogamia en la alfalfa se ve favorecida por mecanismos de autoesterilidad y autoincompatibilidad. Además, la disposición de los órganos florales hace necesario un mecanismo de desenlace en el que los insectos juegan un rol fundamental. El desenlace es la liberación de la columna sexual (pistilo y estambres) de cada flor, lo que ocurre por la presión ejercida por los insectos. La polinización cruzada tiene lugar cuando, en el momento del desenlace, la columna sexual golpea en el insecto que, al transportar polen de otras flores en su abdomen, lo pone al alcance del estigma para iniciar el proceso de fecundación.

La polinización deficiente es uno de los factores que más ha dificultado la producción de semilla de alfalfa en el mundo. Los intentos por desarrollar variedades autógamas o para utilizar medios químicos o mecánicos que reemplacen a los insectos en el desenlace floral no han dado resultados satisfactorios (Arretz y Martínez, 1980; Pederson *et al.*, 1959). El polen de otra planta desarrolla más rápido y alcanza el óvulo antes que el polen de la misma planta, produciendo una semilla de polinización cruzada que tiene un mayor valor genético. Cuando ocurre autofecundación, solo alrededor del 36 % de las flores fecundadas for-

man vainas, mientras que con polinización cruzada ese valor alcanza al 60 %.

En ausencia de insectos polinizadores se puede producir una abundante cantidad de semilla autofecundada, que dará origen a plántulas de menos vigor. Una sola generación de autofecundación produce una población de plantas que reduce su producción de semilla en alrededor del 62 % y en aproximadamente 50 % la de forraje. El pasaje sobre las plantas en floración de diversos elementos –como rastras, cadenas, postes, alambres, etc.– produjo incrementos en el desenlace de las flores de hasta 422 %, pero la producción de semilla llegó sólo al 71 % de la alcanzada en el lote testigo, donde no se usaron métodos artificiales, sino polinización natural. En general, rindes de semilla de 50 a 150 kg ha<sup>-1</sup> y 1 a 3 semillas vaina<sup>-1</sup> indican un alto nivel de autofecundación.

### *Insectos polinizadores*

Las abejas son los insectos de mayor valor como polinizadores de alfalfa. Existen varias especies importantes: abeja melífera (*Apis mellifera*), abeja cortadora de hojas (*Megachile rotundata*), abeja alcalina (*Nomia melanderi*), abejorros (*Bombus* sp.), abeja de trompa larga (*Mellisodes* sp.), abeja carpintera (*Xylocopa* sp.) y otras de menor importancia (Martínez, 1987). Aunque la eficiencia de varias abejas silvestres es muy alta, las dificultades para su manejo y explotación han hecho que la producción de semilla de alfalfa –particularmente en los EE. UU.– se base solo en el uso de tres especies: abeja melífera, abeja cortadora de hojas y abeja alcalina (Martínez, 1987).

La actividad de las abejas depende de muchos factores, entre ellos: las condiciones ambientales (temperatura, vientos, humedad, etc.); el cultivar; el estado del alfar; la proximidad de otras plantas de floración simultánea; la forma, el tamaño y el color de las flores; y el uso de insecticidas en ese u otros lotes vecinos (Martínez *et al.*, 1983). Las bajas temperaturas, los fuertes vientos, el cielo nublado y la lluvia retardan el vuelo de las abejas. En esos períodos hay poca o ninguna recolección de polen o néctar. Las abejas recolectoras prefieren plantas que crecen en suelos moderadamente secos y, al parecer, en estas condiciones la concentración de azúcar en el néctar es mayor (Martínez, 1987).

En cada área de cultivo es posible encontrar poblaciones de abejas nativas. Es frecuente la obtención de rendimientos relativamente altos en lotes de alfalfa ubicados cerca de montes naturales, donde una o más especies de insectos silvestres actúan como polinizadores naturales. Lamentablemente, estas situaciones son cada vez menos frecuentes, dado que las modernas prácticas de cultivo y el uso indiscriminado de agroquímicos han ido destruyendo esa fauna natural que cumple una importantísima misión.

### *Polinización con abejas melíferas (Apis mellifera)*

Si bien la flor de la alfalfa es atractiva para las abejas melíferas, la cantidad real de ellas que visita las flores depende no solo del número, la fortaleza y la proximidad de las colmenas, sino también de la competencia de otras fuentes atractivas de polen y néctar existentes en el área. La relativamente fácil disponibilidad de colmenas y el ingreso adicional que supone la producción de miel convierten a la abeja melífera en el polinizador más común de las áreas productoras de semilla. Cuando los productores de semilla alquilan las colmenas, estas pueden concentrarse en un número mayor al recomendable para la producción de miel y –distribuidas uniformemente en un radio de aproximadamente 1,5 km– manipularse de manera que resulten eficientes polinizadores de la alfalfa (Marble, 1980; Martínez, 1987; Martínez *et al.*, 1983).

En los semilleros de alfalfa las abejas obreras son principalmente recolectoras de néctar (Martínez *et al.*, 1983) y, si bien visitan las flores rápidamente (alrededor de 14 minuto<sup>-1</sup>), evitan el mecanismo de desenlace, llegando a fecundar solo el 1 % de las flores visitadas. De acuerdo a estimaciones realizadas, ese promedio de desenlace decrece aún más a medida que se avanza hacia el norte de los EE. UU. y Canadá, pero se incrementa al 2-3 % en el sudoeste desértico estadounidense. Por el contrario, las recolectoras de polen trabajan más lentamente (8 flores minuto<sup>-1</sup>), pero desenlazan el 80 % de las flores visitadas, lo que hace que polinicen un promedio de 384 flores hora<sup>-1</sup> y sean 45 veces más eficientes como polinizadoras que las recolectoras de néctar. Lamentablemente, las recolectoras de polen no representan más del 1 al 5 % de la población de abejas (Martínez, 1988).

Bohart (1957) calculó que en plantas con buen potencial agronómico, una población de 7,17 abejas melíferas m<sup>-2</sup> que solo desenlacen y fertilicen el 1 % de las flores visitadas, originan un rendimiento de semilla de 392,13 kg ha<sup>-1</sup>. Una abeja recolectora de polen cada 10 m<sup>2</sup> desenlaza tantas flores como 5 recolectoras de néctar en la misma superficie. Tanto es así que si en observaciones a campo se determina que diariamente hay 18-30 % de flores desenlazadas, se puede inferir que en la colonia hay recolectoras de polen. Estos porcentajes se pueden incrementar manteniendo el cultivo en condiciones atractivas para las recolectoras de polen, empleando técnicas que minimicen la competencia de otras fuentes de polen (Martinez, 1988).

La lluvia impide el vuelo de las abejas, al igual que vientos superiores a los 40 Km h<sup>-1</sup> (Martinez *et al.*, 1983). Las abejas que provienen de colonias robustas alcanzan su punto de máximo vuelo cuando la temperatura es superior a 15 °C, mientras que las provenientes de colonias débiles no lo alcanzan hasta que la temperatura es superior a 20 °C. Las recolectoras de polen tienen picos de actividad entre 32 y 44 °C, pero las de néctar alcanzan su máxima actividad entre 32 y 35 °C (Franklin, 1951).

### *Manejo*

Las colonias de abeja melífera usadas como polinizadoras requieren un manejo especial para maximizar su eficiencia. Entre los factores a considerar pueden mencionarse:

- a) una reina joven, activa, con buena capacidad de postura de huevos, acceso a dos pisos de la colmena y suficiente lugar para postura y producción de cría;
- b) una colonia fuerte, con un mínimo de 6.250 cm<sup>2</sup> de cría;
- c) abundantes obreras como para cubrir 8-10 marcos con una densidad de 4-5 abejas pulgada<sup>2</sup> sobre las 3/4 partes de la superficie en ambas caras;
- d) disponer 8-10 colonias ha<sup>-1</sup>, de manera tal que haya al menos 3-5 obreras m<sup>-2</sup>;
- e) distribución gradual de las colonias, colocando el 50 % cuando se alcanza el 25-40 % de floración, y el resto 7 a 10 días más tarde;

f) agrupación de las colonias de forma tal que haya entre 12 y 25 dentro del lote, lo que hace que el rango de vuelo de las abejas se superponga a intervalos de 100 a 150 m (Figura 10);

g) inspección frecuente de la fortaleza de la colonia desde que las primeras abejas se colocan en el campo, y realización de exámenes periódicos para extraer la miel y poner alzas adicionales por encima de la primera cámara, a fin de proveer suficiente área de postura para la reina;

h) implementación de un sistema de riego que posibilite un desarrollo lento pero continuo de flores atractivas;

i) en lo posible, eliminación de las fuentes de polen competitivo, haciendo coincidir los períodos de floración del cultivo con épocas de ausencia o escasez de otras fuentes alternativas de polen;

j) compensar la existencia de flores competitivas mediante el agregado de colonias adicionales (Martinez, 1988; Martinez, 1987; Poduska, 1980; Poduska, 1977; Stanger y Thorp, 1974);

k) aplicación de insecticidas solo cuando sea absolutamente necesario para mantener las plagas debajo del nivel de daño económico y usando los productos específicos que sean menos dañinos para las abejas (Bruno, 2004; Dughetti *et al.*, 1982; Garcia y Martinez, 1985); y

l) formalización de contratos escritos entre los productores de semilla y los apicultores, que aclaren los posibles puntos de controversia y especifiquen el alquiler de las colmenas. Debe reconocerse una compensación por la pérdida de miel, dado que una densidad de 8-10 colmenas ha<sup>-1</sup> es incompatible con una máxima producción de miel; además, la aplicación de insecticidas usualmente elimina o debilita las colmenas y reduce drásticamente el rendimiento de miel (Martinez, 1988; Martinez, 1987; Martinez *et al.*, 1980).

Un análisis del polen recolectado a lo largo del período de floración por las abejas de las colmenas colocadas en el lote de producción reveló un incremento en la recolección de polen de alfalfa, lo que a menudo está asociado con incrementos desde otras fuentes alternativas. Esto sugiere que el polen competitivo en realidad estimula a las abejas a recolectar más polen de todas las fuentes disponibles, incluyendo la alfalfa. Es común que se observen grandes diferencias en el número de

abejas recolectoras de polen entre dos lotes de alfalfa adyacentes, lo que indicaría la existencia de diferencias en la condición de las plantas más que la competencia de otras fuentes de polen. El riego es una de las prácticas de manejo que más afecta el número de abejas presentes en un lote (Marble, 1980; Martínez *et al.*, 1983; Poduska, 1977).



■ **Figura 10.** Ubicación de colmenas en un lote de producción.

### *Polinización con abeja cortadora de hojas (Megachile rotundata)*

El himenóptero *Megachile rotundata* Fabricius es originario del sudoeste asiático y del sudeste europeo, y se caracteriza por su alta eficiencia en la polinización y su preferencia por la alfalfa, aun en presencia de otras fuentes de polen. Es una especie de hábitos gregarios para anidar, haciéndolo naturalmente en perforaciones de troncos y en tallos huecos de plantas herbáceas. Este comportamiento facilitó su semidomesticación y su multiplicación en gran escala mediante la construcción de domicilios artificiales a campo. Paralelamente, su importancia como polinizador despertó el interés por el estudio de su biología, a efectos de definir su manejo y su uso en la producción de semilla de alfalfa (Stephen y Torchio, 1961). Sobre estos últimos aspectos, existen numerosos trabajos que aportan importante información (Arretz y Martínez, 1979; Bacon, 1980; Bacon *et al.*, 1965; Bohart, 1972; Bohart, 1962; Erickson (Jr.) y Wilson, 1972; Hobbs, 1967; Johansen *et al.*, 1969; Klostermeyer, 1964; Stephen, 1972; Stephen, 1962; Stephen, 1961; Waters y Homan, 1975).

### *Manejo*

El manejo invernal se concentra en proporcionarle un ambiente de baja temperatura (4° a 5 °C), destinado a uniformar y mantener el estado de diapausa de las larvas hasta la siguiente temporada. Se debe también controlar que la humedad relativa no sobrepase el 60 % a fin de evitar



la contaminación por hongos (Bacon *et al.*, 1965; Hobbs, 1967; Johansen *et al.*, 1969). Bajo estas condiciones, no solo se impide el daño de enemigos naturales, sino que se puede sincronizar la emergencia de los adultos con el inicio de la floración de la alfalfa. Para esto último, las larvas invernantes deben someterse a un proceso de incubación, con el que se rompe la diapausa invernal para iniciar la pupación, que permitirá completar el desarrollo y uniformar la emergencia de los adultos.

La incubación consiste en someter los estados inmaduros a temperaturas moderadas, entre 26° y 32 °C. La duración de este proceso es variable según la temperatura utilizada: a 26 °C insume unos 40 días y a 32 °C la emergencia se produce aproximadamente en 21 días (Martinez, 1991). A temperaturas inferiores a 26 °C la sincronización de la emergencia de adultos es muy pobre, mientras que por encima de 32 °C se produce una elevada mortalidad (Johansen *et al.*, 1969; Kronic y Hinks, 1972; Stephen y Osgood, 1965a). Para que el proceso se realice adecuadamente, se han diseñado cámaras especiales de incubación que proporcionan las condiciones apropiadas (Hobbs, 1967). Una vez que han emergido los primeros adultos, el material con las celdas ya está en condiciones de ser instalado en los domicilios de campo, donde se completará el proceso de emergencia.

Los domicilios son instalaciones destinadas a proporcionar un ambiente de nidificación para que las hembras construyan sus celdas y pernecten. Además de proporcionar la sombra adecuada al material de nidificación, deben también ofrecer protección a los insectos contra el viento, la lluvia, los pájaros, los enemigos naturales y los insecticidas. La entrada debe estar orientada hacia el este, de manera que reciban los rayos solares desde las primeras horas de la mañana y se induzca así la actividad de las abejas desde las primeras horas del día. Además de la suficiente ventilación y de poseer estructura sólida y liviana para su fácil traslado, deben contar con el espacio suficiente para albergar abundante material de nidificación para el aumento poblacional (Bacon *et al.*, 1965; Bohart, 1962; Erickson (Jr.) y Wilson, 1972). Las hembras anidan en galerías circulares, oscuras, de 5-6 mm de diámetro y 5-10 cm de longitud. Como material de nidificación se han utilizado numerosos elementos: pajuelas de papel encerado o de material plástico, maderas con perforaciones, papel corrugado, maderas o plásticos acanalados, bloques de

poliestireno expandido de alta densidad (telgopor), etc. (Arretz y Martínez; 1988; Bohart, 1962; Stephen, 1961). Los domicilios pueden ser unidades fijas de madera, con capacidad para 20.000 a 60.000 galerías de nidificación, o estructuras móviles de tamaño mediano a grande, con capacidad para 100.000 a 500.000 galerías de nidificación. Los primeros (pequeños y fijos) tienen bajo costo, pero proporcionan menor eficiencia de polinización (Figura 11). Los móviles y de mayor tamaño son más apropiados para polinizar superficies mayores y pueden ser trasladados dentro del lote según las variaciones de la floración; sin embargo, su mayor inconveniente es su alto costo.



Figura 11. Domicilio fijo de *M. rotundata* dispuesto en un lote de alfalfa.

El manejo de campo durante la temporada activa de los polinizadores, una vez instalado el material incubado en los domicilios, se basa en dos aspectos fundamentales: a) proporcionar suficiente material de nidificación, de manera de permitir el aumento poblacional; y 2) proporcionar una adecuada cantidad de flores para que los insectos pueden alimentarse suficientemente. Al final de la temporada, cuando la actividad de los adultos ha cesado y la temperatura ambiental comienza a decrecer, los nidos con celdas deben ser retirados del campo y mantenidos en diapausa a baja temperatura hasta la siguiente primavera (Arretz y Aracena, 1975; Bacon *et al.*, 1965; Bohart, 1962; Johansen *et al.*, 1969; Stephen, 1972).

### *Dinámica poblacional*

El incremento poblacional anual depende del número de generaciones que se produzcan durante la temporada. En Oregon y California (EE. UU.) y en Chile es posible obtener, bajo excelentes condiciones climáticas, dos generaciones por temporada<sup>-1</sup> (Arretz y Aracena, 1975; Bacon *et al.*, 1965; Stephen, 1972; Stephen, 1962). En Utah (EE. UU.) y Alberta (Canadá) se produce una generación año<sup>-1</sup>, y solo una pequeña fracción de las celdas

aprovisionadas al comienzo de la temporada da origen a una segunda generación (Bacon *et al.*, 1965; Kronic y Hinks, 1972). En el Valle Inferior del Río Colorado se han obtenido 1 o 2 generaciones año<sup>-1</sup> (Arretz y Martínez, 1978). Teóricamente, si se controlaran eficazmente los ataques de parásitos, predadores y enfermedades, las poblaciones podrían incrementar en 5 a 6 veces el número de individuos en cada temporada; sin embargo, la ocurrencia de esta situación es poco probable bajo condiciones reales. En Argentina, si bien en algunos años se ha llegado a un incremento poblacional de 2,5 veces, en la mayoría de los casos los incrementos logrados permitieron solamente recuperar la población inicial o alcanzar pequeños márgenes de aumento (Arretz y Martínez, 1979).

### *Densidad poblacional y polinización*

Las estimaciones sobre la población necesaria de *Megachile rotundata* para una buena polinización se basan en la capacidad individual de la hembra como polinizadora a lo largo de su vida útil, en el número de celdas de nidificación que primariamente deben ubicarse en los domicilios de campo y en el número de celdas provisionadas durante la temporada. Para una buena polinización, el número de hembras activas necesarias se calcula en 15.000-25.000 ha<sup>-1</sup>. De ese modo, y asumiendo que la proporción normal en una población es 1 hembra: 3 machos, sería necesario contar con 45.000-75.000 celdas ha<sup>-1</sup>. En consecuencia, por un lado, el empleo de un domicilio móvil y grande ( $\geq 1.000.000$  de celdas) debería ser suficiente para polinizar aproximadamente 20 ha. No obstante, cuando se trabaja bajo condiciones climáticas desfavorables, los requerimientos para una correcta polinización pueden llegar a más de 100.000 celdas hectárea<sup>-1</sup>. Por otro lado, si los domicilios se trasladan a distintos sectores del lote durante la estación de polinización, la efectividad de los megachiles puede ser mayor. En Argentina, la correcta utilización de los megachiles ha posibilitado la obtención de rendimientos de semilla de alfalfa que superaron en 4 a 7 veces el promedio de la zona (Arretz y Martínez, 1988; Moschetti y Martínez, 1988/93).

### *Enemigos naturales y su control*

Una de las principales causas de mortalidad de *Megachile rotundata* es el daño producido por sus enemigos naturales. Esta denominación

comprende diversos parásitos externos e internos, predadores, destructores de nidos y enfermedades. Se ha confeccionado una lista de 36 especies con estas características, que incluyen una bacteria, seis hongos, un ácaro y veintiocho insectos (Arretz, 1973; Bacon *et al.*, 1965; Johansen y Eves, 1966; Minacci *et al.*, 1965; Waters, 1966).

En Argentina se determinó la presencia de los parásitos *Monodontomerus obscurus* y *Dibrachys maculipennis*, del destructor de nidos *Vitula edmansae* y del hongo patógeno *Ascosphaera aggregata*, causante de la enfermedad conocida como "chalk brood". También fueron detectados los parásitos *Melittobia acasta*, *Horismenus albipes* y *Coelioxys* sp.; mientras que se ignora si el primero de ellos es nativo o introducido, los otros se presumen autóctonos. El meloideo *Nemognatha nigrotarsata* es un destructor nativo de nidos que ha provocado daños importantes a las poblaciones de *M. rotundata* establecidas en Santiago del Estero y San Juan. Más recientemente se detectó al microhimenóptero *Pteromalus apum*, considerado una especie muy dañina que parasita en Europa diversas especies de *Megachile* y que fuera introducido accidentalmente en América del Norte después de 1965. En nuestro país, los enemigos naturales que han provocado mayores perjuicios son *Melittobia acasta*, *Pteromalus apum* y *Ascosphaera agreggata* (Arretz y Martinez, 1988; Arretz y Martinez, 1978). El control de estos enemigos naturales debe planificarse de acuerdo a las características de su biología y al momento de ataque a los megachiles, ya sea durante la diapausa, la incubación o la etapa activa en el campo (Arretz, 1973; Arretz y Aracena, 1975; Bacon *et al.*, 1965; Johansen y Eves, 1967; Johansen y Eves, 1966; Waters, 1966).

### *Polinización con abejas silvestres*

La denominación "abejas silvestres" se refiere a aquellas especies no utilizadas por el hombre para la producción de miel y no incluye a las abejas melíferas de apiarios o colonias silvestres. En este contexto, varias especies han sido reconocidas a través de los años como eficientes polinizadores de alfalfa (Bohart y Nye, 1976; Free, 1970; Linsley, 1958; Mc Gregor, 1976; Stephen *et al.*, 1969).

Salvo algunas excepciones, las abejas silvestres visitan la alfalfa para recoger polen y néctar. Muchas especies son muy diestras para producir el desenlace de las flores y obtener el polen; otras en cambio tienen

mayor dificultad (Bohart y Nye, 1976). Entre las especies solitarias, las de mayor tamaño tienen mayor amplitud de vuelo y usualmente son también más eficientes en el desenlace de las flores. Por lo general, las abejas pequeñas (<0,5 cm de largo) son incapaces de liberar el polen porque su peso es insuficiente para presionar la quilla y liberar la columna estaminal (Bohart y Nye, 1976; Gonzalez, 1980).

Free (1970), Mc Gregor (1976) y Stephen *et al.* (1969) clasificaron las familias y géneros más representativos de los polinizadores silvestres. La nómina completa de estas especies descritas en el mundo ronda las 19.000 (Linsley, 1958). En Argentina, los insectos nativos más eficientes en la recolección de polen incluyen a los abejorros *Bombus* sp. y *Megabombus* sp. y a especies del género *Megachile*. Entre aquellos insectos que desenlazan 10-20 flores  $\text{minuto}^{-1}$  hay especies de los géneros *Nomia*, *Melissodes*, *Bombus*, *Megabombus*, *Megachile*, *Xylocopa* y *Anthophora* sp., destacándose que los últimos cinco están presentes en la Argentina (González, 1980). La mayor parte de las especies mencionadas anidan en el suelo, en troncos o trozos de madera, en pequeñas o grandes cavidades, y aun en superficies totalmente expuestas (Free, 1970; González, 1980; Mc Gregor, 1976; Stephen *et al.*, 1969).

Varios son los trabajos realizados en el país que se refieren a la identificación y el manejo de los polinizadores naturales y a su importancia en la producción de semilla de alfalfa (Barbosa y Aguiar, 1983; De Santis, 1974; Martinez *et al.*, 1989; Martinez *et al.*, 1988; Ochoa, 1980; Teson y Dagoberto, 1972; Teson *et al.*, 1976). Las especies más frecuentemente registradas en los muestreos e identificadas sistemáticamente son: *Colletes* sp.; *Megachile* sp.; *Caupolicana lugubris*; *Xylocopa splendidula*; *Xylocopa augusti*; *Bombus bellicosus* y *Bombus* sp. (Martinez *et al.*, 1988).

La presencia de polinizadores silvestres en algunas áreas marginales de Argentina es una de las principales causas de los altos rendimientos de semilla de alfalfa obtenidos. Dichas áreas, que reúnen ciertas condiciones ecológicas y se ubican en las cercanías de montes naturales, facilitan la supervivencia y las multiplicaciones de estas especies benéficas. Si bien la eficiencia polinizadora de estos insectos es muy alta, su manejo y su explotación se presentan como muy difíciles. Una alternativa interesante es implementar medidas proteccionistas a fin de mantener o incrementar sus poblaciones.

Nuevas áreas de producción de semilla de alfalfa suelen tener excelentes rendimientos iniciales, que luego decaen a los pocos años. La aplicación indiscriminada de insecticidas de amplio espectro para controlar insectos perjudiciales es una de las principales causas de esta merma, eliminando o reduciendo las poblaciones de los polinizadores silvestres. También contribuyen a esto la destrucción involuntaria de sitios de nidificación por el laboreo del suelo y la eliminación de plantas que proveen alimento alternativo, al florecer antes o después que la alfalfa.

## Cosecha

La cosecha de semilla de la mayoría de las especies forrajeras ofrece inconvenientes que suelen provocar grandes pérdidas (Goss *et al.*, 1977; Harmond *et al.*, 1961; Jones Kepner, 1954; USDA, 1960). En alfalfa, los principales son: 1) condiciones climáticas desfavorables; 2) pobre preparación del terreno; 3) control deficiente de malezas; 4) inadecuado método de cosecha (hilerado, recolección y trilla o defoliado con cosecha directa); 5) ajuste incorrecto del equipo trillador, que produce trillado incompleto y daño de semillas; y 6) separación inadecuada de semilla y granza (Jones y Marble, 1961; Marble, 1976).

Las pérdidas de semilla en la cosecha son muy variables. En California, un trabajo que incluyó 15 cosechadoras en diferentes condiciones de trabajo reveló pérdidas de 0,54 % (3,3 kg ha<sup>-1</sup>) a 38,7% (215 kg ha<sup>-1</sup>), con una máquina que llegó a perder 398 kg ha<sup>-1</sup> en un lote donde se cosecharon 1.975 kg ha<sup>-1</sup> (Goss *et al.*, 1977). En experiencias realizadas en el Valle Inferior del Río Colorado con diversas cosechadoras, se registraron pérdidas de 67 a 256 kg ha<sup>-1</sup> (Harmond, 1974; Stephen y Moschetti, 1976). Si se considera que una pérdida de 3 a 4 kg ha<sup>-1</sup> es normal, debe tenerse en cuenta que la mala regulación del equipo puede ocasionar pérdidas de semilla mayores que la cantidad que se cosecha.

### Métodos de cosecha

Hay dos métodos básicos de cosecha de semilla de alfalfa: a) hilerado y posterior recolección y trilla con cosechadora provista de recolector; y b) cosecha directa, previa aplicación de un defoliante. La elección de uno

u otro método está influenciada por: a) condiciones climáticas (vientos fuertes, rocíos nocturnos, lluvias); b) estado de madurez del stand y porcentaje de semillas inmaduras; c) largo de la estación de cosecha; d) factores económicos; y e) costumbres y preferencias de los productores (Goss *et al.*, 1979; Jones y Marble; 1961; Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982; Moschetti y Dell'Agostino, 1979). La mayoría de los productores de semilla en la Argentina utilizaba, hasta hace algunos años, el método de hilerado (Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982; Moschetti y Dell'Agostino, 1979; Stephen y Moschetti, 1976), mientras que en los EE. UU. –donde la alfalfa para semilla se cultiva intensamente– cerca de la totalidad de los productores usa el método de cosecha directa.

### *Hilerado*

El cultivo debe ser hilerado cuando del 70 al 75 % de los carreteles viran al color marrón oscuro, pero antes que las vainas comiencen a abrirse. La operación debe efectuarse durante las horas del día de mayor humedad o cuando las hojas están húmedas por efecto del rocío (Smith y Melton, 1967). En general, cuando se deben cosechar cultivos de maduración tardía (con un alto porcentaje de vainas verdes) o cuando la humedad del suelo permanece alta, el hilerado permite obtener mayores rendimientos de semilla que el desecado y cosecha directa; ello se debe a que una alta proporción de semillas verdes completarán su madurez en la hilera (Marble, 1976; Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982; Roylance, 1968). La semilla está lista para cosecha cuando el contenido de humedad del follaje es del 12 % al 18 % (Bunnelle *et al.*, 1954).

Las pérdidas ocurridas en la barra de corte de la hileradora normalmente no exceden los 5 a 10 kg ha<sup>-1</sup> bajo condiciones óptimas de trabajo. Sin embargo, si la operación se realiza con tiempo muy seco o con fuertes vientos que desparraman las hileras antes de la cosecha, las pérdidas por el hilerado pueden exceder el 50 % de la semilla para cosechar (Goss *et al.*, 1979; Marble, 1976; Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982).

### *Cosecha directa*

La preparación del cultivo para la cosecha directa se realiza aplicando un desecante químico cuando la casi totalidad de los carretes se encuentran maduros, es decir, cuando más del 75 % de las vainas presenta un color marrón oscuro (Marble, 1976; Stephen y Moschetti, 1976). Para que la aplicación del desecante resulte más efectiva, las plantas deben presentar un crecimiento abierto y erecto y el contenido de humedad del suelo debe ser bajo, a fin de inhibir el rebrote desde la corona (Jones y Marble, 1961; Marble, 1976; Roylance, 1968) (Figura 12). Si el cultivo es muy denso y presenta abundante follaje, o si está muy enmalezado, es más eficaz efectuar dos aplicaciones separadas 2-4 días una de otra (Marble, 1976; Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982; Moschetti y Dell'Agostino, 1979; Navarrete, 1967). Una vez que el cultivo se encuentra desecado –con un contenido de humedad en hojas y vainas de 15 a 20 % y de 50 % en tallos– debe iniciarse inmediatamente la cosecha, a efectos de evitar las grandes pérdidas que a partir de allí pueden ocurrir por desgrane. En áreas con altas temperaturas, la cosecha podrá efectuarse entre 2 y 4 días después de la defoliación, mientras que en áreas con temperaturas más bajas pueden requerirse entre 5 y 12 días de espera (Jones y Marble, 1961; Marble, 1976). Efectuando un correcto ajuste del equipo antes de la cosecha, las pérdidas producidas deberán oscilar solo de 10 a 20 kg ha<sup>-1</sup> (Goss *et al.*, 1977; Goss *et al.*, 1977; Goss *et al.*, 1979; Marble, 1976).



■ **Figura 12.** Cosecha directa de alfalfa.

### *Desecantes químicos*

Los desecantes químicos o defoliantes son productos que, aplicados al cultivo, provocan una rápida y homogénea desecación del material verde con el que toman contacto, evitando el corte previo y permitiendo la



cosecha directa con la planta en pie. Como no se traslocan en la planta, no afectan el sistema radicular o la corona. Su efecto no es duradero y la planta rebrota normalmente al poco tiempo de aplicado el producto (Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982; Moschetti y Dell'Agostino, 1979; Navarrete, 1967; Roylance, 1968). Históricamente, los más usados fueron diquat y paraquat, aunque desde hace tiempo solo se utiliza el último. Las dosis para aplicaciones terrestres oscilan entre 1 y 4 l ha<sup>-1</sup> de producto formulado, con un volumen de agua no menor a 100 l ha<sup>-1</sup> y con el agregado de un mojante no iónico al 0,10 % o 0,50 %. Para aplicaciones aéreas, la dosis de producto y mojante son las mismas, pero el volumen de agua debe ser  $\geq 20$  l ha<sup>-1</sup>. La efectividad de estos productos se ve incrementada cuando la aplicación es sucedida por un período de horas sin luz, debido fundamentalmente a una mayor penetración del producto en el vegetal (Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982). Además de los dos productos citados, en EE. UU. se han usado entre otros: *dinoseb*, *pentaclorofenol*, *DNOC* y *endothal* (Jones, 1954; Jones y Marble, 1961; Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982; Moschetti y Dell'Agostino, 1979; Navarrete, 1967; Roylance, 1968). Estos últimos no se encuentran disponibles en el mercado nacional. De todos ellos, el *dinoseb* fue durante mucho tiempo el de mayor uso para la cosecha directa de semilla de alfalfa en EUA (Jones, 1954; Jones y Marble, 1961; Marble, 1976; Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982).

Por un lado, la cosecha directa con desecantes químicos ofrece ventajas sobre el método del hilerado. Entre ellas pueden mencionarse: a) reducción de la incidencia de factores ambientales sobre la cantidad y calidad de la semilla obtenida, dado que durante el proceso de secado natural de las hileras, las lluvias, el rocío y la alta humedad relativa pueden provocar humedecimientos, inicio de procesos fermentativos, ardido y manchado de la semilla, mientras que los vientos pueden originar la diseminación del material cortado (González, 1959; Jones y Bunnelle; 1953; Marble, 1976; Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982; Moschetti y Dell'Agostino, 1979; Mur, 1974; Navarro, 1958); y b) reducción significativa de pérdidas de semilla, lo que aumenta los rendimientos. Algunas experiencias arrojaron incrementos del 20 % al 32 % en el rendimiento de semilla a favor de la cosecha directa (González, 1959). Por otro lado, cuando el hilerado se realiza en

condiciones de baja humedad relativa y en presencia de fuertes vientos, las pérdidas de semilla pueden superar el 50 % (Goss, 1979; Marble, 1976). La cosecha directa con desecantes permite un secado rápido y homogéneo del cultivo, disminuyendo los riesgos del secado natural en el campo y evitando el uso del implemento recolector de las hileras. En el Valle Inferior del Río Colorado se lograron disminuir las pérdidas de semillas en más del 40 % (Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982; Moschetti y Dell'Agostino, 1979). En resumen, la metodología de la cosecha directa con desecantes implica simplificar la operación y tener una mayor seguridad de cosecha. En lo referente a la calidad del producto, se ha comprobado que la aplicación del defoliante no afecta la germinación de las semillas, aunque puede aumentar ocasionalmente el número de semillas duras (Navarrete, 1967). Tampoco se han observado problemas de manchado ni reducción del valor cultural de la simiente (Moschetti y Dell'Agostino, 1990; Moschetti y Dell'Agostino, 1982; Moschetti y Dell'Agostino, 1979). Finalmente, debe mencionarse que los incrementos de rendimiento justifican el relativamente elevado costo del desecante.

### *Doble cosecha*

Es posible efectuar dos cosechas de semilla en un mismo ciclo productivo, si se dan ciertas condiciones: larga estación de crecimiento, clima favorable, elección apropiada de la variedad (sin o con muy poco reposo invernal), disponibilidad de polinizadores para ambas cosechas, posibilidad de regar inmediatamente de realizada la primera cosecha, etc. En el país, algunas zonas productoras de Catamarca, La Rioja, San Juan y Mendoza permiten el manejo de los cultivos para la realización de dos cosechas en la temporada: una a fines de diciembre/principios de enero y la otra a fines de marzo/principios de abril.

### *Adaptación y regulación de la máquina cosechadora*

La mayoría de las cosechadoras convencionales pueden ajustarse y modificarse para efectuar un eficiente trabajo de cosecha de semilla de alfalfa. En lotes hilerados, los mejores resultados se obtuvieron cuando la plataforma de la cosechadora fue equipada con un aparato recolector de lonas que gira a una velocidad 10 a 15 % superior a la velocidad de

avance de la cosechadora. Esto debe complementarse con la colocación de un tirante de madera sobre la barra de corte, para evitar pérdidas de semilla y carreteles sin trillar por el frente de la plataforma (Goss, 1975).

Si se utiliza el método de cosecha directa, se aumenta la eficiencia de la operación colocando una cuchilla de corte vertical en el lateral derecho de la plataforma de corte de la cosechadora, en reemplazo del tradicional divisor de cultivo (Figura 13). Para cultivos implantados en hileras distanciadas, se hace necesario el uso de puntones levantadores. El molinete se utiliza solamente en el caso de cultivos ralos. La velocidad del sinfín de la plataforma debe reducirse aproximadamente al 50 % de la recomendada por el fabricante, a efectos de evitar atoramientos del material que entra al acarreador. La detallada observación de lo anteriormente citado, además de la precaución de realizar un corte lo más bajo posible cuando el terreno es parejo, minimiza las pérdidas durante la cosecha (Goss, 1975; Goss *et al.*, 1977; Harmond *et al.*, 1961; Marble, 1976; Moschetti y Dell'Agostino, 1982).



■ **Figura 13.** Cosechadora con plataforma provista de picos sopladores (air jet) y cuchilla de corte vertical.

La velocidad de avance de la cosechadora está en función de la cantidad de heno y semilla que entra a la máquina. Normalmente, la velocidad de avance más adecuada varía de 1 a 3 km h<sup>-1</sup>, manteniendo así una dosis uniforme de alimentación de material de 45 a 66 kg min<sup>-1</sup> (Goss *et al.*, 1979). En cuanto al cilindro trillador, el más usado es el de barras

estriadas. La abertura cilindro-cóncavo no debe ser mayor de 10 mm en la parte anterior y no menor de 3,1 mm en la posterior (Goss, 1979). Por un lado, una excesiva velocidad del cilindro es la causa más importante de daño y de bajo poder germinativo de la semilla cosechada; por otro lado, una baja velocidad del cilindro incrementa la pérdida de simiente no trillada. El ajuste de la velocidad del cilindro se hace sobre la base de su velocidad periférica, siendo los valores recomendados 1.280-1.465 m min<sup>-1</sup> para cultivos hilerados y 1.220-1.525 m min<sup>-1</sup> para cultivos desecados (Goss, 1979, 1975; Jones *et al.*, 1950). Las pérdidas de semilla pueden ser minimizadas con un correcto ajuste del zarandón, del sacapajas, de la intensidad de los vientos y del uso de zarandas apropiadas (Bunnelle *et al.*, 1954; Goss *et al.*, 1977; Jones *et al.*, 1950).

### *Pérdidas de semilla en la cosecha*

Se han estudiado diversas técnicas para estimar el total de pérdidas de semilla ocurridas durante la operación de cosecha (Goss, 1975; Goss *et al.*, 1977; Goss *et al.*, 1979; Harmond *et al.*, 1961; Klein *et al.*, 1961). Tradicionalmente, solo se consideraron las pérdidas por la parte posterior de la cosechadora, ya sea como simiente trillada o carreteles sin trillar. Estos valores de pérdida oscilan entre 1,5 % y 30 % del total de semilla natural cosechada, cuando se utilizan equipos de cosecha minuciosamente ajustados (Goss, 1975). Estimaciones realizadas en California sobre cultivos desecados han señalado que la mayor parte del total de las pérdidas de semilla ocurren en la plataforma de corte, habiéndose determinado valores de 20 a 60 kg ha<sup>-1</sup> en situaciones normales y de hasta 400 kg ha<sup>-1</sup> en cultivos de altos rendimientos (Goss *et al.*, 1977). Estas pérdidas pueden producirse en varios sectores de la máquina, a saber:

- Cuchilla de corte: su acción produce un importante desgrane en cultivos previamente desecados. Experiencias realizadas demostraron que las pérdidas mínimas ocasionadas por la cuchilla de corte eran siempre más del doble de las verificadas en la cola de la máquina, cuando esta funcionaba adecuadamente y en buenas condiciones de trilla. El uso del sistema de cabezal con picos sopladores (*air jet*) montados sobre puntones levantadores redujo 46 % en promedio las pérdidas por desgrane (Figura 12) (Goss *et al.*, 1977). Este sistema de cosecha, construido en el país, fue evaluado en el Valle

Inferior del Río Colorado, con resultados altamente satisfactorios (Moschetti, 1994; Moschetti, 1993).

- Divisor de cultivo de la plataforma de corte: en una plataforma convencional, el divisor de cultivo produce importantes pérdidas de semilla y de carreteles sin trillar cuando se cosecha un lote desecado. El uso de la cuchilla de corte vertical, en reemplazo del divisor, evitó pérdidas de semilla de hasta  $50 \text{ kg ha}^{-1}$  (Goss, 1979; Moschetti, 1994).
- Puntón levantador: durante la cosecha directa con plataforma convencional, una gran cantidad de tallos volcados quedan entre las hileras sin ser cortados, principalmente en cultivos en hileras distanciadas. El uso de puntones levantadores en la plataforma de corte evita estas importantes pérdidas de semilla, que pueden llegar a  $150 \text{ kg ha}^{-1}$  (Goss, 1979; Goss *et al.*, 1977; Moschetti, 1994).
- Daño mecánico de la semilla cosechada: una semilla dañada es la que presenta en cualquiera de sus componentes (tegumentos, radícula, cotiledones o embrión) fracturas, magulladuras, rajaduras o roturas que afectan negativamente su poder germinativo (Goss *et al.*, 1977; Jones, 1978; Stephen y Moschetti, 1976). Durante la cosecha, el daño mecánico de la semilla se produce en el cilindro trillador por: a) excesiva velocidad periférica (la óptima oscila entre  $1.220$  y  $1.524 \text{ m minuto}^{-1}$ ); b) abertura cilindro-cóncavo demasiado pequeña (la óptima no es menor a  $3 \text{ mm}$ ); c) insuficiente alimentación de paja y granza al cilindro, que no otorga adecuada protección a la semilla; y d) contenido de humedad de la semilla demasiado bajo.

Con un ajuste adecuado del equipo trillador, principalmente de la velocidad del cilindro, el daño de la semilla se puede reducir a valores de solo el 2 % y el poder germinativo superar el 90 % (Goss, 1979; Harmond, 1974). En el Valle Inferior del Río Colorado, en una experiencia que incluyó ocho cosechadoras, se determinó que el daño mecánico oscilaba entre el 3,5 % y el 17,5 %; en todos los casos la causa principal fue la excesiva velocidad del cilindro trillador (Harmond, 1974).

### *Manejo poscosecha*

Una vez realizada la cosecha es aconsejable remover o destruir el rastrojo lo antes posible. Este puede ser retirado mediante rastras, enfardado o

quemado. Los restos vegetales deben eliminarse para un mejor control de la avispa de la alfalfa. Un riego de poscosecha mantendrá el vigor de las plantas, ayudará en la germinación de las plantas voluntarias y acelerará la putrefacción de las semillas infectadas por la avispa (Rincker *et al.*, 1987).

## Consejos generales de manejo

- Corte de primavera: en cultivos para producción de semilla, el momento de máxima floración debe coincidir con el período de mayor actividad de los polinizadores, de acuerdo a las particularidades de cada área productora y a las especies de polinizadores presentes. El corte en primavera es utilizado para controlar malezas, reducir el desarrollo vegetativo del cultivo como consecuencia de excesivos riegos invernales, proveer forraje, o regular la floración. En relación con esto último, el objetivo es diferir la floración para una época más favorable, sea por problemas de polinización o climáticos.
- Tanto la bibliografía existente como los antecedentes prácticos presentan opiniones dispares respecto a la conveniencia de realizar el corte de primavera y su incidencia en los rendimientos de semilla. En San Juan, por ejemplo, donde los cultivos son conducidos normalmente para la obtención de dos cosechas, se ha observado una mayor fecundación de flores en plantas que no habían sido cortadas en primavera; además, al adelantarse la floración, se anticipa también la primera cosecha, eludiendo el riesgo de las lluvias de verano. La no realización del corte de primavera ofrece ventajas económicas y prácticas, dado que se suprimen varias labores culturales (corte, rastrillado, enfardado, riego adicional y carpida mecánica).
- Reguladores de crecimiento: en la producción comercial de semilla de alfalfa no suelen usarse reguladores de crecimiento o estimuladores de la floración. Varias experiencias realizadas con estos productos en Washington y California no han producido incrementos de los rendimientos (Rincker *et al.*, 1987).
- Esquema de manejo: las diferencias entre las distintas áreas productoras (suelo, clima, infraestructura, tradición, etc.) originaron diferentes sistemas de producción de semilla de alfalfa, que deben ajustarse en cada caso particular. No obstante, es posible resumir algunos esquemas de manejo generales para cada estación del

año, tanto para cultivos en implantación (a) como para cultivos establecidos (b):

- Otoño: a) siembra, riegos, aplicación de herbicidas, raleo del nuevo stand e inscripción de lotes para su certificación; y b) cosecha, eliminación del rastrojo, riego para estimular la germinación de malezas y plantas de resiembra, laboreo entre hileras, raleo de plantas establecidas y reinscripción de lotes para certificación.
- Invierno: a) riegos y labores entre hileras; y b) riegos y aplicación de herbicidas.
- Primavera: a) y b) riegos, labores entre hileras, aplicación de herbicidas para control de gramíneas, control de insectos e inicio del programa de polinización.
- Verano: a) y b) riegos (solamente los necesarios), control de insectos, finalización de la incorporación de polinizadores y cosecha.

## Producción de semilla fiscalizada

Las áreas de producción intensiva de forraje de alfalfa –para las cuales se desarrollan los cultivares– son generalmente muy poco aptas para la producción de semilla. En esos ambientes, los rendimientos son muy bajos y la semilla obtenida presenta no solo mala calidad, sino también alta proporción de autofecundaciones, con lo que disminuye su valor genético. Estos hechos hacen que la producción industrial de semilla de alfalfa deba concentrarse en áreas ecológicamente aptas y con condiciones ambientales muy distintas a las de su uso forrajero. Sin embargo, después de algunos años, la presión ejercida en esos ambientes a través de la selección natural –que permite sobrevivir solo a los genotipos mejor adaptados– origina cambios en la identidad genética de los cultivares. En ese contexto, si no se restringen el número de generaciones y la cantidad de años posibles de cosecha en cada categoría, el producto obtenido es muy diferente al originariamente implantado.

Basado en los conceptos anteriores, se definió en los EE. UU. una secuencia de generaciones limitadas para la producción de semilla certificada, que reconoce cuatro categorías o clases de semilla:

- a) prebásica, madre o del criador (*"breeder"*): producida en el área de adaptación y uso, bajo la supervisión directa del criador u obtentor;
- b) básica o fundación: usualmente, aunque no siempre, producida en el área de adaptación; cuando se multiplica fuera de esta, deben respetarse la latitud y prácticas de manejo del área de adaptación; además, los lotes deben ser visitados todos los años por el criador, a fin de mantener la pureza fenotípica de la variedad;
- c) registrada o 1.º multiplicación: se produce prácticamente en forma exclusiva fuera del área de adaptación; y
- d) certificada o 2.º multiplicación: se produce exclusivamente fuera del área de adaptación y es la semilla destinada al gran cultivo para la producción de forraje.

## Normas de certificación

Como ya fuera señalado, la multiplicación de variedades de alfalfa fuera de su área de desarrollo y adaptación debe contemplar restricciones en cuanto a: 1) generaciones de multiplicación; 2) edad de los lotes; 3) aislamiento de los lotes respecto de otros de la misma especie o variedad; 4) control de plantas extrañas; y 5) exclusión de prácticas culturales y de manejo que puedan tener efectos indeseables en los hábitos de crecimiento, floración y producción de semilla. Todos estos requisitos son esenciales para prevenir cambios genotípicos en las variedades bajo el programa de multiplicación.

En la Argentina, la producción de semilla de alfalfa es de fiscalización obligatoria, lo que implica que solo puede comercializarse semilla de alfalfa fiscalizada y de aquellos cultivares que estén inscriptos en el Registro Nacional de Cultivares. Para ello, y en el marco que fija la Ley Nacional de Semillas y Creaciones Fitogenéticas N° 20.247, el Instituto Nacional de Semillas (INASE) –organismo dependiente del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación– establece para la alfalfa las siguientes normas de certificación (RS INASE 257, 2003):

- Condiciones del campo. Los cultivos deberán establecerse en lotes donde no se hayan realizado cultivos de alfalfa en el número de años



inmediatamente anteriores según la escala que se detalla a continuación: original: 3 años, registrada: 2 años, y certificada: 1 año.

- Aislamiento. Las distancias mínimas con otros lotes de alfalfa serán:
  - a) Entre diferentes cultivares: original: se sembrará con semilla prebásica (madre o breeder) a 200 m de distancia; registrada: se sembrará con semilla original a 100 m de distancia; y certificada: se sembrará con semilla registrada a 50 m de distancia.
  - b) Entre lotes de alfalfa del mismo cultivar y diferente categoría se sembrarán a 10 m de distancia. En casos de lotes sembrados sin aislamiento, una franja de 10 m de la categoría superior contigua a la inferior pasará a integrar esta.
- Tolerancia del cultivo. Se admitirán como máximo las siguientes cantidades de plantas que no correspondan al cultivar inscripto: original: no más de 2 plantas cada 1000 plantas; registrada: no más de 5 plantas cada 1000 plantas; y certificada: no más de 10 plantas cada 1000 plantas.
- Esquema de multiplicación. El criador u obtentor indicará las categorías (N.º de generaciones) y el número de cosechas dentro de cada generación.
- Técnica del cultivo. Original y registrada: se deberá sembrar en líneas distanciadas a no menos de 0,65 m; y certificada: se podrá sembrar al voleo o en líneas; si se siembra al voleo o en líneas a menos de 0,65 m, se fiscalizará el cultivo por no más de tres años.
- Tolerancias de germinación y pureza físico-botánica de la semilla de alfalfa de cada categoría:

Categoría	Mínimo pureza (%)	Mínimo poder germinativo (%)	Máximo materia inerte (%)	Máximo semillas extrañas (%)
Original	99,5	85	0,5	0,5
Registrada o 1. <sup>a</sup> multiplicación	99,0	85	1,0	1,0
Certificada o 2. <sup>a</sup> multiplicación	98,5	85	1,5	1,5

Número máximo permitido de semillas de otras especies en una muestra de 50 g:

N.º de semillas 50 g muestra <sup>1</sup>	Certificada	Registrada	Original
Sorgo de Alepo ( <i>Sorghum halepense</i> )	4	libre	libre
Abrepuños (*)	4	4	libre
Llantén ( <i>Plantago</i> sp.)	4	4	libre
Cardos (**)	4	libre	libre
Trébol de olor ( <i>Melilotus</i> sp.) (***)	5	3	1
Rúcula ( <i>Eruca sativa</i> )	4	libre	libre
<i>Cuscuta</i> sp.	1	libre	libre
Total	6	6	1

(\*) Abrepuños: *Centaurea melitensis*, *C. calcitrapa* y *C. solstitialis*.  
 (\*\*) *Carduus acanthoides*, *Carduus pycnocephalus*, *Cirsium vulgare*, *Silybum marianum*, *Cynara cardunculus* y *Onopordon acanthium*.  
 (\*\*\*) *Melilotus*: *M. alba*, *M. indica* y *M. officinalis*.

## Consideraciones finales

La alfalfa es uno de los pilares de la producción ganadera argentina, de modo que la producción nacional de semilla de variedades adaptadas adquiere una importancia estratégica. Para ello, la actividad debe considerarse como una industria especializada, separada totalmente de la producción de forraje, y en donde las diferentes condiciones ambientales (variaciones en precipitaciones y temperatura, textura y profundidad de suelo, etc.) implican el uso de distintos sistemas de producción,

Entre los factores claves para la obtención de altos rendimientos, se destacan la existencia de un período relativamente libre de precipitaciones desde floración a cosecha, una baja densidad de siembra, el uso de hileras distanciadas, un adecuado control de malezas e insectos perjudiciales, un eficiente manejo del riego, un apropiado uso de polinizadores y una ajustada regulación de la maquinaria de cosecha (Echeverría, 1993b; Marble, 1987).

Hay una serie de principios desarrollados a través de la investigación que son conocidos y difundidos, tales como densidad de siembra, dis-

tancia entre hileras, control de malezas y uso de insecticidas. Otros, como riego y polinización, son influenciados por diversos factores y los principios científicos deben interrelacionarse con la experiencia y el conocimiento de cómo estos factores influyen e interaccionan. Si cualquier factor o principio es ignorado, el resultado será la obtención de bajos rendimientos.

A fin de afianzar la producción nacional de semilla de alfalfa es fundamental el rol estratégico de los entes gubernamentales en cuanto a la aplicación de la Ley Nacional de Semillas. De este modo, protegiendo tanto a los semilleros como a los usuarios, se podrá obtener semilla en cantidad y calidad adecuadas, evitando la producción y la comercialización de semilla ilegal o “bolsa blanca”.

Por un lado, es un tema de relevancia en los últimos años la difusión ilegal de alfalfas transgénicas con tolerancia al glifosato de amonio (“Alfalfas RR”), que se ha convertido en un serio problema para la producción nacional de semilla convencional derivado del flujo génico mediado por polen o semilla. Por otro lado, en 2018 se desreguló en el país el uso de la tecnología HarvXtra (baja lignina) apilada con un evento RR (tolerante a glifosato de amonio). De acuerdo a restricciones impuestas por la empresa propietaria de la tecnología, estas alfalfas se comercializan solo para la producción de heno, henolaje o forraje para pastoreo. En consecuencia, no está contemplada la producción de semilla en el país bajo ninguna circunstancia; toda la semilla que se comercialice será producida en los EE. UU.

De todos modos, sea por la producción ilegal de semilla RR o por uso legal de la tecnología HarvXtra + RR, es importante promover una serie de acciones que tiendan a disminuir al mínimo posible la presencia indeseada de transgenes en alfalfas convencionales (no transgénicas). El objetivo es proteger la industria nacional de semillas y evitar problemas en la producción de forraje y miel que sea destinada a mercados sensibles a la presencia de transgénicos. Entre las acciones más importantes están: a) implantación de lotes de multiplicación con semilla que no registre presencia detectada de transgénicos; b) la utilización de distancias de aislamiento entre variedades transgénicas y convencionales mayores a las estipuladas por la legislación, sugiriéndose distancias cercanas a 5 km para el caso de utilizar abejas melíferas como poliniza-

dores o bien a 600 metros para megachiles; y c) la limpieza de equipos de siembra y de cosecha, como así también, el control permanente de los procesos de limpieza, clasificación y pildorado de la semilla. Complementariamente, sería interesante analizar la posibilidad de declarar zonas libres de transgénicos para la producción especializada de semilla de alfalfa.

## BIBLIOGRAFÍA

AMORENA, J. 1993. *Manejo del cultivo de alfalfa para semilla en Catamarca. IV Jornadas Nacionales de Alfalfa. I Simposio Nacional de Alfalfa. Resúmenes. Villa María, Córdoba, Argentina. 53-54 pp.*

ARAGÓN, J. 1990. *Manejo integrado de plagas.: Primeras Jornadas de Producción de Semilla de Alfalfa. Agro de Cuyo. Jornadas N.º 2. Centro Regional Cuyo. INTA. Mendoza (Argentina).34-52 pp.*

ARAGÓN, J.; J. IMWINKELRIED. 2007. *Capítulo 9. Manejo integrado de plagas de la alfalfa. En: BASIGALUP, D.H. (Ed.). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. INTA, Buenos Aires. 165-197 pp.*

ARRETZ, V.P. 1973. *Factores de mortalidad de Megachile rotundata (Fabricius) en Chile. Revista Chilena de Entomología 7:59-78.*

ARRETZ, V.P.; E.M. MARTINEZ. 1988. *Utilización de Megachile rotundata Fab. en la producción de semilla de alfalfa. Boletín de Divulgación N.º 10. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina). 20 p.*

ARRETZ, V.P.; E.M. MARTINEZ. 1980. *Utilización de Megachile rotundata en la producción de semilla de alfalfa. Simposio de Producción de Semilla de Alfalfa. IDIA N.º 391-392: 53-63.*

ARRETZ, V.P.; E.M. MARTINEZ. 1979. *Manejo y utilización de insectos polinizadores en la producción de semilla de alfalfa en la Argentina. Informe Proyecto Alfalfa FAO-INTA. Argentina. 75/006, 36 p.*

ARRETZ, V.P.; E.M. MARTINEZ. 1978. *Manejo y utilización de Megachile pacifica en la producción de semilla de alfalfa en la Argentina. Informe Proyecto Alfalfa FAO-INTA. Argentina. 75/006, 63 p.*

ARRETZ, V.P.; L.D. ARACENA. 1975. *Utilización de Megachile rotundata Fab. en la polinización de la alfalfa. Boletín Técnico N.º 40. Facultad de Agronomía. Universidad de Chile. 15-37 pp.*

BASIGALUP, D.; R. ROSSANIGO; M.V. BALLARIO. 2007. *Capítulo 1. Panorama Actual de la Alfalfa en la Argentina. En: BASIGALUP, D.H. (Ed.). El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina. INTA, Buenos Aires. 13-25 pp.*

BACON, O.G. 1980. *Control integrado de las plagas en semilleros de alfalfa. Simposio de Producción de Semilla de Alfalfa. IDIA N.º 391-392: 34-42.*

BACON, O.G.; V.E. BURTON; J.W. MACSWAIN; V.L. MARBLE; W.P. STANGER; R.W. THORP. 1965. *Pollinating alfalfa with leaf cutting bees. California University Agric. Ext. Service. AXT 160. 13 p.*

BARBOSA, M.; M.T. AGUIAR 1983. *Estudio de la fauna polinizadora de la alfalfa. Informe preliminar temporada 82/83. Ministerio de Asuntos Agrarios. La Plata, provincia de Buenos Aires. 3 p.*

BOHART, G.E. 1957. *Pollinating of Alfalfa and Red Clover. Ann. Rev. Ent. 2: 355-380.*

- BOHART, G.E. 1972. *Management of wild bees for the pollination of crops*. *Ann. Rev. Ent.* 17: 287-312.
- BOHART, G.E. 1962. *How to manage the leaf cutting bee for alfalfa pollination*. *Utah Agric. Exp. Station. Circ. Bull.* 97. 7 p.
- BOHART, G.E.; W.P. NYE. 1976. *Insect pollinators of alfalfa grown for seed. Insects and nematodes associated with alfalfa in Utah*. *Utah Agric. Exp. Station. Bull.* 494. 33-45 pp.
- BOLTON, J.L. 1956. *Alfalfa seed production in the Prairie Provinces*. *Canada Dept. Agric. Public. N.º 984.* 12 p.
- BRASE, R.J. 1987. *Growing alfalfa seed on a perched water table*. *Proc. Alfalfa Seed Prod. Symp. Fresno, Coop. Ext. California. Univ. of Calif.* 49-51 pp.
- BRUNO, S.B. 2004. *Intoxicación con plaguicidas*. *Ciencia y Abejas N.º 50.* 5-9.
- BUNNELLE, P.R.; L.G. JONES; J.R. GOSS. 1954. *Seed harvest some grass and legume crops*. *Agr. Eng.* 35: 554-558.
- BURRIL, L.C.; W.S. BRAUNWORTH JR.; R.D. WILLIAM; R. PARKER; D.G. SWAN; D.W. KIDDER. 1988. *Pacific North West Weed Control Handbook*. *Extension Services of Oregon State Univ., Washington State Univ. & Univ. of Idaho.* 68-74 pp.
- CABRAL, D.R.; J.A. PEREYRA; M.A. OCHOA. 1985. *Alfalfa. Producción de semillas*. *Folleto N.º 78 Dirección Regional Mendoza, INTA. (Argentina).* 24 p.
- CASTRO, T.S.; M.A. LLOTTA; H. AMAT. 1990. *Producción de semilla de alfalfa con diferentes regímenes de riego y método de cosecha*. *Primeras Jornadas de Producción de Semilla de Alfalfa. Agro de Cuyo. Jornadas N.º 2 Centro Regional Cuyo. INTA. Mendoza (Argentina).* 22-28 pp.
- CRAGNAZ, A. 1990. *Necesidades y perspectivas de la semilla de alfalfa en las diferentes zonas de consumo*. *Primeras Jornadas de Producción de Semilla de Alfalfa. Agro de Cuyo, Jornadas N.º 2. Centro Regional Cuyo, INTA. Mendoza (Argentina).* 6-10 pp.
- CUDNEY, D.W.; S. ORLOFF. 1988. *Rhizome johnsongrass control in established alfalfa*. *Western Society of Weed Science. Research Progress Report. Fresno, California.* 150-151 pp.
- DAWSON, J.H. 1986a. *Dodder control in alfalfa*. *Proc. 38th Annual California Weed Conference. Fresno, California.* 149-153 pp.
- DAWSON, J.H. 1986b. *Glyphosate controls attached dodder selectivity in alfalfa*. *Proc. Western Soc. of Weed Science.* 208-209 pp.
- DAWSON, J.H.; C.M. RINCKER. 1982. *Weeds in new seedlings of alfalfa (Medicago sativa) for seed production: Competition and weed control*. *Weed Sci.* 30: 20-25.
- DAWSON, J.H.; F.M. ASHTON; W.V. WELKER; J.R. FRANK; G.A. BUCHANAN. 1984. *Dodder and its control*. *Agric. Res. Serv. and Ext. Serv. USDA Farmer's Bull. N.º 2276,* 24 p.
- DE SANTIS, L. 1974. *Megaquilas polinizadoras de la zona de Bellocq*. *Ministerio de Asuntos Agrarios 1 (2):* 9-11 (Bs. As., República Argentina).

- DELL' AGOSTINO, E. 1993. *La producción de semillas forrajeras. Su perspectiva en la Argentina. Revista de la Cámara de Semilleristas de la Bolsa de Cereales (Argentina)* 6 (20): 11-13.
- DELL' AGOSTINO, E. 1990. *Control de malezas en el cultivo de alfalfa para semilla. Primeras Jornadas de Producción de Semilla de Alfalfa. Agro de Cuyo. Jornadas N.° 2. Centro Regional Cuyo. Mendoza, INTA. (Argentina).* 68-72 pp.
- DELL' AGOSTINO, E.; C.J. MOSCHETTI; E.M. MARTINEZ. 1987. *Producción de semilla de alfalfa en el valle bonaerense del Río Colorado. Boletín de Divulgación N.° 8. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina).* 10 p.
- DOVRAT, A.; D. LEVANON; M. WALDMAN. 1969. *Effect of plant spacing on carbohydrates in roots and on components of seed yield in alfalfa (Medicago sativa L.). Crop Sci.* 9: 33-34.
- DUGHETTI, A.C. 1981. *Contribución a la evaluación del daño de Bruchophagus roddi Gussakovskii (Hymenoptera, Eurytomidae) en semilla de alfalfa. Informe Técnico N.° 22. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina).* 20 p.
- DUGHETTI, A.C.; E.M. MARTINEZ; J.M. GARCIA. 1982. *Control integrado de plagas en el cultivo de alfalfa para semilla. Boletín de Divulgación N.° 5 EEA Hilario Ascasubi, INTA (Argentina).* 9 p.
- DUGHETTI, A.C.; C.J. MOSCHETTI. 1990. *Control químico de trips en un cultivo de alfalfa para semilla. Informe Técnico N.° 33. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina).* 8 p.
- ECHEVERRÍA, E.M. 1993a. *Determinación del potencial de semilla de cultivares de alfalfa. IV Jornadas Nacionales de Alfalfa y I Simposio Nacional de Alfalfa. Resúmenes. Villa María. Córdoba. Argentina.* 57-58 pp.
- ECHEVERRÍA, E.M. 1993b. *Producción de semilla de alfalfa en áreas bajo riego: Potenciales de rendimiento y principios claves en la producción. Primeras Jornadas Nacionales de Producción de Semillas y Mejoramiento Genético de Especies Forrajeras. Conferencias y Resúmenes. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Argentina.* 31c-33c pp.
- ECHEVERRÍA, E.M.; C.E. CEREZO. 1990. *Producción de semilla de alfalfa en la Provincia de San Juan: relevamiento de cultivos. Primeras Jornadas de Producción de Semilla de Alfalfa. Agro de Cuyo. Jornadas N.° 2. Centro Regional Cuyo, INTA. Mendoza (Argentina).* 16-20 pp.
- ERICKSON (JR.), E.H.; W.T. WILSON. 1972. *Management of the alfalfa leaf-cutter bee in Colorado. Bull.* 552. Colorado State University. 17 p.
- ERWIN, D.C.; D. LEHMA. 1974. *Summer stand depletion of alfalfa in the low desert Valleys of Southern California. Proc. California and Arizona Low Desert Alfalfa Symp.* 58-64 pp.
- FICK, G.W.; D.A. HOLT; D.G. LUGG. 1988. *Capítulo 5. Environmental physiology and crop growth. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL (Ed.). Alfalfa and Alfalfa Improvement. Agronomy Series N.° 29. ASA-CSSA-SSSA. Madison, WI, EUA.* 163-194 pp.
- FISHER, W.B. 1980. *Control de malezas en la producción de semilla de alfalfa. Simposio de Producción de Semilla de Alfalfa. IDIA N.° 391-392: 23-34.*

- FISHER, B.B. 1977. *Evaluation of herbicides for vegetation management in alfalfa seed production. University of California. Coop. Ext. Fresno. Runcina. Vol. 16. 33 p.*
- FRANKLLN, W.W. 1951. *Insects affecting alfalfa seed production in Kansas. Kansas Agric. Exp. Station Tech. Bull, 70 p.*
- FREE, J.B. 1970. *Insects pollinations of crops. London Acad. Press, 544 p.*
- GARCIA, J.M.; E.M. MARTINEZ. 1985. *Plaguicidas: cómo evitar el daño en abejas melíferas. Boletín de Divulgación N.° 7 EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina). 5 p.*
- GOLDMAN, A.; A. DOVRAT. 1980. *Irrigation regime and honey bee activity as related to seed yield in alfalfa. Agron. J. 72: 961-965.*
- GONZALEZ, L.E.M. 1959. *Los defoliantes en la cosecha de semilla de alfalfa. Lucha contra la Maleza. Revista Arg. de Agronomía, Suplemento N.° 3: 144-145.*
- GONZALEZ, R. 1980. *Insectos polinizadores y ecología de la polinización. Simposio de Producción de Semilla de Alfalfa. IDIA N.° 391-392: 43-48.*
- GOPLIN, B.P. 1976. *Row spacing for alfalfa seed production. Agric. Canada Res. Branch. Forage Notes 21 (1): 6.*
- GOPLIN, B.P. 1975. *Wide row spacing for alfalfa seed production is important. Agric. Canada Res. Branch. Forage Notes 13 (20): 18-19.*
- GOPLIN, B.P.; L.G. SONMOR. 1976. *Heavy irrigation reduces alfalfa seed yields. Agric. Canada Res. Branch. Forage Notes 21(1): 12-14.*
- GOSS, J.R. 1979. *Harvesting alfalfa seed. Curso de Producción de Semilla de Alfalfa. Proyecto Programa Alfalfa FAO-INTA. Argentina, 15 p.*
- GOSS, J.R. 1975. *Combine operation and adjustment for harvesting alfalfa seed. Proc. Alfalfa Seed Prod. Symp. Fresno, California. University of California. Coop. Ext. 18-25 pp.*
- GOSS, J.R.; R. KUMAR; R. SHEESLEY. 1977. *Header losses and reduction in alfalfa seed harvesting. American Society of Agronomy. Eng. Paper N.° 77-1554, 12 p.*
- GOSS, J.R.; R. KUMAR; R. SHEESLEY; R.G. CURLEY. 1977. *Improvement of harvesting alfalfa seed in California. Proc. Alfalfa Seed Prod. Symp. Fresno, California. University of California. Coop. Ext. 24-33 pp.*
- GOSS, J.R.; R. SHEESLEY; R. KUMAR; J.J. MEHLSCHAU. 1979. *Harvest equipment innovations for saving alfalfa seed. Proc. Alfalfa Seed Prod. Symp. Fresno, California, Univ. of California Coop. Ext. 24-33 pp.*
- HACQUET, J. 1986. *La Luzerne Porte-graine. 1° Supplément au Bulletin Semences N.° 94 de la FNAMAS. Centre Technique des Semences. 28 p.*
- HAGEMANN, R. 1987. *Alfalfa seed production in Imperial Valley. Proc. Alfalfa Seed Prod. Symp. Fresno, California. University of California. Coop. Ext. 60-63 pp.*
- HAGEMANN, R.; C.F. EHLLG; M.J. HUBER; R.Y. REYNOSO; L.S. WILLARDSON. 1978. *Effect of irrigation frequencies on alfalfa seed yield. California Agriculture 32 (10): 17-18.*



- HAGEMANN, R.; L.S. WILLARDSON; A.W. MARSH; C.F. EHLLG. 1975. *Irrigating alfalfa seed yield for maximum yield. California Agriculture* 29 (11): 14.
- HARMOND, J.E. 1974. *Informe sobre trilla y procesamiento de semilla de alfalfa. Consultoría de Proyecto. Programa Alfalfa FAO-INTA. Argentina.* 12 p.
- HARMOND, J.E.; J.E. SMITH; J.K. PARK. 1961. *Harvesting the Seeds of Grasses and Legumes. U.S. Department of Agriculture. Yearbook of Agriculture. 87th Congress, House Document N.º 29. 181-188 pp.*
- HART, R.H. 1980. *Spacing and competition among high and low yielding clones of alfalfa. Can. J. Plant Sci.* 60: 1157-1162.
- HELY, F.W.; M. ZORIN 1977. *Influence of temperature and humidity on tripping of lucerne flowers. Aust. J. Agric. Res.* 28: 1015-1027.
- HENDERSON, D.W.; H. YAMADA. 1979. *Irrigation management for alfalfa seed production. Univ. California, West Side Field Stn. Annual Report.*
- HIJANO, E. 1993. *La importancia de la alfalfa en la Argentina. IV Jornadas Nacionales de Alfalfa. I Simposio Nacional de Alfalfa. Resúmenes. Villa María, Córdoba. Argentina.*
- HOBBS, G.A. 1967. *Domestication of Alfalfa Leaf Cutter Bees. Can. Dep. Agr. Pub.* 1313. 19 p.
- ITRIA, C.D.; C. BARIGGI. 1980. *Producción de semilla de alfalfa en la Argentina. Simposio de Producción de Semilla de Alfalfa. IDIA N.º 391-392: 1-4.*
- JOHANSEN, C.A.; J. EVES. 1967. *Enemies of the leaf-cutting bee and their control. Washington State University, Coop. Ext. Serv. Ext. Man.* 2631, 4 p.
- JOHANSEN, C.A.; J. EVES. 1966. *Parasites and Nest Destroyers of the Alfalfa Leaf-Cutting Bee. Washington State University. Agric. Exp. Sta. Circular* 469, 11 p.
- JOHANSEN, C.A.; F.C. KLOSTERMEYER; J.D. EVES; H.S. GERBER. 1969. *Suggestions for alfalfa leafcutter bee management. Washington State University. Ext. Serv. E. M.* 2775 (Rev), 8 p.
- JONES, L.G. 1978. *Harvester seed damage. 9th Annual Interstate Alfalfa Seed Growers Conference and Trade Fair. Pasco, WA.* 14-19 pp.
- JONES, L.G. 1954. *Chemicals for pre-harvest drying or spray curing. University of California. Agric. Ext. Serv. (mimeo).* 8 p.
- JONES, L.G.; C.P. POMEROY. 1962. *Effect of fertilizer, row spacing and clipping on alfalfa seed production. California Agriculture* 16 (2): 8-10.
- JONES, L.G.; P.R. BUNNELLE 1953. *Direct combining of small seeded legumes. University of California. Agric. Eng. Dept. (mimeo).* 6 p.
- JONES, L.G.; R.A. KEPNER. 1954. *Recent advances in legumes seed harvesting techniques. University of California. Agric. Dept. (mimeo).* 12 p.
- JONES, L.G.; V.L. MARBLE. 1961. *Alfalfa seed production. University of California. Agr. Dept. Agronomy Notes (mimeo).* 5 p.

- JONES, L.G.; R.A. KEPNER; R. BAINER; J.P. FAIRBANK. 1950. *Alfalfa seed harvesting. California Agriculture* 8 (4): 8-9.
- KLEIN, L.M.; J.E. HARMOND; W.M. HURST. 1961. *Seed losses in harvesting some grass and legume crops in the Willamette Valley, Oregon, 1953-1954. USDA, ARS 42-48, 20 p.*
- KLOSTERMEYER, E.C. 1964. *Using alkali bee and leafcutting bee to pollinate alfalfa. Washington Agr. Exp. Sta. Circular 442, 8 p.*
- KOLAR, J.J.; P.J. TORELL. 1970. *Row planting for alfalfa seed production. Agric. Exp. Sta. Univ. of Idaho. Idaho Current Information Series N.° 122, 4 p.*
- KOLAR, J.J.; H.R. ROYLANCE; J.R. RIDLEY 1968. *Cultural practices in alfalfa seed production. Agric. Exp. Sta. Univ. of Idaho. Idaho Current Information Series N.° 65, 4 p.*
- KROGMAN, K.K.; E.H. HOBBS. 1977. *Irrigation management of alfalfa for seed. Can. J. Plant Sci. 57: 891-896.*
- KRUNIC, M.D.; H. HINKS. 1972. *Voltinism in Megachile rotundata (Megacilidae: Hymenoptera) in Southern Alberta. Can. Ent. 104: 185-188.*
- LAEMMLEN, F. 1987. *Diseases affecting alfalfa seed production in Imperial Valley. In: Proc. Alfalfa Seed Production Symp., California, University of California. Coop. Ext. 64-65 pp.*
- LINSLEY, E.G. 1958. *The ecology of solitary bees. Hilgarding 27: 543-599.*
- LOVATO, A.; M. MONTANARI. 1987. *Influence of row spacing and sowing rates on lucerne (Medicago sativa L.) seed production. Abstracts International Seed Conference. Tune, Dinamarca. 6 p.*
- MANGLITZ, G.R.; R.H. RATCLIFFE. 1988. *Capítulo 22. Insects and mites. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL (Ed.). Alfalfa and Alfalfa Improvement. ASA-CSSA-SSSA. Agronomy Series N.° 29, Madison, WI, EUA. 671-704 pp.*
- MARBLE, V.L. 1987. *Management of alfalfa for seed production. Abstracts International Seed Conference. Tune, Dinamarca., 5 p.*
- MARBLE, V.L. 1980. *Manejo del cultivo de alfalfa para producción de semilla. Simposio de Producción de Semilla de Alfalfa. IDIA N.° 391-392: 6-23.*
- MARBLE, V.L. 1976. *Producing alfalfa seed in California. Div. of Agr. Sci. University of California. Leaflet 2383, 16 p.*
- MARBLE, V.L.; L.H. OCHOA; C.J. MOSCHETTI. 1986. *Capítulo 11. Producción de semilla de alfalfa. En: BARIGGI, C.; C.D. ITRIA; V.L. MARBLE; J.M. BRUN (eds.). Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa. Colección Científica, INTA. 371-442 pp.*
- MARTINEZ, E.M. 1991. *La abeja cortadora de hojas (Megachile rotundata). Secuencia o patrón de desarrollo bajo condiciones de manejo. Hoja Informativa N.° 26 EEA Hilaro Ascasubi, INTA. (Argentina). 4 p.*
- MARTINEZ, E.M. 1988. *Polinización de alfalfa (Medicago sativa L.). Utilización de abeja melífera (Apis mellifera L.). Hoja Informativa N.° 8. EEA Hilaro Ascasubi; INTA. (Argentina). 5 p.*

- MARTINEZ, E.M. 1987. *Polinización. Conceptos básicos para productores de semilla y apicultores del V.B.R.C. Boletín de Divulgación N.º 9 EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina). 8 p.*
- MARTINEZ, E.M.; A.C. DUGHETTI; J.M. GARCIA; M. BARBOSA; M.T. AGUIAR. 1989. *Alfalfa más abejas silvestres igual a mayor producción de semilla. Convenio INTA, Ministerio de Asuntos Agrarios. Buenos Aires. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina). Trifolio.*
- MARTINEZ, E.M.; A.C. DUGHETTI; J.M. GARCIA; M. BARBOSA; M.T. AGUIAR. 1988. *Abejas Nativas, su importancia en la producción de semillas de alfalfa. Hoja Informativa N.º 9. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina). 4 p.*
- MARTINEZ, E.M.; C.J. MOSCHETTI; E. DELL'AGOSTINO. 1980. *Manejo de insectos polinizadores en la producción de semilla de alfalfa. IX Seminario Panamericano de Semillas. Bolsa de Cereales. Buenos Aires, Argentina, 9 p.*
- MARTINEZ, E.M.; J.M. GARCIA; M. BARBOSA; M.T. AGUIAR. 1983. *Estudio del aporte polinífero en colmenas, como método para evaluar la incidencia de la floración competitiva en un cultivo de alfalfa para semilla. Informe Técnico N.º 25. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina). 15 p.*
- MCGREGOR, S.E. 1976. *Insects pollinations of cultivated crop plants. Agriculture Service. Unites States Departament of Agriculture, 411 p.*
- MINACCI, P.F.; S.L. LEE; R.A. MORSE. 1965. *New leaf cutter bee. Their introduction to New York State. New York State Agr. Exp. Sta. Far. Res. 31 (3): 6-7.*
- MOSCHETTI, C.J. 1994. *El INTA PROPECO y la cosecha de semilla de alfalfa mediante la incorporación a la cosechadora de un cabezal con equipo de aire. Hoja Informativa N.º 38. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina). 6 p.*
- MOSCHETTI, C.J. 1993. *Presentación de un prototipo experimental de cabezal con equipo de aire, cuchilla de corte vertical y puntones levantadores para la cosecha de semilla de alfalfa. Carpeta INTA PROPECO. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina). 9 p.*
- MOSCHETTI, C.J.; E. DELL' AGOSTINO. 1990. *La cosecha directa de semilla de alfalfa. Hoja Informativa N.º 16. EEA Hilario Ascasubi, INTA (Argentina). 4 p.*
- MOSCHETTI, C.J.; E. DELL' AGOSTINO. 1982. *La cosecha de semilla de alfalfa. Revisión Bibliográfica. Informe Técnico N.º 24. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina). 13 p.*
- MOSCHETTI, C.J.; E. DELL' AGOSTINO. 1980. *Consideraciones y resultados obtenidos en la producción de semilla de alfalfa en el valle bonaerense del Río Colorado. Simposio de Producción de Semilla de Alfalfa. IDIA N.º 391-392: 78-87.*
- MOSCHETTI, C.J.; E. DELL' AGOSTINO. 1979. *El uso de desecantes en la cosecha de semilla de alfalfa. Boletín Técnico N.º 18. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina). 12 p.*
- MOSCHETTI, C.J.; E. DELL' AGOSTINO; J. RIVAS. 1994. *Cuscuta: Evaluación del herbicida pendimetalín (Herbadox, E. 33%) para su control en cultivos de alfalfa para semilla. EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina), 5 p.*

- MOSCHETTI, C.J.; E.M. MARTINEZ. 1988/93. *Informes Anuales, Proyecto N.º 62-8512. "Proyecto para Incrementar la Producción de Semilla de Alfalfa en el valle bonaerense del Río Colorado". Proyecto Regional EEA Hilario Ascasubi, INTA. (Argentina), 55 p.*
- MUR, D.R. 1974. *Semilla de alfalfa: La desecación química. Renovación. Rivadavia (Est. América). Bol. N.º 36, 1 p.*
- NAVARRETE, S.E. 1967. *Usos de desecantes en producción de semilla de trébol rosado. Facultad de Agronomía. Universidad Católica de Chile, 42 p.*
- NAVARRO, L.N. 1958. *Cosecha de semilla de alfalfa. Revista de Agricultura y Ganadería (Chile) 4 (13): 5-7.*
- OCHOA, L.H. 1980. *La producción de semilla de alfalfa en la Provincia de Santiago del Estero. Simposio de Producción de Semilla de Alfalfa. IDIA N.º 391-392: 78-87.*
- OLMSTEAD, A.L.; B.W. WOOTEN. 1987. *Bee pollination and productivity growth: the case of alfalfa. Amer. J. Agr. Econ. 69: 56-63.*
- ORLOFF, S.B. 1985. *Dodder: the problem and its control. 15th Calif. Alfalfa Symposium, Fresno, California. 82-89 pp.*
- ORLOFF, S.B.; R.N. VARGAS; D.W. CUDNEY; W.M. CANEVARI; J. SCHMIERER. 1989. *Dodder control in alfalfa. California Agriculture 43 (4): 30-31.*
- PEDERSON, M.W.; G.E. BOHART; M.D. LEVIN; W.P. NYE; S.A. TAYLOR; J.L. HADDOCK. 1959. *Cultural practices for alfalfa seed production. Utah Agric. Exp. Station. Bull. 408.*
- PODUSKA, B. 1980. *Manejo de abejas melíferas para la producción de semilla de alfalfa. Simposio de Producción de Semilla de alfalfa. IDIA N.º 391-392: 49-53.*
- PODUSKA, B. 1977. *Honey bee colony certification. Proc. Alfalfa Seed Production Symp. Fresno. University of California Coop. Ext. Bull. 13, 14 p.*
- RAINERO, H.P.; N.E. RODRIGUEZ; J.A. LOPEZ; O.P. SIGNORILE. 1993. *Control de malezas en alfalfa. Alfalfa. Protección de la pastura. Agro de Cuyo, Manuales N.º 4. Centro Regional Cuyo, INTA. Mendoza (Argentina). 77-112 pp.*
- RINCKER, C.M. 1979. *Alfalfa seed production in the Pacific Northwest. Proc. Ann. Farm Seed Conf. Am. Seed Trade Assoc. Kansas City, MT. 13-19 pp.*
- RINCKER, C.M. 1976. *Alfalfa seed yields from seeded rows vs. spaced transplants. Crop Sci. 16: 268-270.*
- RINCKER, C.M.; C.A. JOHANSEN; K.J. MORRISON. 1987. *Alfalfa Seed Production in Washington. Washington State University, Coop. Ext., 12 p.*
- RINCKER, C.M.; V.L. MARBLE; D.E. BROWN; C.A. JOHANSEN. 1988. *Chapter 32. Seed Production Practices. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL (Jr.) (eds.). Alfalfa and Alfalfa Improvement. Agronomy Series N.º 29 ASA-CSSA-SSSA. Madison, WI, EUA. 985-1021 pp. ASA-CSSA-SSSA. Madison, WI, EUA. 985-1021 pp.*

- RODRIGUEZ, N.; H. RAINERO; N. RODRIGUEZ; M. VIGNA; R. LOPEZ; C. ISTILART; J. MONTOYA. 2007. *Capítulo 10. Malezas de la Alfalfa. El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina*. INTA. 207-211 pp.
- ROYLANCE, H.B. 1968. *Chemical curing of alfalfa seed crops*. University of Idaho. Idaho Current Information Series N.º 69, 2 p.
- SCHABER, B.D.; R. ENTZ. 1988. *Effect of spring burning on insects in seed alfalfa fields*. J. Econ. Entomol. 81 (2): 668-672.
- SECRETARÍA DE AGRICULTURA GANADERÍA PESCA Y ALIMENTACIÓN. 1973. *Ley Nacional de semillas y creaciones fitogenéticas*. N.º 20.247 (Disposición SNS 28/86 y 12/88. Resolución INASE 169/93 y 2/99
- SHEAFFER, C.C.; C.B. TANNER; M.B. KIRKHAN. 1988. Chapter 11. *Alfalfa water relations and irrigation*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES, R.R. HILL (Jr.). (eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agronomy Series N.º 29. ASA-CSSA-SSSA. Madison, WI, EUA. 373-409 pp.
- SHEESLEY, B. 1987. *Irrigation and pesticide effects upon honeybee visitation in alfalfa seed*. Forage & Seed Facts. University of California. Coop. Ext. 12 (1): 7.
- SHEESLEY, B. 1977. *Producing alfalfa seed in a water-short year*. Proc. Calif. Alfalfa Seed Prod. Symp. Fresno, California. University of California. Coop. Ext. Davis. 32-34 pp.
- SHEESLEY, B.; W.D. MCCLELLAN. 1978. *Alfalfa hay: seedbed preparation and establishment*. Coop. Ext. Fresno County. University of California. Leaflet.
- SMITH, D.L. 1988. Chapter 33. *The Seed Industry*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES, R.R. HILL (Jr.) (eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agronomy Series N.º 29. SAS-CSSA-SSSA. Madison, WI, EUA. 1023-1036 pp.
- SMITH, D.L.; A.K. DOBRENZ; M.H. SCHONHORST. 1982. *Response of seedling alfalfa plants to high levels of chloride-salts*. Proc. 28th Alfalfa Improvement Conf. University of California, Davis. 58 p.
- SMITH, D.L.; B.A. MELTON. 1967. *Alfalfa seed productions studies*. New Mexico Agric. Exp. Sta. Bull. 516, 12 p.
- STANGER, W.; R.W. THORP. 1974. *Honey bees in alfalfa pollination*. California University Coop. Ext. AXT 228, 4 p.
- STEPHEN, W.P. 1972. *Studies in crop pollination*. US Dep. Sci. Aff. Gen. Sec. O.A.S. N.º 1, 76 p.
- STEPHEN, W.P. 1962. *Propagation of leafcutter bee for alfalfa seed production*. Oregon Agric. Exp. Station Bull. 586, 16 p.
- STEPHEN, W.P. 1961. *Artificial Nesting sites for the Propagation of the Leafcutter Bee Megachile (Eutricharaea) rotundata for Alfalfa Pollination*. J. Econ. Entomology 54 (5): 989-993.
- STEPHEN, W.P.; C.E. OSGOOD. 1965a. *The induction of emergence in the leafcutter bee, Megachile rotundata, an important pollinator of alfalfa*. J. Econ. Entomol. 58: 284-286.
- STEPHEN, W.P.; P.F. TORCHIO. 1961. *Biological notes on the leafcutter bee, Megachile (Eutricharaea) rotundata*. Pan. Pac. Ent. 37: 85-93.

- STEPHEN, W.P.; G.E. BOHART; P.F. TORCHIO. 1969. *The biology and external morphology of bees*. Oregon State University. Corvallis Agric. Exp. Station Bull., 140 p.
- STEPHEN, W.P.; C.J. MOSCHETTI. 1976. *La cosecha de semilla de alfalfa*. Boletín N.º 1. Proyecto Programa Alfalfa FAO-INTA. 6-19 pp.
- TAYLOR, S.A.; V.L. MARBLE. 1986. *Lucerne irrigation and soil water use during bloom and seed set on red-brown earth in South-Eastern Australia*. Aust. J. Exp. Agric. 26: 577-81.
- TAYLOR, S.A.; J.L. HADDOCK; W. PEDERSEN. 1959. *Alfalfa irrigation for maximum seed production*. Agron. J. 51: 357-360.
- TESON, A.; E. DAGOBERTO. 1972. *Bionomía de la polinización de los alfalfares de la Provincia de Buenos Aires*. Informe Preliminar Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Bs. As., 3 p.
- TESON, A.; E. DAGOBERTO; M. LLZARRALDE; M. LOIACONO. 1976. *Himenópteros polinizadores de la zona de Bellocq (Buenos Aires, República Argentina)*. Rev. Ciencia y Abejas 2 (8): 33-40.
- TICKES, B.; M. OTTMAN. 1991. *Evaluation of coated alfalfa seed in Arizona*. Forage and Seed Facts 16 (2): 19.
- TYSDAL, H.M. 1946. *Influence of tripping, soil moisture, plant spacing, and lodging on alfalfa seed production*. Agron. J. 38: 515-535.
- U.S.D.A. - AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. 1960. *Harvesting seed of grass and small seeded legumes*. ARS Special Report 22-59, 10 p.
- VANCE, C.P.; G.H. HEICHEL; D.A. PHILLIPS. 1988. Chapter 7. *Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL (Jr.). (eds.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agronomy Series N° 29ASA-CSSA-SSSA. Madison, WI, EUA. 229-257 pp.
- VIEYRA, C. 1993. *Efectos del sistema de siembra en la producción de semilla de alfalfa (Medicago sativa L.)*. IV Jornadas Nacionales de Alfalfa y I Simposio Nacional de Alfalfa. Resúmenes. Villa María, Córdoba, Argentina. 59 p.
- VILLATA, C.A. 1993. *Bioecología y control de plagas en alfalfa*. Alfalfa. Protección de la pastura. Agro de Cuyo, Manuales N.º 4 Centro Regional Cuyo. INTA. Mendoza (Argentina). 32-76 pp.
- WADDINGTON, J. 1977. *Effects of applying 2,4-DB to alfalfa grown for seed*. Agric. Canada - Melfort Res. St. Forage Notes 22 (1): 68-69.
- WATERS, N.D. 1966. *Parasites, predators and nest destroyers of the alfalfa leafcutter bee*. Univ. of Idaho, Agric. Ext. Serv., Current Infor. Series 25, 3 p.
- WATERS, N.D.; H.W. HOMAN. 1975. *Managing alfalfa leafcutter bees in Idaho*. Idaho Cooperative Extension Service Bull. 538, 15 p.
- YAMADA, H.; D.W. HENDERSON; R.J. MILLER; R.M. HOOVER. 1973. *Irrigation water management for alfalfa seed production*. California Agriculture 27 (12): 6-7.



## CAPÍTULO 16

### Industrialización de la alfalfa

Daniel H. Basigalup  
y Gastón Urrets Zavalía

Además de su uso tradicional en producción animal, tanto en pastoreo directo como en pastoreo mecánico o reserva forrajera en el propio establecimiento, la alfalfa ofrece oportunidades para la confección de diversos productos industriales con destino a la alimentación animal (cubos, pellets, harina y heno de alta densidad), la elaboración de productos farmacéuticos y cosméticos y la alimentación humana. En el presente capítulo se tratan brevemente algunos de estos usos industriales del cultivo. Las técnicas de henificación, destinadas a la producción de heno de alfalfa de alta calidad, se describen con detalle en el capítulo 13 de este libro.

## Industrialización de alfalfa para alimentación animal

Los procesos de industrialización para la alimentación animal tienen como objetivo primordial aumentar la densidad de la alfalfa recogida –sea a granel u obtenida del campo en forma de rollos, fardos o megafardos– a los fines de facilitar la logística y reducir los costos de transporte y almacenamiento. Esto se logra dándole diferentes formatos al producto, que se ajusten a los distintos usos, destinos y formas de suministro. Los productos finales más usuales son: pellets, cubos, fardos y megafardos de alta densidad (Figura 1).



■ **Figura 1.** Productos más comunes obtenidos de la industrialización de la alfalfa para la alimentación animal: pellets (izquierda), cubos (centro) y megafardos de alta densidad (izquierda).

En la Tabla 1 se resumen los distintos formatos de heno de alfalfa y su efecto sobre cuestiones relacionadas con la logística de fletes.

La industrialización con destino a la alimentación animal involucra en todos los casos procesos de compactado, y en algunos también de secado de la alfalfa utilizada como materia prima.



■ **Tabla 1.** Densidad media del heno de alfalfa bajo los diferentes formatos y efecto sobre el flete.

Formato	Peso (kg)	Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	Capacidad transporte camión	
			unidades	toneladas
Fardo	21	140	750	16
Rollo	470	195	30	14
Megafardo	470	254	48	23
Megafardo de alta compactación	670	282	36	24
Megafardo recompactado	770	417	38	28-30
Megafardo recompactado angosto	430	395	70	28-30
Megafardo recompactado corto	430	485	70	28-30
Pellet		700		28-30
Cubo		460		28-30

En términos generales, el compactado puede ser llevado a cabo mediante prensas en cámaras de sección variable o fija, o bien mediante proceso de pelletizado o cubeteado. Por su parte, el secado puede hacerse de dos maneras fundamentales: 1) a campo, a través de la exposición directa al sol hasta alcanzar los valores de humedad objetivo para el producto (comúnmente 12-14 % si se destina a exportación directa, con o sin recompactado en industria; o 12-18 % si su destino inmediato es el mercado interno); o 2) recibir un preoreado a campo, haciendo descender la humedad hasta valores próximos a 30-40 %, y luego completar el secado en horno hasta alcanzar la humedad objetivo según el producto y destino final. Las dos formas de secado tienen sus ventajas y desventajas. Por un lado, el secado a campo tiene obviamente menores costos, pero expone la alfalfa más tiempo a la probabilidad de ocurrencia de inclemencias climáticas, que pueden causar daños importantes y, en algunos casos, totales. Este sistema es el utilizado en los estados del oeste de Estados Unidos, donde la alfalfa se produce en ambientes áridos bajo riego con condiciones de clima mediterráneo (lluvias invernales y veranos secos). Por otro lado, el secado artificial no solo reduce los riesgos de exposición del material a la lluvia, sino también permite

controlar y uniformizar el proceso de deshidratado; como contrapartida, requiere de grandes inversiones en infraestructura, importantes costos en combustible y de un ajustado proceso de logística hacia y dentro de la planta de deshidratado. No obstante, en zonas de producción de clima húmedo o subhúmedo, el secado artificial se torna poco menos que imprescindible si se quiere asegurar el logro de volúmenes importantes de producto de alta calidad. Este es el sistema predominante en la producción de heno de exportación del continente europeo.

Cuando el material es secado a campo, ingresa a planta de procesamiento usualmente en forma de heno empaquetado bajo los formatos de fardo, rollo o megafardo (Figura 2). Normalmente, este sistema de recolección del material es realizado cuando el destino es el recompactado directo (sin secado artificial), por lo que debe ingresar con un muy bajo contenido de humedad (rango usual: 12 a 15 %). Por el contrario, si la finalidad es la producción de pellets o cubos, donde el secado es terminado a través de esos procesos que requieren cierta temperatura, o si el heno es desmenuzado en una planta ubicada en una zona de alta demanda atmosférica, que le permite al material perder los últimos puntos de humedad antes de su recompactado, el heno puede ingresar con algunos puntos más de humedad (> 15 %).

Si se opta por el ingreso a planta del material a granel (no empaquetado), el secado puede realizarse directamente al sol hasta el nivel de humedad final, o bien puede realizarse un preoreado a campo (sol directo) y posteriormente completarse el secado en el horno de la planta de procesamiento. En este último caso, el material preoreado al sol puede ser recogido del campo mediante una picadora con recolector pick-up y cargado en camión o carro forrajero (Figura 3), o bien ser recogida directamente por carros recolectores, provistos o no de procesador de fibra, que se movilizan tirados por tractores o autopropulsados (Figura 4).

Como norma general, los procesos de industrialización de la alfalfa deben conservar sus excelentes cualidades alimenticias, básicamente su concentración proteica y –según el formato de procesamiento y presentación– su contenido de fibra efectiva. Esto último es posible con todos los productos anteriormente mencionados, menos con un producto industrial no mencionado hasta ahora: la harina de alfalfa. Esta última, que es la alfalfa (tallos y hojas) secada y molida, se usa

principalmente como fuente de proteínas y minerales en la confección de alimentos balanceados, pero –por sus condiciones físicas– no es fuente de fibra efectiva. Un caso similar ocurre con los pellets, que por sus pequeñas dimensiones tampoco son fuente de fibra efectiva para bovinos, pero que se utilizan en forma directa para la alimentación de rumiantes menores, equinos, cerdos, conejos, aves y mascotas; o en forma indirecta, como integrantes de alimentos balanceados para variados tipos de animales.



■ **Figura 2.** Materia prima secada a campo y empaquetada como megafardos (arriba) o rollos (abajo). El proceso tiene menores costos, pero mayor riesgo de pérdida de calidad por lluvias.



■ **Figura 3.** Recolección de alfalfa preoreada en campo para su traslado a planta de procesado a través de una picadora con recolector pick-up sobre camión (izquierda) o sobre carro forrajero (derecha). Fotos: gentileza de las empresas Claas y New Holland.



■ **Figura 4.** Recolección de alfalfa preoreada en campo para su traslado a planta de procesado a través de carros forrajeros dotados o no de sistema cutter. Fotos: gentileza de las empresas Krone, CMC y Pottinger.

### *Pellets*

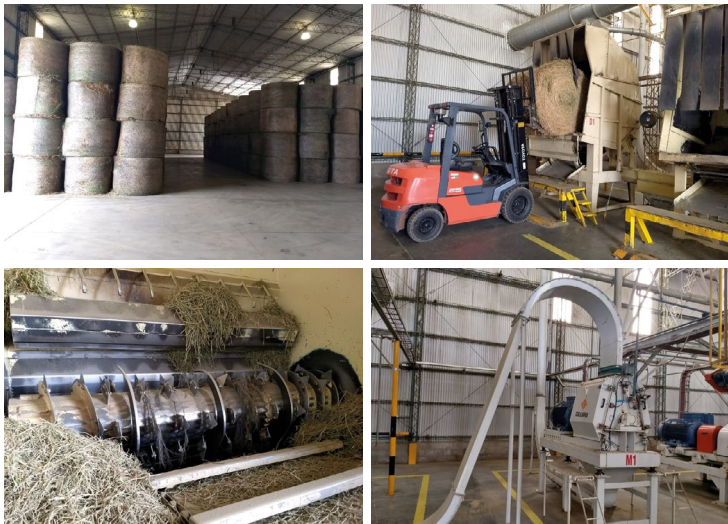
El proceso de fabricación de pellets consiste en moler y prensar la alfalfa cortada y secada por medio de las distintas alternativas descritas previamente (Figura 5). La pelletización se lleva a cabo en condiciones de presión y temperatura controladas, forzando el paso del material a través de los orificios de una matriz, de forma tal que la alfalfa salga como pequeños cilindros de 5 a 13 mm (usualmente 8 mm) de diámetro y de 10 a 30 mm de largo.





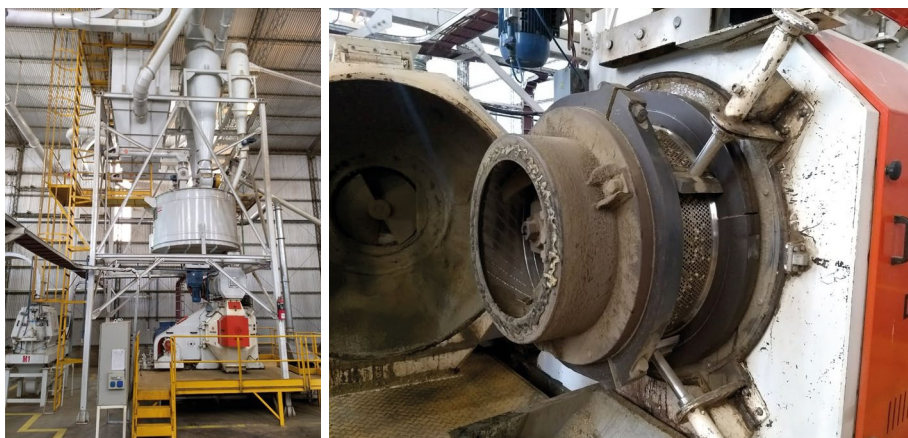
■ **Figura 5.** Vista general de la planta de pelletizado que la firma Pellfood S. A. posee en la localidad de Calchín, provincia de Córdoba, Argentina.

Cuando el material que ingresa a planta lo hace en forma de fardo, rollo o megafardo, debe ser primero desmenuzado y cortado, a fin de estar en condiciones de pasar a los siguientes pasos del proceso de pelletización (Figura 6). En estos casos, la mayoría de las plantas ingresan a las desmenuzadoras henos empaquetados que tienen hasta el 24 % de humedad. Por el contrario, si la alfalfa que ingresa a planta ha recibido un preoreado a campo y debe completar su secado artificialmente, debe pasar primero por el horno de secado para ser seguidamente molido.



■ **Figura 6.** Pasos iniciales del proceso de pelletización. Arriba-izquierda: estiva de materia prima (en este caso rollos) agrupada por partidas de calidad homogénea. Arriba-derecha: ingreso de material a la desmenuzadora. Abajo-izquierda: trozado de la alfalfa dentro de la desmenuzadora. Abajo-derecha: conducción del material desmenuzado (por succión) hacia el sistema de molienda. Fuente: Pellfood S. A.

La alfalfa desmenuzada y cortada es seguidamente succionada hacia los molinos, donde es reducida a partículas de unos pocos mm de tamaño. A continuación, ese material molido es conducido por succión de aire –generada por turbinas– hacia un ciclón donde se separa el polvo (que es filtrado y transferido fuera del sistema) de la alfalfa molida, que cae por gravedad a una tolva donde es homogeneizada y almacenada para ser pelletizada. El pelleteo ocurre al pasar bajo presión la alfalfa molida por una matriz alveolada a una temperatura de 70° a 80 °C (Figura 7). Algunos sistemas de pelleteo utilizan vapor para dar mayor consistencia al pellet; no obstante, las tecnologías más modernas prescinden del vapor haciendo el proceso algo más sencillo y directo.



■ **Figura 7.** Izquierda: sistema de succión hasta módulo de decantado y homogeneizado. Derecha: sistema de pelletizado con matriz alveolada. Fuente: Pellfood S. A.

Los pellets recién formados son transportados por una cinta al módulo de enfriado (Figura 8), donde el intercambio calórico se hace normalmente con aire a temperatura ambiente. Una vez enfriado, el producto es pasado a través de zarandas que separan los pellets propiamente dichos del material molido no pelletizado; este último es recuperado y reenviado a la tolva de homogeneización para una nueva pasada por la pelletizadora.

Los pellets son finalmente transportados por un sistema de cangilones al módulo de empaque, donde se envasan en bolsas de 25 o 40 kg o bien se colocan en big bags de 1 a 1,5 t; o son depositados en silos aéreos para su transporte a granel (Figura 9). El producto final (pellet) tiene un contenido promedio de humedad del 11 al 13 %.



■ **Figura 8.** En el módulo de enfriado los pellets alcanzan la temperatura ambiente y son zarandeados para separar el material no pelletizado. Seguidamente, los pellets son conducidos hacia el módulo de empaque o de descarga a granel. Fuente: Pellfood S. A.



■ **Figura 9.** Módulo de empaquetado (izquierda), donde los pellets se envasan para su comercialización en bolsas de 25 o 40 kg (centro-izquierda) o en big bags de 1 a 1,5 t (centro-derecha). Otra opción es el transporte a granel en camiones (derecha). Fuente: Pellfood S. A.

Previo a la salida de planta para su transporte y comercialización, el proceso se completa con rigurosos análisis de laboratorio para determinar su calidad, particularmente los contenidos de proteína (PB), fibra (FDN y FDA) y cenizas, porcentaje de humedad y presencia de aflatoxinas.

### *Cubos*

Durante siglos, el heno fue un recurso recogido en forma manual y almacenado a campo en parvas. La búsqueda de un método que redujera el volumen ocupado por este comenzó a gestarse a fines del siglo XIX con la introducción de la prensa de heno. Durante la década de 1940, la

enfardadora automática de hilos revolucionó las técnicas de henificación, logrando al mismo tiempo reducir la demanda de mano de obra y obtener un heno más denso, que permitía reducir el volumen a igualdad de peso del producto. Paralelamente, comenzaron intentos para pelletizar el heno, proceso que permitía mantener la calidad nutricional del forraje al tiempo que facilitaba su manejo y transporte. No obstante, los inconvenientes con esa nueva tecnología derivaban de las necesidades de inversiones importantes de equipamiento para el deshidratado y el pelletizado estacionario.

En la década de 1950, la industria orientó parte de sus esfuerzos a obtener una máquina de pellets para trabajar directamente en condiciones de campo, concepto que asomaba como la gran innovación tecnológica y al que se abocaron paralelamente en los Estados Unidos las empresas John Deere (JD) e International Harvester (IH). En 1958, IH desarrolló un modelo experimental de “granulador de campo” y lo exhibió a sus distribuidores. Por su parte, JD invirtió varios años en el desarrollo de prototipos que fueron evaluados a campo en Arizona y California. Finalmente, entre 1965 y 1983 JD logró lanzar al mercado máquinas automotrices –como el modelo JD 425 Cuber (Figura 10)– que fabricaban cubos directamente desde la andana de alfalfa secada a campo. Estos equipos encontraron un nicho de mercado no muy significativo, concentrado básicamente en los estados de Arizona, California y Nuevo México. A nuestro país llegaron unas pocas unidades. La escasa difusión de esta maquinaria se debió a su baja capacidad de trabajo, la corta ventana de humedad de funcionamiento, su alto consumo de combustible en comparación con otros métodos más modernos de confección y sus altos requerimientos de mantenimiento. A nivel mundial, estos equipos fueron rápidamente reemplazados por las rotoenfardadoras.



■ **Figura 10.** Cubeteadora autopropulsada John Deere 425 Cuber difundida en los Estados Unidos en la década de 1970.



Desde el punto de vista de la confección del cubo, la alfalfa tiene un adhesivo natural en la superficie de sus tallos que facilita la unión de las partículas y contribuye a darle consistencia. Para que esta cementación funcione, el forraje debe secarse hasta un contenido de humedad de aproximadamente 10-12 %. Es importante que el proceso de formación de cubos se haga con alfalfa pura, ya que si la masa de forraje incluye gramíneas y malezas, éstas irán en detrimento de la cohesión del cubo y harán que se desmorone. Para ayudar a que el adhesivo se extienda uniformemente en ocasiones la hilera se rocía con agua. Una vez alcanzada la humedad adecuada, la máquina cubeteadora recoge el material, lo pica en trozos de 7 a 10 cm y lo pasa a la matriz de prensado donde se forman prismas de aproximadamente de 3 x 3 x 5-7 cm, que son depositados en una tolva y finalmente trasladados a la planta para su empaque o almacenamiento.

La producción de cubos en plantas industriales conlleva un proceso similar al descrito para la de producción de pellets, con la diferencia sustancial de no incluir la molienda de la fibra. Tanto la forma de secado como el ingreso de la materia prima son las mismas que las explicitadas para la generación de pellets. Una vez ingresada la alfalfa a línea de producción, el segundo paso es pasar la materia prima por unos rodillos con cuchillas que pican la alfalfa en trozos de 5 cm. Hay sistemas que ingresan la alfalfa ya picada, por lo que –en estos casos– el pasaje para picado obviamente ya no es necesario. Seguidamente, a través de cintas transportadoras, la alfalfa picada es trasladada a la tolva que alimenta la cubeteadora, que con presión y a una temperatura de 70-80 °C origina cubos (lados iguales) o prismas (más largos que anchos) de distintas dimensiones. A continuación, los cubos son conducidos hacia el módulo de enfriado, que trabaja a temperatura ambiente. Finalmente, los cubos ya enfriados van a la sección de embolsado (35 o 45 kg) o se cargan a granel (Figura 11). Además de los nutrientes propios de la alfalfa, los cubos pueden proveer fibra efectiva, aunque sin llegar a los niveles de los megafardos, fardos o rollos.

### *Fardos y megafardos recompactados*

Si bien existe un mercado nacional e internacional de pellets –para animales menores, mascotas y balanceados– y cubos –por su buen contenido

de fibra efectiva y facilidad de almacenamiento—, el mercado mundial de heno de alfalfa se orienta hacia la producción de fardos y megafardos recompactados, especialmente para tambos y feedlots. Aunque los mercados pueden requerir diferentes maneras de presentación, las más difundidas son los “megafardos recompactados”, que tienen dimensiones tradicionales, pero con un peso entre los 750 y 800 kg, y los “medios megafardos”, similares a los anteriores, pero con la mitad de su longitud y comúnmente algo más densos (Figura 12). Ambos tipos pueden ser requeridos tanto sunchados como con una cubierta de arpillera plástica en sus cuatro caras. Otro formato muy demandado es el de “fardos pequeños densos”, que son de iguales dimensiones que los fardos tradicionales, pero que tienen el doble de peso (40 kg). Otra variante es mantener el peso tradicional (en torno a los 20 kg), pero con la mitad de tamaño de un fardo pequeño tradicional.



■ **Figura 11.** Confección de cubos de alfalfa en planta de la firma James Farm Inc. (Estados Unidos). El proceso incluye desde la recolección del material henificado en el campo (arriba-izquierda) hasta la carga a granel en un camión para su transporte y comercialización (abajo-derecha).



■ **Figura 12.** Megafardo entero (izquierda) y medio megafardo (derecha). Los dos están confeccionados con alta compresión y sunchados o fajados, conforme un tipo de demanda del mercado mundial. Fuente: Mega Alfalfa Argentina S. A.

La industria del deshidratado y recompactado de heno de alfalfa en formato de megafardo es liderada mundialmente por los países europeos, principalmente España, Francia e Italia, y en menor medida Alemania, Países Bajos y Reino Unido. En el año 2018 operaba en estos países un total de 199 plantas que produjeron 3,2 millones de t de alfalfa deshidratada y forraje verde (Duursema, 2018). En dichos países, la industria se encuentra organizada en asociaciones nacionales, como en España AEFA (Asociación Española de Fabricantes de Alfalfa Deshidratada); en Italia AIFE (*Associazione Italiana di Forragge Esecati* (Asociación Italiana de Forraje Deshidratado)); y en Francia *Coop de France Déshydratation* (Cooperativa Francesa de Deshidratadores). A su vez, estas asociaciones nacionales se nuclean en la CIDE (*Commission Intersyndicale des Déshydrateurs Européens* (Comisión Inter-Asociaciones de Deshidratado Europeas)), que tiene sede en Bruselas (Bélgica) y que se encarga básicamente de bregar por los intereses del sector ante la Comunidad Europea.

En 2018/19, España generó 1,35 millones de t año<sup>-1</sup> de alfalfa, producidas en alrededor de 250.000 ha y procesadas en 69 plantas (Figura 13). El 78 % de esa producción es exportado hacia países árabes y más recientemente también a China, haciendo que sea el principal productor de Europa y el segundo exportador mundial de alfalfa (Agrodigital, 2019). Además, es el mayor proveedor de alfalfa deshidratada en el mundo. Aproximadamente el 78 % de esa producción se canaliza en forma de megafardos o fardos recompactados, mientras que el 22 % restante es comercializado como pellets (AEFA, 2019).

Por su parte, Italia produce unas 800.000 t año<sup>-1</sup> de alfalfa deshidratada, obtenidas en cerca de 90.000 ha y procesadas en 48 plantas deshidratadoras, que emplean más de 13.000 personas en todo el país (AIFE, 2019). La planta del grupo Cari, con capacidad de procesar 120.000 t año<sup>-1</sup>, es la más grande del país. Francia es el tercer productor europeo de alfalfa

deshidratada. Tiene una superficie total cercana a las 300.000 ha, entre alfalfa pura y consociada con otras forrajeras, de las cuales destina al deshidratado cerca de 68.000 ha. Para ello, y dependiendo de la zona de producción, se efectúan de 3 a 5 cortes por temporada, que se preorean al sol por espacio de 24 a 48 h y luego se recogen por medio de recolectoras-picadoras y se llevan a la planta de deshidratado, a las que ingresan con no más del 70 % de materia seca (MS). Francia cuenta con 29 plantas, operadas por 10 cooperativas y dos empresas privadas, que procesan el forraje producido en una radio de menos de 30 km de cada planta. La producción total del país es de alrededor de 700.000 t año<sup>-1</sup> de alfalfa deshidratada, de las cuales 440.000 t se comercializan como pellets y 260.000 t como megafardos. En la Tabla 2 se resumen la producción de alfalfa y el número de plantas deshidratadoras de los países europeos nucleados en la CIDE (Duursema, 2018).



■ **Figura 13.** Planta industrializadora de heno de alfalfa perteneciente al Grupo Gaset, que se integra por las empresas Catalana de Farratges d'Ivars d'Urgell y Fagavi de Vila-Sana y que desde 2012 está asociada a la firma emiratí Al Dahra Agriculture Company (AEFA, 2019).

■ **Tabla 2.** Producción de alfalfa deshidratada en los países europeos miembros de la CIDE. Adaptado de Duursema (2018).

País	t año <sup>-1</sup> de alfalfa deshidratada	N.º de plantas deshidratadoras
España	1.350.000	69
Italia	800.000	48
Francia	700.000	29
Alemania	220.000	37
Países Bajos	120.000	6
Reino Unido	31.000	10

En materia de deshidratado de alfalfa, Argentina contaba hasta 2019 con solo dos plantas pertenecientes a empresas privadas: una ubicada en la localidad de San Vicente, provincia de Córdoba, con una capacidad de procesado de  $20 \text{ t h}^{-1}$ , y otra en la localidad de Fernández, provincia de Santiago del Estero, con capacidad para  $25 \text{ t h}^{-1}$ . Ambas plantas producen megafardos recompactados con destino a la exportación. Se suman a ellas otras tres empresas que no deshidratan, pero sí recompactan megafardos producidos con secado natural a campo: una que opera en el Parque Industrial de Bahía Blanca (Buenos Aires), otra en Calchín (Córdoba) y una tercera en la localidad de Villa Mercedes (San Luis). No obstante, el futuro en el mediano plazo aparece como promisorio porque existen numerosos proyectos en estudio para instalar plantas de recompactado y deshidratado en otras regiones del país. El principal escollo para su concreción es la alta inversión que se necesita para la instalación de este tipo de emprendimientos.

El proceso de deshidratado y compactado se inicia con la recepción del material en el playón de ingreso y estiba de la planta (Figura 14), separando la materia por niveles de calidad y humedad. Previo al ingreso a planta, los camiones o carros forrajeros, que traen la alfalfa usualmente preoreada en los lotes de producción en el campo, son pesados y muestreados. A continuación, la alfalfa ingresa al horno de secado a través de la boca de recolección y la cinta transportadora (Figura 15). En el horno o tromel de secado (Figura 16), que comúnmente cuentan con palas longitudinales multivoltaje en su interior, el material va rotando lentamente a una temperatura de entre  $250$  y  $350 \text{ }^\circ\text{C}$  a lo largo de los 3 a 5 minutos que le lleva recorrer toda la extensión del tromel. Esta exposición a corrientes de aire caliente, generado por medio de un quemador (Figura 17), permite al material reducir rápidamente su contenido de humedad a valores de 12 a 14 %. La tendencia en las plantas más modernas, a fin de evitar posibles daños a la alfalfa, es incrementar la duración del secado mediante la utilización de temperaturas de  $\leq 180 \text{ }^\circ\text{C}$ . Obviamente, cuanto mayor sea el contenido de humedad de la materia prima, mayor será la temperatura y el tiempo de secado que se necesitarán para alcanzar el nivel de humedad final deseado, lo que a su vez incrementará el consumo de combustible e impactará de manera directa en los costos del sistema.





/// **Figura 14.** Recepción y estiba de alfalfa preoreado en parvas según calidad durante el ingreso a una planta de deshidratado en España. Foto: gentileza AEFA.



/// **Figura 15.** Carga del material en la boca de recepción del tromel de secado. Foto: gentileza de Apisa S. L., España.



/// **Figura 16.** Vista general del proceso de construcción de una planta de deshidratado y recompactado, donde se aprecia el el tromel de secado (centro) y el quemador (izquierda). Foto: gentileza Apisa S. L., España.



/// **Figura 17.** Quemador de gas conectado al extremo del tromel. Imagen de un modelo de la firma AYPE, España. Foto: gentileza Apisa S. L., España.

Al salir del horno o tromel de deshidratado, la alfalfa ingresa al módulo de decantación de partículas extrañas y separación de polvo (Figura 18). Este paso es importante porque elimina no solo los elementos extraños que hayan podido ingresar al sistema (piedras, metales, insectos, plumas, etc.), sino también los materiales finos (polvo), especialmente tierra.



■ **Figura 18.** Módulo de decantado de partículas (izquierda) y separador de materiales finos y polvo (derecha). Foto: gentileza Apisa S. L., España.



■ **Figura 19.** Túnel de enfriado por donde el material es expuesto a corrientes de aire frío. Foto: gentileza Apisa S.L., España.

Seguidamente, una vez enfriado (Figura 19), el material deshidratado accede al sistema de prensado, donde por acción de un pistón hidráulico es compactado en una cámara de sección variable (Figura 20, izquierda). El techo y las paredes laterales del túnel de compactación están normalmente articulados y son abatibles, con lo que se consigue una gran retención del material. Seguidamente, los megafardos de alfalfa compactada son atados con hilos o sunchos, o bien envueltos con una tela tipo arpillera plástica o con una tela de plástico resistente (Figura 20, derecha). El atado o la envoltura plástica tiene como objetivo principal la sujeción del material en el megafardo. La densidad promedio de los megafardos recompactados se encuentra en torno a los  $415 \text{ kg m}^{-3}$  y la de los medio megafardos recompactados en torno a los  $480 \text{ kg m}^{-3}$ .



■ **Figura 20.** Izquierda: modelo de prensa compactadora de heno de la firma Imabe Iberica (España). Foto: gentileza Apisa S. L., España. Derecha: modelo de prensa compactadora fabricado por Hunterwood (Canadá) y envoltura plástica del producto en la planta de la empresa Mega Alfalfa Argentina S. A.

Finalmente, los megafardos o los medio megafardos recompactados son almacenados y estibados en partidas de calidad uniforme para su estacionamiento y posterior comercialización (Figura 21).



■ **Figura 21.** Estibas de megafardos de alfalfa deshidratada (12 a 14 % de humedad) envueltos con tela plástica listos para su comercialización en la planta de la empresa Mega Alfalfa Argentina S. A. en Fernández, Santiago del Estero.

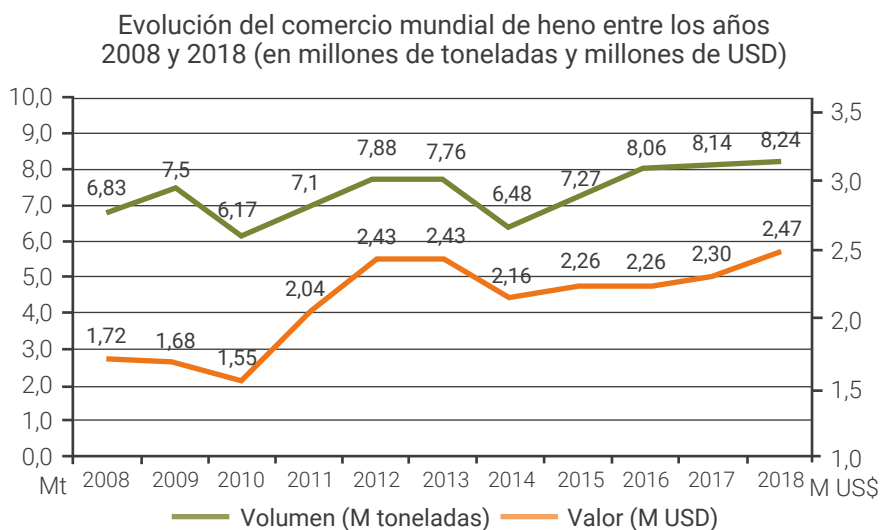
## Comercio mundial de henos

Durante los últimos 20 años, el comercio mundial de henos (alfalfa y gramíneas) ha experimentado una notable expansión, con una tasa promedio de crecimiento entre 2001 y 2016 de 266.000 toneladas métricas



por año ( $t \text{ año}^{-1}$ ) (Putnam *et al.*, 2018). Si bien este incremento resulta de la combinación de varios factores, hay dos sobresalientes: las serias limitaciones en el uso del agua en varios países de Asia y Oriente Medio y el incremento global de la demanda de productos lácteos y de proteínas de origen animal.

El mercado mundial de henos está dominado por la alfalfa, seguido por gramíneas de alta calidad como timote (*Phleum pratense*), pasto Sudán (*Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp. *Drummondii* (Nees ex Steud.) de Wet & Harlan), bermuda (*Cynodon dactylon*) y avena (*Avena sativa*). Según el *International Trade Centre* (ITC, 2018), durante 2018 se comercializaron en el mundo un total de 8,24 millones de t por un valor global cercano a los 3.200 millones de dólares (Figura 22). Los principales proveedores fueron Estados Unidos (4,44 millones de t), Australia (1,14 millones de t), España (0,945 millones de t), Canadá (0,41 millones de t) y Francia (0,25 millones de t). El restante 15 % se conformó por Italia, México, Rumania, Alemania, Países Bajos, Argentina, Alemania, Mongolia y Rumania, entre otros.

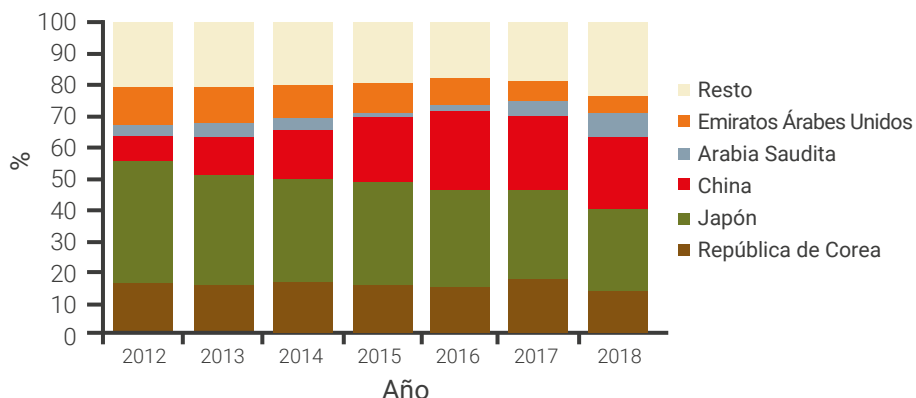


Fuente: Urrets Zavalía - Gilleta en base a datos ITC - International Trade Centre

**Figura 22.** Evolución del mercado mundial de henos entre los años 2008 y 2018 expresado en millones de toneladas y miles de millones de dólares. Elaborado con datos del *International Trade Centre* (ITC, 2019).

Si se hace referencia solo al mercado de heno de alfalfa, la cifra total comercializada en el mundo rondó los 6 millones de t en 2018, siendo Estados Unidos el principal proveedor (55 %), seguido por España (9 %), Canadá (5 %), Italia (3 %) y Francia (2 %). Por su parte, Argentina solo contribuyó con 1,6 % (97.000 t), por un total de 13,3 millones de dólares. Los mayores importadores fueron Japón, China, Corea, Emiratos Árabes Unidos y Arabia Saudita, que constituyeron el 84 % de la demanda mundial. Durante los últimos diez años, es notorio el incremento de la demanda por parte de China, Emiratos Árabes y Arabia Saudita, que pasaron de importar cantidades prácticamente insignificantes en 2007 a millones de t en 2018 (Figura 23).

#### Participación relativa en las importaciones mundiales de heno de fibra larga (%)



Fuente: Urrets Zavalía - Gilleta en base a datos ITC - International Trade Centre

**Figura 23.** Participación relativa de los principales importadores de heno de alfalfa a nivel mundial entre los años 2012 y 2018. Elaborado con datos del *International Trade Centre* (ITC, 2018).

En el caso particular de Arabia Saudita, ese crecimiento significativo de las importaciones se explica por una resolución del Consejo Ministerial dictada en diciembre de 2015 y que estableció un plazo de tres años para detener definitivamente el uso de agua de riego para producciones de forraje verde en áreas de más de 50 hectáreas. Por el contrario, la creciente demanda de China (Figura 24) obedece a razones de carácter dietario. En ese país, el aumento del poder adquisitivo de una parte importante de la población, y su consecuente incorporación a la clase media, trajo aparejado una mayor demanda de productos lácteos en su

dieta, lo que aumentó el consumo anual de leche fluida en 170 % en los últimos 15 años.



Fuente: Gilleta - Urrets Zavalía en base a datos ITC - International Trade Centre

■ **Figura 24.** Evolución de las importaciones chinas de heno de alfalfa durante el período 2005-2017. Elaborado con datos del *International Trade Centre* (ITC, 2018).

Por un lado, respecto de las exportaciones argentinas, haciendo abstracción de su muy escasa participación actual, debe considerarse que el país tiene un enorme potencial para convertirse en un proveedor importante de un mercado que presenta una demanda creciente e insatisfecha. Contribuyen a esta expectativa elementos de orden externo e interno. Entre los primeros, el principal es que no se avizora ningún crecimiento significativo de los volúmenes exportables de los principales países productores, ya que en muchos de ellos –especialmente en Europa– se han alcanzado los máximos niveles de área cultivable de alfalfa. Por otro lado, en Estados Unidos, la superficie de alfalfa viene decreciendo sostenidamente desde hace 40 años –y en especial desde 2008– debido a la competencia que ejercen otros cultivos de mayor rentabilidad o de más fácil producción (Duursema, 2018). Además, la mayor proporción de exportación de heno de alfalfa proviene de los estados del oeste, donde también se registran cuestionamientos al uso de agua para riego de esta producción extensiva que se destina a otras áreas de consumo. Por otra parte, otro hecho importante –si bien de carácter coyuntural– es el conflicto comercial entre Estados Unidos y China, que ha generado una serie de trabas arancelarias desde me-

diados de 2018 y que han impactado en las exportaciones de alfalfa a China; en consecuencia, esta situación generó nuevas oportunidades para otros oferentes, entre ellos Argentina. Además, se advirtió recientemente una tendencia en algunos países compradores para diversificar sus fuentes de importación de heno.

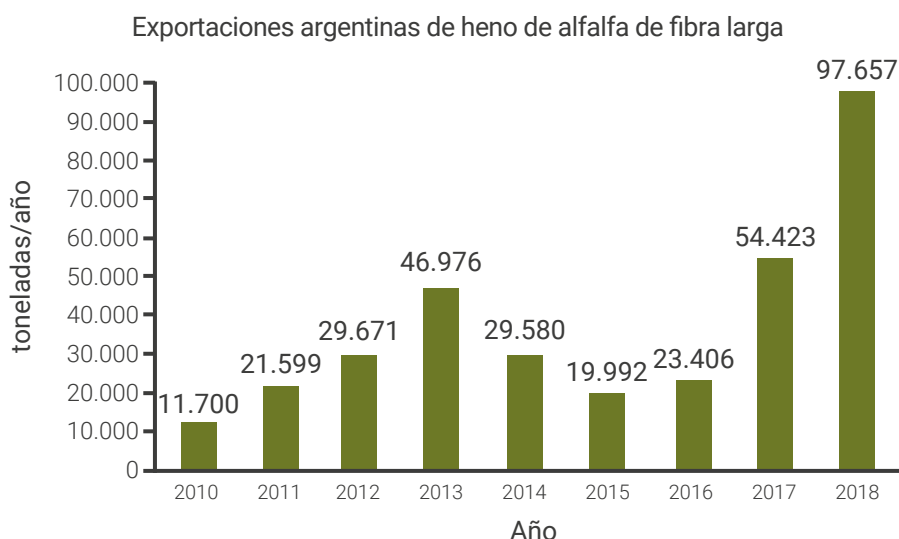
Sin embargo, para concretar el potencial que Argentina tiene para convertirse en un importante proveedor internacional de heno de alfalfa debe no solo aumentar significativamente su producción, sino también –y muy especialmente– alcanzar la necesaria calidad y estabilidad para acceder a los mercados internacionales. En este sentido, la producción estable de heno de calidad es un desafío para muchas áreas de producción, dado que las precipitaciones –a diferencia de los climas de tipo mediterráneo como los de California y España– se concentran durante el ciclo de crecimiento del cultivo. Por ello, aun en áreas con precipitaciones escasas, es difícil escapar completamente a la influencia negativa de las lluvias durante el proceso de henificación (curado) a campo. La instalación de plantas de deshidratado artificial, como en Europa, puede mejorar la obtención de alta calidad en forma consistente. Otra alternativa es mejorar el nivel de tecnología que se utiliza, de forma de tratar de minimizar estas pérdidas y conseguir una mayor producción de heno de alta calidad.

### *Exportaciones argentinas de heno de alfalfa*

Las exportaciones argentinas de alfalfa han seguido un ritmo errático, ligado fuertemente a las condiciones climáticas de cada temporada. En la Figura 25 se presentan las exportaciones argentinas de heno de alfalfa (megafardos) durante el período 2010-2018 y en la Figura 26 la discriminación del volumen exportado por países de destino. Como se aprecia, en la actualidad, el destino casi excluyente de la alfalfa nacional sigue siendo Medio Oriente, básicamente Arabia Saudita y Emiratos Árabes Unidos y, en menor medida, China, Jordania, Bolivia y otros. El mercado chino es aún muy incipiente, si bien tiene un gran potencial en el futuro mediato.

La caída de las exportaciones que se produjo en 2015 y 2016 (Figura 25) se explica por las altas precipitaciones registradas en esos años, lo que

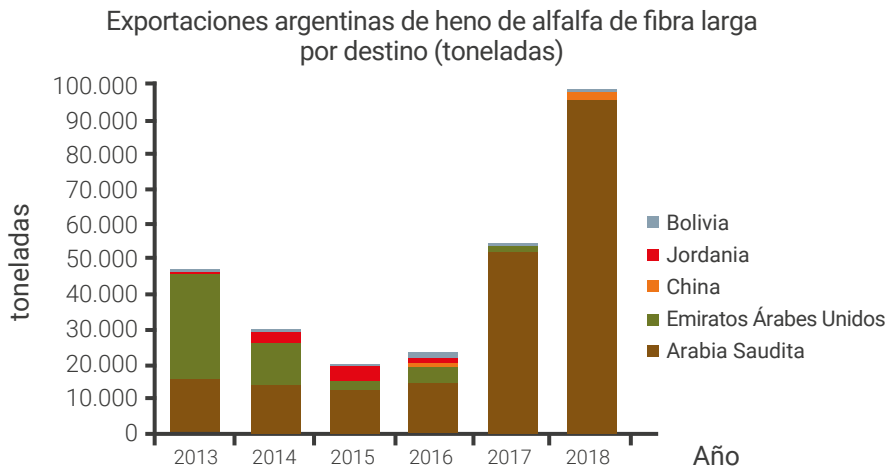
impidió que varios cortes en proceso de henificación pudieran alcanzar la calidad mínima que requiere el mercado internacional. Una forma de obviar esta situación sería la instalación de plantas de deshidratado en varias zonas productivas del país, emprendimiento que requiere de una importante inversión de capital. Debido a esto, y como ya fuera mencionado, hasta 2019 solo había dos plantas de deshidratado en el país. No obstante, es posible que esa situación cambie en los próximos años habida cuenta del creciente interés manifestado por varias empresas para desarrollar proyectos de inversión a fin de obtener la necesaria financiación.



Fuente: Gilleta - Urrets Zavalía en base a datos ITC - International Trade Centre y CAA - Cámara Argentina de la Alfalfa

**Figura 25.** Evolución de las exportaciones argentinas de heno de alfalfa en forma de megafardos entre los años 2010 y 2018. Elaborado con a datos del *International Trade Centre* (ITC, 2018) y Cámara Argentina de Alfalfa (Brigante, comunicación personal).

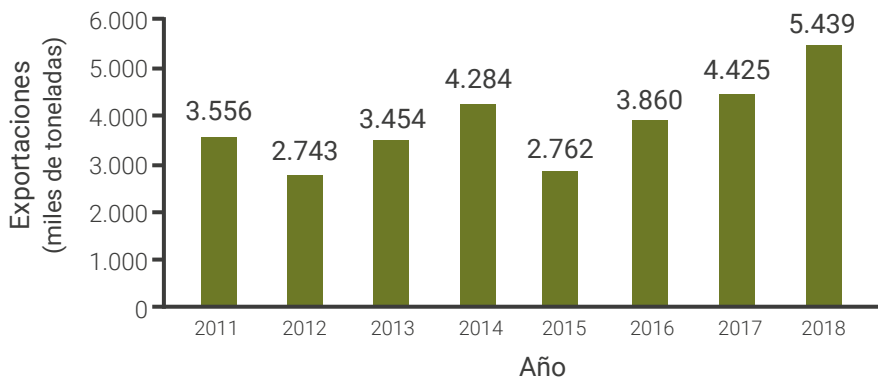
Respecto a las exportaciones argentinas de pellets de alfalfa, el país exportó en 2018 un total de 5.439 toneladas (Figura 27), por un valor de 1.063.000 dólares. Como se aprecia en la Figura 28, el destino de esta producción continúa siendo fundamentalmente Latinoamérica, que totaliza el 97 % de lo exportaciones del país.



Fuente: Urrets Zavalía - Gilleta en base a datos ITC - International Trade Centre y CAA - Cámara Argentina de la Alfalfa

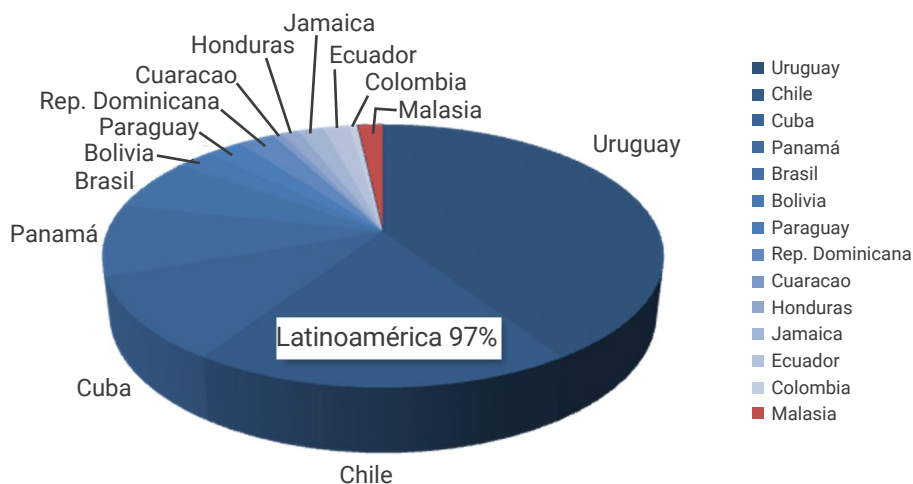
■ **Figura 26.** Evolución de las exportaciones argentinas de megafardos de alfalfa discriminadas por destino entre los años 2013 y 2018. Elaborado con datos del *International Trade Centre* (ITC, 2018) y Cámara Argentina de Alfalfa (Brigante, comunicación personal).

### Exportaciones argentinas de heno de alfalfa en formato de pellets



Fuente: Urrets Zavalía - Gilleta en base a datos ITC - International Trade Centre y CAA - Cámara Argentina de la Alfalfa

■ **Figura 27.** Evolución de las exportaciones argentinas de heno de alfalfa en forma de pellets entre los años 2011 y 2018. Elaborado con a datos del *International Trade Centre* (ITC, 2018), SENASA (2018) y Cámara Argentina de Alfalfa (Brigante, comunicación personal).



Fuente: Urrets Zavalía - Gilleta en base a datos ITC - International Trade Centre y CAA - Cámara Argentina de la Alfalfa

Figura 28. Destino de las exportaciones argentinas de pellets de alfalfa durante el año 2017. Elaborado con datos del *International Trade Centre* (ITC, 2018), SENASA (2018) y Cámara Argentina de Alfalfa (Brigante, comunicación personal).

## Producción de heno de alfalfa en Argentina

Por un lado, se estima que durante 2018 se cortaron en Argentina unas 850.000 ha de alfalfa para la confección de heno, siendo la gran mayoría de esa producción un excedente del uso pastoril y que, como tal, se utilizó principalmente como reserva en el propio establecimiento o se comercializó a poca distancia del predio de origen. En general, la calidad promedio de ese heno es de mediana a baja, fruto de que en el mercado interno la calidad forrajera se evalúa en forma subjetiva a través de criterios organolépticos (color, olor, presencia de hojas, presencia de malezas, etc.) y no a través de parámetros objetivos y analíticos como proteína bruta (PB), fibra (FDA, FDN, lignina), digestibilidad (DIVMS) o valor nutritivo relativo (VNR). En consecuencia, los valores promedio de calidad se ubican en torno al 85 % MS, 16 % PB (rango 13-24 %), 56 % FDN y 58 % DIVMS, bastante lejos de los parámetros de calidad exigidos por el mercado internacional. Se suma a ello que los compradores de rollos o megafardos pagan por peso y no por clasificación analítica de calidad, lo que ha generado que se extendieran una serie de prácticas

de henificación no recomendables, como uso de maquinaria de corte inadecuada, cortes tardíos (que bajan la calidad, pero aumentan el rendimiento de MS), deficiente control de malezas, rastrillado en condiciones de andanas secas y almacenaje inapropiado, entre otras (Figura 29).



■ **Figura 29.** Causas más importantes de pérdida de calidad de los henos argentinos: 1-momento tardío de corte; 2-lotes de alfalfa enmalezadas; 3-corte con hlice desmalezadora; 4-lluvia sobre andanas; 5- rastrillado y confección en condiciones excesivamente secas; y 6- estiba inapropiada en condiciones de intemperie.

Por otro lado, existe un creciente número de empresas que persiguen la producción de heno de alta calidad, tanto para el mercado interno (especialmente tambos y feedlots de gran escala) como para la exportación. Si bien los rendimientos de forraje varían grandemente de acuerdo a las condiciones de suelo y clima, la disponibilidad de agua (lluvia y riego) y el manejo de los lotes en cada región, el factor común de estas empresas es la mejora en el nivel tecnológico de toda la cadena de producción, procesamiento y almacenaje.

La producción de heno de alfalfa como un producto especializado de alta calidad puede hacerse tanto en seco como bajo riego. Las principales zonas productoras de heno en seco son: a) centro-este de Córdoba, donde hay varias empresas que producen megafardos (400 y 800 kg) y pellets y que manejan en conjunto cerca de 33.000 ha con rendimientos de 12-14 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en 6 cortes; b) SE de Córdoba, con rendimientos de 18-20 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en 7-8 cortes; c) oeste de Buenos Aires, con producciones de 12 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en 6 cortes; d) NE de La Pampa, con producciones de 5-7 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en 5 cortes; y e) SE de San Luis, con rendimientos de 6-8 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en 5-6 cortes.



Bajo riego las principales zonas productoras son: a) Santiago del Estero, especialmente en la cuenca del río Dulce, donde se cultivan cerca de 22.000 ha con variedades de GRI 8-10, con rendimientos medios de 16 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en 8-9 cortes; b) Mendoza, donde se trabajan unas 20.000 ha de alfalfa para corte en sus tres "oasis" (norte, centro y sur), siendo la más importante el área sur (San Rafael/Alvear), con unas 16.000 ha; las producciones promedio rondan las 10-12 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en 5-6 cortes con cultivares GRI 6-10; c) norte de San Luis, con cerca de 5.000 ha de alfalfa regadas con sistema presurizado (pivote central) en las zonas Quines, Candelaria y Valle de Conlara, donde se alcanzan producciones promedio de 12-14 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> con 6 cortes de variedades GRI 7-9; d) oeste de Córdoba, en las cercanías de San Vicente, donde una empresa de capitales árabes maneja unas 3.000 ha de alfalfa para la exportación con una de las dos únicas plantas de deshidratado que funcionan hasta el presente en el país; e) Colonia 25 de Mayo (La Pampa), con 2.000 ha de alfalfa de una producción promedio de 10-12 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> con 4-5 cortes y con variedades GRI 6 a 10; f) Valle Inferior del Río Colorado (zona CORFO), con 16.000 ha de alfalfa (7.000 para producción de semillas y 9.000 para corte y pastoreo) que rinden 8-12 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en 3-5 cortes de variedades GRI 6-9; en esta zona, la producción de heno es secundaria a la producción de carne o semillas; g) Río Negro, que en sus distintos valles (Valles Inferior, Medio y Alto del Río Negro y Valle de Conesa) cultiva unas 12.500 ha de alfalfa, con rindes promedio de 8-14 t MS ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en 5-6 cortes y variedades GRI 6-9; y h) Valle Inferior del Río Chubut, con 6.000 ha de características similares a la región anterior.

Aunque viene creciendo en el país el uso de sistemas de riego presurizados, que suponen una mayor inversión inicial pero que son mucho más eficientes en el uso del agua, la mayor parte de las regiones del país todavía utiliza los sistemas de riego superficial por surco o inundación, de menor inversión, pero de notoria baja eficiencia. Además, en algunas zonas, la imposibilidad de disponer de agua en cantidad y calidad adecuadas genera rendimientos de forraje por debajo del potencial de producción esperable. Entre otros, la mayor eficiencia de riego es uno de los principales aspectos que deberían corregirse para un crecimiento sostenido de la producción de alfalfa en Argentina.

## Tipificación y muestreo de alfalfa

Con el objetivo de generar una tipificación uniforme del heno de alfalfa en el país, tanto para el mercado interno como para la exportación, Urrets Zavalía *et al.* (2018a) propusieron desde INTA Manfredi el sistema categorización que se resume en la Tabla 3 y que está basado en las concentraciones de las distintas fracciones químicas del forraje. Esas categorías se correlacionan también con los caracteres de estimación visual que se presentan en la Tabla 4. La tipificación propuesta para su uso a lo largo de todo el país, toma como modelo las clasificaciones de henos según calidad más utilizadas en Estados Unidos y España, y busca aportar al mercado nacional y de exportación un lenguaje de uso común a la hora de hablar de heno y a la toma conciencia de la importancia de la valoración objetiva de este producto.

Un parámetro que no se incluye en la tipificación, pero que es de fundamental importancia para la estabilidad del heno, es el porcentaje de humedad, y que en los henos destinados a la exportación no debe superar en destino el valor de 14 %. Algunos mercados más estrictos exigen valores de 12 % de humedad.

Para que una muestra de heno de unos pocos gramos exprese el verdadero valor de una partida de alfalfa, es de fundamental importancia que esa muestra tenga la necesaria representatividad. A efectos de dimensionar la importancia del correcto muestreo, basta mencionar que una partida de heno de hasta 100 t debe representarse por una muestra compuesta de 250 a 300 g, de la que –una vez molida– se toman solo unos 2 a 3 g para las determinaciones de laboratorio en química húmeda, o alrededor de 30 g cuando la evaluación es mediante tecnología NIRS (Figura 30).



**Figura 30.** Submuestra obtenida (izquierda) para conformar una muestra compuesta que represente una partida de megafardos (derecha).

■ **Tabla 3.** Clasificación de henos de alfalfa según parámetros químicos de calidad. Tomado de Urrets Zavalía *et al.* (2018a).

CATEGORÍA	FDA (%)	FDN (%)	VNR	TND (%)	PB (%)
Superior	< 27	< 34	> 185	> 62	> 22
Premium	27-29	34-36	170-185	60,5-62	20-22
Primera	29-32	36-40	150-170	58-60	18-20
Segunda	32-35	40-44	130-150	56-58	16-18
Tercera	> 35	> 44	< 130	< 56	< 16

Referencias: FDA: fibra en detergente ácido, en % base seca; FDN: fibra en detergente neutro, en % base seca. VNR: valor nutritivo relativo del forraje,  $VNR = [88,9 - (0,779 \times \%FDA)] \times [(120/\%FDN)]/1,29$ ; TND: total de nutrientes digestibles, en % base seca,  $TND = 82,38 - (0,7515 \times \%FDA)$ ; PB: proteína bruta, en % base seca.

■ **Tabla 4.** Clasificación de henos de alfalfa para comercialización según parámetros de inspección visual de calidad. Tomado de Urrets Zavalía *et al.* (2018a).

Superior	Estado de madurez muy temprano (hasta pre botón floral), tallos finos y suaves, muy folioso, color verde brillante y sin evidencias de daño.
Premium	Estado de madurez temprano (botón floral), tallos finos, muy folioso, color verde y sin evidencias de daño.
Primera	Estado de madurez temprano (10 % de floración), folioso, tallos finos a medios, sin evidencias de otro daño que no sea una ligera decoloración.
Segunda	Estado de madurez avanzado (> 10 % de floración a 50 % de floración), moderada foliosidad, tallos medios a gruesos. Si se detectara evidencia de daño, describir tipo e intensidad.
Tercera	Estado de madurez tardío (de 50 % de floración a plena floración), con baja foliosidad y presencia de tallos gruesos. Si se detectara evidencia de daño, describir tipo e intensidad.

La muestra extraída no solo debe representar la proporción apropiada de hojas y tallos (fracciones con contenido de nutrientes muy diferente), sino también reflejar la presencia irregular de malezas. En consecuencia, la toma de submuestras debe hacerse con un patrón preestablecido y libre de sesgo. Para ello, Urrets Zavalía *et al.* (2018b) propusieron el siguiente protocolo de muestreo:

1) Identificar partidas. Durante la confección en el campo, marcar comienzo y final de cada partida y almacenar el heno en estibas separadas. Una partida se conforma con todo el material confeccionado con igual tratamiento y en iguales condiciones (Figura 31).



/// **Figura 31.** Identificación y agrupación del heno por partidas en forma permanente.

2) Momento de muestreo. Muestrear el heno tan cerca del momento del suministro a los animales o del punto/momento de venta como sea posible.

3) Sistema de muestreo. Definir previamente el patrón de muestreo, caminando alrededor de la estiba y tomando, por ejemplo, una muestra cada 10 pasos (Figura 32). Nunca elegir muestrear o dejar de lado unidades de heno porque se ven especialmente bien o mal, respectivamente.



/// **Figura 32.** Los puntos y círculos rojos identifican los lugares de toma de muestras en partidas de heno según un modelo de patrón predeterminado.

4) Cantidad y tamaño de muestras. Para partidas de hasta 100 t, tomar 20 submuestras de unidades distintas (fardo, megafardo o rollo) (Figura 33). Con las 20 submuestras generar una muestra compuesta de 250 a 350 g. En lotes con alta variabilidad (condiciones de suelo, presencia irregular de malezas, etc.) se sugiere obtener 35 submuestras por partida.



■ **Figura 33.** Manipulación de las submuestras para la conformación de la muestra compuesta.

5) Herramienta de muestreo. Utilizar un muestreador tipo, de diámetro interno entre 1 y 2 cm y largo entre 30 y 60 cm, con punta filosa y aserrada, que conserve su filo en el tiempo y que no se caliente en exceso durante la operación (Figura 34).



■ **Figura 34.** Distintos tipos de elementos para el muestreo de heno.

6) Técnica de muestreo. En fardos y megafardos muestrear en forma perpendicular a las caras de menor tamaño (las puntas, evitando la cercanía a los bordes) (Figura 35, izquierda). De no ser posible y necesitar muestrear por los laterales o por las caras mayores, hacerlo con una inclinación de  $45^\circ$  con respecto a la superficie. En rollos, insertar el muestreador por la cara curva apuntando hacia el centro del rollo ( $90^\circ$  respecto a la tangente) (Figura 35, derecha).



■ **Figura 35.** Forma correcta de insertar el muestreador en megafardos (izquierda) y rollos (derecha).



7) Manejo de las muestras. Empaquetar la muestra compuesta, en doble bolsa plástica y protegerla del calor y de la exposición al sol (Figura 36). Enviar a laboratorio lo antes posible con dos rótulos identificatorios de la partida, uno entre las dos bolsas y otro en el exterior.



■ **Figura 36.** Empaquetado correcto de las muestras para su envío al laboratorio.

### *Aspectos logísticos en la comercialización de heno de alfalfa*

Para que Argentina pueda aumentar significativamente sus exportaciones de alfalfa, además de mejorar aspectos de producción y calidad, deben también resolverse aspectos relacionados con las cuestiones logísticas. En este sentido, de acuerdo con Antuña y Bartel (2017), es importante aclarar dos cuestiones básicas: 1) la logística de la alfalfa va más allá de lo que normalmente se entiende solo como “transporte” o “flete”; y 2) el análisis de la logística debe incluir tres parámetros esenciales: a) la relación peso/volumen de lo que se transporta, que en el caso de la alfalfa es modificable, lo que a su vez impacta sobre los costos; b) las distancias para recorrer y los procesos a seguir; y c) el o los medios de transporte para emplear.

La relación peso/volumen es la cantidad de peso que cabe en un volumen definido, que en este caso puede ser un contenedor, un camión, un vagón de ferrocarril o una barcaza. La alfalfa es un producto que en general tiene una baja relación ( $<1$ ). Por ejemplo, en un camión de uso corriente (chasis y acoplado), que puede transportar hasta 28 o 30 t de carga máxima, la carga habitual de fardos comunes (20/22 kg) ronda las 16 t. Obviamente, esta baja relación condiciona el precio del todo el proceso. La adopción de los megafardos, sean los usuales de 400-450 kg o los más eficientes de 600 a 720 kg en caso de la megaenfardadoras de doble compactación, si bien planteó necesidades de infraestructura de carga y descarga, mejoró notablemente esa relación peso/volumen.

Sin embargo, esto último también planteó otro problema logístico para resolver: la alta densidad del megafardo requiere un contenido de humedad no mayor al 14 % para evitar el ardidado y dañado del producto. En resumen: en el caso del heno de alfalfa (y de otros henos), la posibilidad de modificar la relación peso/volumen por procesos de recompactación, haciendo que pueda transportarse significativamente más peso por unidad de volumen, contribuye a mejorar la rentabilidad del negocio, tanto más cuanto más lejos esté el destino.

Lo referido a las distancias para recorrer y a los procesos abarca tres tipos de logística: i) interna, que engloba todos los movimientos dentro del proceso productivo desde recoger los fardos o megafardos en el campo –o el heno a granel en el caso de abastecer a una planta deshidratadora– hasta la carga en el medio de transporte hacia el próximo paso; ii) doméstica, que es la que se refiere a la distribución dentro del país; y iii) internacional, obviamente solo en el caso que el heno producido vaya a exportación, lo que incorpora las actividades de consolidación y embarque de la mercadería.

Finalmente, los medios de transporte para emplear se relacionan con el destino de la producción. Si la logística es doméstica, en la mayoría de los casos se pueden usar camiones o ferrocarriles. Mientras que los primeros son los más usados, el transporte por tren implica la existencia de un centro de transferencia de carga desde el camión (proveniente del campo o de la planta de acopio) al vagón del ferrocarril. En este aspecto, si bien se están haciendo esfuerzos para volver operativo el transporte por tren en algunas regiones del país, se debe todavía mejorar notablemente la infraestructura actualmente disponible. En ese contexto, para la gran mayoría de los casos, la única opción por el momento es el uso del camión punto a punto (carga en producción y descarga en el cliente). Si bien el costo de flete por camión es elevado (derivado del precio del combustible y del costo del servicio por limitaciones en el volumen para transportar), tiene al menos la practicidad de incluir una sola operación de carga y otra de descarga. En el caso de la logística internacional, existen cuatro opciones: i) carga en vagones, arribo y consolidación en puerto; ii) envío por tren a origen de contenedores vacíos, consolidación en origen y envío a puerto ya listos para cargar en barco; iii) envío en camiones, arribo y consolidación en puerto; y iv) envío en camiones a

origen de contenedores vacíos, consolidación en origen y envío a puerto (Antuña y Bartel, 2017). En todo esto también intervienen necesidades de equipamiento e infraestructura propias de cada caso. Por último, si bien la enorme mayoría de la exportación de heno se hace a través de barcos, también debe considerarse que en el caso de comercialización a países vecinos –como Brasil, Bolivia y Uruguay– se utilizan camiones.

Una vez definidos los medios de transporte para emplear, se debe realizar un análisis de las cuestiones de operativa logística, que involucran los procesos y los costos asociados. En el caso de la exportación por barco se emplean contenedores, de los cuales los más usuales son los de 40 pies cúbicos (40''), que pueden ser standard (con dimensiones internas 12,03 m de largo x 2,35 m de ancho x 2,39 m de alto, con una capacidad de 67,5 m<sup>3</sup> y una carga máxima de 26,48 t) o *high cube* (12,03 m de largo x 2,35 m de ancho x 2,70 m de alto, con una capacidad de 76,2 m<sup>3</sup> y una carga máxima de 26,48 t).

La consolidación de la carga, que se puede hacer en origen o en puerto, implica los procedimientos de control aduanero, portuario y sanitario, que a su vez incluyen los movimientos del contenedor, los sitios de depósito, las inspecciones, la carga en el barco y toda la documentación pertinente. La inspección sanitaria (SENASA) es obligatoria y debe realizarse en el mismo acto que la consolidación y verificación aduanera. Todos estos pasos, que tienen sus particularidades y sus costos específicos, deben programarse adecuadamente a efectos proporcionar mayor eficiencia de todo el proceso. Para obtener mayores detalles de todos estos aspectos, en particular para exportaciones desde Santiago del Estero (Argentina), se sugiere consultar el trabajo de Antuña y Bartel (2017).

### *Futuro de Argentina en la producción y exportación de heno y sus derivados*

A diferencia de muchos otros países en el mundo, y como ya fuera señalado, la producción nacional de heno de alfalfa y sus derivados tiene en Argentina grandes posibilidades de expansión (Pasquini Butler, 2010). Contribuyen a esta expectativa no solo la alta demanda internacional insatisfecha y la creciente demanda interna de productos de mayor calidad, sino también la disponibilidad de tierras, las buenas condiciones ambientales en muchas regiones y la existencia de avanzada maquina-



ria de henificación. La adopción de un paquete tecnológico que incluya el buen manejo del cultivo y un correcto proceso de henificación cuidando los puntos críticos de este así como el uso de maquinaria apropiada y la estiba conveniente del producto final serán pilares fundamentales. También contribuirán a la eficiencia del proceso la adopción de un sistema general de tipificación de heno y la disposición de los consumidores para pagar un mayor precio por un producto de mayor calidad.

En este contexto, adquiere una gran trascendencia la creación en 2018 de la Cámara Argentina de la Alfalfa (CAA), que es una entidad civil sin fines de lucro integrada por productores individuales y por empresas de diferentes regiones del país que intervienen en la producción, el procesamiento y la comercialización de heno de alfalfa. La CAA tiene por finalidad la defensa de los intereses profesionales del sector así como la promoción de la investigación y el desarrollo de la industria del heno de alfalfa y sus derivados, en todo lo que se relacione con la producción, elaboración, logística y comercialización interna o externa de dichos productos, tanto directamente como en colaboración con organismos oficiales, mixtos o privados del país o del exterior. Para más información, se sugiere consultar la página oficial de la CAA (2019).

El país deberá también resolver no solo aspectos logísticos, incorporando medios de transporte más baratos y eficientes –como por ejemplo el tren–, sino también mejorando su estructura portuaria, haciendo más eficientes los procesos de control y generando políticas de incentivo a las exportaciones.

## La alfalfa en la industria de cosméticos y fármacos

Los compuestos químicos presentes en la alfalfa se pueden dividir en dos grandes grupos: metabolitos primarios y metabolitos secundarios. Mientras que los primeros son imprescindibles para que la planta pueda completar su ciclo normal de crecimiento y desarrollo, los segundos son importantes para la adaptación al ambiente, particularmente confiriendo tolerancia a los factores de estreses bióticos y abióticos (Hiruma-Lima, 2019).

Entre los metabolitos primarios de la alfalfa se encuentran vitaminas (A, B1, B2, B3, B6, B7, B12, C, D, E, K, inositol y ácido fólico), proteínas, aminoácidos (entre otros asparagina, arginina, cisteína, leucina, fenilalanina, metionina, triptofano, valina e histidina), minerales (Ca, K, P, Mg, Fe, Zn, Cu, Al, B, Cr, Co, Mn, Mo, Se, Si, Na, Li y Sn), pigmentos (xantofila, clorofila y antocianinas) y carbohidratos (sacarosa, fructosa y arabinosa) (Bora y Sharma, 2011a; Barnes *et al.*, 2004; Rafinska *et al.*, 2017). Los metabolitos secundarios de la alfalfa incluyen flavonoides y fitoestrógenos (medicarpina, coumestrol, daidzeína, genisteína y otros), fitoesteroides, ácidos (pantoténico, málico, maleico, láurico, palmítico y otros), poliaminas, saponinas y fenoles (Bora y Sharma, 2011a; Barnes *et al.*, 2004; Rafinska *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2013). Todos los componentes mencionados anteriormente se extraen no solo de las hojas, sino también de las flores, las raíces y los brotes.

Esta gran riqueza de componentes beneficiosos confiere al extracto de alfalfa propiedades hidratantes, antioxidantes, antiinflamatorias y bacteriostáticas, haciéndolo muy adecuado para su uso tanto en la industria farmacéutica como de cosméticos. Además, y en consonancia con los requerimientos modernos, se trata de un producto natural y no cancerígeno (Zincã y Vizireanu, 2015).

### *La alfalfa en la industria de cosméticos*

Actualmente, la mayor expectativa de vida en el mundo genera la aspiración de prolongar la juventud, lo que a su vez estimula la búsqueda de nuevos productos para el cuidado personal y el retardo del envejecimiento. Complementariamente, las empresas invierten también en el perfeccionamiento de las técnicas de fabricación, a la vez que se enfatizan los aspectos de sustentabilidad ambiental (Montero *et al.*, 2019).

Si bien el envejecimiento es un proceso inevitable, los productos cosméticos pueden ayudar a retardarlo de manera significativa. El decaimiento de la piel y del cabello resulta de la interacción de factores internos del organismo y de factores externos o ambientales. Entre los primeros, de acuerdo con Shirata y Campos (2016), el principal es la pérdida de estructura de los tejidos, derivada de la reducción o disfunción de melanocitos, queratinocitos, fibroblastos, colágeno y elastina, además de

problemas de renovación celular y de vascularización. Entre los factores externos, el ambiente (radiación ultravioleta, humedad relativa, temperatura, viento, polución, etc.), la nutrición (particularmente deficiencias vitamínicas, proteicas y de microelementos) y la inadecuada actividad física juegan un rol importante en todo este proceso (Marques *et al.*, 2020a).

Por un lado, Leal (2012) concluyó que el estrés oxidativo es uno de los principales factores del envejecimiento, dado que hace que el sistema de defensa antioxidante no sea efectivo en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno, lo que a su vez genera un daño oxidativo a nivel molecular. Complementariamente, a esa pérdida de la barrera protectora, el avance de la edad conlleva a una marcada disminución del nivel de hormonas (tiroidea, estrógeno y testosterona), lo que provoca menores concentraciones de colágeno y desecamiento de la piel. Por otro lado, la actividad de los radicales libres interfiere en la producción de melatonina, afectando la cantidad de ácidos grasos y de vitaminas (especialmente de los complejos A y B) y promoviendo la reducción de la cantidad y del espesor del pelo (Audi *et al.*, 2017).

La hidratación es fundamental para prevenir el envejecimiento de la piel y del cabello. El uso de productos cosméticos que contengan, entre otras, sustancias hidratantes, retinoides y antioxidantes, además de aminoácidos, fitohormonas y vitaminas es de gran utilidad para retardar los procesos de decaimiento (Leal, 2012). También es importante el contenido de carotenos y de vitamina E, que previenen el estrés oxidativo y protegen así las membranas celulares de la acción perjudicial de los radicales libres (Chorilli *et al.*, 2007).

Shirata (2016) estableció que el extracto de alfalfa tiene un efecto similar al retinol, dado que estimula la síntesis de colágeno y la actividad celular, inhibe las metaloproteinasas –lo que mantiene el nivel de elastina– y regula la diferenciación de los queratinocitos. Todo esto favorece la hidratación y la elasticidad de la piel, promoviendo así el rejuvenecimiento epidérmico. En Brasil ya se comercializan cremas hidratantes, champús y acondicionadores de cabello a base de extracto de alfalfa (Marques *et al.*, 2020c).

Una forma de aprovechar los efectos benéficos de la alfalfa, tanto para uso farmacológico como para el cuidado personal, es el desarrollo de

los productos denominados “nutricosméticos”, que son suplementos dietéticos con función cosmética (Moraes y Colla, 2006). De acuerdo con Klein (2012), esos productos –que se formulan como líquidos, cápsulas o material picado para infusiones– sirven simultáneamente para mejorar el funcionamiento general del organismo y para retardar el envejecimiento, preservando la sanidad de la piel y del cabello.

### *La alfalfa en la industria farmacéutica*

Existen numerosas menciones al uso medicinal de la alfalfa en distintas partes del mundo, que van desde las creencias populares hasta estudios con fundamentos científicos. Respecto de estos últimos, hay diversos trabajos realizados con cultivos de células o con animales que confirmaron las propiedades de la alfalfa como agente antimicrobiano, antiinflamatorio, antioxidante, antitumoral, estrogénico, antidiabético y reductor del colesterol. No obstante, este gran potencial farmacéutico debe ser ratificado a través de exhaustivos estudios clínicos en humanos que confirmen no solo su eficacia, sino también la seguridad de su uso (Hiruma-Lima, 2019).

Bora y Sharma (2011b) indicaron que el extracto de alfalfa tuvo efectos benéficos no solo como diurético y reductor de cálculos renales, sino también en la prevención de accidentes cerebro-vasculares (ACV) y de algunos tipos de cáncer, en la atenuación de los síntomas de la menopausia y en el tratamiento de enfermedades como arterioesclerosis, diabetes, anemia, artritis, afecciones cardíacas, niveles elevados de colesterol y trastornos digestivos. Otros trabajos (Barnes *et al.*, 2004; Lorenzi y Matos, 2008) resaltan el valor de la alfalfa en la reversión de deficiencias vitamínicas.

Ahmad *et al.* (2013) mencionan que los fitoestrógenos de la alfalfa elevaron los niveles de progesterona en ratas y Rafinska *et al.* (2017) señalaron el potencial de estos compuestos para el tratamiento de tumores originados por desequilibrios hormonales. A su vez, las saponinas fueron identificadas como involucradas en el control del hongo *Candida albicans* (Sadowska *et al.*, 2014) y en la reducción del nivel de colesterol en ratas (Shi *et al.*, 2014). También en ratas, Al-Dorasi (2012) informó sobre el efecto hepatoprotector del extracto de alfalfa y Mar-

tinez *et al.* (2016) señalaron su efecto como depresor de la presión arterial y del nivel de glucemia, lo que indica su uso potencial para el control de la diabetes.

### *La alfalfa en la alimentación de pequeños animales y mascotas*

Por un lado, las propiedades nutricionales de la alfalfa –principalmente por su contenido de proteína, vitaminas, minerales y calidad de fibra– y su alta palatabilidad, la hacen un alimento muy apropiado para conejos y chinchillas, donde una dieta balanceada es fundamental para producir carne y piel de alta calidad, respectivamente. También se la usa como integrante de alimentos balanceados para perros, gatos, peces y pájaros. Por otro lado, debido a su contenido en carotenos, es un alimento apreciado en la industria aviar para dar color a la yema de los huevos. Durante los últimos años, ha crecido igualmente el uso de la alfalfa para la alimentación de mascotas y animales de laboratorio, tanto de pequeños roedores –hámster (varias especies), jerbo (*Meriones unguiculatus*), ratón casero o común (*Mus musculus*) y cobayo o conejillo de la India (*Cavia porcellus*)– como de reptiles (iguanas).

Para cumplir con los objetivos anteriormente mencionados, la alfalfa se presenta en el mercado con una gran diversidad de productos, tales como pellets, extrusados, cubos de alta densidad, heno en rama (15 a 20 cm de largo) o groseramente picado (trozos de 2 a 3 cm de largo), concentrado en polvo y como componente de suplementos y mezcla de granos y semillas (Marques *et al.*, 2020a). La elección de alguna de esas alternativas depende del tipo de animal para alimentar. De acuerdo con Oliveira (2009), para la mayor parte de los casos se prefiere el suministro como heno en rama, cubos de alta densidad, pellets o extrusados, de forma tal que la alfalfa constituya hasta el 50 % de la dieta. Los pellets, además de generar menor desperdicio, permiten reducir la selección por parte del animal que los consume, lo que posibilita un mejor balance nutricional de la ingesta en general.

En roedores la firmeza o dureza adecuada del pellet es de gran importancia, dado que permite el correcto desgaste de los dientes; si fuera excesiva, se podría disminuir significativamente el consumo, lo que afectaría el estado corporal del animal (Tobin, 1996). El extrusado ofrece

un producto menos denso y de mayor porosidad que mejora la digestibilidad, aunque debe cuidarse la temperatura del proceso ya que si fuera excesivamente alta, se podrían dañar las vitaminas y otros compuestos.

En las dietas para conejos se debe respetar una proporción de 13 a 18 % de fibra de buena digestibilidad (Starck, 2011), lo que genera tasas de pasaje y condiciones de fermentación intestinal adecuadas, facilitando el normal funcionamiento del sistema digestivo, y evitando así enteritis y otros trastornos (Oliveira, 2009). En el caso de las chinchillas, también es fundamental la cantidad y la calidad de la fibra ingerida. Para estos animales lo más utilizado es el suministro de alfalfa como heno en rama o como cubos de alta densidad.

Para una información más detallada sobre el uso de la alfalfa en la alimentación de pequeños animales se recomienda consultar Marques *et al.* (2020a).

## La alfalfa en la alimentación humana

La forma más común de utilizar la alfalfa para la alimentación humana es el consumo de brotes, que son plántulas de aproximadamente 7-8 días de crecimiento provenientes de la germinación de semillas bajo condiciones adecuadas. Se trata de un alimento sano y natural, producido sin agroquímicos, con una alta concentración de proteínas, vitaminas y minerales y bajo contenido calórico (Vieira y Lopes, 2001). Las vitaminas y los flavonoides le confieren a los brotes una acción antioxidante (Schardong *et al.*, 2013). Su elevado contenido de fibra digestible tiene un efecto benéfico sobre la función intestinal, ayudando a prevenir constipación, meteorismo, cáncer de colon, diabetes y aumento del colesterol, entre otros (Lima, 2008).

La producción de brotes de alfalfa no requiere de grandes inversiones en infraestructura y puede llevarse a cabo en instalaciones sencillas y a lo largo de todo el año. El proceso desde el acondicionamiento de las semillas hasta la cosecha de brotes se completa en poco más de una semana y tiene un rendimiento interesante: 1 kg de semillas puede generar hasta 12 kg de brotes (Vieira, 2016).

Debe partirse de semilla no pildorada (pelleteada) de buen valor cultural, es decir, de alto poder germinativo y buena energía germinativa, sin semillas de malezas ni otras impurezas y libre de tratamientos con curasemillas (sin fungicidas ni insecticidas). Es recomendable utilizar semilla con bajo o nulo porcentaje de semillas duras; caso contrario, podría requerirse de un escurificado a fin de hacer más eficiente la operación. El agua para emplear para la germinación y los riegos posteriores debe ser de buena calidad y todo el proceso de producción debe mantener un estricto control de higiene y seguridad a fin de asegurar la inocuidad del producto final.

### *Proceso de producción de brotes de alfalfa*

Marques *et al.* (2020b) describen con detalle el procedimiento para la producción de brotes de alfalfa, que según Schardong *et al.* (2013) se puede dividir en cuatro etapas:

- 1) Lavado y selección de semillas: las semillas que reúnan las condiciones anteriormente descritas en cuanto a pureza y sanidad son sumergidas en un recipiente con lavandina (hipoclorito de sodio al 10 %) durante 30 minutos. Aquellas semillas que floten en la solución deben eliminarse porque no reúnen las condiciones necesarias de desarrollo.
- 2) Absorción de agua y germinación: las semillas provenientes del paso anterior se sumergen en agua por espacio de 8 horas para que puedan hincharse y así iniciar el proceso de germinación. Seguidamente, las semillas hinchadas son removidas del recipiente de remojo y colocadas en las bandejas de germinación, sobre un tejido de muselina. La temperatura óptima de germinación va desde los 25 a los 30 °C. Las bandejas de germinación, con una inclinación de aproximadamente 20 % para impedir la acumulación de agua, se dejan en un ambiente totalmente oscuro por 48 horas, tiempo en el que son regadas por aspersores unas cuatro veces al día y cuidadosamente mezcladas para uniformar las condiciones de crecimiento en todo momento.
- 3) Crecimiento de las plántulas: las semillas germinadas provenientes del paso anterior son removidas y colocadas en las bandejas de crecimiento, que tienen también una inclinación del 20 % y que son

iluminadas por luz natural indirecta. Durante esta etapa, los riegos se hacen de la misma forma que la descrita anteriormente.

4) Cosecha y embalaje de brotes: los brotes están listos para ser cosechados cuando alcanzan unos 5 cm de longitud. En ese momento son recolectados, pesados y envasados. El envase debe estar lo suficiente seco para no promover el desarrollo de hongos y bacterias que puedan alterar las condiciones naturales del producto. El almacenamiento de los brotes ya envasados debe hacerse en lugares limpios, frescos y secos (Ribeiro, 2019).

Completado el proceso anterior, los brotes están listos para ser comercializados y consumidos. Con referencia a esto último, Marques *et al.* (2020b) señalan que los brotes de alfalfa deben ser consumidos crudos y que pueden servirse en ensaladas, ya sea solos o mezclados con otros brotes o verduras. También puede usarse en sándwiches (usualmente vegetarianos) o acompañando sopas o ensalada de frutas. A fin de no perder sus propiedades, se recomienda que en platos calientes los brotes de alfalfa sean agregados al momento de servirlos. En Brasil también se utilizan en bebidas y jugos naturales.

### *Alfalfa como alimento funcional y fuente de compuestos bioactivos*

El crecimiento demográfico mundial genera una creciente demanda de proteínas, principalmente de origen animal; no obstante, el alto costo de estas estimula la búsqueda de proteínas más económicas, derivadas de las plantas (Gawel *et al.*, 2017). En este sentido, las proteínas de la hoja de alfalfa han sido reconocidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como fuente potencial de proteínas de excelente calidad para consumo humano. La abundancia y valor nutritivo de estas proteínas constituye una oportunidad para la producción de alimentos funcionales de alto valor nutritivo a partir de la alfalfa (Cortés *et al.*, 2016). La producción de concentrados proteicos de alfalfa para la alimentación humana puede erigirse en una fuente importante de aminoácidos y de otros nutrientes en lugares donde, por razones culturales o económicas, se consume poca o ninguna carne. A estas características ventajosas de la alfalfa deben sumarse

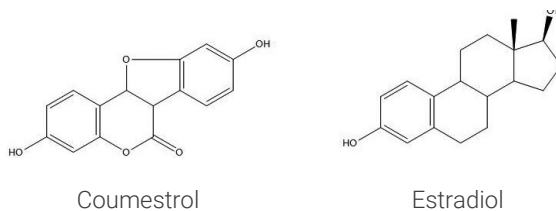


su contenido de ácidos grasos mono o poliinsaturados, vitaminas (B, E, A, K y U), minerales, ácidos orgánicos y fitoestrógenos, entre otros. Además, las hojas de alfalfa también contienen cantidades sustanciales de  $\beta$ -caroteno y clorofila, que favorecen las actividades desintoxicantes y anticancerígenas, especialmente en el tracto digestivo (Gawel *et al.*, 2017). Estudios realizados *in vitro* demostraron actividad antioxidante en aislados hidrolizados de proteína proveniente de las hojas de alfalfa. Sin embargo, a pesar de su alto valor nutritivo, el uso de proteína de hojas de alfalfa en los alimentos es limitado debido a su baja solubilidad y a sus propiedades sensoriales negativas (color, sabor y textura), aunque estos inconvenientes podrían eliminarse a través de procesos de hidrólisis enzimática (Cortés *et al.*, 2016.).

Algunos investigadores (Diplock *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2019) han señalado que ciertos alimentos, además de tener beneficios nutricionales aceptados, se pueden comportar como “alimentos funcionales”, esto es que contribuyen a regular funciones corporales u orgánicas específicas, mejorando así el estado general de salud o reduciendo el riesgo de padecer alguna enfermedad. Para ello, estos alimentos deben permanecer como tales y no en los formatos propios de los fármacos, pudiendo ser tanto un alimento natural, como un alimento al que se le ha añadido un determinado componente o un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido modificada (Diplock *et al.*, 1999). El uso de brotes de alfalfa en la alimentación humana o de alfalfa fresca o conservada (heno o henolaje) en la alimentación animal puede ser una alternativa para transferir estos compuestos bioactivos (fitoquímicos) a la alimentación humana, sea en forma directa o indirecta, a través de productos pecuarios como leche, carne y sus derivados (Mattioli *et al.*, 2016).

Entre los compuestos bioactivos presentes en las leguminosas se encuentran los fitoestrógenos, un grupo de compuestos no esteroideos que comprende a los isoflavonoides (daidzeína, genisteína, fomonomentina, biochanina A), los cumestanos (coumestrol y metoxycoumestrol), los lignanos (enterodiol y enterolactona) y los flavonoides (naringenina). Mientras que los isoflavonoides se encuentran principalmente en soja (*Glycine max*), trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*), trébol rojo (*T. pratense*), trébol blanco (*T. repens*) y alfalfa (aunque en me-

nor proporción), los cumestranos están presentes en las especies del género *Medicago* –tanto anuales como perennes, incluida la alfalfa–, arveja (*Pisum sativum*), habas (*Phaseolus lunatus*) y soja, entre otras leguminosas (Reed, 2016; Křížová *et al.*, 2019). La clase y la cantidad de fitoestrógenos varían de acuerdo con la parte de la planta analizada, la etapa de crecimiento, el cultivar y la ocurrencia de estreses bióticos y abióticos (Seguin *et al.*, 2004; Reed, 2016; Silva *et al.*, 2018). La importancia de estos compuestos reside en su semejanza con la hormona sexual estradiol de los mamíferos (Figura 37).



■ **Figura 37.** Similitud estructural de las moléculas del coumestrol y estradiol.

Numerosas investigaciones (Murkies *et al.*, 1998; Haya *et al.*, 2002; Leyva *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016; Wink, 2018) concluyeron que las dietas ricas en fitoestrógenos (o extractos de estos compuestos) son beneficiosos para la salud humana porque al competir con los estrógenos naturales pueden actuar como agentes protectores contra el cáncer, prevenir enfermedades cardiovasculares y aliviar los síntomas de la posmenopausia. Diferentes estudios epidemiológicos, especialmente en Japón y otros países asiáticos, sugirieron que las dietas ricas en fitoestrógenos se asociaron con menor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y algunos tipos de cáncer hormona-dependientes, como los de mama, endometrio, próstata y colon (Murkies *et al.*, 1998; Leyva *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2014; . Lu *et al.*, 2016; Wink, 2018). En igual sentido, otros investigadores (Haya *et al.*, 2002; López Luengo, 2010) indicaron que las mujeres asiáticas, que incluyen una alta proporción de fitoestrógenos en sus dietas, presentaron síntomas menopáusicos de menor intensidad que las occidentales.

Un proceso importante en la fisiología humana es la síntesis de equol a partir de daidzeina que, como ya se mencionó, es un fitoestrógeno presente en soja y otras leguminosas. Por un lado, la transformación

de daidzeina en equol se produce por la acción de un grupo específico de bacterias intestinales. El equol, que a diferencia del estradiol es una hormona no esteroide, interviene en la mitigación de los síntomas de la menopausia y en la prevención de la hiperplasia prostática. Mientras que cerca del 50-60 % de los adultos que viven en países asiáticos son capaces de sintetizar en su tracto intestinal equol a partir de la daidzeina, solo el 20-35 % de los occidentales lo puede hacer. Esto implica que hay una gran proporción de la población mundial que depende de la ingesta diaria de equol externo (Kalač, 2013). Por otro lado, hay microorganismos en el rumen de los rumiantes capaces de metabolizar isoflavonoides como la formononetina a daidzeina y luego a equol, la biochanina-A a genisteína y el metoxycoumestrol a coumestrol (COU). Los isoflavonoides biochanina-A y formononetina son considerados de acción menos estrogénica que la genisteína y la daidzeina, debido a que los grupos metoxy no pueden unirse eficientemente a los receptores estrogénicos en el animal; en consecuencia, el COU se posiciona como el más potente de todos los fitoestrógenos. Basado en la potencia de su función estrogénica respecto del estradiol, Dweck (2006) ordena a los fitoestrógenos de la siguiente manera: estradiol >> coumestrol > equol = genisteína > biochanina A > daidzeina > formononetina.

Silva (2019) detectó cantidades constitutivas de COU en plantas de alfalfa, que se incrementaban con ataques del complejo viral del achaparramiento. Moravcová *et al.* (2004) detectaron concentraciones variables de COU en henolaje de alfalfa luego de 150 días de confeccionado. En ese sentido, la alimentación de vacas lecheras con forrajes ricos en fitoestrógenos, para la producción de leche –o sus derivados– con alto poder bioactivo, puede ser muy importante para aquellos consumidores con requerimientos específicos. Desde el punto de vista del mejoramiento genético, conocer la cantidad y la composición de los fitoestrógenos presentes en la alfalfa podría ser de interés para el desarrollo de cultivares con alto contenido fitoestrogénico.

También la biotecnología permite obtener estos compuestos *in vitro* a través de extractos vegetales, cultivo de células vegetales, callos y suspensión celular, proporcionando una plataforma valiosa para la producción de estos metabolitos secundarios de interés comercial. En

alfalfa se lograron producciones de flavonoides e isoflavonoides por medio de cultivo de callos y células en suspensión; estas últimas, en particular, facilitan no solo la homogeneidad de la población celular *in vitro*, sino también una gran disponibilidad de material, una alta tasa de crecimiento celular y una buena reproducibilidad de las condiciones (Amer, 2018). Diversos estudios indicaron que algunas especies de *Medicago* poseen un excelente potencial como fuente de estos compuestos bioactivos (Silva *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2014; Barreira *et al.*, 2015; Rafinska *et al.*, 2017).

En la actualidad, procedimientos como la síntesis de nanopartículas combinadas con la producción de metabolitos secundarios a través de callos ofrece nuevas estrategias para mejorar la producción de fitoestrógenos (Amer, 2018). En este sentido, Montero *et al.* (2019) proponen el uso de albúmina de suero bovino como nanopartícula, dado que reduce la degradación del coumestrol y preserva su capacidad antioxidante. Además, la albúmina se presenta como un vehículo prometedor para la administración de fármacos debido a sus múltiples ventajas: tiene una alta estabilidad química, es biocompatible, no es tóxica ni inmunogénica, es biodegradable y posee una mayor capacidad para alcanzar la zona de acción específica, como los tumores. Sin embargo, de acuerdo con Amer (2018), son necesarias más investigaciones para dilucidar completamente los efectos de las nanopartículas en los mecanismos de producción de la síntesis de metabolitos secundarios en plantas para su uso medicinal.

## Consideraciones finales

La producción industrial de heno de alfalfa como actividad especializada viene cobrando en el país una creciente importancia. Esto incluye no solo la producción de pellets y cubos sino también la de megafardos, tanto para el mercado interno como para la exportación. En este último aspecto, Argentina tiene un gran potencial para erigirse en un futuro cercano como un proveedor de relevancia en el mercado global de megafardos. Para ello, deben cumplirse dos requisitos fundamentales: 1) incrementar la calidad del heno producido de manera tal que se satisfagan las demandas internacionales; y 2) aumentar de manera

sostenida la cantidad de esa producción de calidad, de forma que el país se convierta en un proveedor confiable. Paralelamente, a efectos de hacer más rentable el negocio, Argentina debe solucionar aspectos logísticos de diversa índole, que abarcan desde el transporte interno hasta la infraestructura portuaria, entre los más importantes.

Por otro lado, el desarrollo de otros usos industriales –como alimentación humana y pequeños animales, farmacéutica, cosmética y bioinsumos– ofrece también un muy interesante potencial. No obstante, en muchos de estos casos es necesario todavía la generación de conocimientos más sólidos y aplicables a una escala industrial.

## BIBLIOGRAFÍA

AGRODIGITAL. 2019. *España exporta el 78% de su producción de alfalfa*. (Disponible: <https://www.agrodigital.com/2019/05/27/espana-exporta-el-78-de-su-produccion-de-alfalfa/> consultado: 8/10/2019).

AHMAD, N.; U.R. ZIA; N. AKHTAR; S. ALI; M. AHMAD; I. AHMAD. 2013. *Effects of Medicago sativa on Some Serum Biochemical Metabolites in Rats*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 15(1): 297-300.

AL-DOSARI, M.S. 2012. *In vitro and in vivo antioxidant activity of alfalfa (Medicago sativa L.) on carbon tetrachloride intoxicated rats*. *The American Journal of Chinese Medicine* 40(4): 779-793.

AMER, A. 2018. *Biotechnology approaches for in vitro production of flavonoids*. *J. Microbial. Biotech. Food Sci.* 7:457-468.

ANTUÑA, J.C.; E.M. BARTEL. 2017. *Estudio de Mercado Internacional de Heno de Alfalfa*. UCAR-INTA, Argentina, 92 p. (inédito).

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FABRICANTES DE ALFALFA DESHIDRATADA (AEFA). 2019. (Disponible: <https://www.alfalfaspain.es/> consultado: 8/10/2019).

ASSOCIAZIONE ITALIANA FORAGGI ESSICCATI (AIFE). 2019. (Disponible: <https://www.aife.eu/associazione-italiana-foraggi-essiccati/> consultado: 10/10/2019).

AUDI, C.; V.Y. KATAOKA; G.J. DA SILVA; M.Y. TATIKAVA; T. RODRIGUES; B.C. ZYCHAR. 2017. *Desenvolvimento e mecanismo de ação da canície e queda capilar*. *Revista de Iniciação Científica, Saúde e Bem Estar* 6 (5): 2-18.

BARNES, J.; L.A. ANDERSON; D. PHILIPSON. 2004. *Plantas medicinales*. *Pharma Editores*. Barcelona. 63-65 pp.

BARREIRA, J.M.; T. VISNEVSKI-NECRASOV; E. NUNES; S.C. CUNHA; G. PEREIRA; M.P. OLIVEIRA. 2015. *Medicago spp. as potential sources of bioactive isoflavones: Characterization according to phylogenetic and phenologic factors*. *Phytochemistry*. 116: 230-238.

BORA, K.S.; A. SHARMA. 2011a. *Phytochemical and pharmacological potential of Medicago sativa: a review*. *Pharmaceutical Biology* 49 (2): 211-220.

BORA, K.S.; A. SHARMA. 2011b. *Evaluation of antioxidant and cerebroprotective effect of Medicago sativa L. against ischemia and reperfusion insult*. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 9 p.

CÁMARA ARGENTINA DE LA ALFALFA (CAA). 2019. (Disponible: [www.alfalfaargentina.com.ar](http://www.alfalfaargentina.com.ar) consultado: 10/10/2019).

CHORILLI, M.; G.R. LEONARDI; H.R.N. SALGADO. 2007. *Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas*. *Revista Brasileira de Farmácia* 88 (3): 113-118.

- CORTÉS, A.; J. LEÓN; F. JIMÉNEZ; M. DÍAZ; A. VILLANUEVA; C. GUZMÁN. 2016. *Alimentos funcionales, alfalfa y fitoestrógenos*. *Revista Mutis* 6 (1): 28-40, doi: <http://dx.doi.org/10.21789/22561498.1110>
- DWECK, A.C. 2006. *Isoflavones, Phytohormones and Phytosterols*. *J. Appl. Cosmetol.* 24:17-33.
- DIPLOCK, A.; P. AGGETT; M. ASHWELL; F. BORNET; E. FERN; M. ROBERFROID. 1999. *Scientific Concepts in Functional Foods in Europe: Consensus Document*. *Br. J. Nutr.* 81: 1-27.
- DUURSEMA, E. 2018. *Situation of the Alfalfa Dehydration Sector in Europe*. En: *BASIGALUP, D.; M. DEL C. SPADA; A. ODORIZZI; V. AROLFO (ed.). Proceedings of the Second World Alfalfa Congress, PPT Section*. INTA, Córdoba, Argentina, (Disponible: [www.worldalfalfacongress.org](http://www.worldalfalfacongress.org) consultado: 16/10/2019).
- GARDNER, D.; D.H. PUTNAM. 2018. *Alfalfa situation in USA and Canada*. En: *BASIGALUP, D.; M. DEL C. SPADA; A. ODORIZZI; V. AROLFO (ed.). Proceedings of the Second World Alfalfa Congress, INTA, Córdoba, Argentina*. 30-33 pp. (Disponible: [www.worldalfalfacongress.org](http://www.worldalfalfacongress.org) consultado: 16/10/2019).
- GAWEL, E.; M. GRZELAK; M. JANYSZEK. 2017. *Lucerne (Medicago sativa L.) in the human diet - Case reports and short communications*. *J. of Herbal Medicine* 10: 8-16.
- HAYA, J.; C. CASTELO-BRANCO; T. PÉREZ-MEDINA. 2002. *Revisión de conjunto Fitoestrógenos: conocimientos básicos y utilidad clínica*. *Toko-Gin Pr.* 61: 337-362.
- HIRUMA-LIMA, C.A. 2019. *Capítulo 20. Alfafa na indústria farmacêutica*. En: *VILELA, D.; R.P. FERREIRA; D.H. BASIGALUP. Manejo da Alfafa: do cultivo aos seus múltiplos usos*. Viçosa, Centro de Produções Técnicas (CPT). 267-276 pp. (en prensa).
- INTERNATIONAL TRADE CENTRE (ITC). 2018. (Disponible: <http://legacy.intracen.org/marketanalysis/argentina/Default.aspx> consultado: 03/10/2019).
- KALAČ, P. 2013. *Fresh and ensiled forages as a source of estrogenic equol in bovine milk: a review*. *Czech J. Anim. Sci.* 58 (7): 296-303.
- KHAN, I.T.; M. BULE; R. ULLAH; M. NADEEM; S. ASIF; K. NIAZ. 2019. *The antioxidant components of milk and their role in processing, ripening, and storage: Functional food*, *Veterinary World* 12(1): 12-33. doi: 10.14202/vetworld 12-3.
- KLEIN, P.N. 2012. *Nutrição na prevenção e no tratamento da celulite. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Estética) – Faculdade Redentor, Instituto Itesa, San Pablo*. 30 p.
- KŘÍŽOVÁ, L.; K. DADÁKOVÁ; J. KAŠPAROVSKÁ; T. KAŠPAROVSKÝ. 2019. *Isoflavones*. *Molecules* 24: 1-28.
- LA VANGUARDIA. 2012. *El grupo forrajero Leridano Gaset se alía con el árabe Al Dahra Agriculture*. (Disponible: <https://www.lavanguardia.com/local/lleida/20120628/54317685930/el-grupo-forrajero-leridano-gaset-se-alia-con-el-arabe-al-dahra-agriculture.html> consultado: 04/10/2019).

- LEYVA, E.; G. NAVARRO-TOVAR; S.E. LOREDO-CARRILLO; M.S. SANTOS DÍAZ. 2011. *Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides*. *Bol. Soc. Quím. Méx.* 5: 35-43.
- LEAL, R.M. 2012. *Desenvolvimento da linha Maturi de produtos cosméticos para a terceira idade. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 62 p.*
- LIMA, A.L. 2008. *Produção de brotos de fabaceae para o consumo humano. Dissertação Mestrado em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 117 p.*
- LÓPEZ LUENGO, M.T. 2010. *Fitoestrógenos. Eficacia y Seguridad* 29:86-90.
- LORENZI, H.; F.J.A. MATOS. 2008. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum, Nova Odessa.*
- LU, B.; M. LI; R. YIN. 2016. *Phytochemical Content, Health, Benefits and Toxicology of Common Edible Flowers: A Review (2000–2015)*, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56 (Supp 1:1): 130-148.
- MARQUES, R.O.; H.C. GONÇALVES; P.R. DE LIMA MEIRELLES. 2020a. *Capítulo 17. Alfafa na alimentação de pequenos animais. En: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (ed.). Alfafa: do cultivo aos múltiplos usos. Viçosa, Centro de Produções Técnicas (CPT). 233-244 pp.*
- MARQUES, R.O.; H.C. GONÇALVES; P.R. DE LIMA MEIRELLES. 2020b. *Capítulo 18. Brotos de alfafa para a alimentação humana. En: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (ed.). Alfafa: do cultivo aos múltiplos usos. Viçosa, Centro de Produções Técnicas (CPT). 246-254.*
- MARQUES, R.O.; H.C. GONÇALVES; P.R. DE LIMA MEIRELLES. 2020c. *Capítulo 19. Alfafa na indústria de cosméticos. En: Alfafa: do cultivo aos múltiplos usos. Viçosa, Centro de Produções Técnicas (CPT). 255-263 pp.*
- MARTÍNEZ, R.; G. KAPRAVELOU; J.M. PORRES; A.M. MELESIO; M. LÓPEZ-JURADO. 2016. *Medicago sativa L., a functional food to relieve hypertension and metabolic disorders in a spontaneously hypertensive rat model. Journal of Functional Foods* 26: 470-484.
- MATTIOLI, S.; A. DAL BOSCO; M. MARTINO; S. RUGGERI; O. MARCONI; V. SILEONI; B. FALCINELLI; C. CASTELLINI; P. BENINCASA. 2016. *Alfalfa and flax sprouts supplementation enriches the content of bioactive compounds and lowers the cholesterol in hen egg. J. Funct. Foods* 22: 454-462.
- MIGUEL, L.M. 2011. *Tendências do uso de produtos naturais nas indústrias de cosméticos da França. Revista Geográfica de América Central-Número Especial, Costa Rica. 1-15 pp.*
- MONTERO, G.; F. ARRIAGA; G. GÜNTHERA; S. BOLLO; F. MURAB; E. BERRÍOSC; J. MORALES. 2019. *Phytoestrogen coumestrol: antioxidant capacity and its loading in albumin nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics* 562: 86-95.



- MORAES, F.P.; L.M. COLLA. 2006. *Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. Revista Eletrônica de Farmácia* 3 (2): 109-122.
- MORAVCOVÁ, J.; T. KLEINOVÁ; R. LOUČ; I. TYROLOVÁ; M. DUŠEK; M. CE. 2004. *Coumestrol content of alfalfa following ensilage. Anim. Feed Sci. Technol.* 115:159-167.
- MURKIES, L.; G. WILCOX; S.R. DAVIS. 1998. *Clinical review 92: Phytoestrogens. J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 297-303.
- OLIVEIRA, C.E.A. 2009. *Dietas simplificadas na alimentação de coelhos e seus efeitos na reprodução e produção. Tese (Doutorado em Zootecnia). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.* 91 p.
- PASQUINI BUTLER, F. 2010. *Industrialización de la alfalfa para exportación: una oportunidad para Argentina. Trabajo de Tesis en Ingeniería Industrial, Instituto Tecnológico de Buenos Aires, Universidad Privada, Bs. As., Argentina.* 137 p.
- PUTNAM, D.H.; W.A. MATHEWS; T.M. HANON; D.A. SUMMER. 2018. *World trends in alfalfa hay market. En: BASIGALUP, D., M. DEL C. SPADA; A. ODOROZZI; V. AROLFO (ed.). Proceedings of the Second World Alfalfa Congress, INTA, Córdoba, Argentina.* 136-139 pp. (Disponível: [www.worldalfalfacongress.org](http://www.worldalfalfacongress.org) consultado: 10/09/2019).
- RAFINSKA, K.; P. POMANSTOWSKI; O. WRONA; R. GORECKI; B. BUSZEWSKI. 2017. *Medicago sativa as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. Phytochemistry Letter*, 520-539.
- REED, K.F.M. 2016. *Fertility of Herbivores Consuming Phytoestrogen-containing Medicago and Trifolium species. Agriculture* 6 (35): 1-29.
- RIBEIRO, C.G. 2019. *Produção e consumo de brotos comestíveis. (Disponível: <http://www.cpt.com.br/cursos-agroindustria/artigos/producao-e-consumo-de-brotos-comestiveis> consultado: 08/09/2019).*
- RODRÍGUEZ, F.; I. ALMEIDA; B. SARMENTO; M.H. AMARAL; M.B. OLIVEIRA. 2014. *Study of the isoflavone content of different extracts of Medicago spp. as potential active ingredient. Ind. Crops Prod.* 57: 110-115.
- SADOWSKA, B.; A. BUDZYNSKA; M. WIECKOWSKA-SZAKIEL; M. PASZKIEWICZ; A. STOCHMAL; B. MONIUSZKO-SZAJWAJ; M. KOWALCZYK; B. ROZALSKA. 2014. *New pharmacological properties of Medicago sativa and Saponaria officinalis saponin-rich fractions addressed to Candida albicans. Journal of Medical Microbiology* 63: 1076-1086.
- SCHARDONG, E.; E. CALABRESI; P. ZWICK; T. COLOMBO; V.L.C.A. GONÇALVES. 2013. *Resposta ao potencial de desenvolvimento do broto de alfafa (Medicago sativa L.) com o uso de luz durante o ciclo de crescimento. Revista Mirante* 3(1): 68-74.
- SEGUIN, P.; W. ZHENG; A. SOULEIMANOV. 2004. *Alfalfa Phytoestrogen Content: Impact of Plant Maturity and Herbage Components. J. Agr. Crop Sci.* 190: 211-217.
- SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA DE ARGENTINA (SENASA). 2018. *Estadísticas. (Disponível: <http://www.senasa.gov.ar/estadistica.php> consultado: 16/09/2019).*

SHI, Y.; R. GUO; X. WANG; D. YUAN; S. ZHANG; J. WANG; X. YAN; C. WANG 2014. *The regulation of alfalfa saponin extract on key genes involved in hepatic cholesterol metabolism in hyperlipidemic rats. PLoS One* 9(2):e88282.

SHIRATA, M.M.F. 2016. *Influência dos componentes da formulação cosmética nas propriedades biofísicas e estruturais da pele. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 103 p. DOI: 10.11606/D.60.2016.tde-17062016-162342*

SHIRATA, M.M.F.; P.M.B. CAMPOS. 2016. *Importância do perfil de textura e sensorial no desenvolvimento de formulações cosméticas. Surgical & Cosmetic Dermatology* 8 (3): 223-230.

SILVA, M. 2019. *Producción del fitoestrógeno coumestrol en alfalfa como respuesta a la infección por el complejo viral del achaparramiento. Tesis Doctoral. Doctor en Ciencias Biológicas. FCEFQyN. UNRC. 135 p.*

SILVA, L.R.; M.J. PEREIRA; J. AZEVEDO; R.F. GONÇALVES; P. VALENTÃO; P. GUEDES DE PINHO.; P.B. ANDRADE. 2013. *Glycine max (L.) Merr., Vigna radiata L. and Medicago sativa L. sprouts : A natural source of bioactive compounds. Food Res. Int.* 50, 167-175.

SILVA, M.; S. CHIACCHIERA; E. MAMANÍ; F. GIOLITTI; V. TRUCCO; C. DÍAZ; V. AROLFO; D. BASIGALUP. 2018. *Alfalfa (Medicago sativa L.) coumestrol phytoestrogen content in response to genotypes, cultivar and viral disease. En: BASIGALUP, D.; M. DEL C. SPADAPADA; A. ODORIZZI; V. AROLFO (ed.). Proceedings of the Second World Alfalfa Congress, INTA, Córdoba, Argentina. 213 p. (Disponível: [www.worldalfalfacongress.org](http://www.worldalfalfacongress.org) consultado: 04/10/2019).*

STARCK, A.S. 2011. *Desempenho e avaliação de carcaça de coelhos submetidos a diferentes manejos alimentares. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Trabalho de Graduação em Zootecnia.*

TOBIN, G. 1996. *Small pets – food types, nutrient requirements and nutritional disorders. En: KELLY, N.C.; J.M. WILLS (Ed.). Manual of companion animal nutrition & feeding. Iowa: BSAVA. 208-225 pp.*

URRETS ZAVALÍA, G.; N.A. JUAN; D.H. BASIGALUP; A. ODORIZZI; V. AROLFO; S. OLIVO. 2018a. *Tipificación de Heno de Alfalfa Argentino. (Disponível: <https://inta.gob.ar/documentos/tipificacion-del-heno-de-alfalfa-argentino> consultado: 11/10/2019).*

URRETS ZAVALÍA, G.; N.A. JUAN; D.H. BASIGALUP; A. ODORIZZI; V. AROLFO; S. OLIVO. 2018b. *Protocolo INTA para Muestreo de Henos. (Disponível: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_protocolo\\_de\\_muestreo\\_de\\_heno.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_protocolo_de_muestreo_de_heno.pdf) consultado: 11/10/2019).*

VIEIRA, R.F. 2016. *Produção de brotos comestíveis. (Disponível: <http://www.cpt.com.br/cursos-agroindustria/artigos/producao-de-brotos-comestiveis> consultado: 18/10/2019).*

VIEIRA, R.F.; J.D.S. LOPES. 2001. *Produção de brotos comestíveis: feijão Moyashi, alfafa, trevo, rabanete e brócolis. Viçosa, MG. 108 p.*

WINK, M. 2018. *Plant Secondary Metabolites Modulate Insect Behavior-Steps Toward Addiction?* *Front. Physiol.* 9: 1-9.

ZINCĂ, G.; C. VIZIREANU. 2015. *Crop plants and herbs for the treatment of women disorders: analytical methods for the bioactive compounds: a review.* *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 21(2): 107-115.

A pesar de la disminución del área de siembra que viene experimentando desde hace varios años, la alfalfa continúa siendo la especie forrajera cultivada más importante de Argentina. Desde los inicios del siglo XXI, la producción nacional de carne y leche atravesó una serie de cambios estructurales, como el incremento de sistemas confinados, la disminución del pastoreo directo y el mayor uso de reservas forrajeras, entre otros. Paralelamente, se han producido avances en materia de investigación y generación de conocimientos en distintos aspectos del cultivo, particularmente los referidos al desarrollo de técnicas moleculares para la manipulación genética y su uso en el desarrollo de variedades; estudios eco-fisiológicos para un mayor entendimiento de la adaptación a condiciones de estreses abióticos; inscripción de nuevos cultivares; caracterización de nuevas enfermedades; impacto ambiental del proceso de fijación biológica del nitrógeno; y desarrollo de procesos y de maquinaria de última generación para mejorar las prácticas de henificación y henolaje. La gran mayoría de esa producción científica y técnica ha sido generada por el INTA.

La presente obra aspira a ser una actualización y una ampliación del libro *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*, publicado también por Ediciones INTA en 2007. Para ello, se han agregado capítulos completamente nuevos, como los referidos a la industrialización de la alfalfa, la aplicación de la biotecnología al mejoramiento y el enfoque ecofisiológico de las prácticas de siembra y establecimiento. En varios otros temas se han incorporado avances significativos, como el empleo de la edición génica y la transgénesis en el desarrollo de variedades; la selección por tolerancia a salinidad, multifoliolalidad o menor potencial timpanizante; la caracterización del complejo viral del achaparramiento; la definición de nuevos criterios de manejo para una mayor eficiencia del pastoreo; la actualización del mercado varietal; y las prácticas para controlar la presencia indeseada de transgenes en semilla convencional. El ferviente deseo, tanto los autores de los 16 capítulos de este libro como de Ediciones INTA, es que esta publicación constituya una herramienta eficaz de información y consulta para todos aquellos involucrados en el cultivo, la producción y la industrialización de la alfalfa en Argentina.

ISBN 978-987-679-348-3



9 789876 793483



Instituto Nacional de  
Tecnología Agropecuaria

Secretaría de Agricultura,  
Ganadería y Pesca



Ministerio de Economía  
**Argentina**