

CAPÍTULO 7

Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de alfalfa

Nancy G. Grandón,
María V. Moreno,
Gabriela Soto,
Pablo Sipowicz,
Margarita Stritzler,
Cecilia Pascuan
y Eva Mamaní

Introducción

Las diferentes herramientas biotecnológicas desarrolladas durante la última década complementan el mejoramiento convencional, reduciendo el tiempo de obtención de nuevos cultivares y aumentando la ganancia genética en estos. A partir de la década de 1980, el desarrollo de los marcadores moleculares había abierto las puertas para el estudio de la diversidad genética en colecciones de germoplasma y para el mapeo de QTLs (*Quantitative Traits Loci*) asociados a caracteres de interés agronómico. Por un lado, más recientemente, con el avance de las tecnologías de secuenciación de próxima generación o NGS (*Next-Generation Sequencing*) (Metzker, 2010) y el desarrollo de herramientas bioinformáticas, se ha podido secuenciar un genoma entero y descubrir una gran cantidad de marcadores con polimorfismo en nucleótidos individuales o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Posteriormente, la amplia variedad de plataformas de genotipado que se fueron desarrollando permitió generar una gran cantidad de datos en un gran número de loci y en grandes poblaciones. Esto permitió obtener una mayor cobertura genómica y aumentar la resolución de los mapas de ligamiento desarrollados a partir de ellos (Li *et al.*, 2014b; Zhang *et al.*, 2019). Por otro lado, los SNPs facilitaron el mapeo fino de QTLs y el estudio de asociación a genoma amplio (GWAS: *Genome-Wide Association Studies*), como así también su aplicación en otras estrategias como la selección asistida por marcadores (SAM) y la selección genómica (SG) (Li y Brummer, 2012).

No obstante, por un lado, si bien la implementación de la SAM permitió seleccionar individuos con marcadores asociados a QTLs de efecto mayor, la técnica no fue eficiente –al menos hasta el presente– para mejorar caracteres complejos. Una de las principales razones para esto es la dificultad de encontrar el mismo QTL en múltiples ambientes (interacción QTL x ambiente) y en diferentes fondos genéticos. Por otro lado, el desarrollo de modelos estadísticos para predecir la asociación entre los marcadores moleculares y los caracteres en estudio ha posibilitado la implementación de la selección genómica como estrategia de mejoramiento para la obtención de nuevas variedades en menor tiempo y con mejor comportamiento. Dicha estrategia permite la selección de individuos favorables basados en un valor de mejora estimado de los marcadores que mejor predicen el carácter en estudio (Cossa *et al.*, 2017).

Paralelamente, se han desarrollado otras herramientas que permiten generar variabilidad sin modificar el fondo genético. Entre ellas, la transgénesis permite introducir genes de otras especies en materiales elite, incorporando caracteres naturalmente inexistentes en las especies de interés. Además, la edición génica permite la generación de mutaciones puntuales y dirigidas a un lugar específico del genoma. Esto permite silenciar genes determinados que modifican la expresión de algunos caracteres que se quieren disminuir, como por ejemplo el contenido de lignina. Entre las principales ventajas de la edición génica se cuentan: a) al producir una modificación dirigida se conoce la ubicación del gen modificado; b) después de un ciclo de cruzamiento se elimina la maquinaria de edición; y c) sus productos no se regularían como un organismo transgénico, lo que evitaría el largo y costoso proceso de desregularización que se requiere para la comercialización de los eventos transgénicos.

El presente capítulo pretende no solo describir las más importantes herramientas biotecnológicas utilizadas en la actualidad para complementar al mejoramiento tradicional, sino también discutir brevemente sus aplicaciones en el desarrollo de cultivares de alfalfa.

Marcadores moleculares

Un marcador molecular es una secuencia de ADN con una ubicación específica, que presenta variabilidad detectable entre los individuos de una población segregante y herencia Mendeliana. Asimismo, dicha secuencia puede pertenecer a regiones codificantes o no codificantes del genoma (Ferreira y Grattapaglia, 1996; Borém y Teixeira Caixeta, 2006; Teixeira Caixeta *et al.*, 2014).

Actualmente, existe gran cantidad de marcadores moleculares desarrollados y disponibles en bases públicas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sin embargo, dependiendo del objetivo del proyecto, la población de estudio y la disponibilidad de los marcadores para la especie en estudio, se debe elegir el tipo de marcador más adecuado para cumplir con dicho propósito. Las características deseadas en los marcadores moleculares son que sea altamente polimórfico, de herencia mendeliana, neutro, codominante y de detección temprana. En este sentido, a continuación, se detallan los marcadores más utilizados en alfalfa.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Los RFLP fueron los primeros marcadores desarrollados por Grodzicker *et al.* (1974) en virus. Posteriormente, Botstein *et al.* (1980) lo ajustaron en humanos y más tarde Beckmann y Soller (1983) y Burr *et al.* (1983) señalaron su aplicación en mejoramiento vegetal. Esta técnica se basa en la detección de fragmentos polimórficos generados por el corte con enzimas de restricción en sitios específicos del ADN. Luego, estos fragmentos son separados por electroforesis en geles de agarosa y detectados con sondas de ADNc radioactivas, complementarias a la secuencia blanco. A continuación, el patrón de ADN generado es transferido a una membrana de nitrocelulosa para exponerla a las sondas que hibridarán con el ADN. Por último, la visualización de los fragmentos se realiza por exposición de la membrana a una placa autorradiográfica.

Los RFLPs son altamente reproducibles, codominantes, multialélicos y neutros. Además, las sondas utilizadas son homólogas a secuencias únicas del genoma, detectando uno o pocos loci cada vez. La base genética del polimorfismo se debe a la presencia de mutaciones puntuales en los sitios de restricción o a inserciones, deleciones y otros rearrreglos cromosómicos que modifican la distancia entre los sitios de corte, generando variaciones en la longitud de los fragmentos obtenidos. Si bien esta técnica se utilizó ampliamente para el desarrollo de mapas de ligamiento (Brummer *et al.*, 1993; Kiss *et al.*, 1993) y análisis de variabilidad genética (Brummer *et al.*, 1991; Kidwell *et al.*, 1994), con el paso del tiempo y el desarrollo de marcadores más económicos, se la dejó de lado debido, principalmente, a su alto costo operativo y desarrollo laborioso, al uso de material radioactivo y a la falta de una biblioteca de sondas específicas.

RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs)

Esta técnica fue desarrollada simultáneamente por dos grupos independientes (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) y consiste en la utilización de un único cebador corto de 10 pb de secuencia arbitraria, que hibrida al azar en el genoma. Además, para que haya amplificación, dos secuencias de ADN complementarias al cebador arbitrario deben estar lo suficientemente adyacentes (a menos de 4000 pb) y en orientación opuesta. Puesto que las bajas temperaturas de hibridación generan varios fragmentos de secuencia desconocida, cada banda en

el gel es considerada como un locus RAPD. Así, la visualización de los fragmentos generados se realiza en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio o en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata.

El polimorfismo detectado se debe a la presencia o ausencia de fragmentos amplificados debido a mutaciones puntuales en el sitio de hibridación del cebador o a deleciones o inserciones entre dos sitios de apareamiento de aquel. Dado que no permite distinguir individuos homocigotas de heterocigotas, se dice que es un marcador dominante, ya que la presencia de la banda podría corresponder a un individuo homocigota dominante o a un heterocigota para ese locus. Además, la ausencia de banda en el gel se atribuye a la presencia de un genotipo homocigota recesivo.

Esta técnica requiere poca cantidad de ADN y debido a su amplia cobertura genómica es posible muestrear regiones de copia única o altamente repetitivas. Además, no usa sondas radioactivas y no requiere bibliotecas de sondas específicas. Sin embargo, presenta algunas dificultades como tener baja reproducibilidad y ser sensible a pequeñas variaciones en el protocolo que podrían llevar a resultados negativos. Además, debido a que solo detecta un alelo por locus, brinda bajo contenido de información polimórfica. En alfalfa existen diferentes trabajos sobre construcción de mapas de ligamiento (Kiss *et al.*, 1993; Echt *et al.*, 1994) y análisis de diversidad genética (Ghérardi *et al.*, 1998; Mengoni *et al.*, 2000) con este tipo de marcador.

AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism)

La técnica se basa en la amplificación de un subconjunto de fragmentos de restricción mediante una PCR selectiva (Vos *et al.*, 1995) y comprende las siguientes cuatro etapas:

a) Etapa de digestión enzimática: el ADN total se corta con dos enzimas de restricción por separado; primero, con una enzima de corte raro que reconoce sitios de restricción con 6 a 8 pb y otra de corte frecuente que reconoce sitios con 4 pb. Así, se generan tres tipos de fragmentos: grandes producidos por la enzima de corte raro, pequeños producidos por la enzima de corte frecuente e intermedios producidos por la combinación de ambas enzimas.

b) Etapa de ligación de adaptadores: en este paso, los fragmentos de ADN de doble cadena llamados “adaptadores” se ligan a los extremos de los fragmentos de restricción generados en la etapa anterior. Aquellos son secuencias cortas de 20 a 30 pb, con una secuencia principal seguida de una secuencia específica y complementaria al extremo cohesivo del fragmento generado, los cuales servirán de moldes en la siguiente etapa de amplificación.

c) Etapa de amplificación selectiva: la secuencia de los adaptadores y el sitio de restricción adyacente sirven como sitios de unión del cebador. Pero, no todos los fragmentos generados en el punto a) se amplificarán. Así, la selección de aquellos se realiza con cebadores específicos de secuencia arbitraria (20 a 25 pb) y complementaria al adaptador; con el agregado de 1 o 3 nucleótidos (nt) en el extremo 3'. A su vez, esta etapa cuenta de dos pasos. Primero, se realiza una amplificación selectiva de los fragmentos empleando cebadores con 1 nt arbitrario. Luego, el fragmento generado sirve de molde para los cebadores con 2 nt selectivos adicionales al anterior. En este caso, los cebadores llevan una marca radiactiva (P32) o fluorescente en el extremo 5'.

d) Etapa de análisis: si bien los tres fragmentos de restricción son amplificados, solamente los de tamaño intermedio se podrán resolver con claridad. En este caso, la separación de aquellos se puede realizar en geles de poliacrilamida y la visualización por autorradiografía o tinción con nitrato de plata pudiendo detectar entre 50 y 100 fragmentos. Además, la utilización de marcas fluorescentes permite su separación por electroforesis capilar en secuenciadores automáticos y la visualización de realiza mediante programas computacionales específicos para tal fin.

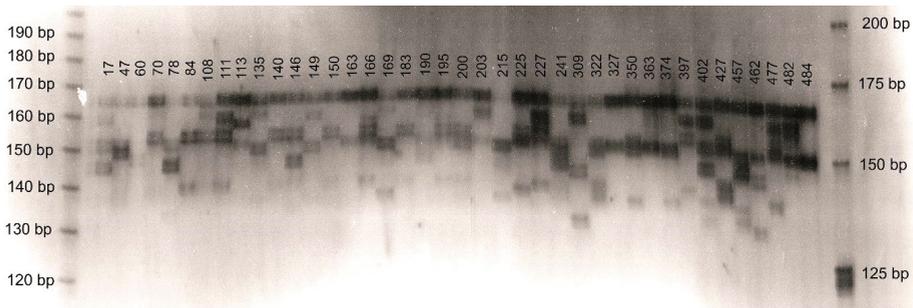
El polimorfismo detectado se debe a la presencia o ausencia de fragmentos amplificados de un tamaño determinado dado por mutaciones puntuales, inversiones, deleciones o inserciones que producen ganancia o pérdida de un sitio de restricción o la alteración de la secuencia reconocida por el cebador. Al igual que los RAPDs, los AFLPs se consideran marcadores dominantes de naturaleza binaria (presencia/ausencia). Además, se caracterizan por detectar un alto nivel de polimorfismo, debido a que exploran simultáneamente la presencia/ausencia de los sitios de restricción y la ocurrencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias. En cambio, a diferencia de los RAPDs, utilizan

cebadores más largos que aumentan la especificidad de la reacción de PCR. Asimismo, debido a la amplificación al azar, no necesita información previa de las secuencias del ADN, permitiendo realizar un muestreo amplio y simultáneo del genoma. A su vez, tienen la desventaja de ser una técnica relativamente laboriosa y costosa. Más aún, presentan un mayor número de etapas que la técnica RAPDs, necesitan mayor cantidad de reactivos y ADN de mejor calidad. No obstante, dado a su amplia cobertura genómica, se los ha utilizado en la construcción de mapas de ligamiento (Barcaccia *et al.*, 1999; Julier *et al.*, 2003), mapeo de QTLs (Musial *et al.*, 2007) y análisis de diversidad (Segovia-Lerma *et al.*, 2003).

Microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats)

Inicialmente, la técnica se desarrolló en humanos (Litt y Luty, 1989); años más tarde, Morgante y Olivieri (1993) la pusieron a punto en plantas. Dichos autores determinaron que los microsatélites se distribuyen con una frecuencia de uno por cada 50 mil pb y la unidad repetida más común es el dinucleótido AT. Es decir que, los SSR son secuencias hipervariables con arreglos de pequeñas secuencias de 1 a 6 pb de largo, repetidas en tándem y que se repiten de 10 a 100 veces. De este modo, cada microsatélite constituye un locus genético altamente variable y multialélico. Por lo tanto, cada segmento amplificado de tamaño diferente representa un alelo del mismo locus. Para amplificarlas se utilizan cebadores específicos de 20 a 30 pb complementarios a las secuencias que flanquean la región del microsatélite. Dichos fragmentos se resuelven en geles de poliacrilamida y se visualizan mediante tinción con nitrato de plata (Figura 1) o por electroforesis capilar mediante la utilización de cebadores fluorescentes.

El polimorfismo detectado se basa en la variabilidad del número de repetidos en tándem y, en consecuencia, del tamaño del microsatélite amplificado en los individuos de una especie (Martínez *et al.*, 2010). Por lo tanto, la base genética de dicho polimorfismo estaría dada por el deslizamiento de la ADN polimerasa que incorpora o elimina repetidos durante la replicación del ADN (*slippage*) o por un entrecruzamiento desigual entre cromosomas homólogos durante la meiosis, generando alelos con un número diferente de unidades (Litt y Luty, 1989).



■ **Figura 1.** Perfil molecular de 40 genotipos de alfalfa analizados con marcadores microsatélites en gel de poliacrilamida al 6 % (p/v); pb: pares de bases. Adaptado de Grandón *et al.* (2013).

Los SSR se caracterizan por tener alta reproducibilidad, buena cobertura genómica, herencia codominante, neutralidad y alto contenido de información polimórfica (PIC) (Varshney *et al.*, 2005). Dichas cualidades los hicieron ideales para mapeo genético en diferentes especies, así como también para estudios de diversidad y estructura poblacional (Flajoulot *et al.*, 2005; Sakiroglu *et al.*, 2010; Sakiroglu y Brummer, 2013). En alfalfa se han publicado diferentes mapas de ligamiento con base en SSR solamente (Sledge *et al.*, 2005; Mun *et al.*, 2006) o en conjunto con otros marcadores como RFLP (Diwan *et al.*, 2000) o AFLP (Julier *et al.*, 2003).

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

Es una variante de los microsatélites (Zietkiewicz *et al.*, 1994) y se basa en la amplificación de un fragmento de ADN localizado entre dos regiones microsatélites idénticas. Esta técnica utiliza la secuencia repetida como un único cebador (di- o trinucleótido) en la reacción de PCR con el adicional de cuatro nucleótidos en uno de sus extremos. Este tipo de marcador de secuencia arbitraria, que hibrida al azar, permite la amplificación simultánea de diferentes regiones del genoma. Sin embargo, su naturaleza dominante constituye una gran limitación en su uso. No obstante, se lo ha utilizado en alfalfa en análisis de diversidad (Touil *et al.*, 2008), mapeo de QTLs (Barcaccia *et al.*, 2000) y estructura poblacional (Xavier *et al.*, 2011).

SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions)

Estos son marcadores PCR alelo-específicos que provienen de marcadores AFLPs o RAPDs. Así que, cuando el marcador derivado proviene de un fragmento RAPD se denomina SCAR (Paran y Michelmore, 1993). Para ello, los productos RAPD amplificados se clonan, se secuencian y se diseñan cebadores específicos de 16 a 24 pb complementarios a los extremos del fragmento. En consecuencia, cada par de cebadores amplifican un único locus del mismo tamaño del fragmento RAPD. Por lo tanto, el polimorfismo estaría dado tanto por la presencia/ausencia de banda en el gel (marcador dominante) como por el polimorfismo de longitud del fragmento amplificado (marcador codominante), dado que pueden contener unidades repetitivas en su secuencia (Paran y Michelmore, 1993). Sin embargo, presentan un bajo nivel de polimorfismo entre variedades de una misma especie (trigo, soja, etc.), disminuyendo así la posibilidad de transformar marcadores dominantes en marcadores codominantes. No obstante, tienen alta reproducibilidad y son fácilmente transferibles a otros laboratorios. Además, por ser locus específicos se aplican muy bien a estudios de mapeo (Wang *et al.*, 2012) y diagnóstico de enfermedades en alfalfa (Larsen *et al.*, 2002).

CAPS (Cleavage Amplified Polymorphic Sequence)

En esta técnica, desarrollada por Konieczny y Ausubel (1993), un fragmento de ADN se amplifica por PCR con cebadores específicos de 20 a 25 pb, luego se digiere con enzimas de restricción y se resuelve por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La base del polimorfismo está dada por la presencia/ausencia de sitios de restricción en el fragmento amplificado; considerándolo como un marcador codominante. Si bien es necesario conocer la secuencia del fragmento genómico blanco para el diseño de los cebadores, se considera una técnica sencilla, fácilmente transferible y altamente reproducible. En este sentido, este tipo de marcador se ha aplicado predominantemente en mapeo genético tanto en alfalfa (Narasimhamoorthy *et al.*, 2007) como en *Medicago truncatula* (Schnabel *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2013).

SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

Por un lado, los polimorfismos de nucleótido simple son variaciones de punto que corresponden a la sustitución de una única base por otra o a la inserción/delección de una base (inDel), en una posición específica del genoma. Este tipo de polimorfismo corresponde a las variaciones genéticas naturales más frecuentes. En este sentido, se dice que son bialélicos, con una frecuencia de 1 cada 100-300 pb en genomas vegetales. Sin embargo, para que la variación se considere un SNP, debe tener 1 % de ocurrencia en la población. Los SNPs se pueden localizar tanto en regiones codificantes como no codificantes. Por lo tanto, las variaciones localizadas en las primeras presentan un 100 % de asociación con el carácter de interés, siendo útiles para su aplicación en Selección Asistida por Marcadores (SAM) (en inglés MAS: *Marker-Assisted Selection*). Por otro lado, dado que son estables evolutivamente, se los puede emplear fácilmente en estudios poblacionales y filogenéticos. Asimismo, por tener una tasa mutacional relativamente baja, son muy frecuentes en el genoma e importantes marcadores genotípicos.

La forma directa de detección e identificación de SNPs es por medio de la amplificación y secuenciación de fragmentos genómicos equivalentes de regiones genómicas específicas de ADN de diferentes individuos y comparando dichas secuencias para encontrar variaciones puntuales. Para ello se usan programas computacionales para alinear las secuencias amplificadas resultantes y así identificar polimorfismos. Otra forma de encontrar SNPs es por medio del análisis in silico de bancos de secuencias ESTs (*Expressed Sequence Tags*). No obstante, independientemente del método utilizado, una vez identificados los SNPs se deben validar experimentalmente en un pequeño grupo de genotipos diferentes. Dicha validación se puede realizar por medio de diferentes técnicas como, por ejemplo: microarreglos (Li *et al.*, 2014a), PCR en tiempo real, digestión con enzimas de restricción (marcadores CAPS) (Kamphuis *et al.*, 2008), análisis por curvas HMR (*High-Resolution Melting*) (Han *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2012), *genotyping-by-sequencing* (GBS) (Li *et al.*, 2014b) y por RAD-seq (*Restriction Associated DNA Sequencing*) (Zhang *et al.*, 2019), entre otros. Por último, una vez validados, se deben genotipar en toda la población de estudio, objeto del mejoramiento. Para ello, actualmente existe una amplia variedad de plataformas de genoti-

pado disponibles, tales como *GoldenGate* (Illumina), *Infinium* (Illumina) (Li *et al.*, 2014a), *SNPstream* (Beckman Coulter), *GeneChip* (Affymetrix), *Perlegen Wafers* y *Molecular Inversion Probe – MIP* (Affymetrix). Sin embargo, no existe un protocolo ideal y a la hora de elegir una de ellas se debe tener en cuenta una serie de factores, como por ejemplo la sensibilidad, la reproducibilidad, la exactitud y la capacidad de la técnica para el análisis a gran escala, además de su costo operativo y su flexibilidad para utilizarla en otras aplicaciones. Sus principales aplicaciones son la identificación de variantes SNPs asociadas a caracteres de interés, los estudios de diversidad a genoma amplio (Li *et al.*, 2014a), la construcción de mapas de alta resolución (Li *et al.*, 2014b; Zhang *et al.*, 2019) y la certificación de variedades, entre otros usos.

Aplicaciones de los marcadores moleculares

El desarrollo de los marcadores moleculares contribuyó al mejoramiento tradicional mediante diversas aplicaciones como la caracterización de germoplasma, el análisis de diversidad de colecciones y la identificación de variedades. La aplicación de esta tecnología permitió asociar marcadores a características de interés agronómico y seleccionar de manera indirecta características deseables en estadios tempranos del desarrollo. Esto permitió reducir el tiempo de obtención de nuevos cultivares a través del incremento de la eficiencia y la efectividad del proceso de selección.

En este sentido, se ha impulsado el desarrollo y la aplicación de los marcadores moleculares en el premejoramiento de alfalfa para realizar diferentes tipos de estudios. Todos ellos con la idea de caracterizar el material genético antes de introducirlo a un programa de mejoramiento e identificar las regiones genómicas asociadas a caracteres de interés agronómico. Estos estudios implican: análisis de diversidad (Bagavathiannan *et al.*, 2010; Herrmann *et al.*, 2010; Herrmann *et al.*, 2017), construcción de mapas de ligamiento genético (Kiss *et al.*, 1993; Diwan *et al.*, 2000; Julier *et al.*, 2003), mapeo de QTLs (Musial *et al.*, 2007; Narasimhamoorthy *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2015), estudios de estructuración poblacional (Sakiroglu *et al.*, 2010; Annicchiarico *et al.*, 2017) y de mapeo por asociación (Li *et al.*, 2011; Sakiroglu *et al.*, 2012), entre otros. Luego, en la etapa del mejoramiento propiamente dicho, los marcadores

identificados previamente mediante diferentes estrategias de mapeo y asociados a regiones genómicas que controlan dichas características son utilizados en la SAM. A continuación, se detallan algunas de las principales aplicaciones de los marcadores moleculares en alfalfa.

a-Análisis de diversidad

El estudio de la diversidad es el proceso por el cual la variación entre individuos, grupos o poblaciones es analizada por medio de un método específico o por la combinación de métodos (Gonzaga Pereira y Santana Pereira, 2006). Dicha variación puede ser morfológica, bioquímica (vía isoenzimas) o genética (vía técnicas moleculares), entre otras. Los datos así generados permiten obtener una mayor diferenciación de los individuos posibilitando a los mejoradores seleccionar aquellos genotipos superiores para la obtención de nuevas combinaciones génicas favorables y generar así poblaciones básicas de mejoramiento (Basbag *et al.*, 2017).

En este sentido, los marcadores moleculares permiten acceder a una gran cantidad de información sobre la diversidad genética y la relación filogenética presente en el germoplasma. Esto se debe a que la gran cantidad de marcadores disponibles en bases públicas posibilitan un muestreo amplio del genoma de interés a nivel de la secuencia del ADN. En alfalfa, existen diferentes estudios con marcadores moleculares para estimar la diversidad genética presente en las colecciones. Annicchiarico *et al.* (2017), usando marcadores SSR, estudiaron la diversidad genética en tres poblaciones de alfalfa –una italiana, una egipcia y una población EECM (germoplasma silvestre proveniente de Europa del Este, Canadá y España)– y concluyeron que la variación entre poblaciones resultó ocho veces menor que la variación promedio dentro de poblaciones (2,05 vs. 17,24). Barghi *et al.* (2016), empleando marcadores RAPD, también observaron esta situación cuando analizaron la diversidad genética entre y dentro de poblaciones de alfalfa de diferentes áreas de Irán. La combinación de los datos moleculares y los fenotípicos provee información adicional para el agrupamiento de genotipos o para la diagramación de cruzamientos dirigidos. Así, Annicchiarico *et al.* (2016) exploraron la diversidad entre once ecotipos (landraces) de *Medicago sativa* L. *subsp. sativa* representativos del norte de Italia mediante la utilización

de marcadores SNPs y SSRs y de caracteres morfofisiológicos. Si bien la combinación de caracteres fenotípicos y moleculares aumentó la probabilidad de discriminación entre las poblaciones, no detectaron correlación entre la diversidad morfofisiológica y la diversidad basada en SSRs ($r=0,04$); la correlación entre la variabilidad fenotípica y la de SNPs fue baja ($r=0,23$; $p<0,15$). Concluyeron que, si bien el criterio basado en marcadores SNPs resultó menos discriminante que la clasificación por caracteres morfofisiológicos, complementa la información obtenida con la caracterización morfológica. En otro trabajo, Herrmann *et al.* (2017) compararon los índices de diferenciación para caracteres morfológicos y marcadores moleculares entre cultivares de *M. sativa* provenientes del norte y del sur de Europa y concluyeron que, si bien los caracteres morfológicos separaron ambos grupos, los marcadores moleculares no generaron una diferenciación clara. Una posible explicación para esto último podría estar relacionada con el hecho de que los marcadores, al ser neutros en términos evolutivos, no estarían sometidos a la presión de selección que sí experimentarían los caracteres morfológicos. En el trabajo comentado, dicho efecto diferencial quedó demostrado por los distintos valores de los índices QST y FST, lo que indicaría que la selección habría efectivamente actuado sobre los caracteres morfológicos evaluados. En este sentido, independientemente de la falta de correlación entre caracteres morfológicos y marcadores moleculares, ambas caracterizaciones se complementan a la hora de clasificar y distinguir variedades dentro de un esquema de certificación de cultivares.

El análisis de diversidad también contribuye a enriquecer la base genética de las colecciones de germoplasma a través del planeamiento del muestreo, mantenimiento y manejo de un banco de germoplasma. Dicho análisis también puede ser utilizado en la conformación de colecciones núcleo (*core collections*), que constituyen una porción mínima representativa de toda la diversidad genética contenida en un banco de germoplasma. Así, por ejemplo, Basigalup *et al.* (1995) desarrollaron la primera core collection de alfalfa perenne del Sistema Nacional de Germoplasma de USDA-ARS. Esta colección comprende 200 entradas seleccionadas a partir de un análisis exhaustivo de 1100 accesiones recolectadas en 47 países y clasificadas en 18 grupos geográficos. La caracterización inicial se realizó con base en caracteres agronómicos, calidad forrajera, morfología de raíz y corona, tolerancia a estreses y

resistencia a enfermedades y plagas. Luego, mediante un análisis multivariado se seleccionaron las 200 entradas que representaban la mayor variabilidad de la colección original. A partir de aquí, dicha colección fue caracterizada por diferentes autores para estudiar la variación genética en la calidad del forraje (Jung *et al.*, 1997), analizar la diversidad de marcadores AFLP entre accesiones de alto rendimiento (Bhandari *et al.*, 2011) y determinar la estructura genética poblacional mediante marcadores SSR (İlhan *et al.*, 2016), entre otros.

b- Mapas de ligamiento genético

La amplia disponibilidad de marcadores moleculares ha permitido la construcción de varios mapas de ligamiento en alfalfa (Tabla 1), los cuales permiten la localización de regiones genómicas asociadas a características cualitativas y cuantitativas de importancia económica. Un mapa de ligamiento genético es una representación gráfica lineal del orden más probable de los marcadores, determinado a partir de la frecuencia de recombinación observada entre estos (Cervigni *et al.*, 2010). Para ello, se debe contar con una población segregante proveniente del cruzamiento de dos progenitores contrastantes fenotípicamente para el carácter en estudio que sea lo suficientemente grande como para aumentar la probabilidad de identificar individuos segregantes con la combinación génica deseada. Además, dichos parentales deben ser distantes genéticamente a fin de incrementar la probabilidad de detectar polimorfismos a nivel del ADN. Otra condición básica para el desarrollo de estos mapas es que los marcadores seleccionados presenten segregación mendeliana. De lo contrario, la distorsión en la segregación reduce el número de marcadores disponibles para el genotipado, afectando así el cálculo de la distancia entre marcadores y el orden de estos en el grupo de ligamiento.

La alfalfa cultivada es una especie autotetraploide, alógama y altamente heterocigota ($2n=4x=32$), características que han impedido la construcción de mapas de ligamiento de alta densidad mediante un sistema tradicional de marcadores moleculares. A diferencia de otras especies, en alfalfa existe la dificultad de obtener líneas puras debido a la depresión por endocria que experimenta con las sucesivas autofecundaciones. En este caso, se trabaja con poblaciones F_1 genéticamente

heterogéneas y con menor distorsión de segregación de marcadores que en una población F_2 . Por lo tanto, los marcadores segregan en diferentes proporciones dependiendo de la configuración de los progenitores. Así, es posible pre-seleccionar marcadores que amplifiquen en uno de los parentales, pero que estén ausentes en el otro y que a su vez presenten polimorfismo en la F_1 , obteniéndose así un mapa de ligamiento para cada parental. Los marcadores de este tipo se denominan alelos de dosis única (*SDA: single-dose allele*) y se aplican principalmente en microsatélites, donde no se puede estimar de forma sencilla la dosis de cada alelo. En esta metodología, los alelos presentes en copias únicas en la línea parental son computados individualmente con base en la presencia o ausencia en la progenie y las relaciones de ligamiento se establecen en cada cromosoma individual. Los grupos de ligamiento homólogos pueden luego ser combinados en grupos de ligamiento consenso (Diwan *et al.*, 2000; Julier *et al.*, 2003). Esta metodología ha posibilitado el mapeo eficiente de especies poliploides como la alfalfa (Brouwer y Osborn, 1999; Diwan *et al.*, 2000; Sledge *et al.*, 2005). Esta estrategia, conocida como *pseudo-testcross*, depende del nivel de heterocigosidad del individuo elegido para el mapeo, de la distancia genética entre los progenitores y de lo informativo del sistema de marcadores utilizados (Barcaccia *et al.*, 1999).

Por lo tanto, dada la complejidad de la herencia tetrasómica de la alfalfa, los primeros mapas de ligamiento se construyeron en especies diploides de *M. sativa L.* con $2n=2x=16$ (Tabla 1). Dos de estos mapas se desarrollaron en poblaciones F_2 , encontrando un alto porcentaje de marcadores con distorsión de segregación, 50 % en Kiss *et al.* (1993) y 48 % en Brummer *et al.* (1993). Por el contrario, en poblaciones F_1 o BC_1 , los porcentajes se redujeron a 5,2 % y 4 % en los mapas desarrollados por Barcaccia *et al.* (1999) y Brouwer y Osborn (1999), respectivamente. En este sentido, la distorsión de la segregación se define como el desvío de las frecuencias genotípicas observadas con respecto a la proporción esperada en una población segregante (Lu *et al.*, 2002). No obstante, Brouwer y Osborn (1999) fueron los primeros en desarrollar un mapa de ligamiento en alfalfa tetraploide ($2n=4x=32$) a partir de una población de retrocruza (*BC: backcross*) y mediante la metodología de *pseudo-testcross*. Más tarde, Diwan *et al.* (2000) lograron incorporar 10 SSR en el mapa de 108 RFLP desarrollado anteriormente por Brummer *et al.*

(1993), extendiendo la longitud total a 534,6 cM (Tabla 1). A continuación, los mapas desarrollados por Julier *et al.* (2003), Musial *et al.* (2005) y Sledge *et al.* (2005), en poblaciones F_1 y BC_1 de alfalfa tetraploide, lograron incorporar un número variable de marcadores y así aumentar la longitud total de los mapas anteriormente desarrollados. Más tarde, con el descubrimiento de los marcadores SNPs y el desarrollo de tecnologías de genotipado de alto caudal, fue posible desarrollar mapas de ligamiento de alta densidad de marcadores. Por un lado, en alfalfa, Li *et al.* (2014b) desarrollaron un mapa saturado con 3591 loci SDA, de los cuales 3555 SNPs fueron detectados por medio del genotipado por GBS. Por otro lado, Zhang *et al.* (2019) utilizaron la metodología RAD-seq para el genotipado y detección de variantes SNPs. Las ventajas que ofrecen estas nuevas plataformas de genotipado de alto caudal son el bajo costo operativo, el amplio número de variantes SNPs detectadas y la mayor resolución de los genomas. Todo esto aumenta la probabilidad de detectar QTLs asociados a caracteres de interés.

c- Mapeo de QTLs

Muchas de las características de importancia agronómica presentan una distribución continua de valores, es decir que, dentro de una población determinada no existe una clara distinción entre clases fenotípicas. Por lo tanto, la base genética de estas características estaría dada por la acción aditiva de muchos genes (Yule, 1902). Geldermann (1975) propuso denominar a estos loci controladores de características cuantitativas como QTLs.

Basado en su asociación con un marcador molecular, existen dos abordajes distintos que permiten determinar la ubicación de una región genómica (o QTL) responsable de un carácter de interés. Uno es la estrategia de mapeo biparental, que parte de una población segregante (F_2 , RILs, DH o BC), proveniente del cruzamiento de dos progenitores contrastantes para el carácter de interés (como se detalló en mapas de ligamiento). Luego del genotipado de dicha población y de la construcción del mapa de ligamiento, se procede a su fenotipado. Esta etapa es muy importante ya que de ella depende el éxito del mapeo. Para ello, dicha evaluación debe ser precisa y presentar un diseño experimental que permita encontrar diferencias significativas entre individuos.

■ **Tabla 1.** Características de los mapas de ligamiento en alfalfa diploide y tetraploide.

Referencia	Población de mapeo	Ploidía	Tamaño población	Marcador molecular	N.º Marcadores	Grupos de ligamiento	Longitud del mapa (cM)
Brummer <i>et al.</i> (1993)	F2	2x	86	RFLP	108	10	467,5
Kiss <i>et al.</i> (1993)	F2	2x	138	RFLP, RAPD, isoenzimas y marcadores morfológicos	89	8	659
Echt <i>et al.</i> (1994)	BC	2x	87	RFLP y RAPD	86/61	10/7	553/603
Tavoletti <i>et al.</i> (1996)	F1	2x	55	RFLP	50/55	10/8	234/603
Barcaccia <i>et al.</i> (1999)	F1	2x	-	RFLP, RAPD y AFLP	67	19	368,6
Diwan <i>et al.</i> (2000)	F2	2x	86	RFLP y SSR	118	6	534,6
Kaló <i>et al.</i> (2000)	F2	2x	137	RFLP, RAPD, isoenzimas y marcadores morfológicos	868	8	754
Brouwer y Osborn (1999)	BC	4x	101	RFLP	88	7	443
Julier <i>et al.</i> (2003)	F1	4x	168	AFLP y SSR	706	8/8	2649/3045
Musial <i>et al.</i> (2005)	BC	4x	120	RAPD, AFLP y SSR	155	18	2136,5
Sledge <i>et al.</i> (2005)	BC	4x	93	SSR	286	8	624
Li <i>et al.</i> (2014b)	F1	4x	384	SNP y SSR	1437/2154	32/32	2126/2133
Zhang <i>et al.</i> (2019)	F1	4x	149	SNP y SSR	3312/1153	32/32	4381/3455

Por último, se realiza el análisis de QTLs propiamente dicho, donde por medio de programas estadísticos se realiza la asociación genotipo x fenotipo. El otro abordaje, que se emplea en alfalfa debido a su naturaleza tetraploide, utiliza poblaciones F1 derivadas del cruzamiento de dos genotipos contrastantes para el carácter de interés (Tabla 1). No obstante,

debe considerarse que estas F_1 no representan la diversidad del QTL en una población completa de mejoramiento (Flint-García *et al.*, 2003). En consecuencia, dado que estas poblaciones poseen pocos eventos de recombinación, se limita también la resolución del mapeo de QTL. En contraste, el mapeo por asociación surge como un complemento de la estrategia anterior y consiste en utilizar eventos de recombinación históricos a lo largo de un linaje para establecer posibles asociaciones entre genotipo y fenotipo (Paniego *et al.*, 2010). Esta estrategia se focaliza en las asociaciones entre marcadores y caracteres en poblaciones no estructuradas o colecciones de germoplasma silvestre (Brescghello y Sorrells, 2006). En este sentido, la base para la detección de tales correlaciones se basa en la identificación de desequilibrio de ligamiento (DL), puesto que dos marcadores que presentan DL están asociados de manera no aleatoria a nivel físico; seguidamente, se evalúa estadísticamente la asociación de esos marcadores con el fenotipo de interés. Dado que las poblaciones naturales abarcan mayor diversidad genética y representan una acabada historia de recombinación dentro del cultivo en estudio, se logran identificar más QTLs con mapeo por asociación que con la primera estrategia (Li *et al.*, 2011; Sakiroglu *et al.*, 2012). En alfalfa se han identificado QTLs mayores asociados a diferentes caracteres relacionados con producción de forraje (Robins *et al.*, 2007a, 2007b; Li *et al.*, 2011), eficiencia en el uso del agua (EUA) (Julier *et al.*, 2010), nutrición con nitrógeno (Moreau *et al.*, 2012), persistencia (Robins *et al.*, 2008), resistencia a enfermedades (Musial *et al.*, 2005; Mackie *et al.*, 2007), resistencia a pulgón (Kamphuis *et al.*, 2013) y tolerancia a estreses abióticos (Tabla 2). Otros QTLs informados en la bibliografía se asocian con el tiempo de floración (Pierre *et al.*, 2008) y la morfogénesis aérea (Julier *et al.*, 2007).

De los caracteres mencionados, vale destacar algunos que revisten mayor importancia histórica para el mejoramiento de alfalfa en Argentina, como la producción de forraje, la persistencia y la resistencia a plagas y enfermedades. Otros –como la EUA, la nutrición nitrogenada y la tolerancia a estreses abióticos– están adquiriendo una importancia creciente por su fuerte impacto en aspectos ambientales y adaptativos.

En el caso de la producción de forraje, diferentes autores han abordado el estudio de este carácter por medio del mapeo de QTLs tanto me-

dian­te la estrategia biparen­tal como por mapeo por aso­ciación. En el primer caso, Robins *et al.* (2007a, 2007b) desarrol­laron una pobla­ción de herma­nos com­ple­tos de *Medicago sativa* deriva­da de un cruza­mien­to interespe­cífico entre *M. sativa subsp. falcata* y *M. sativa subsp. sativa* con heterosis conocida para ren­dimien­to forra­jero. Se reali­zaron evalua­ciones du­rante va­rios años en tres locali­dades y se con­struyó un mapa de liga­mien­to com­bi­nando mar­cadores RFLP y SSR que cu­brieron 546 cM y que se dis­tribuyeron en ocho gru­pos de liga­mien­to (GL). Se log­raron iden­ti­ficar 41 mar­cadores aso­ciados a la pro­duc­ción de bio­masa, ubi­cados en los GL 5 y 7, con alelos favorables aporta­dos por ambos paren­tales. Dado que uno de ellos es *M. sativa subsp. falcata*, se infiere que el germoplasma no adaptado puede emplearse como fuente de alelos favorables para este carácter. En cuanto a la estrategia de mapeo por asociación, Li *et al.* (2011) detectaron un desequilibrio de liga­mien­to signifi­cativo empleando mar­cadores SSR. De un total de 312 alelos con frecuencias mayores al 10 %, iden­ti­ficaron 15 que eviden­cia­ron fuerte aso­ciación con el ren­dimien­to en al menos uno de los cinco ambientes analizados. Solo un alelo mostró fuerte asociación con fibra detergente ácida (FDA) y otro con lignina detergente ácida (LDA). No obstante, si bien estos alelos asociados podrían ser utilizados en procesos de selección asistida por marcadores, se señaló que de acuerdo con el desequilibrio estimado se requerirían cerca de 1.000 marcadores para explorar el genoma completo de la alfalfa con fines de asociación marcador-carácter.

La producción potencial de forraje requiere de una disponibilidad hídrica no limitante para poder satisfacer la transpiración del cultivo. La alfalfa al ser un cultivo perenne consume agua durante todo el año, aun durante el reposo invernal, generando una demanda de evapotranspiración mayor que un sistema de cultivo anual. Por lo tanto, el mejoramiento orientado a una mayor EUA es un objetivo importante dentro de los programas de mejoramiento. En este sentido, Julier *et al.* (2010) emplearon 85 marcadores SSR para identificar QTLs asociados a dicho carácter. Evaluaron una población F1 de 224 individuos, proveniente del cruza­mien­to entre genotipos paren­tales contrastantes para la EUA. El ensayo se realizó en lisímetros de 2 m de altura y se midió la producción de materia seca durante seis ciclos de rebrote bajo riego. Luego mediante el cálculo del consumo hídrico entre cortes, se determinó la EUA pro-

medio por genotipo para los seis cortes. Así, la población F_1 mostró variación cuantitativa para el carácter. Además, se lograron identificar entre seis y nueve marcadores que mostraron un efecto significativo asociado a la variación de dicho carácter y que explican el 31 % de la variación fenotípica.

La tolerancia a los estreses abióticos es un carácter complejo, controlado por múltiples genes/QTLs y está sujeto a grandes efectos ambientales. Esto hace difícil seleccionar y estudiar los genes asociados a estos caracteres, tanto a nivel fisiológico como genético. Por lo tanto, el uso de marcadores moleculares permite diseccionar los caracteres cuantitativos particulares a través del mapeo de QTLs y así, identificar loci individuales que puedan ser usados en un programa de SAM. En este sentido, existe en alfalfa una amplia variedad de trabajos sobre mapeo de QTLs asociados a algún tipo de estrés. En la Tabla 2 se detallan tanto los QTLs como las variantes SNPs asociadas a diferentes características relacionadas con la tolerancia a algunos estreses abióticos.

Con referencia a la nutrición nitrogenada, Moreau *et al.* (2012) realizaron un estudio en la leguminosa modelo *M. truncatula* con el objetivo de explorar los determinantes genéticos y moleculares de este carácter en las leguminosas. Se analizaron variables de eficiencia de la planta asociadas con el procesamiento del carbono (C) y del nitrógeno (N). Se emplearon líneas endogámicas recombinantes de cuatro ciclos de fecundación, en un experimento de invernadero bajo dos concentraciones de nitrato contrastantes. A niveles bajos de nitrato, la fijación simbiótica de N_2 fue la principal fuente de N para el crecimiento de las plantas, detectándose un QTL de efecto mayor en el GL 8. Asimismo, también se detectaron un QTL en el GL 5 y otro involucrado en interacciones epistáticas en GL 2. En la condición de alta concentración de nitrato, la asimilación de este fue la fuente principal de N y se identificaron varios QTLs con efectos menores. Solo dos QTLs fueron comunes a ambos tratamientos con nitrato, uno asociado con la biomasa subterránea en el GL 3 y otro relacionado con área foliar, absorción específica de N y relación de biomasa aérea sobre biomasa radicular en el GL 6. En conclusión, este trabajo aportó resultados que enriquecen el conocimiento sobre el control genético de la nutrición de N en *M. truncatula*, los cuales podrían extrapolarse a la alfalfa.

■ **Tabla 2.** Número de QTLs o variantes SNPs asociados a diferentes caracteres agronómicos, morfológicos y fisiológicos, relacionados con la tolerancia a distintos estreses abióticos en alfalfa.

Estrés abiótico	N.º de loci identificados	Carácter asociado	Marcador molecular	Referencia
Resistencia al invierno	102	Crecimiento otoñal/ Reposo invernal	RFLP, SSR y SNP	Brouwer <i>et al.</i> (2000); Alarcón-Zúñiga <i>et al.</i> (2004); Maureira-Butler <i>et al.</i> (2007); Li <i>et al.</i> (2015a); Adhikari <i>et al.</i> (2018).
	83	Supervivencia al invierno	RFLP, SSR y SNP	Brouwer <i>et al.</i> (2000); Ma <i>et al.</i> (2002); Alarcón-Zúñiga <i>et al.</i> (2004); Maureira-Butler <i>et al.</i> (2007); Li <i>et al.</i> (2015a); Adhikari <i>et al.</i> (2018).
	31	Concentración de metabolitos	RFLP y SSR	Alarcón-Zúñiga <i>et al.</i> (2004).
	20	Biomasa radical	RFLP, SSR y SNP	Alarcón-Zúñiga <i>et al.</i> (2004); Li <i>et al.</i> (2015a).
	19	Daño por frío	RFLP	Brouwer <i>et al.</i> (2000); Ma <i>et al.</i> (2002).
	17	Producción de forraje	RFLP, SSR y SNP	Alarcón-Zúñiga <i>et al.</i> (2004); Maureira-Butler <i>et al.</i> (2007); Robins <i>et al.</i> (2007b); Li <i>et al.</i> (2015a).
Sequía	64	Producción de forraje	SSR y SNP	Ray <i>et al.</i> (2013); Yu (2017); Santantonio <i>et al.</i> (2019).
	19	Índice de resistencia a sequía	SNP	Zhang <i>et al.</i> (2015)
	15	Contenido relativo de agua		
	15	Eficiencia en el uso del agua	SSR	Julier <i>et al.</i> (2010).
	6	Discriminación del isótopo del C	SSR y SNP	Santantonio <i>et al.</i> (2019).
	2	Contenido de C y N		
Salinidad	95	Altura de planta, Conductancia estomática, Contenido de clorofila foliar, Contenido relativo de agua, Peso Fresco y Peso seco	SNP	Liu y Yu (2017); Liu <i>et al.</i> (2019).
	36	Tasa de germinación	SNP	Yu <i>et al.</i> (2016).
Toxicidad por Aluminio	6	Tasa de crecimiento del callo y de la raíz	SSR	Narasimhamoorthy <i>et al.</i> (2007); Khu <i>et al.</i> (2013).

Otro carácter importante para el mejoramiento, que a su vez condicionaría el potencial de producción, es la persistencia del cultivo a lo largo de los años. Dado que no existe un ideotipo persistente que pueda emplearse en todos los ambientes y condiciones, se deben abordar diferentes alternativas para desarrollar materiales adaptados a ambientes específicos. En este contexto, y de acuerdo con Bouton (2012), la selección por mayor persistencia debe considerar aquellos materiales que presenten mejor adaptación, adecuado grado de reposo invernal y resistencia específica a las plagas y enfermedades del ambiente para el que se selecciona. Robins *et al.* (2008) evaluaron la persistencia en una población F_1 proveniente del cruzamiento entre *M. sativa subsp. falcata* y *M. sativa subsp. sativa* en distintos ambientes. Como resultado, detectaron QTLs asociados al carácter en los GL 1, 2 y 7, donde ambos genomas parentales contribuyeron con alelos favorables, lo cual sería un indicio de que ambas especies tienen potencial para ser usadas en SAM. Se verificó, además, interacción significativa genotipo \times ambiente, así como QTLs específicos de ambiente para la persistencia en alfalfa. Dado que muchos de los alelos detectados en el GL 7 también se asociaron con la producción de biomasa, podría haber determinantes genéticos comunes a ambos caracteres. Resultó importante la detección del alelo al37288-1a1, correspondiente a un marcador SSR, que se pudo asociar positiva y significativamente al carácter en todos los ambientes en estudio.

La selección por resistencia a las enfermedades económicamente más importantes en Argentina es otro criterio trascendente en el mejoramiento de alfalfa. Entre ellas resaltan las enfermedades de raíz y corona, como podredumbre húmeda o fitóftora (*Phytophthora megasperma* Drechs. *f. sp. medicaginis*), antracnosis (*Colletotrichum trifolii* Bain & Essary), corchosis (*Xylaria* spp.) y fusariosis (*Fusarium oxysporum* Schl. *f. sp. medicaginis* (Weimer) Syn. & Hans). En menor medida se encuentran las enfermedades foliares como tallo negro de primavera (*Phoma medicaginis* Malbr. & Roum *var. medicaginis* Boerema), roya (*Uromyces striatus* Schroet) viruela (*Pseudopeziza medicaginis*), manchón foliar amarillo (*Leptotrochila medicaginis* (Fckl) Shüepf) y mancha ocular (*Leptosphaerulina briosiana* (Poll.) Graham & Luttrell), entre otras. Si bien estas últimas no matan a las plantas, ocasionan importantes pérdidas por disminución del área foliar y por ende del rendimiento y

de la calidad del forraje. Para un mejor tratamiento de estos temas se sugiere ver el capítulo 9 de este libro.

No obstante la importancia del daño por enfermedades, en la literatura son pocos los trabajos que hacen referencia al mapeo de QTLs asociados con la resistencia a alguna de estas enfermedades. Por lo tanto, a continuación, se detallan solamente los trabajos relacionados con las siguientes enfermedades.

La fitóftora causa una podredumbre húmeda de la raíz y es la principal limitante de la producción del cultivo en Australia y América del Norte. Musial *et al.* (2005) analizaron una población de retrocruza (BC) de 120 individuos de *M. sativa* con el objetivo de identificar QTLs asociados a la resistencia a dicha enfermedad. Para ello construyeron un mapa de ligamiento combinando marcadores RAPD, AFLP y SSR, totalizando 2.136,5 cM, con una distancia promedio de 15 cM por locus. Así lograron identificar tres regiones en los GL 2, 14 y 18 asociadas con la enfermedad, las cuales explicaron entre 6 y 15 % de la variación fenotípica y confirieron resistencia en diferentes órganos de la planta. El marcador W11-2 del GL 18 contribuyó con el 7 % de la variación fenotípica en la respuesta foliar de la población, dado que codifica un factor de resistencia expresado tanto en hoja como en raíz. Además, detectaron al menos seis loci que confieren resistencia al patógeno, con distintos modos de herencia sobre diferentes fondos genéticos de *M. sativa*. Posteriormente, Armour *et al.* (2006) identificaron un QTL de resistencia en un cultivar australiano tetraploide (WA272) en un mapa de ligamiento construido con marcadores SSR de ubicación genómica conocida y combinando información proveniente tanto de *M. sativa* como *M. truncatula*. La caracterización fenotípica de la población se realizó usando cortes de cotiledones y raíces infectadas, sobre las que se evaluó incidencia y severidad. Como resultado, se identificaron dos QTLs de efecto mayor en los GL 2 y 6, los cuales explicaron 32 % y 22 % de la variación fenotípica, respectivamente. También se detectaron dos QTLs en los GL 5 y 7, aunque con menor porcentaje de variabilidad fenotípica (10 % y 14 %, respectivamente). En consecuencia, los marcadores asociados a los QTLs identificados en este trabajo se podrían utilizar en SAM para resistencia parcial a *P. medicaginis* en alfalfa.

La antracnosis es una de las enfermedades más destructivas a nivel mundial (Yang *et al.*, 2007). Los síntomas ocasionados van desde pe-

queños sectores negros hasta lesiones ovales, alargadas y hundidas de color pardo rojizo. El problema más serio que produce es la podredumbre negra de la base de los tallos, dado que el hongo avanza sobre la raíz causando la muerte de la planta (Hijano y Pérez Fernández, 1995). Torregrosa *et al.* (2004) caracterizaron genotipos contrastantes de *M. truncatula* para evaluar la resistencia a este patógeno mediante el análisis del perfil de expresión en ambos genotipos. Identificaron 126 EST, que correspondieron a 92 genes relacionados tanto con funciones de defensa como con el proceso de transducción de señal. Con base en estos resultados se eligieron los parentales a partir de los cuales se construyó una población RIL (*Recombinant Inbred Lines*) de mapeo. Por un lado, concluyeron que la resistencia está gobernada por un locus de efecto mayor (gen *Ct1*), localizado en el cromosoma 4. Luego, Torregrosa *et al.* (2008), a partir de un análisis *in silico*, identificaron en dicha región la presencia de varios grupos de genes ricos en leucina que confieren resistencia atípica y que se expresan en situaciones relacionadas con el estrés. Por otro lado, la aparición de nuevos patotipos (cepas) del patógeno dificulta el manejo de la enfermedad basada solamente en el uso de cultivares resistentes. Por ello, algunos investigadores utilizan en sus trabajos distintas razas del patógeno. En este sentido, Mackie *et al.* (2007) detectaron QTLs asociados a las razas 1, 2 y 4 de *C. trifolii* en un clon de alfalfa tetraploide (W126) proveniente de un cultivar australiano. Para ello, utilizaron una población de retrocruzas derivada de 145 individuos de *M. sativa*, la cual fue inoculada en los tallos tanto por inyección como por pulverización del inóculo. En el primer caso, la inoculación por inyección con las razas 1 y 4 produjo una resistencia del tipo dominante incompleta y se mapeó en un GL homólogo al GL 8 de *M. truncatula*. En la inoculación por pulverización se identificó un QTL asociado a la resistencia en el GL 8. Además, se identificaron seis QTLs asociados a la raza 1 y cuatro QTLs con la raza 4. La resistencia a la raza 2 fue recesiva incompleta, identificándose cuatro QTLs, uno de los cuales está en el GL 4 (al igual que la resistencia para la raza 1). Otros trabajos abordan el estudio de la enfermedad en *M. truncatula*, lo que permite un abordaje más simplificado por su nivel de ploidía (diploide) y por su cercanía con la alfalfa tetraploide. En este contexto, Yang *et al.* (2007) presentaron un mapa genético de alta resolución para el gen de resistencia RCT1 contra la raza 1 de *C. trifolii* en el GL 4 de *M. truncatula*. Este gen forma parte

de un locus complejo conformado por numerosos genes homólogos a genes de resistencia de tipo TIR-NBSLRR. Así, el aporte de este trabajo facilita el clonado posicional de este gen en *M. sativa*.

Entre las enfermedades foliares, el tallo negro de primavera puede producir pérdidas de rendimiento de hasta 20 % en cultivares susceptibles. En plantas afectadas se observan lesiones sobre los tallos de color pardo oscuro, que comienzan aisladas para luego fusionarse y tomar un color negro; en las hojas se observan lesiones de color marrón que pueden llegar a marchitarlas (Hijano y Pérez Fernández, 1995). Dado que es un hongo necrotrófico, el mecanismo de resistencia es cuantitativo y, por ello, se conoce poco acerca de su base genética. Kamphuis et al. (2008) realizaron la caracterización macroscópica y citológica de la respuesta a la enfermedad en dos poblaciones de mapeo F_2 (A y B) provenientes del cruzamiento de una accesión resistente con dos diferentes accesiones susceptibles de *M. truncatula*, detectando QTLs que confieren resistencia. Los mapas de ligamiento se construyeron combinando SSR, SNP y CAPS. El mapa generado para la población A tiene una distancia total de 497,8 cM, con una distancia promedio de 6,4 cM por locus, que se distribuyen en siete GL, debido a que los GL 4 y 8 formaron un único grupo. El mapa de la población B tiene una distancia total de 488,3 cM y una distancia promedio de 4,2 cM por locus, distribuidos en ocho GL. Combinando ambas poblaciones (A y B), se detectaron dos QTLs de efecto mayor para *P. medicaginis* OMT5, uno en cada población de mapeo. El QTL detectado en la población A, llamado rnpm1, se localiza en el GL 4 y explicó 33,6 % de la varianza fenotípica de la respuesta a la infección. Por un lado, el QTL detectado en la población B, llamado rnpm2, se localiza en el GL 8 y explicó 29,6 % de la varianza fenotípica. Además, se detectó en el GL 1 de la población B un tercer QTL de efecto menor, denominado rnpm3, que explicó 19,4 % de la varianza total. Para finalizar, dicho estudio se complementó con un mapeo fino del gen rnpm2 a lo largo del GL 8, empleando 524 familias F3. De este modo se localizó la región a un intervalo de 0,8 cM entre los marcadores h2_16a6a y h2_21h11d. Por otro lado, el gen rnpm1 está estrechamente ligado a un grupo de genes TIR-NBS-LRR y genes tipo proteínas de resistencia a patógenos.

Otra enfermedad foliar de menor importancia en Argentina, pero que a nivel mundial reviste relevancia, es la roya. Entre los síntomas que

causa se observan amarillamiento y marchitamiento generalizado de la planta, lo que puede originar la pérdida total de forraje en un lote infectado (Hijano y Pérez Fernández, 1995). En un trabajo reciente, Adhikari y Missaoui (2019), usando el genotipado por GBS, identificaron cuatro QTLs para la resistencia a roya en una población F_1 de 184 individuos de alfalfa tetraploide. De los cuatro QTLs, el más importante (Us-RustR1) explicó 13 % de la varianza fenotípica, lo que sugiere que la resistencia tendría herencia poligénica. No obstante, se requiere la validación de estos QTLs en diferentes fondos genéticos y el mapeo fino de estos como próximo abordaje para su posterior utilización en selección asistida por marcadores.

Otro carácter que también reviste importancia en Argentina es la resistencia a pulgones, en particular los pulgones azules (*Acyrtosiphon kondoi* [Shinji]) y moteado (*Therioaphis trifolii* Monell). Para el primero, se detectó un locus en el GL 3 asociado a la resistencia, que cosegrega con otro locus asociado a la resistencia a pulgón verde (*Acyrtosiphon pisum* Harris) (Guo et al., 2012). Este estudio se realizó en una población de 114 RILs de *M. truncatula*. La variable asociada correspondió a la reducción corporal (biomasa) del áfido, lo cual indicaría un mecanismo de antibiosis para ambos pulgones. Además, se encontraron dos loci independientes en los GL 3 y 5 asociados a una reducción de la biomasa de la planta, lo que indicaría un mecanismo de tolerancia al ataque de estos dos pulgones. Para el caso del pulgón moteado, Kamphuis et al. (2013) compararon la reacción de tres accesiones de *M. truncatula* sometidas al ataque de este áfido, observando que mientras una de ellas resultó altamente susceptible, las otras dos fueron moderada y altamente resistentes, respectivamente. A partir de ellas, se realizó un cruzamiento recíproco y las respectivas RILs fueron estudiadas. Como resultado, se concluyó que la resistencia moderada está mediada por el floema, vinculando procesos de antibiosis y tolerancia. Se asociaron tres QTLs en los GL 3, 6 y 7 vinculados a ambos modelos de defensa (antibiosis y tolerancia).

d- Selección asistida por marcadores

La selección asistida por marcadores (SAM) es un método por el cual el fenotipo es seleccionado por medio del genotipo del marcador (Collard

et al., 2005). Por lo tanto, se necesita tener una amplia cobertura genómica a fin de maximizar la probabilidad de detectar QTLs o variantes SNPs asociados al carácter. Si bien los primeros mapas desarrollados permitieron encontrar regiones genómicas asociadas a caracteres de herencia simple, no fueron eficientes para mapear caracteres cuantitativos, como los estreses abióticos. En este sentido, tanto las plataformas de genotipado como los nuevos métodos estadísticos de análisis de asociación permitieron asociar variantes alélicas (del tipo SNPs) con este tipo de caracteres. Sin embargo, la asociación de estas variantes con las características de interés no es garantía de que dicho marcador sea parte del gen causante del carácter. Para ello es necesario validar el locus identificado tanto en diferentes fondos genéticos como en distintos ambientes, antes de asegurar la asociación entre marcador y carácter.

La selección asistida permite tanto identificar plantas que porten el QTL de interés, como evaluar su dosaje alélico. Esto último es importante para identificar padres que posean un alto dosaje a fin de aumentar el porcentaje de plantas tolerantes en la población para desarrollar por selección. La estrategia consiste en integrar los marcadores a las evaluaciones fenotípicas en el campo con el objetivo de verificar la selección de individuos con un carácter particular de interés y cuyo dosaje alélico sea alto. Por más que haya varios QTLs mapeados en alfalfa, se requiere mayor esfuerzo para lograr que las asociaciones marcador-carácter sean suficientemente precisas para ser usadas en selección asistida. Por ello, los marcadores cobran mayor importancia cuando son asociados a caracteres que son difíciles de evaluar en el campo o cuyo fenotipado consume mucho tiempo. Es importante destacar que siempre se deberá contar con un fenotipado preciso de los individuos para poder identificar un QTL asociado (Li y Brummer, 2012). No obstante, el mayor impacto de los marcadores en los programas de mejoramiento de alfalfa es la selección a marcador único, dado que pueden realizarse múltiples ciclos de selección por año (Li y Brummer, 2012).

Por una parte, la aplicación de esta metodología en alfalfa presenta algunas complicaciones. Uno de los principales problemas de usar germoplasma para introgresar regiones de interés con el auxilio de los marcadores es limitar el segmento específico del donador (Collard y Mackill, 2008). Además, en los casos donde los marcadores están cer-

ca de fijarse, el efecto del alelo disminuye y se genera la necesidad de un nuevo mapeo para identificar otros QTLs asociados. Por otra parte, el empleo de muchos QTLs de manera simultánea requiere tamaños poblacionales demasiado grandes e impracticables (Casler y Brummer, 2008). Otro punto para considerar aplicar SAM en alfalfa es que se deben evaluar ensayos multiambientales eligiendo sitios contrastantes con base en el conocimiento previo de los patrones de interacción genotipo-ambiente (GxE) (Annicchiarico *et al.*, 2010).

Si bien existe gran número de QTLs y variantes SNPs mapeadas y asociadas con la tolerancia a algún tipo de estrés abiótico (Tabla 2), hasta el momento solo en estrés hídrico se encuentran trabajos que hacen referencia al uso de la SAM. Así, en la Universidad de Nuevo México, EE. UU., después de 20 años de trabajo se ha implementado un proceso de SAM para la obtención de variedades de alfalfa tolerantes a deficiencias de agua. Como resultado, se han identificado y mapeado 10 regiones genómicas que influyen en la producción de biomasa aérea y radicular bajo estrés hídrico (Ray, 2010; Ray *et al.*, 2015). Bajo estrés hídrico seis de estas regiones aumentan la producción de biomasa [marcadores “alta biomasa aérea” o HS (*high shoot*) y “alta biomasa radicular” o HR (*high root*)] y cuatro de ellas la disminuyen [marcadores “baja biomasa aérea” o LS (*low shoot*) y “baja biomasa radicular” o LR (*low root*)]. Luego de evaluar durante tres años diferentes poblaciones en condiciones de campo y bajo dos condiciones hídricas, se identificó un genotipo con los cuatro tipos de marcadores moleculares (HS, HR, LS y LR). A partir del cruzamiento de este genotipo con una variedad comercial estándar se generó una población base (C0), cuyos individuos –con base en el genotipado que se practicó– se clasificaron en cuatro grupos, correspondientes a cada tipo de marcadores. Seguidamente, se llevó a cabo una policruza entre los individuos de cada cada grupo, obteniendo así las poblaciones C1 (1.º generación de híbridos SAM). Estas poblaciones se cruzaron con tres cultivares elite de GRI 7 (uno tolerante y dos susceptibles al estrés hídrico), lo que originó la 2.º generación de híbridos SAM (Ray *et al.*, 2013). Más tarde, con el objetivo de validar estos QTLs, las poblaciones generadas se evaluaron en el campo durante dos años y en dos condiciones hídricas (riego normal y riego limitado) (Babb, 2014). Por un lado, la C1 derivada de la selección a favor de los marcadores para alta biomasa aérea (HS) y radicular (HR) mejoró el

rendimiento de forraje bajo estrés en 23 % y 20 %, respectivamente; sin embargo, rindieron menos que los tres cultivares parentales y sus híbridos SAM respectivos. Por otro lado, la 2.º generación de híbridos SAM provenientes de los dos cultivares elite susceptibles mejoró respectivamente 6 % y 9 % el rendimiento en forraje y conservó 75 % del fondo genético del cultivar elite. Por último, cruzaron la población C1 por seis poblaciones sintéticas de GRI 4-5 y los híbridos SAM así obtenidos se evaluaron a campo durante 2016 y 2017 bajo condiciones de estrés hídrico (Ray, 2017). La producción de forraje bajo estrés de los híbridos SAM superó entre 10 y 25 % a la de los parentales comerciales. Basados en estos resultados se concluyó que la SAM para la obtención de cultivares de alfalfa tolerantes al estrés hídrico funciona de manera adecuada y que los marcadores moleculares seleccionados resultaron apropiados para dicha tarea.

No obstante, los esquemas de selección basados en marcadores aun deben considerar las mismas necesidades comunes a todos los programas de mejoramiento, a saber: a) una clara especificación del ambiente objetivo a los cuales se apunta destinar el cultivar resultante; b) la capacidad de realizar mediciones con precisión de los rasgos de interés; y c) la importancia de realizar evaluaciones fenotípicas en las condiciones lo más cercanas posible al ambiente objetivo.

Genómica

Genoma de referencia de M. sativa

Un genoma de referencia, también conocido como ensamblado de referencia, es una representación lineal del genoma de una especie y funciona como el cimiento de todas las bases de datos genómicos. De ese modo, conforma una plataforma para el ensamblado de genomas *de novo*, la tipificación de variantes alélicas, el alineamiento de lecturas de ARN u otras secuencias y la “anotación” de genes (Ballouz *et al.*, 2019). La obtención de un genoma de referencia constituye un gran avance no solo para el estudio de la regulación de la expresión de caracteres de interés, sino también para programas de mejoramiento genético. Esto se debe a que ofrece numerosas herramientas para el desarrollo de marcadores moleculares y el uso de técnicas de edición génica.

Sin embargo, no todas las especies se pueden secuenciar con la misma facilidad. El tamaño del genoma, el nivel de heterocigosidad, la estructura y número de elementos repetitivos y la ploidía son las principales características que influyen en el proceso de ensamblado de un genoma (Dominguez del Angel *et al.*, 2018; Li y Harkess, 2018). Es por ello que hasta el momento (2020) no se ha logrado secuenciar el genoma de la alfalfa cultivada tetraploide. A continuación, se detallan las particularidades del genoma de esta especie que explican en cierta medida el porqué de esta situación.

En primer lugar, a mayor tamaño del genoma, mayor será el costo del proyecto de secuenciación. En este sentido, se necesita cierta cantidad de secuencias (lecturas) para ensamblar un genoma. Para ello, cuando se menciona que para un proyecto de secuenciación se necesita una profundidad de 10X significa que el número total de nucleótidos, en el total de lecturas, debe ser 10 veces el número total de nucleótidos en todo el genoma. En definitiva, cuanto mayor sea el tamaño en pares de bases mayor será el número de nucleótidos, como así también el número de datos para ordenar y, por ende, el costo y la complejidad de la secuenciación (Dominguez del Angel *et al.*, 2018). Cabe señalar que la alfalfa posee un genoma relativamente pequeño, entre 0,8 y 1 Gigabases (Gb), si se considera que en plantas el rango oscila entre 0,063 y 148,8 Gb (Greilhuber *et al.*, 2006). No obstante, debe considerarse que se han secuenciado genomas de más de 10 Gb y, por lo tanto, el tamaño no representaría una limitación severa en este caso.

Por un lado, por lo general, los programas de ensamblado reducen diferencias alélicas en una única secuencia consenso para que el ensamble final resulte haploide. Sin embargo, en genomas con elevada heterocigosidad las lecturas de alelos homólogos pueden ser demasiado diferentes como para ser condensadas en una sola secuencia y, por lo tanto, son ensambladas de forma separada generando duplicaciones ficticias. Por otro lado, también puede fallar el ensamblado en dichas regiones variables, por lo que al aumentar el nivel de heterocigosidad se obtiene un ensamblaje más fragmentado. En estas situaciones se recomienda, de ser posible, secuenciar individuos endogámicos (Li y Harkess, 2018). Sin embargo, la alfalfa presenta complicaciones en este sentido: además de poseer un genoma de elevada heterocigosidad –debido a su

sistema de reproducción alógama–, sufre una fuerte depresión por endogamia (Li y Brummer, 2009). En consecuencia, estos factores hacen virtualmente imposible generar líneas puras en dicha especie.

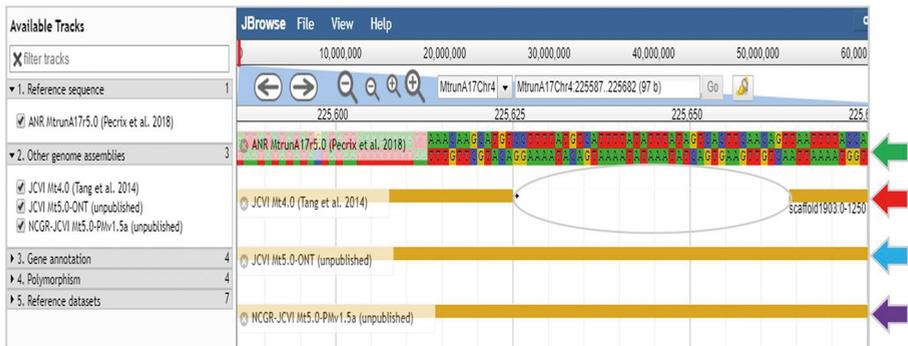
En cuanto a la estructura y el número de elementos repetitivos no se han publicado estudios referidos a estos elementos contenidos en el genoma de alfalfa, por lo que se desconoce el nivel de complejidad del genoma en este sentido. Por último, la ploidía también es un factor determinante, ya que en especies alo o autopoliploides la aparición de haplotipos adicionales dificultan el ensamblado del genoma ya que es probable que se dupliquen sitios y que el genoma resulte con mayor fragmentación (Li y Harkess, 2018). Por consiguiente, la autotetraploidía de la alfalfa ($2n = 4X = 32$) representaría una gran limitación en el correcto ensamblado de su genoma.

En este contexto, para contrarrestar dichas limitaciones, se inició un proyecto para secuenciar el genoma a partir de clones provenientes de un individuo perteneciente a una población de alfalfa cultivada diploide (Bingham y McCoy, 1979). Esta población se originó a partir de un programa de retrocruzamiento cuyo cruzamiento inicial involucró individuos androestériles de alfalfa cultivada tetraploides e individuos silvestres diploides de *Medicago falcata* L. Como resultado de este retrocruzamiento, 98,44 % del genoma es de la alfalfa cultivada y 1,56 % del genoma de *M. falcata* (Bingham y McCoy, 1979). Como resultado, en 2016 se liberó el genoma ensamblado de alfalfa diploide (CADLv0.95P), disponible para su descarga en el sitio web <http://www.medicagohapmap.org/downloads/cadl> y para su visualización en el sitio <http://www.alfalfatoolbox.org/jbrowse>. Dado que no se ha completado el ensamblado en pseudomoléculas, representando cada uno de los ocho cromosomas básicos de la especie, solo se puede visualizar la secuencia y posición de genes en *scaffolds* o estructura “en andamiaje” (Hapmap Project, 2016). De todas maneras, a pesar de no poder observarse la posición física en los cromosomas, el visualizador de genomas permite realizar búsquedas de secuencias mediante la herramienta BLAST. Además de identificar bloques sinténicos, analizar y descargar secuencias, también permite simultáneamente tener una perspectiva de zonas cromosómicas extensas y explorar pequeñas áreas en busca de detalles (Wang *et al.*, 2013). El método de secuenciación utilizado fue

la tecnología PacBio, con una profundidad de 100X, y como resultado se obtuvo un ensamblado constituido por 6593 *scaffolds*, que en su totalidad abarcan 1200 megabases (Mb) (Hapmap Project, 2016). Si bien el tamaño del genoma haploide esperado es de 800 Mb, la diferencia entre lo esperado y lo ensamblado se podría deber a errores resultantes de la elevada heterocigosidad que presenta el genoma de esta especie. De ser así, la mitad del genoma estaría representado por el ensamblado de dos haplotipos distintos como mínimo, lo cual implicaría que el contenido de genes presente una proporción significativa de copias alélicas de los genes resultantes de falsas duplicaciones segmentales. Este dato no es menor ya que no se tiene certeza de si, al comparar la secuencia de genes similares, se está ante miembros de una familia génica o ante copias alélicas de un único gen.

Históricamente, ante la ausencia de un genoma de referencia de *Medicago sativa*, se ha utilizado como referencia el genoma de *Medicago truncatula* GAERTN. Esta especie modelo es autógena, diploide y está altamente emparentada con la alfalfa. Además, al igual que esta, desarrolla una relación simbiótica con *Ensifer meliloti* (Barker *et al.*, 1990). Otro rasgo interesante de esta leguminosa modelo es que posee un genoma relativamente pequeño, de aproximadamente 375 a 465 Mb (Blondon *et al.*, 1994). Su número cromosómico básico también es ocho y presenta un amplio grado de sintenia con el genoma de alfalfa (Julier *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2014b). Dicha sintenia es muy importante, ya que permite el uso futuro de la genómica aplicada a *M. truncatula* en estudios genéticos en alfalfa cultivada. Hasta el momento, se han liberado diferentes versiones del genoma de *M. truncatula* utilizando distintas técnicas de secuenciación. La primera versión ensamblada (Mt3.5), publicada en 2011, se basó en la técnica de secuenciación de cromosomas artificiales de bacterias mediante Sanger (Young *et al.*, 2011). Dicha versión representaba solo 250 Mb del genoma por lo que, aprovechando la disminución de costos en tecnologías de secuenciación de segunda generación, se inició un nuevo proyecto para actualizar la versión del genoma de esta especie. En el año 2014, se liberó la versión Mt4.0, la cual se realizó *de novo* mediante la técnica *whole genome shotgun*. Esta versión mejoró el anclaje de secuencias en pseudomoléculas logrando representar el 97 % de la secuencia genómica y abarcando 360 Mb de secuencias que se extienden 390 Mb (Tang *et al.*, 2014). Ahora bien, en

la versión Mt4.0 quedaron regiones con secuencias repetitivas sin resolver. Por lo que se realizó una actualización de dicha versión mediante tecnologías de secuenciación de tercera generación basadas en “lecturas largas”. Actualmente, existen tres versiones completas basadas en secuenciación por PacBio y Oxford Nanopore. La más completa de las tres es MtrunA17r5.0-ANR, que se liberó en el año 2018 y se realizó mediante la tecnología PacBio, con una profundidad de lecturas superior a 100X. Tiene un tamaño de 430 Mb y permitió descubrir rearrreglos cromosómicos entre genotipos y genes duplicados no hallados en la versión anterior Mt4.0 (Pecrix *et al.*, 2018). Dichos genomas se pueden visualizar con la herramienta genome browser en el sitio web <https://medicago.toulouse.inra.fr/MtrunA17r5.0-ANR/> (Figura 2). Además, se pueden descargar secuencias de hasta 500 kb para el diseño de marcadores y análisis de genes candidatos.



■ **Figura 2.** Visualización del genoma MtrunA17r5.0-ANR. Secuencia de la región de 97 pb comprendida entre los puntos 225587 y 225682 del cromosoma 4 del genoma MtrunA17r5.0-ANR (flecha verde). Secuencias ensambladas de distintas versiones del genoma de *M. truncatula* como Mt4.0 (flecha roja), Mt5.0-ONT (flecha celeste) y Mt5.0-PMv1.5a (flecha violeta). El círculo rojo señala un intervalo no resuelto en la versión del genoma Mt4.0. Adaptado de *Medicago truncatula A17 r5.0 genome portal* (Pecrix *et al.*, 2018).

Plataformas de genotipado de alto caudal

Las estrategias de genotipado de alto caudal se desarrollaron con el objetivo de detectar e identificar una gran cantidad de marcadores SNPs en poblaciones con alto número de individuos. Su uso se vio impulsado por el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de próxima generación o NGS (*Next-Generation Sequencing*) (Metzker,

2010) que posibilitó reducir el costo de la secuenciación y obtener una gran cantidad de datos genómicos. En este contexto, las plataformas desarrolladas en alfalfa se centran en los SNP *arrays* (microarreglos) (Li *et al.*, 2014a) y en el genotipado por secuenciación o GBS (*Genotyping by Sequencing*) (Li *et al.*, 2014b). Tanto la aplicación como la generación de estas estrategias están en continuo desarrollo. Esto se debe no solo al desafío que implica identificar si las mutaciones encontradas son verdaderos marcadores SNPs (*SNP calling*), sino también a la dificultad en tratar de discriminar el dosaje alélico en un genoma tetraploide como el de la alfalfa cultivada.

a -SNP array

Un *SNP array* es un microarreglo de ADN constituido por un soporte sólido en el que se fijan de forma ordenada sondas colindantes a marcadores SNP distribuidos en todo el genoma. Estos microarreglos permiten caracterizar el genotipo (genotipar) de solo unos cientos a cientos de miles de marcadores simultáneamente, transformándolos en plataformas de genotipado de alto caudal. Aunque cada compañía que desarrolla este tipo de tecnología usa diferentes reacciones químicas para identificar el alelo de cada variante SNP, todas tienen dos aspectos en común. El primero es que ambas se basan en la complementariedad de bases del ADN para “pescar” las regiones “blanco” donde se localizan los marcadores SNPs, facilitando así la unión de estos a sus respectivas sondas alelo-específicas. El segundo se refiere a que una vez producida esta reacción química, que genera una señal fluorescente o de otro tipo, se requiere un algoritmo computacional robusto que determine la presencia o ausencia de cada variante en cada SNPs (La Framboise, 2009).

En comparación con las plataformas tradicionales de secuenciación, que requieren mayor tiempo para la construcción de las librerías y para el análisis bioinformático, las principales ventajas que presenta esta técnica son la rapidez en la obtención de los datos y la facilidad del análisis. Además, la conformación del microarreglo está dada por el empleo de SNPs conocidos; por lo tanto, muchos de ellos pueden ser construidos para determinadas regiones genómicas de interés o para responder preguntas específicas de acuerdo a la población en estudio.

Otra ventaja que presenta es una relación costo-beneficio de baja a moderada (You *et al.*, 2018).

Una de las mayores desventajas que presenta radica en que, a fin de utilizar marcadores SNPs de localización conocida, se debe disponer de información genómica previa a partir de transcriptomas, secuenciación de bibliotecas de BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) o genomas de referencia. Esto genera cierto grado de error para encontrar marcadores SNPs polimórficos, ya que no sólo se parte de pocos individuos, sino que además su elección no es necesariamente aleatoria, impidiendo así la captación de todo el polimorfismo en una población de interés. Dicho problema se resolvería ampliando las bases genómicas disponibles a través de la secuenciación de genomas completos de varios individuos con mayor representación poblacional, de modo de actualizar los SNPs de un microarreglo o bien combinar varios de ellos de acuerdo al objetivo de estudio (You *et al.*, 2018).

Por un lado, el desarrollo de estas estrategias en especies poliploides –como la alfalfa– es más lento que en las especies diploides. Esto se debe, como ya fuera señalado, a la dificultad para determinar el número de copias de cada alelo (dosaje alélico) en un determinado SNP, lo que obliga a que la construcción de algoritmos apropiados para la correcta asignación de un genotipo a un determinado individuo esté en constante evolución. Por otro lado, dado que la alfalfa aún no cuenta con un genoma de referencia, se recurre al genoma ensamblado de *M. truncatula* con el cual presenta un amplio grado de sintenia. El empleo de esta alternativa es lo que ha posibilitado el desarrollo de la tecnología de microarreglos en alfalfa.

En la actualidad, solamente Li *et al.* (2014a) han desarrollado un chip de marcadores SNPs (*SNP array*) de alta densidad en alfalfa. Este fue construido a partir de una base de datos transcriptómicos de 27 genotipos, tanto diploides silvestres como tetraploides cultivados, que permitieron identificar 900.000 SNPs (Li *et al.*, 2012). Luego de un proceso de filtrado, ortología con genes candidatos y alineamiento sobre las ocho pseudomoléculas del genoma de *M. truncatula* se desarrolló un *SNP array* con 9.277 SNPs. Dicho chip se validó en un panel de 280 genotipos, que incluyeron tanto individuos diploides como tetraploides, mediante la tecnología Illumina ®. Como resultado, 81 % de las

variantes detectadas (7.476 SNPs) pasaron los controles de calidad y presentaron polimorfismo. Además, el chip también mostró un alto nivel de transferibilidad para especies de *Medicago* estrechamente relacionadas –como *M. prostrata*, *M. lupulina* y *M. truncatula*– y una transferibilidad razonable para trébol rojo (*Trifolium pratense*).

También, se pudo determinar el dosaje alélico del 14 % de las variantes SNPs detectadas en alfalfa tetraploide. Es importante puntualizar que, debido a que el dosaje alélico puede afectar la expresión génica y los fenotipos en las especies poliploides, la integración de la información de dosificación alélica en los modelos estadísticos de GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) mejoraría el mapeo de QTLs (*Quantitative Traits Loci*) en este tipo de especies. Por lo tanto, el chip mencionado podría aplicarse no sólo en experimentos de diversidad genética, sino también en mapeo genético, GWAS y selección genómica en alfalfa.

b- Genotipado por secuenciación o GBS

Esta estrategia combina, en un único procedimiento, el descubrimiento de marcadores SNPs y la genotipificación de la población de estudio. Esta característica hace de esta técnica una plataforma de genotipificación verdaderamente rápida y flexible, aplicable a un amplio rango de especies y de recursos genéticos. Debido a su simplicidad, el método se ha extendido a un amplio rango de especies, aun cuando muchas de ellas no poseen –como la alfalfa– un genoma de referencia. Por definición, los métodos GBS se basan en la secuenciación de una porción reducida del genoma, cuyos fragmentos deben ser adyacentes a un polimorfismo de una única base o SNP. No obstante, en la actualidad, la terminología GBS también se aplica a la resecuenciación de nuevos genotipos en aquellos cultivos que cuentan con un genoma de referencia. La diferencia más importante entre ambas aproximaciones es que las técnicas de reducción del genoma capturan una gran proporción de marcadores SNPs, mientras que las de resecuenciamiento permiten detectar todas las variantes SNPs presentes en la población. Por lo tanto, las metodologías que utilizan la reducción del genoma son las siguientes:

1- RADseq (*Restriction Associated DNA Sequencing*): combina la digestión con una enzima de restricción y la selección de fragmentos polimórficos adyacente a esos sitios (Baird *et al.*, 2008).

2- GBS: combina la digestión con una enzima de restricción y el enriquecimiento de fragmentos cortos mediante amplificación por PCR (Elshire *et al.*, 2011; Poland *et al.*, 2012).

3- ddRADseq (*double digest RADseq*): combina la digestión de dos enzimas de restricción, una de fragmentos largos y otra de fragmentos cortos, y elimina el paso de selección de fragmentos (Peterson *et al.*, 2012).

Cabe destacar que el número de marcadores SNPs obtenidos por cualquiera de las tres estrategias varía entre 100.000 y 1 millón. La densidad de estos depende de dos factores: a) del número de mezclas de ADN de los diferentes individuos (*multiplexing*) que constituyen una librería, considerando que a mayor número de muestras menor será el número de secuencias que se alineen en un determinado sitio del genoma; y b) de la selección de las enzimas de restricción que se utilicen para reducir el genoma, lo que implica que cada especie requiere un pequeño ajuste en el número y el tipo de enzima de restricción para utilizar.

La principal fortaleza de estas metodologías radica en el *multiplexing* de ADN, dado que, al utilizar adaptadores genéricos (*barcode*), permite mezclar el ADN de diferentes genotipos en una única muestra y construir librerías reduciendo el costo por muestra. La inclusión del paso de amplificación de fragmentos cortos por medio de cebadores complementarios a los adaptadores, magnifica la señal de estos para la fase de secuenciación (Poland y Rife, 2012). Este paso permite generar muchas secuencias colindantes a los sitios de restricción y obtener así –a través del alineamiento de aquellas– una secuencia consenso robusta y marcadores SNPs validados por su frecuencia en una determinada posición. Otra ventaja que presenta esta plataforma es que se puede aplicar a especies con o sin genoma de referencia. Esto ha permitido que muchas especies con escaso desarrollo en el área de la genética molecular, puedan rápidamente obtener nuevos marcadores que faciliten el abordaje de enfoques genéticos a genoma amplio.

Para cualquiera de las metodologías que incluyen reducción del genoma, uno de los puntos débiles es la gran cantidad de datos faltantes generados para un marcador SNP determinado. Esto puede deberse a la presencia de mutaciones en los sitios de restricción que impiden la obtención de fragmentos cortos. Dicha dificultad es inherente al geno-

ma de la especie y a la selección de las enzimas para la reducción de la complejidad del genoma. Otro punto en contra es el uso de altos niveles de multiplexing, que disminuyen la cantidad de datos obtenidos por genotipo, reduciendo a su vez el nivel de cobertura. En general, se espera tener gran cantidad de secuencias cortas que secuencias muy largas para poder encontrar marcadores SNPs. Sin embargo, estas últimas son útiles en poliploides para encontrar SNPs de genoma específico.

El número de datos faltantes es un punto crítico a la hora de caracterizar tanto paneles de asociación de germoplasma como parentales de poblaciones de mejoramiento. Para reducir ese número, se podría aumentar el nivel de cobertura genómica o bien disminuir el nivel de multiplexing. Otra forma de salvar este punto es imputar los genotipos faltantes según haplotipos de referencia, es decir, inferir el alelo de la variante SNP faltante en relación con un grupo de SNPs adyacentes en ausencia de recombinación. Esto se puede realizar mediante metodologías algebraicas de inteligencia artificial (*Machine Learning*) como los modelos de regresión Random Forest (Breiman, 2001). Otra alternativa, como ya fuera mencionado, es secuenciar el genoma completo de algunos individuos claves en la población de estudio, lo que permitiría referenciar los *gaps* (brechas de secuenciación) generadas previamente por GBS (Poland y Rife, 2012). Esta desventaja podría desconsiderarse si el genotipado se realiza sobre poblaciones tempranas de mejoramiento y no sobre los parentales. Por lo tanto, dado que la frecuencia de estos marcadores se irá modificando a lo largo de los ciclos de selección, conviene dirigir el esfuerzo requerido para completar la información faltante al genotipo final.

La metodología GBS se ha utilizado en diferentes abordajes de genómica aplicada en alfalfa, como por ejemplo en la construcción de mapas de ligamiento de alta densidad (Li *et al.*, 2014b; Munjal *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019), en el mapeo de QTLs con mayor precisión (Adhikari *et al.*, 2018; Adhikari *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019), en estudios de GWAS (Zhang *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2016; Biazzi *et al.*, 2017; Liu y Yu, 2017; Yu, 2017; Liu *et al.*, 2019) y en la selección y predicción genómica (Annicchiarico *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015b; Biazzi *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2018), entre otros. En este contexto, el GBS genera un gran aporte a la construcción de mapas de ligamiento cuando se dispone de un genoma de referencia, dado

que permite el alineamiento de los marcadores generados, facilitando la identificación de los puntos de recombinación. También se pueden construir mapas a través de la posición asignada a cada marcador, sin tener en cuenta la frecuencia de recombinación. Asimismo, la falta de un genoma de referencia no constituiría una limitante, ya que los SNPs generados se pueden agrupar y ordenar mediante *pipelines* (conductos) de alineamiento de secuencias para ensamblado de genoma *de novo* o por sintenia de mapa con especies muy cercanas. En el caso de la alfalfa tetraploide, como se explicó anteriormente, se utiliza el genoma de *M. truncatula* para facilitar el ordenamiento y el posicionamiento de aquellos. También el GBS facilita la localización de genes simples a través del mapeo fino, ya que permite el balance entre la identificación de marcadores asociados al gen de interés y el desarrollo de ensayos de marcadores diagnósticos. Luego, esos marcadores servirán para el seguimiento del gen asociado al marcador en las diferentes poblaciones de mejoramiento o fondos genéticos que se deseen analizar (Poland y Rife, 2012).

Genómica aplicada al mejoramiento de alfalfa

a- GWAS

El método *Genome-Wide Association Studies* (Estudios de Asociación a Genoma Amplio) se aplicó por primera vez en genética humana (Corder *et al.*, 1993). El primer uso sobre datos agronómicos lo realizaron Thornsberry *et al.* (2001) en maíz para el carácter fecha de floración. La metodología brinda una estrategia poderosa para superar las limitaciones del mapeo biparental de QTLs. En comparación con este último, GWAS permite mapear loci genéticos con una ubicación más precisa. Y en lugar de una población biparental, el método se realiza sobre una población de individuos no relacionados con diversidad amplia, como poblaciones de mejoramiento MAGIC (*Multi-parent Advanced Generation Inter-Cross*) o un panel de accesiones de germoplasma.

Esta forma de análisis surgió con el avance de las plataformas de genotipado masivo permitiendo asociar marcadores SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma a las variantes fenotípicas, tanto cualitativas como cuantitativas. Dicho análisis se basa en el desequilibrio

de ligamiento (DL) a nivel poblacional, resultante de la acumulación de eventos de recombinación históricos durante las sucesivas generaciones que dieron origen a la población de estudio. Por lo tanto, cuando el marcador SNP detectado está asociado al gen que controla el carácter en estudio, se dice que es funcional y se lo denomina QTN (*Quantitative Trait Nucleotide*). Si, por el contrario, dicho marcador se ubica por fuera del gen controlador, el segmento genómico mapeado se denomina QTL. En este sentido, un factor importante para considerar es el nivel de DL, que se refiere al grado de asociación no aleatoria de alelos en diferentes loci y cuyo nivel a través del genoma determina la resolución del mapeo de asociación. Por lo tanto, cuanto mayor sea el DL entre la variante SNP y la variante fenotípica, mayor será la probabilidad de encontrar asociación entre ellos. Por el contrario, cuanto menor sea el DL medido en pares de bases a lo largo del genoma, mayor será el número de marcadores SNPs necesarios para realizar un GWAS y poder mapear QTLs asociados al carácter en estudio con mayor precisión (Zeng *et al.*, 2017).

Existen diferentes aspectos para ser considerados en este tipo de estudio. Entre ellos, el tipo de plataforma de genotipado que se debe utilizar, la eficiencia y el poder de discriminación del método estadístico, y la corrección de factores intrínsecos que puedan generar algún error en la asociación. En este caso, los métodos estadísticos para encontrar la asociación marcador-QTL deben adecuarse al tipo de carácter en estudio, ya sea cuantitativo o cualitativo. En general, para los primeros se usan modelos de regresión lineal, donde el poder estadístico de asociación es suficientemente significativo como para encontrar marcadores SNPs completamente ligados a genes de efecto mayor y menor. Para los segundos, se utilizan métodos de regresión logística o prueba de Fisher, cuyo poder estadístico es muy efectivo para identificar la red de genes asociados a un fenotipo simple (Scherer y Christensen, 2016).

El punto crítico de esta estrategia GWAS es evitar los falsos positivos o los falsos negativos, debidos a diferentes aspectos del análisis que podrían generarlos. Entre ellos, el tamaño de la población y la precisión en el fenotipado. Otro aspecto para considerar es la frecuencia del alelo causal, ya que cuando este es un alelo raro el poder de detección del análisis de asociación disminuye. Al mismo tiempo, otro inconveniente es la posible asociación espuria causada por la estructura de la pobla-

ción y la distancia genética, como cuando por ejemplo las accesiones de una colección núcleo se dividen en subespecies. Dicha estratificación subyacente puede identificarse con métodos estadísticos, como el análisis de componentes principales o el uso de modelos lineales mixtos (Scherer y Christensen, 2016).

En alfalfa se han realizado diferentes análisis de este tipo para identificar loci SNPs asociados a la calidad del forraje (Biazzi *et al.*, 2017), a la tolerancia a la sequía (Zhang *et al.*, 2015; Yu, 2017) y al estrés salino (Yu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019), al reposo invernal (Munjal *et al.*, 2018) y a la resistencia a enfermedades (Yu *et al.*, 2017), entre otros. Estos marcadores SNPs, así identificados, proporcionan una plataforma para el mapeo fino de QTLs a nivel de genoma amplio que luego pueden ser aplicados en selección asistida (SAM) y selección genómica (SG). En este sentido, Zhang *et al.* (2015) evaluaron en invernáculo el índice de resistencia a sequía (IRS) y el contenido relativo de agua (CRA) en un panel de 198 accesiones de alfalfa. Como resultados del GWAS, por un lado, identificaron 34 marcadores SNPs asociados con la tolerancia a la sequía. Diecinueve de ellos mostraron asociación significativa ($p \leq 0,05$) con IRS; de esos, 15 fueron asignados a siete cromosomas, basados en el alineamiento contra el genoma de referencia de *M. truncatula*. Por otro lado, 15 SNPs se asociaron significativamente con CRA y –por alineamiento contra el genoma de referencia de *M. truncatula*– también fueron asignados a siete cromosomas. Además, por medio de la búsqueda de homología con genes candidatos, se identificaron seis SNPs homólogos para loci asociados con IRS y tres SNPs homólogos para loci asociados con CRA. Asimismo, Liu *et al.* (2019) lograron identificar variantes SNPs asociadas a caracteres de tolerancia a la sal en una población avanzada de mejoramiento de 291 individuos de alfalfa en condiciones controladas de invernáculo. En este caso, se calculó un índice de susceptibilidad al estrés (ISE) para cada una de las cinco variables analizadas (peso seco, peso fresco, altura de planta, contenido relativo de agua y conductividad estomática). De esta manera, lograron identificar 53 marcadores SNPs localizados en 49 loci asociados significativamente ($p \leq 0,05$) con los ISE de cada variable. Estos loci se distribuyen sobre los ocho cromosomas y, por homología de secuencias con el genoma de *M. truncatula*, 21 de ellos se asociaron a genes candidatos de tolerancia al estrés salino. Como resultado de ambos

trabajos, los marcadores SNPs asociados –después de ser validados por medio de marcadores diagnóstico en otras poblaciones de mejoramiento o fondos genéticos– se podrán utilizar en SAM o SG.

b- Selección genómica

La selección genómica (SG) es una estrategia de mejoramiento que se está adoptando con mucha rapidez en diferentes programas de mejoramiento (Meuwissen *et al.*, 2001). Es importante su empleo en aquellos cultivos donde el área de la genómica está muy desarrollada –como, por ejemplo, en soja, trigo y maíz–, ya que ha superado varias de las limitaciones que presenta la SAM. Si bien esta última se aplica desde la década de 1990 para la detección e introgresión de genes mayores asociados a caracteres simples, no ha demostrado ser eficiente para caracteres cuantitativos. Esto último se debe a que las asociaciones marcador-QTL utilizadas en esta estrategia se obtienen a partir del mapeo de poblaciones biparentales, en las cuales se pueden capturar con mayor probabilidad genes de efecto mayor. A su vez, el DL entre el marcador-QTL encontrado en dichas poblaciones no suele ser lo suficientemente estable como para garantizar que dicho marcador se pueda utilizar para detectar ese QTL en otras poblaciones o fondos genéticos. Tampoco se ha obtenido una reducción significativa en la duración de los ciclos de selección. Por lo tanto, la relación costo-beneficio solo aparece como interesante para los caracteres de alta heredabilidad. Como consecuencia de todo lo anterior, la SAM ha sido poco efectiva en aquellos caracteres cuantitativos determinados por muchos genes de efecto menor y de alta interacción genotipo-ambiente. Contrariamente, la SG se basa en un modelo de predicción que utiliza la alta densidad de marcadores SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma para identificar aquellos que estén complementemente asociados a los loci del carácter de interés. Esta metodología permite seleccionar individuos solo por su genotipo y sin evaluación fenotípica previa, reduciendo así el tiempo de desarrollo de un cultivar.

La aplicación de esta estrategia requiere definir tres poblaciones: 1- población de estimación o población de entrenamiento (PE); 2- población de validación (PV); y 3- población de selección (PS). Estas tres pueden ser: a- todas físicamente distintas; b- dos poblaciones, donde una de

ellas se utilice como población de estimación y validación; o c- una sola población que cumpla con los tres roles (Deon Vilela de Rezende *et al.*, 2014). Por lo general, se usan las dos primeras estrategias (a y b) (Figura 3). La PE debe estar conformada por más de 500 individuos aproximadamente, que deben ser fenotipados con la mayor precisión posible y genotipados con una alta densidad de marcadores. Es sobre esta población donde se desarrollan los modelos predictivos para la estimación de los valores de mejora genómica (*GEBV: Genomic Estimated Breeding Values*). Para ello, primero se deben estimar para cada genotipo los efectos de todos los marcadores de manera individual. Luego, se identifican aquellos que estén asociados al carácter y, sobre estos, se estiman los efectos sobre el fenotipo y se calcula el valor GEBV para cada individuo. La PV es un grupo pequeño de individuos (aproximadamente 20 % de la PE) que también se debe fenotipar y genotipar, y sobre la cual se verifica la precisión del modelo propuesto. Para ello, los GEBVs son inferidos a partir de los efectos de cada marcador obtenidos en la PE y correlacionados con los valores fenotípicos observados. Con esta correlación y con el valor de heredabilidad del carácter se obtiene el parámetro *selection accuracy* (precisión de selección) que permite determinar la confiabilidad del modelo propuesto. La PS está constituida por los individuos (aproximadamente unos 10.000) que serán seleccionados a través de esta metodología y que solo serán genotipados. A partir de la base de datos genotípicos y de acuerdo con el modelo validado, se pueden inferir tanto sus GEBVs como su futuro desempeño (*performance*) fenotípico (Deon Vilela de Rezende *et al.*, 2014).

El efecto del marcador sobre un genotipo no es igual en los diferentes ambientes, por lo que un determinado modelo de SG solo puede ser aplicado sobre el ambiente donde se obtuvieron los datos fenotípicos de la PE. Por esta razón, para el uso de la SG, se deben considerar los análisis multiambientales que puedan generar modelos que incluyan la interacción genotipo-ambiente ($G \times E$). Otro aspecto para considerar es que los individuos de la PE tienen que tener algún grado de parentesco entre ellos y con la población de selección. De esta forma, puede decirse que la SG se basa en el grado de similitud genética entre ambas poblaciones y en el DL entre el marcador y el carácter (Desta y Ortiz, 2014).

La principal ventaja de la SG sobre la selección fenotípica recurrente es que permite acortar significativamente el tiempo de desarrollo de un

cultivar al alternar los ciclos de selección, haciendo que algunos de ellos se basen únicamente en la constitución genómica de los individuos. De esta manera, se puede aumentar la ganancia genética por unidad de tiempo y de costo; esto es muy ventajoso principalmente en cultivos perennes, donde se requieren muchos años de evaluación para caracteres complejos como el rendimiento. También es conveniente para caracteres donde la selección fenotípica sea ineficiente, o cuando el costo del genotipado sea menor al del fenotipado. Entre las desventajas, pueden mencionarse el costo del genotipado, la pérdida de diversidad cuando la PE no fue constituida sobre la premisa de una base de genética amplia, la dificultad para modelar la interacción G x E en multiambientes y la falta de una guía clara de cómo y cuándo incorporar esta estrategia dentro de un programa de mejoramiento (Crossa *et al.*, 2017).



■ **Figura 3.** Esquema teórico de aplicación de la Selección Genómica en un programa de mejoramiento genético. Adaptado de Deon Vilela de Resende *et al.* (2014). Referencias: Y= valor fenotípico observado; X= matriz de incidencia de los valores fenotípicos; b= vector de efectos fijos; Z= matriz de incidencia de los genotipos; h= vector de efectos aleatorios de los marcadores; e= error residual; GEBV= *Genomic Estimated Breeding Values*; y PE= población de entrenamiento.

Transformación genética

El mejoramiento genético convencional se basa en la existencia natural de variabilidad genética para los caracteres que se desean mejorar y se vale de la reproducción sexual para la modificación de estos. Este hecho hace que el aprovechamiento de la variabilidad esté restringido por barreras de cruzabilidad. Además, para muchos caracteres de importancia agronómica, la selección resulta ineficiente. No obstante, en

términos generales, el mejoramiento genético convencional ha sido exitoso en el desarrollo de cultivares de alfalfa con alta resistencia a plagas y enfermedades o con alta expresión multifoliolada. Por el contrario, no fue eficaz para la mejora de determinados caracteres de importancia, como la tolerancia a herbicidas (Kumar, 2011) o la resistencia a enfermedades foliares.

La metodología de transformación genética que posibilita la introducción asexual de genes en plantas permite revertir situaciones en las cuales la variabilidad genética utilizada en los programas de mejoramiento convencionales no resulta suficiente. En este sentido, se la utilizó con éxito para la introducción de genes que confieren tolerancia a herbicidas, mejorando notablemente el control de malezas en distintos cultivos de importancia económica. Tanto es así que el 80 % de los eventos aprobados para su comercialización en Argentina confieren tolerancia para uno o más herbicidas (CONABIA, 2019; Ministerio de Agroindustria, 2019).

Transgénesis

La problemática de las malezas en alfalfa

Debido a la presencia de más de 120 especies de malezas, se generan importantes pérdidas en las pasturas de alfalfa en nuestro país, a punto tal que se estiman pérdidas de hasta 80 % del rendimiento potencial de forraje (AAPRESID, 2017). Además, como suele ocurrir con otros forrajes, las malezas se cosechan junto con la alfalfa, provocando una pérdida significativa del valor nutricional del forraje y, en consecuencia, una disminución de su valor en el mercado (Rubiales, 2014). Sin embargo, comparado con otros cultivos –como soja, trigo, maíz y arroz–, el mercado mundial de alfalfa es limitado y no incentiva mayormente el desarrollo de agroquímicos específicos, utilizándose por ello herbicidas registrados primero para otros cultivos, como la soja. No obstante, durante los últimos años se desarrollaron productos para soja que no son selectivos para alfalfa, lo que restringe sensiblemente la posibilidad de encontrar nuevas alternativas de control químico. Por lo expuesto, se desprende que en la actualidad el manejo de lotes de alfalfa con herbicidas es complejo, lo que resalta la necesidad de contar con profe-

sionales formados y con experiencia para alcanzar adecuados niveles de control. En este contexto, la falta de herbicidas selectivos, sumado a la ausencia de cultivares tolerantes y al mal manejo de los lotes, intensifica la aparición de malezas resistentes, lo que torna aún más complejo el panorama futuro del manejo de las malezas en el cultivo.

Plataforma para el desarrollo de alfalfas tolerantes a herbicidas

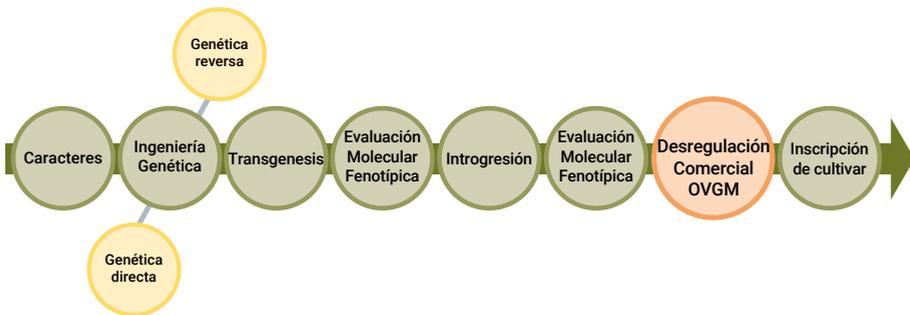
En los Estados Unidos, la empresa Forage Genetics International (FGI), en asociación con Monsanto, liberó en 2005 cultivares transgénicos de alfalfa tolerantes a glifosato de amonio, conocidos como “alfalfas RR” (Roundup Ready®). Posteriormente, la misma empresa liberó cultivares de alfalfa con dos eventos apilados: RR + bajo tenor de lignina (tecnología denominada HarvXtra®). En 2018, FGI, a través de una acción conjunta con INDEAR, logró desregular en Argentina dos cultivares tolerantes a glifosato y de bajo tenor de lignina (RR+HarvXtra) (Ministerio de Agroindustria, 2018), que son los únicos aprobados para ser comercializados en el país.

Si bien las alfalfas RR facilitan el control de malezas en alfalfa, debe considerarse que no presentan la solución integral al problema. Es ampliamente conocido el hecho de que la aplicación masiva de glifosato a nivel global ha promovido la aparición de un número creciente de malezas resistentes (Heap, 2014). Por lo tanto, la disponibilidad de cultivares de alfalfa tolerantes a glifosato no resuelve completamente el problema de las malezas en el cultivo. Recientemente, se ha generalizado a nivel global el concepto que establece que el éxito de un herbicida en particular es solo temporal, haciendo así cada vez mayor la necesidad de desarrollar estrategias alternativas de control para lograr un manejo sustentable de las malezas.

En Argentina, a través de un esfuerzo conjunto que involucró tanto al sector público (INTA y CONICET) como al privado, se estandarizaron protocolos para conformar sintéticas experimentales de alfalfa transgénica desarrolladas completamente en nuestro país. La primera de estas poblaciones posee tolerancia al herbicida glufosinato de amonio (Jozefkowicz *et al.*, 2018; Jozefkowicz *et al.*, 2016) y se encuentra actualmente en proceso de desregulación comercial. Para ello se ha

desarrollado una plataforma de ingeniería genética que maximiza la expresión y la contención del transgen y acelera el proceso de introgresión del evento transgénico en germoplasma elite.

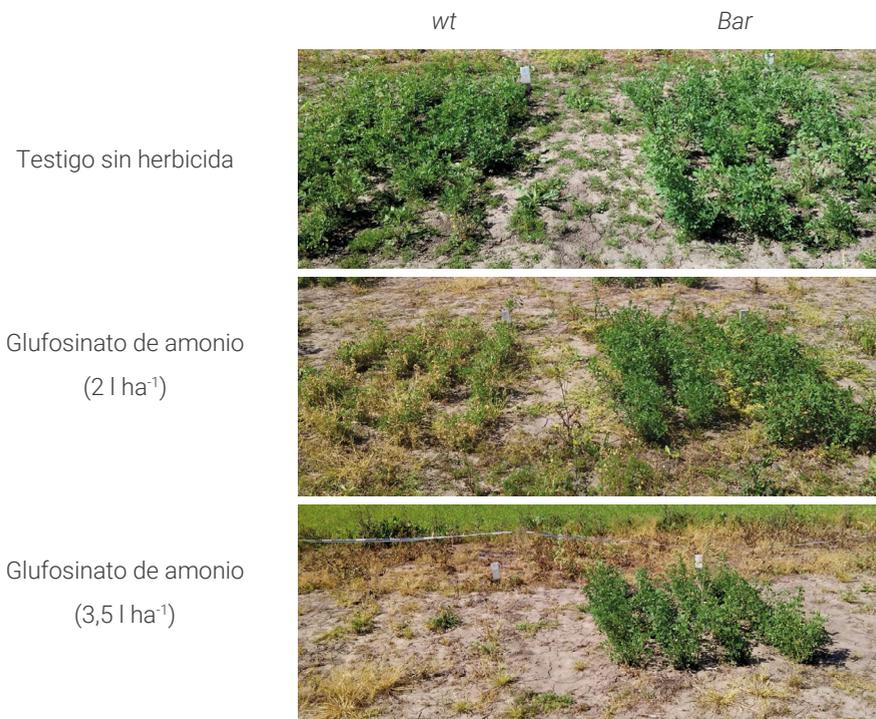
La plataforma comienza con la selección del carácter de interés (Figura 4). En una primera instancia, y teniendo en cuenta las pérdidas significativas que ocasionan las malezas, se eligió para la estandarización del proceso desarrollar la tolerancia a herbicidas a través del gen *bar*, que además de conferir tolerancia al herbicida glufosinato de amonio se puede utilizar como marcador de selección, evitando así el uso de resistencia a antibióticos (Jozefkowicz *et al.*, 2016). El uso del herbicida también facilita la evaluación (*screening*) en cada paso de la plataforma (Jozefkowicz *et al.*, 2018).



■ **Figura 4.** Esquema de la plataforma para el desarrollo de sintéticas experimentales de alfalfa transgénica estandarizada entre INTA y CONICET.

El protocolo de transformación genética de alfalfa vía *Agrobacterium tumefaciens* se lleva a cabo rutinariamente en el actual Laboratorio de Ingeniería Genética de Leguminosas del IGAEF-INTA desde hace 25 años. En ese tiempo se han optimizado diferentes agentes selectivos: kanamicina, higromicina y glufosinato de amonio. En todos los casos, la eficiencia de transformación es muy alta, próxima al 95 %, observándose escapes en forma muy infrecuente. Para la transformación genética se utiliza el clon de regeneración RegelNTA, con alta capacidad para la regeneración *in vitro*, que en alfalfa se produce habitualmente por embriogénesis somática (Saunders y Bingham, 1972). Los materiales, los medios de cultivo, las condiciones de trabajo y el procedimiento en general se describen detalladamente en García *et al.* (2014) y Jozefkowicz *et al.* (2016).

El siguiente paso en la plataforma es la identificación de los eventos con mejor performance fenotípica, lo que se realiza a través de desafíos con glufosinato de amonio. Para ello, se incuban tallos de cada evento transgénico en concentraciones crecientes de glufosinato de amonio en agua, en condiciones controladas de luz (16 h) y temperatura (25 °C). Los eventos seleccionados por mayor tolerancia son seguidamente desafiados en ensayos de aspersión con variadas dosis del herbicida, en diferentes momentos del desarrollo y en distintos tejidos. Los eventos seleccionados se distinguen fácilmente de los convencionales no transformados (genotipos “salvajes” o *wild types*) por su tolerancia al glufosinato de amonio en todos los estadios y tejidos de la planta y en dosis aun mayores a las recomendadas para el control de malezas a campo (Figura 5).



■ **Figura 5.** Desafíos a campo de sintéticas experimentales de alfalfa transgénica con tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Referencias: *wt* (*wild type*): cultivar comercial convencional; *Bar*: sintética transgénica. En todos los casos se aplicó como coadyuvante $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (1 %). Adaptado de Jozefkowicz *et al.* (2018).

El proceso de introgresión consiste en el cruzamiento del evento transgénico con variedades seleccionadas durante cinco ciclos de retrocruzas sucesivas. Dichas retrocruzas buscan reemplazar el bagaje (*background*) genético del clon de alta regeneración (RegelNTA), que no posee aptitudes agronómicas adecuadas. Estos ciclos se llevan a cabo mediante polinización manual en cámaras de cría. Las plantas que se utilizan son plantas jóvenes, crecidas en macetas de 800 ml bajo luz continua a 25 °C para acelerar la floración y lograr, de esta forma, realizar entre tres y cuatro retrocruzas en el término de un año. En cada una de las generaciones se seleccionan los eventos transgénicos por medio de ensayos de aspersión con glufosinato de amonio, que se confirman posteriormente mediante PCR. Para mantener la variabilidad genética y prevenir problemas de endocría se utilizan en cada retrocruza poblaciones de alrededor de cien individuos por variedad. Todo el procedimiento se encuentra detallado en Jozefkowicz *et al.* (2016). Finalmente, y siguiendo la normativa vigente en nuestro país, el material transgénico es evaluado en ensayos a campo a fin de confirmar la tolerancia al glufosinato de amonio y evaluar sus aptitudes agronómicas. En ambos casos, el material generado es contrastado con cultivares comerciales de alto rendimiento (Figura 5). La información obtenida en estos ensayos se puede integrar a la documentación requerida para la desregulación comercial del evento.

Desregulación de OVGМ en Argentina

Argentina se encuentra entre los países pioneros en la adopción de cultivos transgénicos; es el primer país de Latinoamérica que estableció normativas para la regulación y el segundo en el mundo que aprobó un cultivo genéticamente modificado. En el país, todas las actividades con organismos vegetales genéticamente modificados (OVGM) para uso agropecuario están reguladas desde el año 1991. Hasta 2019 se había autorizado la comercialización de 71 eventos transgénicos (Ministerio de Agroindustria, 2019). La soja fue el primer OVGМ aprobado para uso comercial en 1996, en el mismo año que se aprobó en EE. UU. La evaluación de un OVGМ desde su desarrollo hasta su comercialización tiene un costo elevado, conlleva varios años y debe pasar por tres instancias de evaluación, a saber:

I- Análisis de seguridad para el agroecosistema, evaluación que está a cargo de la Dirección de Biotecnología y la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA).

II- Evaluación de inocuidad alimentaria para consumo humano y animal, a cargo del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y del Comité Técnico Asesor en el Uso de OGM (CTAUOGM).

III- Análisis de impacto productivo y comercial de su liberación a gran escala, evaluación que realiza la Dirección de Mercados Agrícolas del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

Cada una de estas etapas es totalmente independiente y cada entidad emite un dictamen no vinculante, que dirige al Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, quien a su vez otorgará o no los permisos para el desarrollo y comercialización de OGM en la Argentina. Como se mencionó previamente, la evaluación respecto del comportamiento agronómico del OVGM la realiza la Dirección de Biotecnología y la CONABIA. El análisis de las solicitudes presentadas se realiza caso a caso, basándose en criterios científicos y técnicos establecidos en el marco regulatorio (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2011; Ministerio de Agroindustria, 2019). Este trabajo está a cargo de especialistas, tanto del sector público como privado, que analizan las solicitudes en profundidad. El objetivo de esta evaluación es asegurar que, bajo las mismas condiciones, el comportamiento agronómico del OVGM sea similar al del organismo no genéticamente modificado (homólogo convencional). Además de las características del OVGM en cuestión, también se analiza el objetivo de la actividad para desarrollar, el cómo, dónde y cuándo se desarrollará dicha actividad y la idoneidad del solicitante.

Los solicitantes, para poder realizar ensayos o multiplicaciones con OVGM, deben estar inscriptos previamente en el Registro Nacional de Operadores con Organismos Vegetales Genéticamente Modificados (RNOOVGM). El INTA está inscripto en dicho registro desde el año 2004 (Registro Nacional de Operadores con OVGM, 2004). En una primera etapa, el solicitante debe presentar información detallada del OVGM, describiendo el modo de obtención, las construcciones utilizadas y el material genético introducido en el producto final. También se deben detallar tanto el lugar donde se realizarán los ensayos como las medi-

das de contención y de aislamiento, además de un plan de acción ante eventuales escapes, a fin garantizar el aislamiento del OGM regulado (Ministerio de Agroindustria, 2019). Luego, en una segunda etapa, se realiza un análisis de riesgo que estima la bioseguridad para el agroecosistema. El objetivo de esta etapa es determinar y evaluar los posibles efectos adversos de la liberación de los OVGM, incluyendo el impacto sobre la conservación y la utilización sostenible de la biodiversidad y los riesgos para la salud humana por exposición no alimentaria. En esta etapa se detallan el comportamiento agrofenotípico del OVGM, en comparación con su homólogo convencional y los métodos actualizados de detección del OVGM (Ministerio de Agroindustria, 2019).

Además, se debe demostrar la inocuidad alimentaria del OVGM para consumo humano y animal, cuya evaluación –como ya se mencionó– está a cargo de SENASA (2002). En esta etapa se dimensionan los riesgos potenciales que podrían derivar del consumo como alimento tanto del OVGM como de sus subproductos. Se determina la presencia de tóxicos y de alérgenos, así como la ocurrencia de posibles modificaciones nutricionales que se pudieron haber generado por la transformación genética.

Por último, la tercera etapa es realizada por la Dirección de Mercados Agrícolas que determina la conveniencia de la comercialización del OGM de manera de evitar potenciales impactos negativos en las exportaciones argentinas. Para ello el solicitante deberá hacer un extenso estudio de mercado con la información requerida por la mencionada dirección (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2011).

Como resultado de estas tres etapas se emiten informes técnicos que se elevan al MAGyP, organismo que toma la decisión final sobre autorizar o no la siembra, el consumo (humano y animal) y la comercialización del cultivo OVGM analizado.

En cuanto a los productos obtenidos por otras herramientas biotecnológicas diferentes de la transgénesis, entre las cuales se incluye la edición génica, se estableció que se evaluarán caso a caso en una instancia de consulta previa (ICP) (Ministerio de Agroindustria, 2019) para establecer si el producto en cuestión es alcanzado o no por la Resolución 763/11. En esta instancia, la CONABIA evaluará si se ha generado

o no una nueva combinación de material genético. Para ello, analizará si se ha producido una inserción en el genoma de una construcción genética definida. Si se determina que no se ha producido una nueva combinación, entonces el producto no será alcanzado por la Resolución 763/11. Por consiguiente, no será necesario transitar la desregulación comercial antes mencionada y el producto seguirá las mismas vías que los productos obtenidos por métodos tradicionales.

Edición génica

La edición génica es otra herramienta que representa una verdadera revolución tecnológica y que se ha consolidado como una poderosa tecnología de vanguardia para modificar genomas de manera rápida, eficiente y precisa. La técnica utiliza el sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), que forma parte del aparato inmune natural de algunas bacterias y archeas frente a las invasiones de virus. El genoma bacteriano acumula secuencias de los virus a los que se ha enfrentado, que son luego utilizadas como guías de una endonucleasa asociada Cas (*CRISPR associated protein*) que, frente a un nuevo ataque, cortará la cadena de ADN invasora y otorgará así inmunidad (Bolotin *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005). Tanto la capacidad de reconocimiento y corte como la simpleza y los pocos requerimientos que posee esta maquinaria hicieron evidente el potencial de CRISPR como un nuevo sistema de edición genética programable para cualquier organismo.

CRISPR/Cas9 es un sistema de edición de *Streptococcus pyogenes* que se ha adaptado particularmente para múltiples organismos. Se trata un complejo ribonucleoproteico que consta de la endonucleasa Cas9 y de una molécula de ARN *single guide* (ARNsg), que guiará a la enzima a la secuencia blanco (*target*) para generar un corte doble hebra o simple hebra (Jinek *et al.*, 2012; Charpentier y Doudna, 2013; Doudna y Charpentier, 2014) (Figura 6).

Para aplicar esta maquinaria en cualquier organismo se diseña primero el ARNsg que contiene una secuencia guía de 20 nt del gen *target* y una secuencia de andamiaje o *scaffold*. Seguidamente, para efectuar el corte, Cas9 requiere la identificación de un pequeño motivo conocido

Directed Repair), lo que evita la generación de errores. Sin embargo, la HDR tiene una eficiencia extremadamente baja (Richardson *et al.*, 2016). Si bien el sistema CRISPR/Cas9 asociado a HDR puede utilizarse para realizar reemplazos alélicos, el mecanismo NHEJ resulta ser más eficaz y es el que se utiliza principalmente para lograr la eliminación de la expresión de un gen (*knock-out*) o de fragmentos cromosómicos. Típicamente, para realizar el *knock-out* de un gen se utilizan vectores que contienen la enzima Cas9 y las guías que hibridan con el gen *target* y conducen a la endonucleasa al sitio donde realizará el corte. Para eliminar la expresión de un gen, se diseñan al menos dos guías de forma tal de generar dos cortes y eliminar el fragmento de ADN entre ellos. Para aumentar la eficiencia del *knock-out*, las guías se diseñan generalmente en el primer o segundo exón del gen *target*. Obviamente, un número mayor de guías hará que el proceso sea más eficaz. Finalmente, y haciendo uso de distintos paquetes informáticos (*software*) disponibles, debe asegurarse que cada guía cuente con la mayor probabilidad de generar los cambios buscados, lo que le otorga un alto *score* (es decir, un lugar destacado en el ranking de guías). Complementariamente, también se busca que esas guías, para ser elegidas, produzcan el menor número de *targets* no deseados (*off-targets*) posibles. Mediante este método pueden eliminarse varios genes en simultáneo, ya sea por el agregado de guías específicas o por el diseño de guías para zonas conservadas entre varios genes (característico de las familias génicas).

La técnica CRISPR/Cas9 puede utilizarse además para realizar la generación de cambios puntuales en la secuencia de ADN, es decir, de una única base o nucleótido, lo que se denomina edición de base (*base editing*) (Figura 7b). Para realizar la edición de base se utilizan vectores que poseen una endonucleasa que reconoce a los genes *target* –pero que es enzimáticamente inactiva– fusionada a una enzima que produce un cambio de base conocido. Por ejemplo, la enzima citidina deaminasa, que produce la desaminación de las citosinas que se encuentran río arriba de la secuencia PAM del gen *target*, es utilizada en este sistema para mutar la citosina a uracilo.

El sistema CRISPR/Cas9 se ha aplicado de manera eficiente en plantas desde 2013 para la edición o eliminación de un gen de manera simple, específica y estable (Feng *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013; Nekrasov *et al.*,

2013; Shan *et al.*, 2013; Xie y Yang, 2013). Además, cuenta con la bondad trascendental de generar cambios en el genoma sin dejar trazas de material génico exógeno. En las plantas, la adquisición del ARNsg que contiene las guías y la Cas9 puede realizarse a través del bombardeo de vectores por biobalística o a través de *Agrobacterium tumefaciens* y la utilización de vectores binarios. No obstante, la estrategia utilizada depende de los objetivos y de las posibilidades considerando la especie en estudio.

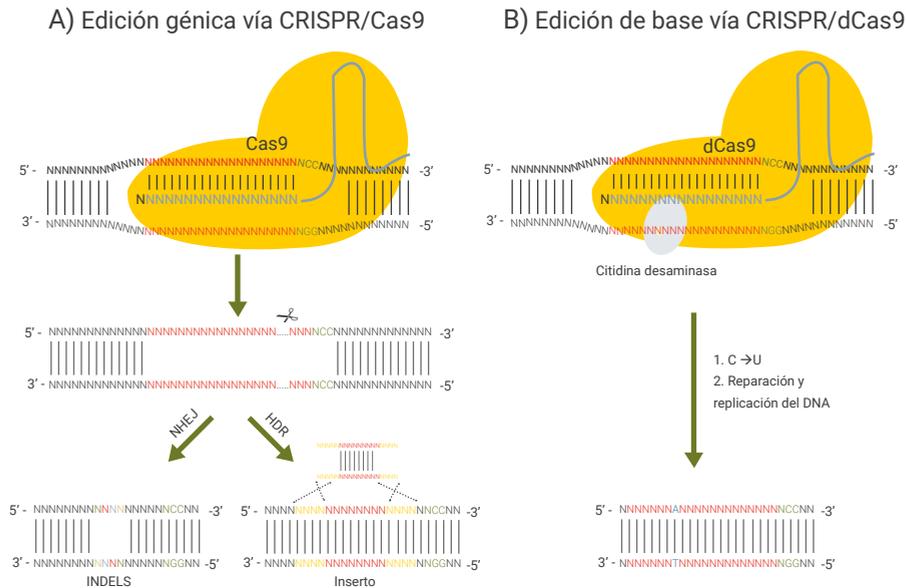
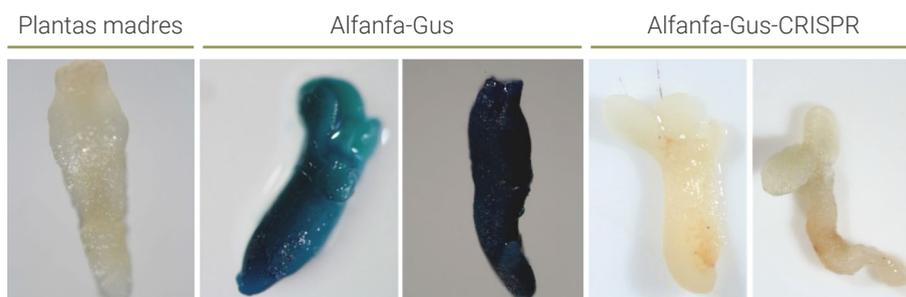


Figura 7. Representación esquemática de los usos más frecuentes del sistema CRISPR/Cas9 en plantas. A) Técnica de unión de extremos no homólogos. B) Técnica de edición de base.

La edición génica emerge como una herramienta sumamente útil para el mejoramiento de cultivos de interés agroeconómico, ya que permite la modificación dirigida de genes de interés y la obtención de productos libres de transgenes. Es por ello que el Instituto de Genética IGEAF-INTA ha comenzado a implementar esta tecnología de edición para el mejoramiento de la alfalfa. Para el primer abordaje de la técnica se utilizó un vector binario (cedido por Gabriela Massa de INTA Balcarce) que cuenta con las guías y la maquinaria para generar el *knock-out* del gen reportero GUS y que se aplicó en plantas transgénicas que sobreexpresaban

dicho gen y que habían sido generadas previamente en el laboratorio. Las plantas obtenidas tras la transformación con este vector demostraron una reducción total o parcial de la actividad glucuronidasa, evidenciando una reversión del fenotipo con respecto a los individuos sobreexpresantes. Este primer abordaje demostró la efectividad de la maquinaria de edición CRISPR/Cas9 para eliminar la expresión de un gen de manera dirigida en alfalfa (Figura 8).



■ **Figura 8.** Estandarización de la tecnología CRISPR/Cas9 en alfalfa utilizando el gen reportero GUS.

En el marco de una estadía en el laboratorio del Dr. E. Blumwald en UC Davis, EE. UU., que estandarizó el sistema CRISPR/Cas9 para especies modelo, se construyeron vectores específicos para genes de interés en alfalfa que pueden utilizarse en los dos abordajes mencionados previamente: silenciamiento o *knock-out* y edición de base (*base editing*). Los genes seleccionados en alfalfa se relacionan con la tolerancia a herbicidas y a estrés abiótico, el aumento de la biomasa y la calidad, la adaptabilidad y la nodulación (fijación biológica del N₂). Estos trabajos apuntan no solo a alcanzar un mayor entendimiento sobre la fisiología de la alfalfa, sino también a generar cultivares de mayor productividad y calidad, mejor comportamiento en áreas marginales y tolerancia a herbicidas.

Consideraciones finales

A lo largo de este capítulo se describió el desarrollo de las diferentes técnicas moleculares que permitieron generar un conocimiento más amplio sobre la genética de la alfalfa y su aplicación al mejoramiento del cultivo. El desarrollo en el área de la genómica permitió obtener a

relativamente bajo costo una gran cantidad de datos para identificar con mayor probabilidad estadística marcadores SNPs asociados a caracteres de interés agronómico. En igual sentido, la implementación de la selección asistida por marcadores para incrementar la frecuencia de genes de efecto mayor debería complementarse con estrategias como la selección genómica, que permite seleccionar individuos a partir de la estimación estadística de su valor de mejora. En este contexto, la resolución de los problemas que enfrenta el cultivo implicaría la adopción de estas estrategias para un mejor uso de la variabilidad existente, de manera de obtener en menor tiempo nuevas variedades con mejor desempeño.

La transgénesis y la edición génica permiten generar una variabilidad genética extra que posibilita la obtención de variedades de alfalfa tolerantes a herbicidas. A su vez, estas técnicas también aparecen como muy promisorias para la mejora de otros caracteres de interés agronómico.

Tal vez el mayor desafío en el futuro inmediato sea la incorporación paulatina y eficiente de estas nuevas estrategias y metodologías a fin de actualizar los programas de mejoramiento de alfalfa para el desarrollo de cultivares comerciales.

BIBLIOGRAFÍA

AAPRESID. 2017. *Manejo de malezas en pasturas*. (Disponible en <http://www.aapresid.org.ar/blog/manejo-de-malezas-en-pasturas/> consultado: 18/12/2019).

ADHIKARI, L.; A.M. MISSAOUI. 2019. *Quantitative trait loci mapping of leaf rust resistance in tetraploid alfalfa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 106: 238-245.

ADHIKARI, L.; S.O. MAKAJU; A.M. MISSAOUI. 2019. *QTL mapping of flowering time and biomass yield in tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.)*. *BMC Plant Biology* 19: 359. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1946-0>

ADHIKARI, L.; O.M. LINDSTROM; J. MARKHAM; A.M. MISSAOUI. 2018. *Dissecting key adaptation traits in the polyploid perennial Medicago sativa using GBS-SNP mapping*. *Frontiers in Plant Science* 9 (July): 1-19. <https://10.3389/fpls.2018.00934>

ALARCÓN-ZÚÑIGA, B.; P. SCOTT; K.J. MOORE; D. LUTH; E.C. BRUMMER. 2004. *Quantitative Trait Locus Mapping of Winter Hardiness Metabolites in Autotetraploid Alfalfa (M. sativa)*. En: HOPKINS, A.; Z.Y. WANG; R. MIAN; M. SLEDGE; R.E. BARKER (Eds.). *Molecular Breeding of Forage and Turf*. Kluwer Academic Publishers, Oklahoma (EUA). 97-104 pp.

ANDERS, C.; O. NIEWOEHNER; A. DUERST; M. JINEK. 2014. *Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease*. *Nature* 513: 569-573.

ANNICCHIARICO, P.; Y. WEI; E.C. BRUMMER. 2017. *Genetic structure of putative heterotic populations of alfalfa*. *Plant Breeding* 136(5): 671-678. <https://doi.org/10.1111/pbr.12511>

ANNICCHIARICO, P.; N. NAZZICARI; A. ANANTA; M. CARELLI; Y. WEI; E. C. BRUMMER. 2016. *Assessment of Cultivar Distinctness in Alfalfa: A Comparison of Genotyping-by-Sequencing, Simple-Sequence Repeat Marker, and Morphophysiological Observations*. *The Plant Genome* 9 (2): 12. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.10.0105>

ANNICCHIARICO, P.; N. NAZZICARI; X. LI; Y. WEI; L. PECETTI; E.C. BRUMMER. 2015. *Accuracy of Genomic Selection for alfalfa biomass yield in different reference populations*. *BMC Genomics* 16(1): 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2212-y>

ANNICCHIARICO, P.; C. SCOTTI; M. CARELLI; L. PECETTI. 2010. *Questions and avenues for lucerne improvement*. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 46 (1): 1-13.

ARMOUR, D.; K.S. AITKEN; E. AITKEN; C. LAMBRIDES; M. DIETERS; J. IRWIN. 2006. *Identification of the genomic location of QTL for Phytophthora medicaginis resistance in alfalfa*. *Proceedings of the XIV Annual International Plant and Animal Genome Conference*. January 14-18, San Diego, California (EUA).

BABB, M.G.M. 2014. *DNA marker assisted selection to improve drought tolerance in alfalfa (Medicago sativa L.)*. *PhD Thesis, New Mexico State University, Las Cruces, NM, EUA*. (Disponible: <http://espace.wheaton.edu/lr/a-sc/archives/theses/201307-PsyD-PSYC-FikkertLindsay.pdf> consultado: 20/09/2019).

BAGAVATHIANNAN, M.V.; B. JULIER; P. BARRE; R.H. GULDEN; R.C. VAN ACKER. 2010. *Genetic diversity of feral alfalfa (Medicago sativa L.) populations occurring in Ma-*

nitoba, Canada and comparison with alfalfa cultivars: An analysis using SSR markers and phenotypic traits. Euphytica 173 (3): 419-432. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0156-5>

BAIRD, N.A.; P.D. ETTER; T.S. ATWOOD; M.C. CURREY; A.L. SHIVER; Z.A. LEWIS; E.U. SELKER; W.A. CRESKO; E.A. JOHNSON. 2008. *Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. Plos One*, 3, e3376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>

BALLOUZ, S.; A. DOBIN; J.A. GILLIS. 2019. *Is it time to change the reference genome? Genome Biology* 20:159. DOI: 10.1186/s13059-019-1774-4

BARCACCIA, G.; E. ALBERTINI; D. ROSELLINI; S. TAVOLETTI; F. VERONESI. 2000. *Inheritance and mapping of 2n-egg production in diploid alfalfa. Genome* 43: 528-537. <https://doi.org/10.1139/gen-43-3-528>

BARCACCIA, G.; E. ALBERTINI; S. TAVOLETTI; M. FALCINELLI; F. VERONESI. 1999. *AFLP fingerprinting in Medicago spp.: Its development and application in linkage mapping. Plant Breeding* 118: 335-340. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.1999.00376.x>

BARGHI, M.; H. MONIRIFAR; A.R. HAGHIGHI; A. GHANBARI; S.A. MOHAMMADI; B. SIASAR. 2016. *Assessment of genetic variation in alfalfa populations using RAPD markers. Analele Universității Din Oradea, Fascicula Biologie XXIII (2): 78-83.*

BARKER, D.G.; S. BIANCHI; F. BLONDON; Y. DATTEÉ; G. DUC; S. ESSAD; P. FLAMENT; P. GALLUSCI; G. GÉNIER; P. GUY; X. MUEL; J. TOURNEUR; J. DÉNARIÉ; T. HUGUET. 1990. *Medicago truncatula, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. Plant Molecular Biology Reporter* 8: 40-49. DOI: 10.1007/BF02668879

BASBAG, M.; A. AYDIN; M. SAKIROGLU. 2017. *Evaluating Agronomic Performance and Investigating Molecular Structure of Drought and Heat Tolerant Wild Alfalfa (Medicago sativa L.) Collection from the Southeastern Turkey. Biochemical Genetics* 55(1): 63-76. <https://doi.org/10.1007/s10528-016-9772-7>

BASIGALUP, D.H.; D.K. BARNES; R.E. STUCKER. 1995. *Development of a Core Collection for Perennial Medicago Plant Introductions. Crop Science* 35 (4): 1163-1168.

BECKMANN, J.S.; M. SOLLER. 1983. *Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theoretical and Applied Genetics* 67 (1): 35-43. <https://doi.org/10.1007/BF00303919>

BHANDARI, H.S.; A.H. AL LAWATI; I.M. RAY. 2011. *Amplified fragment length polymorphism marker diversity among high yielding perennial alfalfa (Medicago sativa L.) core collection accessions. Crop Science* 51 (3): 1110-1121. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.08.0492>

BIAZZI, E.; N. NAZZICARI; L. PECETTI; E.C. BRUMMER; A. PALMONARI; A. TAVA; P. ANNICCHIARICO. 2017. *Genome Wide Association Mapping and Genomic Selection for alfalfa (Medicago sativa) forage quality traits. Plos One*, 12 (1), e0169234. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169234>

- BINGHAM, E.; T. MCCOY. 1979. *Cultivated alfalfa at the diploid level: origin, reproductive stability, and yield of seed and forage*. *Crop Science* 19: 97-100. DOI: 10.2135/cropsci1979.0011183X001900010024x
- BLONDON, F.; D. MARIE; S. BROWN; A. KONDOROSI. 1994. *Genome size and base composition in Medicago sativa and M. truncatula species*. *Genome* 37 (2): 264-270. DOI: 10.1139/g94-037
- BOLOTIN, A.; B. QUINQUIS, B.A. SOROKIN; S.D. EHRLICH. 2005. *Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin*. *Microbiology* 151: 2551-2561.
- BORÉM, A.; E. TEIXEIRA CAIXETA. 2006. *Marcadores moleculares*. Viçosa, MG (BR), 374 p.
- BOTSTEIN, D.; R.L. WHITE; M. SKOLNICK; R.W. DAVIS. 1980. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms*. *American Journal of Human Genetics* 32 (3): 314-331.
- BOUTON, J.H. 2012. *Breeding lucerne for persistence*. *Crop and Pasture Science* 63 (2):95-106. <http://dx.doi.org/10.1071/CP12009>
- BREIMAN, L. 2001. *Random Forests*. *Machine Learning* 45 (1): 5-32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- BRESEGHELLO, F.; M.E. SORRELLS. 2006. *Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (Triticum aestivum L.) cultivars*. *Genetics* 172: 1165-1177.
- BROUWER, D.J.; T.C. OSBORN. 1999. *A molecular marker linkage map of tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Theoretical and Applied Genetics* 99 (7-8): 1194-1200. <https://doi.org/10.1007/s001220051324>
- BROUWER, D.J.; S.H. DUKE; T.C. OSBORN. 2000. *Mapping genetic factors associated with winter hardiness, fall growth, and freezing injury in autotetraploid alfalfa*. *Crop Science* 40 (5): 1387-1396.
- BRUMMER, E.C.; J.H. BOUTON; G. KOCHERT. 1993. *Development of an RFLP map in diploid alfalfa*. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 329-332. <https://doi.org/10.1007/BF01184927>
- BRUMMER, E.C.; G. KOCHERT; J.H. BOUTON. 1991. *RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa*. *Theoretical and Applied Genetics* 83 (1): 89-96. <https://doi.org/10.1007/BF00229230>
- BURR, B.; S.V. EVOLA; F.A. BURR; J.S. BECKMANN. 1983. *Application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding*. En: SETLOW, J.K. y A. HOLLAENDER (Eds.). *Genetic Engineering*. Plenum Press. Nueva York (EUA). 45-59 pp.
- CASLER, M.D.; E.C. BRUMMER. 2008. *Theoretical expected genetic gains for among and-within family selection methods in perennial forage crops*. *Crop Science* 48: 890-902.
- CERVIGNI, G.D.L.; J.P.A. ORTIZ; S.E. FEINGOLD. 2010. *Construcción de mapas de ligamiento genético, localización de genes y regiones cromosómicas asociadas a caracteres*

de interés en plantas. En: LEVITUS, G.; V. ECHENIQUE; C. RUBINSTEIN; E. HOPP; L. MROGINSKI (Eds.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II, Capítulo 6*. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. 86-99 pp.

CHARPENTIER, E.; J.A. DOUDNA. 2013. *Rewriting a genome*. *Nature* 495: 50-51.

COLLARD, B.C.; D.J. MACKILL. 2008. *Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Serie B-Biological Sciences* 363: 557-572.

COLLARD, B.C.Y.; M.Z.Z. JAHUFER; J.B. BROUWER; E.C.K. PANG. 2005. *An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts*. *Euphytica* 142: 169-196. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>

CONABIA. 2019. *Dirección de Biotecnología y la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria*. (Disponible: <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/biotecnologia/conabia/> consultado: 25/11/2019).

CORDER, E.; A. SAUNDERS; W. STRITTMATTER; D. SCHMECHEL; P. GASKELL; G. SMALL; A.D. ROSES; J. HAINES; M.A. PERICAK-VANCE. 1993. *Gene dose of apolipoprotein e type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. *Science* 261 (5123): 921-923.

CROSSA, J.; P. PÉREZ-RODRÍGUEZ; J. CUEVAS; O. MONTESINOS-LÓPEZ; D. JARQUÍN; G. DE LOS CAMPOS; J. BURGUEÑO; J.M. CAMACHO-GONZÁLEZ; S. PÉREZ-ELIZALDE; Y. BEYENE; S. DREISIGACKER; R. SINGH; X. ZHANG; M. GOWDA; M. ROORKIWAL; J. RUTKOSKI; R.K. VARSHNEY. 2017. *Genomic Selection in Plant Breeding: Methods, Models, and Perspectives*. *Trends in Plant Science* 22 (11): 961-975. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.011>

DEON VILELA DE REZENDE, M.; F. FONSECA; E. SILVA; M.F.R. RESENDE JR.; C.F. AZEVEDO. 2014. *Genome-Wide Selection (GWS)*. En: BORÉM A.; R. FRITSCHÉ-NETO (Eds.). *Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. Capítulo 5. Academic Press, Elsevier Inc., California (EUA). 105-133 pp.

DESTA, Z.A.; R. ORTIZ. 2014. *Genomic selection: Genome-wide prediction in plant improvement*. *Trends in Plant Science* 19 (9). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.05.006>

DIWAN, N.; J.H. BOUTON; G. KOCHERT; P.B. CREGAN. 2000. *Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa*. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 165-172.

DOMINGUEZ DEL ANGEL, V.; E. HJERDE; L. STERCK; S. CAPELLA-GUTIERREZ; C. NOTRDAME; O. VINNERE PETTERSON; J. AMSELEM; L. BOURI; S. BOCS; C. KLOPP; J.F. GIBRAT; A. VLASOVA; B.L. LESKOSEK; L. SOLER; M. BINZER-PANCHAL; H. LANTZ. 2018. *Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation*. *F1000Res*, 7: ELIXIR-148. DOI:10.12688/f1000research.13598.1

DOUDNA, J.A.; E. CHARPENTIER. 2014. *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. *Science* 346: 1077.

ECHT, C.S.; K.K. KIDWELL; S.J. KNAPP; T.C. OSBORN; T.J. MCCOY. 1994. *Linkage mapping in diploid alfalfa (Medicago sativa)*. *Genome* 37: 61-71. <https://doi.org/10.1139/g94-008>

ELSHIRE, R.J.; J.C. GLAUBITZ; Q. SUN; J.A. POLAND; K. KAWAMOTO; E.S. BUCLER; S.E. MITCHELL. 2011. *A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species*. *Plos One*, 6 (5), e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>

FENG, Z.; B. ZHANG; W. DING; X. LIU; D.L. YANG; P. WEI. 2013. *Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system*. *Cell Res* 23: 1229-1232.

FERREIRA, M.E.; D. GRATTAPAGLIA. 1996. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética (2.º Ed.)*. EMBRAPA, Brasília, DF, (Brasil), 220 p.

FLAJOULOT, S.; J. RONFORT; P. BAUDOUIN; P. BARRE; T. HUGUET; C. HUYGHE; B. JULIER. 2005. *Genetic diversity among alfalfa (Medicago sativa) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers*. *Theoretical and Applied Genetics* 111 (7): 1420-1429. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0074-4>

FLINT-GARCÍA, S.A.; J.M. THORNBERRY; E.S. BUCKLER. 2003. *Structure of linkage disequilibrium in plants*. *Annual Review of Plant Biology* 54: 357-374.

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

GELDERMANN, H. 1975. *Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods*. *Theoretical and Applied Genetics* 46: 319-330.

GHÉRARDI, M.; B. MANGIN; B. GOFFINET; D. BONNET; T. HUGUET. 1998. *A method to measure genetic distance between allogamous populations of alfalfa (Medicago sativa) using RAPD molecular markers*. *Theoretical and Applied Genetics* 96 (3-4): 406-412. <https://doi.org/10.1007/s001220050756>

GONZAGA PEREIRA, M.; T.N. SANTANA PEREIRA. 2006. *Marcadores moleculares no pré-melhoramento de plantas*. En: BORÉM A.; E. TEIXEIRA CAIXETA, (Eds.). *Marcadores moleculares*. Capítulo 3. Viçosa, MG (Brasil). 85-106 pp.

GRANDÓN, N.G.; Y. ALARCON; M.V. MORENO; V. AROLFO; A. ORODIZZI; D.H. BASIGALUP; J.O. GIECO; C. BRUNO. 2013. *Genetic diversity among alfalfa genotypes (Medicago sativa L.) of non-dormant cultivars using SSR markers and agronomic traits*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Cuyo* 45 (2): 181-195.

GREILHUBER, J.; T. BORSCH; K. MÜLLER; A. WORBERG; S. POREMBSKI; W. BARTHLOTT. 2006. *Smallest angiosperm genomes found in Lentibulariaceae with chromosomes of bacterial size*. *Plant Biology* 8: 770-777.

GRODZICKER, T.; J. WILLIAMS; P. SHARP; J. SAMBROOK. 1974. *Physical Mapping of Temperature-sensitive Mutations of Adenoviruses*. *Cold. Quant. Biol.* 39: 439-446.

- GUO, S.M.; L.G. KAMPHUIS; L.L. GAO; J.P. KLINGLER; J. LICHTENZVEIG; O. EDWARDS; K.B. SINGH. 2012. *Identification of distinct quantitative trait loci associated with defense against the closely related aphids Acyrtosiphon pisum and A. kondoi in Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany* 63 (10): 3913-3922.
- HAN, Y.; D.M. KHU; M.J. MONTEROS. 2012. *High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Molecular Breeding* 29 (2): 489-501.
- HAN, Y.; Y. KANG; I. TORRES-JEREZ; F. CHEUNG; C.D. TOWN; P.X. ZHAO; M.K. UDVARDI; M.J. MONTEROS. 2011. *Genome-wide SNP discovery in tetraploid alfalfa using 454 sequencing and high resolution melting analysis*. *BMC Genomics* 12 (July). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-350>
- HAPMAP PROJECT. 2016. *Medicago truncatula* (Disponibile: http://www.medicago-hapmap.org/downloads/CADL/CADL_v0.95p_README.pdf consultado: 14/02/2020).
- HEAP, L. 2014. *Global perspective of herbicide-resistant weeds*. *Pest Management Sci.* 70 (9):1306-1315.
- HERRMANN, D.; S. FLAJOULOT; P. BARRE; C. HUYGHE; J. RONFORT; B. JULIER. 2017. *Comparison of morphological traits and molecular markers to analyse diversity and structure of alfalfa (Medicago sativa L.) cultivars*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 65 (2) 527-540. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0551-z>
- HERRMANN, D.; S. FLAJOULOT; B. JULIER. 2010. *Sample size for diversity studies in tetraploid alfalfa (Medicago sativa) based on codominantly coded SSR markers*. *Euphytica* 171 (3): 441-446. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-0077-3>
- HIJANO, E.H.; J. PÉREZ FERNÁNDEZ. 1995. *Enfermedades de la alfalfa*. En: HIJANO, E.H.; A. NAVARRO (Eds.). *La Alfalfa en la Argentina*. INTA-Subprograma alfalfa. Agro de Cuyo, Mendoza (AR), Manuales N.º 11, Cap. 1. 13-18 pp.
- İLHAN, D.; X. LI; E.C. BRUMMER; M. SAKIROGLU. 2016. *Genetic diversity and population structure of tetraploid accessions of the Medicago sativa-falcata complex*. *Crop Science* 56 (3): 1146-1156. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.12.0750>
- JIA, C.; F. ZHAO, X. WANG; J. HAN; H. ZHAO; G. LIU; Z. WANG. 2018. *Genomic Prediction for 25 agronomic and quality traits in alfalfa (Medicago sativa)*. *Frontiers in Plant Science* 9: 1220. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01220>
- JINEK, M.; K. CHYLINSKI; I. FONFARA; M. HAUER; J.A. DOUDNA; E. CHARPENTIER. 2012. *A programmable Dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *Science* 337: 816-821.
- JOZEFKOWICZ, C.; R. FRARE; R. FOX; A. ODORIZZI; V. AROLFO; E. PAGANO; D. BASIGALUP; N. AYUB; G. SOTO. 2018. *Maximizing the expression of transgenic traits into elite alfalfa germplasm using a supertransgene configuration in heterozygous conditions*. *Theor. Appl Genet.* 131 (5):1111-1123. doi: 10.1007/s00122-018-3062-1

- JOZEFKOWICZ, C.; E. BOTTERO; C. PASCUAN; E. PAGANO; N. AYUB; G. SOTO. 2016. *Minimizing the time and cost of production of transgenic alfalfa libraries using the highly efficient completely sequenced vector pPZP200BAR*. *Plant Cell Rep.* 35 (9): 1987-1990. doi: 10.1007/s00299-016-2026-7
- JULIER, B.; K. BERNARD; C. GIBELIN; T. HUGUET; F. LELIÈVRE. 2010. *QTL for Water Use Efficiency in Alfalfa*. En: HUYGHE, C. (Ed.). *Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding*. Springer Science+Business Media B.V. 433-436. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-8706-5>
- JULIER, B.; T. HUGUET; F. CHARDON; R. AYADI; J.B. PIERRE; J.M. PRÓSPERI; P.; BARRE; C. HUYGHE. 2007. *Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume *Medicago truncatula**. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 1391-1406.
- JULIER, B.; S. FLAJOULOT; P. BARRE; G. CARDINET; S. SANTONI; T. HUGUET; C. HUYGHE. 2003. *Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers*. *BMC Plant Biology* 3: 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-3-9>
- JUNG, H.G.; C.C. SHEAFFER; D.K. BARNES; J.L. HALGERSON. 1997. *Forage Quality Variation in the U.S. Alfalfa Core Collection*. *Crop Science* 37 (4): 1361-1366.
- KALÓ, P.; G. ENDRE; L. ZIMÁNYI; G. CSANÁDI; G.B. KISS. 2000. *Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*)*. *Theoretical and Applied Genetics* 100 (5): 641-657. <https://doi.org/10.1007/s001220051335>
- KAMPHUIS, L.G.; J. LICHTENZVEIG; K. PENG; S.M. GUO; J.P. KLINGLER; K.H.M. SIDDIQUE; L.L. GAO; K.B. SINGH. 2013. *Characterization and genetic dissection of resistance to spotted alfalfa aphid (*Therioaphis trifolii*) in *Medicago truncatula**. *Journal of Experimental Botany* 64 (16): 5157-5172.
- KAMPHUIS, L.G.; J. LICHTENZVEIG; R.P. OLIVER; S.R. ELLWOOD. 2008. *Two alternative recessive quantitative trait loci influence resistance to spring black stem and leaf spot in *Medicago truncatula**. *BMC Plant Biology* 8 (1): 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-30>
- KHU, D.M.; R. REYNO; Y. HAN; P.X. ZHAO; J.H. BOUTON; E.C. BRUMMER; M.J. MONTEROS. 2013. *Identification of aluminum tolerance quantitative trait loci in tetraploid alfalfa*. *Crop Science* 53 (1): 148-163. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.03.0181>
- KIDWELL, K.K.; E.T. BINGHAM; D.R. WOODFIELD; T.C. OSBORN. 1994. *Relationships among genetic distance, forage yield and heterozygosity in isogenic diploid and tetraploid alfalfa populations*. *Theoretical and Applied Genetics* 89 (2-3): 323-328. <https://doi.org/10.1007/BF00225162>
- KISS, G.B.; G. CSANÁDI; K. KÁLMÁN; P. KALÓ; L. ÖKRÉSZ. 1993. *Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers*. *Molecular and General Genetics* 238: 129-137. <https://doi.org/10.1007/BF00279539>
- KONIECZNY, A.; F.M. AUSUBEL. 1993. *A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers*. *The Plant Journal* 4 (2): 403-410.

KUMAR, M. 2011. *Biotechnological advancements in alfalfa improvement*. *J Appl. Genet.* 2011 52 (2): 111-124.

LA FRAMBOISE, T. 2009. *Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances*. *Nucleic Acids Research* 37 (13): 4181-4193. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp552>

LARSEN, R.C.; C.R. HOLLINGSWORTH; G.J. VANDEMARK; M.A. GRITSENKO; F.A. GRAY. 2002. *A Rapid Method Using PCR-Based SCAR Markers for the Detection and Identification of Phoma sclerotoides: The Cause of Brown Root Rot Disease of Alfalfa*. *Plant Disease* 86 (9): 928-932. <https://doi.org/10.1094/pdis.2002.86.9.928>

LI, F.W.; A. HARKESS. 2018. *A guide to sequence your favorite plant genomes. Applications in Plant Sciences* 6 (3): e1030. DOI:10.1002/aps3.1030

LI, J.F.; J.E. NORVILLE; J. AACH; M. MCCORMACK; D. ZHANG; J. BUSH; G.M. CHURCH; J. SHEEN. 2013. *Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9*. *Nat. Biotechnol.* 31: 688-691.

LI, X.; B. ALARCÓN-ZÚÑIGA; J. KANG; M.H.N. TAHIR; Q. JIANG; Y. WEI; R. REYNO; J.G. ROBINS; E.C. BRUMMER. 2015a. *Mapping fall dormancy and winter injury in tetraploid alfalfa*. *Crop Science* 55 (5): 1995-2011. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.12.0834>

LI, X.; Y. WEI; A. ACHARYA; J.L. HANSEN; J.L. CRAWFORD; D.R. VIANDS; R. MI-CHAUD; A. CLAESSENS; E.C. BRUMMER. 2015b. *Genomic Prediction of biomass yield in two selection cycles of a tetraploid alfalfa breeding population*. *The Plant Genome* 12 (3): 1-10. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.12.0090>

LI, X.; Y. HAN; Y. WEI; A. ACHARYA; A.D. FARMER; J. HO; M.J. MONTEROS; E.C. BRUMMER. 2014a. *Development of an alfalfa SNP array and its use to evaluate patterns of population structure and linkage disequilibrium*. *PLoS ONE*, 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084329>

LI, X.; Y. WEI; A. ACHARYA; Q. JIANG; J. KANG; E.C. BRUMMER. 2014b. *A saturated genetic linkage map of autotetraploid alfalfa (Medicago sativa L.) developed using genotyping-by-sequencing is highly syntenous with the Medicago truncatula genome*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 4 (10): 1971-1979. <https://doi.org/10.1534/g3.114.012245>

LI, X.; E.C. BRUMMER. 2012. *Applied genetics and genomics in alfalfa breeding*. *Agronomy* 2: 40-61. <https://doi.org/10.3390/agronomy2010040>

LI, X.; A. ACHARYA; A.D. FARMER; J.A. CROW; A.K. BHARTI; R.S. KRAMER; Y. WEI; Y. HAN; J. GOU; G.D. MAY; M.J. MONTEROS; E.C. BRUMMER. 2012. *Prevalence of single nucleotide polymorphism among 27 diverse alfalfa genotypes as assessed by transcriptome sequencing*. *BMC Genomics* 13: 568.

LI, X.; Y. WEI; K.J. MOORE; R. MICHAUD; D.R. VIANDS; J.L. HANSEN; A. ACHARYA; E.C. BRUMMER. 2011. *Association Mapping of Biomass Yield and Stem Composition in a Tetraploid Alfalfa Breeding Population*. *The Plant Genome Journal*, 4(1), 24. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2010.09.0022>

- LI, X.; C. BRUMMER. 2009. *Inbreeding Depression for Fertility and Biomass in Advanced Generations of Inter and Intrasubspecific Hybrids of Tetraploid Alfalfa*. *Crop Science* 49. DOI: 10.2135/cropsci2008.04.0205
- LITT, M.; J.A. LUTY. 1989. *A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene*. *American Journal of Human Genetics* 44: 397-401.
- LIU, X.P.; C. HAWKINS; M.D. PEEL; L.X. YU. 2019. *Genetic loci associated with salt tolerance in advanced breeding populations of tetraploid alfalfa using genome-wide association studies*. *Plant Genome* 12 (1). <https://doi.org/10.3835/plantgenome2018.05.0026>
- LIU, X.P.; L.X. YU. 2017. *Genome-wide association mapping of loci associated with plant growth and forage production under salt stress in alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Frontiers in Plant Science* 8 (May): 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00853>
- LU, H.; J. ROMERO-SEVERSON; R. BERNARDO. 2002. *Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize*. *Theoretical and Applied Genetics* 105 (4): 622-628. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0970-9>
- MA, C.X.; G. CASELLA; Z.J. SHEN; T.C. OSBORN; R. WU. 2002. *A unified framework for mapping quantitative trait loci in bivalent tetraploids using single-dose restriction fragments: A case study from alfalfa*. *Genome Research* 12 (12): 1974-1981. <https://doi.org/10.1101/gr.320202>
- MACKIE, J.M.; J.M. MUSIAL; D.J. ARMOUR; H.T.T. PHAN; S.E. ELLWOOD; K.S. AITKEN; J.A.G. IRWIN. 2007. *Identification of QTL for reaction to three races of Colletotrichum trifolii and further analysis of inheritance of resistance in autotetraploid lucerne*. *Theoretical and Appl. Genetics* 114: 1417-1426. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00122-007-0527-z>
- MAKAROVA, K.S.; N.V. GRISHIN; S.A. SHABALINA; Y.I. WOLF; E.V. KOONIN. 2006. *A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action*. *Biology Direct* 1:7 doi:10.1186b /1745-6150-1-7
- MARTÍNEZ, M.C.; M. HELGUERA; A. CARRERA. 2010. *Marcadores Moleculares*. En: LEVITUS, G.; V. ECHENIQUE; C. RUBINSTEIN; E. HOPP; L. MROGINSK (Eds.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Capítulo 5. Ediciones INTA, Buenos Aires (Argentina). 70-85 pp.
- MAUREIRA-BUTLER, I.J.; J.A. UDALL; T.C. OSBORN. 2007. *Analyses of a multi-parent population derived from two diverse alfalfa germplasms: Testcross evaluations and phenotype-DNA associations*. *Theoretical and Applied Genetics* 115 (6): 859-867. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0614-1>
- MENGONI, A.; A. GORI; M. BAZZICALUPO. 2000. *Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, Medicago sativa*. *Plant Breeding* 119 (4): 311-317. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00501.x>

- METZKER, M.L. 2010. *Sequencing technologies – the next generation*. *Nat Rev Genet* 11: 31-46.
- MEUWISSEN, T.H.E.; B.J. HAYES; M.E. GODDARD. 2001. *Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps*. *Genetics* 157: 1819-1829.
- MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2019. *Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. OGM Comerciales*. (Disponible: <https://www.argentina.gob.ar/agricultura/alimentos-y-bioeconomia/ogm-comerciales> consultado: 28/11/2019).
- MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2019. *Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. Resolución 44/2019*. (Disponible: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=324699> consultado: 25/11/2019).
- MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2019. *Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. Resolución 36/2019*. (Disponible: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=324647> consultado: 25/11/2019).
- MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2018. *Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. Resolución 33/2018*. (Disponible: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-33-2018-311332> consultado: 25/11/2019).
- MOJICA, F.J.M.; C. DÍEZ-VILLASEÑOR; J. GARCÍA-MARTÍNEZ; E. SORIA. 2005. *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements*. *J. Mol. Evol.* 60:174-182.
- MOREAU, D.; J. BURSTIN; G. AUBERT; T. HUGUET; C. BEN; J.M. PRÓSPERI; C. SALON; N. MUNIER-JOLAIN. 2012. *Using a physiological framework for improving the detection of quantitative trait loci related to nitrogen nutrition in *Medicago truncatula**. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 755-768.
- MORGANTE, M.; A.M. OLIVIERI. 1993. *PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics*. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* 3 (1): 175-182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.t01-9-00999.x>
- MUN, J.H.; D.J. KIM; H.K. CHOI; J. GISH; F. DEBELLÉ; J. MUDGE; R. DENNY; G. ENDRÉ; O. SAURAT; A.M. DUDEZ; G.B. KISS; B. ROE; N.D. YOUNG; D.R. COOK. 2006. *Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: A resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps*. *Genetics* 172 (4): 2541-2555. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.054791>
- MUNJAL, G.; J. HAO; L.R. TEUBER; E.C. BRUMMER. 2018. *Selection mapping identifies loci underpinning autumn dormancy in alfalfa (*Medicago sativa*)*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 8 (2): 461-468. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300099>
- MUSIAL, J.M.; J.M. MACKIE; D.J. ARMOUR; H.T.T. PHAN; S.E. ELLWOOD; K.S. ALTKEN; J.A.G. IRWIN. 2007. *Identification of QTL for resistance and susceptibility to *Stagonospora meliloti* in autotetraploid lucerne*. *Theoretical and Applied Genetics* 114 (8): 1427-1435. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0528-y>

- MUSIAL, J.M.; K.S. AITKEN; J.M. MACKIE; J.A.G. IRWIN. 2005. A genetic linkage map in autotetraploid lucerne adapted to northern Australia, and use of the map to identify DNA markers linked to resistance to *Phytophthora medicaginis*. *Australian Journal of Agricultural Research* 56 (4): 333-344. <https://doi.org/10.1071/AR04317>
- NARASIMHAMOORTHY, B.; J.H. BOUTON; K.M. OLSEN; M.K. SLEDGE. 2007. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of aluminum tolerance in diploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics* 114 (5): 901-913. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0488-7>
- NEKRASOV, V.; B. STASKAWICZ; D. WEIGEL; J.D. JONES; S. KAMOUN. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.* 31: 691-693.
- PANIEGO, N.; R. HEINZ; P. FERNÁNDEZ; V. LIA; C. FUSARI. 2010. *Bioinformática aplicada a la biotecnología vegetal*. En: LEVITUS, G.; V. ECHENIQUE; C. RUBINSTEIN; E. HOPP; L. MROGINSK (Eds.). *Biología y Mejoramiento Vegetal II*. Capítulo 12. Ediciones INTA, Buenos Aires (Argentina). 170-181 pp.
- PARAN, I.; R.W. MICHELMORE. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 985-993.
- PECRIX, Y.; S.E. STATON; E. SALLET; C. LELANDAIS-BRIÈRE; S. MOREAU; S. CARRÈRE; T. BLEIN; M.F. JARDINAUD; D.L. MOHAMED ZOUINE; M. ZAHM; J. KREPLAK; B. MAYJONADE; C. SATGÉ; M. PEREZ; S. CAUET; W. MARANDE; C. CHANTRY-DARMON; C. LOPEZ-ROQUES; O. BOUCHEZ; A. BÉRARD; F. DEBELLÉ; S. MUÑOS; A. BENDAHMANE; H. BERGÈS; A. NIEBEL; J. BUITINK; F. FRUGIER; M. BENHAMED; M. CRESPI; J. GOUZY; P. GAMAS. 2018. Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. *Nature Plants* 4: 1017-1025. DOI: 10.1038/s41477-018-0286-7
- PETERSON, B.K.; J.N. WEBER; E.H. KAY; H.S. FISHER; H.E. HOEKSTRA. 2012. Double Digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *Plos One* 7(5), e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- PIERRE, J.B.; T. HUGUET; P. BARRE; C. HUYGHE; B. JULIER. 2008. Detection of QTLs for flowering date in three mapping populations of the model legume species *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 609-620.
- POLAND, J.A.; T.W. RIFE. 2012. Genotyping by sequencing for plant breeding and genetics. *The Plant Genome* 5 (3): 92-102.
- POLAND, J.A.; P.J. BROWN; M.E. SORRELLS; J.L. JANNINK. 2012. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *Plos One*, 7, e32253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032253>

- POURCEL, C.; G. SALVIGNOL; G. VERGNAUD. 2005. *CRISPR elements in Yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. Microbiology 151: 653-663.*
- RAY, I. 2017. *Genetics for alfalfa drought tolerance. Presentations of the 2017 Western Alfalfa and Forage Symposium. Reno, NV. Univ. of California, Davis.*
- RAY, I. 2010. *Developing alfalfa varieties for a water-challenged future. Proceedings, 2010 California Alfalfa and Forage Symposium and Corn/Cereal Silage Mini-Symposium, Visalia, CA. 6 p.*
- RAY, I.M.; Y. HAN; L.E.; C.D. MEENACH; N. SANTANTONIO; M.K. SLEDGE; C.A. PIERCE; T.M. STERLING; R.K. KERSEY; H.S. BHANDARI; M.J. MONTEROS. 2015. *Identification of Quantitative Trait Loci for Alfalfa Forage Biomass Productivity during Drought Stress. Crop Science 55 (5): 2012-2033. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.12.0840>*
- RAY, I.; G. BABB; C. PIERCE. 2013. *DNA marker assisted breeding to develop alfalfa varieties for a water-challenged future. Proceedings, 2013 Western States Alfalfa and Forage Symposium, Reno (EUA). 6 p.*
- REGISTRO NACIONAL DE OPERADORES CON OVGM. 2004. *Resolución 72506/04I. (Disponible: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/inase_roovgm_3.pdf consultado: 25/11/2019).*
- RICHARDSON, C.; G. RAY; M. DEWITT; G.L. CURIE; J.E. CORN. 2016. *Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. Nat. Biotechnol 34: 339-344.*
- ROBINS, J.G.; J.L. HANSEN; D.R. VIANDS; E.C. BRUMMER. 2008. *Genetic mapping of persistence in tetraploid alfalfa. Crop Science 48: 1780-1786.*
- ROBINS, J.G.; D. LUTH; I.A. CAMPBELL; G.R. BAUCHAN; C.L. HE; D.R. VIANDS; J.L. HANSEN; E.C. BRUMMER. 2007a. *Genetic mapping of biomass production in tetraploid alfalfa. Crop Science 47: 1-10.*
- ROBINS, J.G.; G.R. BAUCHAN; E.C. BRUMMER. 2007b. *Genetic mapping forage yield, plant height, and regrowth at multiple harvests in tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.). Crop Science 47(1): 11-18. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.07.0447>*
- RUBIALES, D. 2014. *Alfalfa: back to the future. J. Int. Legume Soc. ISSN: 2340-1559.*
- SAKIROGLU, M.; E.C. BRUMMER. 2013. *Presence of phylogeographic structure among wild diploid alfalfa accessions (Medicago sativa L. subsp. microcarpa Urb.) with evidence of the center of origin. Genetic Resources and Crop Evolution 60 (1): 23-31. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9811-0>*
- SAKIROGLU, M.; S. SHERMAN-BROYLES; A. STORY; K.J. MOORE; J.J. DOYLE; E.C. BRUMMER. 2012. *Patterns of linkage disequilibrium and association mapping in diploid alfalfa (M. sativa L.). Theoretical and Applied Genetics 125 (3): 577-590. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1854-2>*

- SAKIROGLU, M.; J.J. DOYLE; E.C. BRUMMER. 2010. *Inferring population structure and genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (Medicago sativa L.) accessions using SSR markers. Theoretical and Applied Genetics* 121 (3): 403-415. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1319-4>
- SANTANTONIO, N.; C.A. PIERCE; R.L. STEINER; I.M. RAY. 2019. *Genetic mapping of water use efficiency and carbon and nitrogen metabolism in drought-stressed Alfalfa. Crop Science* 59 (1): 92-106. <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.05.0307>
- SAUNDERS, J.; E. BINGHAM. 1972. *Production of alfalfa plants from callus tissue. Crop Sci.* 12: 804-808.
- SCHERER, A.; G.B. CHRISTENSEN. 2016. *Concepts and relevance of Genome-Wide Association Studies. Science Progress* 99 (1): 59-67. <https://doi.org/10.3184/003685016X14558068452913>
- SCHNABEL, E.; O. KULIKOVA; R.V. PENMETS; T. BISSELING; D.R. COOK; J. FRUGOLI. 2003. *An integrated physical, genetic and cytogenetic map around the sunn locus of Medicago truncatula. Genome* 46 (4): 665-672. <https://doi.org/10.1139/g03-019>
- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESCA. 2011. *Resolución 763/11. (Disponible: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=185806> consultado:25/11/2019).*
- SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESCA. 2011. *Resolución 510/2011. (Disponible: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=185853> consultado:25/11/2019).*
- SEGOVIA-LERMA, A.; R.G. CANTRELL; J.M. CONWAY; I.M. RAY. 2003. *AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasms using bulk DNA templates. Genome*, 46(1), 51-58. <https://doi.org/10.1139/g02-100>
- SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASA). 2002. *Resolución 412/2002. (Disponible: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=74376> consultado: 25/11/2019).*
- SHAN, Q; Y. WANG; J. LI; Y. ZHANG; K. CHEN; Z. LIANG; K. ZHANG; J. LIU; J.J. XI; J. QIU; C. GAO. 2013. *Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol.* 31: 686-688.
- SLEDGE, M.K.; I.M. RAY; G. JIANG. 2005. *An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.). Theoretical and Applied Genetics* 111 (5): 980-992. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0038-8>
- TANG, H.; V. KRISHNAKUMAR; S. BIDWELL; B. ROSEN; A. CHAN; S. ZHOU; L. GENTZ-BITTEL; K.L. CHILDS; M. YANDELL; H. GUNDLACH; K.F.X. MAYER; D.C. SCHWARTZ; C.D. TOWN. 2014. *An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume Medicago truncatula. BMC Genomics* 15: 312. DOI:10.1186/1471-2164-15-312
- TAVOLETTI, S.; F. VERONESI; T.C. OSBORN. 1996. *RFLP linkage map of an alfalfa meiotic mutant based on an F1 population. Journal of Heredity* 87 (2): 167-170. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a022978>

TEIXEIRA CAIXETA, E.; L.F. VENTORIM FERRÃO; E. MACIEL-ZAMBOLIM; L. ZAMBOLIM. 2014. *Molecular Markers*. En: BORÉM, A.; R. FRITSCHÉ-NETO (Eds.). *Biotechnology Applied to Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*. Capítulo 2. Elsevier, EUA. 19-45 pp.

THORNSBERRY, J.M.; M.M. GOODMAN; J. DOEBLEY; S. KRESOVICH; D. NIELSEN; E.S. BUCKLER. 2001. *Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time*. *Nat Genet* 28 (3): 286-289.

TORREGROSA, C.; M. CAZAUX; D. DANESH; F. CHARDON; S.B. CANNON; M.T. ESQUERRÉ-TUGAYÉ; B. DUMAS; N.D. YOUNG; D.A. SAMAC; T. HUGUET; C. JACQUET. 2008. *Genetic dissection of resistance to anthracnose and powdery mildew in *Medicago truncatula**. *International Soc. for Molecular Plant-Microbe Interaction* 21 (1): 61-69.

TORREGROSA, C.; S. CLUZET; J. FOURNIER; T. HUGUET; P. GAMAS; J.P. PRÓSPE-RI; M.T. ESQUERRÉ-TUGAYÉ; B. DUMAS; C. JACQUET. 2004. *Cytological, genetic and molecular analysis to characterize compatible and incompatible interactions between *Medicago truncatula* and *Colletotrichum trifolii**. *International Society for Molecular Plant-Microbe Interaction* 17 (8): 909-920.

TOUIL, L.; F. GUESMI; K. FARES; A. FERCHICHI. 2008. *Genetic diversity of some Mediterranean populations of the cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) using ISSR markers*. *Bio Techniques* 7 (4): 808-812.

VARSHNEY, R.K.; A. GRANER; M.E. SORRELLS. 2005. *Genic microsatellite markers in plants: Features and applications*. *Trends in Biotechnology* 23 (1): 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005>

VOS, P.; R. HOGERS; M. BLEEKER; M. REIJANS; T. VANDELEE; M. HORNES; A. FRIJTERS; J. POT; J. PELEMAN; M. KUIPER; M. ZABEAU. 1995. *AFLP: A New Technique for DNA-Fingerprinting*. *Nucleic Acids Research* 23 (21): 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>

WANG, J.; L. KONG; G. GAO; J. LUO. 2013. *A brief introduction to web-based genome browsers*. *Briefings in Bioinformatics* 14 (2): 131-143. DOI: 10.1093/bib/bbs029

WANG, Y.; B. BI; Q.H. YUAN; X.L. LI; J.M. GAO. 2012. *Association of AFLP and SCAR markers with common leafspot resistance in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa*)*. *Genetics and Molecular Research* 11 (1): 606-616.

WELSH, J.; M. MCCLELLAND. 1990. *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. *Nucleic Acids Research* 18 (24): 7213-7218. <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/18/24/7213/2388413>

WILLIAMS, J.G.K.; A.R. KUBELIK; K.J. LIVAK; J.A. RAFALSKI; S.V. TINGEY. 1990. *DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Useful as Genetic Markers*. *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6531-6535.

XAVIER, J.R.; J. KUMAR; R.B. SRIVASTAVA. 2011. *Characterization of genetic structure of alfalfa (*Medicago* sp.) from trans-Himalaya using RAPD and ISSR markers*. *African Journal of Biotechnology*, 10(42), 8176-8187. <https://doi.org/10.5897/ajb10.2083>

XIE, K.; Y. YANG. 2013. *RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system*. *Mol. Plant* 6:1975-1983.

YANG, S.; F. TANG; E. TEIXEIRA CAIXETA; H. ZHU. 2013. *Epigenetic regulation of a powdery mildew resistance gene in Medicago truncatula*. *Molecular Plant* 6 (6): 2000-2003. <https://doi.org/10.1093/mp/sst106>

YANG, S.; M. GAO; S. DESHPANDE; S. LIN; B.A. ROE; H. ZHU. 2007. *Genetic and physical localization of an anthracnose resistance gene in Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 45-52.

YOU, Q.; X. YANG; Z. PENG; L. XU, J. WANG. 2018. *Development and applications of a high throughput genotyping tool for polyploid crops: Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Array*. *Frontiers in Plant Science* 9: 104. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00104>

YOUNG, N.; F. DEBELLÉ; G. OLDROYD; R. GEURTS; S.B. CANNON; M.K. UDVARDI; V.A. BENEDITO; K.F. MAYER; J. GOUZY; H. SCHOOF; Y. VAN DE PEER; S. PROOST; D.R. COOK; B.C. MEYERS; M. SPANNAGL; F. CHEUNG; S. DE MITA; V. KRISHNAKUMAR; H. GUNDLACH; S. ZHOU; J. MUDGE; A.K. BHARTI; J.D. MURRAY; M.A. NAOUMKINA; B. ROSEN; K.A. SILVERSTEIN; H. TANG; S. ROMBAUTS; P.X. ZHAO; P. ZHOU; V. BARBE; P. BARDOU; M. BECHNER; A. BELLEC; A. BERGER; H. BERGÈS; S. BIDWELL; T. BISSELING; N. CHOISNE; A. COULOUX; R. DENNY; S. DESHPANDE; X. DAI; J.J. DOYLE; A.M. DUDEZ; A.D. FARMER; S. FOUTEAU; C. FRANKEN; C. GIBELIN; J. GISH; S. GOLDSTEIN; A.J. GONZÁLEZ; P.J. GREEN; A. HALLAB; M. HARTOG; A. HUA; S.J. HUMPHRAY; D.H. JEONG; Y. JING; A. JÖCKER; S.M. KENTON; D.J. KIM; K. KLEE; H. LAI; C. LANG; S. LIN; S.L. MACMIL; G. MAGDELENAT; L. MATTHEWS; J. MCCORRISON; E.L. MONAGHAN; J.H. MUN; F.Z. NAJAR; C. NICHOLSON; C. NOIROT; M. O'BLENESS; C.R. PAULE; J. POULAIN; F. PRION; B. QIN; C. QU; E.F. RETZEL; C. RIDDLÉ; E. SALLET; S. SAMAIN; N. SAMSON; I. SANDERS; O. SAURAT; C. SCARPELLI; T. SCHIEX; B. SEGURENS; A.J. SEVERIN; D.J. SHERRIER; R. SHI; S. SIMS; S.R. SINGER; S. SINHARROY; L. STERCK; A. VIOLLET; B.B. WANG; K. WANG; M. WANG; X. WANG; J. WARFSMANN; J. WEISSENBACH; D.D. WHITE; J.D. WHITE; G.B. WILEY; P. WINCKER; Y. XING; L. YANG; Z. YAO; F. YING; J. ZHAI; L. ZHOU; A. ZUBER; J. DÉNARIÉ; R.A. DIXON; G.D. MAY; D.C. SCHWARTZ; J. ROGERS; F. QUÉTIÉ; C.D. TOWN; B.A. ROE. 2011. *The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses*. *Nature* 480: 520-524 DOI:10.1038/nature10625

YU, L.X. 2017. *Identification of single-nucleotide polymorphic loci associated with biomass yield under water deficit in alfalfa (Medicago sativa L.) using genome-wide sequencing and association mapping*. *Frontiers in Plant Science*, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01152>

YU, L.X.; P. ZHENG; S. BHAMIDIMARRI; X.P. LIU; D. MAIN. 2017. *The impact of genotyping-by-sequencing pipelines on SNP discovery and identification of markers associated with verticillium wilt resistance in autotetraploid alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Front. Plant Sci.* 8:89. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00089>

YU, L.X.; X. LIU; W. BOGE; X.P. LIU. 2016. *Genome-Wide Association Study Identifies Loci for Salt Tolerance during Germination in Autotetraploid Alfalfa (Medicago sativa*

L.) Using Genotyping-by-Sequencing. *Frontiers in Plant Science* 7. 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00956>

YULE, G.U. 1902. Mendel's laws and their probable relation to intra-racial heredity. *New Phytol.* 1: 193-207.

ZENG, A.; P. CHEN; K. KORTH; F. HANCOCK; A. PEREIRA; K. BRYE; C. WU; A. SHI. 2017. Genome-wide association study (GWAS) of salt tolerance in worldwide soybean germplasm lines. *Molecular Breeding* 37(3): 30. <https://doi.org/10.1007/s11032-017-0634-8>

ZHANG, F.; J. KANG; R. LONG; L.X. YU; Z. WANG; Z. ZHAO; T. ZHANG; Q. YANG. 2019. High-density linkage map construction and mapping QTL for yield and yield components in autotetraploid alfalfa using RAD-seq. *BMC Plant Biology* 19 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1770-6>

ZHANG, T.; L.X. YU; P. ZHENG; Y. LI; M. RIVERA; D. MAIN; S.L. GREENE. 2015. Identification of loci associated with drought resistance traits in heterozygous autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) using genome-wide association studies with genotyping by sequencing. *PLoS ONE* 10 (9): 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138931>

ZIETKIEWICZ, E.; A. RAFALSKI; D. LABUDA. 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20: 176-183.