

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**MEJORAMIENTO DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) Y AVANCES
OBTENIDOS**

POR

IHELENA BEATRIZ PAVEZ MEDINA

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE
2024**

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**MEJORAMIENTO DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) Y AVANCES
OBTENIDOS**

POR

IHELENA BEATRIZ PAVEZ MEDINA

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

CHILLÁN – CHILE
2024

Aprobada por:

Profesor Asociado. Marcelo Doussolin G.
Ing. Agrónomo, M. Sc. Dr.

Guía

Profesor Asociado. Pamela Williams S.
Ing. Agrónomo, Dr.

Asesor

Profesor Asistente. Miguel Garriga C.
Lic. Biología. M. Sc. Dr.

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.
Ing. Agrónomo. M. Sc.

Decano

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Summary.....	1
Introducción	2
Desarrollo y Discusión	4
Conclusiones	20
Referencias	20

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Categorías según los distintos grados de latencia descritas por Certified Alfalfa Seed Council	6
Tabla 2 Genes expresados, clonados y expresados en alfalfa y los efectos que causa	16

MEJORAMIENTO DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA L.*) Y AVANCES OBTENIDOS

IMPROVEMENT OF ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA L.*) AND OBTAINED PROGRESS

Palabras índice adicionales: alfalfa transgénica, mejoramiento convencional.

RESUMEN

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una especie perenne de las más importantes a nivel mundial como recurso forrajero en la producción ganadera por su alto nivel de producción de biomasa y valor nutritivo. El criterio de manejo de alfalfa es el principal factor que condiciona el rendimiento y la persistencia del cultivo, pero existen formas de mejorar estas características utilizando mejoramiento genético por medio de técnicas tradicionales, que hacen uso de la variabilidad genética natural presente en la planta, y técnicas de ingeniería genética adaptadas a las limitaciones que tiene alfalfa, debidas a su autotetraploidía e incompatibilidad sexual entre plantas por su autoesterilidad, permitiendo así la manipulación tanto de genes nativos como de otras especies y su introducción en alfalfa, siendo estrategias fundamentales para mejorar caracteres de importancia como el grado de reposo invernal, producción de forraje, persistencia y mejorar la resistencia a estrés abiótico y biótico. La preocupación permanente en la búsqueda de una alfalfa ideal con mejoramiento genético puede ser prometedora y desafiante. Por ello, la presente monografía se dedicó a recopilar información en avances obtenidos de mejoramiento genético de alfalfa y el éxito de diferentes metodologías para producir plantas que tengan mayor productividad, calidad nutricional y persistencia.

SUMMARY

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is a perennial species that is one of the most important worldwide as a forage resource in livestock production due to its high biomass production and nutritional value. The alfalfa management criteria are the main factor that determines the yield and persistence of the crop, but there are ways to improve

these characteristics using genetic improvement through traditional techniques, which make use of the natural genetic variability present in the plant, and techniques through genetic engineering adapted to the limitations that alfalfa has, due to its autotetraploidy and sexual incompatibility between plants due to its self-sterility, thus allowing the manipulation of both native genes and other species and their introduction into alfalfa, being fundamental strategies to improve characteristics of importance such as degree of winter rest, forage production, persistence, and improving resistance to abiotic and biotic stress. The permanent concern in the search for an ideal alfalfa with genetic improvement can be promising and challenging. Therefore, this monograph was dedicated to collecting information on advances in the genetic improvement of alfalfa and the success of different methodologies to produce plants that have greater productivity, nutritional quality, and persistence.

INTRODUCCIÓN

Alfalfa (*Medicago sativa* L.), conocida también como la reina de las forrajeras, es una especie forrajera de mucha importancia para la alimentación animal, debido a su aporte nutritivo, es una fuente importante de proteína, minerales y vitaminas y contiene fibra necesaria para mantener el normal funcionamiento del rumen, además de ser muy apetecible para el ganado (Odorizzi, 2015). Se trata de una leguminosa perenne, dicotiledónea, de alto potencial productivo que se puede adaptar a diferentes condiciones ambientales y tiene una buena persistencia si se maneja adecuadamente desde su establecimiento (Basigalup, 2022). Morfológicamente es una planta herbácea de sistema radicular profundo, lo que le permite tolerar la sequía. En estado vegetativo se forma una estructura denominada corona la cual es importante en la época de invierno, ya que almacena reservas necesarias para el rebrote que da origen a nuevos tallos (Lorenzo, 2017).

Alfalfa es una especie de día largo que requiere fotoperiodos de entre 12 a 16 horas de luz para que se induzca el proceso de floración, por lo que su crecimiento se ve favorecido en épocas de primavera y verano en donde se presentan condiciones de luz y temperaturas óptimas, entre 15 °C a 25 °C, que benefician el

crecimiento y rendimiento. Durante el invierno, cultivares con reposo invernal detienen su crecimiento quedando en estado de latencia, característica genética de alfalfa que le permite aclimatarse durante las bajas temperaturas y disminución del fotoperiodo durante otoño-invierno disminuyendo su crecimiento. Estas condiciones climáticas desencadenan en acumulación de reservas que luego en primavera facilitan el rebrote de la planta, mientras que los cultivares sin reposo invernal continúan su crecimiento en invierno (Espinoza *et al.*, 2017). El ciclo de acumulación de reservas es fundamental para el desarrollo de la planta, ya que el rebrote es iniciado por las reservas de carbohidratos acumulados durante el periodo anterior, por lo que las reservas condicionan las prácticas de manejo del cultivo (Soto, 2000). Además de la latencia, otras características agronómicas importantes que se deben tener en cuenta para escoger una variedad es el rendimiento potencial, calidad, capacidad de persistencia, tolerancia o resistencia al frío o sequía, enfermedades y la capacidad de rebrote, considerando el objetivo de producción de alfalfa para alcanzar un equilibrio entre rendimiento de materia seca y valor nutritivo de alfalfa (Cadena *et al.*, 2011).

Para garantizar un buen cultivo y producción de la alfalfa, se requiere conocer y manejar los factores involucrados en su crecimiento. Por ser un cultivo perenne de alto requerimiento hídrico que genera una demanda evapotranspiratoria mayor que un cultivo anual, su producción se lleva a cabo bajo condiciones de riego, presentando una fuerte presión en los recursos hídricos que son cada vez más escasos (Espinoza *et al.*, 2017). Es por lo que la disponibilidad de agua es la principal limitante para su producción, ya que afecta el crecimiento de los nuevos tallos de la corona produciendo menos cantidad de forraje (Cadena *et al.*, 2011). Alfalfa también es muy sensible a la salinidad, la salinidad tanto en el suelo como en el agua es otro factor abiótico que alfalfa tolera moderadamente y que limita el crecimiento y productividad de las plantas (Basigalup, 2022). La presencia de malezas, plagas y enfermedades también son factores que afectan el rendimiento, calidad y persistencia del cultivo. Según el tipo de crecimiento de las malezas pueden llegar a disminuir la cantidad de la población de alfalfa en una pradera, si predominan especies arrosetadas pueden impedir el crecimiento de plántulas, y

malezas con crecimiento erecto afectan el crecimiento de alfalfa establecida, ya que compiten por factores como luz, agua y nutrientes (Rebuffo *et al.*, 2000). Este cultivo es considerado un excelente huésped para plagas, debido a que facilita la alimentación a organismos parásitos por las altas cantidades de carbohidratos y proteínas que produce, además, presenta un desarrollo foliar que sirve de microclima para la propagación de enfermedades (Soto, 2000). En la actualidad los fitomejoradores tratan de resolver estas problemáticas por medio de mejoramiento genético, con métodos tradicionales y manipulación biotecnológica, que se utilizan como estrategia para generar mayor adaptación a ambientes que le impidan un normal desarrollo, aumentar la producción y calidad del forraje y aumentar persistencia y resistencia a plagas y enfermedades. Los métodos tradicionales de mejoramiento emplean la variabilidad genética propia de alfalfa mediante cruzamientos, retrocruzamientos, evaluación de recursos genéticos, selección basada sobre el fenotipo con pruebas de progenie, selección asistida por marcadores moleculares y mutagénesis (Basigalup, 2022). Algunas herramientas biotecnológicas de mejoramiento que utilizan ingeniería genética son hibridación somática, variación somaclonal, regulación de expresión génica y transgénesis, siendo esta última la técnica más útil para mitigar los inconvenientes de alfalfa (Beltrán, 2011).

DESARROLLO Y DISCUSIÓN

Descripción general y características de alfalfa

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) pertenece a la familia de las Fabaceae y es uno de los cultivos de leguminosas forrajeras más importantes para la producción de heno y ensilaje a nivel mundial. Es una leguminosa autotetraploide, perenne con un ciclo de vida que va desde 4 a 7 años según la variedad, factores climáticos y utilización (Soriano, 2003). Para lograr altos rendimientos de materia seca y persistencia requiere suelos con más de un metro de profundidad, pH neutro o ligeramente alcalino, entre 6,5 a 7,5, y puede ser cultivada en suelos livianos o pesados con buen drenaje y escurrimiento superficial que aseguren aireación en el sistema radicular (Damboriarena y Stinger, 2008). Se utiliza una dosis de siembra de 20 - 25

kg ha⁻¹ manteniendo una distancia de siembra de entre 15 a 20 cm para sostener un mayor número de plantas por unidad de superficie, disminuyendo así la competencia interespecífica (Basigalup, 2022). Una cualidad que tiene el cultivo es su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico mediante la relación simbiótica con la bacteria *Sinorhizobium meliloti*, satisfaciendo entre 43 – 64 % sus requerimientos totales de nitrógeno (Gallace, 2020). Es una especie de polinización cruzada (alógama) del tipo entomófila, que requiere himenópteros para ser polinizada y se propaga por semillas con un alto nivel de heterocigosidad, en donde los embriones producto de la auto fecundación, sobreviven con menos frecuencia que los producidos por fecundación cruzada, lo que aumenta la complejidad del mejoramiento genético convencional (Chen *et al.*, 2020).

Morfológicamente es una planta herbácea con hábito de crecimiento erecto, semi-erecto o semirrastrero, dependiendo del grado de reposo invernal (Soto, 2000). Posee un sistema radicular complejo que puede alcanzar de dos a cinco metros de profundidad en tan sólo 4 años y puede llegar a crecer hasta nueve metros al final de su ciclo de vida (Damboriarena y Stinger, 2008), característica que en plantas adultas y en periodos de estrés hídrico permite absorber agua de las capas más profundas del suelo (Lorenzo, 2017). Consta de una raíz principal, robusta y pivotante con numerosas raíces secundarias. Posee numerosos tallos herbáceos muy ramificados pudiendo llegar hasta 20 según la edad y el vigor de la planta los cuales brotan en el cuello de la raíz, donde se forma un rebrote basal que recibe el nombre de corona (Soriano, 2003). La corona es un órgano complejo y junto con la raíz, son estructuras muy importantes durante el invierno, ya que almacena reservas energéticas que le permiten sobrevivir en el invierno y el rebrote después de cada defoliación (Lorenzo, 2017).

La variedad de alfalfa y su grado de latencia determinan el momento de cosecha y la cantidad de veces que el cultivo puede ser cosechado. Según el clima y las temperaturas de una zona, el momento de inicio y fin del periodo de latencia es distinto según el cultivar que se utilice, puesto que presentan distintos límites térmicos según la variedad de alfalfa clasificándose de acuerdo con su grado de reposo invernal. Los cultivares se clasifican en base a una escala numérica de 1 a

11 según su grado latencia, ordenadas de mayor a menor, donde grado 1 indica un reposo invernal extremadamente largo y grado 11 ausencia de reposo invernal (Lorenzo, 2017) (Tabla 1).

Tabla 1. Categorías según los distintos grados de latencia descritas por Certified Alfalfa Seed Council.

Grado de latencia	Categorías
1 - 2	Muy latente
3 - 4	Latente
5	Moderadamente latente
6 - 7	Semi - latente
8 - 9	No latente
10 - 11	Muy no-latente

Fuente: National Alfalfa & Forage Alliance (NAFA), 2023.

En zonas donde el clima es favorable a lo largo del año se utilizan variedades no latentes (8 - 9), las cuales continúan creciendo en invierno sin entrar en latencia. Las bajas temperaturas no son capaces de dañar al cultivo, siendo más preferidas por los agricultores dado que se puede tener forraje disponible en épocas donde este es más escaso, pero son menos persistentes y susceptibles a diversas enfermedades foliares. En zonas más frías en invierno se utilizan variedades de latencia intermedia (4 a 8), las que entran en reposo invernal a la llegada del invierno pero que con la llegada de la primavera pueden brotar rápidamente. Estas variedades persisten por más años y se comportan mejor frente a plagas y enfermedades siendo usadas principalmente para la conservación de forraje por los altos rendimientos que se producen en primavera y verano. En zonas donde el clima restringe la producción de forraje por largos periodos de tiempo se deben usar variedades latentes (bajo 4) que presentan mayor tolerancia a heladas y tienen un bajo o nulo crecimiento durante épocas de frío, y son variedades más persistentes dado a que se les da menos cortes dentro del año (Rebuffo *et al.*, 2000; Becerra, 2003). Durante el reposo invernal alfalfa puede tolerar temperaturas bajo cero que

pueden llegar hasta los $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y también es capaz de sobrevivir a temperaturas sobre los $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ en verano bajo condiciones de humedad suficiente (Manabayeva y Tussipkan, 2022).

Objetivos en mejoramiento de alfalfa

Resistencia al estrés hídrica. La sequía es el principal factor que afecta los procesos fisiológicos, morfológicos y metabólicos de alfalfa. Como cultivo perenne, requiere agua durante todo el año incluso mientras se encuentra en reposo invernal, solo van variando las necesidades hídricas a lo largo del ciclo de producción, las cuales van incrementando a medida que aumentan las temperaturas y la superficie foliar (Chocarro *et al.*, 2020). Por sus raíces pivotantes, que le permiten penetrar con profundidad en búsqueda de humedad en el perfil de suelo, se considera un cultivo tolerante a la sequía, pero un suelo con déficit hídrico afecta la absorción de agua por parte de las raíces y el crecimiento de los brotes de la corona. Li *et al.* (2020), demostraron que la alfalfa no es tolerante a la sequía en la etapa inicial de crecimiento (2 a 5 meses) debido a que una humedad inadecuada puede provocar la disminución del crecimiento aéreo de la planta, presentando hojas más pequeñas o senescentes. Además, se produce una disminución en la longitud de la raíz principal y un aumento en el desarrollo de las raíces laterales, siendo mayor la biomasa del sistema radical con relación a las hojas y, en casos extremos, puede causar la muerte de la planta. El estrés hídrico puede reducir la cantidad de materia seca de tallos y hojas en aproximadamente un 40 %, repercutiendo negativamente en el crecimiento y desarrollo de la planta. A su vez, bajo condiciones de estrés hídrico aumentan los niveles de etileno generando clorosis, senescencia de hojas y nódulos, lo que afecta la fijación de nitrógeno con *S. meliloti* por desprendimiento de nódulos (Cedeño, 2018). La planta responde a este estrés induciendo mecanismos fisiológicos de aclimatación, como cierre de estomas y reducción del intercambio gaseoso, lo que trae como consecuencia una menor fotosíntesis y disminución en la producción de biomasa y su calidad (Gallace, 2020).

Resistencia a la salinidad. El estrés salino tanto en plantas jóvenes como en adultas produce deshidratación celular y estrés osmótico, similar a lo que ocurre con el déficit hídrico, dificultando la absorción de agua por las raíces, y puede generar

toxicidad por el aumento de iones de sodio en la planta, lo que altera las vías esenciales del metabolismo celular, la síntesis de proteínas, la actividad enzimática y regulación de hormonas vegetales (Bai *et al.*, 2013). Bajas concentraciones de sal en el suelo (< 100 mM de NaCl) afecta la producción y calidad de la biomasa aérea, es decir, menos tallos y más cortos. Por otro lado, concentraciones más altas de sal en el suelo (≥ 150 mM de NaCl) pueden reducir el crecimiento de la planta acompañado de una decoloración en los folíolos más jóvenes y se reduce el potencial osmótico, limitando la absorción de agua por la planta, lo que inhibe el crecimiento. La salinidad en el agua que la alfalfa tolera se encuentra en el rango de 2 a 12 dS m^{-1} de conductividad eléctrica. La producción de forraje disminuye 7,3 % por cada dS m^{-1} de incremento por encima de los 2 dS m^{-1} (Gallace, 2020).

Los síntomas causados por la salinidad son, en primera instancia, el cierre estomático en la parte aérea de la planta, lo que disminuye la transpiración y previene el aumento de la concentración intracelular de los iones de sodio que son transportados desde la raíz. Como consecuencia del cierre estomático se ve disminuida la tasa fotosintética causando un desequilibrio en el estado nutricional de la planta, reduciendo rendimiento y calidad (Abdalla *et al.*, 2020). La planta puede responder a este estrés con un mecanismo de aclimatación que puede resultar en una disminución en las reservas energéticas que requieren para el crecimiento, es decir, la planta regula su potencial osmótico sacrificando su crecimiento y, además, reduce la fijación de nitrógeno con *S. meliloti* atribuida a la reducción de la respiración del nódulo afectando su desarrollo (Gallace, 2020). Si bien es necesario disponer de cultivares tolerantes, no hay que dejar de lado el comportamiento de las plantas en suelos salinos, ya que también está condicionado por las características del suelo como la textura, estructura, pH, propiedades de infiltración, lixiviación y el volumen de agua aplicado para una producción favorable en suelos salinos (Basigalup, 2022).

Resistencia a competencia interespecífica. La presencia de malezas es un factor condicionante que reduce la calidad y el valor nutricional del forraje, ocasionando pérdidas de hasta un 20 % en la producción de alfalfa, al competir por recursos como agua, luz, nutrientes y espacio y que, finalmente, si las malezas no son

agradables, el animal puede rechazar el forraje por presencia de espinas o compuestos tóxicos que resultan una amenaza para su salud por la acumulación de nitrato o alcaloides altamente tóxicos (Bao *et al.*, 2018). Una medida de prevención es la correcta elección de fecha de siembra de alfalfa. Tallone (2017) demuestra que siembras en otoño, donde hay pocas horas de luz al día, la planta favorece el crecimiento radicular y enfrenta de mejor manera la competencia con malezas. La alfalfa es susceptible en la etapa de establecimiento, desde la germinación hasta el comienzo del primer corte, en la cual, si las malezas no son controladas a tiempo, se perjudica la cosecha por la invasión de malezas anuales que pueden representar más del 60 % del forraje cosechado y que luego van disminuyendo su población en el cultivo (Basigalup, 2022). Las malezas que invaden al cultivo antes del primer rebrote en época de primavera debilitan la planta y detienen su crecimiento. De igual modo, en verano las altas temperaturas y, en ocasiones, exceso de humedad favorecen el crecimiento y la irrupción de malezas en la pradera (Soriano, 2003). La poca variedad de herbicidas selectivos, junto con la ausencia de variedades tolerantes y mal manejo de las praderas, aumenta la aparición de malezas resistentes, lo que resalta la necesidad de contar con nuevas alternativas de manejo y control de las malezas en el cultivo (Basigalup, 2022).

Resistencia a plagas y enfermedades. Las plagas y enfermedades provocan pérdidas económicas debido a que reducen significativamente el rendimiento, persistencia y calidad del forraje. Las pérdidas en la producción de semilla pueden ser de un 10 % y en la producción de forraje hasta un 25 %. Según el comportamiento del cultivo frente al ataque de plagas y enfermedades se pueden catalogar como resistentes, tolerantes y susceptibles (Basigalup, 2022). La planta de alfalfa forma un microclima favorable para una amplia variedad de insectos, los cuales pueden ser benéficos o perjudiciales, considerados plagas, siendo los insectos defoliadores y los áfidos las plagas que más daño causan al cultivo. Al alimentarse de la planta por medio de su aparato bucal picador, inyectan saliva tóxica a la planta lo que detiene su crecimiento, acorta sus entrenudos y las hojas se vuelven amarillas; en ocasiones, cuando el ataque es intenso, pueden provocar la muerte de la planta, lo cual puede solucionarse defoliando rápidamente a través de

pastoreo o mediante la siega. Los coleópteros también causan pérdidas en el cultivo, sobre todo en estadio larval, ya que, al alimentarse de las raíces en etapas de crecimiento de alfalfa, pueden dañar la raíz principal causando la muerte de la planta (Basigalup *et al.*, 2011). Los insectos igualmente se comportan como vectores de virus o crean puntos de entrada para hongos y bacterias causando enfermedades infecciosas, siendo las de mayor relevancia las del tipo fungosas, cuya ocurrencia y severidad están dadas principalmente por la temperatura del ambiente, siendo el verano la época de mayor incidencia. Pueden causar pudrición de semillas, manchas foliares, tallos de color negro, pudrición de raíces y corona, defoliación, disminución de vigor, disminución en el valor nutricional, disminución en la fijación de nitrógeno. El hongo patógeno *Uromyze striatus*, conocido como roya de la hoja, impide el crecimiento y desarrollo de alfalfa y se puede evidenciar en el tallo y en la hoja por la presencia de esporas color café con pústulas en forma de círculo. Posterior al invierno, condiciones de humedad y luz favorecen la propagación de este hongo, provocando coloración amarilla, marchitamiento y defoliación prematura en las plantas reduciendo su rendimiento y calidad de forraje y en casos extremos puede causar la muerte de las plantas (Adhikari y Missaoui, 2019). Las plantas pueden generar mecanismos de defensa a través de la producción de proteínas que limitan la infección de hongos patógenos, pero no dejan de ser susceptibles al ataque de enfermedades que incluso pueden ocasionar su muerte (Odorizzi, 2015).

Mejoramiento de alfalfa: avances obtenidos por métodos tradicionales y uso de ingeniería genética

Si bien alfalfa tiene la capacidad de adaptarse a condiciones de estrés biótico y abiótico, lo puede hacer hasta cierto límite, por lo cual se utilizan métodos de mejoramiento tanto tradicionales como mediante ingeniería genética para mejorar su desempeño en estas condiciones. Los métodos tradicionales tienen limitaciones debido a la condición autotetraploide de alfalfa, por lo que los fitomejoradores han tenido que acudir al uso de la ingeniería genética, que desde la década de 1980 se ha convertido en una de las herramientas más poderosas para acelerar ganancia genética en rasgos objetivos y satisfacer las demandas de producción de forraje

disminuyendo las pérdidas causadas por factores de estrés (Bao *et al.*, 2018). A pesar de que se ha utilizado la ingeniería genética para mejorar el rendimiento y la calidad de la alfalfa, la ganancia genética ha sido relativamente baja en comparación con otros cultivos por su baja heredabilidad dada por caracteres cuantitativos influenciados por el medio ambiente, la arquitectura genética compleja y la alta interacción entre el genotipo y el medio ambiente (Han *et al.*, 2018).

Métodos tradicionales. Debido a la condición de alfalfa de planta autotetraploide y por su sistema de autoincompatibilidad causada por la interacción entre el tubo polínico y el óvulo que previene la auto-fertilización, es difícil la selección de genotipos por medio de mecanismos hereditarios. Arolfo *et al.* (2011) mencionan que es compleja la herencia de caracteres en alfalfa por su comportamiento genético distinto al de los diploides y que su mejoramiento se basa en métodos de selección fenotípica recurrente (SFR), que es la interpolinización de individuos seleccionados para desarrollo de variedades sintéticas. Una singularidad de alfalfa es la dificultad de obtener líneas puras debido a la depresión por endocría. Producida por las sucesivas autofecundaciones del progenitor, y en ocasiones por el cruzamiento entre individuos autofecundados y relacionados entre sí, resultan plantas con pérdida de vigor y reducción del rendimiento. Con el fin de aumentar rendimiento, persistencia y resistencia a estrés en alfalfa, se utilizan métodos de mejoramiento que combinan técnicas de SFR por medio del manejo de genotipos. Para obtener plantas con características dominantes obtenidas por entrecruzamiento, se eligen individuos con rasgos distintivos de su fenotipo para luego someterlos a entrecruzamiento, donde se repite varias veces el proceso con las generaciones siguientes y aumenta la frecuencia de los alelos favorables, obteniendo así plantas con características deseadas. Autores como Odorizzi (2015) y Basigalup (2022) mencionan la obtención de cultivares multifoliados y plantas resistentes a sequía mediante técnicas de SFR. Otro método es el cruzamiento complementario de cultivares o policruzamiento, el cual tiene por objetivo reunir en una sola población rasgos característicos de dos o más individuos de interés al combinar plantas individuales por medio de polinización cruzada. Otro de los métodos utilizados en el mejoramiento convencional es la mutagénesis donde se

utilizan agentes mutágenos que pueden ser químicos, físicos o biológicos que tienen la capacidad de alterar la estructura del ADN de la planta (Morán, 2023). También se utilizan líneas masculinas estériles, en las que las flores masculinas no producen polen, pero como los órganos femeninos funcionan normalmente se pueden producir semillas al polinizar con otra línea que no tenga esa limitación. Nan *et al.* (2017) realizaron un cruzamiento entre un híbrido de alfalfa y una línea estéril obteniendo un híbrido con 30 % de aumento en su producción de forraje y mejor resistencia a estrés abiótico.

Sobre avances obtenidos por medio de mejoramiento convencional y mediante la técnica SFR, Odorizzi (2015) realizó una investigación utilizando tres variedades sin reposo invernal, donde se llevaron a cabo cuatro ciclos de selección fenotípica recurrente con el carácter multifoliolado deseado para obtener plantas con más número de folíolos, con lo cual se generó una línea genética con hasta 11 folíolos por hoja, niveles de proteína bruta mayores en un 4 %, con respecto a las hojas trifoliadas, y altos niveles de calidad forrajera expresados en hoja/tallo. También existen variedades comerciales desarrolladas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), de Argentina, como el cultivar “Kumén PV INTA” que es un cultivar sin reposo invernal y que tolera condiciones moderadas y altas de salinidad, desarrollado en tres ciclos de SFR con el uso de genotipos de alfalfa capaces de emerger y crecer adecuadamente en suelos con altas concentraciones salinas. Otra variedad creada por INTA para reducir el meteorismo es “Maltén PV INTA”, donde combinaron selección fenotípica y genotípica, usando además policruzamiento con la ayuda de jaulas y abejas melíferas lo que resultó en una disminución significativa tanto número de animales con meteorismo y la intensidad de este, teniendo casos con la afección en grado leve y moderado (Basigalup, 2022).

Mejoramiento a través de ingeniería genética. En el mejoramiento no convencional se utilizan métodos que permiten la transferencia correcta y precisa de uno o más genes deseables y un ejemplo de esto es la transgénesis y se usa para incorporar nuevos rasgos o aumentar la tasa de ganancia genética. La transgénesis es la transferencia de genes exógenos a *M. sativa*, mediante

transformación directa e indirecta. La transformación directa utiliza métodos físicos o químicos para introducir ADN exógeno en células vegetales y así obtener plantas transgénicas. Mientras que los métodos de transformación indirecta utilizan portadores para introducir ADN en la célula vegetal, la transformación mediada por *Agrobacterium* spp. es el principal ejemplo de esto (Bao *et al.*, 2018).

La planta modelo más utilizada para transformaciones genéticas de leguminosas en el género *Medicago* es *M. truncatula*, ya que presenta características biológicas favorables como contar con un genoma pequeño, corto tiempo de desarrollo y alta producción de semilla, además de ser muy parecida genéticamente a *M. sativa* (Basigalup, 2007). Se han introducido numerosos genes en alfalfa para obtener rasgos económicamente deseables en donde el método de transferencia de genes más utilizado es el cocultivo de *Agrobacterium tumefaciens* (Bao *et al.*, 2018), una bacteria del suelo que se utiliza para transferir genes entre bacterias y plantas y que tiene la capacidad de integrar su ADN dentro del genoma hospedero (Citovsky y Lacroix, 2019). *Arabidopsis thaliana* es la planta modelo más utilizada para estudios genéticos y se ha usado para expresar genes de alfalfa y la identificación de genes de interés (Alves y De La Torre, 2008). La introducción en alfalfa del gen atDPK2 de *Arabidopsis*, que codifica para proteínas multifuncionales que participan en procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas generó plantas con mayor tolerancia a estrés abiótico y aumentó la producción de biomasa bajo esas condiciones. Específicamente, aumentó la tolerancia a estrés oxidativo, debido a la inducción o activación de mecanismos de remoción de especies reactivas del oxígeno (ROS), aumentando los niveles de prolina y mejorando la protección de la membrana celular (Cheol *et al.*, 2014).

Por medio de alfalfa genéticamente modificada, Ostachuk (2013) desarrolló una vacuna comestible al exponer plantas que tienen la capacidad de producir agentes neutralizantes (glicoproteínas) contra el virus de la diarrea viral bovina (fiebre aftosa). Una baja dosis de ingesta de hojas tiene éxito en la inmunización de los animales, incluso llegando a ser más efectivo que vacunas orales por el microambiente hostil del tracto gastrointestinal, en cambio, en una planta transgénica el antígeno se encuentra inmerso en el tejido vegetal por lo que puede

ser capaz de encapsular el antígeno generando más inmunidad. Otro avance obtenido por medio de ingeniería genética aplicada en alfalfa es que se puede incrementar el bajo contenido de aminoácidos azufrados presentes, lo que es una limitante para el crecimiento de ovinos. En este sentido Reyes y Rozowski (2003) demostraron que se puede mejorar la calidad proteica de la alfalfa al introducir en su genoma un gen de maravilla que codifica para una proteína rica en aminoácidos azufrados, lo cual generó un aumento en las proteínas totales en 1 % de la planta, es decir, ovejas alimentadas con esta alfalfa transgénica aumentaron la cantidad de carne y producción de lana comparadas con aquellas alimentadas con alfalfa convencional.

La sequía y la salinidad son los principales problemas que limitan el crecimiento, desarrollo y supervivencia de la alfalfa, conduciendo a pérdidas de rendimiento de hasta 20 %, por lo que es importante el mejoramiento genético en esta especie para un mejor desempeño de las plantas frente a estas condiciones de estrés. La respuesta al estrés es multigénica y han utilizado genes de plantas halófitas y xerófitas para aumentar la tolerancia a sequía y salinidad, mejorando la eficiencia del recurso hídrico, incrementando el rendimiento, productividad y calidad de forraje (Bao *et al.*, 2018). Plantas de alfalfa con el gen GsZFP1 de *Glycine soja* que codifica para proteínas Zinc-finger Cys2His2, que desempeñan funciones en los procesos de desarrollo y estrés abiótico, aumentan la tolerancia a estrés salino acumulando un mayor contenido de prolina libre junto con azúcar soluble en la planta. La prolina es un aminoácido que juega un papel fundamental en la protección de las plantas bajo estrés, por lo que, en las plantas transgénicas de alfalfa, la permeabilidad de la membrana se ve menos dañada bajo estrés salino, ya que al sobreexpresar el gen absorbe menos cantidad de sodio y hay menor pérdida de agua por parte de la planta, aumentando así la tolerancia al estrés por deshidratación (Bai *et al.*, 2013). Por otro lado, al sobreexpresar el gen AtEDT1 de *A. thaliana* en alfalfa se mejoró la tolerancia a la sequía, siendo las plantas capaces de sobrevivir y recuperarse bajo condiciones de estrés hídrico hasta en un 50 % en comparación con plantas silvestres, generando brotes de mayor longitud y con contenido de agua hasta 35 % mayor con respecto a las plantas silvestres. Además, este gen aumentó el

crecimiento del sistema radicular en las plantas transgénicas, siendo hasta un 64 % más largas que las raíces de plantas silvestres, por lo que pueden obtener más agua y nutrientes en ambientes limitantes debido a estrés hídrico (Di *et al.*, 2017).

El estudio de Di *et al.* (2016) demostró que el gen CsLEA de *Cleistogenes songorica*, involucrado en actividades enzimáticas-estructurales, induce rasgos asociados a resistencia a estrés en alfalfa. Luego de ser transformada con *A. tumefaciens* y sobre expresar el gen, las plantas aumentaron sus niveles de osmoprotectores en la célula, los que contribuyen a reducir el potencial osmótico en la raíz y facilitando la absorción de agua desde el suelo. De modo similar, al sobreexpresar el gen GsWRKY20 de *Glycine max* en alfalfa también se aumentaron los niveles de osmoprotectores en la planta transgénica, se generó una cutícula más gruesa, lo que contribuye a evitar pérdidas de agua en plantas con déficit hídrico, y disminuyeron las concentraciones de malondialdehído el cual es un indicador de daño en la membrana celular, por tanto, mejorando la tolerancia al estrés. Ambos estudios demostraron que alfalfa transgénica crece adecuadamente bajo condiciones de alta salinidad y estrés hídrico mientras que las plantas silvestres presentaron clorosis foliar, retraso en el crecimiento e incluso muerte (Bai *et al.*, 2014; Di *et al.*, 2016).

La planta halófila *Eutrema salsugineum* ha sido utilizada también como fuente de genes para transformar alfalfa mediante *A. tumefaciens*. De esta halófita se aisló el gen EsMcsu1, el cual fue incorporado en alfalfa obteniéndose plantas resistentes a sequía, con una capacidad de retención de agua mayor, hasta un 25 %, que las plantas silvestres y con mayor contenido de ácido abscísico (ABA) endógeno y una disminución de los niveles de ROS; niveles aumentados de ABA en plantas aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes y activan la expresión de genes que responden al estrés (Guo *et al.*, 2015).

Otra manera de adquirir tolerancia a la sequía y a la deshidratación es manipulando la producción de ceras en las hojas, dado que las ceras cuticulares juegan un rol importante en limitar la pérdida de agua en las plantas durante la transpiración. Al sobre expresar el gen WXP1 de *M. truncatula* en *M. sativa* utilizando el promotor CaMV345S se incrementó significativamente en contenido de

cera cuticular en las plantas transgénicas, disminuyendo con ello la pérdida de agua y también se redujo la degradación de la clorofila, ya que al ser sometidas a déficit hídrico las plantas solo mostraron marchitez parcial (Blancaflor *et al.*, 2005). Síntesis de lo anterior se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Genes expresados, clonados y expresados en alfalfa y los efectos que causa.

Gen	Fuente	Efecto	Referencia
GsZFp1	<i>Glycine soja</i>	Mayor contenido de prolina libre y azúcar soluble.	Bai <i>et al.</i> , (2013).
AtEDT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mayor capacidad de sobrevivencia, brotes y raíces de mayor longitud.	Di <i>et al.</i> , (2017).
CsLEA	<i>Cleistogenes singorica</i>	Aumento niveles osmoprotectores.	Di <i>et al.</i> , (2016).
GsWRKY20	<i>Glycine max</i>	Aumento niveles osmoprotectores, cutícula más gruesa.	Bai <i>et al.</i> , (2014) Di <i>et al.</i> , (2016).
EsMcsu1	<i>Eutrema salsugineum</i>	Mayor retención de agua, mayor contenido de ABA y menor contenido de ROS.	Guo <i>et al.</i> , (2015).
WXP1	<i>Medicago truncatula</i>	Aumento cera cuticular.	Blancaflor <i>et al.</i> , (2005).

Se han desarrollado plantas de alfalfa con resistencia a lepidópteros mediante transformación genética con genes de *Bacillus thuringiensis* (Bt), lo que ha resultado una estrategia eficaz de control. Bt es un bacilo gram positivo, aerobio facultativo, nativo del suelo que durante su fase de esporulación produce inclusiones proteicas tóxicas para los insectos. Estas proteínas de cristal insecticida (ICP) también conocidas como proteínas Cry y Cyt, son los principales factores de virulencia para una amplia variedad de plagas, que al estar en presencia de un ambiente reductor, modifican su estructura desarrollando actividad biológica altamente tóxica contra insectos-plaga como lepidópteros, coleópteros y dípteros, además, son amigables

con el medio ambiente, razones por la cual se utiliza en productos comerciales y plantas transgénicas (Chaparro *et al.*, 2013). Al expresar el gen Cry1C o Cry3a de Bt en alfalfa se genera una alta resistencia a insectos, ya que en sus tejidos producen estas proteínas altamente tóxicas, las cuales se activan en el sistema digestivo del insecto causándole parálisis en el intestino, deshidratación, y parálisis total por lo que el insecto deja de alimentarse y muere (Chaparro *et al.*, 2013). Según Kole y Xi-Yu (2021) hay más de 700 toxinas proteicas insecticidas identificadas en *B. thuringiensis*, que una vez ingeridas por los insectos, le causan daño celular provocándoles la muerte. Familias de toxinas como Cry3A y Vip1/2 provocan daños en coleópteros y hemípteros plagas importantes en alfalfa. La expresión del gen Cry3A produce una mortalidad entre 70 – 90 % en Curculionidae. El daño causado por áfidos también se puede reducir diseñando plantas repelentes de áfidos que expresen el gen farneseno (EF), que es utilizado como feromona de alarma en esos insectos causándoles repelencia (Kole y Xi-Yu, 2021).

Otro rasgo que se puede modificar genéticamente en alfalfa es la resistencia a patógenos mediante la producción de ciertas moléculas que le confieren resistencia como las fitoalexinas. Estudios han demostrado que sobre expresar genes R, llamados así por su potencial de proporcionar resistencia a enfermedades en los cultivos al generar una molécula derivada de la fitoalexina resveratrol, reducen la incidencia o gravedad de las enfermedades. La expresión en alfalfa del gen RS de maní (*Arachis hypogaea*), heterólogo del gen R, genera resistencia al hongo que causa la enfermedad de la mancha negra en tallos y hojas de alfalfa en épocas de primavera y al expresar conjuntamente la enzima isoflavona-O-metiltransferasa propia de alfalfa se acumula la fitoalexina, proteína que reduce la gravedad de las infecciones más comunes que podrían afectar el cultivo como pudrición de la raíz por *Phytophthora* spp. (Acharya *et al.*, 2018).

Adhikari y Missaoui (2019), investigaron las bases genéticas y genómicas que causan la resistencia a roya en alfalfa, a través de la detección de los alelos causales que generan resistencia al patógeno, lo cual es utilizado en selección asistida por marcadores moleculares en el mejoramiento de alfalfa. Para ello, se analizaron muestras de ADN de *M. sativa* y *M. truncatula* infectadas con roya y se

identificaron genes involucrados en la respuesta a la enfermedad, entre los que se encuentran varios genes relacionados con la dormancia en otoño y la resistencia al invierno, mientras más latentes y resistentes al invierno son los genotipos más susceptibles a la enfermedad.

Dado que las malezas se cosechan junto con la alfalfa y reducen la calidad nutricional del forraje y con el fin de disminuir pérdidas en la producción de forraje por uso de herbicidas como glifosato, Monsanto desarrolló una variedad de alfalfa genéticamente modificada llamada Roundup Ready Alfalfa (RR) resistente al glifosato, con el fin de controlar malezas en etapas más susceptibles lo que permite que el cultivo crezca sin competencia. Para ello, mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, se insertó un gen que codifica para C4-5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) en el ADN de alfalfa. Esta enzima es similar a la EPSPS natural, tanto en estructura como en función, pero que no se ve afectada por el glifosato. La función que cumple esta enzima es producir los aminoácidos aromáticos necesarios para que la planta crezca y sobreviva en presencia del glifosato (Bao *et al.*, 2018). Además, previene intoxicaciones en ganado por malas hierbas con contenidos alto de nitrato o toxinas que dañan la boca de los animales. En general, la variedad RR tiene mayor persistencia al no tener competencia con malezas que reducen el vigor de las plantas y que aumentan la susceptibilidad ante otros factores de estrés en la alfalfa incrementando su sobrevivencia (Orloff y Putnam, 2013).

La alfalfa posee algunas limitaciones y riesgos al ser usada en pastoreo debido a la rápida degradación de proteínas y alto contenido de lignina (Hannouf *et al.*, 2017). La lignificación afecta la relación hoja/tallo, al haber más fibra en el tallo que en la hoja, esto aumenta el rendimiento en materia seca, pero la digestibilidad disminuye, por lo que la lignina es el factor más importante que limita la digestión de la pared celular. La lignina es un polímero complejo que forma parte de la estructura de la pared celular que al ser muy rígida inhibe la fermentación ruminal. En el contenido de lignina también influye el estado de madurez de la planta, ya que a medida que este avanza se van redistribuyendo los foto-asimilados y se producen cambios morfológicos en la planta que repercuten negativamente en la calidad del forraje por el aumento en el contenido de lignina. Al avanzar la madurez se forma

una pared celular secundaria con altos contenidos de compuestos aromáticos que afectan negativamente el proceso de digestión, además, la proteína total disminuye, así como los niveles de fósforo, potasio y otros nutrientes digestibles beneficiosos para los animales (Lorenzo, 2017). Debido a lo anterior, la mejora en la calidad del forraje se centra, principalmente, en aumentar la digestibilidad. Se han desarrollado plantas de alfalfa transformadas genéticamente para reducir el contenido de lignina en el cultivo mejorando así la digestibilidad del forraje, pequeñas disminuciones en el contenido de lignina pueden mejorar la digestibilidad y pueden generar aumentos significativos en el rendimiento animal (Aung *et al.*, 2018).

Se ha obtenido plantas de alfalfa con reducción de 8 a 10 % en lignina mediante la técnica de regulación de genes con la utilización de microARN. Específicamente, se logró mediante el uso de microARN una expresión reducida de la enzima CoA 3-O-metiltransferasa (CCoSOMT), la que está involucrada en la biosíntesis de lignina, mejorando con ello la digestibilidad del forraje, lo que contribuye a aumentar el rendimiento animal al mejorar el consumo de materia seca, mayor digestibilidad de fibra detergente neutra y mayor producción de leche (Guo *et al.*, 2001). El nombre de esta alfalfa genéticamente modificada es HarvXtra (HX-4114), es una alfalfa comercial, tiene un rendimiento entre 15 y 20 % mayor que una alfalfa convencional y permite conservar un nivel de digestibilidad característico de estados de madurez tempranos en estados más avanzados (Bowman *et al.*, 2018). Albrecht *et al.* (2016), Barros *et al.* (2019) y Fisher (2017) afirman que cosechar HarvXtra con un retraso de 5 -10 días en comparación con alfalfa convencional, mantiene la calidad nutritiva, muestra una ganancia en la cantidad de forraje producido y mantiene la persistencia del cultivo al reducir el número y frecuencia de cosechas, además de disminuir costos de mano de obra al tener un corte menos en la planificación.

Otra técnica que mejora la digestibilidad de alfalfa es retrasar la floración. Amyot *et al.* (2015a) modificaron genéticamente la planta clonando el precursor miR156 (MsmiR156) y al sobre expresarlo en alfalfa disminuyó el contenido de lignina en aproximadamente un 10 %. Adicionalmente, MsmiR156 actúa regulando genes similares a la proteína de unión al promotor SPL (SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like), que actúan como factores de transcripción regulando el crecimiento y

desarrollo en plantas y, a su vez, desempeñan un papel importante en el mejorando el desempeño de la planta frente a estrés abiótico. Con esta técnica se mejora el rendimiento del forraje, ya que permite un calendario más flexible de cosecha maximizando el rendimiento, puesto que en la fase de floración de esta alfalfa transgénica el nivel de lignina indeseable se mantiene bajo. Además, con esta modificación se incrementa la longitud de la raíz, ayudando a absorber y retener más agua, y se aumenta la densidad de los tricomas, proporcionando una barrera contra plagas.

De modo similar, con la sobreexpresión del precursor miR156 de *Lotus japonicus* (LjmiR156a) en alfalfa se logró un retraso en la floración. Además, se generaron otros rasgos positivos como una mejor ramificación de brotes, aumentando el número de ramas principales y laterales hasta cuatro veces respecto a una planta convencional, mayor producción de biomasa y aumento de almidón y carbohidratos solubles como la pectina que es más digerible por los rumiantes y altamente degradable en comparación con otros carbohidratos como celulosa y hemicelulosa (Amyot *et al.*, 2015b).

CONCLUSIONES

La alfalfa presenta desafíos importantes para su mejoramiento genético debido, principalmente a autotetraploidía e incompatibilidad sexual entre plantas. Sin embargo, por medio de técnicas de mejoramiento tradicional y uso de ingeniería genética se han mejorado rasgos de interés en alfalfa.

Se han desarrollado cultivares comerciales y líneas genéticas más resistentes a estrés hídrico, salinidad, competencia interespecífica, plagas y enfermedades, así como con mejoras en palatabilidad, calidad, persistencia y rendimiento. No obstante, aún existe la necesidad de producir nuevos cultivares de alfalfa, con mayor productividad frente a un clima muy inestable e impredecible y una creciente población que requiere una dieta enriquecida en productos animales.

REFERENCIAS

1. Acharya, S., A. Hannoufa y S. Singer. 2018. Molecular improvement of alfalfa for enhanced productivity and adaptability in a changing environment. *Rev. Cell.*

Enviar. 41(9):1955-1971.

2. Adhikari, L. y A. Missaoui. 2019. Quantitative trait loci mapping of leaf rust resistance in tetraploid alfalfa. *Rev. Physic and Molec. Plant. Pat.* 106(1): 238-245.
3. Albrecht, K., K. Cassida, M. Hall, S. Mark, D. Min, S. Orloff, A. Parker, D. Undersander y X. Xu. 2016. Low lignin alfalfa: wide area field test results [en línea]. <California alfalfa and forage symposium, Reno.
4. Alves, A. y C. Delatorre. 2008. *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. *Rev. Cs. Agr.* 31(2): 58-67.
5. Abdalla, N., N. Bákonyi, E. Domokos-Szabolcsy, H. El-Ramady. M. Fari y S. Kovacs. 2020. Alfalfa Growth under Changing Environments: An Overview. *Rev. Biodiv. Soil. Security.* 4(4): 201-224.
6. Arolfo, V., M. Balzarini, D. Basigalup y A. Odorizzi. 2011. Validación de un método de selección para rendimiento en alfalfa basado en la depresión por endocría. pp: 13-19. En: *Agriscientia*. Vol XXVIII. Córdoba, Argentina.
7. Amyot, L., B. Aung, A. Bertrand, M. Gruber y A. Hannoufa. 2015a. MicroRNA156 as a promising tool for alfalfa improvement. *Rev. Plant Biotech. Jour.* 13(1): 779-790.
8. Amyot, L., B. Aung, A. Bertrand, M. Gruber y A. Hannoufa. 2015b. Ectopic expression of *Ljmir156* delays flowering, enhances shoot branching, and improves forage quality in alfalfa. *Rev. Plant. Biotech. Rep.* 9(1): 379-393.
9. Aung, B., A. Hannoufa, I. Liu, L. Tian y T. Xing. 2018. Recent progress of transgenic technology development for alfalfa. *Rev. Amer. Jour.of Plants Scien.* 9(3):467-482.
10. Bai, X., H. Cai, W. Ji, X. Luo, L. Tang, Z. Wang y J. Wu. 2013. Overexpression of GsZFP1 enhances salt and drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plants pshyc. And. Biochem.* 71(1): 22-30.
11. Bai, X., H. Cai, X. Luo, L. Tang, Z. Wang y H. Zhai., 2014. Overexpression of *Glycine soja* WRKY20 enhances both drought and salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.* 118(1): 77-86 .
12. Bao, A. K., Z. Bao, L. Gao, T. Kumar, F. Wang y S.F. Wang. 2018. The progress of genetic improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Czech Journ. Of genet. And. Plant breeding.* 54(2): 41-51.
13. Barros, G., R. Dixon y S. Temple. 2019. Development and commercialization of reduced lignin alfalfa. *Current opinion in Biotechnology.* 56(1): 48-54.
14. Basigalup, D.E. 2007. El cultivo de alfalfa en la Argentina. *Rev. Ediciones INTA.* Buenos Aires, Argentina.
15. Basigalup, D., A. Odorizzi y V. Arolfo. 2011. Evaluación de daño de gorgojos en poblaciones de alfalfa (*Medicago sativa* L.) con alto número de raíces

- laterales. Rev. Agriscientia. 28(2): 119-126.
16. Basigalup, D. 2022. Investigación, producción e industrialización de la alfalfa en Argentina. Rev. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina.
 17. Blancaflor, E., C. Broeckling, M. Sledge, L. Sumner, Z. Wang y J. Zhang. 2005. Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). Rev. Plants J. 42(1): 689-707.
 18. Becerra, C. 2003. Productividad de cuatro cultivares y tres líneas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en un andisol de la Región de la Araucanía. Proyecto de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de La Frontera, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Temuco, Chile.
 19. Beltrán, V. M., 2011. Manipulación de la senescencia de alfalfa (*Medicago sativa* L.) por ingeniería genética. Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires, Área de Producción vegetal. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
 20. Bowman, J., R. Endecott, A. Mack, E. Meccage y D. Petterson. 2018. The effects of feeding reduced-lignin alfalfa on growing beef cattle performance: a preliminary study. Rev. Jour. Of Agric. Stud. 6(2): 87-99.
 21. Cadena, P. y E. Clavijo. 2011. Producción y calidad nutricional de la alfalfa (*Medicago sativa*) sembrada en dos ambientes diferentes y cosechada en distintos estados fenológicos. Trabajo de grado, Pregrado. Universidad de La Salle, facultad de ciencias agropecuarias. Bogotá, Colombia.
 22. Cedeño, G. 2018. Tolerancia a estrés hídrico y promoción del crecimiento en alfalfa (*Medicago sativa*) inoculada con bacterias de la rizósfera. Tesis, doctorado en Ciencias de la Agronomía. Universidad de Concepción, Facultad de agronomía. Chillán, Chile.
 23. Chaparro, A., A. López y D. Portela. 2013. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. Rev. Nova 11(20): 87-96.
 24. Chen, J., G. Liu, L. Ma. C. Stephen, X. Wang, Z. Wang, H. Zhang y H. Zhao. 2020. A genome-wide association study approach to the identification of candidate genes underlying agronomic traits in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Journal Plant biotech 18(3): 611-613.
 25. Cheol, J., X. Deng, H. Lee, H. Li, Q. Ke, S. Kwak, Y. Pyu, Z. Wang y B. Xu. 2014. Transgenic alfalfa plants expressing AtDPK2 exhibit increased growth and tolerance to abiotic stresses. Rev. Plant Phys. And Bioch. 84(1): 67-77.
 26. Chocarro, C., I. Delgado y J. Lloveras. 2020. La Alfalfa, agronomía y utilización. Edicions de la Universitat de Lleida. Lleida, Zaragoza.
 27. Citovsky, V y B. Lacroix. 2019. Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species. Annu. Rev.

- Phytopathol. 57(1): 51-231.
28. Damboriarena, J. I. y E. Stinger. 2008. Crecimiento de alfalfa según profundidad del suelo. Proyecto de título, ingeniero agrónomo. Universidad de La República, Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
 29. Di, S., Fan, C., Y. Pang, X. Wang, C. Xiang y G. Zheng. 2017. Over-expression of *Arabidopsis* EDT! Gene Confers Drought tolerance in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Frontiers in Environmental* [en línea]. <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.02125/full>>. [Consultado; 14 agosto 2023].
 30. Di, H., Z. Duan, Y. Wang, D. Zhang, J. Zhang y J. Zhang. 2016. Co-transforming bar and CsLEA enhanced tolerance to drought and salt stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L). *Rev. Bioch. And Biophy. Research Communic.* 472(1): 75.82.
 31. Espinoza, G. G., B.H. Gutiérrez, G.R. Sánchez y M. Servín. 2017. Modelos para optimización de agua de riego en alfalfa con reposo invernal. III° Congreso Nacional de riego y drenaje Comeii. 28-30 Abril, 2017. INIFAP, Zacatecas, México.
 32. Fisher, M. 2017. Reduced-lignin alfalfa provides flexibility for farmers. [en línea] *Crops and soils* magazine. <[file:///C:/Users/usuario/Downloads/Crops%20%20%20Soils%20-%202017%20-%20Fisher%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/usuario/Downloads/Crops%20%20%20Soils%20-%202017%20-%20Fisher%20(1).pdf)>. [Consulta: 09 agosto 2023].
 33. Gallace, M. 2020. Interacción alfalfa-*Ensifer meliloti*: Respuesta al estrés salino. Tesis, Magister en producción agropecuaria en regiones semiáridas. Universidad Nacional de La Pampa, Facultad de Agronomía, Argentina.
 34. Guo D., F. Chen, J. Wheeler, J. Winder, S. Selman, M. Peterson and R.A. Dixon. 2001. Improvement of in-rumen digestibility of alfalfa forage by genetic manipulation of lignin O-methyltransferases. *Transgenic Res.* 10: 457–464.
 35. Guo, J., Z. Ma, G. Wang, C. Zhou y J. Zhu. 2015. Overexpression of EsMcsu1 from the halophytic plant *Eutrema salsugineum* promotes abscisic acid biosynthesis and increases drought resistance in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Rev. Genet. Molec. Res.* 14(4):17204-17218.
 36. Han, J., C. Jia, G. Liu, X. Wang, Z. Wang, F. Zhao y H. Zhao. 2018. Genomic prediction for 25 agronomic and quality traits in alfalfa (*Medicago sativa*). *Rev. Fronts in plant science.* 9(2): 77-83.
 37. Hannouf, A., Y. Lei y P. Yu. 2017. The use of gene modification and advanced molecular structure analyses towards improving alfalfa forage. *Rev. Intern. Journ. Of molec. Scien.* 18(2): 298.
 38. Kent, F. 2019. Forrajeras cultivadas anuales y perennes más difundidas en la provincia de La Pampa. *Rev. Ediciones INTA.* La Pampa, Argentina.
 39. Kole, C and L. Xi-Yu. 2021. Biotechnology Advances In Alfalfa. Pp: 65-86. In: C.

- Kole (Ed.) The Alfalfa genome. Springer Nature. Estados Unidos.
40. Lorenzo, C. 2017. Estrategias para el desarrollo de nuevas variedades de Alfalfa por mejoramiento no convencional. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina.
 41. Li, G., H. Liu, Y. Luo, N. Turner y G. Yan. 2020. Morphological Features and Biomass Partitioning of Lucerne Plants (*Medicago sativa* L.) Subjected to Water Stress. Thesis Project, College of Forestry, Gansu Agricultural University. Gansu, China.
 42. Manabayeva, A. y D. Tussipkan. 2022. Alfalfa (*Medicago sativa* L.): genotypic Diversity and Transgenic alfalfa for phytoremediation [en línea]. *Frontiers in Environmental science*. <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2022.828257/full>>. [Consulta: 14 agosto 2023].
 43. Morán, O. 2023. Caracterización de alfalfa nacional (*Medicago sativa*) inducida a mutación, mediante etilmetasulfonato “EMS”. Trabajo experimental para optar al título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Babahoyo, Ecuador.
 44. Nan, L., S. Shi y K. F. Smith. 2017. The Current Status, problems, and Prospect of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Breeding in China. *Rev. Agronomy* 7(1):1.
 45. National Alfalfa & Forrage Alliance. 2023. Alfalfa variety ratings: winter survival, fall dormancy & pest resistance ratings for alfalfa varieties [en línea]. NAFA, USA. <<https://www.alfalfa.org/varietyLeaflet.php>>. [Consulta: 11 de octubre 2023].
 46. Odorizzi, A. 2015. Parámetros genéticos, rendimiento y calidad forrajera en alfalfas (*Medicago sativa* L.) extremadamente sin reposo con expresión variable del carácter multifoliolado obtenidas por selección fenotípica recurrente. Tesis, proyecto de doctorado en Ciencias agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Córdoba, Argentina.
 47. Orloff, S. y D. Putnam. 2013. Benefits and Risks of Adapting Genetically-Engineered Crops: The Roundup Ready alfalfa story [en línea]. *Cool forages*. <<https://farmwest.com/wp-content/uploads/2020/08/18-AFM-2013-18-Putnam.pdf>>. [Consulta: 09 de agosto 2023].
 48. Ostachuk, A. 2013. Expresión de una proteína de fusión ScFv-E2T en células CHO-k1 y plantas transgénicas de alfalfa para el direccionamiento selectivo a células presentadoras de antígeno. Tesis, proyecto de doctorado, investigador científico. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Argentina.
 49. Rebuffo, M., E. Restaino y D., Risso. 2000. Tecnología en alfalfa. *Boletín de*

divulgación N°69. INIA. Montevideo, Uruguay.

50. Reyes, M.S. y J. Rozowski. 2003. Alimentos transgénicos. Rev. Chil. Nutr. 30(1). Santiago de Chile.
51. Soriano, O. S. 2003. Importancia del cultivo de Alfalfa (*Medicago sativa* L.) en el Estado de Baja California Sur. Monografía, proyecto de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
52. Soto, P. 2000. Alfalfa en la zona centro sur de Chile. Colección Libros INIA (4). Impresora Trama, Chillan, Chile.
53. Tallone, G. 2017. Emergencia y establecimiento de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en dos épocas de siembra. Proyecto de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Córdoba, Argentina.
54. Trucco, R. 2018. Determinación de la relación hoja tallo y del contenido de carbohidratos en alfalfa (*Medicago sativa* L.) [en línea]. Universidad Nacional del Litoral, Argentina. < <http://hdl.handle.net/11185/2205>>. [Consulta: 20 febrero 2024].