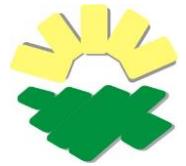




Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



**PARÁMETROS GENÉTICOS, RENDIMIENTO Y CALIDAD
FORRAJERA EN ALFALFAS (*Medicago sativa* L.)
EXTREMADAMENTE SIN REPOSO CON EXPRESIÓN
VARIABLE DEL CARÁCTER MULTIFOLIOLADO
OBTENIDAS POR SELECCIÓN FENOTÍPICA
RECURRENTE**

Ariel Sebastián Odorizzi

Tesis
Para optar al Grado Académico de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2015

**PARÁMETROS GENÉTICOS, RENDIMIENTO Y CALIDAD
FORRAJERA EN ALFALFAS (*Medicago sativa* L.)
EXTREMADAMENTE SIN REPOSO CON EXPRESIÓN
VARIABLE DEL CARÁCTER MULTIFOLIOLADO
OBTENIDAS POR SELECCIÓN FENOTÍPICA
RECURRENTE**

Ariel Sebastián Odorizzi

Comisión Asesora de Tesis

Director: Ph.D. Daniel Horacio Basigalup

Asesores: Dr. Jorge Omar Gieco

Dr. Edgar Ariel Rampoldi

Tribunal Examinador de Tesis

Dra. Sabrina Griffa

Dr. Carlos Biasutti

Dr. Jorge Omar Gieco

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Nacional de Córdoba

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente a:

Mi Director de Tesis y a los miembros del Comité Asesor, por su dedicación y por su calidad técnica y humana con la cual acompañaron mi formación doctoral.

Mis compañeros de trabajo, Blanca, Flavio, Claudio, Horacio, Valeria, Pablo, Eva, Carmen, Héctor, Silvana, Valeria, Gabriela, Carolina, Julieta, Nancy, Ricardo y Mariana por su fundamental e incondicional apoyo.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por impulsar y facilitar la realización de estos estudios.

La Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, por aceptarme como alumno y acompañarme en el proceso; a la CADOC y especialmente a Liliana. También al Tribunal evaluador.

Todos aquellos que me formaron técnica y éticamente a lo largo de todos mis estudios.

Dedicatoria

En primer lugar quiero dedicar especialmente este trabajo a mis queridos padres Celia Morero y Héctor Odorizzi (a su memoria).

También dedico este esfuerzo a mis hermanos, a mis cuñadas y a mis sobrinos, quienes han sido una luz en mi vida para comprender que en la familia radica la fuerza más grande y que del esfuerzo surgen las mejores cosas.

Además dedico estos logros a mi primo Leandro y mis amigos, en quienes me apoyo día a día para generar mis mejores acciones.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mi abuela, tíos, primos y seres queridos; también a aquellos que me acompañan desde algún lugar.

Resumen

La calidad nutricional de las plantas de alfalfa se correlaciona positivamente con la presencia de hojas multifolioladas (MF). Mediante selección fenotípica recurrente se desarrollaron poblaciones (Pob) extremadamente sin reposo invernal con un porcentaje de expresión MF (%MF) que fue desde 6,7 % en la población original (C0) y alcanzó un 77,7 % en el cuarto ciclo (C4), con estabilidad en la expresión. Uno de los objetivos se planteó en planta individual sobre C0, C1, C2 y C3 y bajo cuatro ambientes [humedad edáfica (secano y riego) y temporada de evaluación (2010-2011 y 2011-2012)] y otro de los objetivos en stand denso en secano para las temporadas 2012/2014 sobre C3 y C4 en comparación con C0, Ruano, Mireya y CW1010. En ambos objetivos, se determinó la variabilidad y correlación entre variables productivas, morfológicas y de calidad forrajera. La Pob C0 presentó los máximos valores de rendimiento de forraje con plantas más altas, mayor número de tallos y número de hojas. Dichas variables fueron significativamente menores en C3 y C4 en evaluaciones a planta individual pero no fue así cuando se las evaluó en cultivo denso. De manera diferente C3 y C4 presentaron los valores más altos en cuanto a %MF, relación hoja/tallo y porcentaje de proteína bruta. La caracterización sanitaria en lo que respecta a resistencia a pulgones (azul y moteado) y antracnosis fue otro de los objetivos, encontrándose que el proceso de selección no modificó el comportamiento sanitario de la Pob C4 en comparación con la población original. En un cuarto objetivo se evaluó la diversidad genética de C0 y C4 representadas por 40 plantas cada una y utilizando 25 microsatélites. Se observó un alto número de alelos por locus en C0 y C4. La diversidad genética dentro de la Pob (H_E) fue de 0,723 para C0 y 0,726 para C4 con ausencia de diferencias significativas entre las dos Pob, indicando que la diversidad genética presente en C4 fue tan grande como en C0. La diferenciación según Nei (G_{ST}) entre las Pob indicó que sólo el 1,3 % de la diversidad genética total fue entre las poblaciones y el 98,7 % estaba dentro de ellas, mostrando así un proceso de selección eficiente sin aumento de la consanguinidad.

Palabras Clave: mejoramiento de alfalfa, relación hoja/tallo, resistencia a plagas y enfermedades, microsatélites, heterocigosidad.

Abstract

The nutritional quality of alfalfa plants correlate positively with the presence of multifoliolate (MF) leaves. Using phenotypic recurrent selection we developed extremely non-dormant populations (Pop) with an increased percentage of MF expression (%MF) that was 6.7 % in the original population (C0) and reached 77.7 % in the fourth cycle (C4), with stable expression. The objectives of this study were to evaluate forage yield and quality and stem and leaf morphology on individual plants of C0, C1, C2 and C3 Pop under four environments defined by the combination of growing seasons (2010-2011 and 2011-2012) and moisture condition (rainfed or irrigated) and on stand dense in rainfed seasons 2012/2014 on C3 and C4 compared to C0, Ruano, Mireya and CW1010. The Pop C0 values showed the maximum forage yield with taller plants, higher stem and leaf numbers. These variables were lower in C3 and C4 although these differences were significant at individual plant evaluations but not when they were evaluated in dense culture. Differently C3 and C4 showed the highest values in terms of % MF, leaf/stem ratio and crude protein percentage. Pest (blue and spotted aphid) and disease (anthracnose) resistance were characterized, finding that the selection process did not change the resistance behavior of Pop C4 compared with the original population. Also, the effect of selection on genetic diversity was evaluated. The Pop C0 and C4 were represented by 40 plants each that were genotyped by 25 SSR markers. The number of alleles per locus was large in both C0 and C4, averaging 6.28. The within population genetic diversity (H_E) overall estimation, was 0.723 for C0 and 0.726 for C4. The absence of significant differences for H_E between the two populations indicated that the genetic diversity present in C4 was as large as the diversity observed in C0. The Nei's population differentiation (G_{ST}) overall estimation was 0.013, meaning that only 1.3% of the total genetic diversity was between populations and 98.7% was within populations. These results showed that an efficient selection process was conducted without any increase in inbreeding.

Key words: alfalfa breeding, leaf/stem ratio, pest and disease resistance, microsatellites, heterozygosity

Tabla de contenidos

Agradecimientos	II
Dedicatoria	III
Resumen	IV
Abstract	V
GUÍA DE LA PRESENTACIÓN	1
CAPÍTULO 1	2
INTRODUCCIÓN	2
1.1 Definición del problema	2
1.2 Revisión de antecedentes	7
1.3 Justificación	40
1.4 Hipótesis	41
1.5 Objetivos de la investigación	42
1.5.1 Objetivo general	42
1.5.2 Objetivos específicos	42
CAPÍTULO 2	43
MATERIALES Y MÉTODOS	43
2.1 Caracterización edafoclimática del área de estudio	43
2.2 Desarrollo de las poblaciones experimentales	44
2.2.1 Población original	45
2.2.2 Poblaciones experimentales	45
2.3 Metodología utilizada para el logro del objetivo específico 1	47
2.3.1 Descripción de los ambientes y diseño experimental	47
2.3.2 Evaluaciones	50
2.3.2.1 Rendimiento de forraje	51
2.3.2.2 Características morfológicas	52
2.3.2.3 Parámetros de calidad de forraje	55
2.3.3 Análisis estadístico	56
2.4 Metodología utilizada para el logro del objetivo específico 2	57
2.4.1 Diseño experimental	57
2.4.2 Evaluaciones	58
2.4.2.1 Rendimiento de forraje	58

2.4.2.2 Características morfológicas	59
2.4.2.3 Parámetros de calidad de forraje	61
2.4.3 Análisis estadístico	61
2.5 Metodología utilizada para el logro del objetivo específico 3	62
2.5.1 Caracterización por protocolos de resistencia a agentes bióticos	62
2.5.1.1 Resistencia a pulgón azul (PA)	62
2.5.1.2 Resistencia a pulgón moteado (PM)	64
2.5.1.3 Resistencia a antracnosis (AN)	64
2.5.2 Análisis estadístico para características de resistencia	66
2.6 Metodología utilizada para el logro del objetivo específico 4	66
2.6.1 Material vegetal y extracción de ADN	66
2.6.2 Genotipado mediante SSR	67
2.6.3 Análisis estadístico de los datos SSR	72
CAPÍTULO 3	74
RESULTADOS	74
3.1 Caracterización edáfica	74
3.2 Expresión (%) multifoliolada en las poblaciones experimentales	75
3.3 Objetivo Específico 1	77
3.3.1 Temporada 2010/2011	77
3.3.2 Temporada 2011/2012	82
3.3.3 Análisis conjunto de ambas temporadas (2010/2012)	84
3.3.4 Análisis de componentes principales temporada 2010/2012	86
3.3.5 Análisis de correlación de Pearson temporada 2010/2012	88
3.4. Objetivo Específico 2	89
3.4.1 Resultados de la temporada 2012/2013	89
3.4.2 Análisis de componentes principales temporada 2012/2013	93
3.4.3 Análisis de correlación de Pearson temporada 2012/2013	94
3.4.4 Producción de forraje temporada 2013/2014	95
3.5 Objetivo Específico 3	96
3.5.1. Caracterización de la resistencia a plagas y enfermedades	96
3.5.1.1 Pulgón azul	96
3.5.1.2 Pulgón moteado	97

3.5.1.3 Antracnosis	99
3.6 Objetivo Específico 4	100
3.6.1 Diversidad genética dentro de las poblaciones	100
3.6.2 Diversidad genética entre las poblaciones	104
3.6.3 Desequilibrio de ligamiento	105
CAPÍTULO 4	107
DISCUSIÓN	107
CAPÍTULO 5	119
CONCLUSIONES	119
5.1 Hipótesis 1	119
5.2 Hipótesis 2	120
5.3 Hipótesis 3	120
5.4. Futuras líneas de investigación	121
CAPÍTULO 6	123
BIBLIOGRAFÍA CITADA	123
CAPÍTULO 7	145
ANEXO	145

Lista de Tablas

Tabla 1. Estados de madurez de la alfalfa definidos por Kalu y Fick (1981) con base en el desarrollo morfológico de tallos individuales en una muestra de forraje.	16
Tabla 2. Clases de resistencia utilizadas en la caracterización de cultivares de alfalfa.	36
Tabla 3. Categorías de expresión multifolioladas según el número de hojas MF por tallo.	44
Tabla 4. Aportes de agua (mm) por precipitaciones y por riego durante las temporadas de corte evaluadas.	49
Tabla 5. Fechas de corte de forraje para cada ambiente evaluado durante las temporadas 2010/2012.	51
Tabla 6. Número y fechas de corte durante las temporadas 2012/2013 y 2013/2014.	58
Tabla 7. Secuencias de pares de cebadores de microsatélites para cada locus, grupo de ligamiento (LG) en <i>M. truncatula</i> y <i>M. sativa</i> . Secuencias en dirección 5' a 3'.	69
Tabla 8. Características químicas del suelo en el sector de la E.E.A. Manfredi donde se realizaron los ensayos.	74
Tabla 9. Resultado de comparaciones múltiples DGC entre las medias de las variables evaluadas en las poblaciones C0 a C3 y en promedio de los cuatro ambientes.	85
Tabla 10. Representación esquemática de la valoración de cada variable evaluada en las poblaciones generadas (C0 a C3) para las temporadas (individuales y en conjunto) y para las condiciones de humedad (riego y seco) utilizadas en este estudio.	86
Tabla 11. Correlaciones fenotípicas de Pearson (r) entre todas las variables y considerando las cuatro poblaciones y los cuatro ambientes utilizados en este estudio.	88
Tabla 12. Análisis de la varianza MANOVA para las 12 variables morfológicas, de calidad y de producción de forraje evaluadas durante la temporada 2012/2013 en plantas bajo cultivo denso.	90
Tabla 13. Resultado de comparaciones múltiples DGC de las diferentes variables (rendimiento, morfológicas y de calidad) evaluadas entre las poblaciones y testigos entre C0, C3 y C4.	91

Tabla 14. Correlaciones fenotípicas de Pearson (r) entre todas las variables en estudio evaluadas entre poblaciones (C0 a C4).	95
Tabla 15. Resultado de comparaciones múltiples DGC para la variable rendimiento acumulado (Racum) entre los ciclos de selección (C0 a C3) y los cultivares testigo (CW 1010, Mireya y Ruano) durante la temporada 2013/2014.	96
Tabla 16. Porcentaje de plántulas en cada categoría de resistencia a pulgón azul de acuerdo a la NAAIC para los ciclos inicial (C0) y final (C4) de selección por alta expresión multifoliolada.	97
Tabla 17. Porcentajes de resistencia a pulgón azul de los ciclos inicial (C0) y final (C4) de selección por alta expresión multifoliolada. Los valores consignados son los obtenidos en la prueba y los ajustados al valor histórico promedio del testigo resistente, CUF 101.	97
Tabla 18. Porcentaje de plántulas en cada categoría de resistencia a pulgón moteado de acuerdo a la NAAIC para los ciclos inicial (C0) y final (C4) de selección por alta expresión multifoliolada.	98
Tabla 19. Porcentajes de resistencia a pulgón moteado de los ciclos inicial (C0) y final (C4) de selección por alta expresión multifoliolada. Los valores consignados son los obtenidos en la prueba y los ajustados al valor histórico promedio del testigo resistente, CUF 101.	98
Tabla 20. Porcentajes de resistencia a antracnosis de los ciclos inicial (C0) y final (C4) de selección por alta expresión multifoliolada. Los valores consignados son los obtenidos en la prueba y los ajustados al valor histórico promedio del testigo resistente, ARC.	99
Tabla 21. Rango de tamaño observado (pb) de cada locus y número de fragmentos detectados por planta en las poblaciones C0 y C4 de alfalfa estudiadas mediante 25 loci SSR.	101
Tabla 22. Media de heterocigosidad esperada (H_E) para cada uno de los 25 loci SSR ensayados en las poblaciones C0 y C4.	103
Tabla 23. Media de la diferenciación poblacional de Nei (GST) y la distancia genética de Nei (D) para cada uno de los 25 loci entre las poblaciones C0 y C4.	105

Lista de Figuras

Figura 1. Hojas compuestas de alfalfa: hoja trifoliolada (TF) y 8 hojas multifolioladas con folíolos desde 4 a 11 (MF4 a MF11)	25
Figura 2. Cruzamientos manuales: a) recolección de polen para la policruza; b) policruzamiento de las selectas.	46
Figura 3. Plano de ensayos de plantas individuales con diseño en BCA con tres repeticiones.	48
Figura 4. Siembra y desarrollo de las plantas individuales para la confección de los ensayos: a) emergencia de plántulas en bandejas de alvéolos plásticas; b) plantines en vasos plásticos; c) trasplante de plantines a campo.	48
Figura 5. Ambientes definidos por la condición de humedad edáfica. a: A1 (secano); b: A2 (riego).	48
Figura 6. Toma de datos de producción de forraje: a) alfalfa en floración temprana; b) recolección del forraje cosechado manualmente por parcela; c) pesaje del forraje cosechado por parcela; d) ensayo luego del corte a 0,05 m del nivel del suelo; e) muestra compuesta de 200 g para determinación de MS; f) bandeja con muestra para secado en estufa usado en la estimación del % de MS.	52
Figura 7. Determinación de la relación hoja/tallo: a) separación en seco de hojas y tallos; b) pesado de tallos en seco; c) pesado de hojas en seco; d) muestras de hojas y tallos para análisis de calidad.	54
Figura 8. Evaluación de variables: a) conteo de tallos; b) medición de altura; c) corte del tallo erecto más alto; d) evaluación de rendimiento de forraje; e) conteo de folíolos; f) conteo de hojas por tallo.	55
Figura 9. Plano de ensayo con diseño en BCA con las 3 repeticiones y los 6 tratamientos que se utilizaron para la determinación de los datos bajo stand denso.	57
Figura 10. Toma de datos de producción forrajera: a) maquinaria autopropulsada de corte; b) parcela previa al corte en estado de floración temprana; c) pesaje de una muestra de una parcela para determinación de % MS; d) canastas metálicas para el acondicionamiento en estufa.	59
Figura 11. Toma de datos de características morfológicas: a) medición de la altura de planta; b) corte de tallos al azar para determinar el IMF y N; c) separación en seco de hojas y tallos; d y e) almacenado de muestras en bolsitas para su posterior análisis de calidad; f) hojas MF con cinco folíolos en comparación con una hoja trifoliolada.	60

Figura 12. Protocolo de selección para resistencia a <i>A. kondoi</i> y <i>T. maculata</i> : a) cría de pulgones en condiciones controladas sobre tallos de alfalfa; b) y c) infestación de plántulas y desarrollo de daño; d) identificación de genotipos resistentes (R) y susceptibles (S).	63
Figura 13. Protocolo de selección para resistencia a <i>C. trifolii</i> : a) cultivo del hongo y recuento de esporas; b) pulverización de plántulas con suspensión de esporas; c) cámara húmeda (24-72 h) para favorecer la infección; d) identificación de genotipos resistentes.	65
Figura 14. Plantas de las poblaciones C0 y C4 en macetas para extracción de ADN	67
Figura 15. Geles de agarosa con la amplificación de seis pares de primers SSR selectos.	68
Figura 16. 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.	71
Figura 17. Ejemplo de variación SSR en el locus MTIC447 en 24 individuos.	72
Figura 18. Esquema del proceso selectivo fenotípico recurrente aplicado para la obtención de poblaciones de alfalfa con alta expresión del carácter multifoliolado	76
Figura 19. Biplot generado por el análisis de componentes principales de las variables en estudio, para los ambientes evaluados.	87
Figura 20. Perfiles de variabilidad de la relación hoja/tallo en los diferentes estratos: superior (RHT1), medio (RHT2) e inferior (RHT3), entre las diferentes poblaciones evaluadas y los testigos.	92
Figura 21. Biplot generado por el análisis de componentes principales de las variables en estudio, entre la media de las poblaciones evaluadas.	94

Lista de abreviaturas y/o símbolos

%MF = porcentaje de hoja multifoliolada.

%PG = porcentaje de poder germinativo o porcentaje de semillas germinadas.

A = ambiente, ambientes.

A1 = ambiente bajo condiciones de secano.

A2 = ambiente bajo condiciones de riego.

ACP = análisis de componentes principales.

AFLP = *Amplified Fragment Length Polymorphisms*.

AMV = *Alfalfa Mosaic Virus*.

AN = antracnosis.

ANAVA = análisis de la varianza.

AR = altamente resistente.

AT = dinucleótido adenina, timina

BCA = bloques completos aleatorizados.

BR = baja resistencia.

C0 = población original.

C1 = población resultante del cruzamiento de selectas al primer ciclo de selección fenotípica recurrente.

C2 = población resultante del cruzamiento de selectas al segundo ciclo de selección fenotípica recurrente.

C3 = población resultante del cruzamiento de selectas al tercer ciclo de selección fenotípica recurrente.

C4 = población resultante del cruzamiento de selectas al cuarto ciclo de selección fenotípica recurrente.

Ca²⁺ = calcio.

CE = conductividad eléctrica.

CIC = capacidad de intercambio catiónico.

COT = carbono orgánico total.

CP = componente principal

CP1 = componente principal 1.

CP2 = componente principal 2.

CRI = con reposo invernal.
CRIM = con reposo invernal moderado.
CV = coeficiente de variación
CVT = Convenio de Vinculación Tecnológica.
 D = distancia genética de Nei.
DGC = prueba de comparaciones múltiples Di Rienzo, Guzmán y Casanoves.
DN = distancia de entrenudos media.
E.E.A. = Estación Experimental Agropecuaria.
ETo = evapotranspiración.
EUA = eficiencia en el uso del agua.
EUR = eficiencia en el uso de la radiación.
FBN = fijación biológica del nitrógeno.
FDN = fibra detergente neutro.
FDNdig = fibra detergente neutro digestible.
FH = número de folíolos por hoja.
GRI = grado de reposo invernal.
 G_{ST} = índice de diferenciación de Nei de la población.
 H = altura de planta desde el suelo.
 H_E = heterocigosidad esperada según *Hardy -Weinberg* o diversidad genética de Nei.
 H° = humedad.
HQ = *high quality* (alta calidad).
HR = humedad relativa.
IMF = índice de expresión multifoliolada.
INTA = Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
IVTDMS = digestibilidad in vitro de la materia seca.
 K^+ = potasio.
LD = desequilibrio de ligamiento.
LG = grupo de ligamiento.
MANOVA = análisis de la varianza multivariado.
mf = gen recesivo multifoliolado.
MF = multifoliolado, multifoliolada, multifoliolados, multifolioladas.
 Mg^{2+} = magnesio.

MO = materia orgánica.
MR = moderadamente resistente.
MS = materia seca.
N = número de nudos por tallo.
N₂ = nitrógeno.
Na⁺ = sodio.
NAAIC = *North American Alfalfa Improvement Conference*.
NH = número de hojas por tallo.
N-NO₃⁻ = nitrógeno como nitratos.
NOA = noroeste argentino.
Nt = nitrógeno total.
P = pureza.
PA = pulgón azul.
pb = pares de bases.
PB = proteína bruta.
Pe = fósforo extractable.
pH = potencial hidrógeno.
pl = planta.
PM = pulgón moteado.
Pob = población, poblaciones.
Pob*A = interacción genotipo-ambiente.
pp = precipitaciones.
PSI = porcentaje de sodio intercambiable.
r = coeficiente de correlación de Pearson.
R = resistente.
Racum = rendimiento acumulado.
Rad = radiación.
rep = repetición.
RFA = radiación fotosintéticamente activa.
RFAi = radiación fotosintéticamente activa incidente.
RHT = relación hoja/tallo.
RHT1 = relación hoja/tallo tercio superior.

RHT2 = relación hoja/tallo tercio medio.
RHT3 = relación hoja/tallo tercio inferior.
RHTt = relación hoja/tallo total.
S = susceptible.
SFR = selección fenotípica recurrente.
Sin-2 o *Sin-3* = sintéticos avanzados.
spp. = especie
SRI = sin reposo invernal.
SSR= *Simple Sequence Repeat* ó marcador microsatélite.
subsp. = subespecie.
T = número de tallos.
TF = trifoliolado, trifoliolada, trifoliolados, trifolioladas.
T° = temperatura.
Trat = tratamiento.
VNR = valor nutritivo relativo.

GUÍA DE LA PRESENTACIÓN

Esta tesis se ordena de la siguiente forma:

El Capítulo 1 presenta la introducción donde queda expuesta la definición del problema a tratar y su dimensionamiento, la revisión de los antecedentes científicos relacionados con la temática bajo estudio, las hipótesis de trabajo y la descripción de los objetivos propuestos.

El Capítulo 2 contiene todos los materiales y métodos de estudio utilizados y la descripción de los análisis estadísticos que se han realizado a los datos obtenidos en esta tesis.

En el Capítulo 3 se presentan todos los resultados obtenidos en relación a la comparación de modelos estadísticos para cada uno de los objetivos específicos planteados.

La discusión agronómica de los resultados se presenta en el Capítulo 4 en contraste con resultados encontrados por otros autores nacionales e internacionales.

El Capítulo 5 enumera la síntesis de conclusiones elaboradas a partir del análisis de las hipótesis planteadas y las futuras líneas de investigación relacionadas a la temática en estudio.

El Capítulo 6 identifica toda la bibliografía empleada durante la elaboración de este trabajo.

Por último, se presenta el anexo con información complementaria que puede ser consultada por los lectores de ésta tesis.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Definición del problema

En Argentina la alfalfa (*Medicago sativa* L.) constituye el principal componente de la oferta forrajera de las pasturas implantadas para sistemas de producción bovina de carne y leche y de alimentación de otras especies animales.

Actualmente Argentina es uno de los productores más importantes de esta especie en el mundo y posee aproximadamente 3,7 millones de hectáreas de alfalfa sembradas en un 60 % como cultivos puros y en un 40 % como pastura con mayor proporción de alfalfa en mezcla con gramíneas templadas -anuales y/o perennes- y en menor medida con gramíneas megatérmicas (Basigalup, com. pers., 2014¹). Relacionado a factores tanto internos como externos, es factible que a mediano plazo esta superficie se incremente, especialmente como cultivo puro para la producción de heno. Con respecto a los factores internos, la expansión de la frontera agropecuaria produjo cambios en la estructura productiva de las explotaciones, con el objeto de lograr escala en la producción. Los procesos que condujeron la configuración de la estructura regional Argentina, dieron como resultado una conformación espacial desigual, de acuerdo con el grado de penetración, implantación y difusión del sistema de relaciones económico-sociales capitalista en el espacio nacional (Pertile, 2003). De este modo se originaron áreas diferenciadas, por un lado las más desarrolladas, que concentraron históricamente gran parte de la actividad y potencial económico (área metropolitana y otros polos menores como Santa Fe y Córdoba) y por otra parte, el resto del país, con características restrictivas y en algunos casos de extrema pobreza (Pertile, 2004). El abandono de la convertibilidad a partir del 2002 y la consecuente devaluación del peso argentino condicionaron fuertemente el mercado de la alfalfa en la campaña de siembra 2002/03. La nueva paridad cambiaria y las condiciones

¹ Ing. Agrónomo (Ph. D). Responsable Mejoramiento Genético de Alfalfa- E.E.A. Manfredi – INTA.

internacionales produjeron que, mientras los precios de los granos en general y de la soja en particular se incrementaran, los precios de los productos pecuarios -la carne y especialmente la leche- se mantuvieran sin mayores cambios durante el 2002. Esta situación provocó que en las zonas mixtas de la región pampeana se experimentara una notoria preferencia por el cultivo de soja en detrimento de las actividades ganaderas, hecho que no se reflejó en una disminución proporcional de las existencias vacunas (Basigalup *et al.*, 2007). Esto generó, no solo la intensificación de los sistemas ganaderos, sino también su desplazamiento hacia zonas con mayores limitaciones edáficas y/o climáticas. En lo externo sobresale la creciente demanda de megafardos de alfalfa compactados para el Cercano y Lejano Oriente y de pellets/cubos de alfalfa para Latinoamérica, que ha impulsado la instalación de empresas productoras en distintas regiones del país (Basigalup *et al.*, 2014). Existen también otros mercados potenciales como China. Si bien la superficie de alfalfa está fuertemente concentrada en la región pampeana y se hace en condiciones de secano, la producción bajo riego en otras regiones del país es cada vez mayor. Este crecimiento previsto en superficie así como la mayor intensificación, debe ir acompañado con una evolución tanto de los programas de mejoramiento genético, especialmente en los grupos de menor grado de reposo invernal (GRI) 7 a 10, como del uso de las técnicas adecuadas de manejo de cultivo, cosecha y postcosecha que requieren las variedades, a fin de poder expresar su potencial productivo (Basigalup *et al.*, 2007).

Además de la importancia de obtener un buen volumen de forraje, no menos relevante es la calidad que produce un alfalfar. Elliot *et al.* (1972) menciona a la alfalfa como la especie de mayor valor nutritivo dentro de todos los cultivos forrajeros cultivados comercialmente. De su calidad depende el nivel de producción y el resultado de todo sistema que la incluya (Pordomingo *et al.*, 2004). La proporción de hojas con respecto a los tallos -conocida como relación hoja/tallo (RHT)- del heno es un indicador de calidad muy importante. Se busca que esta sea lo más alta posible; las hojas son más digestibles, tienen un contenido de proteína superior y por lo tanto mayor valor nutritivo (Fick y Holthausen, 1975; Buxton *et al.*, 1985) y su calidad se conserva durante más tiempo que la de los tallos. El contenido proteico de los pecíolos, estípulas y estructuras reproductivas (botones florales y flores) es intermedio entre el de las láminas de las hojas y los tallos. De acuerdo con Fulkerson (1973) el 60 a 75 % de la proteína total de la planta de alfalfa se encuentra

en las hojas. A fin de lograr una RHT lo más alta posible es fundamental, por un lado, las características genéticas de la variedad de alfalfa sembrada y por otro, poner especial cuidado para evitar pérdida de hojas. Hittle *et al.* (1958) sugirieron que cualquier cosa que aumenta la RHT también aumenta el valor nutritivo de la planta. La calidad de este cultivo puede ser mejorada mediante criterios de selección que apunten a una mayor cantidad de hojas o folíolos por hoja o al aumento de la proporción de hojas con relación a los tallos (Johnson *et al.*, 1994).

La alfalfa tiene hojas compuestas, formadas normalmente por tres folíolos -hojas trifolioladas (TF); no obstante, se suelen observar, con alguna frecuencia, hojas de cuatro o más folíolos –multifolioladas (MF), siendo ésta una característica altamente heredable (Bingham y Murphy, 1965). Desde el punto de la calidad forrajera, y por lo anteriormente mencionado con respecto al valor nutritivo de las hojas, el carácter MF cobra un papel importante. Varios investigadores tales como Bingham y Murphy (1965) y Brick *et al.* (1976) han sugerido que el carácter MF puede aumentar el rendimiento de forraje, así como mejorar la calidad de la alfalfa.

A fin de lograr un avance en la mejora de la calidad forrajera de la alfalfa, es importante establecer el esquema de selección a implementar. La selección fenotípica recurrente (SFR) es un método de mejoramiento intrapoblacional muy eficiente (Dudley *et al.*, 1963). Este método ha sido empleado con éxito por el programa de desarrollo de cultivares de alfalfa del INTA Manfredi -Convenio de Vinculación Tecnológica- (CVT INTA-Palo Verde S.R.L), para el mejoramiento de caracteres como el rendimiento de forraje, persistencia y la resistencia combinada a plagas y enfermedades, entre otros. No obstante, también se ha prestado alguna atención a la obtención de poblaciones experimentales (Pob) extremadamente sin reposo invernal, con alta expresión del carácter MF.

Desde un punto de vista agronómicamente abarcativo, el avance genético logrado en un proceso de mejoramiento, orientado hacia la selección de Pob de alfalfa con alta expresión del carácter MF, dependerá de las correlaciones entre caracteres morfológicos, caracteres de productividad y calidad. Es importante tener en cuenta que los caracteres

también están influenciados por la situación ambiental en la cual se desarrolla el cultivo; por tal motivo, se torna necesario evaluarlos en ambientes (A) diferentes. Conocer la magnitud de los patrones de interacción genotipo-ambiente (P*A) es también fundamental en un proceso de mejora genética.

Además de características morfológicas deseables, es necesario también apuntar a la obtención de materiales con buen comportamiento agronómico, incluyendo características como altos rendimientos de biomasa aérea, persistencia y resistencia combinada a plagas (insectos y enfermedades). Uno de los requisitos importantes de cualquier programa de mejoramiento genético es el conocimiento de la magnitud y estructura genética de la variabilidad en el germoplasma considerado (especies, poblaciones, genotipos, clones).

Durante un proceso selectivo se producen cambios en las frecuencias alélicas. La caracterización y cuantificación de dicha variabilidad se puede realizar sobre bases alélicas y/o fenotípicas, a través de marcadores moleculares y de caracteres agronómicos, tales como la variación en el rendimiento (Tester y Bacic, 2005). En ese contexto, la SFR por alta expresión del carácter MF no garantiza el alto rendimiento o características sanitarias de resistencia deseables de las poblaciones derivadas. Por tal motivo es necesario caracterizar las Pob obtenidas con respecto a su comportamiento frente a plagas y enfermedades y medir la magnitud de la diversidad genética luego del proceso selectivo a través, por ejemplo, de marcadores moleculares. La identificación de las bases genéticas, fisiológicas y bioquímicas de caracteres relacionados con la productividad y calidad del forraje, la tolerancia a factores bióticos (plagas) y abióticos (frío, sequía, salinidad), entre otros, permite interpretar las respuestas poblacionales y establecer criterios de selección (Ashraf, 2004).

La biotecnología contribuye al mejoramiento genético ya que, entre otras cosas, es posible estudiar el nivel de diferenciación entre materiales originados a través de un proceso de mejoramiento genético convencional y entre esos materiales y el *pool* genético que le dio origen. En la actualidad, se cuenta con un gran número de marcadores moleculares, no obstante, los *Simple Sequence Repeats* (SSRs) son los que ofrecen

mayores ventajas en el análisis genómico debido a su capacidad para detectar polimorfismos entre genotipos, su alta reproducibilidad y su cobertura genómica (Julier *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se estimó el impacto de la selección por alta expresión del carácter MF. Para ello, se evaluaron a campo, mediante ensayos en planta individual y en cultivo denso, componentes del rendimiento tanto en biomasa como en calidad, entre las Pob obtenidas en ciclos sucesivos de selección por carácter MF. Se evaluó el comportamiento de la población obtenida luego del último ciclo de SFR con respecto a la resistencia frente a antracnosis y pulgones azul y moteado en ensayos bajo condiciones controladas. Por último, se realizó *screening* molecular a través de marcadores codominantes SSR con el fin de describir la diversidad genética entre la población original y aquella obtenida luego del cuarto ciclo de SFR.

1.2 Revisión de antecedentes

La República Argentina, ubicada en la porción templada del Continente Americano, cuenta con 270 millones de ha de secano, con grandes superficies inhabitadas frente a la alta densidad poblacional de otras zonas de igual latitud en el mundo. Dichas superficies están cubiertas principalmente por pastos, alguna presencia de árboles y, en menor medida, cultivos extensivos. Se estima que el 60 % de la superficie del país corresponde a pastizales nativos y el 10 % a agricultura forrajera, distribuidas en una gran diversidad de ambientes, y representan la única fuente de alimento para millones de herbívoros. Debido a ello, deberían encontrarse soluciones para cada ambiente integrando la inversión en insumos (semillas, fertilizantes, tratamientos químicos, etc.), las modificaciones de manejo (momento y sistema de siembra, mezclas apropiadas, frecuencia e intensidad de pastoreo, etc.), con los nuevos logros de la genética vegetal (Echenique *et al.*, 2001).

La alfalfa es la planta forrajera de la División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Fabales, Familia de las leguminosas (Fabaceae), Subfamilia Faboideae, Tribu Trifolieae, más antigua e importante a nivel mundial. En Argentina se utiliza principalmente como forraje y en la mayoría de las áreas geográficas, donde las producciones bovinas de leche y carne son relevantes, esta constituye uno de los componentes básicos en la alimentación del ganado (Chimicz, 1988).

La difusión del cultivo de alfalfa se apoya en sus altos rendimientos de biomasa en materia seca (MS) ha⁻¹ (porcentaje de forraje sin agua). La MS es una variable muy importante ya que indica indirectamente la humedad del forraje; los balances de dieta deben realizarse siempre sobre la base seca porque el agua diluye los nutrientes pero, además un exceso de humedad del forraje modifica negativamente el consumo voluntario. Materiales muy secos también desmejoran la calidad y el consumo (llenado ruminal). Su excelente calidad forrajera es capaz de satisfacer las necesidades nutritivas de animales de altos requerimientos (Pagliaricci *et al.*, 1991) y su gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales (Basigalup *et al.*, 2007) acentúan su amplia difusión. D'Attellis (2005), indica que la alfalfa es un cultivo que permite aumentar la carga animal, mantener el *stock*, mejorar la ganancia en peso o el rendimiento en producción individual de leche. Además, su amplia participación es impulsada por poseer características agronómicas

valiosas como perennidad, plasticidad y capacidad para la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico cuando está correctamente asociada a cepas específicas de *Sinorhizobium meliloti*, cumpliendo un rol fundamental en el sostenimiento de la estructura y la fertilidad nitrogenada de los suelos en los que crece (Muslera Pardo *et al.*, 1984). Además, se constituye en la base de la oferta forrajera como un forraje posible de ser cosechado y conservado como reserva forrajera. Por otra parte, no limita a los sistemas de alta productividad, reduce costos variables, aumenta la estabilidad de producción, y, bien manejado, no extrae del sistema uno de los recursos más escasos, como el nitrógeno edáfico, sino que, por el contrario, incorpora materia orgánica y recupera fertilidad del suelo. Todos estos atributos mencionados la convierten en una especie esencial para muchos sistemas de producción agropecuaria, desde los intensivos a corral que la incluyen en la dieta animal como forraje cosechado y procesado, es decir, rollos y fardos como reserva forrajera, henolaje, silaje, pellets, entre otros (Zubizarreta, 1992), hasta los pastoriles, en menor proporción, que la utilizan en pastoreo directo (Roberto y Viglizzo, 1993; Wilberger, 1984).

En la intensificación de los sistemas de producción de carne y leche, es prácticamente imposible pensar en una planificación a largo plazo sin incluir esta especie forrajera en las rotaciones de los cultivos, debido a las cualidades mencionadas.

El manejo de la alfalfa no se debe hacer buscando la mayor producción de MS, sino la máxima producción de leche o carne, que en definitiva son los productos que generan los ingresos de las empresas (Bustillo, 2012).

El rendimiento del forraje y la persistencia de la pastura son consideraciones muy importantes a tener en cuenta en el manejo productivo de un alfalfar, aunque estos factores son de mucho peso, la calidad del forraje radicada especialmente en las hojas, se ha convertido en el principal factor en un sistema de producción intensiva (Bustillo, 2012). La persistencia es un rasgo complejo que se ve afectada por una serie de factores, incluyendo el genotipo, los factores ambientales abióticos y bióticos, gestión y sus interacciones (Riday y Brummer, 2006).

Cangiano (2001), manifiesta que los cultivares existentes en el mercado, ofrecen una amplia versatilidad en producción, longevidad, reposo invernal y resistencia a enfermedades y plagas.

El origen de esta forrajera se centra en la zona del Golfo Pérsico, más específicamente en el actual Irán (Rodríguez, 1986), desde donde comenzó su dispersión hasta convertirse en una especie cosmopolita. Su domesticación ocurrió probablemente en múltiples lugares y las fechas no están claras (Small, 2011). Sin embargo, la alfalfa se menciona en textos babilónicos del 700 aC (Hendry, 1923) lo que sugiere que se cultivaba en ese momento. Desde el centro (s) de origen, la alfalfa se propagó en gran parte de Europa, norte de África, Oriente Medio y Asia Central y del Norte. El germoplasma de alfalfa se introdujo en Norte y Sur América, a partir del siglo XVI y en Australia en la década de 1800 (Barnes *et al.*, 1977). Por la ruta del Pacífico ingresó a Perú y a Chile y posteriormente a Argentina por vía terrestre. En Argentina se cultivó en primer lugar en la región cuyana, luego en la provincia de Córdoba y finalmente en el resto de la región pampeana. Se difundió rápidamente en el territorio argentino a fines del siglo XIX y comienzos del siglo XX (Itria, 1969).

Actualmente, el intercambio de germoplasma entre todas las regiones de cultivo de alfalfa continúa, tanto a través de las colecciones de germoplasma de las poblaciones silvestres o asilvestradas y por medio de las ventas comerciales o adquisición de material de reproducción de *elite* de las empresas de cría comercial. Como consecuencia, gran parte de la variación genética que se encuentra en las poblaciones silvestres persiste incluso en el material genético de *elite* (aunque las frecuencias alélicas han cambiado presumiblemente), y la variabilidad de la secuencia de ADN presentes en una población determinada (ya sea un cultivar o germoplasma) sigue siendo muy elevada.

La alfalfa se cultiva como forrajera en 32 millones de ha en todo el mundo (Tesfaye *et al.*, 2006) en un amplio rango de condiciones de suelo y clima. En el Hemisferio Norte se cultivan 21 millones de ha, principalmente en EE.UU. y Europa, mientras que en el Hemisferio Sur la superficie alcanza los 12 millones de ha.

La superficie implantada con este cultivo ha ido variando a través del tiempo en nuestro país. El record histórico se presentó en el 1921/1922 con 8 millones de ha y a lo largo del siglo XX la superficie tuvo vaivenes muy marcados debido a problemas de persistencia y producción llegando a un mínimo de 3 millones de ha en los años 1972/1973 debido a la aparición del pulgón verde de la alfalfa (*Acyrtosiphon pisum* Harris) que produjo pérdidas muy importantes en el cultivo. En los años 1997/1998 la superficie implantada ya sea pura o en mezcla con otras gramíneas o leguminosas era de alrededor de 7 millones de ha. A partir de los años 1998/1999 la superficie fue disminuyendo debido a la baja rentabilidad del sector ganadero, fundamentalmente de la actividad lechera en particular. Esta disminución alcanzó el 31 % desde el año 1996 hasta el año 2001 (Picca y Devoto, 2004).

En los últimos años el cultivo ha tenido una recuperación interesante, pasándose de los 3 millones de ha en 2002/2005 a los 4,5 millones en 2011. Actualmente Argentina concentra su superficie en la provincia de Buenos Aires, seguido por Córdoba, Santa Fe, La Pampa y Entre Ríos, representando el 90 % de la superficie cultivada. En tanto que la producción de semilla se concentra en zonas áridas bajo riego y con ausencia de precipitaciones estivales (Echeverría *et al.*, 1995). La provincia de Córdoba es la principal productora de alfalfa pura, en tanto que Buenos Aires es la mayor productora de alfalfas coasociadas con gramíneas anuales o perennes. La mayor parte de la superficie está implantada con semilla importada, proveniente principalmente de los EE.UU. y de Australia. Actualmente, el aumento de paridad cambiaria y la reducción de las importaciones han hecho disminuir la entrada de semilla. Es importante señalar que la mayoría de las semillas de variedades nacionales también son producidas en el extranjero; no obstante, debido a estos hechos mencionados se ha incrementado en alguna medida la producción de semilla netamente nacional y el uso, algunas veces en valores no recomendados, del peleteo (Basigalup, D., com. pers.²).

El reposo invernal se refiere a la característica genética que permite a las plantas de alfalfa mantenerse en latencia durante el período de bajas temperaturas y menor longitud

² Ing. Agrónomo (PhD). Responsable Mejoramiento Genético de Alfalfa- E.E.A. Manfredi – INTA.

del día, previa acumulación de reservas en el sistema radicular y la corona. Entre los GRI que se utilizan en Argentina, el 26 % de los cultivares tienen GRI 6-7 y el 74 % no tienen reposo, o sea GRI 8 a 10. La tendencia para el futuro inmediato es un aumento significativo en el uso de variedades sin reposo.

En los últimos años se han incorporado al mercado algunas variedades de GRI 10 - extremadamente sin reposo invernal (SRI)-, que potencialmente ofrecen menor intervalo entre cortes y mayor número de cortes al año. Las variedades SRI se utilizan principalmente en los sistemas pastoriles de producción lechera e invernada intensiva y también para la producción de heno bajo riego en las regiones argentinas del NOA y Cuyo. En general, son muy susceptibles a enfermedades foliares y exigen un manejo bastante cuidadoso en condiciones de pastoreo. No obstante, durante los últimos años, la mejora de los programas de selección ha permitido desarrollar materiales sin reposo con excelente potencial de rendimiento, persistencia y muy buen comportamiento frente a enfermedades de hoja (Basigalup *et al.*, 2007).

En el país el cultivo de alfalfa se realiza mayoritariamente bajo condiciones de secano pudiendo producir entre 8 y 22 t ha⁻¹ año⁻¹ de MS, dependiendo de la disponibilidad hídrica del año, radiación, fertilidad regional y temperatura, además de otros factores (Hijano y Basigalup, 1995).

Los cultivos que crecen en condiciones de secano pueden ver afectada la eficiencia con la que capturan los recursos radiación y agua para la producción de MS (Collino *et al.*, 2007). La producción potencial de forraje requiere de una disponibilidad no limitante de agua para satisfacer la transpiración del cultivo. Se define como rendimiento potencial de forraje, en un determinado ambiente, a aquel que se puede obtener sin limitantes bióticas y abióticas controlables (plagas, deficiencia de nutrientes y agua, etc.) pero bajo las condiciones de radiación y fotoperiodo de ese ambiente.

En la región pampeana la disponibilidad de agua es el principal factor limitante para la producción de forraje en secano. La alfalfa consume agua durante todo el año, aún durante el reposo invernal, generando una demanda evapotranspiratoria mayor que un

sistema de cultivos anuales, en donde siempre existen períodos de barbecho (Collino *et al.*, 2007). El máximo potencial de producción de alfalfa se alcanza con 1.200 mm anuales en promedio (Dorenboos y Kassam, 1979), situación alejada de la que se presenta en la región semiárida central de nuestro país, donde el aporte de agua por precipitaciones efectivamente infiltradas, es de aproximadamente 640 mm. En ese contexto, la utilización de riego suplementario puede constituir una herramienta de gran utilidad para que el cultivo satisfaga sus demandas de agua y se acerque a la producción potencial de forraje. El riego modifica el modelo de distribución estacional del forraje, transforma una curva bimodal en una unimodal, y permite obtener entre 16 % y 38 % más de forraje (Bertín, 1999). En un cultivo como la alfalfa, cuya duración promedio en buenas condiciones de manejo es de 4 años (Rossanigo *et al.*, 1995), el agua almacenada en el suelo sólo tiene una influencia relevante durante el primer año de vida. Por lo tanto, la principal fuente de suministro de agua para el cultivo, considerando su ciclo en conjunto, son las precipitaciones. En algunos casos, habrá que considerar también el aporte de la napa freática, en particular porque el sistema radical puede alcanzar profundidades de hasta 6 m a partir del segundo año de implantación (Borg y Grimes, 1986).

Con una adecuada población de plantas ($> 250 \text{ pl m}^{-2}$ al término del primer año) se produjeron $28,3 \text{ t MS ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ y se consumieron 1464 mm de agua, con una eficiencia en el uso del agua de $18,6 \text{ kg mm}^{-1}$ (López *et al.*, 1997). Con una densidad de plantas significativamente menor, se obtuvieron $17,1 \text{ t MS ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, con un consumo de 1101 mm y una eficiencia en el uso del agua de $15,5 \text{ kg mm}^{-1}$ (Collino *et al.*, 2005). La eficiencia en el uso del agua es mayor en primavera que en verano debido a que, aun cuando en primavera la temperatura media está ligeramente por debajo del valor crítico, el forraje producido resulta no sólo de los fotosintatos generados a partir de la radiación interceptada sino también de aquéllos provenientes de la removilización desde la corona y la raíz. Contrariamente, la baja eficiencia del uso del agua en otoño e invierno son producidas por limitaciones de temperatura y por la movilización de fotoasimilados hacia los órganos de reserva (Collino *et al.*, 2007).

Las variaciones entre localidades en el consumo potencial anual de agua del cultivo se deben a las diferencias en la demanda atmosférica. Esta a su vez está integrada por dos

componentes: el componente radiativo, que depende principalmente de la radiación solar (factor que está directamente relacionado con la generación de MS), y el componente advectivo, relacionado con la sequedad del aire, que está influenciado por la temperatura y la humedad relativa (Collino *et al.*, 2007). Con respecto a la radiación, la producción de forraje depende de: a) la cantidad de radiación que el cultivo sea capaz de interceptar, y b) la eficiencia con que utilice dicha radiación para generar biomasa aérea (hoja y tallo). Estos parámetros pueden disminuir por temperaturas limitantes para la fotosíntesis y por condiciones que favorezcan la acumulación de carbohidratos en estructuras de reserva: corona y porción superior de las raíces (Heichel *et al.*, 1988). Además, la eficiencia se da con diferente intensidad según el GRI de las distintas variedades y afecta la distribución estacional de la MS pero no la producción anual de forraje (López *et al.*, 1997).

Una manera de incrementar el buen uso de la radiación es aumentando la densidad de siembra, de manera tal de proveer una población de plantas que favorezca una rápida recuperación de la intercepción de la radiación luego de cada corte. Paralelamente, a fin de utilizar de manera más eficiente esa radiación, se deben minimizar las limitaciones en la disponibilidad de agua (Collino *et al.*, 2007). La densidad de siembra a utilizar está relacionada con la especie, el ambiente y la calidad de la semilla que se utilice. Es importante realizar el análisis de calidad de la semilla previo a la siembra, con el fin de calcular la densidad adecuada (kg ha^{-1}) y lograr una buena implantación y una rápida emergencia en pasturas y cultivos.

En condiciones de siembra a campo, las plantas de alfalfa no se encuentran aisladas; por el contrario se presentan inmersas en un sistema donde existen interacciones entre las plantas dentro de una misma población. En este contexto, además de los factores antes mencionados, la estructura o características morfológicas de las plantas de alfalfa también juegan un rol fundamental en cuanto a captación y utilización de recursos y su interacción con las demás plantas que forman parte del sistema de cultivo para la producción forrajera (Heichel *et al.*, 1988).

Ya que la variabilidad en la producción de forraje y sus componentes es más significativa durante el segundo año de desarrollo de la alfalfa (Falcinelli y Veronesi, 1984;

Kertikova y Yancheva, 2000; Petkova y Marinova, 2004), se hace necesaria la evaluación de las variables en dos o más temporadas de corte.

Comparada con otras especies, el forraje de alfalfa tiene un mayor contenido de proteínas y por consiguiente, altos requerimientos nitrogenados (INTA-FAO, 1986; Howarth, 1988). Esto implica, para contenidos medios de proteína del 20 %, un consumo cercano a los 500 kg ha⁻¹ año⁻¹ de nitrógeno, posibles de ser exportados del área de producción, cuando se utiliza como forraje de corte bajo condiciones de riego, con rendimientos que pueden superar las 28 t, las extracciones de nitrógeno se pueden aproximar a los 800 Kg ha⁻¹ año⁻¹ (Collino *et al.*, 1997; Racca *et al.*, 1998).

Las reservas nitrogenadas tienen importancia en algunos procesos relacionados con el rebrote y la tolerancia a las bajas temperaturas. La alfalfa depende en gran parte del nitrógeno proveniente de la fijación simbiótica para satisfacer sus requerimientos totales (Cangiano, 2007). Las variaciones estacionales de los niveles de reserva de estos compuestos en la raíz, tanto del nitrógeno total como de las proteínas solubles, sigue una tendencia similar a la de los carbohidratos (Li *et al.*, 1996). La disminución en 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 (Cangiano, 2007).

El objetivo de una buena siembra es lograr muchas plantas por hectárea. Lograr una buena implantación de alfalfa constituye el 70% del éxito de la producción de forraje. El concepto que se debe manejar, es el de plantas por m² o ha y no kg de semilla por ha y éste depende de la preparación del suelo, la máquina sembradora, el control de malezas, etc., en el caso de siembra convencional y en el tratamiento del rastrojo en el caso de siembra directa (Bustillo, 2007). El rendimiento de pasturas puras de alfalfa está explicado por el número de plantas por área, la cantidad de tallos por planta y el peso de los tallos (Volenc *et al.*, 1987). Cuando el *stand* inicial de plantas es bajo, es posible que haya cierto nivel de compensación de la densidad de plantas a través de la emisión de tallos y/o el peso de los tallos (Croll *et al.*, 1993; Romero *et al.*, 1995). Por otro lado, los *stands* inicialmente muy densos pierden plantas en mayor proporción que los logrados con densidades bajas y ambos tienden a estabilizarse en un número similar de plantas (100-150 pl m⁻²) en los años

sucesivos. Stout (1998) señala que el número de plantas que maximiza la producción forrajera del primer año de la pastura, prácticamente duplica al número de plantas en el que la misma se estabilizará a partir del segundo año.

En la Región Pampeana, es común usar densidades de siembra mayores a las requeridas para alcanzar un promedio de 100-150 pl m⁻². El objetivo de usar densidades de siembra altas no sólo responde a los bajos logros de implantación que se obtienen en general (Hijano y Navarro, 2008) sino a la intención de maximizar la producción de forraje durante el primer año de aprovechamiento de la pastura (Romero *et al.*, 2006). En este sentido, la ventaja de utilizar densidades de siembra altas estaría asociada a que cuando las plantas son jóvenes y aún con coronas poco desarrolladas, el número de tallos potencialmente cosechables aumenta con la densidad lograda. Por otro lado, Huarte y Benech (2003) aumentando la densidad de plantas (de 200 a 400 plantas establecidas por m²) observaron menor invasión de malezas y mayor producción de MS de la especie de interés.

Con respecto a la etapa o desarrollo fenológico, 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 básicas: estado vegetativo, botón floral, floración y fructificación (Rodríguez y Spada, 2007). Por su estrecha relación con la calidad nutricional del forraje, el estado de desarrollo (o estado de madurez) es una variable frecuentemente usada en la descripción de las pasturas (Kilcher y Heinrichs, 1974; Kalu y Fick, 1983; Fick y Mueller, 1989; Sanderson *et al.*, 1989; Griffin *et al.*, 1994; Sule *et al.*, 2001).

En estudios comparativos de cultivares de alfalfa, la determinación del estado de desarrollo puede explicar diferencias en la expresión de caracteres tales como la composición química o la incidencia de meteorismo (Berg *et al.*, 2000). En la búsqueda de un método que posibilitara definir cuantitativamente el estado de desarrollo de la alfalfa,

Kalu y Fick (1981) idearon un sistema numérico que, en función del desarrollo morfológico individual de los tallos individuales, establece diez estados de madurez (Tabla 1). Además de su utilidad para la caracterización del grado de desarrollo de una pastura, los estados de madurez se utilizan para predecir la composición química del forraje.

Tabla 1. Estados de madurez de la alfalfa definidos por Kalu y Fick (1981) con base en el desarrollo morfológico de tallos individuales en una muestra de forraje.

Escala numérica	Denominación	Definición morfológica
0	Vegetativo temprano	Ausencia de botones florales, flores, vainas y yemas axilares
1	Vegetativo medio	Ausencia de botones florales, flores y vainas. Presencia de primeras hojas originadas de yemas axilares
2	Vegetativo tardío	Ausencia de botones florales, flores y vainas. Presencia de ramificaciones axilares
3	Botón temprano	1 a 2 nudos con botones. Ausencia de flores y vainas
4	Botón tardío	> 3 nudos con botones. Ausencia de flores y vainas
5	Floración temprana	1 nudo con una flor abierta. Ausencia de vainas
6	Floración tardía	> 2 nudos con una flor abierta. Ausencia de vainas
7	Fructificación temprana	1 a 3 nudos con vainas verdes
8	Fructificación tardía	> 4 nudos con vainas verdes
9	Semillas maduras	Nudos con vainas marrones

Sobre la base de esta categorización, e incluyendo criterios fisiológicos, se estableció que el indicador más generalizado para determinar el momento de uso es el inicio de floración, el cual tiene una alta correlación con el fin de la acumulación de carbohidratos de reserva en la raíces para posteriores rebrotes (Kloster y Zaniboni, 2007). Por lo tanto, el comienzo del corte o pastoreo podría definirse como el momento en el que el cultivo alcanza el 10 % de floración o cuando los rebrotes basales (desde la corona) alcanzan tres a cinco centímetros de altura, lo cual también permite compatibilizar calidad del forraje obtenido y duración de la pradera (Bariggi y Romero, 1986; Romero *et al.*, 1995; Rossanigo y Aragón, 2003). 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. Con el avance de la madurez se

acrecienta la proporción relativa de los tallos, de menor digestibilidad, por sobre la de hojas, que aunque de alta calidad se mantiene casi constante a través del tiempo. A su vez, el contenido de fósforo disminuye y el de calcio se mantiene alto (Bariggi y Romero, 1986; Berger *et al.*, 1985, 1986).

Como regla general puede decirse que los aprovechamientos tardíos de un rebrote aumentan la cantidad de MS acumulada, pero en detrimento de la calidad y de la facilidad de cosecha; de este modo, el consumo animal y las ganancias de peso normalmente se resienten. Por lo tanto, el factor más importante que influye en la calidad del forraje en pie es su madurez, ya que a medida que avanza el desarrollo de la alfalfa, aumenta su contenido de MS y la porción digestible de la planta disminuye; siendo el contenido de proteína el componente que presenta mayor variación en el cultivo. En ese sentido, las proteínas disminuyen desde 23 % en estado de pre-botón, hasta 15 % cuando la alfalfa está en 100 % floración. Paralelamente, la energía disminuye desde 2,49 megacalorías (Mcal) de energía metabolizable por kg de MS, hasta 2,00 Mcal para los mencionados estados de pre-botón y 100 % floración (Jahn *et al.*, 1998). De una forma más sencilla y práctica, en una semana de retraso en la cosecha de alfalfa disminuye la digestibilidad y la concentración de proteína cruda por alrededor de 20 g Kg⁻¹ y aumenta la concentración de la pared celular 30 g Kg⁻¹ aproximadamente (Buxton, 1996).

Los cortes de primavera-verano son más frecuentes que los de otoño-invierno. La mayor frecuencia de cortes en primavera-verano es consecuencia principalmente de la mayor temperatura, combinada con un efecto fotoperiódico (Rossanigo *et al.*, 1995).

La alfalfa es una especie cuantitativa de día largo, que tiende a florecer más rápidamente con fotoperíodos largos; por lo tanto, durante los períodos del año con días más cortos, requiere mayores sumas térmicas para llegar al momento de corte (Fick y Mueller, 1989).

En primavera-verano la pérdida de interceptación de la radiación fotosintéticamente activa es más elevada y de mayor magnitud en términos diarios; por lo tanto, la baja

densidad de plantas y la desuniformidad del cultivo tendrán efectos más detrimentales en esta época del año en términos de conversión a MS (Collino *et al.*, 2007).

El área foliar en plena expansión es afectada por la temperatura y se registran los valores máximos con temperaturas próximas a los 20-25°C (Christian, 1977). A temperaturas más bajas, el área foliar disminuye gradualmente, debido a la entrada del período de latencia invernal que se produce en el cultivo; y a temperaturas mayores, el área foliar disminuye más rápidamente (Bula, 1972; Fick *et al.*, 1988).

Aunque el concepto de reservas en la planta hace referencia a varios compuestos en forma simultánea, los carbohidratos no estructurales son los que han sido objeto de la mayor cantidad de estudios destinados a explicar su relación con la persistencia y la productividad de la alfalfa. No obstante, Reynolds (1971) estableció que las concentraciones otoñales de carbohidratos no estructurales observadas en los órganos de reserva, como raíz y corona, no se correlacionaron con la producción de MS en la temporada siguiente.

Entre los factores más importantes que modifican la partición de los fotoasimilados originados por la fotosíntesis se encuentran la posición, el estado de desarrollo de las hojas y la competencia entre los órganos. Las hojas totalmente expandidas, ubicadas en los estratos inferiores del canopeo, exhiben una mayor exportación de asimilados y tardan más tiempo en completarla que las hojas nuevas y en crecimiento, situadas en la parte superior de la planta. A pesar de estas diferencias, las hojas superiores e inferiores contribuyen en forma simultánea al abastecimiento de carbohidratos hacia la raíz y la corona (Cangiano, 2007).

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 la corona y el comienzo del desarrollo de frutos (Dobrenz y Massengale, 1966).

El momento óptimo para su uso está dado, fundamentalmente, por el balance entre la cantidad de carbohidratos acumulados en la raíz y el estado de desarrollo alcanzado al momento del corte, lo cual también permite compatibilizar calidad del forraje obtenido y duración de la pradera (Soto y Jahn, 1993).

A medida que avanza el estado de madurez, desde prebotón a floración completa, disminuye el valor nutritivo de la alfalfa (Jahn *et al.*, 1993). 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 la corona, siendo las pérdidas por respiración las de mayor magnitud (Ta *et al.*, 1990).

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; como consecuencia de lo anteriormente mencionado, el rebrote después del corte o pastoreo se origina en las yemas de la corona o de la parte basal de los tallos remanentes. 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 continuamente, mientras que la de hojas se detiene antes, y la presencia de material muerto comienza a aumentar. El mayor contribuyente de material muerto es la hoja, indicando que en un determinado momento se producen tantas hojas como las que mueren (Cangiano, 2007).

Bajo las cambiantes condiciones climáticas que se producen durante todo el ciclo de crecimiento, la acumulación de MS que se observa en los subsiguientes rebrotes luego de las defoliaciones es muy variable (Cangiano, 2007).

En las especies de crecimiento indeterminado, junto con el inicio de la floración se produce una reducción gradual de la RHT, lo que se debe a una menor producción de hojas, a un incremento de la senescencia foliar en la parte inferior del canopeo, y producción de tallos de mayor peso (Nelson y Moser, 1994).

Mientras que Albrecht *et al.* (1987) señalaron que en alfalfa la RHT decrece desde 1,5 en el estado vegetativo a 0,5 cuando las plantas alcanzan la madurez, Nordkvist y Aman (1986) registraron valores de 3,9 a 0,5, respectivamente. Esto demuestra que, a medida que disminuye la RHT decrece la calidad del forraje.

El concepto de calidad forrajera es complejo e involucra no solo al forraje en sí, sino también al animal que lo consume. La calidad forrajera determina la contribución de un forraje a la producción animal, reconociendo al menos cuatro componentes: a) consumo, es decir qué cantidad de ese forraje es voluntariamente consumido por el animal; b) digestibilidad, o sea cuanto de lo consumido es absorbido a través del aparato digestivo; c) eficiencia, que es la relación entre la producción animal y el suministro de nutrientes; y d) factores de anti-calidad: todos aquellos componentes presentes en el forraje que pueden disminuir el consumo, la digestibilidad y la eficiencia (Fick y Muller, 1989).

Fulkerson (1973) posiciona a las leguminosas forrajeras como el mayor recurso de proteínas concentradas. Una de las características más importantes de la alfalfa para la alimentación animal es su alta calidad nutricional con porcentajes de 15-22 % de proteína bruta (PB), vitaminas (A, B, C, D, E) y minerales (McCoy y Walker, 1984).

Una buena calidad de la alfalfa puede reducir considerablemente la necesidad de suplementos proteicos. Además, sus contenidos relativamente altos de calcio, fósforo y magnesio son importantes en el equilibrio de los requisitos de minerales del ganado. La alfalfa es relativamente baja en fibra, pero alta en proteínas en comparación con otros forrajes, lo que se traduce en un alto consumo. La fibra de las plantas está constituida por tres compuestos: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. La principal fuente de fibra de la ración proviene de los forrajes. A medida que aumenta la fibra en los forrajes, disminuye la energía. Los rumiantes necesitan una cantidad mínima de fibra para mantener la motricidad ruminal, la rumia, y la producción de saliva. La cantidad o el contenido de fibra depende de las especies forrajeras y del estado de madurez a la cosecha.

Los factores más importantes que afectan la calidad final de una planta de alfalfa son: la edad de la planta, la variedad, el contenido de: PB, celulosa, hemicelulosa, lignina,

el total de nutrientes digestibles, foliosidad -RHT- y la ausencia de enfermedades especialmente de hoja. Los factores ambientales como la temperatura, la luz, la humedad, el tipo de suelo y la fertilidad también influyen en el valor nutritivo de la alfalfa. Cuando se habla de calidad en alfalfa se hace referencia a materiales que alcancen una alta digestibilidad de la MS y la mantengan a medida que avanzan es su desarrollo fenológico y, que además, presenten altos contenidos de PB (Juan *et al.*, 1995). En otras palabras, la calidad de este forraje, se basa en la relación entre digestibilidad y contenido proteico en una determinada etapa fenológica de desarrollo del cultivo (Demarquilly, 1966; Kalu y Fick, 1983).

Aún cuando la alfalfa es una de las especies forrajeras de más alto valor nutritivo, se llevan a cabo trabajos para incrementar su calidad a través de mejoramiento genético, aunque el mejoramiento de la calidad forrajera no ha tenido la atención que se anticipaba hace algunos años.

A partir de los años 1991 en EE.UU. y 1992 en Argentina, comenzaron a aparecer en el mercado variedades de alfalfas denominadas *High Quality* (alta calidad), que además de presentar altos rendimientos de forraje fueron seleccionadas específicamente por alta calidad (Huset *et al.*, 1991). No obstante, es un tema que todavía merece ser desarrollado. Las futuras acciones deberían orientarse no sólo a la disminución de fibra (particularmente lignina), sino también al aumento del contenido de carbohidratos no estructurales y a la mejora de la relación entre proteína degradable y no degradable en rumen (Basigalup *et al.*, 2004).

Las hojas y los tallos tienen diferentes composiciones químicas y digestibilidades, donde las hojas contienen 2,5 a 3 veces más PB y tantas veces menos fibra cruda que los tallos; y su digestibilidad es casi 2 veces mayor que la de los tallos (Krachunov y Naydenov, 1995) y que los pecíolos. Dobrenz *et al.* (1969) mostraron que los porcentajes de proteína de los tallos y de las hojas fueron de 11 % y 26 %, respectivamente.

La RHT es una característica no suficientemente investigada por los programas de mejoramiento, pero se trata de una forma simple de mejorar el valor nutritivo de la alfalfa.

Como ya fuera mencionado, a medida que la planta de alfalfa avanza en sus estados de madurez, desde rebrote a floración, va modificando no sólo su forma de acumular forraje sino también su digestibilidad y su composición química. Entre otros parámetros, la digestibilidad (IVTDMS) y el contenido de PB varían en función de la distribución vertical de la MS presente en las hojas y tallos. 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, mientras que el peso de tallos aumenta gradualmente hacia la parte inferior de la planta y no sólo disminuyen la IVTDMS y el contenido de PB de los tallos sino también la RHT. 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, en consonancia con los cambios de morfología y calidad en los distintos estratos, adquiere una gran importancia en la utilización del forraje bajo pastoreo. La digestibilidad de los tallos es muy variable tanto dentro como entre años, pudiendo llegar en verano a valores inferiores a 40% (Cangiano, 1992). Según Vough y Marten (1971), la digestibilidad de los tallos se relaciona directamente con las altas temperaturas y el aceleramiento de la madurez que se producen en esa estación.

Para la evaluación de la calidad se han desarrollado métodos de análisis basados en las propiedades físicas y químicas de los forrajes. Un grupo importante de técnicas de análisis de calidad forrajera tienen como objetivo determinar la cantidad relativa de pared y de contenidos celulares. La pared celular está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, que contribuyen al basamento estructural de la planta y que constituyen la fibra del forraje. A medida que la planta avanza en su madurez, se incrementa el contenido de lignina, confiriendo mayor resistencia a la estructura. Para los rumiantes, la celulosa y la hemicelulosa son sólo parcialmente digestibles, en tanto que la lignina es indigestible. Por eso, el contenido de fibra se asocia negativamente con la calidad. Por otro lado, los contenidos celulares (citoplasma) son la parte de mayor valor nutritivo y de más alta digestibilidad, proveyendo la mayor parte de la PB, los carbohidratos solubles y los lípidos (grasas) (Basigalup, 2007).

La digestibilidad y el consumo son criterios que brindan información sobre valores nutricionales del forraje y esto deriva en la utilización por los animales. La manera ideal de estimar la calidad forrajera es por medio de ensayos con animales (*in vivo*), en donde se mida su respuesta productiva. Siendo esta vía difícil, lenta y sumamente costosa, se desarrollaron diferentes métodos de laboratorio que simulan el proceso de digestión en el rumen. Entre ellos figuran el método *in vitro* en base a degradación mediante jugo ruminal (Tilley y Terry, 1963), el método en base a degradabilidad enzimática (Jones y Hayward, 1975) y el de producción de gas *in vitro* para incubación de forraje en jugo ruminal (Menke y Steingass, 1988).

A pesar de las excelentes características en calidad de la alfalfa, en el país, la producción de heno presenta en general serias deficiencias de calidad, reflejadas en los parámetros que surgen de los análisis químicos. En este contexto, de todas las muestras analizadas por los laboratorios del INTA en Rafaela y Manfredi durante los últimos cinco años, se obtuvieron promedios generales de 16 % PB (rango: 13 % a 24 %), 56 % de fibra detergente neutro (FDN), 44 % de fibra detergente ácido (FDA) y 58 % de IVTDMS, cuando los valores deseables para estos parámetros serían 18-22 %, 40-47 %, 32-36 % y >62 %, respectivamente. Lo mencionado es fruto del uso de maquinaria de corte inapropiada (hélices), del inadecuado manejo que reciben muchos lotes (cortes tardíos, deficiente control de malezas y plagas, uso de rastrillos estelares, etc.) y del estacionado de los rollos a la intemperie. Lamentablemente, otro factor que contribuye a la baja calidad del heno producido para el mercado interno es que el producto se paga por cantidad y no por calidad forrajera. No obstante lo anterior, se viene también experimentando una paulatina mejora de calidad por parte de aquellos sectores que apuntan a la exportación de megafardos y pellets y/o a satisfacer la demanda de sectores domésticos exigentes en valor nutritivo. En este panorama, existe un número creciente de empresas que se dedican a la producción de heno (pellets, cubos y megafardos) de calidad y que atienden tanto al mercado interno como a la exportación. De todo lo anterior, se desprende que las perspectivas para la producción de heno de alfalfa en el país son muy alentadoras. En lo que respecta a las exportaciones, la demanda creciente de varios mercados, en especial países del Cercano y Lejano Oriente, permiten avizorar condiciones muy favorables para los próximos años. En el recientemente celebrado Congreso CIDE 2013, organizado por la

Conferencia Europea de Deshidratadores de Forrajes, se pudieron comprobar no sólo estas tendencias sino también las interesantes posibilidades que se abren para el mercado argentino de alfalfa (Basigalup, 2014).

Morfológicamente, las variedades comerciales de alfalfa, poseen normalmente hojas compuestas TF, alternas y pecioladas, con folíolos de color verde oscuro y dentados en el tercio superior. La primera hoja de la plántula en aparecer es unifoliolada y de forma orbicular. Las segundas y subsiguientes son imparipinnadas y se originan en el ápice del tallo. Cuando la planta ya está desarrollada, las hojas pueden originarse del ápice del tallo o de las yemas laterales/axilares ubicadas en los nudos de los tallos. En el nacimiento de las hojas se observan las estipulas, que son unos apéndices delgados a modo de pequeñas hojas modificadas situadas en la base del pecíolo y adheridas a sus lados. Los folíolos tienen una nervadura central prominente, que se extiende a lo largo de la lámina y de la cual parten nervaduras laterales pinnadas (Rodríguez y Spada, 2007).

El término MF es usado para describir hojas que contienen más de tres folíolos por hoja. La presencia de hojas MF ha sido mencionada y estudiada en varias leguminosas como alfalfa, tanto a nivel diploide (Bingham, 1964; Bingham y Murphy, 1965; Barnes y Hanson, 1967; Brick *et al.*, 1976) tetraploide (Bingham 1964, 1966) y hexaploide (Bingham y Binek, 1969), *Trifolium incarnatum* L. (Knight, 1969), soja (*Glycine max* L.) (Fehr, 1972), trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) (Jaranowski y Broda 1978) y trébol blanco (*Trifolium repens* L.) (Baltensperger *et al.*, 1991; Ford and Claydon, 1996).

En algunas oportunidades se suelen observar hojas MF con cuatro (tetrafolioladas), cinco (pentafolioladas), seis (hexafolioladas) y siete (heptafolioladas) folíolos, aunque también pueden encontrarse algunas hojas con ocho y nueve, o como en algunos individuos seleccionados en la Estación Experimental Agropecuaria (E.E.A.) Manfredi-INTA con diez y once folíolos (Odorizzi, A. S., com. pers.³) (Figura 1).

³ Ing. Agrónomo (MSc). Mejoramiento Genético de Alfalfa- E.E.A. Manfredi – INTA.

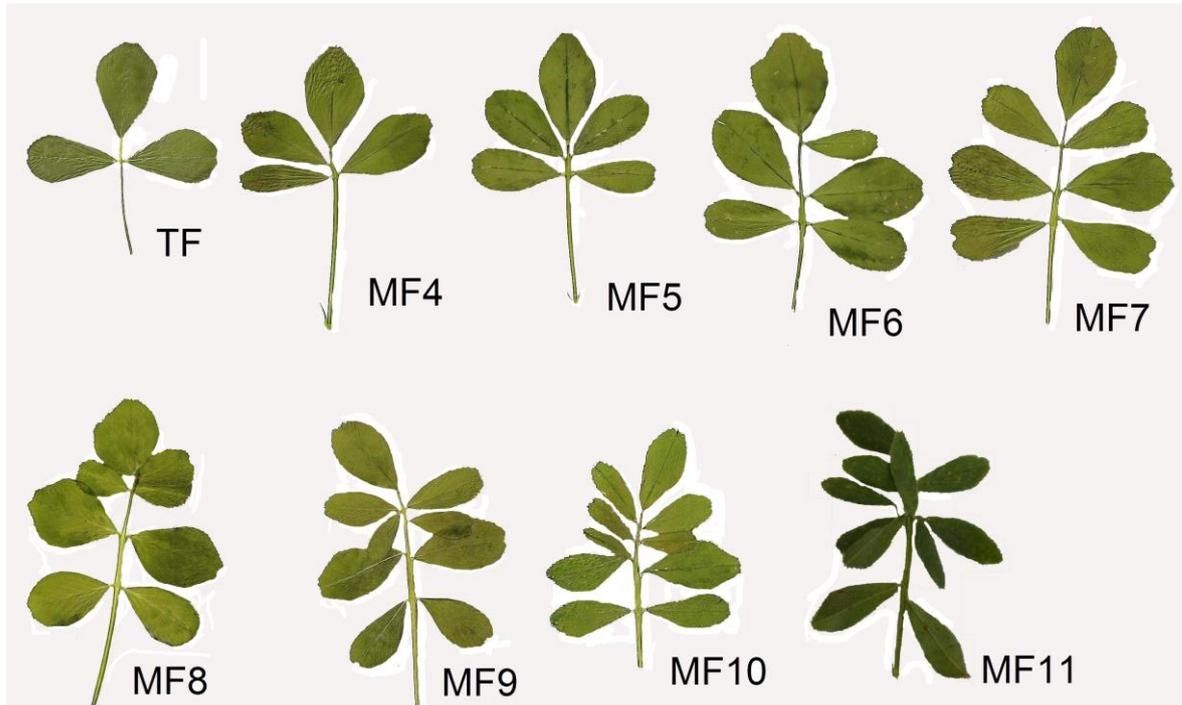


Figura 1. Hojas compuestas de alfalfa: hoja trifoliolada (TF) y 8 hojas multifolioladas con folíolos desde 4 a 11 (MF4 a MF11).

Varios informes indican que el carácter MF es altamente heredable (Bingham y Murphy, 1965).

Tanto en alfalfas con características TF como MF, la primera hoja verdadera en aparecer es unifoliolada y a medida que la planta continúa su desarrollo van apareciendo en disposición alterna hojas TF o MF (Mueller and Teuber, 2007).

Las variedades de alfalfas MF han generado el interés de los productores de carne y leche en los beneficios potenciales de estas variedades sobre las TF, ya que han sido promovidas como más frondosas y de mayor valor nutritivo que las TF (Twidwell *et al.*, 2002).

Desde el punto de la calidad forrajera, el carácter MF puede ser importante dado que, como ya se mencionara, las hojas de la alfalfa poseen un valor nutritivo más elevado que el de los tallos (Fick y Holthausen, 1975; Buxton *et al.*, 1985).

Varios estudios demostraron en alfalfas MF una RHT más alta que la de plantas TF (Bingham y Murphy, 1965; Ferguson y Murphy, 1973; Brick *et al.*, 1976), lo que podría elevar la calidad forrajera (Buxton, 1988). No obstante, y a pesar de su potencial importancia, existe sobre este carácter muy escasa información que se haya generado en Argentina. Un trabajo realizado por Romero *et al.* (2002) en la E.E.A. Rafaela- INTA, hace referencia a que algunos cultivares MF no presentaron mayor RHT que otros TF tradicionales.

Existen en el mercado cultivares con porcentajes variables de hojas MF (alfalfas "multileaf"), que se publicitan como poseedores de un mayor valor nutritivo como consecuencia de haber sido seleccionados por ese carácter. Hay evidencias de que la planta compensa fisiológicamente el mayor número de folíolos en las hojas con tallos más pesados o con una menor producción de forraje por ha, de manera que el resultado final es comparable al de las alfalfas TF seleccionadas por mayor valor nutritivo relativo (VNR). Por razones de mercado, en algunas variedades se ha buscado mayor expresión del carácter MF a partir de materiales previamente seleccionados por menor contenido de fibra, promocionando de ese modo productos con supuestamente mayor VNR por ser MF.

En el caso específico de las alfalfas MF, el efecto del avance genético de la selección por alta expresión MF sobre el valor agronómico de la población, dependerá de las correlaciones entre este carácter y los parámetros de productividad y calidad forrajera. En este contexto, es importante que la alta expresión MF se correlacione con caracteres morfológicos (tamaño y número de hojas, RHT, altura y porte de la planta, etc.), con la producción de forraje y con parámetros de calidad (PB, IVTDMS, contenido de fibra, etc.). Por otro lado, conocer la magnitud de la interacción genotipo-ambiente (Pob*A) se torna esencial para orientar al mejorador en la toma de decisiones concernientes a los programas de mejoramiento. Es importante no ignorar esta respuesta diferencial de los genotipos sujetos a evaluación en diferentes ambientes, ya que podría conducir a conclusiones erróneas.

Ferguson y Murphy (1973) y Brick *et al.* (1976) reportaron que las plantas de alfalfa MF tuvieron mayor porcentaje en peso seco de hoja que plantas TF. Brick *et al.* (1976) también encontró que las plantas MF tenían un mayor peso específico de las hojas (peso seco de hoja por unidad de área foliar) que las plantas TF. Bauder (1938) y Bingham y Murphy (1965) informaron que plantas MF de alfalfa no mostraron un porcentaje significativamente más alto de hoja que los testigos TF. Además varios investigadores como Pearce *et al.* (1969), Delaney y Dobrenz (1974) y Retzinger (1977) han demostrado que el peso específico de hoja está correlacionado positivamente con la fotosíntesis aparente por unidad de área foliar en alfalfa.

Eames (1961) sugirió que las plantas MF son la forma primitiva en leguminosas. La expresión del carácter MF bajo diferentes condiciones ambientales ha sido estudiada por varios investigadores. El investigador ruso Mokeyeva (1940) informó que la expresión MF era influenciada por el fotoperiodo y observó que, alfalfas MF creciendo a campo, reaccionaban a fotoperíodos cortos con un aumento de la frecuencia de las hojas MF; en éstas últimas se presentaban hojas MF en brotes de primavera y otoño y que además, estas condiciones también propiciaban el incremento en el tamaño foliar. Bingham (1964) informó que, tanto en condiciones controladas en cámara de crecimiento como a campo, la frecuencia de hojas MF no era afectada por la estación del año (primavera, verano u otoño) y que, en condiciones de baja temperatura y fotoperiodos cortos, no se afectaba la frecuencia de hojas MF pero sí el incremento de tamaño de las hojas. El rasgo también fue reportado por Mokeyeva (1940).

El carácter MF tanto en alfalfas diploides como tetraploides, se ha estudiado en los últimos años por varios investigadores, incluyendo Bingham (1964, 1966), Bingham y Murphy (1965), Ferguson y Murphy (1973), Brick *et al.* (1976) y Retzinger (1977). Bauder (1938) fue el primero en estudiar el carácter MF; él propuso un modo disómico de herencia con dos genes independientes, que muestran epistasis (interacción entre genes situados en distintos loci en un mismo cromosoma que consiste en que cada gen puede enmascarar o suprimir la expresión del otro). 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 de un alelo dominante, que se contrapone a

la expresión de otro gen dominante. Bingham (1964) estudió el patrón de herencia MF en alfalfa diploide. Después de analizar las proporciones de segregación en dos S_1 , una F_1 , once F_2 y tres familias de retrocruzamiento, sugirió que eran tres genes independientes los involucrados en la expresión del carácter; un gen recesivo (*mf*) en condición homocigota en un locus se requiere para el desarrollo de hojas MF, y dos genes aditivos 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 éste 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 del 19 % en el ciclo II hasta el 68 % en el ciclo III. Concluyeron que la selección recurrente fue eficaz en el aumento de la frecuencia de las plantas MF, plantas con alta frecuencia de hojas MF y estabilidad de la expresión. Estas conclusiones muestran que el rasgo es altamente heredable. Brick *et al.* (1976) estudiaron la transmitancia del carácter MF en alfalfas sin reposo invernal concluyendo que, el rasgo era fácilmente transmisible, aunque parecía estar bajo un complejo control genético. Un examen preliminar realizado por Azizi (1980) de los resultados de cruzamientos dialélicos indicó que el carácter MF en alfalfa tetraploide fue controlado por más de dos genes principales. También fue evidente que el grado de expresión del rasgo era dependiente del número de alelos dominantes. Asumiendo la herencia tetrasómica en alfalfa, parecía que tres genes principales influyeron en el grado de expresión del carácter MF. Estos tres genes, denominados LA, LB, 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 sólo de dominancia parcial y la dominancia completa estuvo ausente. Se planteó la hipótesis de que las plantas con una puntuación media de 3,1; 3,2 a 3,4; 3,5 a 4,0, y mayor a 4,1 FH contenían 4, 5, 6, y 7 alelos dominantes por genotipo, respectivamente. Observaciones en segregaciones de familias F_2 sugieren que el carácter MF, en alfalfa tetraploide, es controlado por al menos tres genes tetrasómicos, LA, LB y LM, con herencia cromosómica al azar. La presencia de cuatro o más alelos dominantes produciría hojas MF en alfalfa. La heredabilidad en el sentido amplio de este carácter en la alfalfa fue de alrededor del 86 %. Esto indica que los factores ambientales tenían poca influencia. Estos resultados están en desacuerdo con los de Bauder

(1938), quien sugirió que había dos genes independientes y dominantes, ambos heredados disómicamente que controlaban la expresión del carácter MF. Hubo poca evidencia de la presencia de citoplasma o efecto materno.

El género *Medicago* se compone de aproximadamente 60 especies, incluyendo algunas alógamas perennes, como la alfalfa, y otras anuales autógamas, como *M. truncatula* (Tesfaye *et al.*, 2006). Su ploidía varía de diploide ($2n = 16$) a poliploide ($2n = 32, 48, 64$). La alfalfa cultivada es autotetraploide (Stanford, 1951), con $2n = 4x = 32$ (Armstrong, 1954), con un tamaño de genoma de 800-1000 Mpb (Blondon *et al.*, 1994). Existen dos subespecies principales en cada nivel de ploidía, subsp. *falcata* con flores amarillas y vainas falcadas y subsp. *sativa* con flores de color púrpura y vainas enrolladas (subsp. *caerulea* a nivel diploide) (Quiros y Bauchan, 1988).

La alfalfa posee flores perfectas y fecundación alógama, favorecida por mecanismos de autoesterilidad y autoincompatibilidad (Viands *et al.*, 1988). En condiciones naturales, la polinización es entomófila realizada por distintas especies de *himenópteros*, que utilizan sofisticados mecanismos de desenlace floral (Quiros y col., 1988).

La extraordinaria variabilidad genética de la alfalfa es enriquecida por la introgresión de las especies que conforman el complejo *Medicago sativa* (Quiros y Bauchan, 1988) lo que le otorga una gran capacidad de adaptación a las más diversas condiciones de suelo, clima y manejo.

La herencia de caracteres en alfalfa es compleja, por tratarse, como se ha mencionado, de una autotetraploide. Su naturaleza tetrasómica hace que su comportamiento genético sea distinto al de los diploides; esto, sumado a la gran sensibilidad a la endocría que presenta, condiciona los métodos utilizados para su mejoramiento. Tradicionalmente, la depresión por endocría se ha considerado el opuesto a la heterosis (Wilsie, 1966; Falconer y Mackay, 1996). Aunque las causas de dicha depresión no son completamente conocidas, se considera que, al menos en parte, ésta se debe a la exposición de alelos deletéreos que se acumulan a medida que la autofecundación

fuerza a los *loci* hacia la homocigosidad (Willis, 1999). Estas características biológicas han dictado que muchos cultivares de alfalfa, se obtengan por SFR y se comercialicen como cultivares sintéticos obtenidos luego de tres a cuatro generaciones de cruzamientos panmícticos (Tysdal *et al.*, 1942).

La mejora convencional de plantas se basa en la selección por el fenotipo de los individuos de interés por alguna característica distintiva, entre los individuos de progenies segregantes resultado de la hibridación. La obtención de nuevos cultivares por esta vía implica se toma no menos de ocho a diez años. En otras palabras, el mejoramiento convencional o tradicional se basa en la existencia de variabilidad genética natural heredable de esta forrajera y, mediante la aplicación de los principios genéticos clásicos relativos al fenotipo, ó características observables de la planta que se desean mejorar y se vale de la reproducción sexual para la modificación de los mismos. Este hecho hace que el aprovechamiento de la variabilidad esté restringido por barreras de cruzabilidad.

Los métodos de mejoramiento constituyen diferentes modos de combinar técnicas y unidades de selección con el posterior manejo de los genotipos seleccionados. Éstos se pueden clasificar de acuerdo con distintos criterios, que los agrupan según sistemas de apareamiento (intra o interpoblacionales) y unidades de selección (individuos o familias) (Rumbaugh *et al.*, 1988).

La SFR es un refinamiento de la selección masal, y consiste en elegir individuos deseables a través de su fenotipo y su posterior entrecruzamiento para la producción de la generación siguiente, donde se repite el proceso anterior (Dudley, *et al.*, 1963; Eberhart *et al.*, 1967; Hanson *et al.*, 1972), tantas veces sea necesario, hasta que se aumente la frecuencia de los alelos favorables y se alcance el nivel de mejoramiento propuesto.

Otro método muy utilizado en alfalfa es el cruzamiento complementario de cultivares (Elgin (Jr.) *et al.*, 1983). El retrocruzamiento se utilizó en unos pocos casos (Murphy y Lowe, 1966; Peaden *et al.*, 1976), pero ya ha caído en desuso.

La SFR, al igual que la selección masal, es más efectiva para el mejoramiento de caracteres cualitativos y de alta heredabilidad (Twamley, 1974). Para su empleo exitoso, es fundamental mantener una adecuada presión de selección (Rodríguez, 1986), término que define el grado con que se ejerce la selección sobre una determinada característica. Como lo señalan Hill y Haag (1974), las complicaciones que pueden aparecer con la utilización de este método se relacionan con bajas frecuencia inicial de los genes de interés, baja heredabilidad del carácter en cuestión y elevado valor de la varianza ambiental.

La SFR ha sido empleada con éxito por el programa de desarrollo de cultivares de alfalfa del INTA Manfredi (Convenio de Vinculación Tecnológica INTA-Palo Verde S.R.L) para el mejoramiento de caracteres como el rendimiento de forraje y la resistencia combinada a plagas y enfermedades y se han obtenidos los para la obtención de cultivares comerciales GRI 6 al 10. Para ello, se utiliza la SFR de genotipos destacados en condiciones de campo (pastoreo o corte), los cruzamientos complementarios de cultivares y los ciclos de SFR para resistencia a antracnosis (*Colletotrichum trifolii* Bain & Essary), a podredumbre húmeda o fitóftora (*Phytophthora megasperma* Drechs. f .sp. *medicaginis*) y a los pulgones azul (*Acyrtosiphon kondoi* Shinji) y moteado (*Terioaphis trifolii* Monnell), de acuerdo a los protocolos definidos por la North American Alfalfa Improvement Conference (NAAIC). Durante la selección a campo, se conservan las plantas vigorosas y con coronas compactas y se eliminan los individuos afectados por corchosis (*Xylaria* spp.), por el complejo de podredumbres de corona y raíz (*Fusarium* spp., *Phoma* spp., *Rhizoctonia* spp., *Colletotrichum* spp., etc.) o por enfermedades foliares. Las plantas selectas –provenientes tanto de la selección a campo como de los insectarios y/o de los infectarios- se agrupan por GRI, se transplantan a jaulas de intercrucamiento con abejas melíferas (*Apis mellifera*) y se conducen de ahí en más como variedades sintéticas. La producción de semilla prebásica o *breeder* se lleva a cabo en la EEA Manfredi-INTA. La producción de semilla fundación o básica de cada sintético se hace en la EEA San Juan-INTA, donde las condiciones ambientales son más propicias para la obtención de buenos niveles de producción de semilla de calidad. La evaluación de la producción de forraje y persistencia de los sintéticos avanzados (*Sin-2* o *Sin-3*), se hace bajo condiciones de corte en una red interna que incluye cinco localidades y series de ensayos que se conducen por

tres años. Los materiales que se destacan en todas las localidades son caracterizados e inscriptos como nuevos cultivares.

La mayoría de los programas de mejoramiento de alfalfa se enfocan en tres temas principales: incremento de la producción de forraje, aumento de la persistencia y resistencia múltiple a plagas y enfermedades. No obstante lo anterior, también se realizan esfuerzos para mejorar la calidad forrajera a través del aumento de la digestibilidad o del valor nutritivo relativo (alfalfas “HQ”), de la disminución de la concentración y/o composición de la lignina, de la reducción del potencial timpanizante ó del aumento de la expresión del carácter MF. La selección por todos estos parámetros debe estar asociada a la obtención de materiales con buen comportamiento agronómico (altos rendimientos de biomasa aérea, persistencia y resistencia combinada a plagas y enfermedades), dado que en un cultivar comercial el aumento de la calidad *per se*, no garantiza su difusión entre los productores pecuarios.

La productividad y la persistencia de la alfalfa se ven afectadas por numerosos factores de tipo abiótico (salinidad, acidez, sequía, anegamiento, niveles tóxicos de aluminio, etc.) y de tipo biótico (plagas), entendiéndose por plaga a todos los animales, microorganismos y plantas que tienen un efecto negativo sobre la producción agrícola.

El cultivo de alfalfa, destinado tanto a la producción de forraje como a la producción de semillas, forma un microclima particular, por la densidad del cultivo y un ciclo de crecimiento plurianual, lo que lo transforma en un agroecosistema perenne a corto plazo, capaz de albergar una amplia variedad de plagas, tanto insectos benéficos y perjudiciales como patógenos. Los ataques pueden causar grandes pérdidas de productividad tanto en la cantidad como la calidad del forraje y en la persistencia del alfalfar.

En la Argentina, cuatro grupos de insectos causan del 80 al 90% del daño de plagas al cultivo de alfalfa, dentro de los que se encuentran los pulgones. Los pulgones o áfidos pertenecen a la familia Aphididae del orden Homóptera. Estos poseen un complejo ciclo reproductivo, incluyendo fases partenogénicas y sexuales (González, 2003); forman

colonias activas en las plantas y se alimentan de éstas extrayendo la savia del floema -lo que explica, en parte, su especificidad con plantas hospedantes- a través de su aparato bucal picador-suctor e inyectan saliva tóxica. Esta savia contiene una alta concentración de carbohidratos, siendo muy baja la de nitrógeno y por lo tanto ellos filtran la savia reteniendo parte de las sustancias nitrogenadas y excretando los carbohidratos (Delfino, 2003; Brewer y Argüello, 1980). Las plantas detienen su crecimiento, acortan sus entrenudos y las hojas se amarillean. Por lo antes mencionado, el rendimiento y la calidad del forraje se reducen en proporción a la intensidad y la duración del ataque de esta plaga (Aragón e Imwinkelried, 2007) y, en ataques severos, pueden producir la muerte de plantas. También puede segregarse sustancias melosas sobre las que se desarrollan hongos saprófitos que desmejoran la calidad del forraje.

A nivel mundial se conocen unas 10 especies de pulgones que colonizan plantas de alfalfa. De éstas, solo ocho son conocidas en Argentina y cuatro son las declaradas serias: pulgón verde (*Acyrtosiphon pisum* Harris), pulgón azul de la alfalfa (*Acyrtosiphon kondoi* Shinji), pulgón moteado o manchado (*Therioaphis trifolii* Money) y pulgón negro (*Aphis craccivora* Koch) (Ortego y Mier Durante, 2003). Actualmente los más problemáticos son el pulgón azul y el moteado, aunque el pulgón negro está teniendo una reciente importancia por ser uno de los presuntos agentes vector del *rhabdovirus* del achaparramiento de la alfalfa o de la enación de la alfalfa (*Alfalfa Enation Virus*).

El pulgón azul originario del Norte de China y Manchuria hizo su aparición en Argentina en 1976. El mayor ataque se produjo en el otoño de 1977 produciendo pérdidas de hasta el 70 % al no contarse con variedades o ecotipos resistentes o tolerantes. Las colonias se establecen sobre tallos y brotes, reproduciéndose en forma activa. Los daños causados son similares a la de otros pulgones pero, tiene síntomas que son característicos de ésta especie. El daño económico causado por el pulgón azul se da a menores densidades que otras especies de áfidos (Aragón e Imwinkelried, 2007).

El pulgón moteado de la alfalfa está presente en todas las regiones del país donde se cultiva esta especie. Los mayores ataques se registran durante el período primavera-verano-otoño, especialmente en condiciones de sequía, y las zonas usualmente más

afectadas son los sectores subhúmedo y semiárido de la Región Pampeana. A diferencia de las demás especies de pulgones que atacan la alfalfa, el pulgón moteado se ubica con preferencia en la cara inferior de las hojas basales de las plantas. En caso de ataques muy intensos y prolongados, pueden ocasionar defoliaciones importantes e incluso la muerte de la planta. En 1957 se logró en EE.UU. el cultivar Moapa, primera variedad de alfalfa con resistencia a este pulgón. En la actualidad, existe en nuestro país un gran número de variedades resistentes, cuyo uso reduce significativamente la necesidad de efectuar tratamientos de control no sólo para este pulgón sino también para el resto de áfidos de la alfalfa. El control de los pulgones puede realizarse de varias maneras; éstas pueden ser a través de controladores biológicos como son las avispas parásitas de la familia Aphididae e insectos de la familia Coccinellidae y a través de hongos del género *Entomophthora*. También se puede realizar por medio de la aplicación de agroquímicos y a través del uso de variedades de alfalfa resistentes al ataque de pulgones (Aragón e Imwinkelried, 2007), siendo éste último el método de control más efectivo, eficiente y duradero.

La acción de microorganismos plaga ó patógenos tales como hongos, bacterias, nematodos, virus y micoplasmas que generan enfermedades, son responsables también de la disminución de la calidad forrajera, la reducción de la vida útil de la pradera, la mayor predisposición a factores adversos como insectos, malezas, estrés hídrico por déficit o exceso y desbalance nutricional (Leath *et al.*, 1988).

Toda enfermedad genera una disminución de la producción de MS y semilla, del *stand* de plantas y vigor, como así también del valor nutritivo del forraje destinado al consumo (Barnes *et al.*, 1969).

Las enfermedades que afectan al cultivo de la alfalfa son limitantes en el mantenimiento de lotes productivos (Hijano y Pérez Fernández, 1995), teniendo en cuenta que hasta un 25 % de la producción de forraje y hasta un 10 % de la producción de semilla se pierde debido a su incidencia, Leath (1981, citado por Hijano y Pérez Fernández, 1995).

Se denomina triángulo de la enfermedad o triada ecológica a la interacción que se produce entre la cepa virulenta de un agente patógeno, el huésped susceptible y las

condiciones ambientales favorables para el desarrollo de los agentes patógenos (Berger, 1977). De acuerdo con Graham *et al.* (1979), las enfermedades son el resultado de la interacción entre hospedantes susceptibles, patógenos virulentos y condiciones ambientales predisponentes, incluyendo entre éstas no sólo los aspectos climáticos y edáficos, sino también los vectores y las prácticas culturales inadecuadas.

Las enfermedades pueden provocar pérdidas económicas de dos tipos: directas e indirectas. Dentro de las primeras, se destacan las pérdidas de calidad por manchas foliares y/o defoliación y el menor rendimiento debido a la mortandad de plantas y/o disminución del vigor. Las indirectas se generan por disminución del valor nutricional del forraje (presencia de micotoxinas), disminución de la nodulación y de la consecuente fijación de N₂, mayor susceptibilidad al ataque de insectos, proliferación de malezas agresivas, etc. (Gieco *et al.*, 2007).

La antracnosis es una enfermedad de relevancia en alfalfa en muchas regiones cálidas y húmedas del mundo, producida por hongos del género *Colletotrichum* (Irwin, 1974; Ostazeski (1978, citado por Boland y Brochu, 1989); Elgin (1981, citado por Boland y Brochu, 1989)), presentando síntomas de mayor severidad en esta especie y trébol rojo (Stovold y Francis, 1988; Welty, 1982). En alfalfa, la infección puede llegar a la corona resultando en la muerte de la planta o provocando lesiones que perdurarán en el invierno, afectando la posterior producción de forraje, Graham (1979, citado por O'Neill *et al.*, 1989). En estados avanzados de la enfermedad, la corona sufre una fase de podredumbre que se caracteriza por una coloración negra o azul negruzca (Irwin, 1974; Barnes (1969, citado por Graham *et al.*, 1972)). Durante el período de establecimiento del alfalfar, el patógeno puede ocasionar la muerte de las plántulas *-damping off-* (Gieco *et al.*, 2007). Como consecuencia de ésta, se han observado pérdidas de *stand* de plantas que oscilan entre el 3 % y el 45 %, dependiendo de la susceptibilidad de los cultivares afectados (Hijano, 1985). Esta enfermedad se hace presente en primaveras templadas y húmedas, disminuye en períodos de estrés hídrico del verano y retoma importancia hacia el otoño (Hijano y Pérez Fernández, 1995; Gieco *et al.*, 2007). En cultivares susceptibles, con altos niveles de infección de antracnosis, la producción de forraje se redujo entre 25 y 30 %, causando una pérdida del *stand* de plantas de 30 % o más, y predisponiéndolas a sufrir

daño durante el invierno (Barnes *et al.*, 1969). Según Grau *et al.* (1984), la antracnosis puede reducir la producción de forraje entre 0,5 a 1,25 t MS ha⁻¹. La forma de control de enfermedades puede variar desde la aplicación de fungicidas -práctica poco económica- hasta el aprovechamiento rápido del lote al evidenciar los síntomas de la enfermedad, aunque la más efectiva es el empleo de cultivares resistentes (Gieco *et al.*, 2007).

Sorensen *et al.* (1988) clasifican la resistencia de las plantas en cinco grados: alta resistencia, resistencia intermedia, baja resistencia, susceptibilidad y alta susceptibilidad. La NAAIC 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. Allí 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 a emplear en cada caso. La Tabla 2 resume las clases de resistencia para caracterización de cultivares que utiliza la NAAIC en base a los porcentajes de plantas resistentes que se obtienen en pruebas protocolizadas. En la actualidad, la forma más efectiva de control es el empleo de cultivares resistentes (Barnes *et al.*, 1969; Graham *et al.*, 1976; Gieco *et al.*, 2007).

La SFR, en conjunto con la selección en tandem o el uso de niveles independientes de selección, ha sido muy efectiva en el desarrollo de cultivares con resistencia múltiple a plagas. El cruzamiento complementario de cultivares también ha sido exitoso en la obtención de materiales resistentes (Sorensen *et al.*, 1988).

Tabla 2. Clases de resistencia utilizadas en la caracterización de cultivares de alfalfa.

% Plantas Resistentes	Clases de resistencia	Abreviatura
0-5	Susceptible	S
6-14	Moderadamente Susceptible	MS
15-30	Moderadamente Resistente	MR
31-50	Resistente	R
>50	Altamente Resistente	AR

En la resistencia a los insectos, los mecanismos de resistencia se deben a la acción individual o combinada de tres factores: antibiosis (sustancias segregadas por las plantas que afectan de varias maneras sobre el insecto, desde el crecimiento, la supervivencia y/o la tasa de reproducción), tolerancia (la planta soporta el daño causado por los insectos) y la antixenosis o no preferencia (característica de la planta que la hace no deseable como alimento, lugar de oviposición o como protección). Con respecto a la resistencia a enfermedades, según Fernández Valiela (1978), la capacidad de resistir una enfermedad puede expresarse como inmunidad, cuando el patógeno es incapaz de atacar a su hospedante, o por distintos grados de resistencia.

La resistencia puede estar condicionada por factores internos y externos que contribuyan para reducir la probabilidad y el grado de infección. Los distintos grados de resistencia pueden lograrse mediante cualquier característica heredable de la planta que contribuya a localizar o aislar el patógeno en el punto de infección, reducir el efecto perjudicial de las sustancias tóxicas producidas por el patógeno, limitar o inhibir la reproducción del mismo u otra característica que permita a la planta completar su crecimiento y desarrollo. Dentro de los mecanismos de resistencia, se destaca la resistencia específica que se expresa en ciertos cultivares luego de la fase de penetración del patógeno. Este tipo de resistencia depende de la presencia de genes de resistencia dominantes en la planta que discrimina entre razas virulentas y avirulentas del patógeno (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1992).

De modo general la resistencia a antracnosis es considerada una característica de alta heredabilidad (Ostazeski *et al.*, 1969; Gioco *et al.*, 2007). Después de un ciclo de selección, la resistencia puede incrementarse entre 18 y 75 % (Ostazeski *et al.*, 1969). En la mayoría de los casos, la resistencia a microorganismos que causan enfermedades está condicionada por uno o pocos genes con grado variable de dominancia (Elgin *et al.*, 1988), lo que hace que el progreso de selección sea relativamente rápido, como en *Colletotrichum trifolii*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum* y virus del mosaico o *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV). En unos pocos casos, la herencia de la resistencia es cuantitativa, como en *Leptosphaerulina briosiana* y *Verticillium albo-atrum* (Kehr *et al.*, 1972).

Otro aspecto interesante es que, por lo general, los genes de resistencia a distintas enfermedades no están ligados y actúan en forma independiente unos de otros. Afortunadamente, la producción de razas fisiológicas o patogénicas es insignificante en la mayoría de los patógenos, habiéndose registrado sólo unas pocas excepciones en *C. trifolii* (Welty y Mueller, 1979) y *Peronospora trifoliorum* (Stuteville, 1973). Por lo anteriormente mencionado, es de fundamental importancia contar con materiales con resistencia a plagas ya que es la forma más eficiente, ecológicamente amigable y económica para abordar su control.

Caracterizar el material seleccionado con respecto a su comportamiento frente a plagas y enfermedades, es de suma importancia a fin de mejorar o no los niveles de resistencia combinada a enfermedades e insectos en pos de obtener un cultivar MF con niveles aceptables de resistencia. La resistencia genética posee características propias que son determinantes de su priorización entre los caracteres a incorporar en los programas de mejoramiento de alfalfa. En ese contexto, la correcta valoración del nivel de resistencia a una determinada plaga debe hacerse en función de la frecuencia o del porcentaje de plantas presentes en cada clase de resistencia preestablecida.

La biotecnología contribuye al mejoramiento genético ya que, entre otras características permite estudiar el nivel de diferenciación entre materiales originados a través de un proceso de mejoramiento genético convencional y entre éstos el pool genético que le dio origen. Las diferencias en las frecuencias alélicas entre los padres de una población sintética, son necesarias para contrarrestar los efectos de consanguinidad (Rotili *et al.*, 1999) y para poner en evidencia y explotar los efectos de la heterosis (Brummer, 1999). A pesar de esto, la diversidad genética por sí sola no es suficiente para la expresión de la heterosis (Kidwell *et al.*, 1999, Riday *et al.*, 2003).

Luego de varios ciclos de SFR es difícil saber si la diversidad genética presente en la población original, se mantuvo o decreció luego del proceso selectivo. Por lo antes mencionado es importante entonces estimar y comparar la diversidad genética entre y dentro de la población original y la obtenida luego del proceso selectivo.

En la actualidad, se cuenta con un gran número de marcadores moleculares, no obstante, los SSRs y AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) son los que ofrecen mayores ventajas en el análisis genómico debido a su capacidad para detectar polimorfismos entre genotipos, su alta reproducibilidad y su cobertura genómica. Para estudiar la diversidad genética se utilizan comúnmente los SSR, conocido como marcadores microsatélites. Éstos proporcionan información útil y son eficientes debido a que son altamente polimórficos, co-dominantes, abundantes en el genoma y pueden ser fácilmente detectados por métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Suwabe *et al.*, 2004). Los SSR consisten en pequeñas secuencias con 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 del 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 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). Los marcadores de SSR se han aplicado en alfalfa en otros estudios (Carelli *et al.*, 2009; Diwan *et al.*, 2000; Ellwood *et al.*, 2006; Eujayl *et al.*, 2004; Falahati-Anbaran *et al.*, 2007; Flajoulot *et al.*, 2005; He *et al.*, 2009; Mengoni, 2000a y 2000b; Petolescu *et al.*, 2010; Sledge *et al.*, 2005).

1.3 Justificación

Es importante que el mejorador, a efectos de orientar su tarea de selección, disponga no sólo de información básica sobre parámetros genéticos tales como componentes de varianza y heredabilidad, sino también sobre correlaciones genéticas entre los caracteres de importancia. A tal efecto, el presente trabajo de tesis se justifica, desde el punto de vista teórico, en la generación de conocimientos sobre diferentes aspectos de la genética de materiales MF. La bibliografía existente sobre estos aspectos es escasa a nivel internacional y en Argentina prácticamente nula; por consiguiente, los resultados generados serán un valioso aporte para el mejoramiento genético de la alfalfa. Además, el conocimiento de la herencia del carácter MF puede ayudar a determinar los procedimientos de selección más eficientes para el desarrollo de poblaciones de alfalfa con estas características.

Desde un punto de vista práctico, la generación de una población de alfalfa con alta expresión del carácter MF, sin reposo invernal, permitirá contar en un futuro cercano con un cultivar desarrollado en Argentina y adaptado íntegramente a las condiciones locales, lo cual es un avance sin precedentes en el país. Además, se contará con un material de alto valor nutritivo que permitiría a los productores ganaderos incrementar su producción de carne y leche.

Desde el punto de vista metodológico, el aporte de esta investigación a otros estudios futuros –tanto en la faz de materiales y métodos como en otros aspectos concretos, como la detección de hasta once folíolos por hoja, característica que no había sido citada anteriormente- permitirá la generación de nuevos conocimientos y podría tener un efecto multiplicador. Por otro lado, la metodología de selección que se empleó en este trabajo, que incluye la selección de plantas MF en dos estados de madurez de la alfalfa, permite no sólo aumentar la presión de selección, sino también reducir el número de plantas que se utilizan. Esto último es muy importante en términos de aumentar la eficiencia de los recursos humanos, económicos y de infraestructura.

1.4 Hipótesis

1. El carácter MF no implica un mayor rendimiento de forraje en MS aunque si una mayor calidad de forraje en comparación con cultivares TF; por ende, existe covariabilidad entre el índice de expresión MF (IMF) y la calidad de forraje en las poblaciones de alfalfa MF obtenidas por SFR utilizadas en este estudio.

2. El proceso de SFR no modifica las características de resistencia presentes en la población original frente a antracnosis, pulgón azul y pulgón moteado de la población obtenida luego de cuatro ciclos de selección.

3. No hay pérdida de variabilidad en el proceso de selección ya que la diversidad genética presente en la población original se mantiene luego de cuatro ciclos de SFR.

1.5 Objetivos de la investigación

1.5.1 Objetivo general

Evaluar componentes del rendimiento, morfología de tallo y hoja, calidad forrajera, comportamiento frente a plagas y caracterización molecular mediante SSRs, en Pob de alfalfa extremadamente sin reposo invernal, obtenidas por SFR con diferente índice de expresión del carácter MF.

1.5.2 Objetivos específicos

Objetivo 1: Determinar componentes de rendimiento de forraje, características morfológicas de tallo y hoja y parámetros de calidad forrajera en Pob de alfalfa con diferente índice de expresión del carácter MF, en ambientes definidos por la condición edáfica y por condiciones de humedad (riego y seco) en base a plantas individuales. Explorar la interacción población-ambiente (P*A) y correlacionar el rendimiento y los parámetros de calidad de forraje de las Pob seleccionadas con las características morfológicas evaluadas.

Objetivo 2: Determinar componentes de rendimiento de forraje, características morfológicas de tallo y hoja y parámetros de calidad forrajera en Pob de alfalfa con diferente índice de expresión del carácter MF, en base a plantas bajo cultivo denso. Explorar la interacción P*A y correlacionar el rendimiento y los parámetros de calidad de forraje de las Pob seleccionadas con las características morfológicas evaluadas.

Objetivo 3: Caracterizar el comportamiento de la resistencia a antracnosis, pulgón azul y moteado de la Pob original y de aquella obtenida luego de cuatro ciclos de SFR.

Objetivo 4: Estimar la diversidad genética a través de marcadores moleculares SSR, entre la Pob original y aquella obtenida luego de cuatro ciclos de SFR.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios planteados en este trabajo se desarrollaron en el marco del Convenio de Vinculación Tecnológica (CVT Alfalfa INTA-Palo Verde S.R.L.) para el mejoramiento genético de alfalfa de Argentina y se llevaron a cabo en el campo experimental, invernaderos y laboratorios de la E.E.A. Manfredi-INTA, ubicada a los 31° 49' 12" de Latitud Sur y 63° 46' 00" Longitud Oeste y a 292 m.s.n.m. Las evaluaciones y resultados del presente trabajo fueron obtenidas durante las temporadas 2010-2014.

2.1 Caracterización edafoclimática del área de estudio

El clima del área se caracteriza por ser templado, con una precipitación media anual de 744 mm, distribuidos según un régimen de tipo monzónico. La E.E.A. Manfredi se halla en el sector de la carta de suelos denominado Pampa Alta. Se caracterizó el área mediante la Hoja Oncativo INTA-SMAG y RR (Jarsun *et al.*, 1987). El relieve es muy plano (subnormal), con una pendiente < 0,5 %. El suelo está clasificado como Haplustol éntico (Serie Oncativo), profundo, bien drenado, desarrollado sobre materiales loésicos de textura franco-limosa que ocupan las lomas casi planas y muy extendidas. La secuencia de horizontes comúnmente es A, AC y Ck, los dos primeros presentando estructuras de bloques subangulares y el tercero estructura masiva. Desde el punto de vista morfológico, no se evidenciaron características que pudieran estar condicionando el normal desarrollo de las plantas en los ensayos.

A través del Grupo manejo de cultivos y recursos naturales del Área de Agronomía de la E.E.A. Manfredi-INTA, se obtuvieron los datos de temperatura, humedad y precipitaciones (Tabla 1-Anexo) durante las temporadas de estudio (Alvarez y Severina, 2014).

En base a muestras recogidas según procedimientos habituales (0-20, 20-40 y 40-60 cm de profundidad), se realizó la caracterización física (estructura) y química del suelo donde se condujeron los ensayos. Los parámetros químicos evaluados fueron: carbono orgánico total (CO) por Walkey y Black; porcentaje de materia orgánica (MO); pH en agua (suelo:agua 1:1); conductividad eléctrica (CE); fósforo extractable (Pe) por Bray y Kurtz; nitrógeno total (Nt) por Kjeldhal; nitrógeno como nitratos (N-NO₃⁻); calcio (Ca²⁺) y magnesio (Mg²⁺) extractables por quelatometría; y sodio (Na⁺) y potasio (K⁺) extractables por espectrofotometría de llama; capacidad de intercambio catiónico (CIC) por saturación con acetato de amonio a pH 7 y porcentaje de sodio intercambiable (PSI). Las técnicas utilizadas se describen en Sparks (1996).

2.2 Desarrollo de las poblaciones experimentales

Para el desarrollo de las Pob de alfalfa empleadas en este trabajo, se realizaron cuatro ciclos de selección fenotípica recurrente (SFR) en favor del carácter multifoliolado (MF). En cada ciclo, se trabajó con una población inicial de 1000 individuos y se seleccionaron aquellos que expresaban el carácter MF en dos estados de madurez diferentes definidos por Kalu y Fick (1981) con base en el desarrollo morfológico de tallos individuales. En el estado 0 (vegetativo temprano) se seleccionaron aquellas plantas que al menos presentaran una hoja MF. Posteriormente, las plantas selectas fueron reevaluadas en el estado 5 (floración temprana), reteniendo sólo a los individuos que correspondían a dos de las categorías de expresión MF definidas en la Tabla 3. Cada una de estas categorías se basa en el promedio de hojas MF por tallo (Sheaffer, *et al.*, 1995).

Tabla 3. Categorías de expresión multifolioladas según el N° de hojas MF por tallo.

Categoría MF	Descripción
0	todas las hojas trifolioladas
1	1 hoja multifoliolada por tallo
2	2-3 hojas multifolioladas por tallo
3	4-5 hojas multifolioladas por tallo
4	6-7 hojas multifolioladas por tallo
5	8 ó + hojas multifolioladas por tallo

Se seleccionaron aquellas plantas alcanzadas por las categorías 4 (6-7 hojas MF por tallo) y 5 (8 ó más hojas MF por tallo). Estas selectas fueron entonces interpolinizadas manualmente para producir la semilla que daría origen al siguiente ciclo de selección.

2.2.1 Población original

Partiendo de tres cultivares comerciales trifoliolados (TF) extremadamente sin reposo invernal (GRI 10), que se sembraron en forma espaciada (0,50 x 0,50 m) en el campo experimental de la E.E.A. Manfredi-INTA en marzo de 2007, se lograron 116 plantas del cultivar Ruano, 110 de Mireya y 123 de CW 1010. De estas plantas, después de una cuidadosa evaluación de características agronómicas -como vigor, capacidad de rebrote y ausencia de enfermedades- se seleccionaron 28, 30 y 25 plantas, respectivamente.

A continuación, las selectas fueron interpolinizadas por abejas melíferas y se obtuvo la semilla de la población original (C0) para la selección por el carácter MF. De esta manera el *pedigree* de la población C0 estaría conformado por un 34 % de Ruano, 36 % de Mireya y 30 % de CW 1010.

2.2.2 Poblaciones experimentales

En marzo de 2008, con la semilla C0 se sembraron 1000 macetas plásticas (0,05 m de diámetro), rellenas con suelo esterilizado en autoclave a 1 atm de presión por 2 h. En cada maceta se distribuyeron 3 semillas, para posibilitar la selección de plántulas con mayor vigor al estado unifoliolado. De esos 1000 individuos, al cabo de 8 semanas de crecimiento, aquellos que presentaron el carácter MF al estado 0, se transplantaron a macetas de 0,20 m de diámetro y se conservaron en invernáculo con condiciones de 12 a 16 hs de luz artificial (luz halógena de 400 W) y temperaturas que oscilaron entre 15 y 26°C. Al momento de la floración, las plantas fueron interpolinizadas manualmente en agosto de 2008. Se procedió al desenlace floral con la consecuente carga de polen mediante una cuña de cartón recortado y plegado en forma de “V” (Figura 2). Para iniciar la polinización y evitar la autofecundación, se cortó una inflorescencia y se recolectó el

polen en la cuña de cartón; al día siguiente, se repetía la operación pero recortando el extremo de la cuña para descartar el polen no viable que hubiera quedado del día anterior.



Figura 2. Cruzamientos manuales: a) recolección de polen para la policruza; b) policruzamiento de las selectas (Gentileza Biól. Valeria Arolfo).

La población de policruzamiento fue mantenida bajo condiciones de invernáculo hasta la madurez de las vainas, las que fueron finalmente cosechadas en masa. Después de una trilla manual se obtuvo la semilla C1.

Durante los períodos que las plantas permanecieron en el invernáculo, según necesidad, se realizaron aplicaciones de insecticidas y acaricidas para controlar la aparición de larvas de lepidópteros (*Agrotis* sp., *Porosagrotis* sp.), trips (*Frankiniella australis* M., *Thrips tabaci* L.) y arañuela roja (*Tetranychus desertorum* B.).

Para la obtención de la semilla C2, se realizó el mismo planteo descrito anteriormente partiendo de la semilla C1, sembrándola en noviembre de 2008. De los 1000 individuos iniciales, se identificaron aquellos que resultaron de carácter MF al estado 0. De éstos, cuando las plantas alcanzaron el estado 5, se identificaron aquellos que correspondían a las categorías 4 y 5, los que fueron policruzados en invernáculo durante el otoño de 2009. La semilla obtenida se denominó C2.

La población C3 se obtuvo a partir de seleccionar sobre la población C2, sembrada en noviembre de 2009, con un procedimiento idéntico al anterior. De los individuos C2 con

carácter MF al estado 0, se identificaron los que correspondían a las categorías 4 y 5 al estado 5, los cuales fueron policruzados en junio de 2010 para obtener la semilla C3.

La población C4, obtenida a partir de seleccionar sobre la población C3, fue sembrada en marzo de 2011, con un procedimiento idéntico al anterior. Sobre la base de los individuos C3 con carácter MF al estado 0, se identificaron los que correspondían a las categorías 4 y 5 al estado 5, los cuales fueron policruzados en octubre de 2011 para obtener la semilla C4.

2.3 Metodología utilizada para el logro del objetivo específico 1

2.3.1 Descripción de los ambientes y diseño experimental

A efectos de crear dos diferentes ambientes (A) para este estudio, se plantearon dos condiciones de humedad edáfica: seco (A1) y riego (A2). Los ensayos con las diferentes poblaciones obtenidas se establecieron en la primavera de 2010, utilizando para ello plantas individuales que se trasplantaron al campo experimental como plantas aisladas (0,50 m en la hilera y 1,20 m entre hileras).

En cada ambiente se incluyeron 25 plantas, tanto de cada ciclo de selección como del testigo empleado, siguiendo un diseño en Bloques Completos Aleatorizados (BCA) con tres replicaciones (Figuras 3 y 5). La unidad experimental fue entonces una parcela formada por 25 plantas. Estas plantas individuales se obtuvieron en invernáculo mediante siembra en bandejas de alvéolos de plástico, que fueron trasplantadas luego a macetas de plástico de 0,10 m de diámetro y finalmente trasplantadas a campo entre las 8 y 12 semanas de emergidas (Figura 4).

Los ensayos siguieron un diseño factorial, con dos factores y dos niveles en cada uno: el factor humedad edáfica incluyó los niveles seco (A1) y riego (A2); y el factor temporada los niveles 2010-2011 y 2011-2012. Como testigo se utilizó la C0 y los materiales evaluados fueron C1, C2 y C3. En esta etapa experimental no se contaba aún con la Pob C4.

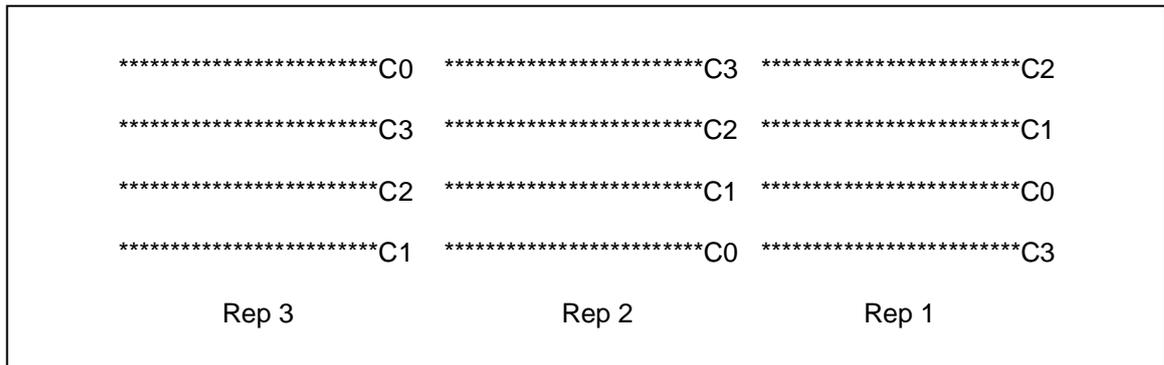


Figura 3. Plano de ensayos de plantas individuales con diseño BCA con tres repeticiones.



Figura 4. Siembra y desarrollo de las plantas individuales para la confección de los ensayos: a) emergencia de plántulas en bandejas de alvéolos plásticas; b) plantines en vasos plásticos; c) trasplante de plantines a campo.



Figura 5. Ambientes definidos por la condición de humedad edáfica. a: A1 (secano); b: A2 (riego).

En la Tabla 4, se detallan los aportes de agua realizados por las precipitaciones y por el riego suplementario durante la conducción de los ensayos.

Tabla 4. Aportes de agua (mm) por precipitaciones y por riego durante las temporadas de corte evaluadas.

Año	Temporada de corte	Mes	Precipitaciones ⁴	Riego
			(mm)	(mm)
			A1 y A2	A2
2010		Octubre	45	80
		Noviembre	57	80
		Diciembre	42	80
2011	2010/2011	Enero	206	40
		Febrero	106	40
		Marzo	81	80
		Abril	70	80
		Mayo	11	80
		Total		618
Total por ambiente			618	1178
2011		Octubre	132	40
		Noviembre	190	40
		Diciembre	40	80
2012	2011/2012	Enero	77	80
		Febrero	241	40
		Marzo	63	80
		Abril	11	80
		Mayo	19	80
		Total		773
Total por ambiente			773	1293

⁴ Información proveniente de la Estación Agrometeorológica del Área de Recursos Naturales – INTA E.E.A. Manfredi - Responsable: Ing. Agr. (MSc) Carolina Álvarez

El ensayo con riego se manejó teniendo en cuenta el consumo (en mm) de agua mensual del cultivo, la precipitación efectiva y la deficiencia de agua a aportar (López *et al.*, 1997). Se regó una vez por semana durante 4 horas a razón de 20 mm cada vez que se regaba. La lámina de riego fue calculada en 5 mm por hora. El riego fue aplicado sistemáticamente para todos los meses de las temporadas de corte desde el trasplante, excepto en los meses de enero, febrero, octubre y noviembre de 2011 y febrero de 2012, en donde los aportes por riego suplementario fueron la mitad de los mm aportados en los otros meses ya que las precipitaciones superaron al consumo.

Los lotes donde se realizaron los ensayos se prepararon mediante pasadas de rastra de discos y rolo, con una aplicación previa de glifosato 48 % a razón de 2,5 l ha⁻¹. Posteriormente, y de acuerdo a necesidad, se realizaron también controles químicos, para prevenir infestaciones de ortiga mansa (*Lamium amplexicaule* L.), perejilillo (*Bowlesia incana* R.) y pasto puna (*Stipa brachychaeta* G.), malezas muy comunes en el área. Se utilizó trifluralina 48 % a razón de 1,5 l ha⁻¹ en presiembra incorporada. El control se complementó con una mezcla de herbicidas postemergentes, aplicados a partir del estado de 3 hojas trifoliadas de la alfalfa. Para eliminar Brassicáceas y cardos, principalmente cardo pendiente (*Carduus thoermeri* L.) se utilizó 2,4-DB 100 % a razón de 0,5 a 1,0 l ha⁻¹ + imazetapir 10 % (0,6 a 0,8 l ha⁻¹). Después de implantado el cultivo se observó la presencia de pasto puna, gramón (*Cynodon dactylon* L.) y pasto cuaresma (*Digitaria sanguinalis* L.), que se controlaron con haloxifop-r-metil a razón de 3,0 a 4,0 l ha⁻¹. Se realizaron también controles manuales para mantener la limpieza tanto entre plantas como en los caminos de los ensayos.

2.3.2 Evaluaciones

Para las determinaciones de rendimiento de forraje, características morfológicas y parámetros de calidad se tuvieron en cuenta los estados de madurez de la alfalfa. Las mismas se realizaron cuando la mayoría de las plantas en cada ambiente alcanzaron el estado 5 según Kalu y Fick (1981) durante las temporadas de corte 2010/2012.

2.3.2.1 Rendimiento de forraje

El rendimiento de forraje en MS se evaluó mediante corte a una altura de 0,05 m y pesado de todo el forraje cosechado por parcela y en cada fecha de corte (Tabla 5). La producción se expresó en kilogramos de MS por parcela (kg MS parcela⁻¹). Las determinaciones del porcentaje de MS (% MS) en cada corte se hicieron sobre muestras compuestas de 200 g por parcela, secadas en estufa a 45°C hasta peso constante. Para los análisis se utilizó el rendimiento de forraje acumulado por parcela durante cada temporada de corte (Racum).

Tabla 5. Fechas de corte de forraje para cada ambiente evaluado durante las temporadas 2010/2012.

Temporada	Nº de corte	Fechas
2010/2011	1	13/12/2010
	2	05/01/2011
	3	02/02/2011
	4	02/03/2011
	5	06/04/2011
	6	04/05/2011
2011/2012	1	31/10/2011
	2	23/11/2011
	3	14/12/2011
	4	09/01/2012
	5	13/02/2012
	6	07/03/2012

En la Figura 6 se muestran algunos de los procedimientos empleados en cada uno de los cortes manuales realizados para cada fecha.



Figura 6. Toma de datos de producción de forraje: a) alfalfa en floración temprana; b) recolección del forraje cosechado manualmente por parcela; c) pesaje del forraje cosechado por parcela; d) ensayo luego del corte a 0,05 m del nivel del suelo; e) muestra compuesta de 200 g para determinación de MS; f) bandeja con muestra para secado en estufa usado en la estimación del % de MS.

2.3.2.2 Características morfológicas

Las siguientes determinaciones fueron efectuadas en cuatro oportunidades: segundo, cuarto y sexto corte de la temporada 2010/2011 y cuarto corte de la temporada 2011/2012. Para cada una de las determinaciones, los datos se presentaron como la media por parcela.

Primero se estimó el número de tallos (**T**) de cada Pob, sobre cinco plantas de cada parcela tomadas al azar. Seguidamente, sobre el tallo erecto más alto de cada planta se determinó:

Altura de planta desde el suelo (**H**) en cm.

Número de nudos por tallo (**N**) por conteo directo.

Distancia media de entrenudos (**DN**) en cm mediante la ecuación H/N .

Número de hojas por tallo (**NH**) por conteo directo.

Número de folíolos por hoja (**FH**) y porcentaje de hoja multifoliolada (**%MF**), contando los folíolos en la hoja más vieja de cada nudo.

Relación hoja/tallo (**RHT**), estimado como el cociente entre el peso seco de las fracciones hoja (folíolos, pecíolos, estípulas, etc.) y tallo; se usó una muestra de 200 gr por parcela que, luego de secada en estufa, se separó en hojas y tallos y se pesó cada fracción (Figura 7).

Índice de expresión multifoliolada (**IMF**), que se basó en la caracterización de la expresión del carácter MF para cada población (C0 a C3) de acuerdo a la escala visual definida por la NAAIC (Sheaffer *et al.*, 1995). Con los valores obtenidos en cada categoría MF se calcula el IMF según la siguiente ecuación:

$$\text{IMF} = \frac{((N^{\circ}1 \times 1) + (N^{\circ}2 \times 2) + (N^{\circ}3 \times 3) + (N^{\circ}4 \times 4) + (N^{\circ}5 \times 5))}{\text{Total de plantas de la población}}$$

donde N° es el número de plantas que se ubican en cada categoría MF (1 a 5).

Los valores IMF se agruparon posteriormente en tres categorías de expresión de la multifoliosidad, según los siguientes rangos de aceptación: baja (IMF = 1,40-2,40), moderada (IMF = 2,41-2,80) y alta (IMF = 2,81-3,80).



Figura 7. Determinación de la relación hoja/tallo: a) separación en seco de hojas y tallos; b) pesado de tallos en seco; c) pesado de hojas en seco; d) muestras de hojas y tallos para análisis de calidad.

En la Figura 8 se ilustra la metodología utilizada para la medición de algunas de las variables de este estudio. Como puede apreciarse, se trabajó tanto a campo como en gabinete, de acuerdo a practicidad en la toma de datos.

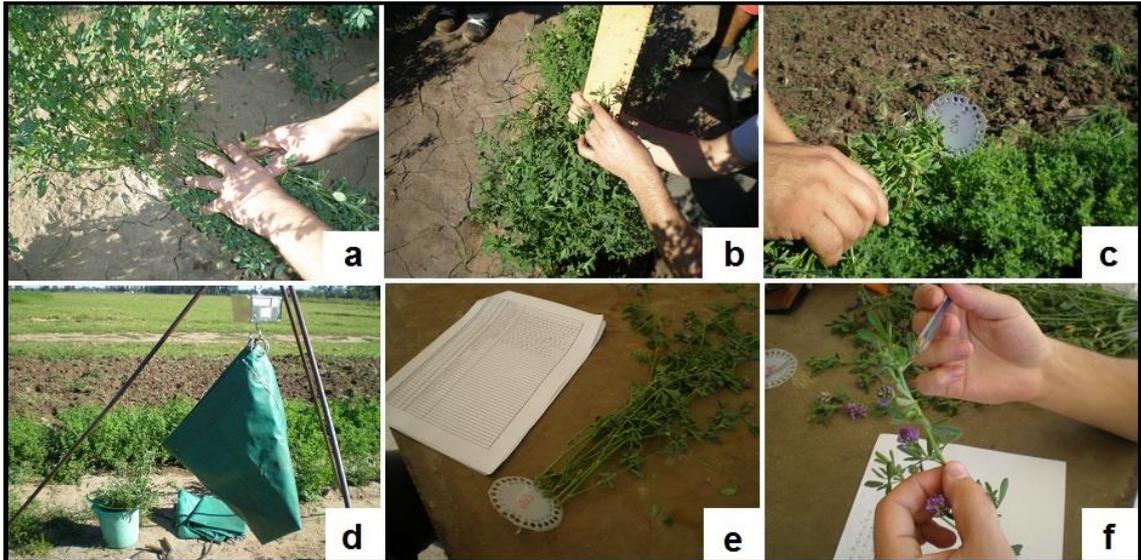


Figura 8. Evaluación de variables: a) conteo de tallos; b) medición de altura; c) corte del tallo erecto más alto; d) evaluación de rendimiento de forraje; e) conteo de folíolos; f) conteo de hojas por tallo.

2.3.2.3 Parámetros de calidad de forraje

Las determinaciones de contenido de proteína bruta (PB), fracción fibra detergente neutra (FDN) y digestibilidad in vitro de la MS (IVTDMS) se realizaron en dos oportunidades (segundo y cuarto corte de la temporada 2010/2011) y sobre las muestras compuestas de 200 g por parcela, secadas en estufa a 45°C hasta peso constante, que se utilizaron para las determinaciones del % MS. Las muestras fueron analizadas de acuerdo a la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1990) siguiendo los métodos de la *Cornell Net Carbohydrate and Protein System* (CNCPS) para MS (método 930.15), cenizas (método 924.05), PB Kjeldahl (método 984.13) usando el analizador automático *Kjeltec Sampler 8420* de FOSS (Orskov y McDonald, 1970).

El contenido de PB, que resulta de determinar el contenido total de nitrógeno de la muestra y multiplicarlo por el factor 6,25, estima no sólo el contenido de la verdadera proteína sino también de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados (como clorofila y ácidos nucleicos). La fracción FDN contiene fundamentalmente celulosa, hemicelulosa y lignina. Complementando lo anterior, también se estimó el porcentaje de fibra detergente

neutro digestible (FDN_{dig}) (Van Soest, *et al.*, 1991). El cálculo de la IVTDMS se obtuvo mediante la fermentación de la muestra con microorganismos del rumen (licor ruminal) (Menke y Steingass, 1988).

2.3.3 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los datos generados se realizaron con el software Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo 2011).

Para cada una de las variables en estudio se realizó un análisis de la varianza al finalizar cada temporada de producción. El modelo ANAVA incluyó los efectos de Pob, A, repetición dentro de A (rep) e interacción Pob*A. Para cada variable se usó la prueba de comparaciones múltiples DGC (Di Rienzo, *et al.*, 2002) para todos los pares posibles de comparaciones. Además de lo anterior, se tomaron conjuntamente las dos temporadas de evaluación para un análisis multivariado de la varianza (MANOVA).

También se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con todas las variables, a fin de explicar la variabilidad entre las Pob a través de los A. Este análisis se basa en una combinación lineal de las variables hasta encontrar índices ó componentes principales (CP), con máxima varianza. La interpretación del estudio se realizó mediante gráfico biplot, que permitió visualizar -en un plano óptimo para el estudio de variabilidad- las poblaciones y las variables de manera simultánea.

Para conocer la relación funcional entre las variables, se realizó un análisis de correlación fenotípica. La medida de asociación entre las variables se estimó a través del coeficiente de correlación de Pearson (r), definido por la ecuación

$$r_{ij} = Cov_{ij} / \sqrt{\sigma_i^2 \times \sigma_j^2} .$$

donde: Cov_{ij} es la covarianza entre los caracteres i y j, σ_i^2 es la varianza del carácter i y σ_j^2 es la varianza del carácter j.

2.4 Metodología utilizada para el logro del objetivo específico 2

2.4.1 Diseño experimental

El ensayo fue sembrado en otoño de 2012, a densidad comercial (10 kg ha^{-1}), en parcelas de $1 \times 5 \text{ m}$. En cada ensayo se incluyeron seis tratamientos: dos poblaciones MF (C3 y C4), la población original C0 y las tres variedades comerciales TF (Ruano, Mireya y CW1010) que dieron origen a la C0. Se siguió un diseño en Bloques Completos Aleatorizados (BCA) con tres repeticiones (Figura 9). La unidad experimental fue cada parcela.

El lote, previo a la siembra, se preparó mediante pasadas de rastra de discos y rolo con una aplicación previa de glifosato 48 % a razón de $2,5 \text{ l ha}^{-1}$. Se realizaron también controles químicos (similares a los efectuados en el experimento realizado para el logro del objetivo específico 1) y manuales para mantener el ensayo libre de malezas. El ensayo se protegió durante los primeros meses con tela anti-pájaros para evitar el daño por palomas, muy común en la zona donde se realizan los ensayos.

Rep1		Rep2		Rep3	
1	C0	6	Mireya	3	C4
2	C3	5	Ruano	4	CW1010
3	C4	3	C4	6	Mireya
4	CW1010	4	CW1010	5	Ruano
5	Ruano	2	C3	2	C3
6	Mireya	1	C0	1	C0

Figura 9. Plano de ensayo con diseño en BCA con las 3 repeticiones y los 6 tratamientos que se utilizaron para la determinación de los datos bajo stand denso.

2.4.2 Evaluaciones

En la siguiente tabla se detallan las fechas de los diferentes cortes de las parcelas. Los cortes realizados fueron seis por temporada (Tabla 6).

Tabla 6. Número y fecha de cortes durante las temporadas 2012/2013 y 2013/2014.

Temporada	Nº de corte	Fechas
2012/2013	1	18/10/2012
	2	21/11/2012
	3	13/12/2012
	4	15/01/2013
	5	13/02/2013
	6	05/04/2013
2013/2014	1	25/09/2013
	2	05/11/2013
	3	05/12/2013
	4	06/01/2014
	5	13/02/2014
	6	02/04/2014

Para las determinaciones de rendimiento de forraje, características morfológicas y parámetros de calidad se tuvo en cuenta, en este ensayo también, el estado de madurez de la alfalfa. Las mismas se realizaron cuando la mayoría de las plantas alcanzaron el estado 5 (floración temprana) (Kalu y Fick, 1981) durante la temporada de corte 2012/2013. También se evaluó el rendimiento forrajero durante la temporada de corte 2013/2014.

2.4.2.1 Rendimiento de forraje

La productividad forrajera en MS (Racum) se evaluó con los mismos criterios que se explicitaron para el objetivo específico 1, pero en este caso realizando cortes con una segadora autopropulsada (Figura 10). La producción se expresó en t de MS ha⁻¹. Las determinaciones del porcentaje de MS (%MS) en cada corte se hicieron sobre muestras compuestas de 200 g por parcela, secadas en estufa a 45 °C hasta peso constante.



Figura 10. Toma de datos de producción forrajera: a) maquinaria autopropulsada de corte; b) parcela previa al corte en estado de floración temprana; c) pesaje de una muestra de una parcela para determinación de % MS; d) canastas metálicas para el acondicionamiento en estufa.

2.4.2.2 Características morfológicas

Las determinaciones se realizaron previas al tercer y al quinto corte de la temporada 2012/2013. Los datos se presentaron como media por parcela. Las características medidas fueron:

Altura de planta desde el suelo (**H**) en tres sectores al azar de cada parcela, para lo cual se utilizó una regla.

Número de nudos por tallo (**N**) por conteo directo sobre 25 tallos al azar por parcela.

Índice de expresión multifoliolada (**IMF**), estimado en forma similar a la realizada para el logro del objetivo específico 1. Se realizó sobre 25 tallos al azar por parcela.

Relación hoja/tallo (**RHT**), calculada por el cociente del peso seco de las fracciones hoja y tallo de una muestra de 200 g de material verde por parcela. Los valores de RHT fueron estimados para toda la muestra (**RHTt**) y para los tres estratos en que cada muestra se subdividió: superior (**RHT1**), medio (**RHT2**) e inferior (**RHT3**).

La Figura 11 ilustra la metodología utilizada en la toma de las diferentes variables.



Figura 11. Toma de datos de características morfológicas: a) medición de la altura de planta; b) corte de tallos al azar para determinar el IMF y N; c) separación en seco de hojas y tallos; d y e) almacenado de muestras en bolsitas para su posterior análisis de calidad; f) hojas MF con cinco folíolos en comparación con una hoja TF.

2.4.2.3 Parámetros de calidad de forraje

Las determinaciones se realizaron en dos oportunidades (tercero y quinto corte) de la temporada 2012/2013 sobre las muestras compuestas de 200 g por parcela, secadas en estufa a 45 °C hasta peso constante, destinadas previamente a determinar el % MS. Se compararon los valores de tres ciclos: C0, C3 y C4. Por cuestiones económicas se estableció no determinar estos parámetros en los cultivares testigos que dieron origen a la Pob C0.

Las muestras fueron analizadas de la misma manera y bajo las mismas metodologías que las utilizadas para el logro del objetivo específico 1 determinando PB, FDN, FDNdig e IVTDMS.

2.4.3 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los datos generados se realizaron con el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010).

Se realizó un análisis multivariado de la varianza al finalizar el primer ciclo de producción. El modelo MANOVA incluyó los efectos de población y repetición. Las diferencias significativas entre medias se identificaron mediante la prueba de comparaciones múltiples DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) con un nivel de significancia $p=0,05$.

También se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con todas las variables a fin de explicar la variabilidad de las poblaciones respecto de los caracteres evaluados. Este análisis se basó en una combinación lineal de las variables hasta encontrar índices ó componentes principales (CP) con máxima varianza. La interpretación del estudio se realizó mediante gráfico biplot.

Se determinaron las correlaciones entre todas las variables mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r).

Se realizó un análisis ANOVA de la variable Racum para la temporada 2013/2014, que incluyó los efectos de población y repetición.

2.5 Metodología utilizada para el logro del objetivo específico 3

2.5.1 Caracterización por protocolos de resistencia a agentes bióticos

Los protocolos de caracterización de niveles de resistencia a insectos y enfermedades utilizados en este trabajo están avalados por la NAAIC de los Estados Unidos de Norteamérica (O'Neill, 1991, Berberet *et al.*, 1991a;b). Las determinaciones se realizaron sobre las poblaciones C0 y C4 representadas por 50 plántulas distribuidas equitativamente en dos surcos de bandejas plásticas de 40x30x15 cm. Como sustrato se utilizó una mezcla de suelo y mantillo, esterilizada en autoclave durante 2 h a una presión de 2 atm. En cada prueba de resistencia se emplearon cuatro bandejas, cada una correspondiente a una repetición. Se utilizaron testigos resistentes y susceptibles, de acuerdo a cada prueba, cada uno representado por dos surcos y 50 plántulas por bandeja. Inicialmente se sembraron 80 semillas, ajustando el número final a 50 a través del raleo de las plántulas sobrantes.

2.5.1.1 Resistencia a pulgón azul (PA)

La población de pulgones (ninfas y adultos) fue recolectada de pasturas de alfalfa en la E.E.A. Manfredi mediante golpe de plantas sobre una bandeja plástica. Luego en el laboratorio y con ayuda de una lupa y una pinza, se seleccionaron los pulgones azules más sanos y vigorosos. Seguidamente, y a fin de purificar la colonia de otros insectos, parásitos y/o enfermedades, los pulgones fueron puestos en cuarentena sobre tallos de alfalfa que habían sido previamente lavados con alcohol al 70 % durante 30 s y posteriormente con hipoclorito de sodio al 0,5 % por otros 30 s. Una vez purificada, la colonia de pulgones fue multiplicada en una cámara bajo condiciones controladas (16 h luz y 22 ± 4 °C) sobre tallos de alfalfa, preparados como se describió anteriormente. Durante el proceso, los tallos

fueron reemplazados por otros nuevos al menos dos veces por semana. Se utilizó como testigo resistente el cv CUF 101 y como susceptible el cv Costera SP INTA. Para la caracterización de la resistencia, las bandejas fueron infestadas con al menos dos pulgones azules por plántula un día después de la emergencia (Figura 12). Los pulgones se mantuvieron en las bandejas por un tiempo promedio de 25 días, al cabo de los cuales se procedió a la categorización de las plántulas según su estado y sintomatología: 1- Resistente: plántulas altas, hojas normales; 2- Resistente: plántulas altas, hojas pequeñas; 3- Resistente: plántulas moderadamente altas, hojas pequeñas y deformadas; 4- Susceptible: plántulas cortas; hojas pequeñas, deformadas, usualmente cloróticas; y 5- Susceptible: plántula muerta. De acuerdo al número de plántulas en cada categoría y al número total de plántulas emergidas, se calculó el % de resistencia de la población según la ecuación:

$$\% \text{ resistencia} = \frac{\sum \text{plántulas categorías 1-3}}{\text{total de emergidas}}$$



Figura 12. Protocolo de selección para resistencia a *A. kondoi* y *T. maculata*: a) cría de pulgones en condiciones controladas sobre tallos de alfalfa; b) y c) infestación de plántulas y desarrollo de daño; d) identificación de genotipos resistentes (R) y susceptibles (S).

2.5.1.2 Resistencia a pulgón moteado (PM)

La obtención de la población de pulgones se realizó de la misma manera descrita para pulgón azul, aunque bajo diferentes condiciones ambientales: 18 h de fotoperíodo y 26 ± 4 °C. Se utilizaron los mismos testigos resistente (CUF 101) y susceptible (Costera SP INTA). Para la caracterización, las bandejas se infestaron con al menos dos pulgones moteados por plántula en el estado de hoja unifoliolada (aproximadamente a los siete u ocho días después de la emergencia). Los pulgones permanecieron en las bandejas por un tiempo promedio de 18 días, al cabo de los cuales se realizó la categorización de las plántulas según una escala de 1 a 5, donde 1 y 2- Resistente: plántulas con al menos una hoja verdadera; 3-Resistente: plántulas con muy poco desarrollo; 4-Susceptible: plántulas vivas pero sin formación de hoja verdadera; y 5-Susceptible: plántula muerta. De acuerdo al número de plántulas en cada categoría y al número total de plántulas emergidas, se calculó el porcentaje de resistencia de la población según la ecuación:

$$\% \text{ resistencia} = \frac{\sum \text{plántulas categorías 1-3}}{\text{total de emergidas}}$$

2.5.1.3 Resistencia a antracnosis (AN)

Las bandejas con las plántulas a evaluar fueron colocadas en invernáculo con fotoperíodo de 16 h y 23 °C de temperatura promedio. Se utilizó como testigo resistente el cv ARC y como testigo susceptible el cv Costera SP INTA. La inoculación con el patógeno se realizó asperjando las bandejas con una suspensión de esporas del patógeno obtenidas a partir de un cultivo puro *C. trifolii*. Para el recuento inicial de esporas se empleó una cámara de conteo (rayado *Neubauer*) con la ayuda de un microscopio. Seguidamente, se ajustó el volumen final de la suspensión para llegar a una concentración de 2×10^6 esporas ml^{-1} (O'Neill *et al.*, 1989), según la siguiente ecuación:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

donde: C_i es concentración inicial; V_i es volumen inicial; C_f es concentración final y V_f es volumen final.

La inoculación se efectuó 10 días después de la siembra utilizando un pulverizador manual que facilitó la distribución del inóculo sobre las plántulas. Las bandejas inoculadas se mantuvieron durante 48 h en cámara húmeda, bajo condiciones de 100 % de humedad relativa y 23 °C. Luego de ese período, las bandejas fueron regresadas al invernáculo para permitir el desarrollo de la enfermedad durante 10 días (Figura 13). Al cabo de ese período, se estimó el porcentaje de supervivencia de plántulas relacionando el número de sobrevivientes y el número inicial en cada bandeja. Para determinar el número inicial de plántulas se tomó como válido el conteo registrado a los 10 días de la siembra. La evaluación se realizó según lo establecido por O'Neill (1991).



Figura 13. Protocolo de selección para resistencia a *C. trifolii*: a) cultivo del hongo y recuento de esporas; b) pulverización de plántulas con suspensión de esporas; c) cámara húmeda (24-72 h) para favorecer la infección; d) identificación de genotipos resistentes.

2.5.2 Análisis estadístico para características de resistencia

El comportamiento de las poblaciones C0 y C4 y de los testigos, tanto para pulgones como para antracnosis, se determinó a través de la prueba de comparación de medias LSD, con un nivel de significación del 5% ($\alpha = 0,05$). Para los análisis estadísticos se usó el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010).

2.6 Metodología utilizada para el logro del objetivo específico 4

2.6.1 Material vegetal y extracción de ADN

El análisis de la diversidad genética se realizó a través de la caracterización molecular de un total de 80 genotipos individuales de alfalfa provenientes de las poblaciones C0 y C4. Para ello, de cada población se seleccionaron 40 plantas con buen desarrollo agronómico (plantas de buen porte y tamaño, coronas compactas y sin enfermedad aparente). Las plantas estaban cultivadas en maceta bajo condiciones de invernadero en la EEA Manfredi-INTA (Figura 14). En cada población se mantuvo la proporción original de expresión MF, esto es 6,7 % y 77,7 % para C0 y C4, respectivamente.

El número de plantas por población fue elegido de acuerdo a Herrmann *et al.* (2010a), quienes llegaron a la conclusión de que 40 genotipos era un tamaño de muestra razonable para estudios de diversidad entre poblaciones de alfalfa tetraploides estrechamente relacionadas basados en marcadores SSR. En esa línea, otros investigadores (Bataillon *et al.*, 1996; Nei y Roychoudhury, 1974) coinciden en que la fiabilidad de las estimaciones de la variación genética, tales como la diversidad de genes y las distancias genéticas, depende más del número de loci que del número de individuos.

Diez hojas jóvenes desarrolladas de cada planta se recogieron y se liofilizaron (LABCONCO Modelo 7949030). Este proceso consiste en la deshidratación de las muestras por sublimación a bajas temperaturas. Las muestras liofilizadas fueron molidas en

mortero, colocadas individualmente en tubos Eppendorf y almacenadas a -80 °C hasta la extracción del ADN.



Figura 14. Plantas de las poblaciones C0 y C4 en macetas para extracción de ADN.

El ADN se extrajo mediante el protocolo CTAB modificado (Doyle y Doyle, 1987). Para ello, 30 mg de polvo liofilizado se mezclaron con 0,7 ml de tampón precalentado (65 °C) de CTAB (2 % CTAB, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris 100 mM (pH 8), 1 % de PVP 40 y 0,2 % β - mercaptoetanol) y se incubaron durante 1 h a 65 °C. El sobrenadante se extrajo con 0,6 ml de cloroformo-octanol (24:1) y se centrifugó durante 10 min; seguidamente se recuperó y se mezcló con 1/10 de CTAB 5 %, para luego extraerse nuevamente con 0,6 ml de cloroformo-octanol. La fase acuosa se recuperó y el ADN se precipitó con 2/3 vol de isopropanol frío. El sedimento se lavó en etanol al 70 % durante toda la noche, se secó y se resuspendió en 100 μ l de TE que contenía RNAsa 10 μ g/ μ l.

2.6.2 Genotipado mediante SSR

El análisis de SSR se llevó a cabo utilizando 40 pares de *primers* originados principalmente de *M. truncatula* (Julier *et al.*, 2003). Las pruebas preliminares (en agarosa)

se realizaron con material de algunas plantas (8) a fin de evaluar la amplificación de cada cebador (Figura 15).

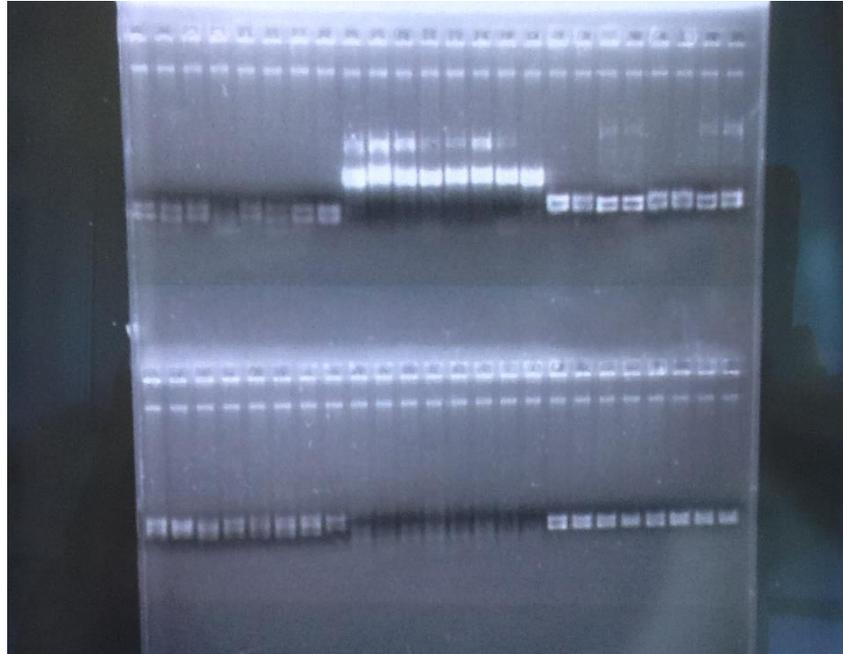


Figura 15. Geles de agarosa con la amplificación de seis pares de *primers* SSR selectos (MTIC441: calles 1 a 8; MTIC21: calles 9 a 16; MTIC471: calles 17 a 24; MTIC153: calles 25 a 32; MTIC250-2: calles 33 a 40 y MTIC470: calles 41 a 48).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 6 μ l de una mezcla que contuvo 20 ng de ADN molde, 200 nM de cada cebador (forward and reverse), 200 M de cada dNTP, 1X tampón de *Taq* ADN polimerasa, 0,45U *Taq* ADN polimerasa y 1,5 mM de $MgCl_2$. El perfil de PCR fue como sigue: 94 °C durante 4 min, 6 ciclos incluyendo 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C (-1 °C por ciclo), 1 min a 72 °C, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min con un paso de extensión final de 72 °C durante 10 min (Flajoulot *et al.*, 2005). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp sistema AB9700 (Applied Biosystems). Se confirmó la amplificación de los fragmentos por electroforesis en gel en agarosa al 2%.

De los 40 loci, dos fueron monomórficos y 13 mostraron amplificación poco exitosa en la mayoría de las muestras, por lo que fueron excluidos de este estudio. Se identificaron 25 loci con patrones claros, bandas fuertes, individuales para cada alelo. Estos 25 loci (Tabla 7) fueron los que se amplificaron y se utilizaron en este trabajo.

Tabla 7. Secuencias de pares de cebadores de microsatélites para cada locus de los 25 seleccionados, grupo de ligamiento (LG) en *M. truncatula* y *M. sativa*. Secuencias en dirección 5' a 3'.

Locus	Primers 5' a 3'	LG <i>M. truncatula</i>	LG <i>M. sativa</i>
MAA660870	GTACATCAACAACCTTCTCCT ATCAACAAAATTCATCGAAC		8
MTR58	GAAGTGGAAATGGGAAACC GAGTGAGTGAGTGTAAGAGTGC	1	1
MAL369471	ATTCACACAAACCCATCTTC AAACCCTTAGCACCGACA	1	1
B21E13	GCCGATGGTACTAATGTAGG AAATCTTGCTTGCTTCTCAG	2	2
ENOD20	CGAACTTCGAATTACCAAAGTCT TTGAGTAGCTTTTGGGTTGTC	8	8
MTIC77	TCTTCATCGCTTTCTTCTATTCA GCCGTATGGTGTGTTGATG	3	3
MTIC82	CACTTCCACACTCAAACCA GAGAGGATTTCCGGTGATGT	7	7
MTIC94	GCTACAACAGCGCTACATCG CAGGGTCAGAGCAACAATCA		
MTIC95	AAAGGTGTTGGGTTTTGTGG AGGAAGGAGAGGGACGAAAG		1
MTIC103	TGGGTTGTCCTTCTTTTTGG GGGTGCAGAAGTTTGACCA	8	
MTIC131	AAGCTGTATTCTGATACCAAAC CGGGTATTCTCTTCTCCA	3	3
MTIC153	TCACAACATGCAACAAAAGTGG TGGGTCGGTGAATTTCTGT	6	6
MTIC210	CCAAACTGGCTGTGTTCAAA GCGGTAAGCCTTGCTGTATG	2	2
MTIC232	TAAGAAAGCAGGTCAGGATG TCCACAAATGTCTAAAACCA	7	7

Tabla 7 (Continuación). Secuencias de pares de cebadores microsatélites para cada locus de los 25 seleccionados, grupo de ligamiento (LG) en *M. truncatula* y *M. sativa*. Secuencias en dirección 5' a 3'.

Locus	Primers 5' a 3'	LG <i>M. truncatula</i>	LG <i>M. sativa</i>
MTIC238	TTCTTCTTCTAGGAATTTGGAG CCTTAGCCAAGCAAGTAAAA	5	5
MTIC247	TTCGCAGAACCTAAATTCAT TGAGAGCATTGATTTTTGTG	1	1
MTIC249	TAGGTCATGGCTATTGCTTC GTGGGTGAGGATGTGTGTAT		4
MTIC258	CACCACCTTCACCTAAGAAA TGAAATTCACATCAACTGGA	1	1
MTIC304	TTGGGCTTAATTTGACTGAT AGCGTAAAGTAAAACCCTTTC	2	2
MTIC331	CCCTCTTCTACCTCCTTTCCA GGAAGAGAAGATGGGGGTGT	4	4
MTIC332	CCCTGGGTTTTTGATCCAG GGTCATACGAGCTCCTCCAT	4	4
MTIC338	TCCCCTTAAGCTTCACTCTTTTC CATTGGTGGACGAGGTCTCT	3	3
MTIC447	TCTTGTGTATCCTCCGAAC TCCTGAGTTGTAGAGTGAGTGA	1	1
MTIC470	GGTTCGTGTATTTGTTTCGAT CCCTTCACAGAATGATTGAT	7	7
MTIC471	ATCAGGTGATGATTGGTTTT CCAACCATCTTTGTTTCCTA		7

Cada 80 productos de la PCR de cada primer se mezclaron con un volumen igual de formamida (98 %). Luego, 3 µl de muestra se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizada al 6 %, se corrieron a 50 W durante 120 min en tampón TBE 1X y se visualizaron por tinción con plata (Bassam *et al.*, 1991; Creste *et al.*, 2001). El tamaño de cada producto se determinó con un *ladder* de ADN de 10 pb (Invitrogen).

En la Figura 16 se muestra la extracción de ADN y la preparación para el genotipado de muestras.

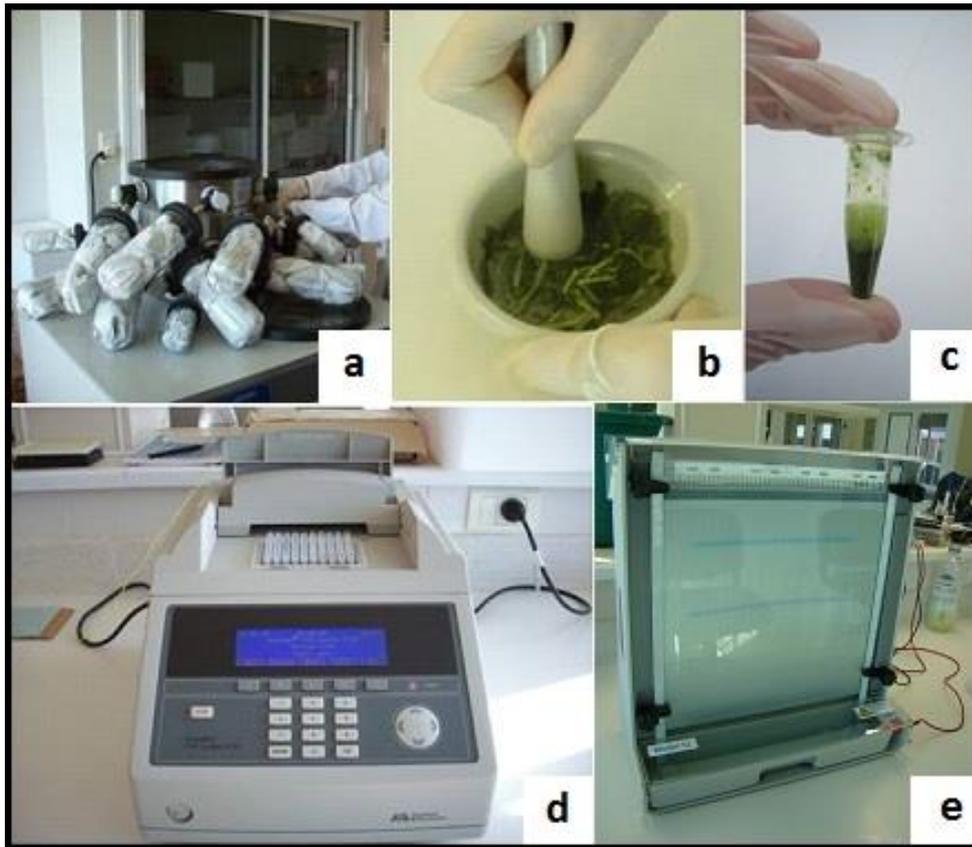


Figura 16. Preparación de material para extracción de ADN y posterior genotipado: a) liofilizado de muestras; b) molienda de muestras para posterior extracción; c) extracción de ADN; d) equipo para reacción de amplificación y e) cuba para corrida electroforética de geles de poliacrilamida (Gentileza Lic. Nancy Grandón).

Cada gel fue escaneado y las imágenes tratadas mediante el software Quantity One[®] 1-D (Bio-Rad Laboratories, Inc.) (Figura 17) para la identificación de los diferentes alelos. Algunas bandas que siempre estuvieron presentes junto a otras bandas de mayor intensidad, se consideraron como “réplicas” y se desecharon. Finalmente, con la información validada, se determinó el número de alelos para cada individuo.

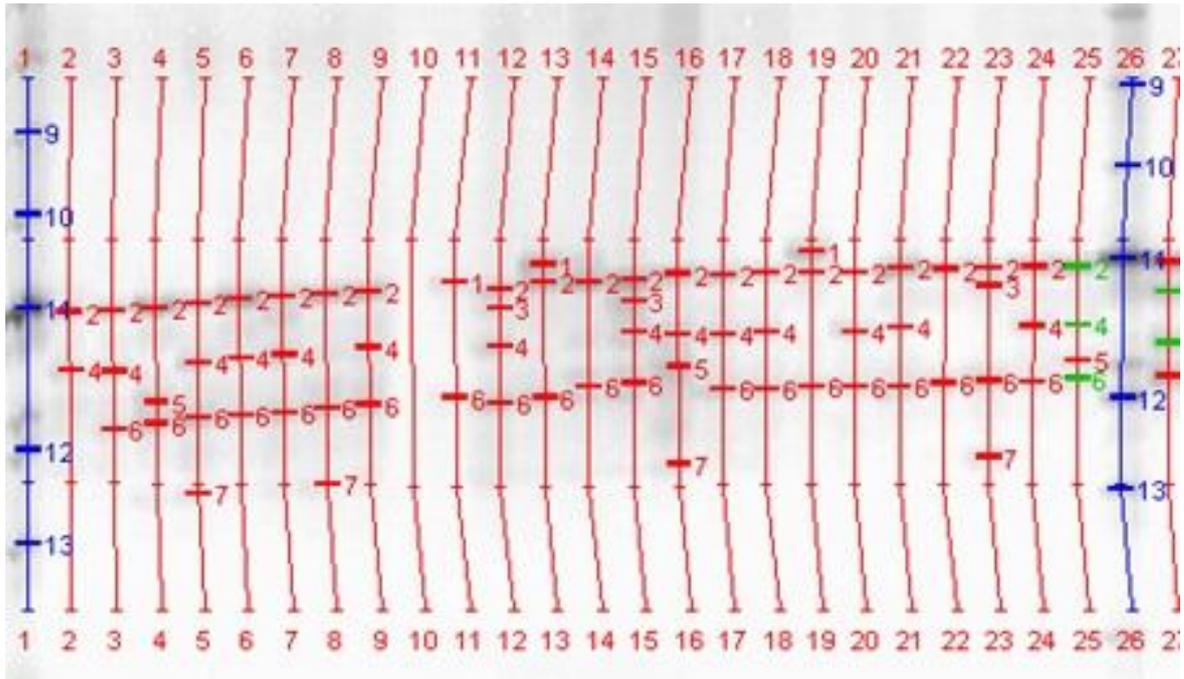


Figura 17. Ejemplo de variación SSR en el locus MTIC447 en 24 individuos. Números y guiones rojos y verdes indican los diferentes alelos. Números y guiones azules indican el ladder (10 pb).

2.6.3 Análisis estadístico de los datos SSR

Para calcular la diversidad genética dentro y entre las poblaciones (Van Puyvelde *et al.*, 2010) se utilizó el programa ATetra versión 1.2. Este programa calcula la heterocigosidad esperada según Hardy -Weinberg (H_E), también denominada diversidad genética de Nei (Nei, 1978; Nei, 1987). Este parámetro, representado como H_E , se calcula como

$$\hat{H} = \frac{N}{N-1} \left(1 - \sum_{i=1}^l p_i^2 \right), \text{ donde } N \text{ es el tamaño de la muestra.}$$

Para poder hacer comparaciones entre poblaciones, se calculó el índice de diferenciación de Nei, denominado G_{ST} (Nei, 1973). También se calculó la distancia genética de Nei, representada como D (Nei, 1972; Nei, 1978). Ambos parámetros implican la enumeración explícita de todas las posibles configuraciones de los alelos.

No se realizó dosaje alélico ya que la técnica de tinción con plata utilizada no lo permite. El no poseer el dosaje alélico conduce a un sesgo en la estimación de las frecuencias alélicas y, por lo tanto, del grado de diferenciación de la población. No obstante, existen algunos paquetes estadísticos -como ATetra (Meirmans y Van Tienderen, 2013)- que permiten compensar este sesgo mediante la sustitución de los datos faltantes en las operaciones de cálculo. El método se basa en una simulación de Monte-Carlo, donde se considera un subconjunto de combinaciones elegidas al azar. La práctica demuestra que, para poblaciones con cerca de 20 individuos, un número de 10.000 combinaciones elegidas al azar conduce a un buen resultado, incluso si este número es un subconjunto muy pequeño del número total de posibles combinaciones (Van Puyvelde *et al.*, 2010); obviamente, cuanto mayor es el número de simulaciones mayor es la precisión de los resultados obtenidos. En este estudio, se utilizaron 100.000 simulaciones.

Para comparar el nivel de significación de H_E entre C0 y C4 se utilizó la prueba de comparaciones de medias DGC mediante el software Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2011).

El desequilibrio de ligamiento (LD) se puso a prueba para todos los pares de primers utilizando el software LD4X desarrollado por Julier (2009). Este programa realiza una prueba exacta de Fisher entre pares de alelos tomados de a dos loci. Todas las combinaciones de alelos de dos loci son tratadas de a una. Si dos alelos de un par de loci tienen una distribución no aleatoria, los marcadores se consideran como vinculados. El software LD4X fue utilizado mediante el software libre R (R Core Team, 2013).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Caracterización edáfica

En la Tabla 8 se detallan las características químicas evaluadas en el sector donde se implantaron los ensayos.

Tabla 8. Características químicas del suelo en el sector de la E.E.A. Manfredi donde se realizaron los ensayos.

Características químicas	Profundidades del suelo (cm)		
	0-20	20-40	40-60
CO (%)	0,84	sd ^(†)	sd
MO (%)	1,44	sd	sd
pH	6,89	7,75	8,6
CE (dS m ⁻¹)	1,31	1,56	1,74
Pe (ppm)	45,23	30,24	21,8
Nt (%)	0,09	sd	sd
N-NO ₃ ⁻ (ppm)	18,42	11,16	9,75
Ca ²⁺ (cmol(+) kg ⁻¹)	11,93	13,6	23,23
Mg ²⁺ (cmol(+) kg ⁻¹)	4,55	3,77	4,32
Na ⁺ (cmol(+) kg ⁻¹)	2,21	2,33	2,42
K ⁺ (cmol(+) kg ⁻¹)	2,28	1,87	1,79
CIC	14,46	16,38	19,79
PSI (%)	15,26	14,3	12,22

CO= carbono orgánico total; MO= porcentaje de materia orgánica; pH en agua (suelo:agua 1:1); CE= conductividad eléctrica; Pe= fósforo extractable; Nt= nitrógeno total; N-NO₃⁻= nitrógeno como nitratos; Ca²⁺= calcio extractable; Mg²⁺= magnesio extractable; Na⁺= sodio extractable; K⁺= potasio extractable; CIC= capacidad de intercambio catiónico; PSI= porcentaje de sodio intercambiable; (†) sd: sin dato.

Se observó un contenido de MO moderado para la profundidad entre 0 y 20 cm. En cuanto al pH, se observó un valor cercano a la neutralidad en los primeros 20 cm de profundidad, ligeramente alcalino entre los 20 y 40 cm y alcalino a partir de los 40 cm. No se detectó un valor de CE que pudiera afectar el normal desarrollo de las plantas. Tampoco el contenido de Pe se consideró como limitante. En tanto que el valor de Nt apareció como moderado, el contenido de N-NO₃⁻ se estimó como de moderada disponibilidad para los primeros 20 cm y de baja disponibilidad desde los 20 cm hacia abajo. El valor de la capacidad de CIC se definió como alto y adecuado para las profundidades de 20-40 cm y 40-60 cm, respectivamente. El valor hallado del porcentaje de PSI no afectaría en forma notoria la exploración de raíces ya que, según Bressler *et al.* (1982), la alfalfa es tolerante hasta un rango de 40-60 % de PSI, a partir del cual se reduce el crecimiento por condiciones físicas del suelo adversas.

3.2 Expresión (%) multifoliolada en las poblaciones experimentales

De los 1000 individuos que se evaluaron de la población inicial (C0), sólo 67 presentaron el carácter MF al estado 0, determinando así un 6,7 % de expresión MF. Estos 67 genotipos se utilizaron para la conformación del primer ciclo de selección (C1).

Para la obtención de Pob C2, de los 1000 individuos de la C1 que se analizaron, 348 resultaron de carácter MF al estado 0. De esos, se identificaron 252 que correspondían a las categorías 4 y 5 al estado 5, determinado así un 25,2 % de expresión MF en la C1. Esas 252 plantas fueron las que se inter cruzaron para generar la C2.

De los 1000 individuos iniciales de la población C2 que se analizaron, 463 presentaron carácter MF al estado 0, y de éstos 313 correspondieron luego a las categorías 4 y 5 al estado 5, indicando 31,3 % de expresión MF en la población C2. Los 313 genotipos se emplearon para la obtención del tercer ciclo de selección o C3.

En la Figura 18 se presenta un esquema detallado de todo el proceso de selección fenotípica recurrente empleado para la obtención de las diferentes Pob a partir de los cultivares elegidos (material básico de cría) y la población original lograda.

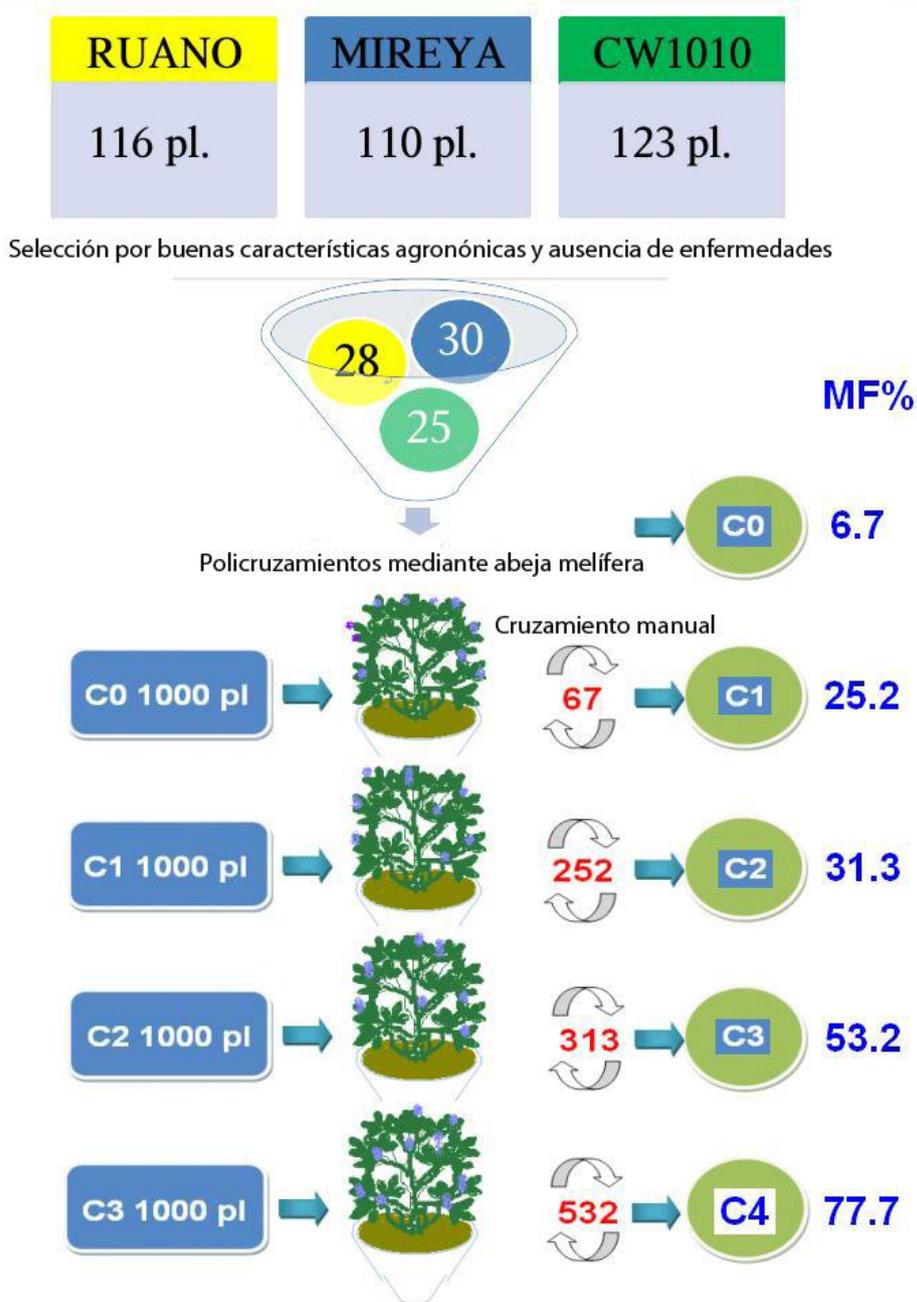


Figura 18. Esquema del proceso selectivo fenotípico recurrente aplicado para la obtención de poblaciones de alfalfa con alta expresión del carácter multifoliolado.

En el siguiente ciclo de selección, de los 1.000 individuos evaluados en la población C3, 613 presentaron el carácter MF al estado 0, y de ellos 532 correspondieron luego a las categorías 4 y 5 al estado 5. Esto significó 53,2 % de expresión MF en la

población C3. Esos 532 genotipos MF fueron policruzados para la generación del cuarto ciclo de selección o C4.

Finalmente, sobre las 1.000 plantas C4 analizadas, se identificaron al estado 5 un total de 777 MF (categorías 4 y 5), lo que arrojó 77,7 % de expresión MF en la población surgida del cuarto ciclo de selección.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para los Objetivos Específicos 1 y 2 de este trabajo de tesis, tanto para cada temporada individual como para el análisis conjunto de ambas temporadas. Se aclara que en este capítulo sólo se incluyen las tablas y figuras del análisis conjunto de los datos. El detalle de las tablas y figuras de la información correspondiente a cada temporada individual se ofrece en el Anexo.

3.3 Objetivo Específico 1

Como se mencionó en el Capítulo 1, el objetivo aquí tratado fue determinar componentes de rendimiento de forraje, características morfológicas de tallo y hoja y parámetros de calidad forrajera en las Pob seleccionadas, en los ambientes definidos por la condición edáfica y por condiciones de humedad en base a plantas individuales. Además, explorar la P*A y correlacionar el rendimiento y los parámetros de calidad de forraje de las Pob seleccionadas con las características morfológicas evaluadas.

3.3.1 Temporada 2010/2011

La media \pm el error estándar del rendimiento acumulado, de las características morfológicas y de los parámetros de calidad evaluados, para cada una de las poblaciones y bajo las dos condiciones ambientales propuestas durante la temporada 2010/2011, se presentan en la Tabla 2-Anexo. A lo largo de esta primera temporada, se observó una importante variabilidad en todos los caracteres evaluados.

La productividad de biomasa (Racum) fue inversamente proporcional al avance de los ciclos de selección; vale decir que el aumento de la expresión MF se vio acompañado por una tendencia a disminuir el rendimiento de materia seca. Como era de esperar, los Racum fueron mayores en el ambiente con riego (A2), por la mayor disponibilidad de agua, que en el ambiente en seco (A1). Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos ciclos de selección (Pob), aunque no se observó interacción ($p > 0,05$) entre Pob y ambientes (A). Esto último significa que las diferencias en Racum entre las Pob se mantuvieron a través de los diferentes A generados; en consecuencia, no fue necesario analizar las diferencias entre Pob dentro de cada A. En la Tabla 3-Anexo, se muestra el resultado de la prueba de comparaciones múltiples DGC entre las medias de MS acumulada en 2010/11 (6 cortes) para todas las Pob en los dos ambientes generados (A1 y A2). No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las Pob C1 y C2, pero sí entre éstas y la Pob C3, que presentó el valor más bajo de Racum. Por el contrario, la Pob C0 acumuló mayor cantidad de forraje en esta primera temporada de evaluación.

El número de tallos (T) fue mayor en la Pob C1 respecto de la Pob C0 en ambos ambientes; no obstante, a partir de la Pob C2 se observó una sostenida disminución en el número a lo largo de los ciclos de selección. Los valores de T presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las Pob pero no entre A. Tampoco se detectó interacción Pob*A, indicando que las diferencias entre Pob se mantuvieron tanto en seco como bajo riego. En la prueba de comparaciones múltiples (Tabla 3-Anexo), las Pob C0 y C1 presentaron mayor número de tallos ($p < 0,05$) que las Pob C2 y C3.

La altura de planta (H) disminuyó a medida que se avanzó en los ciclos de selección, observándose en ambos A que los valores máximos de H correspondieron a la Pob C0. Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) de H entre Pob y entre A, pero no hubo interacción Pob*A. El resultado de las comparaciones múltiples (Tabla 3-Anexo) indica que la Pob C0 presentó plantas más altas ($p < 0,05$) que el resto de las Pob, en tanto que la Pob C3 exhibió las plantas más bajas ($p < 0,05$). Por su parte, las Pob C1 y C2 alcanzaron alturas intermedias y sin diferencias entre ellas.

Relacionado con el párrafo anterior, la distancia entre nudos (DN) se redujo a lo largo de los ciclos de selección porque, si bien el número de nudos (N) entre ciclos no varió, la pérdida de H afectó obviamente la DN. El análisis de la variable N no detectó diferencias significativas entre A y Pob ($p>0,05$), pero sí detectó interacción Pob*A (Tabla 3-Anexo). En consecuencia, las diferencias entre Pob se analizaron discriminadas por A. En ese contexto, no se detectaron diferencias entre Pob para las condiciones de secano pero sí para las condiciones de riego. Bajo condiciones de secano, si bien se apreció una tendencia a que N disminuya con el avance de los ciclos de selección, ésta no alcanzó niveles de significancia estadística. Por el contrario, bajo condiciones de riego no se observó ninguna tendencia de N respecto de los ciclos de selección, siendo la Pob C1 la que exhibió menos nudos por tallo ($p<0,05$) que el resto de las Pob, que no se diferenciaron entre sí. El análisis de la variable DN no detectó interacción Pob*A ni diferencias significativas entre A, pero sí entre Pob. En consecuencia, las comparaciones de medias entre ciclos de selección se hicieron con el conjunto de los datos (Tabla 3-Anexo). La menor DN correspondió a la Pob C3, que se diferenció estadísticamente ($p<0,05$) de las otras Pob. Como era de esperarse, esto está estrechamente ligado a lo señalado previamente respecto de la evolución de las variables H y N a lo largo de los ciclos de selección.

El análisis de la varianza para el número de hojas por tallo (NH) no detectó diferencias estadísticamente significativas entre A pero sí entre Pob. Los valores de NH fueron similares entre las Pob en A1 pero muy variables en A2. Esto es compatible con la interacción Pob*A ($p<0,05$) que se detectó en el análisis. En consecuencia, la comparación entre medias se realizó dentro de cada A en particular (Tabla 3- Anexo). No hubo diferencias ($p>0,05$) para NH entre las Pob bajo condiciones de secano (A1), pero sí bajo condiciones de riego (A2), donde la cantidad de hojas disminuyó progresivamente a lo largo de los ciclos de selección ($C0>C1>C2>C3$).

Contrariamente a lo anterior, el número de folíolos por hoja (FH) registró un aumento sostenido en ambos A a medida que avanzaron los ciclos de selección, presentándose las mayores diferencias entre las Pob C1 y C3. Así, se detectaron diferencias altamente significativas ($p<0,0001$) entre Pob pero no entre A. Tampoco se detectó

interacción Pob*A, por lo que los datos se analizaron en conjunto. Las comparaciones de las medias entre las Pob se resumen en la Tabla 3-Anexo. La Pob C3, lograda luego de tres ciclos de SFR por alta expresión del carácter MF, presentó una media de FH = 4,17, superando significativamente al resto de las Pob y corroborando el éxito del proceso de selección, dado que el carácter FH fue uno de los objetivos de mejoramiento del presente trabajo. La Pob C2, con una media de FH = 3,65, también superó significativamente a las medias de las Pob C1 y C0. Como era esperable, la cantidad de folíolos por hoja en la Pob C0, no sujeta a selección por el carácter MF, alcanzó una media de FH = 3,09, acorde a su condición de alfalfa trifoliada (TF).

El análisis de la expresión multifoliolada (%MF) detectó diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) entre Pob pero no entre A ni tampoco interacción Pob*A. En consecuencia, las comparaciones de medias entre Pob se hicieron con el conjunto de datos (Tabla 3-Anexo). Los datos muestran una clara respuesta a la selección, dado que las Pob exhibieron un aumento significativo a medida que se avanzó en los ciclos de selección por el carácter MF. La frecuencia de hojas MF fue mayor en las hojas primarias que en las axilares (datos no mostrados).

La Pob C3 exhibió los mayores valores de relación hoja/tallo (RHT) en ambos A. No obstante, las mayores diferencias entre C3 y las otras Pob se registraron en A1. El análisis estadístico de la RHT no detectó interacción Pob*A ni tampoco diferencias significativas entre A, pero sí entre Pob. La comparación de medias (Tabla 3-Anexo) indicó una clara respuesta a la selección, dado que los valores RHT mostraron una tendencia a incrementarse con los ciclos de selección; sin embargo, sólo las Pob C3 y C1 se diferenciaron ($p < 0,05$) de C0.

El análisis del índice de expresión multifoliolada (IMF) sólo detectó diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre Pob; en consecuencia, la comparación de las medias se hizo en base al conjunto de datos (Tabla 3-Anexo). En consonancia con lo expresado en el párrafo anterior, el IMF mostró una evolución acorde al progreso de selección.

Respecto de los parámetros de calidad, el % PB se incrementó en forma lineal desde C0 a C3 en ambos A. Sin embargo, el análisis de la varianza no detectó diferencias significativas entre los A, las Pob o su interacción. En este contexto, y a fin de visualizar mejor la existencia de diferencias entre Pob, se analizaron las medias a través del test DGC (Tabla 3-Anexo). De esta manera, se aprecia que el contenido de PB tiende a aumentar con los ciclos de selección.

El contenido de fibra detergente neutra (% FDN) tendió a disminuir a medida que avanzaban los ciclos de selección, tanto en condiciones de secano como de regadío. Para éste parámetro, el análisis detectó interacción Pob*A y diferencias entre Pob pero no entre A. En función de esto último, las comparaciones entre las medias de las Pob se realizaron para cada condición ambiental (A1 y A2) en particular (Tabla 3-Anexo). En secano, las Pob no se diferenciaron ($p>0,05$) en cuanto a su contenido de FDN. Contrariamente, bajo condiciones de regadío, las Pob derivadas de los tres ciclos de selección (C1, C2 y C3) tuvieron menor ($p<0,05$) contenido de fibra que la C0.

Los porcentajes de digestibilidad (% IVTDMS) de las distintas Pob no variaron demasiado entre A, aunque bajo riego (A2) se observaron mayores valores que en secano (A1). Las diferencias más grandes se registraron entre las Pob C0 y C3, si bien el análisis de la varianza no detectó diferencias significativas entre Pob ni entre A, al igual que tampoco detectó interacción Pob*A.

En la Tabla 3-Anexo se presentan las medias de cada Pob, que en todos los casos alcanzaron valores muy altos. Si bien se observa una tendencia a aumentar % IVTDMS en función del progreso en los ciclos de selección, estas diferencias no alcanzaron ($p>0,05$) la suficiente entidad como para atribuir ventajas a las Pob MF respecto de la TF original (C0). No obstante la ausencia de diferencias significativas entre las Pob, el aumento de la digestibilidad en consonancia con el progreso de selección tiene una significancia biológica que no debe soslayarse, cuyo posible impacto en la producción animal debería evaluarse en un futuro.

3.3.2 Temporada 2011/2012

La media \pm el error estándar del rendimiento acumulado, de las características morfológicas y de los parámetros de calidad evaluados, para cada una de las poblaciones y bajo las dos condiciones ambientales propuestas durante la temporada 2011/2012, se presentan en la Tabla 4-Anexo. La prueba de comparaciones múltiples DGC entre las medias de todas las Pob en los dos A generados se ofrece en la Tabla 5-Anexo.

El análisis de varianza para la variable Racum (6 cortes) en ambos A (riego y seco) detectó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las Pob, aunque no se observó interacción ($p > 0,05$) A*Pob, indicando que las diferencias de biomasa producida entre las Pob evaluadas se mantuvieron a través de los ambos ambientes. No se detectaron diferencias ($p > 0,05$) de Racum entre C0, C1 y C2, pero si entre éstas y C3; esta última presentó el valor más bajo de producción, situación similar al de la temporada precedente. La Pob C1 fue la que acumuló mayor cantidad de forraje durante esta segunda temporada de evaluación.

En cuanto al número de tallos (T), se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las Pob pero no entre A. Tampoco se detectó Pob*A, lo que indica que las diferencias entre Pob se mantuvieron estables tanto en seco como bajo riego. La comparación de medias (DGC) indicó que las poblaciones C0 y C1 presentaron mayores valores de T que C2 y C3 ($p < 0,05$).

El análisis de la altura de plantas (H) detectó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre Pob pero no entre A. Tampoco se encontró interacción Pob*A ($p > 0,05$). La prueba DGC indicó que C0 y C1 presentaron plantas más altas ($p < 0,05$) que C2 y C3. El tercer ciclo de selección (C3) tuvo las plantas más bajas.

Tanto T como H, son dos componentes importantes para la determinación del rendimiento de forraje. En consecuencia, su evolución inversamente proporcional al avance de los ciclos de selección, podría explicar los menores valores de Racum de C1, C2 y C3 respecto de la población trifoliada original (C0).

No hubo diferencias ($p > 0,05$) en cuanto al número de nudos (N) entre A y Pob, así como tampoco interacción Pob*A. Por su parte, la distancia entre nudos (DN) no presentó interacción Pob*A ni diferencias significativas entre A ($p > 0,05$) pero sí entre Pob ($p < 0,05$). En consecuencia, las comparaciones de medias entre ciclos de selección se hicieron con el conjunto de los datos (Tabla 5-Anexo). C3 exhibió entrenudos más cortos respecto de C0, aunque sin diferenciarse ($p > 0,05$) de C1 y C2. Al igual que en la primera temporada, los menores valores de DN en C3 se explican por tener una menor H que las otras poblaciones con un número similar de tallos (T).

El análisis de la varianza para las estimaciones de la variable número de hojas por tallo (NH) no detectó diferencias estadísticamente significativas entre A ni tampoco interacción Pob*A, pero sí entre Pob ($p < 0,05$). De acuerdo a los datos de comparaciones múltiples (Tabla 5-Anexo), C0 y C1 presentaron mayores valores de NH que C2 y C3.

Para la variable número de folíolos por hoja (FH) se detectaron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) entre Pob pero no entre A. Tampoco se detectó interacción Pob*A. La población C3 presentó una media de 4,84 folíolos por hoja, lo que la diferenció ($p < 0,05$) del resto de las poblaciones. Estos resultados, al igual que lo observado en la primera temporada de evaluación, confirman la efectividad del proceso de selección. La población C2, con un promedio de FH = 3,79, superó significativamente ($p < 0,05$) a las medias de C1 y C0. Como era de esperar, la cantidad de folíolos por hoja de C0, no sujeta a selección por el carácter MF, alcanzó una media de FH = 3,06, compatible con su condición de alfalfa trifoliolada (TF).

El análisis de la expresión multifoliolada (%MF) arrojó diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) entre Pob, pero no entre A ni tampoco detectó interacción Pob*A. Las comparaciones de medias entre Pob se hicieron con el conjunto de datos (Tabla 5-Anexo). Aquí se pone de manifiesto una clara respuesta a la selección, dado que las poblaciones exhibieron un aumento significativo en %MF a medida que avanzaban los ciclos de selección por el carácter multifoliolado.

La relación hoja/tallo (RHT) no mostró interacción Pob*A ni tampoco diferencias significativas entre A, pero sí entre Pob. La comparación de medias (Tabla 5- Anexo), indicó que sólo C3 y C2 se diferenciaron estadísticamente ($p < 0,05$) de C0. En general, los valores de RHT tuvieron un incremento sostenido a lo largo de los ciclos de selección, lo que también corrobora la efectividad de la SFR por el carácter MF.

El análisis del índice de expresión multifoliolada (IMF) detectó diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) entre Pob, pero no entre A ni tampoco interacción Pob*A. En consecuencia la comparación entre medias se hizo en base al conjunto de datos (Tabla 5-Anexo). Al igual que las dos variables anteriores, el aumento de IMF mostró una relación directa con el progreso de selección, alcanzando aumentos significativos en cada ciclo.

3.3.3 Análisis conjunto de ambas temporadas (2010/2012)

A fin de realizar inferencias simultáneas sobre los efectos de los factores sobre las 13 variables que incluyó este estudio, se efectuó un análisis de la varianza multivariado (MANOVA) con toda la información generada en las dos temporadas de evaluación. Para ello, se consideraron el factor humedad edáfica, con los niveles secano y riego, y el factor temporada, con los niveles 2010-2011 y 2011-2012. Mediante este modelo se analizaron las diferencias entre poblaciones, ambientes y su interacción. Los componentes del rendimiento de forraje y parámetros de calidad forrajera fueron evaluados para todas las poblaciones de alfalfa con diferente expresión MF (C0 a C3) en los cuatro ambientes generados para este estudio (Tabla 9).

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las Pob evaluadas para casi todas las variables, excepto para N y IVTDMS. Las Pob C0 y C3 presentaron los valores máximo y mínimo de producción de forraje, respectivamente. Del mismo modo, las variables T, H y NH -que son componentes del rendimiento de forraje- también alcanzaron los mayores valores en C0 y los menores en C3. Por otro lado, C3 presentó los valores más altos en cuanto a %MF y RHT; de ese modo, ambas variables exhibieron una clara respuesta a la selección, dado que su incremento fue consistente con el avance de los ciclos

de selección por el carácter MF. En igual sentido, el aumento del contenido de PB fue mayor ($p < 0,05$) en C3 y menor en C0. Por el contrario, el % FDN disminuyó ($p < 0,05$) en C3 respecto de C0, aunque no hubo diferencias ($p > 0,05$) entre los ciclos de selección.

Tabla 9. Resultado de comparaciones múltiples DGC entre las medias de las variables evaluadas en las poblaciones C0 a C3 y en promedio de los cuatro ambientes.

	C0	C1	C2	C3
Racum (kg MS parcela⁻¹)	4,38a	4,11a	3,90a	3,15b
T	75,70a	80,72a	68,00b	60,77b
H (cm)	48,34a	45,64b	43,97b	40,87c
N	9,69a	9,50a	9,67a	9,49a
DN (cm)	5,11a	4,85a	4,58a	4,39b
NH	41,28a	39,64a	41,07a	37,67b
%MF	4,89d	17,08c	39,40b	67,25a
FH	3,08c	3,28b	3,71b	4,51a
RHT	1,17b	1,30a	1,34a	1,40a
IMF	0,40d	1,11c	2,31b	3,63a
PB (%)	26,60b	28,25a	28,70a	29,25a
FDN (%)	40,47a	39,70b	39,44b	38,91b
IVTDMS (%)	79,29a	80,29a	79,45a	80,72a

Medias en filas con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Referencias: Racum= rendimiento acumulado; T= número de tallos; H= altura de planta; N= número de nudos; DN= distancia entrenudo; NH= número de hojas; %MF= porcentaje de hoja multifoliolada; FH= folíolos por hoja; RHT= relación hoja/tallo; IMF= índice de expresión multifoliolado; PB= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutro; IVTDMS= digestibilidad in vitro de la materia seca.

La Tabla 10 presenta un resumen esquemático de lo ocurrido para las diferentes variables entre las poblaciones y los ambientes generados (riego/secano y temporadas).

Tabla 10. Representación esquemática de la valoración de cada variable evaluada en las poblaciones generadas (C0 a C3) para las temporadas (individuales y en conjunto) y para las condiciones de humedad (riego y seco) utilizados en este estudio.

	2010/2011		2011/2012		2010/2012
	A1	A2	A1	A2	
Racum (kg MS parcela⁻¹)	C0>C1=C2>C3		C0=C1=C2>C3		C0=C1=C2>C3
T	C1>C0>C2>C3		C0=C1>C2=C3		C0=C1>C2=C3
H (cm)	C0>C1=C2>C3		C0=C1>C2>C3		C0>C1=C2>C3
N	C0=C1=C2=C3	C0=C1=C2>C3	C0=C1=C2=C3	C0=C1=C2=C3	C0=C1=C2=C3
DN (cm)	C0>C1=C2>C3		C0>C1=C2=C3		C0=C1=C2>C3
NH	C0=C1=C2=C3	C0>C1>C2>C3	C0=C1>C2=C3	C0=C1=C2>C3	C0=C1=C2>C3
FH	C3>C2>C1>C0		C3>C2>C1>C0		C3>C2>C1>C0
%MF	C3>C2>C1>C0		C3>C2>C1>C0		C3>C2>C1>C0
RHT	C3=C1>C0=C2		C3>C2>C1=C0		C3=C2=C1>C0
IMF	C3>C2>C1>C0		C3>C2>C1>C0		C3>C2>C1>C0
PB (%)	C3=C2=C1>C0				
FDN (%)	C0>C1=C2=C3				
IVTDMS (%)	C0=C1=C2=C3				

Referencias: A1= ambiente en seco; A2= ambiente bajo riego; Racum= rendimiento acumulado; T= número de tallos; H= altura de planta; N= número de nudos; DN= distancia entrenudo; NH= número de hojas; %MF= porcentaje de hoja multifoliolada; FH= folíolos por hoja; RHT= relación hoja/tallo; IMF= índice de expresión multifoliolado; PB= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutro; IVTDMS= digestibilidad in vitro de la materia seca.

3.3.4 Análisis de componentes principales temporada 2010/2012

Para explicar la variabilidad de las Pob seleccionadas con respecto a todas las variables intervinientes y determinar las correlaciones entre ellas, se realizó un análisis de componentes principales o ACP. Con las dos primeras componentes (CP1 y CP2) que se generaron, y que explicaron el 95,1 % de la variabilidad, se confeccionó el gráfico biplot que se muestra en la Figura 19.

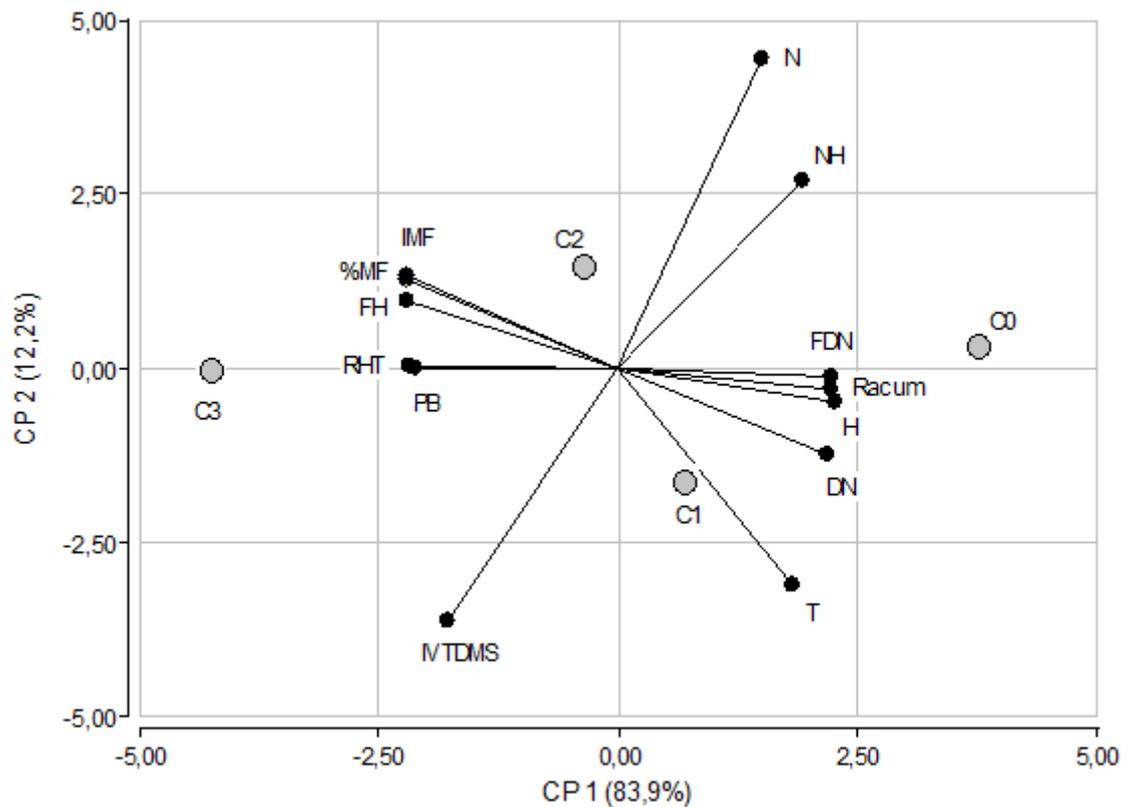


Figura 19. Biplot generado por el análisis de componentes principales de las variables en estudio para el promedio de los cuatro ambientes evaluados. Referencias: Racum= rendimiento acumulado; T= número de tallos; H= altura de planta; N= número de nudos; DN= distancia entrenudo; NH= número de hojas; %MF= porcentaje de hoja multifoliolada; FH= folíolos por hoja; RHT= relación hoja/tallo; IMF= índice de expresión multifoliolado; PB= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutro; IVTDMS= digestibilidad in vitro de la materia seca.

A nivel de la CP1, que explica por sí sola casi 84 % de la variabilidad total, se aprecia la alta diferenciación entre C3 y C0. Considerando que las variables PB, %MF y RHT tienden a estar agrupadas, conformando entre ellas un ángulo agudo y muy cerrado, se infiere que están positiva y altamente correlacionadas entre sí; en menor medida, ese grupo de variables también se infiere que se correlaciona con IVTDMS. Por otro lado, este primer grupo de variables, fuertemente identificadas con calidad forrajera, se infiere que se correlaciona negativamente con T, Racum, H, NH y FDN. Dentro de éstas últimas, Racum, FDN y H estarían positiva y altamente correlacionadas entre sí. Las variables T, Racum, H,

NH y FDN tuvieron una gran influencia para separar las Pob C0 y C1 respecto de C2 y C3. Consecuentemente, la Pob C3, en respuesta a la selección realizada por MF, se asoció a niveles más altos de PB, %MF y en menor medida de IVTDMS.

3.3.5 Análisis de correlación de Pearson temporada 2010/2012

La matriz de correlación lineal fenotípica de Pearson (r) entre todas las variables en estudio y para el conjunto de poblaciones en los cuatro ambientes generados (temporadas 2010-2011 y 2011-2012 y condición de humedad riego/secano) se presenta en la Tabla 11.

Tabla 11. Correlaciones fenotípicas de Pearson (r) entre todas las variables y considerando las cuatro poblaciones y los cuatro ambientes utilizados en este estudio.

	Racum	T	H	N	DN	NH	%MF	FH	RHT	IMF	PB	FDN	IVTDMS
Racum	1	**	**	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
T	0,59	1	ns	**	**	**	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
H	0,63	-0,02	1	**	**	**	*	*	**	*	ns	ns	ns
N	0,18	-0,49	0,67	1	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
DN	0,55	0,51	0,53	-0,26	1	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns
NH	0,05	-0,6	0,64	0,89	-0,16	1	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
%MF	-0,25	-0,14	-0,33	-0,1	-0,3	-0,18	1	ns	ns	ns	**	**	ns
FH	-0,22	-0,09	-0,29	-0,13	-0,19	-0,21	0,97	1	**	ns	**	**	ns
RHT	-0,06	0,52	-0,64	-0,69	-0,07	-0,8	0,39	0,4	1	*	ns	ns	ns
IMF	-0,26	-0,2	-0,31	-0,02	-0,36	-0,1	0,99	0,94	0,31	1	**	**	ns
PB	-0,29	-0,21	-0,13	0,04	-0,22	0,01	0,61	0,61	0,21	0,62	1	**	**
FDN	0,06	0,05	0,0046	-0,09	0,09	-0,05	-0,4	-0,41	-0,16	-0,41	-0,72	1	**
IVTDMS	-0,08	-0,06	0,16	0,18	-0,02	0,08	0,23	0,24	-0,04	0,21	0,63	-0,62	1

*, **, ns: significativo a los niveles de probabilidad 0,05, 0,01 y no significativo, respectivamente. Referencias: Racum= rendimiento acumulado; T= número de tallos; H= altura de planta; N= número de nudos; DN= distancia entrenudo; NH= número de hojas; %MF= porcentaje de hoja multifoliolada; FH= folíolos por hoja; RHT= relación hoja/tallo; IMF= índice de expresión multifoliolado; PB= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutro; IVTDMS= porcentaje digestibilidad in vitro de la materia seca.

Se detectaron correlaciones importantes entre algunas variables, con valores de r moderados a altos. El Racum tuvo una correlación altamente significativa ($p < 0,01$) y

positiva con T, H y DN; mientras que con PB fue solamente significativa ($p < 0,05$) y negativa. Del mismo modo, la variable T manifestó una correlación altamente significativa y positiva con DN y RHT, pero negativa con N y NH.

La variable H mostró una correlación alta y positiva con N, DN y NH, pero moderada y negativa con %MF, FH e IMF; en cambio, su relación con RHT fue alta y negativa.

El %MF estuvo alta y positivamente correlacionado con PB, pero moderada y negativamente con FDN. A su vez, FH tuvo una correlación altamente significativa y positiva con PB, pero moderada y negativa con FDN.

3.4. Objetivo Específico 2

Cabe recordar que el objetivo fue determinar componentes de rendimiento de forraje, características morfológicas de tallo y hoja y parámetros de calidad forrajera en las Pob seleccionadas, en base a plantas bajo cultivo denso. Además, explorar la P*A y correlacionar el rendimiento y los parámetros de calidad de forraje de las Pob seleccionadas con las características morfológicas evaluadas.

3.4.1 Resultados de la temporada 2012/2013

Los valores medios de producción acumulada para todos los cortes, así como los valores promedio para las demás variables evaluadas durante la temporada 2012/2013 del ensayo en cultivo denso, se presentan en las Tablas 6, 7 y 8-Anexo. Las significancias del análisis MANOVA para las 12 variables consideradas en este estudio, con su respectivo coeficiente de variación, se presentan en la Tabla 12.

Para Racum no se detectaron diferencias entre Pob y testigos para los 6 cortes, así como tampoco se observaron diferencias significativas para las variables H, RHT1, RHT2, FDN y FDNdig. Por el contrario, sí se registraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre

Pob y testigos para las variables IMF, RHT3, RHTt y PB. Si bien las diferencias para N y IVTDMS no fueron *sensu strictu* significativas al nivel de 0,05, se hace notar que los bajos valores de p (0,071 y 0,057, respectivamente), muy cercanos al nivel de significancia del 5% pre-fijado, permiten inferir un cierto nivel de significancia biológica para ambas variables entre los ciclos de selección y los testigos usados.

Tabla 12. Análisis de la varianza MANOVA para las 12 variables morfológicas, de calidad y de producción de forraje evaluadas durante la temporada 2012/2013 en plantas bajo cultivo denso.

	CV (%)	p-valor
Racum	23	0,7616
H	14,27	0,7532
N	0,00	0,0708
IMF	15,17	<0,0001
RHT1	21,28	0,3899
RHT2	41,79	0,3717
RHT3	17,16	0,0458
RHTt	7,93	0,0386
PB	1,55	0,0019
FDN	5,50	0,3805
FDNdig	6,45	0,5118
IVTDMS	1,30	0,0574

CV= coeficiente de variación; p-valor=valor de significación (p<0,05). Racum= rendimiento acumulado; H= altura de planta; N= número de nudos; IMF= índice de expresión multifoliolado; RHT1-2-3= relación hoja/tallo superior-medio-inferior, respectivamente; RHTt= relación hoja/tallo total; PB= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutro; FDNdig= fibra detergente neutro digestible; IVTDMS= digestibilidad in vitro de la materia seca.

En la Tabla 13 se resumen las comparaciones de las medias para cada una de las 12 variables entre las poblaciones y los testigos.

En algunos de los caracteres evaluados se observó un importante rango de variabilidad, como en el caso de Racum, que presentó valores entre 10,70 y 12,47 t MS ha⁻¹ año⁻¹ (6 cortes) para C4 y C0, respectivamente. No obstante, y como ya fuera

mencionado, estas diferencias no fueron significativas al nivel de $\alpha=0,05$. A medida que se avanzó en los ciclos de selección (C3 y C4), las diferencias de rendimiento de forraje respecto de C0 y de los testigos tendieron a incrementarse, lo que podría estar relacionado con la tendencia a disminuir la altura de planta (H) como consecuencia de la selección por alta expresión MF.

Tabla 13. Resultado de comparaciones múltiples DGC de las diferentes variables (rendimiento, morfológicas y de calidad) evaluadas entre las poblaciones y testigos entre C0, C3 y C4.

	C0	C3	C4	CW1010	MIREYA	RUANO
Racum (t MS ha⁻¹)	12,47a	11,23a	10,70a	11,48a	12,86a	11,33a
H (cm)	45,00a	41,39a	41,05a	43,28a	47,72a	45,94a
N	10,75a	9,57a	9,37a	9,56a	9,98a	10,51a
IMF	0,09b	3,03a	3,24a	0,28b	0,07b	0,28b
RHT1	4,81a	5,97a	5,76a	4,82a	4,19a	4,88a
RHT2	1,54a	1,56a	1,74a	2,51a	1,47a	1,24a
RHT3	0,31b	0,35b	0,34b	0,42a	0,29b	0,25b
RHTt	1,35b	1,46a	1,49a	1,54a	1,29b	1,25b
PB (%)	23,11b	23,55b	25,00a	sd	sd	sd
FDN (%)	40,93a	39,40a	38,25a	sd	sd	sd
FDNdig (%)	48,25a	50,33a	51,42a	sd	sd	sd
IVTDMS (%)	78,33a	79,89a	80,93a	sd	sd	sd

sd=sin dato. Medias en filas con una letra común no son significativamente diferentes ($p<0,05$). Referencias: Racum= rendimiento acumulado; H= altura de planta; N= número de nudos; IMF= índice de expresión multifoliolado; RHT1-2-3= relación hoja/tallo superior-medio-inferior, respectivamente; RHTt= relación hoja/tallo total; PB= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutro; FDNdig= fibra detergente neutro digestible; IVTDMS= digestibilidad in vitro de la materia seca.

Si bien H disminuyó en valores absolutos a medida que se avanzó en los ciclos de selección por alta MF, no se detectaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre Pob y testigos. La variedad MIREYA fue la que presentó el mayor valor medio de H (47,72 cm), mientras que C4 tuvo el menor valor (41,05 cm). El número de tallos (N) tampoco mostró diferencias significativas ($p>0,05$) entre los ciclos de selección y los testigos.

El IMF aumentó a medida que se avanzó en los ciclos de selección, diferenciándose C4 y C3 respecto de C0 y de los cultivares testigo ($p < 0,0001$). Por su parte, la variable RHT no registró diferencias significativas entre Pob y testigos para los estratos superior (RHT1) y medio (RHT2), pero sí para el estrato inferior (RHT3) y para la relación hoja/tallo total (RHTt). Tanto C3 y C4 como el testigo CW1010 tuvieron mayores ($p < 0,05$) RHTt que el resto de los tratamientos. A su vez, CW1010 también se diferenció del resto de los materiales evaluados con respecto a RHT3.

Para obtener una mejor visualización de la estructura de las plantas en cuanto a la distribución de las hojas en los diferentes estratos de la canopia, se presentan en la Figura 20 las distribuciones de la RHT en los distintos estratos considerados.

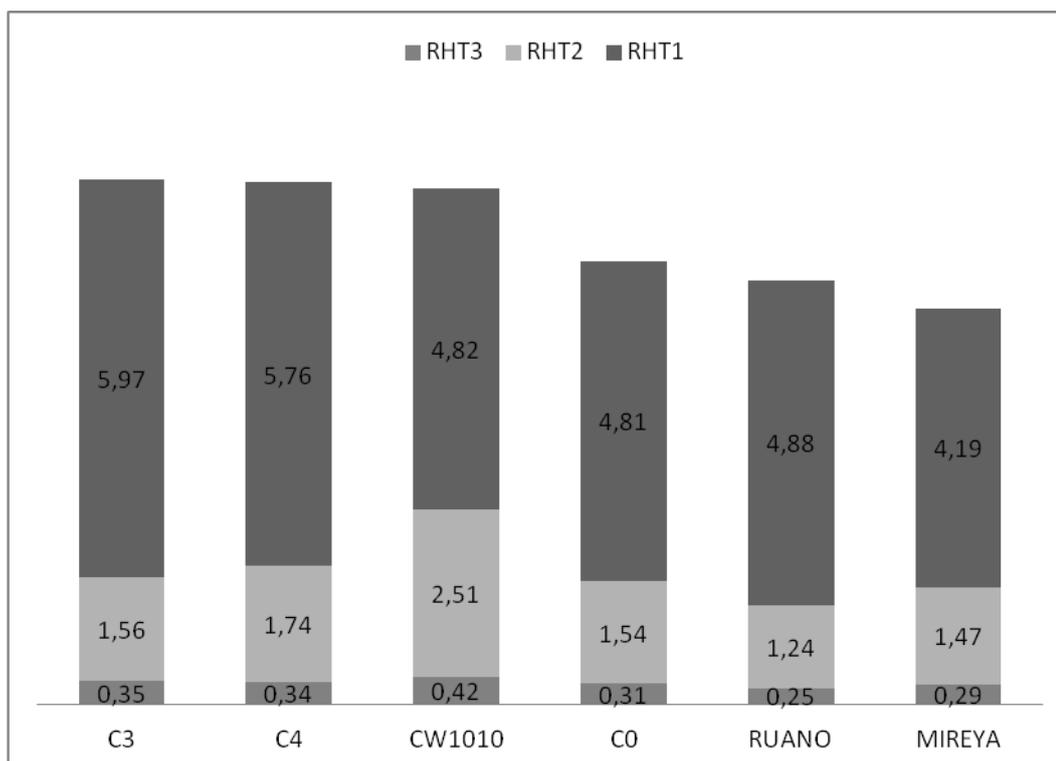


Figura 20. Perfiles de variabilidad de la relación hoja/tallo en los diferentes estratos: superior (RHT1), medio (RHT2) e inferior (RHT3), entre las diferentes poblaciones evaluadas y los testigos. Referencias: RHT1= relación hoja/tallo superior; RHT2= relación hoja/tallo medio; RHT3= relación hoja/tallo inferior.

Se aprecia que tanto C3 como C4 alcanzaron los mayores valores de RHT1, lo que indica que la selección por alta expresión MF acumuló mayor proporción de hojas en el estrato superior. Por su parte, el cv CW1010 presentó los mayores valores de RHT para los estratos medio e inferior, seguida por C4.

Como resultado de la selección por MF, el contenido de proteína bruta (PB) se incrementó ($p < 0,05$) desde C0 a C4 (Tabla 13). Por el contrario, FDN tendió a disminuir a medida que avanzaron los ciclos de selección, aunque estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$). Igual comentario puede hacerse respecto de la fracción digestible de la fibra (FDNdig) y de la digestibilidad (IVTDMS).

3.4.2 Análisis de componentes principales temporada 2012/2013

Se realizó un ACP, al igual que en el ensayo establecido para el logro del objetivo específico 1, para explicar la variabilidad en las Pob seleccionadas con respecto a todas las variables intervinientes y para inferir las correlaciones entre ellas. Las dos primeras componentes (CP1 y CP2), que explicaron el 100% de la variabilidad, se emplearon para la confección del gráfico biplot que se muestra en la Figura 21.

A nivel de la CP1, que explica por sí sola casi el 89,5 % de la variabilidad total, se aprecia la alta diferenciación entre C4 y C0. Considerando que las variables PB y RHT2 tienden a estar agrupadas, conformando entre ellas un ángulo agudo y muy cerrado, se infiere que estarían positiva y altamente correlacionadas entre sí; en menor medida, ese grupo de variables también se correlacionaría con IVTDMS y FDNdig.

Por otro lado, todas las variables anteriores se correlacionarían negativamente con Racum, H, N y FDN. A su vez, los caracteres incluidos en este último grupo estarían positiva y altamente correlacionadas entre sí y son en gran medida los responsables de la clara separación de C0 respecto de C3 y C4. Dicho de otra forma, C4 –como consecuencia de la selección realizada por MF– se asoció fuertemente a mayores valores de IVTDMS, FDNdig, PB, RHTt e IMF.

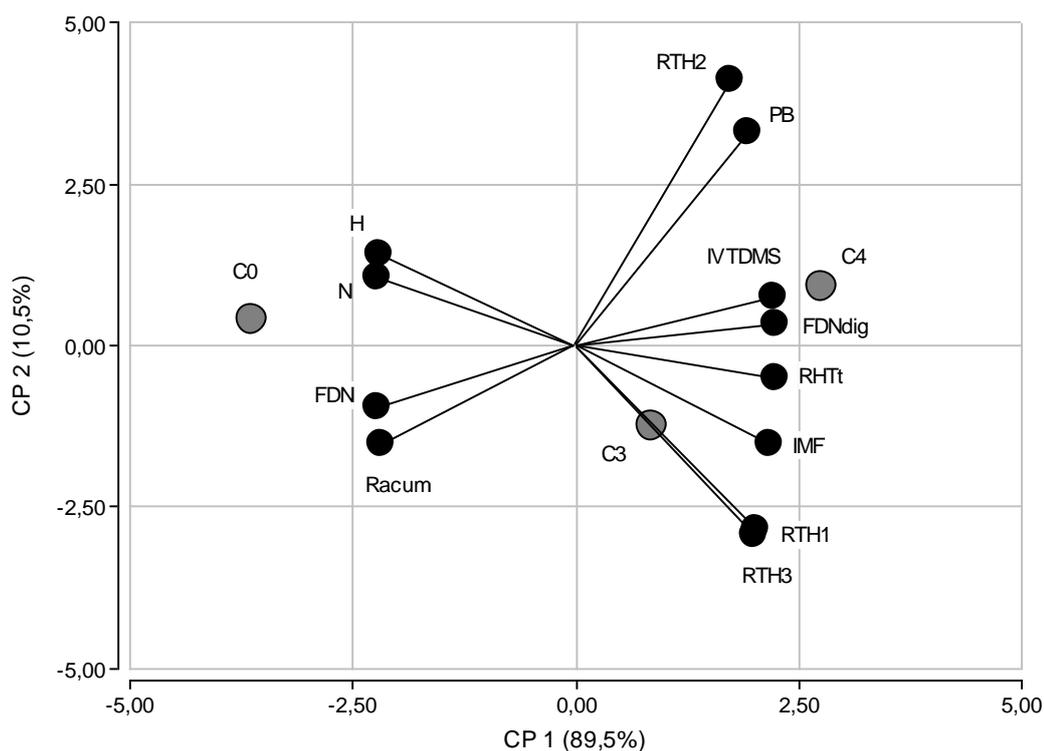


Figura 21. Biplot generado por el análisis de componentes principales de las variables en estudio, entre la media de las poblaciones evaluadas. Referencias: Racum= rendimiento acumulado; H= altura de planta; N= número de nudos; IMF= índice de expresión multifoliolado; RHT1-2-3= relación hoja/tallo superior-medio-inferior, respectivamente; RHTt= relación hoja/tallo total; PB= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutro; FDNdig= fibra detergente neutro digestible; IVTDMS= digestibilidad in vitro de la materia seca.

3.4.3 Análisis de correlación de Pearson temporada 2012/2013

La matriz de correlación lineal fenotípica de Pearson (r) entre todas las variables y para el conjunto de las poblaciones se presenta en la Tabla 14.

Algunas variables mostraron valores de r moderados a altos. El Racum tuvo una correlación altamente significativa ($p < 0,01$) y positiva con H, negativa con RHTt y IVTDMS, y significativa ($p < 0,05$) y positiva con FDN. Por su parte, H se correlacionó negativamente con RHTt ($p < 0,01$) y RHT1 ($p < 0,05$) y positivamente con FDN ($p < 0,05$).

El número de tallos (N) exhibió correlación negativa ($p > 0,05$) con IVTDMS. El IMF estuvo positiva y significativamente correlacionado con PB e IVTDMS. Tanto RHT2 como RHT3 se correlacionaron positivamente con RHTt, pero negativamente con FDN. Además, RHTt estuvo correlacionada positivamente ($p < 0,05$) con IVTDMS y negativamente con FDN. Finalmente, IVTDMS se correlacionó ($p < 0,05$) positivamente con PB pero negativamente con FDN.

Tabla 14. Correlaciones fenotípicas de Pearson (r) entre todas las variables en estudio evaluadas entre poblaciones (C0 a C4).

	Racum	H	N	IMF	RTH1	RTH2	RTH3	RHTt	PB	FDN	FDNdig	IVTDMS
Racum	1	**	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	ns	**
H	0,76	1	ns	ns	*	ns	ns	**	ns	*	ns	ns
N	0,23	0,12	1	ns	*							
IMF	-0,26	-0,35	-0,49	1	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*
RTH1	-0,25	-0,54	-0,33	0,49	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
RTH2	-0,17	-0,14	-0,26	-0,02	-0,33	1	*	*	ns	*	ns	ns
RTH3	-0,32	-0,44	-0,37	0,16	0,11	0,62	1	**	ns	*	ns	ns
RHTt	-0,65	-0,75	-0,37	0,42	0,38	0,48	0,73	1	ns	**	ns	**
PB	-0,36	-0,18	-0,63	0,68	0,32	0,18	-0,01	0,46	1	ns	ns	*
FDN	0,73	0,76	0,42	-0,44	-0,28	-0,77	-0,69	-0,93	-0,49	1	ns	*
FDNdig	-0,33	0,04	-0,49	0,52	-0,13	-0,38	-0,46	0,19	0,43	0,05	1	ns
IVTDMS	-0,85	-0,66	-0,76	0,73	0,34	0,53	0,39	0,92	0,69	-0,82	0,47	1

*, **, ns: significativo a los niveles de probabilidad 0,05, 0,01 y no significativo, respectivamente. Racum= rendimiento acumulado; H= altura de planta; N= número de nudos; IMF= índice de expresión multifoliolado; RHT1-2-3= relación hoja/tallo superior-medio-inferior, respectivamente; RHTt= relación hoja/tallo total; PB= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutro; FDNdig= fibra detergente neutro digestible; IVTDMS= digestibilidad in vitro de la materia seca.

3.4.4 Producción de forraje temporada 2013/2014

En el análisis de varianza entre Pob y testigos para la variable Racum en los seis cortes de la temporada 2013/2014, se detectaron diferencias significativas entre las Pob y los testigos (Tabla 15). Los valores promedio de rendimiento fueron de casi 15 t MS ha⁻¹ año⁻¹ en CW 1010 a 24 t MS ha⁻¹ año⁻¹ en MIREYA; esta última variedad se diferenció

estadísticamente ($p < 0,05$) del resto de los testigos y de los ciclos de selección. Si bien las diferencias de Racum de C3 y C4 respecto de C0 no alcanzaron niveles de significancia, se considera que los valores absolutos son lo suficiente importantes como para asignar a esta situación un valor agronómico insoslayable.

Tabla 15. Resultado de comparaciones múltiples DGC para la variable rendimiento acumulado (Racum) entre los ciclos de selección (C0 a C3) y los cultivares testigo durante la temporada 2013/2014.

	C0	C3	C4	CW1010	MIREYA	RUANO
Racum (t MS ha⁻¹)	18,11b	15,46b	15,67b	14,96b	24,69a	16,93b

Medias en filas con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Referencia: Racum= rendimiento acumulado.

3.5 Objetivo Específico 3

Cabe aquí recordar que el objetivo fue caracterizar el comportamiento de la resistencia a antracnosis, pulgón azul y pulgón moteado de la Pob original y de aquella obtenida luego de 4 ciclos de SFR.

3.5.1. Caracterización de la resistencia a plagas y enfermedades

3.5.1.1 Pulgón azul

Las Tablas 16 y 17 presentan la evaluación realizada en la EEA Manfredi respecto del nivel de resistencia a pulgón azul de las Pob C0 y C4. La siembra de las bandejas fue realizada el 15/10/2012; la infestación se realizó el 19/10/2012 y la evaluación de los niveles de resistencia el 12/11/2012. De acuerdo al protocolo de la prueba, las categorías 1, 2 y 3 se consideran como resistentes, y las categorías 4 y 5 como susceptibles. En consecuencia, se aprecia que tanto C0 como C4 se categorizaron como “altamente resistentes” (AR). Vale decir que los cuatro ciclos de SFR por MF no modificaron el nivel de comportamiento frente a la plaga que tenía el material original.

Tabla 16. Porcentaje de plántulas en cada categoría de resistencia a pulgón azul de acuerdo a la NAAIC para los ciclos inicial (C0) y final (C4) de selección multifoliolada.

Material	% de plántulas en cada categoría de resistencia					N° total de plantas
	1	2	3	4	5	
Costera SP INTA	0,8	5,3	12,6	50,4	30,9	368
CUF 101	10,3	12,3	19,5	42,6	15,3	382
C0	7,6	23,4	26,1	35,4	7,5	376
C4	8,4	20,2	22,9	39,5	9	282

Referencias: testigo susceptible (Costera SP INTA); testigo resistente (CUF 101).

Tabla 17. Porcentajes de resistencia a pulgón azul de los ciclos inicial (C0) y final (C4) de selección por alta expresión multifoliolada. Los valores consignados son los obtenidos en la prueba y los ajustados al valor histórico promedio del testigo resistente, CUF 101.

	Resistencia (%) (=% cat 1, 2 y 3)	Resistencia (%) ajustado a CUF 101 = 55%
Costera SP INTA	18,7	24,4 MR ^(*)
CUF 101	42,1	55,0 AR
C0	57,1	74,6 AR
C4	51,5	67,3 AR
Media	42,3	55,3
CV (%)	13,5	13,5
LSD (0,05)	7,98	10,63

Referencias: testigo susceptible (Costera SP INTA); testigo resistente (CUF 101).

CV= coeficiente de variación; LSD= test con valor de significación ($p < 0,05$); cat: categoría de resistencia. ^(*) Categorías de resistencia: MR = moderadamente resistente; AR = altamente resistente.

3.5.1.2 Pulgón moteado

En las tablas 18 y 19 se presentan los datos obtenidos del test de caracterización de resistencia a pulgón moteado realizado en la EEA Manfredi. La siembra de las bandejas

fue realizada el 15/10/2012; la infestación se realizó el 26/10/2012 y la evaluación de los niveles de resistencia el 22/11/2012.

Tabla 18. Porcentaje de plántulas en cada categoría de resistencia a pulgón moteado de acuerdo a la NAAIC para los ciclos inicial (C0) y final (C4) de selección por alta expresión multifoliolada.

Material	% de plántulas en cada categoría de resistencia					N° total de plantas
	1	2	3	4	5	
Costera SP INTA	0	1,2	1,1	1,8	95,9	362
CUF 101	23	28,5	27	6	15,5	345
C0	18,2	30,1	27,2	7,2	17,3	361
C4	19,3	25,3	26,5	3,4	25,5	265

Referencias: testigo susceptible (Costera SP INTA); testigo resistente (CUF 101).

Tabla 19. Porcentajes de resistencia a pulgón moteado de los ciclos inicial (C0) y final (C4) de selección por alta expresión MF. Los valores consignados son los obtenidos en la prueba y los ajustados al valor histórico promedio del testigo resistente, CUF 101.

	Resistencia (%) (=% cat 1 y 2)	Resistencia (%) ajustado a CUF 101 = 60%
Costera SP INTA	1,2	1,4 S ^(*)
CUF 101	51,5	60 AR
C0	48,3	56,3 AR
C4	44,6	52 AR
Media	36,4	42,4
CV (%)	11,8	11,8
LSD (0,05)	8,11	9,21

Referencias: testigo susceptible (Costera SP INTA); testigo resistente (CUF 101). CV= coeficiente de variación; LSD= test con valor de significación (p<0,05); cat: categoría de resistencia. ^(*) Categorías de resistencia: S = susceptible; AR = altamente resistente.

De acuerdo al protocolo de la prueba, las categorías 1, 2 y 3 se consideran como resistentes, y las categorías 4 y 5 como susceptibles. En consecuencia, se aprecia que tanto C0 como C4 se categorizaron como “altamente resistentes” (AR). Vale decir que los cuatro

ciclos de SFR por MF no modificaron el nivel de comportamiento frente a la plaga que tenía el material original.

3.5.1.3 Antracnosis

La evaluación realizada sobre C0 y C4 con respecto al comportamiento de la resistencia frente a antracnosis se presenta en la Tabla 20. La siembra de las bandejas fue realizada el 04/10/2012; la inoculación se realizó el 18/10/2012 y la evaluación de los niveles de resistencia el 01/11/2012.

Tabla 20. Porcentajes de resistencia a antracnosis de los ciclos inicial (C0) y final (C4) de selección por alta expresión multifoliolada. Los valores consignados son los obtenidos en la prueba y los ajustados al valor histórico promedio del testigo resistente, ARC.

	Resistencia (%) sin ajustar	Resistencia (%) ajustado a ARC = 65%
Costera SP INTA	3,9	4,4 S ^(*)
ARC	57,2	65 AR
C0	32,6	37 R
C4	27,9	31,7 R
Media	30,4	34,5
CV (%)	22,3	22,3
LSD (0,05)	9,23	10,15

Referencias: testigo susceptible (Costera SP INTA); testigo resistente (ARC). CV= coeficiente de variación; LSD= test con valor de significación ($p < 0,05$). ^(*) Categorías de resistencia: S = susceptible; R = resistente; AR = altamente resistente.

La variable medida fue el porcentaje de supervivencia de plántulas mediante conteo de las que sobrevivieron a los 10 días posteriores a la inoculación. Para el cálculo del porcentaje se tomó como conteo inicial (número base) el número de plántulas emergidas a los 10 días de la siembra. Tanto C0 como C4 se categorizaron como resistentes (R) (Tabla 20). Vale decir que los cuatro ciclos de SFR por MF no modificaron el nivel de comportamiento frente a la enfermedad que poseía el material original.

3.6 Objetivo Específico 4

Cabe aquí recordar que el objetivo específico 4 fue estimar la diversidad genética a través de marcadores moleculares SSR, entre la Pob original y aquella obtenida luego de 4 ciclos de SFR.

3.6.1 Diversidad genética dentro de las poblaciones

Del total de microsatélites utilizados para la caracterización de la diversidad genética intrapoblacional, 20 de ellos amplificaron en una sola región y 5 mostraron dos regiones de amplificación. Estas dos regiones fueron denominadas “a” ó “b”, de acuerdo a su menor o mayor peso molecular, respectivamente. Ambas regiones resultaron lo suficientemente distantes y no presentaron ninguna relación alélica, lo que evitó errores de lectura por una superposición de fragmentos de pesos similares. Entre las dos regiones, fue elegida sólo la región que mostró mayor polimorfismo, es decir un mayor número de alelos -suponiendo que esto representaría un poder discriminativo superior entre las poblaciones en estudio-.

Los 25 loci microsatélites mostraron un total de 185 fragmentos de PCR o alelos (Tabla 21), cuyos pesos moleculares oscilaron desde 80 a 310 pb. El número de fragmentos por locus varió desde 3 (para MAL369471) hasta 11 (para ENOD20 y MTIC153) y registró un promedio de 6,28 alelos por locus.

Se observó un gran número de alelos para casi todos los marcadores SSR utilizados en este estudio. Mediante la especificación y la comparación del número de fragmentos por locus dentro de cada población se estimó si hubo o no una pérdida efectiva de alelos durante el proceso de selección.

Para casi todos los microsatélites, el número de alelos por locus fue el mismo entre C0 y C4, aunque en cuatro de ellos (MTIC82, MTIC95b, MTIC247 y MTIC470) se observó que uno o dos alelos presentes en C0 (si bien con frecuencias <5%) no aparecieron en C4. No obstante, en atención al alto grado multialélico de marcadores SSR en alfalfa,

esta pequeña pérdida no se consideró lo suficientemente significativa como para determinar una diferenciación entre las dos poblaciones. Esta observación se ve reforzada por los valores estimados de diversidad genética (H_E) para cada uno de los microsatélites (Tabla 22).

Tabla 21. Rango de tamaño (pb) observado para cada locus y número de fragmentos detectados por planta en las poblaciones C0 y C4 de alfalfa estudiadas mediante 25 loci SSR.

Locus	Rango de tamaño observado (bp)	Nº total de fragmentos por locus	Nº total de fragmentos por locus en C0	Nº total de fragmentos por locus en C4
MAA660870	215-250	5	5	5
MTR58	150-200	7	7	7
MAL369471	100-140	3	3	3
B21E13	145-170	5	5	5
ENOD20	225-310	11	11	11
MTIC77a	105-150	6	6	6
MTIC82	120-160	6	6	4
MTIC94a	100-150	5	5	5
MTIC95b	100-140	6	6	5
MTIC103	140-180	5	5	5
MTIC131	100-140	8	8	8
MTIC153	115-180	11	11	11
MTIC210	200-240	5	5	5
MTIC232	110-130	4	4	4
MTIC238a	100-190	7	7	7
MTIC247	160-200	8	8	6
MTIC249a	90-120	4	4	4
MTIC258	125-140	4	4	4
MTIC304	135-165	5	5	5
MTIC331	80-85	3	3	3
MTIC332	95-140	10	10	10
MTIC338	150-180	6	6	6
MTIC447	85-100	7	7	7
MTIC470	110-135	8	8	7
MTIC471	110-160	8	8	8

En algunos loci, a ó b hacen referencia a la región de amplificación.

La cuantificación de la H_E varió de 0,565 a 0,889 en C0 y de 0,491 a 0,877 en C4. Estos valores se asumen como moderados a altos y son consistentes con el número total de alelos encontrados en cada marcador.

Los resultados obtenidos señalan que la diversidad genética de ambas poblaciones fue muy similar, incluso para los cuatro microsatélites que mostraron pérdida de alelos. Paralelamente, se observó que el promedio global de H_E fue 0,723 para C0 y 0,726 para C4 y que la prueba DGC no detectó diferencias significativas ($p > 0,05$) de H_E entre las dos poblaciones. Todo lo anterior permite concluir que la diversidad genética presente en C4 fue tan grande como la diversidad observada en C0. En ese contexto, las diferencias mínimas de H_E que hubo entre C0 y C4 respecto de los loci B21E13, MTIC249 y MTIC471 (Tabla 22), no fueron significativas para la prueba de comparación de medias. Sin embargo, esas diferencias en valores absolutos, aunque pequeñas, podrían estar indicando algún efecto potencial del proceso de selección hacia algún grado de estrechamiento de la variabilidad genética en la población resultante (C4).

En resumen, los resultados obtenidos evidenciaron un alto grado de variabilidad genética intrapoblacional y que la variabilidad presente en la población original se pudo mantener luego de cuatro ciclos de selección fenotípica por alta expresión MF.

Mediante el uso de la tinción con nitrato de plata, que fue la técnica empleada en este caso, es difícil obtener el dosaje alélico evaluando la intensidad de bandeo; en consecuencia, el dosaje alélico no se determinó en el presente trabajo. La limitación señalada puede ser importante cuando un individuo particular tiene menos de cuatro fragmentos de amplificación diferentes, dado que eso puede impedir la identificación del genotipo real al hacer posible la ocurrencia de más de un genotipo para un perfil dado de fragmentos. Para sortear esa dificultad, en algunos estudios de diversidad en la alfalfa se ha estimado el parámetro diversidad de PIC, que considera cada fragmento amplificado de forma independiente, como si se tratara de un marcador dominante, perdiendo las relaciones alélicas inherentes a la naturaleza de los marcadores SSR.

Tabla 22. Media de heterocigosidad esperada (H_E) para cada uno de los 25 loci en las pob C0 y C4.

Locus	Heterocigosidad esperada (H_E)	
	C0	C4
MAA660870	0,728	0,771
MTR58	0,795	0,807
MAL369471	0,565	0,551
B21E13	0,77	0,679
ENOD20	0,879	0,831
MTIC77a	0,764	0,769
MTIC82	0,709	0,69
MTIC94a	0,647	0,66
MTIC95b	0,715	0,698
MTIC103	0,696	0,759
MTIC131	0,84	0,837
MTIC153	0,889	0,877
MTIC210	0,703	0,711
MTIC232	0,575	0,545
MTIC238a	0,723	0,728
MTIC247	0,786	0,805
MTIC249a	0,635	0,491
MTIC258	0,617	0,678
MTIC304	0,641	0,602
MTIC331	0,65	0,663
MTIC332	0,804	0,855
MTIC338	0,804	0,783
MTIC447	0,758	0,776
MTIC470	0,677	0,745
MTIC471	0,715	0,84
Promedio global	0,723	0,726

En este estudio, los marcadores de SSR utilizados fueron altamente polimórficos y eficaces para revelar el nivel de diversidad genética presente en las poblaciones estudiadas.

Como se ha mencionado antes, la diversidad genética promedio detectada en C4 fue comparable a la de la población original (C0), mostrando así que la efectividad de la

selección por alta expresión multifoliolada no conllevó un aumento de la consanguinidad. Esto último es particularmente importante en el mejoramiento genético de la alfalfa, ya que es una especie extremadamente sensible a la endocria. Es probable que para la conservación de la variabilidad a lo largo de los ciclos de selección haya contribuido el tamaño de la población de mejoramiento suficientemente grande, permitiendo evitar la deriva genética.

3.6.2 Diversidad genética entre las poblaciones

Las estimaciones de la media para la medida de diferenciación poblacional de Nei (G_{ST}) y para la distancia genética de Nei (D) se presentan en la Tabla 23.

Los valores de G_{ST} -considerando todos los microsatélites incluidos en este estudio- variaron desde 0,002 hasta 0,033 para MTIC95 y MTIC471, respectivamente, con un promedio de 0,013. Esto último significa que sólo 1,3% de la diversidad genética fue interpoblacional (entre C0 y C4) y que 98,7% fue intrapoblacional.

Los valores G_{ST} obtenidos para cada marcador individual no fueron lo suficientemente altos ($G_{ST}>0,05$) como para identificar una región genómica que, cubierta por esos marcadores, permitiera inferir la posible localización de genes mayores relacionados con el carácter MF. Por otro lado, los valores estimados de G_{ST} fueron independientes del número total de alelos para cada marcador individual.

La distancia genética (D) osciló entre 0,008 a 0,274, con una estimación global de 0,091. El rango consignado es bajo y refuerza la similitud observada entre las dos poblaciones.

Tabla 23. Media de la diferenciación poblacional de Nei (G_{ST}) y la distancia genética de Nei (D) para cada locus entre las poblaciones C0 y C4.

Locus	Parámetros de diversidad entre poblaciones	
	G_{ST}	D
MAA660870	0,006	0,036
MTR58	0,014	0,124
MAL369471	0,016	0,042
B21E13	0,018	0,088
ENOD20	0,020	0,262
MTIC77a	0,007	0,050
MTIC82	0,007	0,033
MTIC94a	0,003	0,012
MTIC95b	0,002	0,008
MTIC103	0,026	0,149
MTIC131	0,010	0,108
MTIC153	0,013	0,216
MTIC210	0,009	0,046
MTIC232	0,006	0,014
MTIC238a	0,021	0,122
MTIC247	0,008	0,065
MTIC249a	0,020	0,041
MTIC258	0,005	0,015
MTIC304	0,012	0,041
MTIC331	0,005	0,020
MTIC332	0,025	0,274
MTIC338	0,019	0,161
MTIC447	0,011	0,074
MTIC470	0,013	0,060
MTIC471	0,033	0,235
Promedio global	0,013	0,092

3.6.3 Desequilibrio de ligamiento

Se analizó el desequilibrio de ligamiento (LD) para todos los pares de *primers* empleados en este estudio. El análisis no reveló evidencia significativa de desequilibrio de ligamiento entre los marcadores.

Cuando se analizó el perfil de amplificación para cada individuo (1, 2, 3 o 4 fragmentos), se observaron diferencias pequeñas al comparar C0 y C4. Algunos individuos mostraron cuatro fragmentos en C4, que estuvieron ausentes en todos los individuos C0; por el contrario, hubo individuos que presentan un solo fragmento en C4 pero dos o más combinaciones alélicas en C0 (datos no mostrados). Estos resultados demostrarían, al menos indirectamente, que es probable la existencia de un cambio de frecuencias alélicas entre C0 y C4; no obstante, al no haberse podido estimar el dosaje alélico, no se pudo calcular la veracidad ni la magnitud de ese cambio de frecuencias alélicas entre las poblaciones. El LD podría haberse observado en C0 porque esta población fue creada a partir de tres poblaciones probablemente panmícticas que se entrecruzaron para una sola generación, pero la ausencia de LD en C0 significa que las tres poblaciones iniciales no tuvieron arreglos específicos de alelos. Esta ausencia de LD también podría explicar por qué, a pesar de la naturaleza poligénica de la característica MF, el número de SSR utilizado en este estudio fue insuficiente para identificar un cambio en la frecuencia de los alelos SSR que podría estar relacionado con el rasgo MF.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

El esquema de mejoramiento en pos de incrementar el carácter multifoliolado (MF) a través de cuatro ciclos de selección fenotípica recurrente (SFR) fue muy similar al planteado por Ferguson y Murphy (1973), con la diferencia de que la selección realizada en el presente trabajo tuvo dos momentos de selección correspondientes a los estados 0 (vegetativo temprano) y 5 (floración temprana) del desarrollo de la alfalfa. Los efectos más notorios de la SFR fueron: a) el incremento del número de plantas MF en la población; b) la alta frecuencia de hojas MF dentro de las plantas MF; y c) la estabilidad en la expresión del carácter MF. Estos resultados indican la alta heredabilidad del carácter y concuerdan con un trabajo de Bingham y Murphy (1965), quienes generaron -luego de tres ciclos de SFR- una población multifoliolada que alcanzó un 85 % de plantas MF, fue comparado con el cultivar “Narragansett” (TF), llegando a la conclusión de la alta heredabilidad del carácter. Otra conclusión interesante del presente trabajo de tesis es que la SFR por alta expresión MF no modificó en la Pob C4 el nivel de resistencia a la antracnosis ni a los pulgones azul y moteado de la población original (C0).

Por otro lado, en el estudio de Ferguson y Murphy (1973) se comparó también el rendimiento de forraje en plantas espaciadas de las 21 poblaciones MF generadas respecto de cuatro cultivares trifoliolados (TF), concluyendo que fue igual o levemente menor en las primeras. Coincidentemente, en el presente trabajo de tesis, en condiciones de planta individual, se observó menor rendimiento de forraje en la población C3 (tercer ciclo de selección) respecto de la C0. Sin embargo, en el ensayo bajo condiciones de cultivo denso, casi no se detectaron diferencias ($p > 0,05$) entre los ciclos de selección y los testigos evaluados, si bien en valores absolutos las producciones más bajas de biomasa aérea correspondieron a los ciclos más avanzados de selección (C3 y C4). De todos modos, los rendimientos de materia seca obtenidos en el ensayo en cultivo denso fueron muy altos comparados con la producción histórica promedio de Manfredi. Otros autores (Twidwell y Thiex, 1992; Twidwell *et al.*, 2002), en evaluaciones hechas a campo y en cultivo denso,

no encontraron diferencias de producción y calidad forrajeras entre ocho cultivares TF y seis cultivares MF a lo largo de dos temporadas.

El número de tallos (T), evaluado tanto a campo como en planta individual, tuvo una evolución similar en todos los ambientes generados en este estudio (riego/secano y temporadas): mayores ($p < 0,05$) valores en C0 y C1, menor ($p < 0,05$) en C2 y menor aún ($p < 0,05$) en C3; es decir: $C0=C1 > C2 > C3$.

La relación entre altura de planta y carácter MF fue descrita por varios autores. Ferguson y Murphy (1973), observaron individuos MF con tallos más cortos que los testigos TF, a diferencia de Bingham y Murphy (1965) quienes señalaron que las plantas MF con las que trabajaron tenían tallos más largos que las TF. Brick *et al.* (1976), evaluando en planta espaciada cuatro genotipos MF seleccionados entre la progenie de una cruce entre una planta TF (cv Mesa-Sirsa) y otra que expresaba el carácter MF (cv Ladak-65), encontraron alturas similares entre individuos de ambos grupos poblacionales. Por su parte, Juan *et al.* (1993a) compararon la altura de plantas MF cultivadas individualmente en macetas que habían sido seleccionadas de cuatro cultivares, y sugirieron que las discrepancias de altura observadas se relacionaban más con el tipo de germoplasma utilizado que con un efecto directo del carácter MF sobre las características morfológicas del tallo. En el presente trabajo de tesis, para ambas temporadas de evaluación a planta individual, se observó que la altura de la población C0 (6,5 % de expresión MF) era mayor que de la C3, mientras que C1 y C2 presentaban alturas intermedias entre las dos primeras. En el ensayo en cultivo denso no hubo diferencias ($p < 0,05$) de altura entre ciclos de selección y testigos, aunque en valores absolutos C0 fue unos pocos cm más alta que C4.

Tampoco las referencias bibliográficas son concluyentes respecto de la relación entre el número de nudos (N) y MF, dado que tanto Bingham y Murphy (1965) como Ferguson y Murphy (1973) observaron que las plantas MF presentaron menos nudos por tallo que los cultivares TF en algunos ambientes, pero mayores valores de N en otros. En las evaluaciones a planta individual, bajo condiciones de secano en la temporada 2010/2011, se apreció una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, a que N disminuya con el avance de los ciclos de selección. Por el contrario, bajo condiciones de

riego no se observa ninguna tendencia de N respecto de los ciclos de selección. Esto último se vio reflejado al analizar ambas temporadas donde todas las Pob presentaron similar número de nudos. Esto mismo también se presentó tanto en las Pob como en los testigos del ensayo conducido a campo en cultivo denso.

La distancia entre nudos, medida a través de la variable DN, está estrechamente ligada a lo señalado previamente respecto de la evolución de las variables H y N a lo largo de los ciclos de selección. En ese contexto, si la población C3 presentó menor H pero similar N por tallo, en ambas temporadas de evaluación a planta individual, necesariamente la DN debe ser menor. Estos resultados se contraponen con los señalados por Bingham y Murphy (1965), quienes observaron mayores valores de DN en alfalfas MF comparadas con un testigo TF. Estudios posteriores de Ferguson y Murphy (1973), mostraron que no hay efectos consistentes en el rasgo MF en cuanto a la DN y que la diferencia de esta variable entre poblaciones MF y TF tenían un fuerte componente ambiental, con valores de DN en MF significativamente mayores o menores en función de la localidad donde se realizaron las evaluaciones. Bingham y Murphy (1965) y luego Brick *et al.* (1976) sugirieron que la condición MF no está asociada con un incremento en la DN.

Respecto del número de hojas por tallo, Sheaffer *et al.* (1995) concluyeron que las plantas MF que evaluaron en su estudio presentaron igual o menor cantidad de hojas que las plantas TF. En igual sentido, en esta tesis se observó una cantidad de hojas por tallo similar entre las poblaciones C0 y C3. En ese contexto, a igual número de hojas pero a mayor cantidad de folíolos por hoja, las plantas MF presentaron un mayor peso seco de hojas que las plantas TF. Contrariamente, en un trabajo pionero sobre el tema, Bauder (1938), trabajando en condiciones de invernáculo, informó que las plantas MF no mostraron un porcentaje significativamente mayor de hoja que los testigos TF.

La variable folíolos por hoja (FH) refleja tres componentes: % de plantas MF, % de hojas MF en plantas MF y número de FH. Ferguson y Murphy (1973), utilizando poblaciones con un rango de expresión MF de 55 % a 83 %, y bajo dos condiciones ambientales, propusieron que para incrementar FH se debería seleccionar por mayor frecuencia de nudos con hojas MF o bien por un aumento del número de FH en hojas MF.

Por otro lado, Volenec y Cherney (1990), desarrollaron poblaciones de alfalfa MF a través del aumento de la frecuencia de plantas con alto número de FH (5, 7 y 9) en plantas MF y encontraron que la selección por alto número de FH podía incrementar el área foliar; sin embargo, observaron también que un área foliar relativamente grande se podía obtener en plantas TF a través de la selección de folíolos de mayor tamaño. En ese contexto, sugirieron que la selección de plantas por mayor FH como único criterio de mejoramiento no necesariamente puede producir aumentos consistentes del área foliar, dado que el tamaño de esos folíolos puede ser menor al normal en plantas TF. Etzel *et al.* (1988), trabajando bajo condiciones controladas, observaron que selecciones MF promediaban los 4,1 a 7,3 FH y poseían mayor área foliar, una más rápida expansión del área foliar luego de la defoliación y menos tallos que fenotipos TF. Esta última característica es una determinante importante en el rendimiento de forraje a *stand* denso (Volenec *et al.*, 1987). El incremento del número de FH puede ser un método para modificar el área foliar por planta. En alfalfa esto puede ser logrado genéticamente a través del uso de características de hoja MF (Bauder, 1938). Futuros incrementos en el parámetro FH deberían realizarse incrementando, a través de la selección, la frecuencia de nudos con hojas MF con incremento de folíolos más grandes por hoja en hojas MF. Según Brick *et al.* (1975), la foliosidad en alfalfa es un importante factor en la calidad y maximización de la intercepción de la luz. Las hojas constituyen entre el 30 y 60% del forraje; plantas con áreas foliares grandes presentan alta tasa de fotosíntesis por planta y así tienden a tener mayor producción forrajera (Chatterton, 1976).

En el presente trabajo, el aumento de expresión MF fue proporcional al avance de los ciclos de selección. Las poblaciones C3 y C4 superaron el mínimo de 60 % de MF propuesto por Juan *et al.* (1993a) para que una población de alfalfa pueda ser considerada como de alta expresión MF. También se observó una mayor frecuencia de hojas MF entre las hojas primarias respecto de las axilares (datos no mostrados). Esto es coincidente con lo señalado por Juan *et al.* (1993a), quienes consignaron que el carácter MF se expresó en el 50 % de de las hojas primarias y sólo en el 27 % de las axilares.

La RHT se utiliza en gran medida como un indicador positivo de la calidad del forraje de alfalfa, debido a su estrecha relación con la digestibilidad y el consumo de

forraje (Kephart *et al.*, 1990; Lemaire y Allirand, 1993); obviamente, lo último surge de la mayor digestibilidad de las hojas respecto de la de los tallos (Albrecht *et al.*, 1987; Marten *et al.*, 1988). Además, una mayor RHT es una determinante importante de las concentraciones más altas de proteína no degradable ruminal (Tremblay *et al.*, 2002.). El aumento de RHT en C3 y C4 respecto de C0, en el ensayo a planta individual para ambas temporadas y también en cultivo denso durante la primera temporada de evaluación, es consistente con lo señalado por otros autores que compararon ese carácter entre poblaciones MF y cultivares TF (Bingham y Murphy, 1965; Ferguson y Murphy, 1973; Brick *et al.*, 1976; Etzel *et al.*, 1988, Volenec y Cherney, 1990; Juan *et al.*, 1993). Schonhorst *et al.* (1979) reportó que el germoplasma MF sin reposo AZMFA-1 tuvo mayor RHT que su cultivar parental TF Mesa-Sirsa, solamente durante el período frío de la temporada de crecimiento. Según Buxton (1988) y Djukic *et al.* (2004), la mayor RHT podría elevar la calidad forrajera de la alfalfa. Cuanto mayor sea la proporción de hojas en relación a la cantidad de tallo, mayor será el valor nutritivo de la planta. La mayoría de los programas de mejoramiento por calidad forrajera no seleccionan directamente por una mayor RHT. Volenec *et al.* (1987) concluyeron que la selección por alta producción de MS por tallo es un método efectivo para incrementar la producción de biomasa, pero en general, las plantas resultantes tienen menos digestibilidad y tallos más largos. La proporción relativa de las fracciones hoja y tallo está también influenciada por estadio de desarrollo de la planta. Sheaffer *et al.* (2000) observaron una caída en el contenido de PB y un incremento en el contenido de fibra a medida que avanzaba la madurez del cultivo, lo que también se relacionó con variaciones en la RHT. En función de todo lo anterior, puede inferirse que el incremento de RHT podría ser a expensas de un aumento de la fracción hojas o una disminución de la proporción de tallos (fracción más pesada). Esto último, si bien conllevaría una disminución de los rendimientos totales de MS, podría aumentar la producción de nutrientes totales por unidad de superficie. La valoración de la calidad de la alfalfa es usualmente basada en las relaciones entre digestibilidad, contenido proteico y estado fenológico del cultivo (Demarquilly 1966; Kalu y Fick 1983). Estas relaciones están indirectamente relacionadas con la RHT (Popovic *et al.*, 2001). Numerosos científicos estudiaron esta relación (Juan *et al.*, 1993a; Kratchunov y Naydenov, 1995; Julier *et al.*, 2000; Sheaffer *et al.*, 2000). La conclusión general fue que la RHT puede ser un valioso criterio en mejoramiento de alfalfa. Johnson *et al.* (1994) indicó que el entendimiento de la

relación entre calidad y características agronómicas puede asistir a los programas de mejoramiento.

Un gran número de factores ambientales influyen en la expresión RHT. Bula (1972) y Allirand *et al.* (1992) confirmaron el impacto de las condiciones ambientales en los cambios en la RHT, en el contenido de nutrientes y en la digestibilidad. Lemaire *et al.* (1994) utilizaron dos cultivares de alfalfa con diferente productividad y digestibilidad contrastante en evaluaciones a campo a cultivo denso. El cultivar no mejorado por mayor digestibilidad mostró que el decrecimiento de la RHT estuvo asociado a un incremento en la cantidad de biomasa. Los resultados mostraron que la frecuencia de distribución de la altura de tallos era la fuente de la diferencia de digestibilidad entre los dos genotipos. La altura del tallo de brotes individuales determina tanto la digestibilidad como su RHT. Por lo tanto, la altura del cultivo parece ser un buen parámetro de estimación de la digestibilidad del forraje.

De acuerdo a los valores del índice de expresión MF hallados, y según lo sugerido por Sheaffer *et al.* (1995), las poblaciones C1 y C2 se clasifican como de "baja" y "moderada" expresión del carácter MF, respectivamente; mientras que C3 y C4 se catalogan como de alta expresión.

En cuanto a los parámetros de calidad química, el contenido de PB tendió a aumentar con los ciclos de selección, tanto en planta individual como en cultivo denso. Esto sería consistente con el aumento de la RHT en las poblaciones C3 y C4. En este contexto, es oportuno mencionar que por lo general los cambios en la calidad de la alfalfa (PB, FDN e IVTDMS) se relacionan básicamente con los estados fenológicos o de desarrollo de la planta (Demarquilly, 1966; Kalu y Fick, 1983); no obstante, estos cambios también están indirectamente relacionados con la RHT (Juan *et al.*, 1993a; Kratchunov y Naydenov, 1995; Julier *et al.*, 2000; Sheaffer *et al.*, 2000). En consecuencia, Johnson *et al.* (1994) señalaron que una buena comprensión de las relaciones entre calidad y caracteres agronómicos sería útil para asistir a los programas de mejoramiento genético de especies forrajeras. En ese contexto, los cambios morfológicos (%MF, IMF y RHT) de las poblaciones C3 y C4 obtenidos en este trabajo, tuvieron su correlato en el aumento del

contenido de PB respecto de C0. Esto es coincidente con lo informado por Vassileva e Ilieva (1998), quienes al comparar cultivares MF con cultivares TF, observaron que los cultivares MF tenían menor rendimiento de MS pero más foliosidad y mayor contenido de PB que los TF. En otro trabajo, Petkova y Panayotova (2007) concluyeron que el cultivar MF que utilizaron tuvo menor producción forrajera que los testigos TF pero mayor RHT y % PB. Juan *et al.* (1993b), al evaluar el valor nutritivo relativo de alfalfas MF, de moderada expresión respecto de materiales TF, seleccionados por menor contenido de FDN y FDA (alfalfas “HQ”), no observaron ventajas de calidad de las primeras respecto de éstas últimas. De todos modos, y a pesar de algunas discrepancias en la bibliografía, los resultados del presente trabajo –así como de otros ya mencionados- sugieren que a través de la selección por alta expresión del carácter MF, se pueden obtener cambios importantes en la calidad nutritiva de la alfalfa.

El desarrollo de los entrenudos está acompañado por el desarrollo de un sistema vascular, lo que requiere tejidos altamente lignificados para soporte estructural y para la conducción de agua y minerales (Morrison *et al.*, 1994); esta lignificación atentaría contra la calidad forrajera. Por eso, Jewett y Barnes (1994) sugirieron que la variación genética de la calidad del forraje de alfalfa podría estar relacionada con la anatomía del tallo. Los resultados de este trabajo de tesis no fueron concluyentes en cuanto a las variaciones del contenido de FDN y/o de su fracción digestible (% FDN_{dig}) para diferenciar entre los ciclos de selección. En otras palabras: la disminución del contenido de fibra detergente neutro no fue suficiente como para incrementar significativamente la digestibilidad *in vitro* de la biomasa aérea (IVTDMS).

De acuerdo con Volenec *et al.* (1987), las poblaciones MF podrían tener una mayor IVTDMS de las poblaciones MF por su mayor contenido de la fracción hoja. Los resultados del presente trabajo de tesis indicaron que si bien en valores absolutos la IVTDMS tendió a aumentar en función del progreso en los ciclos de selección, tanto en planta individual como en cultivo denso, esas diferencias no alcanzaron ($p > 0,05$) la suficiente entidad como para atribuir ventajas a las poblaciones MF respecto de la TF original. Esto es coincidente con un trabajo de Volenec y Cherney (1990), en el que concluyeron que la IVTDMS de las poblaciones MF fue superior, aunque no

significativamente, con la de las poblaciones TF. Por otro lado, Yancheva *et al.* (2012), comparando en Bulgaria la calidad del forraje de dos variedades TF y tres poblaciones MF experimentales, encontraron que los genotipos multifoliolados presentaron en todos los cortes mayor contenido de PB y mayor digestibilidad *in vitro* de la MS que los TF.

Para el fitomejorador, a efectos de facilitar su tarea de selección, es importante disponer de información sobre la forma en que los caracteres con los que trabaja están correlacionados. En este trabajo, muchas de las variables evaluadas estuvieron correlacionadas de forma significativa, con valores de r moderados a altos.

Atendiendo a la matriz de correlaciones de este trabajo, la variable altura de planta (H) aparece como una de las más importantes para determinar el valor agronómico de las poblaciones. En primer lugar, H estuvo correlacionada positivamente con el rendimiento de forraje, resultado que es coincidente con lo informado por Popovic *et al.* (2001). También Marinova *et al.* (2004), comparando en Bulgaria dos variedades TF y cinco poblaciones de distinto grado de expresión MF, determinaron que la producción de MS se correlacionó positivamente con el número de tallos (N) ($r=0,54$) y con H ($r=0,92$), y que a su vez H se correlacionó negativamente ($r= -0,72$) con la expresión MF. En la presente tesis, H mostró correlaciones altas y positivas con N ($r=0,67$), distancia entre nudos (DN) ($r=0,53$) y número de hojas (NH) ($r=0,64$). Por el contrario, H exhibió una relación negativa, aunque moderada, con las variables asociadas a la mutifoliosidad: $r= -0,33$ con expresión multifoliolada (%MF), $r=-0,29$ con número de folíolos por hoja (FH) y $r= -0,31$ con índice de expresión multifoliolada (IMF). Esto es coincidente con un trabajo de Marinova *et al.* (2004), quienes hallaron también que H se correlacionó negativamente ($r= -0,72$) con la expresión MF. En lo referido a parámetros de calidad evaluados en cultivo denso, se resaltó en esta tesis la correlación alta y negativa de H con la relación hoja/tallo (RHT) ($r=-0,64$), en particular con la del tercio superior (RHT1) ($r=-0,54$) y la total (RHTt) ($r=-0,75$). En líneas generales, esto es coincidente con lo informado por Vodraska (1990), Rotili (1992), Johnson *et al.*, (1994) y Julier y Huyghe (1997). También en cultivo denso, H se correlacionó significativa y positivamente con FDN ($r=0,76$). En resumen, puede decirse que en este trabajo, H se relacionó positivamente con producción biomasa aérea pero negativamente con calidad forrajera. A la misma conclusión arribaron Popovic *et al.* (2001). Por otro lado, el rendimiento de forraje y la RHT estuvieron asociados en forma

negativa, al igual que lo señalado por Hill *et al.* (1988) y Julier *et al.* (2000). Sin embargo, Annicchiarico (2007), si bien también detectó una relación negativa entre estas mismas variables, la estimó de una significancia más bien modesta que no obstaculizaría gravemente la selección simultánea de las dos variables.

En segundo lugar, con referencia a las variables que definen el objetivo de selección que tuvo esta tesis (>MF), FH y %MF no estuvieron significativamente correlacionados, lo que diferencia estos resultados de los informados por Etzel *et al.* (1988), Ferguson y Murphy (1973) y Brick *et al.* (1976), quienes determinaron correlaciones moderadas y positivas entre ambos. También Juan *et al.* (1993b), trabajando en condiciones de campo con dos cultivares TF y cuatro MF, estimaron que FH y %MF estaban altamente correlacionados ($r=0,84$); sin embargo, esta asociación tuvo sólo un peso relativo (<20 %) entre los componentes que explicaron la variación en la cantidad de hoja (% de hoja) de las plantas. En la presente tesis, las poblaciones con muy alta o muy baja expresión MF exhibieron los más altos y los más bajos % de hoja, respectivamente. No obstante, la proporción de hojas (expresada como RHT) no se relacionó con el contenido de PB. Esto último es difícil de explicar, dado que los ciclos avanzados de selección –en particular C3- alcanzaron mayores niveles de PB que la población original (C0). En igual sentido, Julier *et al.*, (2001), Popovic *et al.*, (2001) y Pei-Chun *et al.*, (2006), encontraron que la proporción de hojas y el contenido de PB estaban positivamente correlacionados. En general, la selección por una mayor RHT se considera como una forma de mejorar la calidad del forraje de las especies forrajeras. En el caso particular de la alfalfa, hay evidencia que avalan la mayor calidad de los genotipos MF sobre los TF (Petkova, 2010). En ese contexto, el grado de expresión de las diferencias entre los parámetros de calidad puede estar influenciado por una serie de factores, como la estructura genética del material de cría, el grado de reposo invernal, las condiciones ambientales y la forma de conducción de los ensayos. Las diferencias de correlación entre RHT y PB entre esta tesis y otros trabajos, podrían estar relacionadas con el tipo extremadamente sin reposo invernal (GRI 10) del material que se usó en el presente trabajo y con factores ambientales.

Otro aspecto a considerar cuando se compara el efecto de las hojas multifolioladas sobre la calidad de la alfalfa, es el grado de expresión que alcanza el carácter en los

materiales que se estudian. Twidwell *et al.* (2002) compararon la calidad forrajera de ocho cultivares TF y seis MF bajo condiciones de campo y en cultivo denso, concluyendo que no existió una gran diferencia entre ambos grupos; lamentablemente, el trabajo no hace mención precisa a la multifoliosidad de los materiales utilizados. Desde un punto comercial, se considera que un cultivar tiene alta expresión MF cuando $\geq 60\%$ de las plantas en la población tienen al menos una hoja MF. En esta tesis, como resultados del esquema de selección empleado, se consiguió que los últimos ciclos de selección (C3 y C4) tuvieran no sólo la mayoría de las plantas MF sino también que éstas tuvieran una alta cantidad de hojas MF (con valores promedio cercanos a los cinco folíolos por hoja). Evidentemente, la forma de contabilizar el carácter MF juega un rol muy importante en la determinación de las cualidades del material resultante.

El análisis molecular a través de los marcadores microsatélites (SSR) empleados en este estudio reveló un alto número de alelos presentes para la mayoría de los loci, lo que está en consonancia con lo observado por otros autores que trabajaron tanto con distintas accesiones de alfalfa como con especies asociadas al complejo *Medicago* (Diwan *et al.*, 1997; Mengoni *et al.*, 2000b; Riday *et al.*, 2003; Flajoulot *et al.*, 2005 y Bagavathiannan *et al.*, 2010).

Relacionado con lo anterior, los marcadores SSR también sirvieron para detectar en este trabajo una gran diversidad genética entre genotipos individuales, haciendo que la variación intrapoblacional fuera mucho más alta que la interpoblacional. Este mismo resultado es el que encontraron muchos otros autores, usando no sólo SSR sino también RFLPs y RAPDs (Brummer *et al.*, 1991; Crochemore *et al.*, 1996; Pupilli *et al.*, 1996; Gherardi *et al.*, 1998; Labombarda *et al.*, 2000; Mengoni *et al.*, 2000a;b; Morales Cortes y Crespo Martínez, 2000; Pupilli *et al.*, 2000; Flajoulot *et al.*, 2005; Zhi- Peng *et al.*, 2007; Noeparvar *et al.*, 2008; Bagavathiannan *et al.*, 2010; Tuck *et al.*, 2010 y Nagl *et al.*, 2011). En igual sentido se ubican los hallazgos de otros autores que estudiaron la diversidad genética dentro de poblaciones muy distintas de alfalfa (cultivadas y/o parientes silvestres de diversos orígenes) con conjuntos de microsatélites diferentes a los utilizados en este trabajo (Mengoni *et al.*, 2000b; Flajoulot *et al.*, 2005; Falahati-Anbaran *et al.*,

2007; Zhi-Peng *et al.*, 2007; Carelli *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Bagavathiannan *et al.*, 2010 y Petolescu *et al.*, 2010).

Según lo establecido por Tucak *et al.* (2008), si como consecuencia de la selección la heterocigosidad y la heterogeneidad de la población disminuyen, no sólo el vigor y la productividad podrían disminuir sino también su plasticidad para superar estreses bióticos o abióticos que no fueron considerados como un criterio de selección. En el caso de alfalfa, atendiendo a su extremada sensibilidad a la endocría, esta situación es aún peor. En efecto, la marcada depresión por endogamia que muestra la alfalfa tetraploide es sustancialmente mayor a la que se podría esperar basándose sólo en la disminución de la heterocigosidad (Veronesi *et al.*, 2010).

En este trabajo de tesis, sólo 1,3 % de la diversidad genética total fue entre poblaciones y 98,7 % dentro de poblaciones. Según Wright (1978), esto es indicativo de una muy baja diferenciación entre la población original (C0) y el cuarto ciclo de SFR (C4). En una situación similar, Bagavathiannan *et al.* (2010) estudiaron dos grupos de alfalfa: uno compuesto por poblaciones cultivadas y otro por poblaciones silvestres, observando que estas últimas provenían de zonas adyacentes a las primeras, de las cuales probablemente se habían originado. Basado en el análisis de microsatélites realizado para estimar la diversidad genética entre ambas poblaciones, los parámetros de diferenciación calculados por estos autores (H_E , F , D y F_{ST}) no fueron significativamente diferentes, lo que indicó ausencia de deriva genética; sin embargo, las diferencias fenotípicas entre los dos grupos fueron muy evidentes. Aunque no totalmente comparables, estos resultados son similares a los encontrados en esta tesis, ya que no hubo diferencias genéticas entre C0 y C4 pero sí apreciables diferencias fenotípicas para varios caracteres, como %MF, PB y RHT.

Tampoco se detectaron evidencias de desequilibrio de ligamiento (LD) entre C0 y C4. Esto último también es coincidente con lo encontrado por otros autores en circunstancias similares a las de este estudio (Herrmann *et al.*, 2010b; Sakiroglu *et al.*, 2012). Estos resultados son importantes, dado que es común provocar una deriva genética como consecuencia del trabajo de selección para generar la nueva población (C4). En este

contexto, y de acuerdo con Falke *et al.* (2007), era esperable que el LD temporal en la C0 disminuyera rápidamente con los ciclos sucesivos de recombinación.

La ausencia de LD en este estudio se puede atribuir al alto número de genotipos parentales que se utilizaron en cada ciclo de selección, lo que permitió conservar un adecuado grado de variabilidad en todo el proceso. Por otro lado, es probable que para la no detección de LD haya contribuido que, a pesar de la naturaleza poligénica de la característica MF, los SSR utilizados en este estudio no fueron suficientes para identificar regiones potenciales de asociación. Con un enfoque similar al usado en esta tesis, Falke *et al.* (2007) analizaron el comportamiento de microsatélites en el genoma de poblaciones de maíz F₂ dentro de un método modificado de selección recurrente de hermanos completos. A pesar de la alta respuesta obtenida a la selección, no encontraron un marcador alélico de fijación y el análisis de la deriva genética dio lugar a diferencias significativas para algunos loci. Sin embargo, cuando analizaron las frecuencias alélicas después de cuatro a siete ciclos de selección, encontraron variaciones positivas o negativas en todo el genoma, tanto en marcadores estrechamente vinculados a los QTL como en otras regiones sin asociación evidente con los rasgos agronómicos seleccionados. En el presente trabajo, analizando el perfil de amplificación para cada individuo (1, 2, 3 o 4 fragmentos), también se observaron pequeñas diferencias entre C0 y C4. Algunos individuos de C4 mostraron un perfil de amplificación con cuatro fragmentos, que estuvo ausente en todos los individuos de C0; por el contrario, hubo individuos de C4 con sólo un fragmento mientras que en C0 la combinación alélica incluyó dos o más (datos no mostrados).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

5.1 Hipótesis 1

"El carácter MF no implica un mayor rendimiento de forraje en MF aunque si una mayor calidad de forraje en comparación con cultivares TF; por ende, existe covariabilidad entre el índice de expresión MF (IMF) y la calidad de forraje en las poblaciones de alfalfa MF obtenidas por SFR utilizadas en este estudio".

Luego de tres (para algunas evaluaciones) y cuatro (para otras evaluaciones) ciclos de selección fenotípica recurrente (SFR), se logró incrementar la proporción de plantas con alta frecuencia de hojas multifolioladas (MF). Como una clara respuesta a la selección, no sólo se lograron valores de %MF moderados a altos, sino que también el carácter se mostró estable a lo largo de las temporadas y bajo las condiciones de humedad (secano/riego) generadas en este trabajo. La mayor MF se correlacionó con niveles más altos de calidad forrajera, expresados como relación hoja/tallo (RHT) y contenido de proteína bruta (%PB). Por el contrario, las poblaciones C3 y C4 tuvieron menor producción de biomasa aérea y menores valores de número de tallos (T), altura de planta (H) y número de hojas por planta (NH); sin embargo, es importante resaltar que las diferencias para estas últimas variables (T, H y NH) sólo fueron significativas para las evaluaciones en planta individual y no en cultivo denso. Atento a su condición de componentes de rendimiento, las variables T y H se correlacionaron positivamente con rendimiento de forraje. En las poblaciones C3 y C4, los altos valores de %MF, RHT y %PB estuvieron alta y positivamente correlacionados entre sí, pero sólo moderadamente con %IVTDMS. A su vez, el rendimiento de forraje y sus componentes se correlacionan negativamente con %MF, RHT y %PB. En valores absolutos, el contenido de fibra (FDN y %FDN_{dig}) aumentó y la digestibilidad (%IVTDMS) decreció desde C0 a C4, aunque sin alcanzar niveles de significancia estadística.

En resumen: el hecho de que a través de los objetivos planteados, las poblaciones C3 y C4 hayan alcanzado un mayor valor nutritivo en comparación con individuos TF de la población C0, permite aceptar la Hipótesis 1 de este estudio.

5.2 Hipótesis 2

"El proceso de SFR no modifica las características de resistencia presentes en la población original frente a antracnosis, pulgón azul y pulgón moteado de la población obtenida luego de 4 ciclos de selección".

El proceso de SFR no modificó las características sanitarias de la población resultante (C4). Es decir que los niveles de resistencia a la antracnosis y a los pulgones azul y moteado presentes en la población C0 se mantuvieron en la población C4. En consecuencia, habiendo alcanzado los objetivos planteados, se acepta la Hipótesis 2 planteada en este estudio.

5.3 Hipótesis 3

"La diversidad genética presente en la población original se mantuvo luego de cuatro ciclos de SFR por ende, no hay pérdida de variabilidad en el proceso de selección".

Los marcadores SSR empleados en este trabajo resultaron altamente polimórficos y determinaron un número similar de alelos por locus en cada población (C0 y C4). También los marcadores SSR fueron eficaces en revelar un alto grado de variabilidad genética intrapoblacional, tanto en C0 como en C4.

En sintonía con lo anterior, no se detectaron diferencias significativas en los índices de diversidad genética H_E y G_{ST} dentro y entre las poblaciones C0 y C4, lo que indica que la diversidad genética presente en C4 fue tan grande como la diversidad observada en C0.

La distancia genética entre ambas poblaciones no fue relevante y hubo ausencia de desequilibrio de ligamiento (LD). Esto demuestra que el proceso de selección, además de

efectivo, no incrementó la consanguinidad en C4 respecto de C0. Esto puede estar relacionado con el tamaño poblacional elegido durante el proceso de selección, que fue lo suficientemente grande como para evitar la deriva genética.

En síntesis: se obtuvieron dos poblaciones fenotípicamente divergentes (C0 y C4), pero sin ninguna reducción de la diversidad genética ni de diferenciación genética global evaluada a través de los objetivos planteados. En consecuencia, se acepta la Hipótesis 3 planteada.

5.4. Futuras líneas de investigación

Se sugiere que para futuros trabajos de desarrollo de poblaciones con alta expresión del carácter MF, los criterios de selección enfatizen la evaluación del carácter MF en floración temprana (estadio 5 de desarrollo fenológico), eligiendo aquellos individuos ubicados en las categorías 4 ó 5 de expresión multifoliolada. Dentro de éstos, a su vez, debería seleccionarse aquellos que presenten mayor altura y mayor número de tallos, ya que estos dos parámetros están altamente correlacionados con el rendimiento forrajero. No obstante, a fin de no perder calidad forrajera, la selección también debería enfatizar la conservación de genotipos con mayor RHT y mayor número de folíolos por hoja, y dentro de éstos a los que posean folíolos más grandes o sean de mayor área foliar.

En relación a las alfalfas MF, hay poca información disponible acerca del efecto de la densidad de siembra y el espaciamiento entre hileras sobre la producción de forraje y sus componentes (Lamb *et al.*, 2003). Esto significa una muy interesante oportunidad para generar estudios que evalúen estas variables de forma exhaustiva. Algunos ensayos preliminares realizados por Yancheva *et al.* (2008) sugieren para las alfalfas MF una densidad de siembra más baja que para alfalfas TF.

La población C4 generada en este trabajo es una firme candidata a ser inscrita como un nuevo cultivar comercial. En ese contexto, se hace necesaria su evaluación en otras localidades que representen los principales mega ambientes donde se utiliza la alfalfa. Estos ensayos de evaluación agronómica también podrían usarse para determinar el efecto

de la temperatura y del fotoperíodo existentes en otras regiones alfalferas sobre la expresión del carácter MF.

Pensando en la expansión del cultivo de alfalfa, sería interesante en un futuro incorporar al germoplasma MF la tolerancia a ambientes salinos o salino-sódicos, sea por técnicas de mejoramiento convencional o molecular. Esto permitiría contar con un producto de alta calidad en ambientes considerados marginales o poco aptos para la alfalfa.

La producción de semillas no es parte del valor agronómico del cultivo forrajero y usualmente no es tomada en cuenta como criterio de mejoramiento. Sin embargo, en la alfalfa –como en casi todas las especies forrajeras- es un requisito fundamental para el desarrollo comercial de un nuevo cultivar (Falcinelli, 2000). Dado que el potencial productivo de la población C4 no ha sido medido, sería deseable hacerlo en un futuro cercano y en las áreas apropiadas (ambientes áridos) donde se realiza la multiplicación comercial de semilla. Hay estudios publicados sobre varios de los aspectos que influyen en el rendimiento de semilla, como los componentes del rendimiento de semilla (Bolaños-Aguilar *et al.*, 2000), la variación genética para la fertilidad del polen (Viands *et al.*, 1988), la fertilidad del óvulo (Rosellini *et al.*, 1998) y la facilidad de desenlace del pistilo y estambres (Knapp y Teuber, 1994). Estos y otros caracteres, aunque no son fáciles de medir, podrían de alguna manera ser incluidos en las evaluaciones del germoplasma MF a fin de identificar los más convenientes para un eventual programa de selección.

Finalmente, y con el fin de identificar todas las regiones genómicas implicadas en la expresión MF, se podría realizar el genotipado de las poblaciones C3 y C4 con un número suficiente de marcadores –SSR y/u otras complementarios- que saturen gran parte del genoma. De este modo se podría establecer un sistema de selección asistida que haría más eficiente el trabajo de mejoramiento.

El listado anterior de futuras actividades a realizar con el germoplasma MF no intenta ser, en modo alguno, exhaustivo. Es muy probable que existan muchos otros temas que sean del interés de otros investigadores de distintas disciplinas y que serían igualmente válidos para el desarrollo de diversos estudios.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Albrecht K. A., Wedin W. F., Buxton D. R. 1987. Cell-wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves. *Crop Science* 27: 735-741.
- Allirand J.M., Gosse G., Lemaire G. 1992. Influence of temperature on lucerne dry matter and nitrogen distribution. En: Proc. of the X International Conference of the EUCARPIA *Medicago spp.* Group, Lodi (Italy), pp. 245-251.
- Alvarez C., Severina I. 2014. Información meteorológica mensual de la E.E.A. Manfredi. Publicado en internet, disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/informacion-meteorologica-mensual-de-la-e.e.a.-manfredi>. Activo febrero 2015.
- Annicchiarico P. 2007. Inter- and intra-population genetic variation for leaf:stem ratio in landraces and varieties of lucerne. *Grass and Forage Science* 62: 100-103.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, USA, pp. 770-771.
- Aragón, J.; Imwinkelried, J. M. 2007. Manejo integrado de plagas de la alfalfa. En: Basigalup D. H. (Ed.). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Ediciones INTA, Buenos Aires (AR), pp. 165-198.
- Ashraf M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora*, 199: 361-376.
- Azizi M. R. 1980. Inheritance of the multifoliolate trait in tetraploid alfalfa, *Medicago sativa* L. Ph.D. Thesis. Graduate College. University of Arizona. p. 41.
- Bagavathiannan M. V., Julier B., Barre P., Gulden R. H., Van Acker R. C. 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.
- Baltensperger D. D., Wofford D. S., Anderson W. H. 1991. Registration of FL-ML White Clover Germplasm. *Crop Science* 31: 853.
- Balzarini M., Bruno C., Arroyo A. 2005. Análisis de ensayos agrícolas multiambientales. Ejemplos en Info-Gen. Brujas. Córdoba, Argentina. 141 pp.
- Balzarini M. G., Di Rienzo J. A. 2011. InfoGen, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Publicado en internet, disponible en: <http://www.info-gen.com.ar>. Activo febrero 2015.

- Bariggi C., Romero N. 1986. Crecimiento de la alfalfa y utilización en la Región Pampeana. En: Bariggi, C., Itria, C.D., Marble V.L., Brun J.M. (ed). Investigación, tecnología y producción de alfalfa. INTA, Buenos Aires, Colección Científica, Tomo XXII, Cap. V., pp. 119-159.
- Barnes D. K., Hanson C. H. 1967. An illustrated summary of genetic traits in tetraploid and diploid alfalfa. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture U.S. Government Printing Office, Washington, DC. Technical Bulletin No. 1370. pp. 39.
- Barnes D. K., Ostazeski S. A., Schillinger J. A., Hanson C. H. 1969. Effect of anthracnose infection on yield, stand, and vigor of alfalfa. *Crop Science* 9 (3): 344-346.
- Barnes D. K., Bingham E. T., Murphy R. P., Hunt O. J., Beard D. F., Skrdla W. H., Teuber L. R. 1977. Alfalfa germplasm in the United States: Genetic vulnerability, use, improvement, and maintenance. USDA-ARS Tech. Bull. 1571. Washington, DC.
- Basigalup D. H., Castell C. V., Giaveno C. D. 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 & Breeding* 57(1): 31-38.
- Basigalup D. H. 2007. Mejoramiento genético y desarrollo de variedades. En: Basigalup, D.H. (ed). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Ediciones INTA. pp. 81.
- Basigalup D. H., Rossanigo R., Ballario M. V. 2007. Panorama actual de la alfalfa en la Argentina. En: Basigalup, D.H. (ed). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Ediciones INTA. pp. 13-25.
- Basigalup D. H. 2014. Situación de la alfalfa en Argentina. 5° Jornada Nacional de Forrajes Conservados. Ediciones INTA. pp. 95-99.
- Bassam B. J., Caetano-Anollés G., Gresshoff P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80-83.
- Bataillon T. M., David J. L., Schoen D. J. 1996. Neutral genetic markers and conservation genetics: simulated germplasm collections. *Genetics* 144: 409-417.
- 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., Murphy, R. P. 1973. Comparison of trifoliolate and multifoliolate phenotypes of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Crop Science* 13: 463-465.
- Berberet R. C., Caddel J. L., Zarrabi A. A. 1991a. Blue alfalfa aphid resistance. Standard tests to characterize alfalfa cultivars. NAAIC. Publicado en internet, disponible en: <http://www.naaic.org>. Activo febrero 2015.

- Berberet R. C., Caddel J. L., Zarrabi A. A. 1991b. Spotted alfalfa aphid resistance. Standard tests to characterize alfalfa cultivars. NAAIC. Publicado en internet, disponible en: <http://www.naaic.org>. Activo febrero 2015.
- Berg B. P., Majak W., Mc Allister T. A., Hall J.W., Mc Cartney D., Coulman B. E., Goplen B. P., Acharya B. P., Tait R. M., Chenh K. J. 2000. Bloat in cattle grazing alfalfa cultivars selected for a low initial rate of digestion: A review. *Can. J. Plant Sci.* 80: 493-502.
- Berger R. D. 1977. Application of epidemiological principles to achieve plant disease control. *Ann. Rev. Phytopathology.* 15: 165-183.
- Berger M. E., León R. S., Fenoglio H. F. 1985. Cambios en la concentración de elementos minerales en alfalfa (*Medicago sativa* L.) con el avance a madurez. *Revista Argentina de Producción Animal* Vol. 5: 149.
- Berger M. E., León R. S., Fenoglio H. F. 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: 423.
- Bertín O. 1999. Producción de alfalfa con y sin riego. *Revista Agromercado* N° 33. p. 52.
- Bingham E. T. 1964. A genetical and morphological investigation of multifoliolate leaves of alfalfa, *Medicago sativa* L. Ph.D. Thesis. Cornell University, Ithaca, New York. Univ. Microfilms, Ann Arbor, Mich. (Diss. Abstr.25: 3217).
- Bingham E. T., Murphy R. P. 1965. Breeding and morphological studies on multifoliolate selections of alfalfa *Medicago sativa* L. *Crop Science* 5: 233-235.
- Bingham E. T. 1966. Morphology and petiole vasculature of five heritable leaf forms in *Medicago sativa* L. *Bot. Gaz.* 127(4): 221- 225.
- Bingham E. T., Binek A. 1969. Hexaploid alfalfa, *Medicago sativa* L.: Origin, fertility and cytology. *Can. J. Genet. Cytol.* 11: 359-366.
- Blondon F., Marie D., Brown S., Kondorosi A. 1994. Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*, 37: 264-270.
- Boland G. J., Brochu L. D. 1989. *Colletotrichum destructivum* on alfalfa in Ontario and cultivar response to anthracnose. *Can. J. Plant Path.* 11: 303-307.
- Bolaños-Aguilar E. D., Huyghe C., Julier B., Ecalle C. 2000. Genetic variation for seed yield and its components in alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations. *Agronomie*, 20: 333-345.
- Borg H., Grimes D. W. 1986. Depth development of roots with time: an empirical description. *Trans. ASAE* 29: 194-196.

- Bresler E., Mc Neal B. L., Carter P. L. 1982. Saline and Sodic Soils: Principles, Dynamics, Modeling, 236 pp., Springer-Verlag, New York.
- Brewer M. M., Argüello N. V. 1980. Guía ilustrada de insectos comunes de Argentina. Tucumán (AR) Fund. Miguel Lillo. Miscelánea N° 67. p. 45-51.
- Brick M. A., Dobrenz A. K., Schonhorst M. H. 1975. Increasing the leaf area of alfalfa. Progressive agriculture in Arizona. 27 (2) p. 7-8.
- Brick M. A., Dobrenz A. K., Schonhorst M. H. 1976. Transmittance of the multifoliolate leaf characteristics into non-dormant alfalfa. Agron. J. 68:134-136.
- Brummer E. C., Kocher G., Bouton J. H. 1991. RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. Theoretical and Applied Genetics 83: 89-96.
- Brummer E. C. 1999. Capturing heterosis in forage crop cultivar development. Crop Science 39: 943-954.
- Bula R. J. 1972. Morphological characteristics of alfalfa plants grown at several temperaturas. Crop Science 12: 683-686.
- Bustillo E. 2007. Pasturas y Forrajes. Publicado en internet, disponible en: <http://www.pasturasyforrajes.com>. Activo febrero 2015.
- Bustillo E. 2012. Calidad del forraje de alfalfa. Publicado en internet, disponible en: <http://www.pasturasyforrajes.com>. Activo febrero 2015.
- Buxton D. R., Horstein J. S., Wedin W. F., Marten G. C. 1985. Forage quality in stratified canopies of alfalfa, birdsfoot trefoil, and red clover. Crop Science 25: 273-279.
- Buxton D. R. 1988. Quality potencial of alfalfa. En Alfalfa: The crop for today. Proc. 18th Natl. Alfalfa Symposium, St. Joseph, MO. pp. 9-20.
- Buxton D. R. 1996. Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. Animal Feed Science Technology 59: 37-49.
- Cangiano C. A. 1992. Alfalfa - Factores que afectan su producción y utilización. Boletín Técnico N° 107, INTA EEA Balcarce, 55 p.
- Cangiano C. A. 2001. Alfalfa la reina de las forrajeras. Publicado en internet, disponible en: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/forrajes/alfalfa/alfalfa2.htm>. Activo febrero 2015.

- Cangiano C. A. 2007. Crecimiento y manejo de la defoliación. En: El cultivo de la alfalfa en la Argentina. . Basigalup, D.H. (ed). Ediciones INTA. pp 251-254-256-257-259-260-265-266.
- Carelli M., Gnocchi G., Scotti C. 2009. Alfalfa germplasm from Sahara oasis: Characterization by means of bio-agronomic traits and SSR markers. *Plant Breed.* 128:271-277.
- Chatterton N. J., 1976. Photosynthesis of 22 alfalfa populations differing in resistance to diseases, insect pests and nematodes. *Crop Science* Vol. 16 p. 833.
- Chimicz J. 1988. Los sistemas de producción de leche en Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal.* 8. 2. Balcarce. AR. pp. 155-168.
- Collino D. J., Lopez A, Dardanelli J., Sereno R., Racca R. W. 1997. Effect of soil water availability on water use strategies and dry matter production by two alfalfa cultivars differing in winter dormancy. *Phyton* 61: 45-53.
- Collino, D. J., Dardanelli, J. L., De Luca, M. J., Racca, R. W. 2005. Temperature and water availability effects on radiation and water use efficiencies in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Aust. J. Exp. Agric.*45: 383-390.
- Collino D., De Luca M., Dardanelli J. 2007. Uso del agua y la radiación para producción de forraje. En: Basigalup, D. H. (ed). El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Ediciones INTA. pp. 50-53-59-60.
- Creste S., Tulmann Neto A., Figueira A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter.* 19: 299-306.
- Crochemore M. L., Huyghe C., Kerlan M. C., Durand F., Julier B. 1996. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. *Agronomie.* 16: 421-432.
- Croll W., Bayá Casal E., Saucedo M. Colombino A. 1993. Comportamiento de cultivares de alfalfa en pasturas consociadas a distintas densidades durante el año de implantación. 2. Vigor de plántulas. *Revista Argentina de Producción Animal* 13: 191-199.
- D'Attellis J. 2005. Alfalfa (*Medicago sativa* L) producción de semilla Tinogasto, Catamarca. Publicado en internet, disponible en: <http://www.produccion%20de%20Alfalfa.com>. Activo noviembre 2013
- Delaney R. H., Dobrenz A. K. 1974. Morphological and anatomical features of alfalfa leaves as related to CO₂ exchange. *Crop Science* 14: 444-447.
- Delfino M. A. 2003. Transmisión de virosis por áfidos en ornamentales. San Pedro, Buenos Aires (AR): INTA. EEA San Pedro. Boletín de floricultura Año 1 - N° 12.

3 p. Publicado en internet, disponible en:
http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/Bflori/012_bf.htm. Activo noviembre 2013

- Demarquilly C. 1966. Valeur alimentaire de la luzerne. Fourrages, 2: 2-33.
- Di Rienzo J. A., Guzmán A. W., Casanoves F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics, 7 (2): 129-142.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W. 2010. InfoStat, versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Diwan N., Bhagwat A. A., Bauchan G. R., Cregan P. B. 1997. Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. Genome 40: 887-895.
- Diwan N., Bouton J. H., Kochert G., Cregan P. B. 2000. Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. Theoretical and Applied Genetics 101: 165-172.
- Djukic D., Genier G., Acalte C., Petkova D. 2004. Agronomical characteristics of native and foreign alfalfa varieties and germplasms. En: D. Djukic et al. (Editors), Forage crops as a basis for cattle production improvement (Proceedings of 10th National Symposium for Forage crops), Cacak, Serbia and Montenegro, pp. 79-86
- Dobrenz A. K., Massengale M. A. 1966. Change in carbohydrates in alfalfa (*Medicago sativa* L.) roots during the period of floral initiation and seed development. Crop Science 6: 604-607.
- Dobrenz A. K., Schonhorst M. H., Thompson R. K. 1969. Yield and protein production of alfalfa cultivars. Prog. Agr. Arizona. 21(3): 4-5.
- Doorenboos J., Kassam A. 1979. Yield response to water. FAO Irrigation and drainage paper N° 33.
- Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.
- Dudley J., Hill R. (Jr), Hanson C. 1963. Effects of seven cycles of recurrent phenotypic selection on means and genetic variances of several characters in two pools of alfalfa germplasm. Crop Science 3: 543-546.
- Eames A. J. 1961. Morphology of the angiosperms. McGraw-Hill Book Co., New York. pp. 8-9.
- Eberhart S., Harrison M., Ogada F. 1967. A comprehensive breeding system. Der Zuchter 37: 169-174.

- Echenique V., Polci P., Lutz E. 2001. Presente y futuro de la biotecnología en especies forrajeras en sudamérica, especialmente en Argentina. Argenbio. <http://argenbio.org/index.php?action=biblioteca&opt=8> 27/11/2013
- Echeverría E., Moschetti C., Martínez E. 1995. Producción de semilla de alfalfa. En: Hijano, E., Navarro A. (ed) La alfalfa en la Argentina. INTA Enc. Agro de Cuyo, Manuales N° 11. Editar, San Juan, Argentina, pp. 210.
- Elgin J. H. (Jr), McMurtey III J. E., Hatman B. J., Thyr B. D., Sorensen E. L., Barnes D. K., Froshaiser F. I., Peaden R. N., Hill R. R. (Jr), Leath K. T. 1983. Use of strain crosses in the development of multiple pest resistant alfalfa with improved field performance. *Crop Science* 23: 57-64.
- Elgin J. H., Welty R. E., Gilchrist D. G. 1988. Breeding for disease and nematode resistance. En: A.A. Hanson, D.K. Barnes and R.R. Hill (ed) Alfalfa and alfalfa improvement, pp. 827-858. American Society Agronomy, Madison, WI.
- Elliot F. C., Johnson I. J., Schonhorst M. H. 1972. Breeding for forage yield and quality. En: Hanson, C.H. (ed.). Alfalfa Science and Technology. Amer. Sco. Agron., Madison, Wisconsin, pp. 319-333.
- Ellwood N. K., D' Souza L. G., Kamphuis T. I., Burgess R. M., Nair R. P., Oliver S. R. 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.
- Esquerré-Tugayé M. T., Mazau D., Barthe J. P., Lafitte C., Touzé A. 1992. Mechanisms of resistance to *Colletotrichum* species. En: Bailey, J. A. and M. J. Jeger (ed). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, pp: 121-133.
- Etzel M. G., Volenec, J. J., Vorst, J. J. 1988. Leaf morphology, shoot growth, and gas exchange of multifoliolate alfalfa phenotypes. *Crop Science* 28: 263-269.
- Eujayl, I., Sledge M., Wang L., May G., Chekhovskiy K., Zwonitzer J., Mian M. 2004. *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago spp.* *Theoretical and Applied Genetics* 108: 414-422.
- Falahati-Anbaran M., Habashi A., Esfahany M., Mohammadi S., Ghareyazie B. 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.
- Falcinelli M., Veronesi F. 1984. Variabilità genetica per caratteri di interesse agronomico entro un ž ecotipo umbero di erba medica. *Annali della Facoltà di Agraria, Università degli studi di Perugia*, 38: 317-329.

- Falcinelli M. 2000. Temperate forage seed production: Conventional and potential breeding strategies. Newsletter International Herbage Seed Production Research Group, 31: 7-15.
- Falconer D. S., Mackay T. F. C. 1996. Introduction to quantitative genetics. Ed 4. Longman Green, Harlow, Essex, UK. 480 pp.
- Falke K. C., Maurer H. P., Melchinger A. E., Piepho H. P., Flachenecker C., Frisch M. 2007. Linkage disequilibrium in two European F2 flint maize populations under modified recurrent full-sib selection Theoretical and Applied Genetics 115: 289–297
- Fehr W. R. 1972. Genetic control of leaflet number in soybeans (*Glycine max* L.). Crop Science 9: 221–224.
- Ferguson J. E., Murphy R. P. 1973. Comparison of trifoliolate and multifoliolate phenotypes of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Crop Science 13: 463-465.
- Fernández Valiela, M. V. 1978. Introducción a la fitopatología. 3° Ed. Colección Científica de INTA. Vol III: Hongos. Buenos Aires, Argentina.
- Ferreira M. Y., Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia, Brasil. pp. 38-56.
- Fick G. W., Holthausen R. S. 1975. Significance of parts other than blades and stems in leaf-stem separations of alfalfa herbage. Crop Science 15: 259-262.
- Fick G. W., Holt D. A., Lugg D. G. 1988. Environmental physiology and crop growth. En: A. A. Hanson, D. K. Barnes and R.R. Hill (ed) Alfalfa and alfalfa improvement. Agronomy Monograph N° 29, Chapter 5. ASA-CSSA-SSSA. Madison, USA. pp. 163-194.
- Fick G. W., Mueller S. C. 1989. Alfalfa: Quality, maturity, and mean stage of development. Cornell Univ. Inform. Bull. 217: 1-13.
- Flajoulot S., Ronfort J., Baudouin P., Barre P., Huguet T., Huyghe C., Julier B. 2005. Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. Theoretical and Applied Genetics 111: 1420-1429.
- 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.
- Ford J. L., Claydon R. B. 1996. Inheritance of multifoliolate leaves in white clover. Agronomy Society of New Zealand Special Publication No. 11. Grassland Research and Practice Series No. 6. pp. 167-170.

- Fulkerson R. S. 1973. Protein supplements from forage legumes. In Factsheet, Ontario Ministry of Agriculture and Food.
- Gherardi M., Mangin B., Goffinet B., Bonnet D., Huguet T. 1998. A method to measure genetic distance between allogamous populations of alfalfa (*Medicago sativa*) using RAPD molecular markers. Theoretical and Applied Genetics 96: 406-412.
- Gieco J., Moreno M. V., Basigalup D. 2007. Enfermedades de la alfalfa y abordaje molecular de la selección por resistencia. En: Basigalup, D. (ed). El cultivo de la alfalfa en la argentina. Ediciones INTA, pp. 455-456.
- González R. 2003. Familia Aphididae. Chile http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/gonzalezr03/03d.htm 23/11/2013
- Graham J., Kreitlow K., Faulkner L. 1972. Enfermedades. En: Hanson, C. H. (ed). Ciencia y tecnología de la alfalfa. Ed. Hemisferio Sur, pp. 605-639.
- Graham J., Devine T., Hanson C. 1976. Occurrence and interaction of three species of *Colletotrichum* in the mid-Atlantic United States. Phytopathology 66: 538-541.
- Graham J., Stuteville D., Frosheiser F., Erwin D. 1979. A compendium of alfalfa disease. Am. Phytopath. Soc. pp. 1-56.
- Grau C. R., Arny D. C., Hansen M. A., Caine D. T. 1984. Relationship between levels of anthracnose resistance and performance of alfalfa cultivars. University of Wisconsin-Madison. pp. 25.
- Griffin T. S., Cassida K. A. Hesterman O. B., Rust S. R. 1994. Alfalfa maturity and cultivar effects on chemical and in situ estimates of protein degradability. Crop Science 34: 1654-1661.
- Guines F., Julier B., Ecalle C., Huyghe C. 2003. Among and within-cultivar variability for histological traits of lucerne (*Medicago sativa* L.) stem. Euphytica 130: 293-301.
- Hanson C. H., Busbice T. H., Hill R. R. (Jr), Hunt O. J., Oakes A. J. 1972. Directed mas selection for developing multiple pest resistance and coserving germplasm of alfalfa. J. Environ. Quality 1: 106-111.
- He C., Xia Z. L., Campbell T. A., Bauchan G. R. 2009. Development and characterization of SSR markers and their use to assess genetic relationships among alfalfa germplasms. Crop Science 49: 2176-2186.
- Heichel G. H., Delaney R. H., Cralle H. T. 1988. Carbon assimilation, partitioning and utilization. En: Hanson A. A., Barnes D. K., Hill R. R. (eds) Alfalfa and alfalfa improvement, Chapter 6. Agronomy Monograph N° 29. ASA-CSSA-SSSA. Madison, USA. pp. 195-228.

- Hendry G. W. 1923. Alfalfa in history. J. Am. Soc. Agron., 15: 171–176.
- Herrmann D., Flajoulo, S., Julier B. 2010a. Sample size for diversity studies in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) based on codominantly coded SSR markers. Euphytica. 171: 441-446.
- Herrmann D., Barre P., Santoni S., Julier B. 2010b. Association of a constans-like gene to flowering and height in autotetraploid alfalfa. Theoretical and Applied Genetics 121: 865-876.
- Hijano E. H. 1985. Efecto de la antracnosis sobre los rendimientos y la persistencia de algunos cultivares de alfalfa. Revista Agronómica de Manfredi. Córdoba, Argentina. II (2): 5-21.
- Hijano E. H., Basigalup D. H. 1995. El cultivo de la alfalfa en la Argentina. En: La alfalfa en la Argentina. Hijano, E. H y A. Navarro (ed) INTA. pp. 12-18.
- Hijano E., Pérez Fernández J. 1995. Enfermedades de la alfalfa. En: Hijano, E. y A. Navarro (ed). La alfalfa en la Argentina. INTA Enc. Agro de Cuyo, Manuales N° 11. Editar, San Juan, Argentina, pp. 127-142.
- Hijano E., Navarro A. 2008. La Alfalfa en la Argentina. San Juan, Argentina, INTA, 287p.
- Hill R. R. (Jr), Haag W. L. 1974. Comparison of selection methods for autotetraploids. Theoretical. Crop Science 14: 587-590.
- Hill R. R., Shenk J. S., Barnes R. F 1988. Breeding for yield and quality. p. 809-825. In A. A. Hanson et al. (ed) Alfalfa and alfalfa improvement. Agron. Monogr. 29. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI.
- Hittle C. N., Miller D.A., Jacobs J.A. 1958. Leaf-stem ratios of five varieties of alfalfa at varying stages of maturity. 16th Alfalfa Improvement Conference. Ithaca, New York.
- Howarth R. E. 1988. Alfalfa and alfalfa improvement. Agronomy N°29. Cap.15.
- Huarte H. R., Benech R. L. 2003. Understanding mechanisms of reduce annual weed emergence in alfalfa. Weed Sci. 51: 876-885.
- Huset D. E., Schnebbe D. A., Kugler J. L., Peterson M. A. 1991. Registration of HQ alfalfa. Crop Science 31: 1699-1670.
- Huyghe C., Julier B., Bolaños-Aguilar E. D., Ecalle C., Hacquet J. 2001. En: Delgado, I. Lloveras, J. (eds.) Quality in lucerne and medics for animal production, Options Mediterraneennes. Serie A: Seminaires Mediterraneens (France) no. 45 / FAO, Rome (Italy). Animal Production and Health Div. pp. 37-40

- Ilieva A., Blajev V. 1998. Aminoacid content of multifoliolate and trifoliolate alfalfa. *Plant Science*, 35: 389-393.
- Imwinkelried J. M., Fava F. D., Trumper E. V. 2013. Pulgones (*Hemiptera:Aphidoidea*) de la alfalfa. Ediciones INTA, EEA Manfredi. 6 p.
- INRA 1978. Alimentation des ruminants. INRA Publication, Versailles.
- INRA 1981. Prévision de la valeur nutritive des aliments des ruminants. INRA Publication, Versailles.
- INRA 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins. INRA, Paris.
- INTA-FAO 1986. Investigación, tecnología y producción de alfalfa. Colección Científica INTA. p. 488.
- Irwin J. A. G. 1974. Crown rot of lucerne in Queensland caused by *Colletotrichum trifolii*. *Austr. J. Exp. Agric.* 14: 197-200.
- Itria C. 1969. La alfalfa en la R. Argentina. I: Factores que disminuyen el rendimiento y duración de los cultivos. II: Contribución a la bibliografía nacional sobre alfalfa. IDIA Supl. 21.
- Jahn E. B., Vidal A. V., Baez F., Soto P. O. 1993. Use of irrigated lucerne at different growth stages. II. Utilisation for milk production. Proceeding of the XVII International Grassland Congress. Palmerston North, New Zealand. 8-21 February 1993. p. 1506-1507.
- Jahn E. B., Soto P. O., Vidal A. V. 1998. Ensilaje de alfalfa de buena calidad. Informativo Agropecuario, Bioleche. Quilamapu, Chile. www.inia.cl. Publicado en internet, disponible en: <http://www.inia.cl>. Activo febrero 2015.
- Jaranowski J. K., Broda Z. 1978. Leaf mutants in diploid red clover (*Trifolium pratense* L.). *Theoretical Applied Genetics* 53: 97-103.
- Jarsun B., Bosnero H., Lovera E. 1987. Carta de suelos de la República Argentina. Hoja 3163-32 Oncativo. Plan Mapa de suelos (Ed.).
- Jenczewski E., Proserpi J. M., Ronfort J. 1999. Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (*Leguminosae*) based on allozyme markers and quantitative traits. *Am. J. Bot.* 86: 677-687.
- Jewett J. G., Barnes D. K. 1994. Inheritance and potential utility of alfalfa stem anatomy traits. En: Report of the Thirty Fourth North American Alfalfa Improvement Conference (NAAIC), University of Guelph, Ontario (Canada), 10-14 July, p. 134.

- Johnson J. L. S., Hansen J. L., Viands D. R. 1994. Relationships between agronomic and quality traits in alfalfa as influenced by breeding. En: 34 North American Alfalfa Improvement Conference, Ontario (Canada), 17 pp.
- Jones D., Hayward M. 1975. The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26:711-718.
- Juan N. A., Sheaffer C. C., Barnes D. K. 1993a. Temperature and photoperiod effects on multifoliolate expression and morphology of alfalfa. *Crop Science* 33:573-578.
- Juan N. A., Sheaffer C. C., Barnes D. K., Swanson D. R., Halgerson J. H. 1993b. Leaf and stem traits and herbage quality of multifoliolate alfalfa. *Agronomy Journal* 85(6): 1121-1127.
- Juan N. A., Romero L. A., Bruno O. A. 1995. Conservación del forraje de alfalfa. La alfalfa en la Argentina. INTA C.R. Cuyo, cap. 9, pp. 173-192.
- Julier B., Huyghe C. 1997. Genetic variation for digestibility and fiber contents in the *Medicago sativa* complex. En: Proc. of the XIIth EUCARPIA Meeting of the group *Medicago*, Brno (Czech Republic), pp. 74-76.
- Julier B., Huyghe C., Ecalte C. 2000. Within and among cultivar genetic variation in alfalfa: forage quality, morphology, and yield. *Crop Science* 40: 365-369.
- Julier B., Guines F., Ecalte C., Huyghe C. 2001. From description to explanation of variations in alfalfa digestibility. En: Delgado I. (ed.), Lloveras J. (ed.). Quality in lucerne and medics for animal production. Zaragoza: CIHEAM. p. 19-23 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens, n. 45).
- Julier B., Flajoulot S., Barre P., Cardinet G., Santoni S., Huguet T., Huyghe C. 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biol.* 3:9.
- Julier B. 2009. A program to calculate linkage disequilibrium between loci in autotetraploid species. *Molecular Ecology Resources.* 9: 746-748.
- Kalu B. A., Fick G. W. 1981. Quantifying morphological development of alfalfa for herbage quality. *Crop Science* 21: 267-271.
- Kalu B. A., Fick G. W. 1983. Morphological stage of development as predictor of alfalfa herbage quality. *Crop Science* 23: 1167-1172.
- Kehr W. R., Frosheiser F. I., Wilcoxson R. D., Barnes D. K. 1972. En: Hanson C. H. (ed.) Alfalfa science and technology. Amer. Soc. Agron. Madison, Wisconsin. pp. 335-354,

- Kephart K. D., Buxton D. R., Hill R. R. (Jr.). 1990. Digestibility and cell-wall components of alfalfa following selection for divergent herbage lignin concentration. *Crop Science* 30: 207-212.
- Kertikova D., Yancheva H. 2000. Variability of some traits in lucerne within one breeding cycle. *Genetics and Breeding*, 30: 67-72.
- Kidwell K., Hartweck M., Yandell S., Crump M., Brummer E., Moutray E., Osborn C. 1999. Forage yields of alfalfa populations derived from parents selected on the basis of molecular markers diversity. *Crop Science* 39: 223-227.
- Kilcher M. R., Heinrichs D. H. 1974. Contribution of stems and leaves to the yield and nutrient level of irrigated alfalfa at different stages of development. *Can. J. Plant Sci.* 54: 739-742.
- Kloster A., Zaniboni C. 2007. Manejo y utilización de pasturas de alfalfa en producción de carne. En: *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*. Basigalup, D. H. (Ed.) INTA. pp. 39-40.
- Knapp E. E., Teuber L. R. 1994. Selection progress for ease of floret tripping in alfalfa. *Crop Science* 34: 323-326.
- Knight W. E. 1969. Inheritance of multifoliolate leaves, glabrous leaves and petiolulate leaflet attachment in crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.). *Crop Science* 9: 232-235.
- Kratchunov I., Naydenov T. 1995. Estimation of lucerne forage quality by means of morphological and meteorological data. *European Journal of Agronomy*, 4(2): 263-267.
- Labombarda P., Pupilli F., Arcioni S. 2000. Optimal population size for RFLP-assisted cultivar identification in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agronomie*. 20: 233-240.
- Lamb J. F. S., Sheaffer C. C., Samac D. A. 2003. Population density and harvest maturity effects on leaf and stem yield in alfalfa. *Agron. J.* 95: 635-641.
- Leath K. T., Edwin D. C., Griffin G. D. 1988. Diseases and Nematodes. En: Hanson A.A. (ed). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Madison, Wisconsin, USA. American Society of Agronomy, Inc. Agronomy Monograph N° 29. Cap 21:621-670.
- Lemaire G., Allirand J. M. 1993. Relation entre croissance et qualité de la luzerne: Interaction génotype-mode d'exploitation. *Fourrages*, 134: 183-198.
- Lemaire G., Genir G., Lila M. 1994. Growth dynamics and digestibility for two genotypes of lucerne having different morphology. *Eucarpia*. FAO Meeting. Technical Series 36. Lusignan. p. 75-77.

- Li R., Volenec J. J., Joern B. C., Cunningham S. M. 1996. Seasonal changes in nonstructural carbohydrates, protein, and macronutrients in roots of alfalfa, red clover, sweetclover and birdsfoot trefoil. *Crop Science* 36: 617-623.
- López A., Dardanelli J., Collino D., Sereno R., Racca R. 1997. Necesidad de riego suplementario en alfalfa para corte. PRONALFA-INTA. 4pp.
- Marinova D., Petkova D., Yancheva C. 2004. Influence of expression of the multifoliolate trait on quantity and quality of lucerne (*M. sativa* L.) forage. Proceedings of the 20th General Meeting of the European Grassland Federation, Luzern, Switzerland. pp. 927-929.
- Marten G. C., Buxton D. R., Barnes R. F. 1988. Feeding value (forage quality). p. 463-492. En: Hanson et al. (ed) Alfalfa and alfalfa improvement. Agronomy monograph no. 29. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI
- Maureira-Butler I. J., Udall J. A., Osborn T. C. 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.
- McCoy T. J., Walker E. T. 1984 Cytology and cytogenetics of alfalfa. En: Alfalfa and alfalfa improvement. Agronomy Monograph 29 (ed. A.A. Hanson, D.K. Barnes and R.R. Hill), pp. 737-776. Madison, USA.
- Meirmans P. G., Van Tienderen P. H. 2013. The effects of inheritance in tetraploids on genetic diversity and population divergence. *Heredity*. 110: 131-137.
- Mengoni A., Ruggini C., Vendramin G. G., Bazzicalupo M. 2000a. Chloroplast microsatellite variations in tetraploid alfalfa. *Plant Breed.* 119: 509-512.
- Mengoni A., Gori A., Bazzicalupo M. 2000b. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breeding*. 119: 311-317.
- Menke K. H., Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28 pp. 7-55.
- Mokeyeva E. V. 1940. Biological-anatomical studies of alfalfa, *Medicago sativa* L. State Pub. House of Agr. Lit. Uzbek, S.S.R., Tashkent.
- Morales Cortes M. R., Crespo Martinez M. C. 2000. Variation of PGM and IDH isozymes for identification of alfalfa varieties. *Euphytica*. 112: 137-143.
- Morrison T. A., Kessler J. R., Buxton D. R. 1994. Maize internode elongation patterns. *Crop Science* 34: 1055-1060.

- Mueller S. C., Teuber L. R. 2007. Alfalfa growth and development. En: Summers C. G., Putnam D. H., (eds.), Irrigated alfalfa in desert zones. Chapter 3. University of California Agriculture and Natural Resources Publication 8289.
- Murphy R. P., Lowe C. C. 1966. Registration of Saranac alfalfa. *Crop Science* 6: 611.
- Muslera Pardo E. de, Ratera García C. 1984. La alfalfa. En: Praderas y forrajes. Ed. MundiPrensa. Madrid. España, pp. 625-694.
- Nagl N., Taski-Ajdukovic K., Barac G. 2011. Estimation of the genetic diversity in tetraploid alfalfa populations based on RAPD markers for breeding purposes. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 5449-5460.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Nat.* 106: 283-292.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70: 3321-3323.
- Nei M., Roychoudhury A. R. 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics.* 76: 379-390.
- Nei M. 1978. *Molecular evolutionary genetics.* Columbia University Press. New York, USA. 512 p.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics.* Columbia University Press, New York. 512 pp.
- Nelson C. J., Moser L. E. 1994. Plant factors affecting forage quality. En: G. C. Fahey, Jr. (ed) *Forage Quality, Evaluation and Utilization.* ASA-CSSA-SSA, Madison, WI, pp. 115-154.
- Noeparvar S., Valizadeh M., Monirifar H., Haghghi A., Darbani B. 2008. Genetic diversity among and within alfalfa populations native to Azarbaijan based on RAPD analysis. *J. Biol. Res.-Thessalon.* 10: 159-169.
- Nordkvist E., Åman P. 1986. Changes during growth in anatomical and chemical composition and in vitro degradability of lucerne. *J. Sci. Food Agricultural* 37: 1-7.
- O'Neill N. 1991. Anthracnose resistance. Standard tests to characterize alfalfa cultivars. NAAIC. Publicado en internet, disponible en: <http://www.naaic.org/stdtests/multifol.htm>. Activo febrero 2015.
- O'Neill N., Elgin J., Baker J. 1989. Characterization of induced resistance to anthracnose in alfalfa by races, isolates, and species of *Colletotrichum*. *Phytopathology* 79: 750-756.

- Orskov E. R., McDonald I. 1970. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci., Camb.* pp. 92: 499-503.
- Ortego J., Mier Durante M. 2003. *Acyrtosiphon* (A.) *loti* (Hemiptera: Aphididae) hallado sobre alfalfa en la Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent. (AR)* v.6 n° 1-2. 23/11/2013 Publicado en internet, disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0373-56802003000100004&lng=es&nrm=iso. Activo febrero 2015.
- Ostazeski, S. A., Barnes D. K., Hanson C. H. 1969. Laboratory selection of alfalfa for resistance to anthracnose, *Colletotrichum trifolii*. *Crop Science* 9: 351- 354.
- Pagliaricci H. R, Saroff A. C., Ohanian A. E. 1991. Densidad de plantas y producción de forraje de alfalfa con diferentes frecuencias de corte y descansos de otoño. *Revista Argentina de Producción Animal* 11: 285-293.
- Peadar R. N., Hunt O. J., Faulkner L. R., Griffin D. G., Jensen H. J., Stanford E. H. 1976. Registration of multiple-pest resistant alfalfa germplasm. *Crop Science* 16: 125.
- Pearce R. B., Carlson G. E., Barnes D. K., Hart R. H., Hanson C. H. 1969. Specific leaf weight and photosynthesis in alfalfa. *Crop Science* 9: 423-426.
- Pei-chun M., Lin M., Guo-fang Z., Chaoliu. 2006. Study on the productive performance of multifoliar alfalfa in Beijing. *Pratacultural*, 23: 19-22.
- Pertile V. C. 2003. La situación social y económica del pequeño productor aldonero en el Chaco a fines de los '90, su correlato con la ampliación de la frontera agropecuaria Chaqueña. Facultad de Humanidades de la Universidad Nacional del Nordeste.
- Pertile V. C. 2004. Ampliación de la frontera agropecuaria chaqueña. Facultad de Humanidades de la Universidad Nacional del Nordeste.
- Petkova D. 2003. Morphological and economical characteristic of multifoliolate alfalfa variety. *Plant Sci.* 40: 190-192.
- Petkova D., Marinova D. 2004. Relationship and variability between some important traits of lucerne. u: Timbrek T. (ur.) *Genetics, plant breeding and seed production, XXXIX Croatian symposium on agriculture*, pp. 259-260.
- Petkova D., Djukic D. 2007. Performance and stability of some agronomical traits of trifoliate and multifoliate alfalfa germ plasms. *A Periodical of scientific research on field and vegetable crops*, 44: 35-38.

- Petkova D., Panayotova G. 2007. Comparative study of trifoliolate and multifoliolate alfalfa (*Medicago sativa* L.) synthetic populations. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13: 221-224.
- Petkova D. 2010. Multifoliolate alfalfa line with 23-24 leaves on a leaf stalk. *Journal of Crop and Weed*. 6(1): 1-5.
- Petolescu C., Ciulca S., Lazar A., Schitea M., Badea E. M. 2010. Intra-Population genetic diversity in romanian alfalfa cultivars as revealed by SSR markers. *Romanian Biotechnological Letters*. Vol. 15 (2).
- Picca C., Devoto R. 2004. Participación del germoplasma INTA en el mercado de semilla de alfalfa. Buenos Aires (AR): INTA Gerencia de Vinculación Tecnológica. Publicado en internet, disponible en: <http://www.inta.gov.ar/uvt/info/alfalfa.pdf>. Activo febrero 2015.
- Popovic S., Stjepanovic M., Grljusic S., Cupic T., Tucak M. 2001. Protein and fiber contents in alfalfa leaves and stems. *Options Mediterraneennes Serie A, Seminaires Mediterraneens* (45): 215-218.
- Pordomingo A. J., Volpi Lagreca G., Orienti W., Welsh R. 2004. Evaluación del agregado de taninos en dietas de distinto nivel energético en vaquillonas para carne. *Revista Argentina de Producción Animal* 24(1): 67.
- Pupilli F., Businelli S., Paolocci F., Scotti C., Damiani F., Arcioni S. 1996. Extent of RFLP variability in tetraploid populations of alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breed*. 115: 106-112.
- Pupilli F., Labombarda P., Scotti C., Arcioni S. 2000. RFLP analysis allows for the identification of alfalfa ecotypes. *Plant Breed*. 119: 271-276.
- Quiros C. F., Bauchan G. R. 1988. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. En: Hanson, A. A., Barnes, D. K., Hill, R. R. (ed). *Alfalfa and alfalfa improvement*.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Publicado en internet, disponible en: <http://www.R-project.org/>. Activo febrero 2015.
- Racca R. W., Basigalup D., Brenzoni E., Collino D., Dardanelli J., Gonzalez N., Hansen N., Lopez E., Peticari A., Cuadrelli A., Rivero E. 1998. Cuantificación de la FBN en alfalfa y caracterización de los factores ambientales que la regulan. Proc. XIX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Maturín, Venezuela.
- Retzinger E. J. 1977. A physiological study of multifoliolate alfalfa (*Medicago sativa* L.). M.S. Thesis, University of Arizona, Tucson, Arizona.

- Reynolds J. H., Smith D. 1962. Trend of carbohydrates reserves in alfalfa, smooth brome grass, and timothy grown under various cutting schedules. *Crop Science* 2: 333-336.
- Reynolds J. H. 1971. Carbohydrate trends in alfalfa (*Medicago sativa* L.) roots under several forage harvest schedules. *Crop Science* 11: 103-106.
- Riday H., Brummer E. C., Campbell T. A., Luth D., Cazcarro P. M. 2003. Comparisons of genetic and morphological distance with heterosis between *Medicago sativa* subsp. *sativa* and subsp. *falcata*. *Euphytica*. 131: 37-45.
- Riday H., Brummer C. E. 2006. Persistence and yield stability of intersubspecific alfalfa hybrids. *Crop Sci.* 46: 1058-1063.
- Roberto Z. E., Viglizzo E. F. 1993. Análisis del impacto de los recursos forrajeros en agrosistemas de la pampa semiárida. *Revista Argentina de Producción Animal* 10: 47-54.
- Rodriguez J. A. 1986. Mejoramiento genético de la alfalfa. En: C. Bariggi, V. L. Marble, C. D. Itria y J. M. Brun (ed) *Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa*. INTA, Colección Científica, Bs. As., pp. 251-323.
- Rodriguez N., Spada M. del C. 2007. Morfología de la alfalfa. En: *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*. Basigalup, D. H. (Ed.) INTA. pp. 27-44.
- Romero N. A., Comerón E. A., Ustarroz E. 1995. Crecimiento y utilización de la alfalfa, En: Hijano E. H., Navarro A. (eds.) *La alfalfa en la Argentina* pp. 149-172.
- Romero L. A., Aronna M. S., Cuatrin A. L. 2002. Producción estacional de forraje y relación hoja-tallo de alfalfas multifoliadas. 25° Congreso Argentino de Prod. Ani. Publicado en internet, disponible en: http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/anuario2002/a2002_p3.htm. Activo febrero 2015.
- Romero L. A., Mattera J., Cuatrin, A. 2006. Efecto de la distancia y la densidad de siembra sobre la producción de material seco y la persistencia de la alfalfa. *Revista Argentina de Producción Animal* 26: 171-172.
- Rosellini D., Lorenzetti F., Bingham E. T. 1998. Quantitative ovule sterility in *Medicago sativa*. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 1289-1295.
- Rossanigo R. O., Spada M. del C., Bruno O. A. 1995. Evaluación de cultivares de alfalfa y panorama varietal. Ed. INTA. pp. 64-78.
- Rossanigo, R. O., Aragón J. R. 2003. Alfalfa. En: N. J. Latimori y A. M. Kloster (ed) *Invernada bovina en zonas mixtas*. INTA Marcos Juárez. Agro de Córdoba 12. Editorial Editar S.A., San Juan, Arg. Cap. I, pp. 6-53.

- Rotili P. 1992. Methods and procedures in variety constitutions. En: Proc. of the X International Conference of the EUCARPIA *Medicago* spp. Group, Lodi (Italy), pp. 499-508.
- Rotili P., Gnocchi G., Scotti C., Zannone L. 1999. Some aspects of breeding methodology in alfalfa. En: Proc. of The Alfalfa Genome Conference, Madison, WI, USA, Publicado en internet, disponible en: <http://www.naaic.org/TAG/TAGpapers/rotili/rotili.html>. Activo febrero 2015.
- Rumbaugh M. D., Caddel J. L., Rowe, D. E. 1988. Breeding and Quantitative Genetics. En: Hanson A. A., Barnes D. K., Hill R. R. (Jr) (eds.) Alfalfa and Alfalfa Improvement. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, USA, pp. 777-808.
- Sakiroglu M., Doyle J. J., Brummer E. C. 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., Sherman-Broyles S., Story A., Moore K. J., Doyle J. J., Brummer E. C. 2012. Patterns of linkage disequilibrium and association mapping in diploid alfalfa (*M. sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 125: 577-590.
- Sakiroglu M., Brummer E. C. 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.
- Sanderson M. A., Hornsteinand J. S., Wedin W. F. 1989. Alfalfa morphological stage and its relation to in situ digestibility of detergent fiber fractions of stems. Crop Science 29: 1315-1319.
- Schonhorst M. H., Dobrenz A. K., Thompson R. K., Brick M. 1979. Registration of AZMFAI non-dormant multifoliolate alfalfa germplasm. Crop Science 19: 750-751.
- Sheaffer C. C., McCaslin M., Volenec J. J., Cherney J. H., Johnson K. D., Woodward W. T., Viands D. R. 1995. Multifoliolate leaf expression. Standard tests to characterize alfalfa cultivars. NAAIC. Publicado en internet, disponible en: <http://www.naaic.org/stdtests/multifol.htm>. Activo febrero 2015.
- Sheaffer C. C., Martin N. P., Lamb J. F. S., Cuomo G. R., Jewett J. G., Quering S. R. 2000. Leaf and stem properties of alfalfa entries. Agronomy Journal, 92(4): 733-739.
- Sledge M., Ray I., Jiang G. 2005. An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 111: 980-992.

- Small E. 2011. Alfalfa and relatives: evolution and classification of *Medicago*. NRC Research Press, p. 727
- Sorensen E. L., Byers R. A., Horber E. K. 1988. Breeding for insect resistance. En: Hanson A. A., Barnes D. K., Hill R. R. (eds.) Alfalfa and alfalfa improvement, American Society Agronomy, Madison, WI. pp. 859-902.
- Soto P., Jahn E. 1993. Use of irrigated lucerne in different growth stages. Evaluation under cutting. Proceeding of the XVIII International Grassland Congress. Palmerston North, New Zealand. 8-21 February 1993. p. 869-870.
- Sparks D. L. 1996. Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical Methods. ASA, SSSA, CSSA, Madison, WI, USA. pp. 91-140.
- Stout D. G. 1998. Effect of high lucerne sowing rates on establishment year yield, stand persistence and forage quality. J Agron. & Crop Science 180: 39-43.
- Stovold G. E., Francis A. 1988. Incidence of *Colletotrichum trifolii* on lucerne in New South Wales, its host range and reaction of lucerne cultivars to inoculation. Aust. J. Exp. Agr. 28: 203- 210.
- Stuteville D. L. 1973. Pathogenic specialization in *Peronospora trifoliorum*. Abstract 0715 Second Int. Congress of Plant Pathology. Sept. 5-12, Univ. of Minnesota, St. Paul, MN, USA.
- Sule R. M., Albrecht K. A., Owens V. N. 2001. A simple method for estimating alfalfa fiber content in the field. En: XIX International Grassland Congress. Brazilian Society of Animal Husbandry, Sociedade Brasileira de Zootecnia, São Paulo, Brazil. CD.
- Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Fujimura M., Konodo M., Nunome T., Fukuoka H., Hirai M., Matsumoto S. 2004. Joint meeting of the 14th Crucifer Genetics Workshop and the 4th ISHS Symposium on Brassicas 2004, Chungnam National University Daejeon, Korea October 24-28, pp 143
- Ta T. C., Macdowall F. D., Faris, M. A. 1990. Utilization of carbon and nitrogenous reserves of alfalfa roots in supporting N₂ fixation and shoot regrowth. Plant y soil 127: 231-236.
- Tesfaye M., Silverstein K. A. T., Bucciarelli B., Samac D. A., Vance C. P. 2006. The affymetrix *Medicago* genechip array is applicable for transcript analysis of alfalfa (*Medicago sativa*). Funct. Plant Biol. 33: 783-788
- Tester M. Bacic A. 2005. Abiotic stress tolerance in grasses. To model plants to crop plants. Plant Physiol. 137: 791-793
- Tilley J. M. A., Terry R. A. 1963. A two stage technique for in vitro digestion of forage crops. Journal of the British Grassland Society, 18: 104-111.

- Tremblay G. F., Bélanger G., McRae K. B., Michaud R. 2002. Leaf and stem dry matter digestibility and ruminal undegradable proteins of alfalfa cultivars. *Can. J. Plant Sci.* 82: 383-393.
- Tucak M., Popovic S., Cupic T., Grljusic S., Bolaric S., Kozumplik V. 2008. Genetic diversity of alfalfa (*Medicago* spp.) estimated by molecular markers and morphological characters. *Period. Biol.* 110: 243-249.
- Tucak M., Popovic S., Cupic T., Grljusic S., Megli V., Jurkovic Z. 2010. Efficiency of phenotypic and DNA markers for a genetic diversity study of alfalfa. *Russian Journal of Genetics* 46(11): 1314-1319.
- Twamley B. E. 1974. Recurrent selection in forages. *Plant Breeding Abst.* 44: 613-616.
- Twidwell E. K., Thiex N. J. 1992. Forage yield and quality of multifoliate alfalfa. *Proc. S.D. Acad. Sci.*, Vol. 71.
- Twidwell E. K., Thiex N. J., Skogberg J. L. 2002. Forage yield and quality of multileaflet alfalfa. College of Agriculture & Biological Sciences. South Dakota. USDA. ExEx 8073. 4 pp.
- Tysdal H. M., Kiesselbach T. A., Westover H. L. 1942. Alfalfa breeding. *Univ. Of Nebraska, Agr. Exp. Stn. Res. Bull.* 124, 46 pp.
- Van Puyvelde K., Geert A. V., Triest L. 2010. ATetra, a new software program to analyse tetraploid microsatellite data: Comparison with Tetra and Tetrasat. *Molecular Ecology Resources.* 10: 331-334.
- Van Soest P. J. 1963. The use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for determination of the fiber and lignin. *J.A.O.A.C.*, 46: 829-835.
- Van Soest P. J., Robertson J. B., Lewis B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy. Sci.* 74: 3583-3897.
- Vasileva B., Ilieva A. 1998. Productivity of dry mass and quality of multifoliate and trifoliate lucerne varieties. *Plant Science*, 35: 716-719.
- Veronesi F., Brumers E. C., Huyghe C. 2010. Alfalfa. 395 - 437. En: Boller B., Posselt K., Veronesi F. (ed.) *Fodder Crops and Amenity Grasses. Series: Handbook of Plant Breeding, Vol. 5*, Springer, New York, USA.
- Viands D. R., Sun P., Barnes D. K. 1988. Pollination control: mechanical and sterility. En: A. A. Hanson, D. K. Barnes and R. R. Hill (Jr) (ed.) *Alfalfa and Alfalfa Improvement. ASACSSA-SSSA Agronomy Series 29*. Madison, WI, USA, pp. 931-960.

- Vodraska R. V. 1990. Preharvest prediction of forage quality in first cutting alfalfa. Report of the 32th North American Alfalfa Improvement Conference, Pasco (USA), 55 pp.
- Volenec J. J., Cherney J. H., Johnson. K. D. 1987. Yield components, plant morphology, and forage quality of Alfalfa as influenced by plant population. *Crop Science* 27 (2): 321-326.
- Volenec J. J., Cherney J. H. 1990. Yield components, morphology and forage quality of multifoliolate alfalfa phenotypes. *Crop Science* 30: 1234-1238.
- Vough L. R., Marten G. C. 1971. Influence of soil moisture and ambient temperature on yield and quality of alfalfa forage. *Agron. J.* 63: 40-42.
- Welty R. E., Mueller J. P. 1979. Occurrence of a highly virulent isolate of *Colletotrichum trifolii* on alfalfa in North Carolina. *Phytopathology* 69: 537.
- Welty R. E. 1982. Forage legume hosts of races 1 and 2 of *Colletotrichum trifolii*. *Plant disease* 66: 653- 655.
- Wilberger J. J. 1984. Tecnología disponible para mejorar la producción lechera en la región oeste de Buenos Aires y La Pampa. I simposio sobre la Integración Producción – Industria en la lechería Argentina. Santa Rosa La Pampa Arg. pp. 15-27.
- Willis J. H. 1999. Inbreeding load, average dominance and the mutation rate for mildly deleterious alleles in *Mimullus guttatus*. *Genetics* 153: 1885-1898.
- Wilsie C. P. 1966. Inbreeding depression and heterosis in *Medicago sativa*, selfing and slower forms of inbreeding. Jour. Paper N° J-5241 Iowa Agr. And Home Econom. Exp. Stn, Ames, Iowa. Project N° 1048. Proceedings of the X International Grassland Congress.
- Wright S. 1978. Evolution and the genetics of populations, Vol. IV. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Yancheva C., Sevov A., Popov N. 2008. Effects of seeding rate and row spacing on multifoliolate alfalfa forage yield. 53rd Georgikon Scientific Conference.
- Yancheva C., Petkov, D., Sevov A. 2012. Studies on quality of multifoliolate alfalfa. Series A. Agronomy, Vol. LV: 261-264.
- Zhi-Peng L., Gong-She L., Qing-Chuan Y. 2007. A novel statistical method for assessing SSR variation in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Genetics and Molecular Biology.* 30(2): 385-391.
- Zubizarreta J. 1992. Producción lechera en EE. UU. *Revista CREA* N° 156: 80-84.

CAPÍTULO 7

ANEXO

Tabla 1. Datos climáticos durante las temporadas de evaluaciones.

Año	Mes	T° Media	Humedad	Lluvias
		°C	% diario	mm
2010	Set	14,20	67,00	84,00
	Oct	15,60	68,00	45,00
	Nov	19,60	61,00	57,00
	Dic	23,40	58,00	42,00
2011	Ene	23,60	68,00	206,00
	Feb	20,80	82,00	106,00
	Mar	19,30	76,00	81,00
	Abr	17,30	69,00	70,00
	May	12,70	79,00	11,00
	Jun	8,30	85,00	31,00
	Jul	8,70	73,00	6,00
	Ago	9,00	67,00	2,00
	Set	15,00	53,00	32,00
	Oct	16,50	72,00	132,00
	Nov	21,40	66,00	190,00
	Dic	22,60	61,50	40,00
2012	Ene	23,90	65,50	77,00
	Feb	23,40	76,00	241,50
	Mar	20,20	75,50	63,00
	Abr	24,50	71,00	11,00
	May	22,60	72,00	19,00
	Jun	18,90	66,00	0,00
	Jul	17,10	58,00	0,00
	Ago	19,90	67,00	40,50
	Set	22,50	59,55	96,00
	Oct	23,80	76,75	171,00
	Nov	17,40	76,75	171,00
	Dic	22,00	65,20	100,00
2013	Ene	23,10	65,55	104,00
	Feb	23,40	69,05	157,00
	Mar	21,40	75,90	42,50

	Abr	18,00	75,35	91,00
	May	22,00	71,20	28,00
	Jun	21,60	66,05	0,00
	Jul	19,00	66,75	0,00
	Ago	22,00	52,90	0,00
	Set	23,40	55,75	0,00
	Oct	28,90	59,05	111,00
	Nov	29,00	53,05	114,50
	Dic	34,80	61,35	173,50
2014	Ene	24,80	68,00	94,00
	Feb	20,50	85,00	243,00
	Mar	18,00	80,00	119,00

Tabla 2. Medidas resumen (media \pm error estándar) de las variables evaluadas entre poblaciones y entre ambientes para la temporada 2010/2011.

Variables	A1				A2			
	C0	C1	C2	C3	C0	C1	C2	C3
Racum (kg parcela⁻¹)	3,83 \pm 0,36	3,42 \pm 0,41	3,25 \pm 0,29	2,30 \pm 0,14	5,22 \pm 0,33	4,37 \pm 0,02	4,77 \pm 0,11	3,82 \pm 0,63
T	54,58 \pm 4,74	57,62 \pm 3,41	46,25 \pm 1,48	42,29 \pm 2,03	48,70 \pm 4,87	51,40 \pm 1,08	50,00 \pm 0,62	45,27 \pm 3,54
H (cm)	49,43 \pm 0,27	46,67 \pm 1,80	44,77 \pm 2,03	39,55 \pm 1,74	53,05 \pm 0,06	48,22 \pm 0,14	49,98 \pm 0,14	47,92 \pm 2,26
N	10,66 \pm 0,28	10,65 \pm 0,35	10,01 \pm 0,53	9,75 \pm 0,51	11,33 \pm 0,03	9,91 \pm 0,08	11,11 \pm 0,42	11,64 \pm 0,12
DN (cm)	4,8 \pm 0,16	4,51 \pm 0,19	4,54 \pm 0,02	4,17 \pm 0,19	4,79 \pm 0,05	4,88 \pm 0,02	4,56 \pm 0,16	4,19 \pm 0,18
NH	52,79 \pm 2,01	54,35 \pm 2,29	54,41 \pm 4,23	49,27 \pm 2,05	52,67 \pm 0,52	49,92 \pm 1,14	59,48 \pm 0,21	55,1 \pm 0,75
FH	3,09 \pm 0,03	3,23 \pm 0,06	3,69 \pm 0,10	4,12 \pm 0,22	3,1 \pm 0,01	3,32 \pm 0,00	3,6 \pm 0,05	4,22 \pm 0,05
MF (%)	5,64 \pm 1,85	15,75 \pm 2,25	37,49 \pm 3,64	51,16 \pm 8,65	6,48 \pm 1,07	21,11 \pm 0,23	35,55 \pm 2,59	58,74 \pm 0,98
RHT	1,04 \pm 0,07	1,19 \pm 0,05	1,16 \pm 0,04	1,27 \pm 0,05	1,02 \pm 0,02	1,16 \pm 0,03	1,03 \pm 0,01	1,08 \pm 0,01
PB (%)	27,42 \pm 0,96	27,64 \pm 1,00	28,18 \pm 0,62	29,51 \pm 0,71	28,11 \pm 0,59	28,87 \pm 0,50	29,21 \pm 0,64	28,98 \pm 0,53
FDN (%)	40,07 \pm 0,57	40,30 \pm 0,43	40,84 \pm 0,53	39,13 \pm 0,37	40,86 \pm 0,52	39,1 \pm 0,39	38,03 \pm 0,40	38,68 \pm 0,70
IVTDMS (%)	79,15 \pm 0,57	79,38 \pm 0,70	78,58 \pm 0,62	79,86 \pm 0,52	79,44 \pm 0,63	81,2 \pm 0,68	80,32 \pm 1,51	81,57 \pm 0,79

Tabla 3. Resultado de comparaciones múltiples de la media de cada variable evaluadas para la temporada 2010-2011 entre las poblaciones en ambos ambientes.

Pob	C0	C1	C2	C3
Racum (kg parcela⁻¹)	4,34a	3,72b	3,70b	2,84c
T	51,64a	54,51a	48,12b	43,78b
H (cm)	51,24a	47,45b	47,37b	43,74c
N en A1	10,66a	10,65a	10,01a	9,75a
N en A2	11,33a	9,91b	11,11a	11,64a
DN (cm)	4,79a	4,70a	4,55a	4,18b
NH en A1	52,79a	54,35a	54,41a	49,27a
NH en A2	52,67c	49,92d	59,48a	55,10b
MF (%)	6,06d	18,43c	36,52b	54,95a
FH	3,09c	3,28c	3,65b	4,17a
RHT	1,03b	1,18a	1,09b	1,18a
IMF	0,49d	1,42c	2,22b	3,28a
PB (%)	26,60 b	28,25a	28,70a	29,25a
FDN (%) en A1	40,07a	40,30a	40,84a	39,13a
FDN (%) en A2	40,87a	39,10b	38,69b	38,03b
IVTDMS (%)	79,29a	80,29a	79,45a	80,72a

DGC. Medias en filas con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Tabla 4. Medidas resumen (media \pm error estándar) de las variables evaluadas entre poblaciones y entre ambientes para la temporada 2011/2012.

Variables	A1				A2			
	C0	C1	C2	C3	C0	C1	C2	C3
Racum (kg parcela⁻¹)	3,65 \pm 1,03	3,60 \pm 0,98	3,42 \pm 0,83	2,61 \pm 0,70	5,19 \pm 0,86	5,44 \pm 0,17	4,73 \pm 0,31	4,31 \pm 0,43
T	88,80 \pm 6,96	105,60 \pm 18,61	72,33 \pm 9,48	63,13 \pm 14,51	110,73 \pm 20,85	108,27 \pm 13,70	103,40 \pm 12,90	92,40 \pm 5,08
H (cm)	39,07 \pm 4,81	38,80 \pm 4,11	40,13 \pm 4,26	33,33 \pm 5,77	51,80 \pm 0,72	48,87 \pm 2,37	41,00 \pm 2,70	42,67 \pm 1,54
N	7,53 \pm 0,43	8,13 \pm 0,12	8,30 \pm 0,61	7,88 \pm 0,13	9,23 \pm 0,77	9,30 \pm 0,36	9,27 \pm 0,15	8,70 \pm 0,72
DN (cm)	5,15 \pm 0,37	4,76 \pm 0,44	4,81 \pm 0,22	4,25 \pm 0,78	5,69 \pm 0,50	5,25 \pm 0,13	4,42 \pm 0,23	4,96 \pm 0,36
NH	23,30 \pm 3,76	22,77 \pm 3,01	21,77 \pm 4,44	19,46 \pm 0,80	36,37 \pm 3,56	31,53 \pm 3,40	28,63 \pm 2,37	27,27 \pm 4,02
FH	3,10 \pm 0,05	3,18 \pm 0,05	3,85 \pm 0,20	4,94 \pm 0,51	3,03 \pm 0,03	3,38 \pm 0,25	3,72 \pm 0,18	4,73 \pm 0,10

MF (%)	4,91 ± 2,46	10,82 ± 1,07	50,47 ± 6,73	79,39 ± 10,89	2,52 ± 1,99	20,66 ± 12,72	35,55 ± 3,42	78,25 ± 5,55
RHT	1,37 ± 0,04	1,44 ± 0,02	1,48 ± 0,03	1,76 ± 0,09	1,26 ± 0,04	1,41 ± 0,08	1,69 ± 0,19	1,50 ± 0,04

Tabla 5. Resultado de comparaciones múltiples de la media de cada variable evaluadas para la temporada 2011-2012 entre las poblaciones en ambos ambientes.

Pob	C0	C1	C2	C3
Racum (kg parcela⁻¹)	4,42a	4,52a	4,08a	3,46 b
T	99,77a	106,93a	87,87 b	77,77 b
H (cm)	45,43a	43,83a	40,57 b	38 c
N	8,38a	8,72a	8,78a	8,29a
DN (cm)	5,42a	5,01 b	4,62 b	4,61 b
NH	29,83a	27,15a	25,20 b	23,36 b
MF (%)	3,72 c	15,74 c	43,01 b	78,82a
FH	3,06 c	3,28 c	3,79 b	4,84a
RHT	1,32 b	1,43 b	1,59a	1,63a
IMF	0,32 c	1,00 c	2,40 b	3,99a

DGC. Medias en filas con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Tabla 6. Producción de materia seca ha⁻¹ de cada una de las poblaciones y en cada uno de los cortes para la temporada 2012/2013.

Pob	Rep	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Racum
		kg MS ha ⁻¹						
C0	1	3533,17	1900,91	1726,31	1499,13	1344,34	711,68	10715,54
C3	1	2925,51	1650,93	1527,07	909,68	814,57	282,08	8109,84
C4	1	3330,81	1851,61	1712,97	1030,22	774,58	399,88	9100,08
CW1010	1	2369,60	1127,84	1502,45	948,48	1114,28	335,15	7397,79
Mireya	1	3166,49	1962,00	2132,93	1639,86	1655,67	987,24	11544,18
Ruano	1	2644,69	1478,40	1934,89	972,95	1142,24	481,01	8654,17
C0	2	3240,38	2691,78	2761,93	2283,95	2186,12	1301,24	14465,40
C3	2	3930,24	1783,04	2405,13	1432,70	960,18	543,89	11055,18
C4	2	3045,42	1569,46	2034,61	1498,72	1295,87	582,53	10026,60
CW1010	2	3066,80	1876,16	2337,17	1839,15	2172,99	841,46	12133,72
Mireya	2	3156,99	2368,37	2187,66	1628,42	1289,48	565,85	11196,78
Ruano	2	3176,60	2061,68	2037,39	1289,26	1112,74	505,57	10183,23
C0	3	3078,56	2293,01	1967,92	2740,50	2824,38	1554,56	14458,92

C3	3	3161,97	2605,13	2321,12	3545,09	2622,69	1368,58	15624,57
C4	3	2493,24	1794,14	1825,82	1619,30	1689,77	1293,53	10715,80
CW1010	3	3368,35	2378,48	2145,94	2568,06	2213,14	1203,99	13877,96
Mireya	3	3072,91	2281,03	1927,28	2921,20	2244,55	1211,23	13658,20
Ruano	3	2772,50	2104,91	2313,53	2966,82	3003,73	1425,24	14586,73

Referencias: Pob= poblaciones; R= rendimiento; Racum= rendimiento acumulado.

Tabla 7. Valor medio de alguna de las variables evaluadas para la temporada 2012/2013.

Pob	Rep	Racum	H	N	IMF	RTH1	RTH2	RTH3	RHTt
		kg MS ha ⁻¹	cm						
C0	1	10715,54	39,17	10,68	0,00	4,41	1,46	0,35	1,36
C3	1	8109,84	36,83	9,68	3,12	5,24	1,88	0,40	1,55
C4	1	9100,08	34,33	9,00	2,96	7,04	2,32	0,42	1,55
CW1010	1	7397,79	38,00	9,56	0,40	5,98	1,81	0,39	1,63
Mireya	1	11544,18	40,50	10,84	0,04	4,79	1,44	0,23	1,36
Ruano	1	8654,17	40,33	10,96	0,48	4,86	1,40	0,28	1,38
C0	2	14465,40	45,83	11,36	0,24	4,05	1,65	0,31	1,38
C3	2	11055,18	41,33	9,24	2,88	6,53	1,58	0,34	1,55
C4	2	10026,60	43,33	8,92	3,60	5,24	1,39	0,24	1,46
CW1010	2	12133,72	47,33	9,56	0,28	2,74	4,32	0,44	1,52
Mireya	2	11196,78	46,83	9,98	0,04	4,45	1,59	0,35	1,36
Ruano	2	10183,23	42,00	9,80	0,16	5,54	1,37	0,27	1,29
C0	3	14458,92	50,00	10,20	0,04	5,98	1,51	0,26	1,30
C3	3	15624,57	46,00	9,80	3,08	6,14	1,21	0,30	1,28
C4	3	10715,80	45,50	10,20	3,16	5,01	1,50	0,36	1,47
CW1010	3	13877,96	44,50	9,56	0,16	5,75	1,41	0,43	1,47
Mireya	3	13658,20	55,83	9,12	0,12	3,34	1,38	0,28	1,15
Ruano	3	14586,73	55,50	10,76	0,20	4,24	0,95	0,21	1,08

Referencias: Pob= poblaciones; Racum= rendimiento acumulado; H= altura de plata; N= número de nudos; IMF= índice de expresión multifoliolado; RHT1-2-3= relación hoja/tallo superior-medio-inferior, respectivamente; RHTt= relación hoja/tallo total.

Tabla 8. Resumen de variables evaluadas en las pob C0, C3 y C4 para la temporada 2012/2013.

Pob	Rep	Racum	H	N	IMF	RTH1	RTH2	RTH3	RHTt	PB	FDN	FDNdig	IVTDMS
		kg MS ha ⁻¹	cm							%	%	%	%
C0	1	10715,54	39,17	10,68	0,00	4,41	1,46	0,35	1,36	22,99	40,63	48,90	78,61
C3	1	8109,84	36,83	9,68	3,12	5,24	1,88	0,40	1,55	23,00	38,40	51,45	80,79
C4	1	9100,08	34,33	9,00	2,96	7,04	2,32	0,42	1,55	24,96	36,00	46,86	81,34
C0	2	14465,40	45,83	11,36	0,24	4,05	1,65	0,31	1,38	23,39	39,41	47,44	78,44
C3	2	11055,18	41,33	9,24	2,88	6,53	1,58	0,34	1,55	24,01	37,31	50,05	80,84
C4	2	10026,60	43,33	8,92	3,60	5,24	1,39	0,24	1,46	25,31	39,69	57,45	81,37
C0	3	14458,92	50,00	10,20	0,04	5,98	1,51	0,26	1,30	22,95	42,74	48,40	77,93
C3	3	15624,57	46,00	9,80	3,08	6,14	1,21	0,30	1,28	23,65	42,49	49,48	78,04
C4	3	10715,80	45,50	10,20	3,16	5,01	1,50	0,36	1,47	24,72	39,07	49,96	80,08

Referencias: Pob= poblaciones; Rep= repeticiones; Racum= rendimiento acumulado; H= altura de plata; N= número de nudos; IMF= índice de expresión multifoliolado; RHT1-2-3= relación hoja/tallo superior-medio-inferior, respectivamente; RHTt= relación hoja/tallo total; PB= proteína bruta; FDN= fibra detergente neutro; FDNdig= fibra detergente neutro digestible; IVTDMS= digestibilidad in vitro de la materia seca.