

MELHORAMENTO GENÉTICO DA ALFAFA

Ing. Agr. (MSc,PhD) Daniel H. Basigalup e Ing. Agr. (MSc) Ariel S. Odorizzi
INTA Manfredi, Argentina

INTRODUCCIÓN

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una planta perenne, de flores perfectas y de fecundación preponderantemente alógama. Posee una extraordinaria variabilidad genética, enriquecida por la introgresión de las especies que conforman el “complejo *Medicago sativa*” (Quirós y Bauchan, 1988). Las especies que conforman este complejo tienen 8 cromosomas como número básico ($x = 8$) y se presentan con formas diploides ($2n = 2x = 16$) y tetraploides ($2n = 4x = 32$).

La naturaleza autotetraploide de la alfalfa cultivada tiene profundas implicancias en su mejoramiento, que se pueden resumir en las tres siguientes (Busbice et al., 1972): a) El rango total de genotipos esperables se logra luego de al menos dos generaciones en panmixia; en la práctica, esto significa que si el objetivo es identificar genotipos extremos, se deberá permitir la ocurrencia de un mínimo de dos generaciones de apareamientos al azar y se deberá evaluar un alto número de individuos; b) El equilibrio gamético se alcanza en forma asintótica, dado que -a diferencia de los diploides- los autotetraploides pierden en cada generación de apareamiento en panmixia sólo dos tercios del desequilibrio gamético, como consecuencia de que la naturaleza diploide 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; y c) La naturaleza diploide de las gametas puede permitir un cierto grado de endocria dentro mismo de las gametas, lo que aumenta las probabilidades de consanguinidad.

La alfalfa es muy sensible a la endogamia, que se manifiesta rápidamente en pérdida de vigor, baja producción de forraje y escasa o nula formación de semillas. Usualmente es muy difícil avanzar más allá de la segunda generación de autofecundaciones. En consecuencia, la obtención de “líneas puras” o el desarrollo de líneas endocriadas para la obtención de híbridos son métodos impracticables. La obtención de variedades de alto rendimiento se logra intercruzando progenitores no endocriados ni relacionados.

Cuando se selecciona por un solo gen dominante, 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 y a valores $> 0,5$, la respuesta se hace lenta y poco perceptible; si la frecuencia es $= 0,5$, el 93% de los individuos de una población autotetraploide en equilibrio expresará el fenotipo dominante (Rodríguez, 1986). Si la frecuencia del gen dominante es muy baja o si el carácter a mejorar está condicionado por un gen recesivo, se deben seleccionar sólo los genotipos deseables, dado que la inclusión de genotipos indeseables (“escapes”) puede retrasar notoriamente el progreso de la selección (Busbice et al., 1972).

La alfalfa posee mecanismos de autoincompatibilidad y autoesterilidad que favorecen la alogamia (Viands et al., 1988). La incompatibilidad hace referencia a la imposibilidad de que un gameto masculino y otro femenino –asumiendo que ambos son funcionales- puedan fecundarse luego de la polinización o apareamiento. Según Barnes et al. (1972), la autoincompatibilidad impide la autofecundación, ya sea por interacciones entre polen y estigma (control esporofítico), o por reacciones entre polen y estilo (control gametofítico), o por fallas en la singamia dentro del saco embrionario, o por interacciones entre el tubo polínico y el óvulo dentro del ovario. Esta última es una característica de la alfalfa, donde los tubos polínicos originados en polen propio (autopolinización) crecen más lentamente que los

originados en polen de fecundación cruzada; no obstante, la autoincompatibilidad es sólo parcialmente eficaz en la prevención de la autofecundación. Por otro lado, en la alfalfa también se da un alto porcentaje de aborto de óvulos fecundados, lo cual ya no sería autoincompatibilidad (dado que hubo fecundación) sino autoesterilidad. Este último término debe usarse cuando se habla de la imposibilidad de formación de frutos y semillas luego de la autofecundación.

Otro mecanismo que puede usarse para el control de polinización es la androesterilidad, tanto genética (Childers y McLennan, 1960) como citoplásmica (Davis y Greenblatt, 1967). Según McLennan y Childers (1964), la androesterilidad genética estaría condicionada por un solo gen nuclear recesivo (ms_3). El sistema de androesterilidad citoplásmica en alfalfa se caracteriza por el desarrollo incompleto del polen o por el aborto de los granos de polen una vez finalizada la meiosis. De acuerdo con Barnes et al. (1972), las plantas de tipo A (androesterilidad citoplásmica) son relativamente fáciles de identificar, pero las de tipo B (no restauradoras) son más difíciles de detectar porque debe recurrirse a la observación de la F_1 en los cruzamientos androestériles X fértiles: si la progenie es completa o parcialmente androestéril, es posible que el polinizador tenga citoplasma fértil y genes no restauradores de la fertilidad; por el contrario, si la progenie es fértil, el polinizador puede clasificarse como R (restaurador de la fertilidad). Todos estos mecanismos tienen importancia en el desarrollo de híbridos comerciales, como se verá más adelante.

Una ventaja de la alfalfa es la facilidad para clonar individuos a partir del enraizamiento de trozos de tallos insertos en un medio inerte (vermiculita, arena, perlita, etc.). La elección de tallos sanos, vigorosos y en activo crecimiento es un factor de enorme importancia para obtener un alto porcentaje de enraizamiento. El uso de clones puede facilitar la evaluación de genotipos para algunos caracteres cuantitativos o para determinar la magnitud de la varianza ambiental.

IMPLEMENTACIÓN DE UN PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO

Además de conocer los conceptos planteados en la sección anterior, el fitomejorador deberá analizar cuidadosamente una serie de cuestiones que impactarán en los resultados y en la eficiencia de su trabajo de mejoramiento. Entre ellas, es fundamental definir los objetivos del programa, que deben ser claros y alcanzables en un plazo de tiempo razonable y en función a la infraestructura disponible. En caso de ser varios, puede ser necesario establecer un orden de prioridad para llevarlos a cabo. Si hubiera que mejorar un conjunto de caracteres, es aconsejable tratar de mejorar primero aquellos caracteres que parecen más deficitarios y concentrarse luego en elevar las relativamente buenas características que pudieren estar ya presentes (Rodríguez, 1983; Rodríguez, 1986). La gran mayoría de los programas de mejoramiento de alfalfa tienen como objetivos principales el desarrollo de cultivares con muy alta producción de forraje, alta persistencia y resistencia múltiple a insectos dañinos y enfermedades. En otros casos, también puede ser importante mejorar la calidad forrajera o la adaptación a ambientes con problemas de acidez, salinidad o sequía. El rendimiento de semilla no suele ser tenido en cuenta por muchos fitomejoradores, pero es un carácter importante para los multiplicadores y puede tener una incidencia directa en los costos de multiplicación y en la disponibilidad comercial de semilla de las variedades. En países donde la alfalfa se usa básicamente en pastoreo directo, la disminución del potencial timpanizante constituye un objetivo importante.

Obviamente, el requisito fundamental para un programa de selección es la existencia de adecuados niveles de variabilidad genética en los caracteres a mejorar. Los métodos de mejoramiento tradicionales hacen uso de la variabilidad genética naturalmente presente en el

cultivo y/o en las especies relacionadas. Si ésta no existiera, deberá crearse ya sea por inducción de mutaciones o por el uso de técnicas biotecnológicas (variación somaclonal, transgénesis, manipulación genética, etc.). En alfalfa, el empleo de agentes mutagénicos, muy en boga hace unas décadas, ha caído en desuso. Por el contrario, la utilización de la biotecnología adquiere cada vez más preponderancia, y se está empleando con éxito en el desarrollo de cultivares transgénicos con tolerancia a herbicidas (glifosato) o resistencia a insectos (lepidópteros). También se ha avanzado en la producción de plantas con menor tenor de lignina y en la síntesis de taninos condensados para la prevención del timpanismo.

Seguidamente, el fitomejorador deberá definir el método de mejoramiento a emplear, las unidades de selección, el tamaño de la población a conducir, la intensidad de la selección y el grado de mejoramiento esperado. La definición de estos temas se vería facilitada si se contara con información previa sobre la heredabilidad de los caracteres a mejorar, el peso relativo de los efectos génicos y la magnitud de la interacción genotipo-ambiente. Lamentablemente, en la mayoría de los casos, esa información raramente existe.

La disponibilidad de campo experimental, de herramientas y equipamiento, de invernáculos y laboratorios, y de recursos humanos y financieros, debe ser la adecuada para la consecución de los objetivos planteados en el programa de mejoramiento. También es importante contar, en zonas apropiadas, con lotes de multiplicación de las poblaciones avanzadas y/o de producción de semilla prebásica (*breeder*) de las nuevas variedades.

En lo referente al material de cría, la utilización de genotipos de alto potencial de rendimiento y adecuada adaptación es imprescindible. Todos los programas destinados a la obtención de variedades comerciales utilizan como base de sus bancos activos germoplasmas *elite*, con 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 sólo como fuente de alelos raros o poco frecuentes en los materiales de los bancos activos. 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 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.

MÉTODOS DE MEJORAMIENTO

Los métodos de mejoramiento definen la forma de conducir la selección, las unidades de selección a utilizar y el posterior manejo que se da a los genotipos seleccionados. Existen muchos métodos de mejoramiento, que de acuerdo con Rumbaugh et al. (1988) se clasifican en dos grandes grupos (Cuadro 1): a) *interpoblacionales*, que se basan en el concepto del mejoramiento de poblaciones de polinización abierta, donde se permite el flujo de genes entre poblaciones y en los que el intercambio de polen puede ser llevado a cabo en forma natural (polinizadores) o manual; y b) *intrapoblacionales*, que buscan incrementar la frecuencia de genes favorables dentro de una misma población de plantas. En este último grupo, las unidades de selección pueden ser plantas individuales, familias de plantas, o sus combinaciones. Es importante señalar que -en general- los métodos no son excluyentes entre sí y que pueden usarse en forma complementaria, a efectos de una utilización más eficiente de los recursos disponibles en función de los objetivos del programa de mejoramiento. Por ejemplo, la selección fenotípica recurrente puede utilizarse en combinación con las pruebas de progenie o con la evaluación clonal.

CUADRO 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).

MÉTODOS DE MEJORAMIENTO DE ALFALFA

A- INTERPOBLACIONAL

- 1- Formación de poblaciones
- 2- Variedades Sintéticas/Sintéticos
- 3- Retrocruzamientos
- 4- Cruzamientos Complementarios de Cultivares
- 5- Híbridos

B- INTRAPOBLACIONAL

a- Selección de plantas individuales

- 1- Selección Masal/Fenotípica recurrente
- 2- Evaluación Clonal
- 3- Pruebas de Progenie:
 - i) Polinización Abierta
 - ii) Autofecundación (S_1)
 - 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

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 genes favorables para los caracteres de interés (Tysdal et al., 1942). El **retrocruzamiento** se ha utilizado en alfalfa para corregir alguna deficiencia, generalmente susceptibilidad a una plaga o enfermedad, en materiales agrónomicamente muy valiosos. A fin de disminuir el riesgo de endocria, es recomendable utilizar diferentes padres recurrentes en cada ciclo de retrocruzamientos (Stanford y Houston, 1954). La **evaluación clonal**, que puede ayudar a la identificación de genotipos superiores cuando se trabaja con caracteres de baja a mediana heredabilidad y con una importante interacción genotipo-ambiente, se usa cada vez menos por su alto costo y por la cantidad adicional de trabajo que demanda. Además, la clonación altera el normal desarrollo de las raíces, lo que complica la evaluación de caracteres radiculares.

Prácticamente todos los cultivares comerciales en el mundo son **variedades sintéticas**, o simplemente **sintéticos**, que de acuerdo con Busbice (1969) se definen como el producto del libre apareamiento entre varios progenitores, de modo tal que todos los cruzamientos posibles tengan igual probabilidad de ocurrencia. De esa manera, la formación de una variedad sintética arranca con la selección de individuos por uno o más caracteres a fin de constituir la generación parental (*Sin 0*); seguidamente, a través del intercruzamiento de esas selectas parentales, se produce la semilla de la primera generación de síntesis (*Sin 1*); ésta es utilizada en la misma forma para producir la semilla *Sin 2*; y así sucesivamente. Vale decir que una variedad sintética 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, dependiendo del grado de consanguinidad y del número de

progenitores utilizados (Busbice, 1970). 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). Los sintéticos son usados comercialmente en generaciones avanzadas (*Sin 3-5*); por ello, y teniendo en cuenta que Kehr et al. (1961) demostraron que los rendimientos de un sintético decrecen a medida que se avanza en el número de generaciones, especialmente entre la *Sin 1* y la *Sin 2*, es aconsejable que la evaluación agronómica de los nuevos cultivares se haga sobre una generación comercial. En general, los sintéticos de base amplia son menos inestables en generaciones más avanzadas.

Dos métodos muy utilizados en alfalfa son el **cruzamiento complementario de cultivares** (CCC) y la **selección fenotípica recurrente** (SFR). Las poblaciones resultantes de uno u otro pueden utilizarse como cultivares comerciales o como fuentes de germoplasma para posteriores trabajos de mejoramiento. Respecto del CCC, Busbice et al. (1972) demostraron que si dos poblaciones se cruzan, y suponiendo que cada una de ellas posea con una frecuencia de 0,5 un gen dominante, la población resultante tendrá en el punto de equilibrio el 46,7% de individuos con ambos genes dominantes, el 43,3% con sólo uno de ellos, y únicamente el 10% con ninguno de los dos. El CCC fue utilizado por Elgin (Jr.) et al. (1983) en el desarrollo de poblaciones de alfalfa con resistencia múltiple a plagas. Por otro lado, y considerando la apreciable cantidad de heterosis que se obtiene al cruzar poblaciones no relacionadas ni endocriadas, el CCC también es una alternativa muy importante para el desarrollo de cultivares con mayor rendimiento de forraje (Bingham, 1983; Hill (Jr.), 1983). Por su parte, la SFR consiste en un proceso cíclico de selección de individuos deseables por su fenotipo y su posterior entrecruzamiento para la producción de la generación siguiente. Se trata de un refinamiento de la selección masal, donde el intercambio de polen se limita a los individuos seleccionados. De ese modo, realizando tantos ciclos de selección y entrecruzamiento como sean necesarios, se incrementa la frecuencia de los alelos favorables en la población (Dudley et al., 1963; Eberhart et al., 1967; Hanson et al., 1972). A fin de favorecer el avance genético y evitar la endocría, es importante evaluar poblaciones de tamaño considerable y emplear un número relativamente alto de progenitores en cada generación de entrecruzamientos. En el caso de la alfalfa se ha sugerido el uso de no menos de 75 individuos en cada ciclo (Aalders, 1966; Hill (Jr.) et al., 1969). Si bien la SFR es usualmente más eficiente en el mejoramiento de caracteres cualitativos y de alta heredabilidad, también se ha empleado con éxito para incrementar el rendimiento de forraje y otros caracteres cuantitativos en algunas especies forrajeras (Twamley, 1974).

La depresión por endocría y el vigor híbrido manifestados por la alfalfa han incentivado el desarrollo de cultivares **híbridos** desde mucho tiempo atrás (Burkart, 1947); sin embargo, el desarrollo de líneas endocriadas en alfalfa es prácticamente imposible debido a la marcada depresión por endocría que la especie manifiesta. Como alternativa, y desde etapas muy tempranas, Tysdal et al. (1942) propusieron la propagación vegetativa de dos clones autoestériles para originar una F_1 y posteriormente la mezcla de semilla de dos poblaciones F_1 para producir un híbrido doble; no obstante, al no existir un completo control de la polinización, este método fue legalmente excluido de la denominación de “híbrido” en los Estados Unidos. La idea de emplear la androesterilidad genética, que se expresa sólo en el genotipo homocigota recesivo y que requiere la propagación vegetativa de las plantas androestériles, fue considerada antieconómica y poco práctica (Barnes et al., 1972). A fines de la década de 1960, se sugirió el empleo de la androesterilidad citoplasmática para el desarrollo de híbridos comerciales (Davis y Greenblatt, 1967; Bradner y Childers, 1968). Este método de control de la polinización parece ser el más eficiente, especialmente cuando se desarrollan híbridos de tres líneas: un clon A androestéril (*ms*) X un clon B androfértil (mantenedor no restaurador) y luego esa F_1 AB (*ms*) X un clon C, que es un padre

polinizador y que puede ser una línea B o R (androfértil restaurador de la producción de polen). La forma de obtener los cruzamientos es alternando hileras distanciadas de cada una de las líneas y utilizar abejas polinizadoras; en ese contexto, se han observado menores rendimientos de semilla en las líneas androestériles, ya sea por problemas de distancia a las fuentes de polen o por diferencias de atracción hacia los polinizadores, lo que plantea objeciones de carácter económico. En los últimos años, la empresa Dairyland Seed Co. (Estados Unidos), utilizando un procedimiento muy similar al descrito (Sun et al., 2001), ha lanzado algunos híbridos comerciales de alfalfa en los que –dado que la semilla del producto final ABC se cosecha a granel de todas las plantas- se asegura un mínimo de 75% de semilla híbrida. Esto último hace que, a diferencia de los que pasa con otras especies que utilizan líneas endocriadas, la composición de la variedad no sea la misma a través de los años. Por otro lado, y de acuerdo a lo planteado por Childers y Barnes (1972), la herencia tetraploide de la alfalfa puede dificultar el uso de genes nucleares restauradores de la fertilidad. Como otra alternativa para capitalizar la heterosis en alfalfa, Brummer (1999) propuso el desarrollo y el mantenimiento de dos grupos heteróticos para la obtención de “semihíbridos”, dado que cuando estos dos grupos se aparean la mitad de la progenie es el resultado de cruzamientos interpoblacionales y la otra mitad de cruzamientos intrapoblacionales.

Dentro de los métodos intrapoblacionales, la diferencia fundamental entre la **selección de plantas individuales** y la **selección de familias** radica en las unidades de selección: mientras que en el primer caso sólo los mejores individuos son elegidos e interpolinizados, en el segundo las mejores progenies (no los genotipos parentales) son seleccionadas e intercruzados para producir la siguiente generación. La selección de familias, ya sea de medio-hermanos o de hermanos completos, es más efectiva que la selección masal para mejorar caracteres cuantitativos (Rumbaugh et al., 1988). En el caso de la **selección dentro de cada familia**, la diferencia estriba en que sólo 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 empleo de **pruebas de progenie** tiene por finalidad la identificación de genotipos superiores a través de la evaluación de su descendencia. Dado que requieren de una generación extra para la evaluación de los progenitores y de una considerable dedicación de recursos, son recomendadas casi exclusivamente para mejorar caracteres de baja heredabilidad y donde la interacción genotipo-ambiente puede ser significativa. Es importante promover la floración simultánea del material y, si se emplean abejas para la polinización, considerar el sesgo que la preferencia floral de los insectos puede originar. Mientras que con las pruebas de polinización abierta y de policruza se puede estimar la aptitud combinatoria general de cada individuo, con las de topcross y cruzamientos dialélicos se puede estimar tanto la aptitud combinatoria general como la específica. No obstante, teniendo en consideración la gran cantidad de trabajo que requieren, se aconseja que éstos dos últimos – y en particular los dialélicos- se utilicen sólo para etapas avanzadas del programa de mejoramiento, cuando se cuenta con un número reducido de clones y cuando la determinación de la aptitud combinatoria específica sea relevante. El uso de cruzamientos recíprocos en un dialélico también proporciona información sobre los efectos maternos que pueden influir en el control genético de algunos caracteres. Por su parte, las pruebas de autofecundación (S_1) pueden ser muy efectivas cuando se trabaja con caracteres que son condicionados por acciones génicas aditivas. Si bien la mayoría de los programas de mejoramiento comerciales no emplean actualmente pruebas de progenie de ningún tipo, por el requerimiento de tiempo y recursos que suponen, Basigalup et al. (2004) utilizaron con

éxito la prueba de policruza para la identificación de padres superiores en el desarrollo de un cultivar de alfalfa con menor potencial timpanizante.

SELECCIÓN POR MÁS DE UN CARÁCTER

La situación más común que los fitomejoradores enfrentan durante el desarrollo de un cultivar es la necesidad de mejorar simultáneamente por más de un carácter. Para ello, se han diseñado algunos procedimientos que en su conjunto se denominan "técnicas de selección para caracteres múltiples" y que básicamente son las tres siguientes (Busbice et al., 1972; Rumbaugh et al., 1988): i) **niveles independientes de selección**: para cada carácter a mejorar se elige un determinado nivel a alcanzar y se retienen, en el mismo ciclo de mejoramiento, sólo aquellas unidades (plantas individuales o familias) que satisfagan esos niveles prefijados. Por ejemplo, una fracción de la población es seleccionada por el carácter *A*; seguidamente, de esta fracción se seleccionan unidades por el carácter *B*; posteriormente, de esta nueva fracción se selecciona por el carácter *C*; y así sucesivamente hasta el carácter *n*. Finalmente, las unidades seleccionadas por los caracteres *A*, *B*, *C*, ...*n* son intercruzadas para producir la siguiente generación o ciclo de mejoramiento. Este procedimiento es generalmente utilizado para mejorar caracteres agronómicos. Para evitar posibles problemas de consanguinidad, es importante partir de una población inicial lo suficientemente numerosa. Una variante del esquema anterior, utilizada especialmente para el desarrollo de poblaciones con resistencia múltiple a plagas y enfermedades, es la llamada *eliminación sucesiva*, en la que los individuos sobrevivientes a la peste *a* son expuestos a la peste *b*, los sobrevivientes a la peste *b* son expuestos a la peste *c*, y así sucesivamente. Con los niveles independientes de selección y/o sus variantes, la intensidad de selección para caracteres individuales decrece cuando el tamaño de la población y el número de individuos retenidos es mantenido constante; sin embargo, si los caracteres tienen similar importancia económica y son genéticamente independientes, el progreso global será mayor que el obtenido con la selección por cada carácter en forma individual; ii) **selección en "tandem"**: se mejora primero un carácter, por una o más generaciones, hasta alcanzar el nivel prefijado. Luego se inician los correspondientes ciclos de selección para mejorar un segundo carácter, y así sucesivamente hasta completar los objetivos planteados. Obviamente, tanto el número de ciclos de selección como los niveles a alcanzar pueden variar para cada carácter; y iii) **selección por índices**: las unidades de selección son evaluadas por varios caracteres de acuerdo a escala definida para cada uno. Esos valores, ponderados por su importancia genética y/o económica, son luego integrados en un índice final. Los individuos o las progenies que alcancen los más altos valores de ese índice ponderado son utilizados para la producción de la siguiente generación. En general, este procedimiento es más conveniente cuando se trabaja con caracteres de alta heredabilidad y cuando existe una correlación genética relativamente alta entre esos caracteres. Harris (1963; 1964) aconsejó el uso de muestras suficientemente grandes -no menos de 1000 individuos- si se quieren minimizar los errores en la estimación de las ganancias esperadas con la utilización de índices.

Comparando las técnicas anteriormente descritas, Hazel y Lush (1942) concluyeron que la selección por índices es más eficiente que la selección por niveles independientes, y que ésta es más eficiente que la selección en tandem, especialmente si los caracteres a mejorar tienen la misma importancia e igualdad de varianzas y heredabilidades. La superioridad de los índices de selección se incrementa a medida que aumenta el número de caracteres a seleccionar, pero disminuye cuando los caracteres difieren en importancia o cuando se incrementa la intensidad de selección. No obstante su menor eficiencia, la selección en tandem es menos exigente en recursos e infraestructura. La elección entre una

u otra deberá basarse no sólo en las cuestiones técnicas planteadas sino también en la infraestructura disponible y en las particularidades de los caracteres a mejorar. En relación a esto último, resulta especialmente importante el momento en que la resistencia a una plaga o enfermedad se puede expresar o evaluar mejor.

BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL MEJORAMIENTO DE ALFALFA

El mejoramiento genético convencional utiliza la variabilidad genética ya existente y se basa en la reproducción sexual, lo que restringe la realización de cruzamientos a plantas de la misma especie y/o especies relacionadas. En algunos casos, la obtención de nuevos cultivares por medio de técnicas convencionales puede resultar ineficiente, tanto por el tiempo que se requiere como por el progreso lento que se obtiene; en otros, puede ser directamente imposible por la ausencia de variabilidad genética. En ese contexto, la Biotecnología puede facilitar el desarrollo de materiales mejorados al permitir superar las limitaciones de los métodos convencionales (Ríos et al., 2007). Una descripción de las técnicas biotecnológicas aplicadas al mejoramiento de la alfalfa se ofrece en el Capítulo 9.

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares pueden utilizarse para fines tan diversos como la construcción de mapas genéticos, la caracterización de la variabilidad genética de poblaciones, la detección de grupos heteróticos, la detección de zonas codificantes para QTLs (*Quantitative Traits Loci*), la selección asistida y la identificación de variedades por caracterización molecular (*fingerprinting*). Un completo tratamiento de los diferentes marcadores moleculares y sus aplicaciones se puede encontrar en Ferreira y Grattapaglia (1998) y en Martín (2002). En el género *Medicago* se han utilizado, entre otros, RFLP (Kidwell et al., 1994), RAPD (Barcaccia, 1994; Brummer et al., 1995) y microsatélites (Diwan et al., 1997). En el caso concreto de la alfalfa cultivada, estos marcadores fueron empleados para desarrollar un mapa genético (Brummer et al., 1993), para el mapeo de QTLs (Alarcón Zuñiga et al., 2004), para caracterizar la variabilidad genética en poblaciones (Bonafede et al., 1999) y para estudios de heterosis (Riday y Brummer, 2004). En INTA Manfredi se está desarrollando un sistema de selección asistida por microsatélites para identificar individuos con resistencia a enfermedades (Gieco et al., 2007).

Transformación genética

La introducción de genes filogenéticamente diferentes en el genoma de la alfalfa puede ser de gran utilidad cuando se quieren mejorar caracteres para los que no existe variabilidad genética convencional. En ese sentido, la obtención de plantas transgénicas con resistencia a insectos y enfermedades, tolerancia a herbicidas, mayor calidad forrajera o tolerancia a estreses abióticos (sequía, salinidad, acidez, etc.) ofrece grandes posibilidades. Si bien todos estos eventos corresponden a la llamada “primera generación de transgénesis”, ya se está trabajando en los de “segunda generación”, que implican -entre otras- la mejora de la calidad nutricional, la biorremediación, la reducción de alérgenos o el uso de la alfalfa como biorreactor para la producción de vacunas, enzimas, etc. Paralelamente, se están dilucidando las bases para los de “tercera generación”, que supondrá la manipulación de la estructura de las plantas, la alteración de los patrones de floración o de fotosíntesis, la senescencia de hojas, etc.

El INTA Castelar (Ríos et al., 2007) ha desarrollado alfalfas transgénicas con resistencia a lepidópteros (genes *Bt*) y continúa trabajando en la resistencia a hongos patógenos (glucanasas y quitinasas), en la manipulación de la biosíntesis de taninos condensados para controlar timpanismo y aumentar la proporción de proteína pasante, y en la expresión de antígenos virales (fiebre aftosa, diarrea viral bovina y rotavirus bovino). En los Estados Unidos, la empresa Forage Genetics ha lanzado al mercado un grupo de variedades con tolerancia al glifosato (tecnología RR) que han exhibido un muy buen comportamiento frente a las aplicaciones del herbicida (Van Deynze et al., 2004). Las pruebas de evaluación de estos materiales en la Argentina comenzaron en 2007.

Incorporación de transgenes

Otra de las implicancias prácticas de la autotetraploidía en el mejoramiento de la alfalfa se relaciona con la introgresión de transgenes para el desarrollo de cultivares comerciales genéticamente modificados. 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_0) 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, en la alfalfa -debido a su condición autotetraploide- la obtención de índices relativamente altos (> 90%) de transmisión del transgen requiere del inter cruzamiento de genotipos parentales que posean el transgen en condición duplex (AA--), triplex (AAA-) o cuádruplex (AAAA). Si bien tales individuos podrían desarrollarse a partir de ciclos de selección recurrente fenotípica, no existen en la actualidad técnicas de laboratorio lo suficientemente precisas y potentes como para discriminar plantas de ese tipo. En consecuencia, se hace necesaria la utilización de pruebas de progenie que permitan la identificación de individuos que compartan el mismo fenotipo transgénico. Sin embargo, además del mayor trabajo que supone esta situación, la selección y las pruebas de progenie incrementan el riesgo de generar una significativa depresión por endocría o deriva genética (Samac y Temple, 2004). Una alternativa para superar estas dificultades y maximizar la expresión de caracteres transgénicos en autoploidos, es el método propuesto por McCaslin et al. (2002), que se basa en la selección asistida por marcadores moleculares y el uso plantas *multihomogénicas*, término que describe la presencia de más de una copia de un transgen particular en varios loci independientes a lo largo del genoma de una planta individual. 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 transgénicas con resistencia al herbicida glifosato (Temple et al., 2002). En este caso concreto se utilizaron cuatro líneas experimentales, cada una conteniendo una copia simple del transgen provenientes 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 para un sistema autotetraploide con dos eventos independientes de transformación (McCaslin et al., 2002).

MEJORAMIENTO POR RESISTENCIA A PLAGAS

Para mejorar el nivel de resistencia a plagas (enfermedades e insectos dañinos), el objetivo es identificar y mantener las plantas individuales de una población que posean genes de resistencia. Luego, esas plantas son interpolinizadas a fin de cosechar la semilla que dará origen a una nueva población con una mayor frecuencia de plantas resistentes. El empleo de un número de plantas lo suficientemente grande es fundamental para minimizar endocria y conservar variabilidad genética para otros caracteres deseables (Elgin et al., 1988). También es importante conocer las características del patógeno en cuestión, incluyendo sus requerimientos de cultivo o cría, ciclo de vida, hospedantes, distribución geográfica, generación de razas o biotipos, importancia económica, etc.

A fin de aumentar la eficiencia de trabajo es necesario desarrollar protocolos de selección que –combinando procedimientos de laboratorio, invernáculo, cámara de cría y/o campo- permitan una adecuada identificación de los genotipos resistentes. La finalidad es reproducir las mejores condiciones ambientales para que el patógeno desarrolle en condiciones óptimas y, a través de sus daños, permita identificar las plantas deseables en la población. Además de permitir evaluar un gran número de genotipos en un plazo de tiempo razonable y adecuado, un protocolo ideal debe ser sencillo, estable, reproducible, objetivo, efectivo y preciso. Por otro lado, es importante que exista una alta correlación entre el comportamiento de los genotipos seleccionados bajo esas condiciones y su posterior comportamiento a campo. Complementariamente, es conveniente determinar si la resistencia en cuestión se expresa de la misma forma en los distintos estadios fenológicos de la planta.

La North American Alfalfa Improvement Conference (NAAIC) publica en Internet la serie completa de pruebas estandarizadas que se han establecido para la caracterización de los niveles de resistencia a los principales insectos y enfermedades de importancia económica. Allí se especifican las condiciones de cultivo o cría, las condiciones ambientales de las pruebas y los testigos (cultivares o líneas experimentales) resistentes y susceptibles a emplear en cada caso. En un programa de mejoramiento, las plantas identificadas como resistentes a través de esos protocolos se inter cruzan para producir la siguiente generación de selección.

Resistencia a enfermedades

La selección fenotípica recurrente ha sido el método de mejoramiento más exitosamente empleado en el desarrollo de cultivares de alfalfa resistentes a enfermedades. Otra técnica interesante es el cruzamiento complementario de cultivares (Elgin (Jr.) et al., 1983). El retrocruzamiento se utilizó en unos pocos casos (Murphy y Lowe, 1966; Peadar et al., 1976), pero ya ha caído en desuso.

En la mayoría de los casos, la resistencia a enfermedades está condicionada por uno o pocos genes con grado variable de dominancia (Elgin et al, 1988), lo que hace que el progreso de selección sea relativamente rápido. Otro aspecto interesante es que, por lo

general, los genes de resistencia a distintas enfermedades no están ligados y actúan en forma independiente unos de otros. Afortunadamente, la producción de razas fisiológicas o patogénicas es insignificante en la mayoría de los patógenos, habiéndose registrado sólo unas pocas excepciones en *C. trifolii* (Welty y Mueller, 1979) y *Peronospora trifoliorum* (Stuteville, 1973).

Resistencia a insectos

La resistencia a los insectos está usualmente condicionada por características de la planta y por condiciones ambientales, que en conjunto con la plaga determinan una serie de complejas interacciones insecto-hospedante. Sorensen et al. (1988) clasifican la resistencia de las plantas en cinco grados: alta resistencia, resistencia intermedia, baja resistencia, susceptibilidad y alta susceptibilidad. También definen las siguientes categorías de resistencia funcional: i) *pseudoresistencia*, que es una resistencia transitoria en plantas potencialmente susceptibles y que comprende tres subclases: escape, evasión y resistencia inducida; ii) *hipersensibilidad*, que es una rápida respuesta de la planta expresada en la necrosis prematura del tejido afectado; iii) *resistencia en planta adulta*, que se expresa sólo en plantas maduras; y iv) *resistencia juvenil*, que es resistencia que se expresa en plántula. A su vez, Painter (1951) definió a los mecanismos de resistencia de las plantas en tres conceptos: *no-preferencia*, *antibiosis* y *tolerancia*. Posteriormente, Kogan y Ortman (1978) propusieron el término *antixenosis* en vez de no-preferencia, dado que éste último hace referencia al comportamiento de los insectos y no a propiedades de la planta en sí. La producción de compuestos químicos por parte de las plantas juega el papel más importante en la determinación de la resistencia a insectos y es la responsable de lo que se conoce como antibiosis. Las características morfológicas –color, tricomas, cera, lignificación, etc.– que interfieren con la alimentación, la digestión, la locomoción o la oviposición de los insectos son las que determinan la antixenosis. La tolerancia hace referencia a la capacidad de la planta para seguir produciendo económicamente a pesar de tener una carga de insectos lo suficientemente alta como para dañar a un hospedante susceptible.

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

PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DE ALFALFA EN INTA MANFREDI

El programa de mejoramiento genético de alfalfa de INTA Manfredi tiene por finalidad la obtención de cultivares comerciales de grados de reposo invernal (GRI) intermedio (6-7) a sin reposo (8-10), de muy buen rendimiento de forraje, alta persistencia y buenos niveles de resistencia combinada a insectos y enfermedades. Para ello, se utilizan la selección fenotípica de genotipos destacados en condiciones de campo (pastoreo o corte), los cruzamientos complementarios de cultivares y los ciclos de selección fenotípica recurrente para resistencia a antracnosis (*Colletotrichum trifolii* Bain & Essary) (Figura 1), a podredumbre húmeda o fitóftora (*Phytophthora mnegasperma* Drechs. f. sp. *medicaginis*) (Figura 2) y a los pulgones azul (*Acyrtosiphon kondoi* Shinji) y moteado (*Terioaphis trifolii* Monnell) (Figura 3), de acuerdo a los protocolos definidos por la NAAIC.



Figura 1: Protocolo de selección para resistencia a *C. trifolii*: a) cultivo del hongo y recuento de esporas; b) pulverización de plántulas con suspensión de esporas; c) cámara húmeda (24-72 h) para favorecer la infección; y d) identificación de genotipos resistentes. Adaptado de NAAIC.

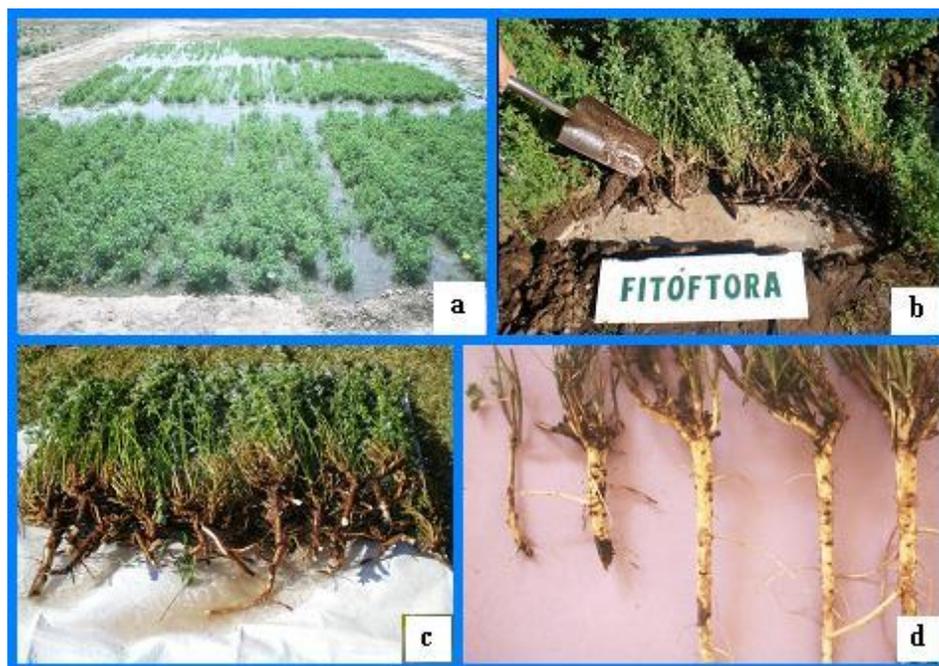


Figura 2: Protocolo de selección para resistencia a *P. megasperma*: a) cultivo de plantas en condiciones de alta humedad y suelo infestado; b) extracción de plantas; c) lavado de plantas individuales; y d) clasificación por sintomatología (izq. a der.): las tres primeras susceptibles, las dos últimas resistentes. Adaptado de NAAIC.



Figura 3: Protocolo de selección para resistencia a *A. kondoi* y *T. maculata*: a) cría de pulgones en condiciones controladas sobre tallos de alfalfa; b) y c) infestación de plántulas y desarrollo de daño; y d) identificación de genotipos resistentes (R) y susceptibles (S). Adaptado de NAAIC.

Durante la selección a campo, se conservan las plantas vigorosas y con coronas compactas y se eliminan los individuos afectados por corchosis (*Xylaria* spp.), por el complejo de podredumbres de corona y raíz (*Fusarium* spp., *Phoma* spp., *Rhizoctonia* spp., *Colletotrichum* spp., etc.) o por enfermedades foliares.

Las plantas selectas –provenientes tanto de la selección a campo como de los insectarios y/o de los infectarios- se agrupan por GRI, se transplantan a jaulas de inter cruzamiento con abejas melíferas (*Apis mellifera*) y se conducen de ahí en más como variedades sintéticas. La producción de semilla prebásica o *breeder* se lleva a cabo en la EEA Manfredi. La producción de semilla fundación o básica de cada sintético se hace en INTA San Juan, donde las condiciones ambientales son más propicias para la obtención de buenos niveles de producción de semilla de calidad. La evaluación de la producción de forraje y persistencia de los sintéticos avanzados (*Sin-2* o *Sin-3*) se hace bajo condiciones de corte en una red interna que incluye seis localidades y series de ensayos que se conducen por tres años. Los materiales que se destacan en todas las localidades son caracterizados e inscriptos como nuevos cultivares. Los más recientes lanzamientos del programa fueron los cultivares ProINTA Luján (GRI 6), ProINTA Patricia (GRI 7), ProINTA Súper Monarca (GRI 8) y ProINTA Mora (GRI 9). En los Cuadros 1 y 2 se resumen los excelentes niveles de producción forrajera que exhibieron en la Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa del INTA.

Cuadro 1: Producción acumulada de forraje del ensayo de reposo intermedio ALFARI 2002 en cuatro localidades de la Región Pampeana. Avances en Alfalfa N° 16 (Spada, 2006).

<i>Cultivar</i>	-----Producción acumulada (Tn MS ha ⁻¹) -----				Σ
	M. Juárez 2002/06	Manfredi 2002/05	Rafaela 2002/06	Anguil 2002/06	
ProINTA Patricia	110,56 a	47,39 a	67,99 a	29,66 a	255,60
ProINTA Luján	107,69 a	45,07 a	49,40 a	32,27 a	234,43
WL 442	103,36 a	42,02 b	58,39 a	26,23 a	230,00
Candombe	102,81 a	39,35 b	55,26 a	30,29 a	230,00
5683	91,16 b	43,19 b	56,64 a	29,33 a	220,32
Gala	96,57 b	38,81 b	49,40 a	27,68 a	212,46
Victoria SP INTA	87,74 b	42,09 b	45,63 a	25,11 a	200,57
Tango	88,16 b	34,33 c	48,62 a	28,75 a	199,86
S 711	78,11 c	33,22 c	41,96 a	27,28 a	180,57
Key II	63,05 d	30,67 c	33,07 b	22,32 a	149,11
Promedio	92,92	39,61	51,17	27,89	
CV (%)	5,5	8,3	21,1	14,2	

Valores seguidos por igual letra no difieren significativamente (DGC $\alpha = 0.05$).

Cuadro 2: Producción acumulada de forraje del ensayo sin reposo ASRI 2004 en cuatro localidades de la Región Pampeana. Avances en Alfalfa N° 18 (Spada, 2008).

<i>Cultivar</i>	-----Producción acumulada (Tn MS ha ⁻¹) -----				Σ
	M. Juárez 2004-08	Manfredi 2004-07	Rafaela 2004-08	Anguil 2004-08	
Cautiva	88,20 a	29,99 b	70,50 a	15,61 b	204,30
ProINTA					
Súper Monarca	91,34 a	32,85 b	62,44 a	16,19 b	202,82
Bacana	88,65 a	31,90 b	66,09 a	15,00 b	201,64
ProINTA Mora	88,39 a	32,40 b	59,49 b	19,04 a	199,32
5939	80,98 b	33,43 b	61,91 a	17,27 a	193,59
Baralfa 9242	83,36 b	33,13 b	62,02 a	14,17 b	192,68
Monarca SP INTA	82,50 b	27,78 b	63,23 a	18,01 a	191,52
969	84,72 a	30,67 b	61,50 a	14,05 b	190,94
Armona	78,24 b	29,52 b	62,37 a	15,06 b	185,19
Maricopa	79,18 b	30,61 b	61,43 a	12,68 b	183,90
Villa	83,39 b	29,80 b	52,82 b	17,65 a	183,66
Yolo	80,65 b	29,94 b	56,23 b	14,89 b	181,71
Exp. 1048	84,16 b	30,99 b	45,15 b	14,89 b	175,19
Medina	81,62 b	25,62 b	46,69 b	17,37 a	171,30
Franca	76,02 b	23,19 b	44,15 b	20,43 a	163,79
ZZ 809S	75,69 b	25,53 b	46,76 b	13,58 b	161,56
MH RD1-SS	79,01 b	25,76 b	36,02 c	15,91 b	156,70
Bar 814	73,92 b	24,48 b	30,27 c	15,63 b	144,30
Promedio	82,85	30,30	58,49	15,97	187,61
CV (%)	4,2	19,4	10,3	12,1	

Valores seguidos por igual letra no difieren significativamente (DGC $\alpha = 0.05$).

MEJORAMIENTO POR CARACTERES ESPECÍFICOS

Además del mejoramiento que se focaliza en la obtención de altos niveles productivos para ambientes sin mayores restricciones, puede ser necesario mejorar también otros caracteres de importancia. Dentro de éste último grupo se encuentran –entre muchos otros– la menor propensión a causar timpanismo y la tolerancia a condiciones de salinidad y acidez. A continuación se reseñarán los adelantos más recientes en el mejoramiento de algunos de ellos o se resumirán los avances en el desarrollo de técnicas de selección.

Timpanismo

De acuerdo con Howarth et al. (1988), y en base a la comparación entre especies de leguminosas timpanizantes y no-timpanizantes, el desarrollo de alfalfas no 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 y 2-) la selección de plantas con menor tasa inicial de desaparición ruminal (TIDR). En el primer caso, la acción antiespumógena de los taninos condensados impide la formación de espuma estable en el rumen, lo que hace que el gas producido por la fermentación microbiana pueda ser expulsado por eructación y no retenido en microburbujas esparcidas por el rumen (McMahon et al., 2000; Gruber et al., 2001). En el segundo caso, las plantas con menor TIDR, al poseer paredes celulares más gruesas, retardan la acción de la microflora e impiden la liberación explosiva de los contenidos celulares al rumen, haciendo que el nivel de gas producido no alcance –en la mayoría de las veces– el umbral necesario para producir timpanismo (Howarth et al., 1978; Howarth et al., 1982a; Howarth et al., 1982b).

El INTA Manfredi, en base a la teoría de la menor desaparición inicial, inició en 1991 un programa de mejoramiento genético para la obtención de un cultivar con menor potencial timpanizante. 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. 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., 2004). Después de tres ciclos de selección y de numerosas evaluaciones, se lanzó al mercado en 2006 el cultivar sin reposo invernal (GRI 8) ProINTA Carmina, que exhibió en promedio una TIDR 22,6% menor que la de la población original.

ProINTA Carmina fue evaluada bajo condiciones de pastoreo en ensayos realizados dentro unidades del INTA, conducidos entre 2003 y 2006 (Basigalup et al., 2007). Los ensayos fueron conducidos de acuerdo con el sistema de “desafíos” y creando condiciones sumamente predisponentes para la ocurrencia de timpanismo. La estimación del grado de timpanismo se basó en una escala visual de 0 (no-timpanismo) a 5 (timpanización crítica, con inminente muerte si no había tratamiento). ProINTA Carmina presentó más casos de no-timpanismo (grado 0) y menores frecuencias de animales con sintomatología leve a moderada (grados 1, 2 y 3). Es decir que los novillos pastoreando ProINTA Carmina presentaron menor incidencia de timpanismo que aquellos que pastorearon el cultivar testigo ($p < 0,05$); además, esas diferencias fueron consistentes a lo largo de los desafíos.

También se realizaron evaluaciones en campos de productores con la finalidad de evaluar el comportamiento de ProINTA Carmina en condiciones de producción comercial y empleando la misma escala de apreciación visual descripta anteriormente. Dos de esos

ensayos se condujeron en la Estancia “La Angelita” (Buchardo, Córdoba). El primero se sembró en marzo de 2006 e incluyó dos potreros de 25 ha: uno con ProINTA Carmina y otro con el cultivar testigo. La alfalfa (7,5 kg ha⁻¹) se consoció con 3 kg ha⁻¹ de festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreber) y 3 kg ha⁻¹ de cebadilla criolla (*Bromas catharticus* Vahl.). Cada potrero se pastoreó con una carga de 100 novillos con un peso individual promedio de 280 kg. Los resultados de 100 días de pastoreo mostraron que ProINTA Carmina tuvo no sólo menor número de animales timpanizados sino también menor frecuencia de casos moderados a graves (Figura 4). El segundo ensayo se implantó en abril de 2007 sobre dos lotes de 48 ha sembrados con una mezcla forrajera similar a la anterior. Cada potrero se pastoreó con una carga de 250 novillos con un peso individual promedio de 230 kg. Después de 70 días de evaluación, se observó que ProINTA Carmina tuvo un significativamente menor número de grados moderados a severos (Figura 5). En esta prueba se calculó también el *índice de timpanismo* (= cantidad de casos x grado de severidad), que en el testigo fue el doble del registrado en ProINTA Carmina: 487 vs. 238. En función de un posible efecto detrimental que la selección por paredes celulares más gruesas pudiera tener en la digestibilidad y el en el consumo, se condujo un ensayo bajo condiciones de corte en la EEA Manfredi. El objetivo fue comparar la calidad forrajera de ProINTA Carmina frente a la del cv. Bárbara SP INTA (testigo) en tres estados fenológicos: vegetativo tardío, botón floral y 10% de floración. Los ensayos tuvieron un diseño de bloques completos aleatorizados con tres repeticiones y parcelas 1 x 5 m. Las determinaciones químicas se realizaron sobre planta entera y de acuerdo a las técnicas tradicionales de Van Soest (fibra detergente neutro o FDN y fibra detergente ácido o FDA) y Kjeldahl (nitrógeno total x 6,25 = proteína bruta). Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro 3. En general, no se detectaron diferencias de calidad entre las dos variedades. Sólo en el estado de botón floral se detectó una mayor concentración de fibra y un menor contenido de proteína bruta en ProINTA Carmina respecto del testigo, resultado esperable dado que el proceso de selección por menor desaparición inicial que dio origen a ProINTA Carmina fue realizado en ese estado de madurez.

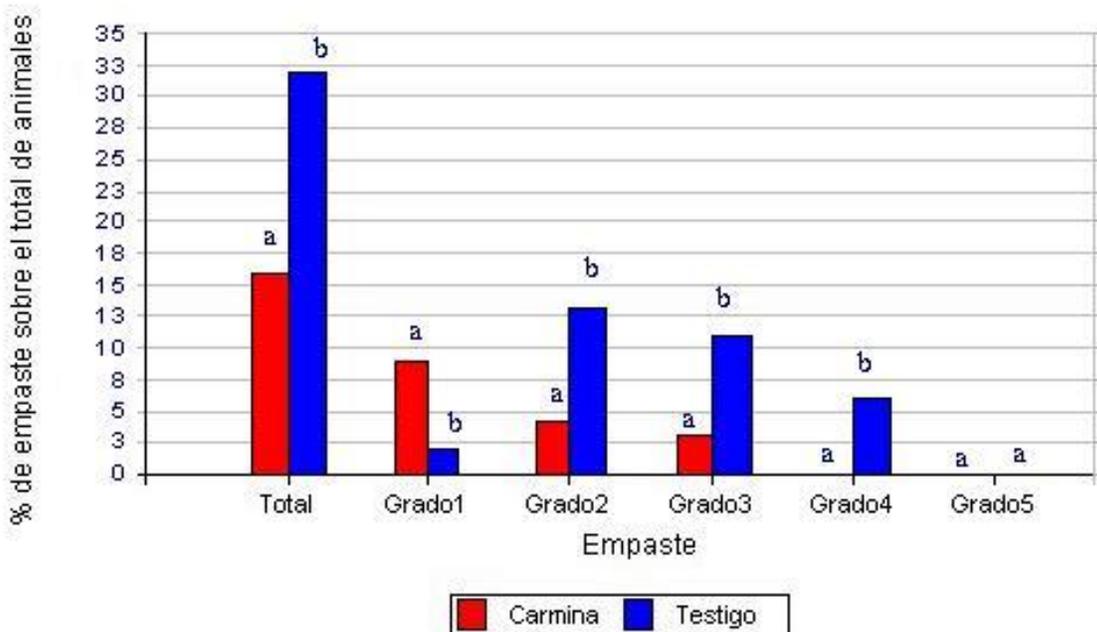


Figura 4: Frecuencia de grados positivos de timpanismo (escala 1= ligero a 5= tratamiento o muerte) en Estancia “La Angelita” durante el período octubre 2006/febrero 2007. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente (Kruskal-Wallis, $\alpha = 0,05$).

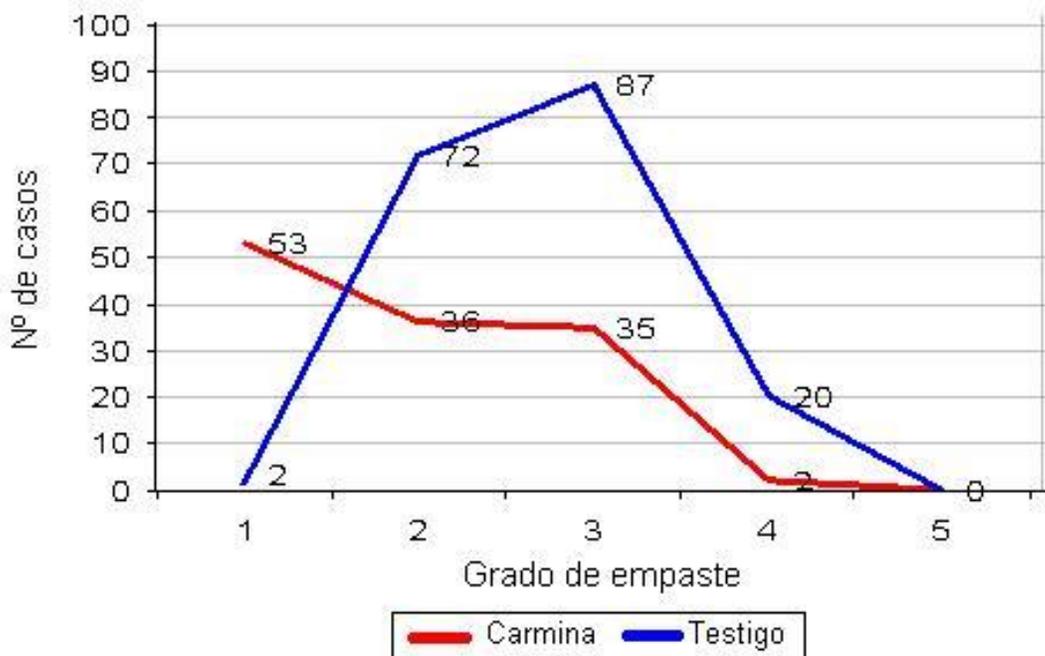


Figura 5: Frecuencia de grados de timpanismo (1= ligero a 5= tratamiento o muerte) en Estancia “La Angelita” durante la temporada 2007/2008.

Cuadro 3: Valores promedio (12 cortes) de calidad de ProINTA Carmina y de Bárbara SPI para tres estados fenológicos. EEA Manfredi 2002/04.

<u>Estado</u>	<u>Cultivar</u>	<u>Dig. (%)</u>	<u>FDN (%)</u>	<u>FDA (%)</u>	<u>PB (%)</u>
Vegetativo	Carmina	65,20 a	28,62 a	20,74 a	26,15 a
	Bárbara	66,31 a	28,27 a	19,68 a	26,78 a
Botón floral	Carmina	62,00 a	32,70 a	25,60 a	23,78 a
	Bárbara	62,60 a	30,72 b	22,79 b	25,73 b
10% Flor	Carmina	60,81 a	31,62 a	24,21 a	22,73 a
	Bárbara	61,17 a	31,62 a	23,96 a	23,56 a

Dentro de cada estado de madurez, los valores seguidos de la misma letra no difieren estadísticamente (LSD, $\alpha = 0,05$).

En base a todos los resultados anteriores se concuyó que ProINTA Carmina fue capaz de disminuir la incidencia de timpanismo entre 23% y 50% y que, en general, no se registraron diferencias de calidad forrajera con los testigos utilizados, salvo una mayor concentración de fibra en el estado de botón floral. Esto indica que ProINTA Carmina puede contribuir significativamente al control del problema, aunque es importante tener presente que no lo elimina. En consecuencia, se recomienda utilizarla en consonancia con otras medidas de prevención, como la vigilancia frecuente de la tropa de animales, la ausencia de

ayunos prolongados, el no pastoreo en estados muy inmaduros, y eventualmente el uso otras tecnologías específicas de control.

Tolerancia al aluminio (Al) y la acidez

En los ambientes tropicales suele ser importante el desarrollo de cultivares de alfalfa con tolerancia a condiciones de acidez y, particularmente, a altas concentraciones de Al. Se han propuesto diferentes métodos para evaluar la tolerancia al Al en muchas especies de importancia agronómica. Gran parte de ellos miden la inhibición del crecimiento radical, la acumulación de Al dentro de la raíz, o la producción de biomasa de plantas que crecen en una solución con cantidades variables de Al. En otros casos, se han sugerido métodos *in vitro* que evalúan el desarrollo de células en medios de cultivo que contienen Al. Para una revisión completa del tema se sugiere consultar el trabajo de Samac y Tesfaye (2003).

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 la 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).

Para el caso concreto de la alfalfa, Devine et al. (1976) propusieron utilizar macetas con **suelo ácido** y concentraciones tóxicas de Al para comparar el crecimiento de las plantas e 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 sólo aquellos lugares en donde la disponibilidad de tales suelos es abundante. Para obviar este problema, Villagrancia 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: 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**, con el objetivo de discriminar genotipos tolerantes al Al, también ha sido propuesto para varias especies y para alfalfa (Baligar et al.,

2002). 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 comprar 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 a 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 aún 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, sólo 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).

El empleo de métodos de **cultivo *in vitro*** ofrece un potencial interesante no sólo 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 (1990) 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/o con niveles tóxicos de Al, Dall'Agnol et al. (1996) compararon las siguientes técnicas de evaluación: a) selección en macetas tubulares con suelo ácido ($pH_{\text{agua}} = 4,7$; $Al_{KCl} = 0,29 \text{ cmol kg}^{-1}$; $Ca = 0,283 \text{ cmol kg}^{-1}$; $P = 7 \text{ kg ha}^{-1}$); b) selección en macetas tubulares con suelo ácido + una capa superficial de suelo encalado y fertilizado ($pH_{\text{agua}} = 6,5$; $Al_{KCl} = 0,0 \text{ cmol kg}^{-1}$; $Ca = 1,80 \text{ cmol kg}^{-1}$; $P = 72 \text{ kg ha}^{-1}$); 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

tandem entre suelo ácido (selectas en a) y alta relación de crecimiento de callos (selectas en c); y e) selección en tandem 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 sólo la obtenida sobre suelo ácido 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. 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 en relación al testigo tolerante (GA-AT). Asumiendo que la colección núcleo es una representación bastante aproximada de la variabilidad existente en la colección general, el trabajo concluyó que la detección de fuentes de tolerancia en la colección completa sería muy poco probable.

Sintetizando todo lo anterior, puede decirse que el desarrollo de variedades de alfalfa realmente tolerantes a la acidez/Al por medio del mejoramiento tradicional aparece como muy difícil en el futuro cercano. A las complicaciones metodológicas explicitadas más arriba, se suman la herencia autotetraploide del cultivo y las restricciones que impone la depresión por endocría, elementos que pueden enmascarar la expresión de la tolerancia. El empleo de técnicas biotecnológicas ofrece alguna esperanza para resolver el problema. Sledge et al. (2002), utilizando análisis de RFLP en poblaciones F_2 y retrocruzas, fueron capaces de identificar QTLs que se relacionan con la tolerancia al Al en alfalfa diploides; obviamente, esto facilitaría la selección y la obtención de variedades tolerantes. Por otro lado, el desarrollo de construcciones transgénicas que incrementen la expresión de genes inducidos por la presencia de Al y/o 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-dehidrogenasa en el ápice de la raíz, lo que incrementó siete veces la exudación de ácidos orgánicos (malatos, oxalatos, citratos, succinatos y acetatos) respecto del control no transgénico y disminuyó 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 sólo en la diversidad y en la actividad de la microflora rizosférica sino también en la disponibilidad de macro y micronutrientes para las plantas.

Tolerancia a la salinidad

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 con el desarrollo de los tallos secundarios y llega hasta la cosecha y los posteriores rebrotes. Según numerosos trabajos que investigaron la germinación de la alfalfa bajo condiciones de salinidad, tanto el porcentaje como la tasa de germinación 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 mM NaCl. A diferencia de la situación anterior, existen relativamente pocos estudios referidos a la respuesta de la alfalfa a la salinidad durante la emergencia y el establecimiento del cultivo. McKimmie y Dobrenz (1987) observaron que cerca del 75% de las plántulas emergidas sobrevivían durante dos 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), sólo 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).

McKimie 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 a menores concentraciones iónicas (Na^+ , Cl^-) en hojas (Rogers, 1998), a mayores potenciales hídricos y a crecimientos más vigorosos, lo que puede ser útil para diluir las acumulaciones iónicas (Kapulnik et al., 1989; 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 comparación con el suelo (Noble et al., 1984). Según Talibart et al. (1994) la adaptación al estrés osmótico parece estar regulada por al menos dos osmoprotectores.

En los últimos años, se han propuesto técnicas de *screening* que se basan en la estimación del funcionamiento normal de la planta a nivel celular, lo que permite una temprana detección de la tolerancia no sólo 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. Por otro lado, aparece como una manera efectiva para seleccionar por el resultado final de una larga serie de factores de la planta que interactúan para desarrollar tolerancia a la salinidad.

Usualmente, los programas de mejoramiento genético para desarrollar materiales tolerantes a la salinidad se han focalizado en las etapas de la germinación, emergencia y plántula (Al-Khatib et al., 1993; McKimmie y Dobrenz, 1987). Sin embargo, y de acuerdo con Johnson et al. (1991), actualmente se reconoce 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, parecerían ser más apropiados que la lixiviación de sales a través del suelo utilizando riego con soluciones salinas (Smith, 1994). Complementariamente, 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 en base al 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 materiales tolerantes, que han exhibido un grado variable de germinación y sobrevivencia en condiciones controladas (invernáculo). En ellos, pueden citarse los germoplasmas *AZ-90NDC-ST* (Jonson et al., 1991), *AZ-97MEC* y *AZ-97MEC-ST* (Al-Doss y Smith, 1998) y el cv *Salado* (Dowes, 2000). En Argentina, se han desarrollado los cultivares *Salinera INTA* (Ochoa, 1980) y *Trinidad 87* (Ochoa y Anzardi, 1996). Desde 2006 el INTA Santiago del Estero, con el apoyo de INTA Manfredi, ha puesto en marcha un programa de selección fenotípica recurrente para la obtención de poblaciones de alfalfa tolerantes a salinidad. Mediante evaluaciones en condiciones de campo, con suelos de salinidad moderada a alta, se busca identificar genotipos que sean capaces de sobrevivir y producir forraje en esas condiciones ambientales (Figura 8).

También existen posibilidades concretas de desarrollar nuevos materiales a través del uso de técnicas moleculares, tal como lo propuso tiempo atrás Winicov (1998). En Argentina, investigadores de la Universidad Nacional del Litoral han podido clonar del girasol el gen *Hahb-4* (de la familia HD-Zip), que incorporado al genoma de *Arabidopsis thaliana* ha sido capaz de conferir tolerancia a sequía y salinidad (Chan et al., 1998; Chan y González, 1994; Dezar et al., 2005a; Dezar et al., 2005b). En el caso concreto de la alfalfa, se han iniciado acciones exploratorias para evaluar la posibilidad de desarrollar variedades tolerantes mediante el uso de este transgen.

CONSIDERACIONES FINALES

Los conocimientos generados sobre la herencia autotetraploide de la alfalfa y los mecanismos que favorecen su alogamia, han sentado las bases para definir los métodos de mejoramiento más efectivos para la especie. En ese contexto, y utilizando la extensa variabilidad genética del complejo *Medicago sativa*, se ha desarrollado en el mundo una enorme cantidad de cultivares adaptados a los más diversos ambientes. El mejoramiento también ha sido efectivo para la obtención de resistencia múltiple a la mayoría de plagas y enfermedades de importancia económica. Más recientemente, la aplicación de técnicas moleculares abrió perspectivas interesantes para el mejoramiento de caracteres más difíciles de abordar por procedimientos convencionales, como la tolerancia a herbicidas, la resistencia a lepidópteros, la disminución de lignina, la tolerancia a estreses abióticos y la síntesis de taninos condensados. En Argentina, el INTA –a través de una activa vinculación con el sector

privado- ha lanzado al mercado cultivares de excelente producción y persistencia, y ha desarrollado un cultivar con menor potencial timpanizante.

BIBLIOGRAFÍA

- AALDERS, L. E. 1966. A recurrent selection program for perennial crop species designed to minimize inbreeding. *Can. J. of Gen. and Cytol.* 8: 293-295.
- ALARCÓN ZUÑIGA, B., P. SCOTT, K. MOORE, D. LUTH and E. C. BRUMMER. 2004. Quantitative trait locus mapping of winter hardiness metabolites in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa*), *In: A. Hopkins, Z. Y. Wang, M. Sledge and R. Barker (eds) Molecular Breeding of Forage and Turf.* Kluwer Academic Publishers, Australia. Developments in Plant Breeding, Volume 11: 97-104.
- AL-DOSS, A. and S. SMITH. 1998. Registration of AZ-97MEC and AZ-97MEC-ST very nondormant alfalfa germplasm pools with increased shoot weight and different response to saline irrigation. *Crop Sci.* 38: 568.
- AL-KHATIB, M., T. McNEILLY and J. C. COLLINS. 1993. The potential of selection and breeding for improved salt tolerance in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Euphytica* 65: 43-51.
- BALIGAR, V. C., J. H. ELGIN (Jr) and C. D. FOY. 2002. Variability in alfalfa for growth and mineral uptake and efficiency ratios under aluminium stress. *Agron. J.* 81: 223-229.
- BARCACCIA, G. 1994. Development, comparability and potential applications of RAPD markers in the genus *Medicago*. *J. Genet. & Breed.* 48: 161-168.
- BARNES, D. K., E. T. BINGHAM, J. D. AXTELL and W. H. DAVIS. 1972. The flower, sterility mechanism, and pollination control. *In: C. H. Hanson (ed) Alfalfa Science and Technology.* ASA, Agronomy 15. Madison, WI, USA, pp. 123-141.
- BASIGALUP, D. H., J. MARTÍNEZ FERRER, A. ODORIZZI, V. ADOLFO, E. USTARROZ, M. L. BERNÁLDEZ, N. LATIMORI, A. KLOSTER, P. DAVIES, D. MÉNDEZ y M. CORREA LUNA. 2007. ProINTA Carmina: Variedad de Alfalfa con Menor Potencial Timpanizante. *IDIA Año VII – N^o 9: 32-37.*
- BASIGALUP, D. H., C. V. CASTELL and C. D. GIAVENO. 2004. Response to selection for lower initial rate of dry matter disappearance in the development of a bloat-tolerant non-dormant alfalfa population. *Journal of Genetics and Breeding* 57 (1): 31-38.
- BASIGALUP, D. H., D. K. BARNES and R. E. STUCKER. 1995. Development of a core collection for perennial *Medicago* Plant Introductions. *Crop Sci.* 35 (4): 1163-1168.
- BINGHAM, E. T. 1983a. Maximizing hybrid vigor in autotetraploid alfalfa. *In: Better Crops for Food.* CIBA Foundation Symp. 97. Pitman Books, London, UK, pp. 130-143.
- BONAFEDE, M. D., R. D. RIOS, C. G. ROBREDO y D. BASIGALUP. 1999. Utilización de marcadores RAPDs en alfalfa (*Medicago sativa* L.). IV Simposio Nacional de Biotecnología Vegetal, REDBIO Argentina '99. Buenos Aires, Argentina, p. 60.

- BOUTON, J. H.. 1996. Screening the alfalfa core collection for acid soil tolerance. *Crop Sci.* 36: 198-200.
- BOUTON, J. H. and D. R. RADCLIFFE. 1989. Effects of acid soil selection on agronomically important traits in alfalfa. *In: Association Française pour la Production Fourragère (ed) Proc. 16th Intern. Grass. Congress. Nice, France, Oct. 4-11. French Grassland Society, Versailles, pp. 377-378.*
- BRADNER, N.T. and W.R. CHILDERS. 1968. Cytoplasmic male sterility in alfalfa. *Can. J. Pl. Sci.* 48: 111-112.
- BRUMMER, E. C. 1999. Capturing heterosis in forage crop cultivar development. *Crop Sci.* 39: 943-954.
- BRUMMER, E. C., J. H. BOUTON and G. KOCHERT. 1995. Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome* 38: 362-367.
- BRUMMER, E. C., J. H. BOUTON and G. KOCHERT. 1993. Development of a RFLP map in diploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 329-332.
- 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.
- BUSBICE, T. H. 1970. Predicting yields in synthetic varieties. *Crop Sci.* 10: 265-269.
- BUSBICE, T. H. 1969. Inbreeding in synthetic varieties. *Crop Sci.* 9: 601-604.
- BUSBICE, T. H., R. R. HILL (Jr) and H. L. CARNAHAN. 1972. Genetics and breeding procedures. *In: C. H. Hanson (ed) Alfalfa Science and Technology. ASA, Agronomy 15. Madison, WI, USA, pp. 283-318.*
- CHAN, R. L., G. M. GAGO, C. M. PALENA and D. H. GONZALEZ. 1998. Homeoboxes in Plant Development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1442: 1-19.
- CHAN, R. L. And D. H. GONZALEZ. 1994. A cDNA encoding an HD-Zip protein from sunflower. *Pl. Physiol.* 106: 1687-1688.
- CHILDERS, W. R. and H. A. McLENNAN. 1960. Inheritance studies of a completely male sterile character in *Medicago sativa* L. *Genet. Cytol.* 2: 57-65.
- CHILDERS, W. R. and D. K. BARNES. 1972. Evolution of hybrid alfalfa. *Agric. Sci. Rev.* 10: 11-18.
- DALL'AGNOL M., J. H. BOUTON and W. A. PARROTT. 1996. Screening methods to develop alfalfa germplasms tolerant to acid, aluminium toxic soils. *Crop Sci.* 36: 64-70.
- DAVIS, W. H. and J. M. GREENBLATT. 1967. Cytoplasmic male sterility in alfalfa. *J. of Heredity* 58: 301-305.

- DEGENHARDT, J., P. B. LARSEN, S. H. HOWELL and L. KOCHIAN. 1998. Aluminium resistance in the *Arabidopsis* mutant *alr-104* is caused by an aluminium increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol.* 117: 19-27.
- DEVINE, T. E., C. D. FOY, A. L. FLEMING, C. H. HANSON, T. A. CAMPBELL, J. E. McMURTREY and J. W. SCHWARTZ. 1976. Development of alfalfa strains with differential tolerance to aluminium toxicity. *Plant Soil* 44: 657-665.
- DEZAR, C. A., G. V. FEDRIGO and R. L. CHAN. 2005a. The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene *Hahb-4* directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA. *Plant Science* 169: 447-459.
- DEZAR, C. A., G. M. GAGO, G. M. GONZALEZ and R. L. CHAN. 2005b. *Hahb-4*, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Research* 14: 429-440.
- DIWAN, N., A. A. BHAGWAT, G. B. BAUCHAN and B. CREGAN. 1997. Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome* 40: 887-895.
- DOWNES, R. 2000. Lucerne, *Medicago sativa*, 'Salado'. *Plant Var. J.* 13 (1): 52-53.
- DUDLEY, J. W. R. R. HILL (Jr) and C. H. HANSON. 1963. Effects of seven cycles of recurrent phenotypic selection on means and genetic variances of several characters in two pools of alfalfa germplasm. *Crop Sci.* 3: 543-546.
- EBERHART, S. A., M. N. HARRISON and F. OGADA. 1967. A comprehensive breeding system. *Der Zuchter* 37: 169-174.
- ELGIN, J. H. (Jr.), R. E. WELTY and D. B. GILCHRIST. 1988. Breeding for Disease and nematode Resistance. In: A. A. Hanson, D. K. Barnes and R. R. Hill (Jr) (ed) *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, USA, pp. 827-858.
- ELGIN, J. H. (Jr), J. E. McMURTEY III, B. J. HATMAN, B. D. THYR, E. L. SORENSEN, D. K. BARNES, F. I. FROSHEISER, R. N. PEADEN, R. R. HILL (Jr) and 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.
- FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-Cenargen (2º ed.), Brasília, Brasil, 220p.
- FOY, C. D., R. R. DUNCAN, R. M. WASKON and D. T. MILLER. 1993. Tolerance of sorghum genotypes to an acid, aluminium toxic tatum subsoil. *J. Plant Nutr.* 161: 97-127.
- GIAVENO, C. D. and J. B. MIRANDA. 2000. Rapid screening for aluminium tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Genet. Mol. Biol.* 23: 847-850.

- GIECO, J. O., M. V. MORENO y D. H. BASIGALUP. 2007. Enfermedades de la alfalfa y abordaje molecular de la selección por resistencia. *In*: Basigalup, D. H. (ed) El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina. Ediciones INTA. Capítulo 19, pp. 449-476.
- GRUBER, M. Y., H. RAY and L. BLAHUT-BEATTY. 2001. Genetic manipulation of condensed tannin synthesis in forage crops. *In*: G. Spangenberg (ed) Molecular breeding of forage crops. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 189-201.
- HANSON, C. H., T. H. BUSBICE, R. R. HILL (Jr), O. J. HUNT and A. J. OAKES. 1972. Directed mass selection for developing multiple pest resistance and conserving germplasm of alfalfa. *J. Environ. Quality* 1: 106-111.
- HARRIS, D. L. 1964. Expected progress from index selection involving estimates of populations parameters. *Biometrics* 20: 46-72.
- HARRIS, D. L. 1963. The influence of errors of parameter estimation upon index selection. *In*: W. D. Hanson and H. F. Robinson (ed) Statistical Genetics and Plant Breeding. Nat. Acad. Sci., Washington (DC), USA. NRC Publ. 982, pp. 491-500.
- HARTEL, P. G. and 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. and J. L. LUSH. 1942. The efficiency of three methods of selection. *J. Heredity* 33: 393-399.
- HENDERSON, M. and 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). 1983. Heterosis in population crosses of alfalfa. *Crop Sci.* 23: 48-50.
- HILL, R.R. (Jr), C. H. HANSON and T. H. BUSBICE. 1969. Effect of four recurrent selection programs on two alfalfa populations. *Crop Sci.* 9: 129-133.
- HOFFMAN, G. J., E. V. MASS and S. L. RAWLINS. 1975. Salinity-ozone interactive effects on alfalfa yield and water relations. *Journal of Environmental Quality* 4: 326-331.
- HOWARTH, R.E. 1988. Antiquity factors and nonnutritive chemicals components. p 493-514. *In* A. A. Hanson, D. K. Barnes and R. R. Hill, Jr. (ed) Alfalfa and Alfalfa Improvement, Agronomy 29, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- HOWARTH, R. E., K.-J. CHENG, J. P. FAY, W. MAJAK, G. L. LEES, B. P. GOPLIN and J. W. COSTERTON. 1982a. Initial rate of digestion in legume pasture bloat. p. 719-722. *In* J. A. Smith and V. W. Hays (ed) Proc. 14th Int. Grassl. Congr., Westview Press, Boulder, CO.
- HOWARTH, R. E., B. P. GOPLIN, S. A. BRANDT and K.-J. CHENG. 1982b. Disruption of leaf tissues by rumen microorganisms: An approach to breeding bloat-safe forage legumes. *Crop Sci.* 22: 564-568.

- HOWARTH, R. E., B. P. GOPLEN and A. C. FESSER. 1978. A possible role for leaf cell rupture in legume pasture bloat. *Crop Sci.* 18: 129-133.
- JENSEN, S., M. R. BROADLEY, W. ROBBRECHT and E. SMETS. 2002. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *Bot. Rev.* 68: 235-269.
- JOHNSON, D. W., S. E. SMITH and A. K. DOBRENZ. 1991. Registration of AZ-90NDC-ST nondormant alfalfa germplasm with improved forage yield in saline environments. *Crop Sci.* 31: 1098-1099.
- KAMP-GLASS, M., D. POWELL, G. B. REDDY, V. C. BALIGAR and R. J. WRIGHT. 1993. Biotechniques for improving acid aluminium tolerance in alfalfa. *Plant Cell Rep.* 12: 590-592.
- KAPULNIK, Y., L. R. TEUBER and D. A. PHILLIPS. 1989. Lucerne (*Medicago sativa* L.) selected for vigor in a nonsaline environment maintained growth under salt stress. *Aust. J. Agric. Res.* 40: 1253-1259.
- KEHR, W. R., H. O. GAUMAN, C. C. LOWE and C. O. GARDNER. 1961. The performance of alfalfa synthetics in the first and advance generations. *Neb. Agr. Exp. Stn. Bull.* 200.
- KIDWELL, K. K., D. F. AUSTIN and T. C. OSBORN. 1994. RFLP evaluation of nine *Medicago* accessions representing the original germplasm sources of North America alfalfa cultivars. *Crop Sci.* 34: 230-236.
- KOGAN, M. and E. E. ORTMAN. 1978. Antixenosis – A new term proposed to replace Painter's "nonpreference" modality of resistance. *ESA Bull.* 24: 175-176.
- LI, X. F., J. F. MA, S. HIRADATE and H. MATSUMOTO. 2000. Mucilage strongly binds aluminium but does not prevent roots from aluminium injury in *Zea mays*. *Physiol. Plant* 108: 152-160.
- LÓPEZ-BUCIO, J., M. F. NIETO-JACOBO, V. RAMÍREZ-RODRÍGUEZ and 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.
- 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 and E. DELHAIZE. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6: 273-278.
- MARTÍN, A. 2002. Los marcadores genéticos en la Mejora Vegetal. *In:* F. Nuez, J. Carrillo y R. Lozano (eds) *Genómica y Mejora Vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa Libros, Madrid, España, pp. 39-63.

- McCASLIN, M., S. J. TEMPLE and J. E. TOFTE. 2002. Methods for maximizing expression of transgenic traits in autopolyploid plants. U. S. Patent Office Application Publication N° US-2002-0042928-A1.
- McKIMMIE, T. and A. K. DOBRENZ. 1991. Ionic concentrations and water relations of alfalfa seedlings differing in salt tolerance. *Agronomy Journal* 83 (2): 363-367.
- McKIMMIE, T. and A. K. DOBRENZ. 1987. A method for evaluation of salt tolerance during germination, emergence and seedling establishment. *Agron. J.* 79: 943-945.
- McLENNAN, H.A. and W.R. CHILDERS. 1964. Transfer of genetic male sterility from tetraploid to diploid alfalfa, and inheritance at the diploid level. *Can. Soc. Agron. 10th Ann. Meeting Abstr. Proc.*, p. 79.
- McMAHON, L. R., T. A. Mc ALLISTER, B. P. BERG, W. MAJAK, S. N. ACHARYA, J. D. POPP, B. E. COULMAN, Y. WANG and 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.
- MILLER, D. R., R. M. WASKOM, R. R. DUNCAN, P. L. CHAPMAN, M. A. BRICK, G. E. HANNING, D. A. TIMM and M. W. NABORS. 1992. Acid soil stress tolerance in tissue culture-derived sorghum lines. *Crop Sci.* 32: 324-327.
- MURPHY, R. P. and C. C. LOWE. 1966. Registration of Saranc alfalfa. *Crop Sci.* 6: 611.
- 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 and D. W. WEST. 1984. Identification and selection for salt tolerance in Lucerne (*Medicago sativa* L.). *Austr. J. Agric. Res.* 35: 239-252.
- NORTH AMERICAN ALFALFA IMPROVEMENT CONFERENCE (NAAIC). Standard Test to Characterize Pest Resistance. Sitio web: www.naaic.org .
- OCHOA, L. H. y G. A. ANZARDI. 1996. Trinidad 87. Legajo de inscripción. Ministerio de Economía-SAGyPA-INASE. Registro Nacional de Cultivares. Bs. As., Arg.
- OCHOA, L. H. 1980. Obtención de variedades mejoradas de alfalfa. Informe anual del Plan de Trabajo 41:1345. EEA La Banda-INTA.
- PAINTER, R. H. 1951. Insect resistance in crop plants. Macmillan Publishing Co., New York.
- PARROT, W. A. and J. H. BOUTON. 1990. Aluminium tolerance in alfalfa as expressed in tissue culture. *Crop Sci.* 30: 387-389.
- PEADEN, R. N., O. J. HUNT, L. R. FAULKNER, D. G. GRIFFIN, H. J. JENSEN and E. H. STANFORD. 1976. Registration of multiple-pest resistant alfalfa germplasm. *Crop Sci.* 16: 125.

- QUIROS, C. F. and G. R. BAUCHAN. 1988. The Genus *Medicago* and the origin of *Medicago sativa* Complex. *In*: A. A. Hanson, D. K. Barnes and R. R. Hill (Jr) (ed) *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, USA, pp. 93-124.
- RIDAY, H. and E. C. BRUMMER. 2004. Dissection of heterosis in alfalfa hybrids. *In*: A. Hopkins, Z. Y. Wang, M. Sledge and R. Barker (eds) *Molecular Breeding of Forage and Turf*. Kluwer Academic Publishers, Australia. *Developments in Plant Breeding*, Volume 11: 315-324.
- RÍOS, R., F. ARDILA, E. PAGANO, M. C. GÓMEZ y P. FRANZONE. 2007. Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de alfalfa. *In*: Basigalup, D. H. (ed) *El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina*. Ediciones INTA. Capítulo 6, pp. 109-129.
- RODRÍGUEZ, J. A. 1986. Mejoramiento genético de la alfalfa. *In*: C. Bariggi, V. L. Marble, C. D. Itria y J. M. Brun (ed) *Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa*. INTA, Colección Científica, Bs. As., pp. 251-323.
- RODRÍGUEZ, J. A. 1983. Conceptos para el mejoramiento de especies forrajeras. INTA, EEA Anguil. Publ. Misc. 8, 19 p.
- ROGERS, M. E. 1998. Salinity effects on irrigated lucerne. *In*: D. L. Michalk and J. E. Pratley (ed) *Proc. of the 9th Austr. Agronomy Conference*, Waga Wagga, Australia, pp. 266-268.
- RUMBAUGH, M. D., J. L. CADDEL and D. E. ROWE. 1988. Breeding and Quantitative Genetics. *In*: A. A. Hanson, D. K. Barnes and R. R. Hill (Jr) (ed) *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, USA, pp. 777-808.
- SAMAC, D. A. and S. J. TEMPLE. 2004. Development and utilization of transformation in *Medicago* species. *In*: G. H. Ling and D. Z. Skinner (ed) *Genetically Modified Crops – Their development, uses and risks*. Food Products Press, USA, pp. 165-202.
- SAMAC, D. A. and M. TESFAYE. 2003. Plant Improvement for tolerance to aluminium in acid soils – a review. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 75: 189-207.
- SHABALA, S. N., S. I. SHABALA, A. I. MARTYNENKO, O. BABOURINA and 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.
- SLEDGE, M. K., J. H. BOUTON, M. DALL'AGNOLL, W. A. PARROT and G. KOCHER. 2002. Identification and confirmation of aluminium tolerance QTL in diploid *Medicago sativa* subsp. *coerulea* *Crop Sci.* 42: 1121-1128.
- SMITH, S. E. 1994. Salinity and the production of alfalfa. *In*: M. Pessakari (ed) *Handbook of Plant and Crop Stress*. Marcel Dekker, Tucson, AZ, USA, pp. 431-449.
- SORENSEN, E. L., R. A. BYERS and E. K. HORBER. 1988. Breeding for Insect Resistance. *In*: A. A. Hanson, D. K. Barnes and R. R. Hill (Jr) (ed) *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, USA, pp. 859-902..

- SPADA, M. del C. (ed). 2006. Avances en Alfalfa. Ensayos Territoriales. INTA. Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa. EEA Manfredi, Año 16 - Nº 16, 70 p.
- SPADA, M. del C. (ed). 2008. Avances en Alfalfa. Ensayos Territoriales. INTA. Red de Evaluación de Cultivares de Alfalfa. EEA Manfredi, Año 18 - Nº 18, 89 p.
- STANFORD. E. H. and E. R. HOUSTON. 1954. The backcross technique as a method of breeding alfalfa. *In*: Report of 14th Alfalfa Improvement Conference. Davis, CA, August 3-7, pp. 44-45.
- STUTEVILLE, D. L., 1973. Pathogenic specialization in *Peronospora trifoliorum*. Abstract 0715 Second Int. Congress of Plant Pathology. Sept. 5-12, Univ. of Minnesota, St. Paul, MN, USA.
- SUN, P., M. VELDE and D. B. GARDNER. 2001. Alfalfa hybrids having at least 75% hybridity. US Patent 6774280 (<http://www.patentstorm.us/patents/6774280-description.html>)
- TALIBART, T., M. JEBBAR, G. GOUESBET, S. HIMDIKABBAB, H. WROBLEWSKI, C. BLANCO and 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 and M. McCASLIN. 2002. Maximizing expression of transgenic traits in autopolyploid plants. *In*: C. Sheaffer and G. R. Bauchan (ed) Report 38th North American Alfalfa Improvement Conference. Sacramento, CA, USA, July 27-30, p. 42.
- TESFAYE, M., N. S. DUFAULT, M. R. DORNBUSCH, D. L. ALLAN, C. P. VANCE and 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.
- TESFAYE, M., S. J. TEMPLE, D. L. ALLAN. C. P. VANCE and D. A. SAMAC. 2001. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminium. *Plant Physiol.* 127: 1836-1844.
- TWAMLEY, B. E. 1974. Recurrent selection in forages. *Plant Breeding Abst.* 44: 613-616.
- TYSDAL, H. M., T. A. KIESSELBACH and H. L. WESTOVER. 1942. Alfalfa breeding. Univ. of Nebraska, Agr. Exp. Stn. Res. Bull. 124, 46 p.
- VAN DEYNZE, A., D. PUTNAM, S. ORLOFF, T. LANINI, M. CANEVARI, R. VARGAS, K. HEMBREE, S. MUELLER and L. TEUBER. 2004. Roundup ready alfalfa: An emerging technology. Univ. of California of Agriculture and Natural Resources Publication 8153. ANR Communication Services Web Site (<http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8153.pdf>).

- VASQUEZ, M. D., C. POSCHENRIEDER, I. CORRALES and J. BARCELO. 1999. Change in apoplastic aluminium during the initial growth response to aluminium during the initial growth response to aluminium by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiol.* 119: 435-444.
- VIANDS, D. R., P. SUN and D. K. BARNES. 1988. Pollination control: mechanical and sterility. *In: A. A. Hanson, D. K. Barnes and R. R. Hill (Jr) (ed) Alfalfa and Alfalfa Improvement. ASA-CSSA-SSSA Agronomy Series 29. Madison, WI, USA, pp. 931-960.*
- VILLAGRACIA, M. R., T. E. CARTER, T. W. RUFTY, A. S. NIEWOEHNER, M. W. JENNETTE and 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. and J. A. MOSJIDIS. 2002. Acid-soil resistance of forage legumes as assessed by a soil-on-agar method. *Crop Sci.* 42: 1631-1639.
- VOIGT, P. W. and H. W. GODWIN. 1997. A soil-on-agar method to evaluate acid-soil resistance in white clover. *Crop Sci.* 37: 1493-1496.
- WELTY, R.E. and J. P. MUELLER. 1979. Occurrence of a highly virulent isolate of *Colletotrichum trifolii* on alfalfa in North Carolina. *Phytopathology* 69: 537.
- WINICOV, I. 1998. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. *Annals of Botany* 82: 703-710.