



CAPÍTULO 6

Mejoramiento genético y desarrollo de variedades

Ariel S. Odorizzi y
Daniel H. Basigalup

Introducción

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

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

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

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

Modelos genéticos autotetraploides

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

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

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

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

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

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

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

Implicancias de la autotetraploidía en el mejoramiento de alfalfa

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

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

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

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

Mejoramiento genético

Implementación de un programa de mejoramiento

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

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

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

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

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

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

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

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

Métodos de mejoramiento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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



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

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

Incorporación de transgenes

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

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

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

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

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

Protocolos de selección

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

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

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



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



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



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

Selección por más de un carácter

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

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

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

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

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

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

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

Mejoramiento de alfalfa en Argentina

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mejoramiento de caracteres específicos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INTA (Ochoa, 1980), Trinidad 87 (Ochoa y Anzardi, 1996) y Salina PV (www.paloverde.com.ar).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

5- *Tolerancia a la acidez y aluminio (Al)*. Aproximadamente el 30 % de los suelos y más del 50 % de las tierras cultivables del mundo son ácidas (Von Uexküll y Mutert, 1995). El complejo suelo-ácido, que consiste en la fitotoxicidad del exceso de iones como el aluminio (Al^{3+}) y protones (H^+), es uno de los factores principales que limitan la productividad del cultivo (Delhaize y Ryan, 1995; Ishitani *et al.*, 2004). La existencia de suelos ácidos se puede deber fundamentalmente a dos causas: 1) la propia naturaleza ácida de los materiales que dieron origen al suelo, asociado a su bajo contenido en cationes básicos como Ca^{++} , K^+ , Na^+ y Mg^{++} ; y 2) el lavado o lixiviación de esos cationes básicos, por erosión o uso excesivo, que reducen la capacidad buffer de ese suelo. La fertilización amoniacal y la nitrificación que desencadena aceleran el proceso de acidificación. A medida que el pH decrece el Al se solubiliza hasta alcanzar valores fitotóxicos en la solución del suelo; paralelamente, elementos como P, N, Ca, Mg y K se tornan menos disponibles para las plantas. Además, en el caso específico de la alfalfa, la acidificación del suelo resiente la fijación simbiótica del N_2 , dado que los rizobios son sensibles a la acidez. A un pH bajo, el Al se solubiliza a partir de silicatos de Al no tóxicos y forma los iones Al^{3+} fitotóxicos (Hoekenga *et al.*, 2003). La acción fitotóxica del Al se centra principalmente en el ápice

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Uso de técnicas moleculares

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

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

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

- Estimación de la distancia genética a través de marcadores moleculares

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

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



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

- Edición génica

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

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

Consideraciones finales

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

BIBLIOGRAFÍA

- AL-DOSS, A.; S. SMITH. 1998. *Registration of AZ-97MEC and AZ-97MEC-ST very non-dormant alfalfa germplasm pools with increased shoot weight and different response to saline irrigation*. *Crop Sci.* 38: 568.
- AL-KHATIB, M.; T. MCNEILLY; J.C. COLLINS. 1993. *The potential of selection and breeding for improved salt tolerance in lucerne (Medicago sativa L.)*. *Euphytica* 65: 43-51.
- ANJUM, N.A.; I.M. AREF; A.C. DUARTE; E. PEREIRA; I. AHMAD; I. MUHAMMAD. 2014. *Glutathione and proline can coordinately make plants withstand the joint attack of metal (loid) and salinity stresses*. *Front. Plant Sci.* 5, doi: 66210.3389/fpls.2014.00662
- ARANJUELO, I.; J. JOSÉ IRIGOYEN; M. SÁNCHEZ-DÍAZ. 2007. *Effect of elevated temperature and water availability on CO₂ exchange and nitrogen fixation of nodulated alfalfa plants*. *Environmental and Experimental Botany.* 59. 99-108. 10.1016/j.envexpbot.2005.10.008
- ARDILA, F.; J. CIANCIO; M.R. GARAY; E. PAGANO; R.D. RÍOS; P.M. FRANZONE. 2003. *Genetic engineering manipulation of condensed tannin biosynthesis for the obtention of safe-bloat alfalfa*. *Proc. 3rd International Symposium of Molecular Breeding of Forage and Turf*. Dallas, TX, EUA.
- AZIZI, M.R. 1980. *Inheritance of the multifoliolate trait in tetraploid alfalfa, Medicago sativa L.* Ph.D. Thesis. Graduate College. University of Arizona. 41 p.
- BAGAVATHIANNAN, M.V.; B. JULIER; P. BARRE; R.H. GULDEN; R.C. VAN ACKER. 2010. *Genetic diversity of feral alfalfa (Medicago sativa L.) populations occurring in Manitoba, Canada and comparison with alfalfa cultivars: an analysis using SSR markers and phenotypic traits*. *Euphytica.* 173: 419-432.
- BALIGAR, V.C.; J.H. ELGIN JR.; C.D. FOY. 2002. *Variability in alfalfa for growth and mineral uptake and efficiency ratios under aluminium stress*. *Agron. J.* 81: 223-229.
- BARNES, D.K.; E.T. BINGHAM; J.D. AXTELL; W.H. DAVIS. 1972. *The flower, sterility mechanism, and pollination control*. En: HANSON, C.H. (ed.). *Alfalfa Science and Technology*. ASA, Agronomy 15. Madison, WI, EUA. 123-141 pp.
- BARONE, P.; D. ROSELLINI; P. LAFAYETTE; J. BOUTON; F. VERONESI; W. PARROTT. 2008. *Bacterial citrate synthase expression and soil aluminum tolerance in transgenic alfalfa*. *Plant Cell Rep.* 27:893-901. doi:10.1007/s00299-008-0517-x
- BARROS-RIOS, J.; S. TEMPLE; R. DIXON. 2018. *Development and commercialization of reduced lignin alfalfa*. *Current opinion in biotechnology.* 56. 48-54. 10.1016/j.copbio.2018.09.003
- BASIGALUP, D.H.; D.K. BARNES; R.E. STUCKER. 1995. *Development of a core collection for perennial Medicago Plant Introductions*. *Crop Sci.* 35 (4): 1163-1168.
- BASIGALUP, D.H.; E.H. HIJANO. 1995. *Mejoramiento genético de la alfalfa*. En: HIJANO, E.H.; A. NAVARRO (ed.). *La Alfalfa en la Argentina*. INTA, SubPrograma Alfalfa. Enciclopedia Agro de Cuyo, Manuales 11. 39-60 pp.

- BASIGALUP, D.H.; C.V. CASTELL; C.D. GIAVENO. 1996. *Breeding a bloat-tolerant alfalfa in Argentina*. En: WOORDWARD, W.T.; J.H. ELGIN, Jr. (eds.). *Report of the 35th North American Alfalfa Improvement Conference*. Oklahoma City, OK, EUA. 31 p.
- BASIGALUP, D.H.; C.V. CASTELL; V. AROLFO; M. BENÍTEZ. 1998. *Response to selection in the development of a bloat-tolerant alfalfa in Argentina*. En: BOUTON, J.; G. Bauchan (eds.). *Report of the 36th North American Alfalfa Improvement Conference*. Bozeman, MT, EUA. 90 p.
- BASIGALUP, D.H.; C.V. CASTELL; C.D. GIAVENO. 2003. *Response to selection for lower initial rate of dry matter disappearance in the development of a bloat-tolerant non-dormant alfalfa population*. *Journal of Genetics and Breeding* 57 (1): 31-38.
- BASIGALUP, D.H.; J. MARTINEZ FERRER; A. ODORIZZI; V. AROLFO; E. USTARROZ; L. BERNÁLDEZ; N. LATIMORI; A. KLOSTER; P. DAVIES; D. MÉNDEZ; M. CORREA LUNA. 2007. *ProINTA Carmina. Variedad de alfalfa con menor potencial timpanizante*. IDIA XXI. Año VII, N.º 9. 32-37 pp.
- BASIGALUP, D.H.; R. ROSSANIGO; M.V. BALLARIO. 2007. *Panorama actual de la alfalfa en la Argentina*. En: BASIGALUP, D.H. *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*. Buenos Aires: INTA. Cap. 1. 13-25 pp.
- BASSAM, B.J.; G. CAETANO-ANOLLÉS; P.M. GRESSHOFF. 1991. *Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels*. *Anal. Biochem.* 196: 80-83.
- BAUDER, W.W. 1938. *The inheritance of the odd leaf character in Medicago sp.* M.S. Thesis. University of Nebraska, Lincoln. En: FERGUSON, J.E.; R.P. MURPHY. 1973. *Comparison of trifoliolate and multifoliolate phenotypes of alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Crop Science* 13: 463-465.
- BEISSINGER, T.M.; C.N. HIRSCH; R.S. SEKHON; J.M. FOERSTER; J.M. JOHNSON; G. MUTTONI. 2013. *Marker density and read depth for genotyping populations using genotyping-by-sequencing*. *Genetics*. 193:1073-1081. 10.1534/genetics.112.147710
- BEJERMAN, N.; H. DEBAT; C. NOME; D. CABRERA MEDEROS; V. TRUCCO; S. DE BREUIL; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2019. *Redefining the medicago sativa alphapartitiviruses genome sequences*. *Virus Research*. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.021>
- BENES, S.E.; G. GALDI; R.B. HUTMACHER; S.R. GRATTAN; I. CHAHAL; D.H. PUTNAM. 2018. *Alfalfa (Medicago sativa L.) is more tolerant to salinity than guidelines indicate: Implications of field and greenhouse studies*. En: *Proceedings. Second World Alfalfa Congress, Cordoba, Argentina*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (Disponible: <http://www.worldalfalfacongress.org/> consultado: agosto de 2020).
- BERG, B.P.; W. MAJAK; T.A. MCALLISTER; J.W. HALL; D. MCCARTNEY; B.E. COULMAN; B.P. GOPLEN; S.N. ACHARYA; R.M. TAIT; K.J. CHENG. 2000. *Bloat in cattle grazing alfalfa cultivars selected for a low initial rate of digestión: a review*. *Can. J. Plant Sci* 80: 493-502.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

JAYASINGHE, C.; J. WANG; P. BODENHORST; J. JACOBS; G. SPANGENBERG; K. SMITH. 2019. Application of multispectral image sensors for evaluation of perennial ryegrass persistence in field plots. *Proceedings of the International Forage & Turf Breeding Conference, Lake Buena Vista, FL, EUA.* 109 p.

JENSEN, S.; M.R. BROADLEY; W. ROBBRECHT; E. SMETS. 2002. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *Bot. Rev.* 68: 235-269.

JOHNSON, D.W.; S.E. SMITH; A.K. DOBRENZ. 1991. Registration of AZ-90NDC-ST non-dormant alfalfa germplasm with improved forage yield in saline environments. *Crop Sci.* 31: 1098-1099.

- JOZEFKOWICZ, C.; E. BOTTERO; C. PASCUAN; E. PAGANO; N.D. AYUB; G. SOTO. 2016. *Minimizing the time and cost of production of transgenic alfalfa libraries using the highly efficient completely sequenced vector pPZP200BAR*. *Plant Cell Rep. Sep*;35(9):1987-90.
- JOZEFKOWICZ, C.; R. FRARE; R. FOX; A. ODORIZZI; V. AROLFO; E. PAGANO; D. BASIGALUP; N. AYUB; G. SOTO. 2018. *Maximizing the expression of transgenic traits into elite alfalfa germplasm using a supertransgene configuration in heterozygous conditions*. *Theor Appl Genet. May*; 131(5):1111-1123.
- JULIER, B.; S. FLAJOULOT; P. BARRE; G. CARDINET; S. SANTONI; T. HUGUET; C. HUYGHE. 2003. *Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (Medicago sativa) using microsatellite and AFLP markers*. *BMC Plant Biology* 3, 9. doi:10.1186/1471-2229-3-9
- KAMP-GLASS, M.; D. POWELL; G.B. REDDY; V.C. BALIGAR; R.J. WRIGHT. 1993. *Biotechniques for improving acid aluminium tolerance in alfalfa*. *Plant Cell Rep.* 12: 590-592.
- KEHR, W.R.; H.O. GAUMAN; C.C. LOWE; C.O. GARDNER. 1961. *The performance of alfalfa synthetics in the first and advance generations*. *Neb. Agr. Exp. Stn. Bull.* 200.
- KEMPTHORNE, O. 1955. *The correlation between relatives in a simple autotetraploid population*. *Genetics* 40: 168-174.
- KEMPTHORNE, O. 1957. *An introduction to genetics statistics*. John Willey and Sons, Nueva York, EUA. 545 p.
- KHU, D-M.; R. REYNO; E.C. BRUMMER; M.J. MONTEROS. 2012. *Screening Methods for Aluminum Tolerance in Alfalfa*. *Crop. Science, Vol. 52.* 161-167 pp.
- KHURANA, E.; J.S. SINGH. 2004. *Germination and seedling growth of five tree species from tropical dry forest in relation to water stress: Impact of seed size*. *J. Trop. Ecol.* 20: 385-396.
- KOCHIAN, L.V. 1995. *Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:237-260. doi:10.1146/annurev.pp.46.060195.001321
- KOCHIAN, L.V.; O.A. HOEKENGA; M.A. PINEROS. 2004. *How do crop plants tolerate acid soils? – Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:459-493. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655
- KOPECKY, D.; B. STUDER. 2013. *Emerging technologies advancing forage and turf grass genomics*. *Biotechnol Adv.* 2014; 32:190-199. 10.1016/j.biotechadv
- KUGLER, W.F.; M.S. MORO; J.A. JOSIFOVICH. 1963. *Catálogo de cultivares de plantas agrícolas argentinas*. Colección Agropecuaria N.º 9, INTA. Bs. As. 176-179 pp.
- LACEFIELD, G.D. 2004. *Alfalfa quality: what is it? What we can do about it? And, will it pay?*. *Proc. National Alfalfa Symposium, San Diego, CA, UC*.
- LAMB, J.F.S.; L.D. JOHNSON; D.K. BARNES; J.J. MARQUEZ-ORTIZ. 2000. *A method to characterize root morphology traits in alfalfa*. *Can. J. Plant Sci.* 80: 97-104.

- LENARDÓN, S.; D. BASIGALUP; J. PÉREZ FERNÁNDEZ. 2010. *Una virosis limitante del cultivo de alfalfa en Argentina. Informe técnico. Argentina, INTA.*
- LEVINGS, D.S. III; J.W. DUDLEY. 1963. *Evaluation of certain mating designs for estimation of genetic variance in autotetraploid alfalfa. Crop Sci. 3: 532-535.*
- LI, X.F.; J.F. MA; S. HIRADATE; H. MATSUMOTO. 2000. *Mucilage strongly binds aluminium but does not prevent roots from aluminium injury in Zea mays. Physiol. Plant 108: 152-160.*
- LI, X.; Y. WEI; A. ACHARYA; Q. JIANG; J. KANG; E.C. BRUMMER. 2014. *A saturated genetic linkage map of autotetraploid alfalfa (Medicago sativa L.) developed using genotyping-by-sequencing is highly syntenous with the Medicago truncatula genome. G3 (Bethesda); 4(10):1971-1979.*
- LIPPKE, H.; J.L. REAVES; N.L. JACOBSON. 1972. *Rumen pressure associated with the score of a bloat severity scale. J. An. Sci. 34(1):171-175.*
- LÓPEZ-BUCIO, J.; M.F. NIETO-JACOBO; V. RAMÍREZ-RODRÍGUEZ; L. HERRERA-ESTRELLA. 2000. *Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. Plant Sci. 160: 1-13.*
- LU, F.; A.E. LIPKA; J. GLAUBITZ; R. ELSHIRE; J.H. CHERNEY; M.D. CASLER. 2013. *Switchgrass genomic diversity, ploidy, and evolution: novel insights from a network-based SNP discovery protocol. PLoS Genet. 9:e1003215 10.1371/journal.pgen.1003215*
- MA, J.F. 2000. *Role of organic acids in detoxification of aluminium in higher plants. Plant Cell Physiol. 41: 383-390.*
- MA, J.F.; P.R. RYAN; E. DELHAIZE. 2001. *Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. Trends Plant Sci. 6: 273-278.*
- MAUREIRA-BUTLER, I.J.; J.A. UDALL; T.C. OSBORN. 2007. *Analyses of a multi-parent population derived from two diverse alfalfa germplasms: testcross evaluations and phenotype-DNA associations. Theoretical and Applied Genetics 115: 859-867.*
- MCCASLIN, M.; S.J. TEMPLE; J.E. TOFTE. 2002. *Methods for maximizing expression of transgenic traits in autopolyploid plants. U. S. Patent Office Application Publication N.º US-2002-0042928-A1.*
- MCCASLIN, M.H. 2018. *Use of GE traits for Improvement of Forage Quality in Alfalfa. IN Proceedings. Second World Alfalfa Congress, Cordoba, Argentina. (Disponible: <http://www.worldalfalfacongress.org/> consultado: agosto de 2020).*
- MCKIMMIE, T.; A.K. DOBRENZ. 1987. *A method for evaluation of salt tolerance during germination, emergence and seedling establishment. Agron. J. 79: 943-945.*
- MCKIMMIE, T.; A.K. DOBRENZ. 1991. *Ionic concentrations and water relations of alfalfa seedlings differing in salt tolerance. Agronomy Journal 83 (2): 363-367.*
- MCMAHON, L.R.; T.A. MCALLISTER; B.P. BERG; W. MAJAK; S.N. ACHARYA; J.D. POPP; B.E. COULMAN; Y. WANG; K.-J. CHENG. 2000. *A review of the effects of forage*

condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can. J. Plant Sci.* 80: 469-485.

MEDRANO, H.; J. BOTA; J. CIFRE; J. FLEXAS; M. RIBAS; J. GUILAS. 2007. *Eficiencia en el uso del agua por las plantas. Investigaciones Geográficas*, 43.63-84 pp.

MELTON, B. 1979. *Inbreeding, environmental effects and combining ability studies in alfalfa. New Mexico State Univ. Agr. Exp. Stn. Special Report 35*, 223 p.

MENGONI, A.; C. RUGGINI; G.G. VENDRAMIN; M. BAZZICALUPO. 2000a. *Chloroplast microsatellite variations in tetraploid alfalfa. Plant Breed.* 119: 509-512.

MENGONI, A.; A. GORI; M. BAZZICALUPO. 2000b. *Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, Medicago sativa. Plant Breeding.* 119: 311-317.

MILLER, D.R.; R.M. WASKOM; R.R. DUNCAN; P.L. CHAPMAN; M.A. BRICK; G.E. HANNING; D.A. TIMM; M.W. NABORS. 1992. *Acid soil stress tolerance in tissue culture-derived sorghum lines. Crop Sci.* 32: 324-327.

MONSANTO. 2005. *Safety assessment of roundup ready alfalfa events J101 and J163. Executive Summary.* 1-32 pp.

MORALES, C.; M. PINO; A. DEL POZO. 2013. *Phenological and physiological responses to drought stress and subsequent rehydration cycles in two raspberry cultivars. Scientia Horticulturae*, 162.234-241 pp.

MUNNS, R.; M. TESTER. 2008. *Mechanisms of salinity tolerance. Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.

NAGL, N.; K. TASKI-AJDUKOVIC; G. BARAC; A. BABURSKI; I. SECCARECCIA; S. MILIC. 2011. *Estimation of the genetic diversity in tetraploid alfalfa populations based on RAPD markers for breeding purposes. Int J Mol Sci.* 12:5449-5460. 10.3390/ijms12085449

NEI, M. 1973. *Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Nat. Acad. of Sci. USA.* 70, 3321-3323.

NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. Nueva York, EUA.* 512 p.

NOBLE, C.L. 1983. *The potential for breeding salt-tolerant plants. Proc. of the Royal Soc. of Victoria* 95: 133-138.

NOBLE, C.L.; G.M. HALLORAN; D.W. WEST. 1984. *Identification and selection for salt tolerance in Lucerne (Medicago sativa L.). Austr. J. Agric. Res.* 35: 239-252.

OCHOA, L.H. 1980. *Obtención de variedades mejoradas de alfalfa. Informe anual del Plan de Trabajo 41:1345. EEA La Banda-INTA.*

OCHOA, L.H.; G.A. ANZARDI. 1996. *Trinidad 87. Legajo de inscripción. Ministerio de Economía-SAGyPA-INASE. Registro Nacional de Cultivares. Bs. As., Arg.*

ODORIZZI, A.; E. MAMANÍ; P. SIPOWICZ; B. JULIER; J. GIECO; D. BASIGALUP. 2015. *Effect of phenotypic recurrent selection on genetic diversity of non-dormant multifoliate*

lucerne (*Medicago sativa* L.) populations. *Crop and Pasture Science*. 66. 1190. 10.1071/CP14280.

PAN, X.; C. ZHU; C. CHENG. 2008. Assessment of techniques for screening alfalfa cultivars for aluminum tolerance. *Euphytica* 164:541-549. doi:10.1007/s10681-008-9751-0

PARROT, W.A.; J.H. BOUTON. 1990. Aluminum tolerance in alfalfa as expressed in tissue culture. *Crop Sci.* 30:387-389. doi:10.2135/crops ci1990.0011183X003000020030x

PETOLESCU, C.; S. CIULCA; A. LAZAR; M. SCHITEA; E.M. BADEA 2010. Intra-Population genetic diversity in romanian alfalfa cultivars as revealed by SSR markers. *Romanian Biotechnological Letters*. Vol. 15 (2).

POSTNIKOVA, O.; J. SHAO; L.G. NEMCHINOV. 2013. Analysis of the alfalfa root transcriptome in response to salinity stress. *Plant Cell Physiol.* 54, 1041-1055. doi: 10.1093/pcp/pct056

QUIROS, C.F.; G.R. BAUCHAN. 1988. The Genus *Medicago* and the origin of *Medicago sativa* Complex. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL Jr. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, EUA. 93-124 pp.

RODRÍGUEZ, J.A. 1983. Conceptos para el mejoramiento de especies forrajeras. *EEA Anguil. INTA. Publ. Misc.* 8, 19 p.

RODRÍGUEZ, J.A. 1986. Mejoramiento genético de la alfalfa. En: BARIGGI, C.; V.L. MARBLE; C.D. ITRIA; J.M. BRUN (ed.). *Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa*. INTA, Colección Científica, Bs. As., Cap. 9. 251-323 pp.

ROGERS, M.E. 1998. Salinity effects on irrigated lucerne. En: MICHALK, D.L.; J.E. PRATLEY (ed.). *Proc. of the 9th Austr. Agronomy Conference, Waga Wagga, Australia*. 266-268 pp.

ROMERO, N.A.; N.A. JUAN; L.A. ROMERO. 1995. Establecimiento de la alfalfa en la Región Pampeana. En: HIJANO H.; A. NAVARRO (ed.). *La alfalfa en la Argentina*. INTA, Subprograma Alfalfa. *Enciclopedia Agro de Cuyo Manuales* 11, Capítulo 2. 21-36 pp.

RUMBAUGH, M.D.; J.L. CADDEL; D.E. ROWE. 1988. *Breeding and Quantitative Genetics*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL Jr. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, EUA. 777-808 pp.

SAKIROGLU, M.; J.J. DOYLE; E.C. BRUMMER. 2010. Inferring population structure and genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 121: 403-415.

SAKIROGLU, M.; S. SHERMAN-BROYLES; A. STORY; K.J. MOORE; J.J. DOYLE; E.C. BRUMMER. 2012. Patterns of linkage disequilibrium and association mapping in diploid alfalfa (*M. sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 125: 577-590.

SAKIROGLU, M.; E.C. BRUMMER. 2013. Presence of phylogeographic structure among wild diploid alfalfa accessions (*Medicago sativa* L. subsp. *microcarpa* Urb.) with evidence of the center of origin. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 60: 23-31.

SAMAC, D.A.; M. TESHAYE. 2003. *Plant Improvement for tolerance to aluminium in acid soils – a review*. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 75: 189-207.

SAMAC, D.A.; S.J. TEMPLE. 2004. *Development and utilization of transformation in Medicago species*. En: LING, G.H.; D.Z. SKINNER (ed.). *Genetically Modified Crops – Their development, uses and risks*. Food Products Press, EUA. 165-202 pp.

SANGWAN, N.; H.A. FAROOQI; R. SANGWAN. 2006. *Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses*. *New Phytologist*. 128. 173-179. 10.1111/j.1469-8137.1994.tb04000.x.

SCHILLING, M.P.; P.G. WOLF; A.M. DUFFY; H.S. RAI; C.A. ROWE; B.A. RICHARDSON. 2014. *Genotyping-by-sequencing for Populus population genomics: an assessment of genome sampling patterns and filtering approaches*. *PLoS One*. 9:e95292 10.1371/journal.pone.0095292

SCOTT, B.J.; M.A. EWING; R. WILLIAMS; A.W. HUMPHRIES; N.E. COOMBES. 2008. *Tolerance of aluminium toxicity in annual Medicago species and lucerne*. *Aust. J. Exp. Agric.* 48:499-511. doi:10.1071/EA07137

SCOTTI, C.; C. SUARDI, F.; PUPILLI; F. DAMIANI; S. ARCIONI; P. ROTILI. 1994. *Inbreeding depression in Medicago sativa: estimation of the different levels of heterozygosity by RFLP*. En: MICHAUD, R.; J.H. ELGIN Jr. (ed.). *Report 34th North American Alfalfa Improvement Conference*. Guelph, ON, Canadá. 84 p.

SHABALA, S.N.; S.I. SHABALA; A.I. MARTYNNENKO; O. BABOURINA; I.A. NEWMAN. 1998. *Salinity effect on bioelectronic activity, growth, Na⁺ accumulation and chlorophyll fluorescence of maize leaves: a comparative survey and prospects for screening*. *Aust. J. Plant Physiol.* 25 (5): 609-616.

SHEAFFER, C.C.; M. MCCASLIN; J.J. VOLENEC; J.H. CHERNEY; K.D. JOHNSON; W.T. WOODWARD; D.R. VIANDS. 1995. *Multifoliolate leaf expression. Standard tests to characterize alfalfa cultivars*. NAAIC. doi: <http://www.naaic.org/stdtests/multifol.htm>

SHIFINO-WITTMANN, M.T.S. 2008. *Alfalfa*. En: BARBIERI, R.L.; E.R.T. STUMPF (Ed.). *Origem e evolução de plantas cultivadas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 89-120 pp.

SLEDGE, M.K.; J.H. BOUTON; M. DALL'AGNOLL; W.A. PARROT; G. KOCHER. 2002. *Identification and confirmation of aluminium tolerance QTL in diploid Medicago sativa subsp. coerulea* *Crop Sci.* 42: 1121-1128.

SLEDGE, M.; I. RAY; G. JIANG. 2005. *An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (Medicago sativa L.)*. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 980-992.

SMITH, S.E. 1994. *Salinity and the production of alfalfa*. En: PESSAKARI M. (ed.). *Handbook of Plant and Crop Stress*. Marcel Dekker, Tucson, AZ, EUA. 431-449 pp.

SMITH, S.E. 1998. *Evaluating salt tolerance: some experiences with nondormant alfalfa*. En: BOUTON J.; G.T. BAUCHAN (ed.). *Report 36th North American Alfalfa Improvement Conference*. Bozeman, MT, EUA. 26 p.

- SOTO, G.C. 2018. *Transgenic alfalfa tolerant to herbicides, from Lab to Field*. IN *Proceedings. Second World Alfalfa Congress, Cordoba, Argentina*. (Disponible: <http://www.worldalfalfacongress.org/> consultado: agosto de 2020).
- SPADA, M. DEL C. (ED). 2005. *Avances en Alfalfa. Ensayos Territoriales*. EEA Manfredi-INTA, Año 15 N.º 15, 51 p.
- STANFORD, E.H.; E.R. HOUSTON. 1954. *The backcross technique as a method of breeding alfalfa*. Report of 14th Alfalfa Improvement Conference. Davis, CA. 44-45 pp.
- SUAREZ, D.L.; J.D. WOOD; S.R. LESCH. 2006. *Effect of SAR on water infiltration under a sequential rain-irrigation management system*. *Agric. Water Manage.* 86: 150-164.
- SUWABE, K.; H. TSUKAZAKI; H. IKETANI; K. HATAKEYAMA; M. FUJIMURA; M. KONODO; T. NUNOME; H. FUKUOKA; M. HIRAI; S. MATSUMOTO. 2004. *Joint meeting of the 14th Crucifer Genetics Workshop and the 4th ISHS Symposium on Brassicas 2004*, Chungnam National University Daejeon, Korea. 143 p.
- TALIBART, T.; M. JEBBAR; G. GOUESBET; S. HIMDIKABBAB; H. WROBLEWSKI; C. BLANCO; T. BERNARD. 1994. *Osmoadaptation in rhizobia-ectoine-induced salt tolerance*. *J. of Bacteriology* 176 (17): 5210-5217.
- TAYLOR, G.J. 1991. *Current views of the aluminium stress response: the physiological basis of tolerance*. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 10: 57-93.
- TEMPLE, S.J.; B.J. DRUMMOND; J.E. TOFTE; M. MCCASLIN. 2002. *Maximizing expression of transgenic traits in autopolyploid plants*. En: SHEAFFER, C.; G.R. BAUCHAN (ed.). *Report 38th North American Alfalfa Improvement Conference*. Sacramento, CA, EUA. 42 p.
- TESFAYE, M.; S.J. TEMPLE; D.L. ALLAN; C.P. VANCE; D.A. SAMAC. 2001. *Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum*. *Plant Physiol.* 127:1836-1844. doi:10.1104/pp.010376
- TESFAYE, M.; N.S. DUFAULT; M.R. DORNBUSCH; D.L. ALLAN; C.P. VANCE; D.A. SAMAC. 2003. *Influence of enhanced malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability*. *Soil Biol. & Biochem.* 35: 1103-1113.
- TOMÉ, G. 1947. *El mejoramiento de la alfalfa*. *Rwv. Arg. de Agronomía* 14:279-313.
- TRUCCO, V.M.; N. BEJERMAN; S. DE BREUIL; D. CABRERA MEDEROS; S. LENARDON; F. GIOLITTI. 2018. *Alfalfa dwarf disease, a viral complex affecting alfalfa crop in Argentina*. IN *Proceedings. Second World Alfalfa Congress, Cordoba, Argentina*. (Disponible: <http://www.worldalfalfacongress.org/> consultado: agosto de 2020).
- TURNER, N.C. 1986. *Crop water deficits: A decade of progress*. *Adv. Agron.* 39: 1-51.
- TWAMLEY, B.E. 1974. *Recurrent selection in forages*. *Plant Breeding Abst.* 44: 613-616.
- TYSDAL, H.M.; T.A. KIESSELBACH; H.L. WESTOVER. 1942. *Alfalfa breeding*. *Univ. of Nebraska, Agr. Exp. Stn. Res. Bull.* 124, 46 p.

- TYSDAL, H.M.; B.H. CRANDALL. 1948. *The polycross progeny performance as an index of the combining ability of alfalfa clones*. *J. Am. Soc. Agronomy* 40: 293-306.
- VASQUEZ, M.D.; C. POSCHENRIEDER; I. CORRALES; J. BARCELO. 1999. *Change in apoplastic aluminium during the initial growth response to aluminium during the initial growth response to aluminium by rotos of a tolerant maize variety*. *Plant Physiol.* 119: 435-444.
- VERONESI, F.; D. ROSELLINI; E. ALBERTINI. 2003. *The use of molecular markers in alfalfa breeding*. *Czech J. Genet. Plant Breeding.* 39. 104-111.
- VIANDS, D.R.; P. SUN; D.K. BARNES. 1988. *Pollination control: mechanical and sterility*. En: HANSON, A.A.; D.K. BARNES; R.R. HILL Jr. (ed.). *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, EUA. 931-960 pp.
- VILLAGRACIA, M.R.; T.E. CARTER; T.W. RUFTY; A.S. NIEWOEHNER; M.W. JENNETTE; C. ARELLANO. 2001. *Genotypic rankings for aluminium tolerance of soybean roots grown in hydroponics and sand culture*. *Crop Sci.* 41: 1499-1507.
- VOIGT, P.W.; H.W. GODWIN. 1997. *A soil-on-agar method to evaluate acid-soil resistance in white clover*. *Crop Sci.* 37: 1493-1496.
- VOIGT, P.W.; J.A. MOSJIDIS. 2002. *Acid-soil resistance of forage legumes as assessed by a soil-on-agar method*. *Crop Sci.* 42: 1631-1639.
- VOLENEC, J.J.; J. CHERNEY. 1990. *Yield components, morphology and forage quality of multifoliolate alfalfa phenotypes*. *Crop Sci.* 30, 1234-1238.
- VON UEXKÜLL, H.R.; E. MUTERT. 1995. *Global extent, development and economic impact of acid soils*. *Plant Soil* 171:1-15. doi:10.1007/BF00009558
- WANG, J.; P. BODENHORST; A. PHELAN; L. PEMBLETON; G. SPANGENBERG; N. COGAN. 2019. *Applications of unmanned aircraft system for genomic selection of drought tolerance in perennial ryegrass*. *Proceedings of the International Forage & Turf Breeding Conference, Lake Buena Vista, FL, EUA.* 114 p.
- WIERSMA, D. 2001. *Are Hybrids the New Yield Force in Alfalfa? A Summary of Alfalfa Hybrid Performance in University Variety Trials. Focus on Forage*. University of Wisconsin-Madison. Vol. 3. N.º 12. 4 p. (Disponibile: <https://fyi.extension.wisc.edu/forage/files/2014/01/hybridalfalfa2.pdf> consultado: agosto de 2020).
- WINICOV, I. 1998. *New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants*. *Annals of Botany* 82: 703-710.
- WINICOV, I.; D. BASTOLA. 1999. *Transgenic overexpression of the transcription factor Alfin1 enhances expression of the endogenous MsPRP2 gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants*. *Plant Physiol.* 120, 473-480. doi: 10.1104/pp.120.2.473