



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN RECURSOS GENETICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERIA

**VARIANZA GENÉTICA Y MAPEO MOLECULAR DE RENDIMIENTO Y
CALIDAD NUTRICIONAL EN FAMILIAS DE MEDIOS HERMANOS EN
*Medicago sativa***

MARISOL GALICIA JUÁREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2012

La presente tesis titulada: “**VARIANZA GENÉTICA Y MAPEO MOLECULAR DE RENDIMIENTO Y CALIDAD NUTRICIONAL EN FAMILIAS DE MEDIOS HERMANOS EN *Medicago sativa***”, realizada por la alumna: **Marisol Galicia Juárez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. José Ricardo Bárcena Gama

DIRECTOR

Dr. Baldomero Alarcón Zúñiga

ASESOR

Dr. Sergio Segundo González Muñoz

ASESOR

Dr. Omar Hernández Mendo

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados por la oportunidad de formarme como profesionista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el financiamiento necesario para cursar los estudios de maestría.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca otorgada.

A la Fundación Produce Hidalgo, por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación.

Al Dr. Baldomero Alarcón Zúñiga por la buena dirección, apoyo y consejos en la realización de la tesis.

Al Dr. Ricardo Bárcena Gama por el apoyo brindado en la elaboración y mejora de la tesis.

Al Dr. Sergio Segundo González Muñoz por brindarme su apoyo y atinadas sugerencias en la tesis.

Al Dr. Omar Hernández Mendo por su valioso apoyo y aportación en la tesis.

A la Dra. Ma. Rosario Venegas Ordoñez por todo el apoyo, enseñanzas y amistad.

La Dra. Ma. Magdalena Crosby Galván por el apoyo desinteresado en la tesis.

A María Moreno, Andrés Luna y Daniel Espejel por todo el apoyo recibido.

A los Ingenieros: José Abel Vásquez Pablo y Abelino Saragos Pérez por forma parte de esta investigación, por su amistad y apoyo incondicional.

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y todo lo necesario día a día para ir cumpliendo mis metas.

A mis padres: María Hipólita Juárez Martínez y Raymundo Galicia Ortiz, por todo el amor y apoyo incondicional, la confianza y el gran impulso de convertir mis sueños en metas.

A mis hermanas y hermano; Guadalupe, Francisco, Leticia y Liliana, por su amor, comprensión y apoyo en cada instante de mi vida.

A mí cuñada y cuñados: Rosario, Alan y Manuel por todo el apoyo, consejos y alegrías compartidas.

A mis sobrinos: Por toda la felicidad, motivación e impulso en mi vida para seguir emprendiendo nuevas metas.

A mis amigos del COLPOS; Amaury, Miriam, Kalina, Nely, Lupita, Ángeles y Adrián por su amistad y todos los momentos compartidos.

A mis amigos Gregorio, Krys, Chio, Yessy, Alondra, Blancka, Gil, por sus motivaciones, apoyo y amistad incondicional en todo momento.

En especial a Olimpia, Osmany y Nicte-Ha, por la enseñanza de vida, fe, valor y fuerza ante cualquier adversidad.

INDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| CAPITULO I INTRODUCCION GENERAL | 1 |
| 1.1. OBJETIVOS GENERALES..... | 3 |
| 1.2. HIPÓTESIS..... | 3 |
| 1.3. REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 1.3.1. Importancia de la alfalfa <i>Medicago sativa</i> L. | 3 |
| 1.3.2. Caracterización genética de alfalfa tetraploide..... | 6 |
| 1.3.3. Importancia de la mejora genética en alfalfa..... | 6 |
| 1.3.4. Selección y mejoramiento genético..... | 10 |
| 1.3.5. Componentes de rendimiento y calidad..... | 15 |
| 1.3.6. Aplicación de la genómica a los programas de mejoramiento en alfalfa | 17 |
| 1.3.7. Mapeo genético y uso de marcadores moleculares en alfalfa | 18 |
| 1.4. LITERATURA CITADA | 20 |
| | |
| CAPITULO II. DETERMINACION DE COMPONENTES DE VARIANZA GENETICA EN CARACTERES MORFOLÓGICOS DE OCHO VARIEDADES DE ALFALFA A PARTIR DE FAMILIAS DE MEDIOS HERMANOS | 25 |
| RESUMEN | 25 |
| 2.1. INTRODUCCIÓN..... | 26 |
| 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS | 28 |
| 2.2.1. Material genético experimental | 28 |
| 2.2.2. Diseño experimental en campo..... | 29 |
| 2.2.3. Evaluación de campo..... | 30 |
| 2.2.4. Análisis de calidad de nutrientes | 31 |
| 2.2.5. Variables medidas..... | 32 |
| 2.2.6. Análisis estadístico | 32 |
| 2.2.7. Componentes de varianza..... | 34 |
| 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 36 |
| 2.3.1. Varianzas genéticas de variedades en caracteres morfológicos | 36 |
| 2.3.2. Varianzas genéticas de variedades en caracteres de calidad de nutrientes..... | 39 |
| 2.3.3. Varianzas genéticas en caracteres morfológicos por corte | 41 |
| 2.3.4. Varianzas genéticas en caracteres de calidad de nutrientes por corte | 44 |
| 2.4. CONCLUSIONES..... | 46 |
| 2.5. LITERATURA CITADA | 46 |

| | |
|--|-----------|
| CAPITULO III. VARIABILIDAD GENETICA INTRA E INTER POBLACIONAL DE ALFALFA BAJO UN DISEÑO GENÉTICO DE FAMILIAS DE MEDIOS HERMANOS POR MEDIO DE MARCADORES AFLP..... | 49 |
| RESUMEN | 49 |
| 3.1. INTRODUCCIÓN..... | 50 |
| 3.2. MATERIALES Y METODOS..... | 52 |
| 3.2.1. Material experimental..... | 52 |
| 3.2.2. Extracción y cuantificación de ADN..... | 53 |
| 3.2.3. AFLP (Polimorfismo de Fragmentos Largos Amplificados). | 54 |
| 3.2.4. Análisis estadístico | 56 |
| 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 57 |
| 3.3.1. Distancia genética inter poblacional..... | 57 |
| 3.3.2. Distancia genética intra poblacional..... | 61 |
| 3.4. CONCLUSIONES..... | 64 |
| 3.5. LITERATURA CITADA | 64 |
| CAPITULO IV. CONCLUSION GENERAL | 68 |
| 4.1. CONCLUSION | 68 |
| 4.2. SUGERENCIAS | 68 |
| 5. ANEXOS..... | 70 |

INDICE DE CUADROS

CAPITULO I

| | |
|--|---|
| CUADRO 1. PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE ALFALFA EN MÉXICO, 2010..... | 5 |
|--|---|

CAPITULO II

| | |
|---|----|
| CUADRO 2. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA VARIEDADES CON DIFERENTE NÚMERO DE CORTES Y LOCALIDADES. | 35 |
| CUADRO 3. COMPONENTES DE VARIANZA GENÉTICA PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS EN CADA UNA DE LAS VARIEDADES..... | 38 |
| CUADRO 4. COMPONENTES DE VARIANZA GENÉTICA PARA CARACTERES DE CALIDAD DE NUTRIENTES EN CADA UNA DE LAS VARIEDADES..... | 40 |
| CUADRO 5. COMPONENTES DE VARIANZA GENÉTICA PARA CARACTERES MORFOLÓGICOS POR LOCALIDAD EN CADA UNO DE LOS CORTES Y TOTAL. | 42 |
| CUADRO 6. COMPONENTES DE VARIANZA GENÉTICA PARA CARACTERES DE CALIDAD DE NUTRIENTES POR LOCALIDAD EN CADA UNO DE LOS CORTES Y TOTAL..... | 45 |

CAPITULO III

| | |
|---|----|
| CUADRO 1. DESCRIPCIÓN DE LOS GENOTIPOS DE <i>MEDICAGO SATIVA</i> L. UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO, PROVISTOS POR EL BANCO DE GERMOPLASMA DEL DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA..... | 53 |
| CUADRO 2. COMBINACIONES DE PRIMER DE AFLP UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO. | 56 |
| CUADRO 3. MATRIZ DE SIMILITUD Y DISIMILITUD GENÉTICA DE LAS OCHO POBLACIONES DE ALFALFA. | 60 |
| CUADRO 4. RANGOS DE SIMILITUD GENÉTICA DE LAS 10 FAMILIAS DE MEDIOS HERMANOS (FMH) DENTRO DE CADA UNA DE LAS VARIEDADES..... | 62 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. DENDOGRAMA DE 8 VARIEDADES DE <i>MEDICAGO SATIVA</i> L..... | 58 |
|--|----|

**VARIANZA GENÉTICA Y MAPEO MOLECULAR DE RENDIMIENTO Y CALIDAD
NUTRICIONAL EN FAMILIAS DE MEDIOS HERMANOS EN *Medicago sativa***

Marisol Galicia Juárez

Colegio de Postgraduados 2012

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es considerada como el cultivo forrajero de mayor importancia en la nutrición de animales domésticos, y se siembra en todo el mundo. A pesar de existir una amplia gama de variedades de alfalfa sembradas en México hay pocos estudios acerca de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones criollas, por tanto esta investigación tuvo el objetivo de estimar la variabilidad genética de caracteres cuantitativos agronómicos y de calidad de nutrientes considerando ocho poblaciones de alfalfa bajo un diseño de familias de medios hermanos a partir de marcadores AFLPs (*EcoRI* y *Mse*). Se empleó un diseño lattice rectangular 8 x 10 con tres repeticiones y mediciones repetidas a través del tiempo. El análisis de los componentes de varianza indican que la varianza genotípica (σ^2_g) fue mayor para rendimiento total, seguido de rendimiento de hoja y rendimiento de tallo, la variedad con mayor σ^2_g fue Tanverde para biomasa acumulada y hoja, Júpiter tuvo mayor rendimiento de tallo. La varianza genética total para componentes morfológicos promedio de los cinco cortes es mayor para Acolman en rendimiento total y rendimiento de tallo y Chapingo en rendimiento de hoja mientras que en calidad la mayor varianza la presenta Acolman para PC, presentando varianzas negativas para FDN y FDA en las dos localidades. El análisis de agrupamiento se efectuó con el método de ligamiento promedio (UPMGA) y los valores de similitud y distancia genética con estimadores genéticos insesgados de Nei (1978) en donde las 10 combinaciones de oligonucleótidos amplificaron un total de 234 amplicones con el 100 % de polimorfismo en el análisis de las ocho poblaciones.

El análisis del dendograma sugirió que existen dos grupos principales; 1) por las variedades Atlixco, Julia, Rustique, Júpiter, Macate, INIA-76, Tanverde; 2) por la variedad Mediterránea. Se realizó un análisis de las distancias genéticas entre y dentro de familias de medios hermanos (FMH) para cada población en donde se encontró una mayor variación genética entre FMH dentro de cada población que entre poblaciones, siendo Julia e INIA-76 las de mayor disimilitud genética con Mediterránea. Se concluye con el apoyo de AFLPs se identificaron poblaciones genéticamente divergentes asumiendo un mayor número de alelos contrastantes y con mayor heterocigosidad, que es la base de la productividad en especies forrajeras autoploides y que el rendimiento y calidad de nutrientes son altamente influenciadas por la estación del año, localidad y fuente genética disponible, y que el mejoramiento genético debe ser preferentemente dirigido para cada región agroclimatológica.

Palabras clave: *Medicago sativa*, familia de medios hermanos, AFLP, variabilidad genética.

CAPITULO I. INTRODUCCION GENERAL

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es originaria de la región Caucásica del nordeste de Turquía, Turkmenistan y nordeste de Irán, con genética diploide y autotetraploide ($2n=2x=16$; $2n=4X=32$) de polinización cruzada (alógamas) y propagación por semillas (Anbaran *et al.*, 2007). Es la leguminosa forrajera más importante en el mundo debió a su alto rendimiento y valor nutritivo (Li *et al.*, 2011; Sakiroglu, *et al.*, 2011).

Los principales países que producen alfalfa son Estados Unidos, Argentina, Canadá y China (Alarcón *et al.*, 2011); siendo México el noveno productor, con una superficie cultivable de 383,436 ha sembradas durante 2010 (SIAP-SAGARPA, 2011), y es la leguminosa forrajera más utilizada para la alimentación de ganado lechero, en las regiones árida, semiárida y templada (Rojas, 2011); además facilita al productor ganadero transferir excedentes de cosecha a periodos críticos de disponibilidad de forraje (Moreno y Talbot, 2006). Sin embargo, México no es autosuficiente en disponibilidad de variedades de alfalfa por lo que tiene que importar entre 85 y 90% de sus necesidades anuales de semilla proveniente de Estados Unidos, España y Australia, lo cual lo hace dependiente del uso de variedades y estrategias de selección de regiones distintas para las zonas productoras del país (Salinas, 2005).

Cuantificar parámetros genéticos dentro de poblaciones adaptadas a las regiones productoras, se establece como un requisito indispensable para definir los esquemas de selección en cada carácter agronómico, maximizar las respuestas a la selección, identificar la magnitud del efecto ambiental sobre el comportamiento productivo y evitar de esta forma que los productores tengan cierta incertidumbre por la variedad a sembrar.

Los programas de mejoramiento de cualquier especie tienen como objetivo el desarrollo de germoplasma que mejorará la producción del cultivo y ningún programa será exitoso sin un conocimiento detallado de las características importantes del germoplasma, los problemas comunes involucrados en la producción y cuáles de estos problemas pueden solucionarse a través de un programa de mejoramiento genético (Alarcón *et al.*, 2011; Alarcón *et al.*, 2009).

Riday y Brummer (2006) mencionan que los programas tradicionales de mejoramiento de alfalfa suelen seleccionar las plantas después de 3 a 5 años de evaluación en campo, a lo que Robins *et al.* (2007) sugiere la selección asistida con marcadores moleculares para hibridación selectiva, ofreciendo un decremento en los ciclos del tiempo e incrementando la variabilidad genética intravarietal. Actualmente la mayoría de los trabajos de mejoramiento genético, tienen un enfoque genómico y están orientados a la construcción de mapas genéticos de ligamiento, la dilucidación de vías metabólicas, identificación y caracterización de genes, resistencia a patógenos (hongos, insectos y bacterias), o los involucrados en la resistencia a frío, calor y sequía o los responsables de la autoincompatibilidad (Alarcón y Brummer, 2007).

Sin embargo, no se han documentado trabajos de investigación que hayan estudiado de manera integral las fuentes genéticas potenciales de germoplasma de alfalfa *per se* y la variabilidad genética, ambiental y de interacción en el rendimiento de forraje, adaptación y persistencia, calidad forrajera, y comportamiento productivo a través de épocas y localidades, para las regiones agroecológicas de Valles Centrales de México; es por esto, que los objetivos de la presente investigación son:

1.1. Objetivos Generales

Estimar los componentes de varianzas genéticas de caracteres morfológicos y de calidad nutritiva en ocho poblaciones criollas de alfalfa a partir del diseño genético de familia de medios hermanos y determinar la variabilidad genética intra e interpoblacional con el uso de AFLP (Polimorfismo de Fragmentos Largos Amplificados) como marcador molecular.

1.2. Hipótesis

La magnitud en la variabilidad genética de componentes morfológicos y calidad nutritiva de cada población dependerá de su constitución génica y la interacción con el ambiente, mejorando la precisión de dichos estimadores genéticos con la implementación de diseños genéticos intrapoblacionales, tal como el de familias independientes de medios hermanos y con un consecuente incremento en la respuesta a selección de caracteres complejos.

1.3. REVISIÓN DE LITERATURA

1.3.1. Importancia de la alfalfa *Medicago sativa* L.

La Alfalfa es uno de los cultivos forrajeros más importantes en el mundo debido a su alto rendimiento y valor nutritivo (Li *et al.*, 2011). En el contexto de un sistema de cultivo, la alfalfa controla la erosión del suelo, mejora la calidad del agua, reduce los brotes de plagas y contribuye con cantidades considerables de nitrógeno al suelo (Brummer, 2004).

En México la alfalfa constituye uno de los recursos forrajeros más importantes, debido a su amplia adaptación a diferentes climas templados y suelos. También facilita al productor ganadero transferir excedentes de cosecha a periodos críticos de disponibilidad de forraje (Moreno y Talbot, 2006).

En comparación con el ensilaje de maíz que representa la primera alternativa de forraje para la ración diaria de ganado y que puede producir más materia seca que la alfalfa, éste suele presentar una menor concentración de proteína, por lo que considera un forraje de mediana calidad nutritiva (Brummer, 2004).

La alfalfa es el principal cultivo forrajero que se siembra en todo el mundo, con 32 millones de hectáreas (Julier *et al.*, 2003). SIAP-SAGARPA (2011) reporta que México sembró durante el 2010, alrededor de 383,436 ha de alfalfa, con un rendimiento promedio de 77.06 tha^{-1} de alfalfa verde y los tres principales estados productores son: Chihuahua, Guanajuato e Hidalgo (Cuadro 1). En Estados Unidos de América, la alfalfa es el tercer cultivo más importante después del maíz y soya (Yang *et al.*, 2008). Riday y Brummer (2005) mencionan que representa alrededor del 2.5% de la superficie agrícola total cultivada y 6,000 millones de dólares de producción anual.

Los genotipos que han dado origen a las principales variedades de alfalfa en México, se clasifican en tres grandes grupos: a) *sativas* peruanos y africanos, adaptados a la región central de México; b) *sativa* chilenos para el norte de México; y c) *falcata*, de regiones montañosas con heladas frecuentes, poco comunes en México. Los ecotipos peruanos y africanos dan su nombre por ser las zonas donde se inicia su explotación y selección, pero no por ser el centro de origen (Asia menor). De los ecotipos peruanos y africanos se han obtenido variedades adaptadas para Valles Altos Centrales de México, tales como San Miguelito, Aragonesa o también conocida como Valenciana, Moapa, CUF101, Júpiter, Oaxaca, Atlixco, INIA-76, Puebla, Tanverde, Tanhuato, entre otras; siendo los criterios de selección de estas variedades: a) persistencia de las plantas; b) resistencia a plagas y enfermedades; c) grado de latencia invernal; y d) rendimiento anual de forraje (Alarcón, 2007).

Cuadro 1. Principales estados productores de alfalfa en México, 2010.

| Ubicación | Superficie Sembrada (ha) | Superficie Cosechada (ha) | Producción (t) | Rendimiento (t/ha) | PMR (\$/t) | Valor Producción (Miles de Pesos) |
|---------------------------|---|--|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|--|
| CHIHUAHUA | 74,020.37 | 74,020.37 | 4,934,021.70 | 66.66 | 323.95 | 1,598,365.48 |
| GUANAJUATO | 53,675.67 | 53,675.67 | 3,698,699.55 | 68.91 | 574.51 | 2,124,947.34 |
| HIDALGO | 48,243.50 | 48,243.50 | 4,978,497.10 | 103.2 | 195.66 | 974,092.74 |
| BAJA CALIFORNIA | 30,627.50 | 25,501.81 | 1,672,356.45 | 65.58 | 356.94 | 596,924.88 |
| SONORA | 29,850.00 | 29,850.00 | 2,185,371.85 | 73.21 | 384.11 | 839,432.78 |
| DURANGO | 26,429.00 | 26,351.51 | 2,017,106.15 | 76.55 | 354.16 | 714,368.56 |
| COAHUILA | 22,401.75 | 22,198.00 | 1,720,559.00 | 77.51 | 443.02 | 762,249.60 |
| PUEBLA | 18,433.00 | 18,433.00 | 1,386,008.39 | 75.19 | 482.89 | 669,293.90 |
| SAN LUIS POTOSI | 13,916.00 | 13,916.00 | 1,624,044.00 | 116.7 | 482.91 | 784,275.18 |
| JALISCO | 10,210.50 | 10,209.50 | 734,222.66 | 71.92 | 420.21 | 308,530.48 |
| TOTAL NACIONAL | 383,436.68 | 377,755.75 | 29,110,563.04 | 77.06 | 378.51 | 11,018,750.50 |

Consulta: <http://www.siap.gob.mx/>, 12 de junio de 2012.

1.3.2. Caracterización genética de alfalfa tetraploide

La alfalfa es una especie de conformación genética tetraploide con $x=8$ cromosomas básicos (32 cromosomas) y con segregación (meiosis) autotetraploide acorde a las frecuencias genéticas de muchos caracteres, por lo que el máximo de alelos que puede presentar en estado somático es de 4, y su segregación en la progenie es muy variable. Con la segregación de cromosomas, la tetraploide de un genotipo AAaa en dominancia completa produce una relación de autoprogenie de 35:1 si es autotetraploide, o una relación de 15:1 si es alotetraploide. Cuando es retrocruzado con el genotipo homocigoto recesivo (aaaa), el AAaa tetraploide segrega 5:1 si es autotetraploide, o 3:1 si es alotetraploide. Un genotipo tetraploide de Aaaa produce una relación lógica de autoprogenie de 3:1 y una relación de retrocruzamiento de 1:1 cuando se cruza con el homocigoto recesivo (aaaa), se trate de alotetraploides o autotetraploides (Alarcón *et al.*, 2004). El progreso genético en esta especie leguminosa es pequeño debido a que este es autotetraploide y alógamo además de que la estructura genética de esta especie hace difícil la construcción de mapas genéticos, por lo que la respuesta a la selección en generaciones sucesivas se basa en la complementación alélica ocurrida dentro y entre poblaciones que recombinan en la población en selección, así como sus respectivas frecuencias alélicas ocurrentes (Julier *et al.*, 2003).

1.3.3. Importancia de la mejora genética en alfalfa

El mejoramiento genético experimentado en los últimos años ha llevado a contar con cultivares de alta producción y resistencia a enfermedades, que superan ampliamente a los cultivares utilizados hace 20 años (Moreno y Talbot, 2006).

Sin embargo, México no es autosuficiente en la producción de alfalfa por lo que tiene que importar forraje todos los años de los Estados Unidos, especialmente en la época invernal. Por otro lado se estima que México importa entre el 85% y 90% de sus necesidades anuales de semilla de alfalfa proveniente de Estados Unidos, España y Australia, haciéndolo dependiente del uso de variedades y estrategias de selección de regiones contrastantes a nuestro país (Salinas, 2005).

Alarcón *et al.* (2011) mencionan que el objetivo importante en programas de mejoramiento de cualquier especie es el desarrollo de germoplasma que mejorará la producción del cultivo. Ningún programa será exitoso sin un conocimiento detallado de las características importantes del germoplasma, los problemas comunes involucrados en la producción de la alfalfa, y un conocimiento de cuáles de estos problemas pueden solucionarse a través de un programa de mejoramiento genético. El trabajo de mejoramiento genético en alfalfa es complicado debido a su autotetraploidía y la cruce natural presente en la especie. Otro factor adicional es la depresión endogámica del rendimiento, producción de semilla y resistencia de enfermedades que ocurre de una generación a otra por medio de la autopolinización. Algunos de los métodos de selección utilizados en alfalfa son descritos por Alarcón *et al.* (2011) y Fehr (1987).

Selección recurrente fenotípica

Este método de mejoramiento es el más empleado en el incremento de resistencia a plagas y enfermedades en alfalfa, o en caracteres de heredabilidad moderada a alta. El método consiste en:

- 1) Evaluar un número grande de plantas para el carácter o caracteres
- 2) Seleccionar los individuos sobresalientes del paso uno

- 3) Hibridar los individuos seleccionados
- 4) Repetir los pasos 1 a 3 hasta obtener el carácter deseado

Este procedimiento es conducido en el invernadero o cámaras de crecimiento con ambiente controlado, y se puede obtener un ciclo en varios meses. El tamaño de la población inicial dependerá principalmente del tamaño de las instalaciones, considerando la probabilidad de identificar los individuos sobresalientes, así como el número mínimo de individuos por hibridar con el objeto de mantener el nivel de tetrasomía (tetraalélicos). El número mínimo de individuos para evitar una depresión endogámica en la población debe ser de 75 plantas, prefiriendo seleccionar más de 150 individuos. Por lo anterior, el tamaño de la población por monitorear (paso 1), debe ser mayor de 1500 si los individuos deseables se presentan con una frecuencia de 0.1; y más de 15,000 individuos se deben evaluar, si la frecuencia de individuos deseables es de 0.1.

Retrocruza

El objetivo de la retrocruza es trasponer genes para uno o pocos caracteres con alta heredabilidad de una población donadora a una población recurrente. Los pasos del procedimiento son:

- 1) Identificar el donador adecuado de los caracteres y los progenitores recurrentes
- 2) Cruzar una gran cantidad de plantas de cada población
- 3) Evaluar la progenie de las cruzas del paso 2. Estas evaluaciones se hacen en el invernadero, cámaras de crecimiento, o instalaciones de campo similares a los usados en la selección fenotípica recurrente, descritas en el apartado anterior
- 4) Seleccionar los individuos sobresalientes del paso 3, y cruzarlos con los progenitores recurrentes

5) Repetir los pasos 2 a 4 hasta obtener el nivel deseado del carácter del progenitor donador, dentro de la población recurrente.

Selección con pruebas de progenie

El más popular en alfalfa es el de familia de medios hermanos, denominados también como pruebas de progenie de polinización abierta o policruzas, para caracteres de baja heredabilidad. La progenie de policruzas proviene de viveros donde los progenitores se distribuyen y repiten vegetativamente para maximizar la probabilidad de hibridarse entre ellos.

Los pasos en el procedimiento son:

- 1) Identificar y seleccionar un grupo de progenitores para prueba
- 2) Hibridar los progenitores en aislamiento
- 3) Evaluar las progenies. La evaluación para calidad puede ser hecha en instalaciones como los de la selección masal o retrocruza, usando la polinización abierta ya que su heredabilidad es moderada a alta y la probabilidad de obtener progenie sobresaliente también es alta. Para el caso de rendimiento, la selección se basa en pruebas de progenie individual, evaluándose en más de una localidad si se cuenta con semilla suficiente.
- 4) Seleccionar los progenitores de las pruebas de progenie sobresalientes, para realizar los cruzamientos respectivos e iniciar a partir del paso 2 al 4. La ventaja de la selección con pruebas de progenie para poblaciones de polinización abierta o policruzas, es que a partir del paso 2 se puede obtener suficiente semilla para evaluar la progenie en más de una localidad, obteniéndose bastante información de la interacción genotipo-ambiente.

La principal desventaja de este método es que éste procedimiento requiere mucho esfuerzo y tiempo, y no es tan adaptable a la selección cíclica como los otros métodos de selección.

El número de progenies evaluadas en el paso 3 no puede ser muy grande que permita incrementar la intensidad de selección en el paso 4 y así permitir la selección de bastantes individuos para evitar la depresión endogámica en la población.

Selección familiar

La selección de las mejores familias de medios hermanos o hermanos completos, o individuos superiores de las mejores familias es una extensión obvia de la selección con pruebas de progenie. El procedimiento opera en la misma forma que la selección con pruebas de progenie, con excepción que todos los individuos o una muestra de los individuos de las mejores familias serán seleccionados. Este método es altamente efectivo para la mejora de rendimiento, persistencia y producción de semilla, aunque requiere un paso adicional para seleccionar los mejores individuos de las familias sobresalientes.

1.3.4. Selección y mejoramiento genético

Las ganancias genéticas en rendimiento de forraje en alfalfa son inferiores de las ganancias obtenidas en rendimiento de granos o en cultivos de cereales que pueden ser hasta un 10%, particularmente debido al ineficiente uso de métodos de selección que hacen poco uso de la varianza genética aditiva (Casler y Brummer, 2008).

Está bien documentado que las ganancias en rendimiento de forraje de cultivos forrajeros mejorados son bajos o inexistentes, a pesar de más de 100 años de esfuerzos en el mejoramiento en algunas especies forrajeras (Humphreys, 2005). Casler (1998) mencionan diversas causas para el retraso de rendimiento en cultivos forrajeros en relación a cultivos de grano: i) ciclos más largos de mejoramiento para cultivos forrajeros, la mayoría de los cuales son perennes; ii) la falta de un índice de cosecha para ayudar la partición de la materia seca dentro del producto económico; iii) la inhabilidad para explotar la heterosis en cultivos comerciales; y iv) un enfoque

en una amplia gama de rasgos económicamente importantes en cultivos forrajeros, muchos de los cuales no están específicamente correlacionados o que pudieran ser negativamente correlacionados con rendimiento de forraje (Casler *et al.*, 2001). En adición, Humphreys (1999, 2005) sugiere que el rendimiento de forraje puede incrementarse por mejoramiento en ganancia lejanas a superar las tasas de 1.0 a 4.0% por década. En orchard grass (*Dactylis glomerata L.*), un ciclo de intensiva selección familiar entre medios hermanos resulto en significantes ganancias con un incremento promedio en rendimiento de forraje de 6.5 a 1.3 % por año (Casler *et al.*, 2002). En rye grass perenne (*Lolium perenne L.*) cuatro ciclos de selección familiar dentro y entre (AWF) resulto en una ganancia en rendimiento de forraje de 12.8 a 1.1% por año (Wilkins y Humphreys, 2003). Aunque los productores de forrajes no ejercen una fuerte presión a los mejoradores para crear un cultivo con alto rendimiento forrajero, el reciente enfoque mundial en la dedicación de producción de cultivos bioenergéticos ha incrementado la atención en la mejora del rendimiento de biomasa como una de las metas más importantes para los mejoradores (Perlack *et al.*, 2005).

De acuerdo con Casler y Brummer 2008, la selección dentro y entre familias es favorecida sobre la selección por prueba de progenie por i) alta heredabilidad en una base planta individual; ii) la intensidad de selección dentro de familias es mayor que la intensidad de selección entre familias; iii) es posible acortar los tiempos del ciclo (para algunas especies y algunos programas de mejoramiento), por lo que realizaron una investigación de las ganancias genéticas teóricas esperadas por métodos de selección entre y dentro familias en cultivos forrajeros perennes, en donde el objetivo del este estudio fue 1) calcular las ganancias genéticas esperadas de los métodos de selección dentro y entre familias (AWF); 2) comparar estos métodos de selección con los métodos de selección de prueba de progenie; y 3) definir las condiciones

bajo las cuales la selección AWF puede ser superior a la selección por prueba de progenie. Estas condiciones son más frecuentemente logradas por sistemas de medios hermanos debido a que la varianza genética aditiva está más dividida, pero la selección AWF puede ser fuertemente favorecida en sistemas de hermanos completos bajo condiciones que son un poco más restrictivas y concluyeron que este estudio de tasas de ganancia para rendimiento de forraje y otros rasgos de cultivos forrajeros pueden ser mejorados por el uso de un más eficiente y enfocado método de selección. Vogel y Pedersen (1993) estiman que la selección AWF debería ser más eficiente que la selección con prueba de progenie de medios hermanos bajo la más estricta condición de una varianza fenotípica igual dentro y entre familias.

En el caso particular de esquemas de selección de alfalfa, los caracteres morfológicos que han sido seleccionados son la resistencia a enfermedades e insectos, rendimiento total de biomasa, persistencia y el valor nutritivo del forraje (Riday y Brumer 2005). Numerosos programas de mejora están usando selección natural y artificial para el desarrollo de la mejora de germoplasma capaz de soportar varios tipos de estrés vegetal e incrementar así su tiempo de vida (Brummer y Moore, 2000). La persistencia a largo plazo es importante para la producción económica de alfalfa ya que permite que los costos de siembra se amorticen en un periodo más largo. La persistencia es un rasgo complejo afectado por diversos factores, incluyendo el pastoreo, equipos de cosecha mecánica, la intensidad del manejo de la cosecha, enfermedades y plagas, el clima frío, latencia inadecuada, y la competencia dentro de las especies de plantas (Riday y Brummer, 2006). La mayoría de los mejoradores están de acuerdo que para seleccionar realmente la persistencia de la alfalfa se requiere por un largo tiempo la evaluación de plantas y la selección entre las plantas sobrevivientes de los años avanzados. Los programas comerciales de mejoramiento de alfalfa suelen seleccionar las plantas después de 3 a 5 años de evaluación en

campo. Riday y Brummer (2006) realizaron un experimento en dos localidades en Iowa, E.U.A., con el propósito de examinar el rendimiento de biomasa, persistencia de la planta y la estabilidad de la producción de biomasa en híbridos interespecíficos de *M. sativa* subsp. *Sativa* y *M. sativa* subsp. *falcata* después de 5 años de establecimiento en donde los nueve genotipos *sativa* fueron: ABI408, ABI311, ABI419, ABI314, C96-514, C96-673, C96-513, FW-92-118 y RP-93-377; los cinco genotipos *falcata* fueron: WISFAL-4, WISFAL-6, C25-6, PI214218-1 y PI502453-1. El rendimiento de biomasa en el experimento demostró que la cruce de *sativa* X *falcata* (SFC) es inferior a la cruce de *sativa* X *sativa* (SSC) y superior a la cruce de *falcata* X *falcata* (FFC). En este estudio la superioridad de SSC sobre FFC ó SFC podría enmascarar los alelos útiles para producción de biomasa dentro del germoplasma de *falcata*. En el 2005, Riday y Brummer demostraron que el germoplasma de *M. sativa* subsp. *falcata* con origen europeo mostro un mayor rendimiento de biomasa y rendimiento que el material asiático. No se encontraron diferencias entre los tipos de cruza observados en 1999 al 2000. Durante el 2001 y 2002 que fueron el tercer y cuarto año de postestablecimiento, respectivamente, SSC y SFC fueron equivalentes y tuvieron mayor persistencia que FFC. Inicialmente la persistencia fue menor en la localidad Nashua que en Ames posiblemente por las condiciones de un invierno más severo. En Ames sin embargo, la persistencia declinó más rápidamente, alcanzando niveles cercanos a los vistos en Nashua por el final del experimento, lo que se asume un alto efecto de interacción genotipo x ambiente. La estabilidad de producción de biomasa no encontró diferencias entre los tipos de cruce observados entre varianzas.

Otra causa de la limitación de la mejora del rendimiento es posible a que los mejoradores tengan enfocados sus esfuerzos más en selección en resistencia a insectos y enfermedades que sobre el rendimiento *per se* (Lamb *et al.*, 2006).

Una manera efectiva de potencializar la mejora de rendimiento en el futuro es capitalizar sobre el aprovechamiento de la heterosis por la acción aditiva de los genes. En alfalfa se han estado intentando desarrollar líneas puras para usarse como padres de híbridos desde 1930, pero debido a la depresión endogámica, las líneas puras son difíciles o imposibles de producir. La estrategia de la generación de semihíbridos basado en cruza de poblaciones podría evitar la necesidad de líneas puras y capturar algo de heterosis (Brummer, 1999). Poblaciones híbridas entre *Medicago sativa* subsp. *Sativa* y subsp. *falcata* demuestra heterosis para producción de biomasa, sugiriendo posibles grupos heteróticos dentro del germoplasma de alfalfa (Riday y Brummer, 2002 y 2005). Generalmente la depresión endogámica es considerada como la inversa de heterosis, aunque el mecanismo genético puede ser un poco diferente. La depresión endogámica en alfalfa tetraploide es más severa de lo previsto exclusivamente sobre el decremento en heterocigosis, sugiriendo que esto es debido a la pérdida de interacción de múltiples alelos o más probable, la pérdida de alelos dominantes favorables ligados en fase de repulsión o de deseables combinaciones de alelos epistáticos. Li y Brummer (2009) citan la presencia de depresión endogámica para fertilidad y biomasa en generaciones avanzadas inter e intrasubspecificas de híbridos tetraploides de alfalfa, con el objetivo de comparar la fertilidad en invernadero y la producción de biomasa en campo de híbridos F1 y sus generaciones F2 y S1 en ambos intra y intersubspecificas cruza, en donde los experimentos en campo incluyeron F1, F2 y S1 y una doble cruza de poblaciones que fue plantada en dos localidades en Iowa, E.U.A. en 2003 y evaluada por 2 años en rendimiento. Los resultados de las cruza *sativa* X *falcata* (SFC) F1 demostraron mayor fertilidad que las cruza intrasubspecificas, sugiriendo que las dos subespecies tienen similar estructura cromosómica.

La SFC no demostró heterosis F1 con el progenitor superior, probablemente debido a un intensivo horario de corte favoreciendo a los híbridos sativa x sativa (SSC). Sin embargo, SFC presentó una mayor depresión endogámica en ambas generaciones F2 y S1 que las cruzas intrasubspecificas, posiblemente reflejando una pérdida mayor de interacción de genes de favorable complementariedad. Estos resultados sugieren que la selección dentro cada población parental seguido por un intercrucamiento para producir poblaciones híbridas puede ser una mejor forma para mejorar la biomasa con este germoplasma que avanzar con híbridos dentro de un programa de selección recurrente fenotípica.

1.3.5. Componentes de rendimiento y calidad

El mejoramiento de la calidad del forraje se centra principalmente en el incremento de la digestibilidad, la cual puede ser realizada por decremento de la fibra o el incremento de la relación hoja/tallo (Casler, 2001). En un estudio realizado por Riday *et al.* (2002) sobre la heterosis de la calidad del forraje en alfalfa, no se observó interacción entre los tipos de cruza X ambiente entre y dentro de subespecies. En todos los ambientes, la craza falcata X falcata (FFC) tuvo mayor digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) de tallos, menor lignina ácido detergente (LAD), menor hemicelulosa y mayor proteína cruda (PC) que sativa X sativa (SSC). SSC tuvo más celulosa y mayor relación hoja/tallo que FFC. Fibra ácido detergente (FAD) y fibra detergente neutra (FDN) no tuvieron diferencias entre FFC y SSC. Concluyen que el germoplasma de falcata tiene mejor calidad de forraje del tallo que el germoplasma de sativa pero una menor relación hoja/tallo. Sativa x falcata (SFC) obtuvo valores medios entre SSC y FFC incluyendo digestibilidad in vitro de MS, proteína cruda, celulosa, hemicelulosa, y relación hoja/tallo. Sin embargo, SFC tiene mayor FDN y FDA que cualquiera de las cruza SSC y FFC.

Aunque la dominancia de subespecies lleva a un decremento de la calidad del forraje, este estudio demuestra una ventaja potencial de poblaciones híbridas comparadas con una cruce simple híbrida. En una cruce simple híbrida, la selección intensiva y el mejoramiento es requerido para desarrollar combinación de alelos deseables e insertar nuevos alelos a líneas puras. Cuando las líneas puras son cruzadas para producir híbridos, estos híbridos solo expresan complementariedad conteniendo alelos favorables en las dos líneas puras que constituyen el híbrido. En un sistema de población híbrida la fuerza colectiva de todo el conjunto de complementariedad de alelos favorables contenido en ambas poblaciones es expresada en la población media híbrida. La desventaja de las poblaciones híbridas es que si las poblaciones tienen una pesada carga genética, la complementación entre poblaciones tienen una menor probabilidad de cubrir alelos deseables. La selección fenotípica dentro de poblaciones heteróticas pueden reducir la carga genética, y la creación de líneas puras en alfalfa es difícil debido a la depresión endogámica, por lo que seleccionar poblaciones heteróticas con reducida carga genética es una opción deseable. Riday y Brummer (2005) dieron continuidad a este experimento evaluando la relación entre los componentes del rendimiento de biomasa entre y dentro de subespecies de alfalfa, y solo presentaron correlaciones fenotípicas en donde el rendimiento fue negativamente correlacionado con el daño invernal provocado por bajas temperaturas y positivamente correlacionado con altura de la planta, vigor y rebrote en primavera. El rendimiento no tuvo una correlación significativa con hábito de crecimiento, madurez y rebrote en otoño, pero el aumento de rendimiento fue correlacionado con el aumento de FDN y hemicelulosa. No es de extrañar, que un mayor daño invernal fue asociado con un menor rebrote y vigor en primavera. La altura y hábito de crecimiento fueron altamente correlacionados, y ambos fueron positivamente correlacionados con rebrote y madurez.

Madurez y rebrote fueron positivamente correlacionados, indicando que las plantas que rebrotan más rápido tienden a madurar más rápido. El incremento en vigor o velocidad de crecimiento fue correlacionado con el incremento del rebrote de primavera. Altura y hábito de crecimiento fueron correlacionados con muchos rasgos de valor agronómico y nutritivo. Las correlaciones fueron negativas entre DIVMS y PC, y positiva para FDN y lignina ácido detergente LAD. En general, los componentes de la pared celular (FDN, FDA, LAD, celulosa y hemicelulosa) tuvieron una correlación positiva alta unos con otros, pero negativamente asociados con proteína cruda y digestibilidad in vitro de la materia seca.

1.3.6. Aplicación de la genómica a los programas de mejoramiento en alfalfa

Existen diversas investigaciones de la aplicación de la genómica a los programas de mejoramiento de alfalfa, como por ejemplo el realizado por Brummer (2004) en donde menciona que se está tratando de mejorar la producción de biomasa y disminuir el daño invernal con métodos genómicos y aumentando la selección tradicional con esfuerzos enfocados en tres áreas i) identificación de loci de caracteres cuantitativos (QTL); ii) fuentes de germoplasma para identificar alelos nobles y estructurar programas de mejoramiento para capturar heterosis; y iii) aislamiento de genes asociados con control de dormancia, también eventualmente acelerar la adaptación de recursos genéticos en los diversos ambientes. El enfoque es la identificación de loci involucrados en producción de biomasa y tolerancia a bajas temperaturas invernales, por lo que los marcadores, QTL y genes podrían ser usados como una herramienta para ayudar al mejoramiento de estos rasgos complejos. La selección efectiva para rendimiento y tolerancia invernal, requieren múltiples años de evaluación en campo para asegurar una larga persistencia y sostenido rendimiento, consecuentemente, la mejora genética se acumulará lentamente.

El intento de identificar genes involucrados en temperatura o fotoperiodo podrían ser útiles en la selección asistida con marcadores dirigiéndolos en la alteración de la respuesta de dormancia invernal de varias poblaciones. La selección basada en marcadores moleculares ofrece un principal decremento en los ciclos del tiempo e intenta identificar loci asociados con ciertos rasgos usando mapeo genético estandarizado y procedimientos de detección de QTL (Robins *et al.*, 2003). Estos estudios de mapeo conducen en ambas poblaciones tetraploides y diploides a proporcionar una imagen del paisaje de la genómica de estos importantes rasgos e identificar opciones para mejorarlos. Además de dar un enfoque a la selección asistida con marcadores como un posible medio para incrementar rendimiento y capturar heterosis, que todavía no está disponible comercialmente en cultivares sintéticos (Brummer, 1999). Los marcadores moleculares no tienen que ser exitosos para predecir heterosis pero si más efectivos para diferenciar progenitores contrastantes (Riday *et al.*, 2003; Riday y Brummer, 2004).

1.3.7. Mapeo genético y uso de marcadores moleculares en alfalfa

La construcción de dos mapas genéticos en un cultivo tetraploide de alfalfa usando microsatélites y AFLP como marcadores fue realizado por Julier *et al.* (2003), empleando una población F1 obtenida de la cruce de cultivares de alfalfa Magali y Mercedes. 599 amplicones AFLP y 107 SSR polimórficos fueron identificados para ambos cultivares, generando 8 grupos de 4 cromosomas homólogos cada uno, y con un mapa cubierto entre 88 a 100 % del genoma (5x). Para Mercedes el mapa midió 3045 cM con 339 marcadores posicionados y una distancia entre marcadores de 9.0 cM. El mapa de Magali cubrió 2649 cM con 350 marcadores posicionados y una distancia entre marcadores de 7.6 cM.

Robins *et al.* (2007) construyeron un mapeo genético para asociar el rendimiento de forraje, altura de planta y rebrote en múltiples cortes de alfalfa tetraploide con la posición de los marcadores moleculares. El objetivo de este estudio fue 1) caracterizar la producción de forraje, altura y rebrote de múltiples cortes y sus correlaciones en poblaciones de alfalfa tetraploide derivada de la cruce *Medicago sativa* subsp. *falcata* X subsp. *sativa*; y 2) identificar la región genómica subyacente a estos rasgos usando el mapa molecular y datos de marcadores creados para esta población. El análisis de asociación de marcadores con caracteres morfológicos, en un análisis de regresión múltiple, identificó 32 alelos asociados con rendimiento, 23 con altura, y 31 con rebrote durante por lo menos uno de los tres rebrotes. Para altura, todos los alelos con efectos negativos o fueron aportados por ABI408 o estuvieron presentes en ambos padres. En el último caso, si WISFAL-6 apporto alelos para acortar las plantas es desconocido por que no se pudo determinar si ambos padres también contienen el QTL. Aunque un número de alelos: 18 para rendimiento, 7 para altura y 3 para rebrote fueron asociados con los rasgos durante más de un corte solo 4 alelos: 3 para rendimiento y 1 para altura, fueron asociados para un rasgo en los tres cortes. Un previo análisis de las relaciones entre rasgos, se llevó a cabo en la progenie híbrida de cruces entre *M. sativa* subsp. *falcata* y *M. sativa* subsp. *sativa* encontrando una correlación positiva entre rendimiento y altura, y sin correlación entre rendimiento y rebrote (Riday y Brummer 2005).

Li *et al.* (2009) propuso que los microsatelites (SSR) y marcadores morfológicos pueden emplearse para evaluar la diversidad genética de poblaciones *falcata* (*Medicago sativa* subsp. *falcata*) de Eurasia. Los genotipos de *falcata* tienen una alta resistencia al frío, sequía y enfermedades, juega un papel importante en el rol del mejoramiento de alfalfa.

Un total de 22 loci SSR fueron detectados en 12 poblaciones estudiadas, y el promedio de la diversidad genética de cada población fue de un rango de 0.2517 a 0.4965, indicando una variación substancial dentro poblaciones. De las 12 poblaciones, tres tuvieron flores de otros colores que amarillos, indicando introgresión antes de la colección de semilla. Estas tres poblaciones crecieron de manera más erecta que el resto de las poblaciones, y valores de distancia fenotípica las agruparon en un cluster individual. El análisis de regresión demostró que no hay relación entre distancia genética y distancia fenotípica. Latitud, longitud y altitud no fueron correlacionados con la distancia genética entre poblaciones, altitud tuvo correlación con distancia fenotípica entre estas poblaciones ($p < 0.001$) exhibiendo resistencia al invierno, resistencia a sequía y resistencia a enfermedades. Las características morfológicas son las fuertes determinantes del valor agronómico y clasificación taxonómica de plantas. Para leguminosas, habito de crecimiento, color de la flor, forma de la hoja y forma de la semilla son usualmente usados para estimar la diversidad entre especies.

1.4. Literatura citada

- Alarcón, Z., B., E.C. Brummer, K.J. Moore, D. Luth, and J. Robbins. 2004. Quantitative trait loci mapping of forage quality estimators in autotetraploid alfalfa (*M. sativa*). Plant and Animal Genome XII. The International Conference on the Status of Plant & Animal Genome Research. Jan 14-18. San Diego, Cal.
- Alarcón, Z. B. 2007. Transferencia de tecnología para el manejo fitosanitario de la alfalfa en el Valle del Mezquital, Hgo. Innovando Juntos. 5(16):10-15.
- Alarcón, Z. B., and E. C. Brummer. 2007. A candidate gene-marker approach to improve cold hardiness in alfalfa (*Medicago sativa*). Arch. Latinoam. Prod. Anim. 15:70-73.

- Alarcón Z., B., R. Venegas O., M. Galicia J., C. Verduzco R., T. Cervantes M. 2009. Selección genética y molecular de genotipos de alfalfa (*Medicago sativa*) para el Valle del Mezquital. *Innovando Juntos*. 7(22): 18-31.
- Alarcón Z., B., G. C. Ortega N., S. S. Gonzales M., T. Cervantes M., R. Venegas O. 2011. Manual de la selección genética y molecular, producción de semilla de alfalfa en el Valle del Mezquital, Hidalgo. Fundación Hidalgo Produce A.C. México. 80 p.
- Anbaran, F. M., A. A. Habashi, M. Esfahany, A. S. Mohammadi and B. Ghareyazie. 2007. Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centres of origin of the species. *Journal of Genetics*. 86: 59-63.
- Brummer, C. E. 1999. Capturing heterosis in forage crop cultivar development. *Crop Sci* 39: 943-954.
- Brummer, C. E. and K. J. Moore. 2000. Persistence of perennial cool-season grass and legume cultivars under continuous grazing by beef cattle. *Agron. J.* 92: 466–471
- Brummer, C. E. 2004. Applying genomics to alfalfa breeding programs. *Crop Sci.* 44:1904-1907.
- Brummer, C. E. 2006. Five decades of alfalfa cultivar improvement: Impact on forage yield, persistence and nutritive value. *Crop Sci.* 46:902-909.
- Casler, D. M. 1998. Genetic variation within eight populations of perennial forage grasses. *Plant Breed* 11: 243-249.
- Casler, D. M. 2001. Breeding forage crops for increased nutritional value. *Adv. Agron.* 71: 51-107.

- Casler, D. M., L. S. Fales, H. M. Hall, D. L. Hoffman, J. D. Undersander and T. K. Leath. 2002. Half-sib family selection for forage yield in orchardgrass. *Plant Breed.* 121:43-48.
- Casler D. M. and E. C. Brummer. 2008. Theoretical expected genetic gains for among-and-within-family selection methods in perennial forage crops. *Crop Sci.* 48:89-902.
- Fehr R. W. 1987. Principles of cultivar development. v. 2. Crop species. Department of agronomy. Iowa State University. Ames, Iowa, USA.11-40 p.
- Humphreys, O. M. 2005. Genetic improvement of forage crops: Past, present and future. *Agric. Sci.* 143: 441-448.
- Julier, B., S. Flajoulot, P. Barre, G. Cardinet, S. Santoni, T. Huguet and C. Huyghe. 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biology* 19 p.
- Lamb, S. F. J., C. C. Sheaffer, H. L. Rhodes, M. R. Sulc, J. D. Undersander and C. E. Brummer. 2006. Five decades of alfalfa cultivar improvement: Impact on forage yield, persistence and nutritive value. *Crop Sci.* 46:902-909.
- Li, P., Y. Wang, X. Sun and J. Han. 2009. Using microsatellite (SSR) and morphological markers to assess the genetic diversity of 12 falcata (*Medicago sativa* subsp. falcata) populations from Eurasia. *African Journal of Biotechnology* 8:2102-2108.
- Li, X., and E. C. Brummer.2009. Inbreeding depression for fertility and biomass in advanced generations of inter-and intrasubspecific hybrids of tetraploid alfalfa. *Crop Sci.* 49: 13-19.
- Li, X., Y. Wei, J. K. Moore, R. Michaud, R. D. Viands, L. J. Hansen, A. Acharya A. and E. C. Brummer. 2011. Association mapping of biomass yield and stem composition in a tetraploid alfalfa breeding population. *The Plant Genome* 4:24-31.

- Moreno S., G. y Talbot W. L. M. 2006. Fertilización equilibrada de la alfalfa. Departamento Técnico. Stoller, Argentina. 10 pp. [www. Stoller.com.ar](http://www.stoller.com.ar)
- Perlack, R.D., L.L. Wright, A.F. Turhollow, R.L. Graham, B.J. Stokes, and D. C. Erbach. 2005. Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply. Available at <http://www.osti.gov/bridge> (verified 12 Feb. 2008). USDOE and USDA, Oak Ridge, TN.
- Riday, H., E. C. Brummer and J. K. Moore. 2002. Heterosis of Forage Quality in Alfalfa. *Crop Sci.* 42: 1088-1093.
- Riday, H., E. C. Brummer, A. T. Campbell, D. Luth and M. P. Cazarro. 2003. Comparisons of genetic and morphological distance with heterosis between *Medicago sativa* subsp. *sativa* and subsp. *falcate*. *Euphytica* 131: 37-45.
- Riday H. and E. C. Brummer. 2004. Performance of intersubspecific alfalfa hybrids in sward versus space planted plots. *Euphytica* 138: 107–112.
- Riday H. and E. C. Brummer. 2005. Heterosis in a broad range of alfalfa germplasm. *Crop Sci* 45: 8-17.
- Riday, H. and E. C. Brummer. 2006. Persistence and yield stability of intersubspecific alfalfa hybrids. *Crop Sci.* 46:1058-1063.
- Robins, G. J., R. G. Baughan and E. C. Brummer. 2007. Genetic mapping forage yield, plant height, and regrowth at multiple harvests in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Crop Sci.* 47:11-18.
- Rojas G., R., A. 2011. Dinámica de crecimiento y rendimiento de forraje de diez variedades de alfalfa. Tesis de Maestría. Colegio de postgraduados. 81 pp.

- Sakiroglu, M., K. J. Moore and E. C. Brummer. 2011. Variation in Biomass Yield, Cell Wall Components, and Agronomic Traits in a Broad Range of Diploid Alfalfa Accessions. *Crop Sci.* 51: 1956-1964.
- Salinas, C. S. 2005. Pasado, presente y futuro de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) en México. Semillas Berentsen. Departamento de investigación y desarrollo. 4pp. www.sebesa.com.mx
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP) 2011. Anuario estadístico de producción agropecuaria. <http://www.siap.gob.mx/>
- Vogel P. K. and F. J. Pedersen. 1993. Breeding systems for cross pollinated perennial grasses. *Plant Breed* 11: 251-274.
- Wilkins, W. P. and Humphreys O. M. 2003. Progress in breeding perennial forage grasses for temperate agriculture. *Agric. Sci.* 140: 129-150.
- Yang, S., M. Gao, C. Xu, J. Gao, S. Deshpande, S. Lin, A. B. Roe and H. Zhu. 2008. Alfalfa benefits from *Medicago truncatula*: The RCT1 gene from *M. truncatula* confers broad-spectrum resistance to anthracnose in alfalfa. *PNAS.* 105: 12164-12169.

**CAPITULO II. DETERMINACION DE COMPONENTES DE VARIANZA
GENETICA EN CARACTERES MORFOLÓGICOS DE OCHO VARIEDADES
DE ALFALFA A PARTIR DE FAMILIAS DE MEDIOS HERMANOS**

RESUMEN

En la actualidad no existen reportes de investigación que estudien y ofrezcan un conocimiento genético de las poblaciones de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en Valles Altos Centrales, por lo que este trabajo es pionero en proponer esquemas de evaluación de la variabilidad genética de caracteres cuantitativos agronómicos y de calidad, considerando ocho poblaciones de alfalfa bajo un diseño de familias de medios hermanos. Se empleó un diseño lattice rectangular 8 x 10 con tres repeticiones y mediciones repetidas a través del tiempo. Los resultados indican que la varianza genotípica (σ^2_g) fue mayor para rendimiento total, seguido de rendimiento de hoja y rendimiento de tallo, la variedad con mayor σ^2_g fue Tanverde para biomasa acumulada y hoja, Júpiter tuvo mayor rendimiento de tallo. La varianza de interacción genotipo x localidad solo presentó valores positivos en PC en las poblaciones de Atlixco, Júpiter y Macate, mientras que la varianza de interacción genotipo x corte obtuvo los valores más altos en las variedades Júpiter, Rustique y Julia para PC, FDN y FDA respectivamente y la mayor varianza de interacción genotipo x corte x localidad la presentó la variedad INIA-76 para PC y FDA, mientras que Julia lo presentó en FDN. La varianza genética total para componentes morfológicos promedio de los cinco cortes es mayor para Acolman en rendimiento total y rendimiento de tallo y Chapingo en rendimiento de hoja mientras que en calidad la mayor varianza la presenta Acolman para PC, presentando varianzas negativas para FDN y FDA en las dos localidades. Se concluye que el rendimiento y calidad nutritiva son altamente influenciadas por la estación del año, localidad y fuente genética disponible, y que el mejoramiento genético debe ser preferentemente dirigido para cada región agroclimatológica.

Palabras clave: variabilidad genética, familias de medios hermanos, localidades.

2.1. INTRODUCCIÓN

Los ecotipos que han dado origen a las principales variedades de alfalfa, se clasifican en tres grupos; 1) *sativa* peruanos y africanos, adaptados a la región central de México; 2) *sativa* chilenos para el norte de México; y 3) *falcata*, de regiones montañosas con heladas poco frecuentes, poco comunes en México. De los ecotipos peruanos y africanos se han obtenido variedades adaptadas para Valles Altos Centrales de México, tales como San Miguelito, Aragonesa, CUF101, Júpiter, Oaxaca, Atlixco, INIA-76, Puebla, Tanverde, Tanhuato, entre otras; siendo los criterios de selección de estas variedades 1) grado de latencia invernal; 2) persistencia de las plantas; y 3) rendimiento anual de forraje (Alarcón, 2007). Evaluar y seleccionar variedades con mejor adaptación y rendimiento en una determinada región, son requisitos indispensables para obtener los máximos beneficios económicos, evitando de esta forma que los productores tengan cierta incertidumbre por la variedad a sembrar (Alarcón *et al.*, 2011). El progreso en la selección, depende del tamaño de la variabilidad genética existente en una población y las magnitudes de sus componentes. Estos, y la interacción genotipos x ambientes proveen al fitomejorador de informaciones en cuanto a si existe suficiente variabilidad genética en el germoplasma a utilizar, cual es el más adecuado esquema de selección para el mejor aprovechamiento de dicha variabilidad, que extensamente el germoplasma debe ser probado para identificar los mejores progenitores, y si el mismo método de selección será igualmente apropiado para mejorar caracteres de diferente importancia (Navarro *et al.*, 1992; Dudley y Moll, 1969).

El mejoramiento genético en alfalfa (*Medicago sativa* L.) es complicado debido a su autotetraploidía y la cruce natural presente en la especie. Otro factor adicional es la depresión endogámica del rendimiento, producción de semilla y resistencia de enfermedades que ocurre de una generación a otra por medio de la autopolinización. Algunos de los métodos de selección utilizados en alfalfa descritos por Alarcón *et al.* (2011) y Fehr (1987) son selección recurrente fenotípica, retrocruza, selección con pruebas de progenie y selección familiar. Casler y Brummer (2008) proponen el uso de la selección dentro y entre familias de medios hermanos, ya que es favorecida sobre la selección por prueba de progenie por: 1) alta heredabilidad; 2) la intensidad de selección dentro de familias es mayor que la intensidad de selección entre familias; 3) es posible acortar los tiempos del ciclo. Falconer (1975) y Márquez (1985) mencionan que a través de las familias de medios hermanos se puede estudiar la estructura genética de una población y estimar las medias y varianzas genéticas del carácter de interés, además de la heredabilidad y la respuesta predicha a la selección para determinar la proporción del carácter que se transmite a su progenie al hacer selección para el carácter introducido. Para maximizar el rendimiento debe minimizar la depresión endogámica e incrementar la heterocigosidad y heterosis (Brummer, 1999).

En la actualidad no existen reportes de investigación que ofrezcan un conocimiento genético de las poblaciones de alfalfa en Valles Altos Centrales de México, por lo cual este estudio es pionero en proponer esquemas de evaluación de la variabilidad genética de caracteres cuantitativos agronómicos y de calidad de nutrientes en ocho poblaciones de alfalfa con un diseño de familias de medios hermanos con la finalidad de incrementar la expresión fenotípica en cada una de las variables de respuesta, y generar variedades de alto rendimiento y calidad nutritiva.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material genético experimental

El experimento se realizó en dos etapas: La primera en el invernadero de Forrajes del Departamento de Zootecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) en donde las diferentes semillas de familias de medios hermanos se sembraron en charolas de plástico (10 x 20) y en sustrato PeatMoss Kekkila® el 15 de diciembre de 2009. Las plántulas fueron regadas diariamente por 75 días, con una aplicación quincenal de fertilizante 20-30-20 (Verde-Abon®).

La segunda etapa consistió en el transplante en dos localidades: La primera fue en el lote J-116 del Campo Agrícola Experimental “Tabla San Juan”, de la UACH, en Chapingo, Estado de México, México, con ubicación geográfica en las coordenadas 19° 29´ de latitud Norte y 98° 54´ de longitud Oeste, a 2250 msnm. El clima en la región de Chapingo es templado sub-húmedo, el más seco de los sub-húmedos Cb(w0)(w)(i´)g. La precipitación media anual es de 644.8 mm, siendo el verano la estación del año en la que más llueve (García, 1988).

La segunda localidad se estableció en Xometla, municipio de Acolman, Estado de México, México, las coordenadas geográficas se ubican entre los paralelos 19° 38´ 00’’ de latitud norte, y 98°55´00’’ de longitud oeste del Meridiano de Greenwich, a 2250 msnm. El clima de la región es templado semiseco Cb(wo)(w)(i´)g, la temperatura media anual es de 13.8°C (rango mensual de 22.9 a 4.8°C), precipitación media anual acumulada de 601.5 mm, con invierno seco y lluvias en verano (Servicio Meteorológico Nacional, www.smn.cna.org.mx).

Los genotipos de alfalfa que se utilizaron fueron 8 poblaciones de alfalfa (*Medicago sativa* L.), cada uno con 10 Familias de Medios Hermanos (FMH) como se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Descripción de los genotipos de *Medicago sativa* L. utilizados en el experimento.

| Número | Accesión | Variedad | País de origen | Número de Familias de Medios Hermanos | Identificación de FMH en campo |
|--------|-----------|--------------|----------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | PI 172190 | Julia | Perú | 10 | 1 al 10 |
| 2 | PI 199271 | Rustique | Portugal | 10 | 11 al 20 |
| 3 | PI 199305 | Macate | Perú | 10 | 21 al 30 |
| 4 | PI 310338 | Mediterránea | España | 10 | 31 al 40 |
| 5 | PI 343050 | Atlixco | México | 10 | 41 al 50 |
| 6 | PI 343053 | Tanverde | México | 10 | 51 al 60 |
| 7 | PI 343053 | INIA-76 | México | 10 | 61 al 70 |
| 8 | | Júpiter | México | 10 | 71 al 80 |

2.2.2. Diseño experimental en campo

En el presente experimento se evaluaron 8 poblaciones de alfalfa, conformadas por 10 familias de medios hermanos por población, las familias de cada población de alfalfa se transplantaron el 6 de febrero de 2010 en la tabla San Juan del Campo Agrícola Experimental de la UACH y el 01 de mayo del 2010 en Xometla, bajo un diseño en parcelas divididas con mediciones repetidas a través del tiempo (tipo lattice rectangular 10x8) y tres repeticiones por localidad con 8 sub-bloques en cada repetición.

Cada parcela fue constituida de 6 hileras de 4 m, con una separación entre hileras de 20 cm y de 15 cm entre plantas; la densidad poblacional fue de 27 plantas por hilera, dando un total de 162 plantas por parcela. Las parcelas estaban separadas a 80 cm entre ellas. Al establecimiento, se dio una aplicación de fertilizante de 80-60-60 de N-P-K.

2.2.3. Evaluación de campo

Posterior al establecimiento, se realizó un corte de homogenización (15/05/2010) para la localidad de Chapingo debido a una mayor variación entre plantas por razones climatológicas, y para Acolman no fue necesario realizar dicho corte de homogenización. El ensayo se inició inmediatamente después del corte de homogenización en la localidad Chapingo, considerándose en total cinco cortes, con un intervalo entre cortes de 43 días para Chapingo y 47 días para Acolman.

La metodología establecida para la evaluación de las familias de medios hermanos por población fue de la siguiente manera: en cada uno de los cinco cortes, se segó cada parcela con una segadora BCS® Modelo 615X con cuchillas de 80 cm de ancho, a una altura aproximada de 5 cm; pesando el contenido de cada una de estas en una báscula digital Ohaus® (serie EB-15kg) para estimar la acumulación de forraje en peso fresco. Una vez registrado el peso fresco se tomaron 6 muestras homogéneas de cada parcela 300 a 500 g en bolsas de papel identificadas por localidad, número de la parcela y fecha de corte. Se tomó una submuestra de cada bolsa para estimar cada componente morfológico separando tallo, hoja y flor, y se registró el peso de cada componente con una báscula digital Ohaus® (serie EB 3kg).

Las bolsas de papel de las submuestras se colocaron en una estufa de aire forzado (Felisa Mod. 293-A) a una temperatura de 55 °C durante 72 horas; al final de este tiempo se pesó cada bolsa y con el peso fresco de la muestra y el respectivo peso seco, se calculó el porcentaje (%) de materia seca de cada muestra. Este porcentaje se utilizó para calcular el rendimiento de peso seco de cada componente morfológico de la alfalfa cosechado, así como el rendimiento de forraje de cada parcela experimental en cada localidad.

Después de calcular el porcentaje de materia seca de cada muestra, se molió con molino tipo Willey en malla 1 mm y el material obtenido se colocó en bolsas de plástico previamente identificadas por localidad, fecha, número de corte y número de parcela para posteriormente determinar el contenido de proteína cruda, fibra detergente neutro y fibra detergente ácido.

2.2.4. Análisis de calidad de nutrientes

Las muestras molidas y previamente identificadas por localidad, fecha, número de corte y número de parcela se les determinó por triplicado la absorbancia/reflectancia con un espectrofotómetro de infrarrojo cercano (NIRS, por sus siglas en inglés) Perkin Elmer®, en el Laboratorio de Nutrición Animal del Programa de Ganadería del Colegio de Posgraduados. Para la curva de calibración del equipo se realizó un análisis proximal de 20 muestras al azar de cada una de las localidades, en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Zootecnia, de la UACH, incluyendo el contenido de proteína cruda (PC) con un analizador de nitrógeno por combustión (Perkin Elmer® N-lyzer2410 Serie II). La determinación de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) se realizó por el método de Van Soest *et al.*(1991) con un analizador automatizado de fibra (Ankom® Mod. 2000) y posteriormente se realizó la predicción de datos con el paquete de software QUANT⁺ con el que cuenta el NIRS.

2.2.5. Variables medidas

Se estimaron los componentes de varianza genética para los siguientes caracteres:

Caracteres morfológicos

Rendimiento total (kg MS ha⁻¹): Se obtuvo del rendimiento de materia verde total por parcela multiplicado por el porcentaje de materia seca.

Rendimiento de hoja (kg MS ha⁻¹): El rendimiento de hoja se obtuvo dividiendo entre la suma de hoja, tallo y flor y después multiplicado por rendimiento total (kg MS ha⁻¹).

Rendimiento de tallo (kg MS ha⁻¹): El rendimiento de tallo se obtuvo dividiendo entre la suma de hoja, tallo y flor y después multiplicado por rendimiento total (kg MS ha⁻¹).

Caracteres de calidad nutricional:

Proteína cruda (PC): Se realizó con un analizador de nitrógeno por combustión (Perkin Elmer® N-Iyzer 2410 Serie II).

Fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA): Se realizó por el método de Van Soest *et al.*, 1991. Con un analizador automatizado de fibras (Ankom®, Mod. 2000).

2.2.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un modelo en parcelas divididas, con observaciones repetidas a través del tiempo (Steel y Torrie, 1985). La obtención de los componentes de varianza se realizó mediante la aplicación del procedimiento PROC MIXED de SAS (Versión 9.1). La comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad.

Para ello se utilizaron los siguientes modelos estadísticos:

a) Modelo general utilizado para analizar las variables en cada una de las poblaciones:

$$Y_{ijkm} = \mu + \text{Loc}_i + \text{Corte}_l + (\text{Corte*Loc})_{il} + \text{Corte*Loc(rep)}_{lik} + \text{Var}_m + (\text{Var*Corte})_{lm} + (\text{Var*Loc})_{im} + (\text{Var*Corte*Loc})_{ilm} + E_n$$

Dónde:

Y_{ijkm} = Valor de la variable respuesta en la localidad i, subbloque j, repetición k y variedad m

μ = Media General

Loc_i = Efecto de i-ésimo localidad, $i = 1, 2$.

Corte_l = Efecto de l-ésimo corte, $l = 1, 2, 3, 4, 5$.

$(\text{Corte*Loc})_{il}$ = interacción del corte con la localidad

$\text{Corte*Loc(rep)}_{lik}$ = Error tipo a

Var_m = Efecto de m-ésimo variedad, $m = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$.

$(\text{Var*Corte})_{lm}$ = interacción de la variedad con el corte

$(\text{Var*Loc})_{im}$ = interacción de la variedad con la localidad

$(\text{Var*Corte*Loc})_{ilm}$ = interacción de la variedad con el corte y con la localidad

E_n = Error tipo b

b) El modelo matemático utilizado para analizar las variables estudiadas a través de los cortes fue el siguiente:

$$Y_{jkm} = \mu + \text{Corte}_i + \text{Corte (rep*sub)}_{ijk} + \text{Var}_m + (\text{Var*Corte})_{lm} + E_n$$

Dónde:

Y_{jkm} = Valor de la variable respuesta en corte i, subbloque j, repetición k y variedad m

μ = Media General

Corte_l = Efecto de l-ésimo corte, $l = 1, 2, 3, 4, 5$.

Corte (rep*sub)_{ik} = Error tipo a

Var_m = Efecto de m-ésimo variedad, m= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

(Var*Corte)_{im} = interacción de la variedad con el corte

E_n = Error tipo b

- c) El modelo matemático que se empleó para análisis de variables estudiadas por cada uno de los cortes fue el siguiente:

$$Y_{jkm} = \mu + \text{rep*sub}_{jk} + \text{Var}_m + E_n$$

Dónde:

Y_{jkm} = Valor de la variable respuesta en, subbloque j, repetición k y variedad m

μ = Media General

rep*sub_{jk} = Efecto de i-ésima repetición i=1, 2, 3 y el j-esimo sub-bloque j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Var_m = Efecto de m-ésimo variedad, m= 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

E_n = Error tipo b

2.2.7. Componentes de varianza

Con las esperanzas de cuadrados medios se estimaron los componentes de varianza genética, utilizando el modelo propuesto por Fehr (1993) tomado de Johnson *et al.* (1955) como se puede observar en el Cuadro 2, el cual fue modificado para cada uno de los modelos estadísticos y las estimaciones se hicieron bajo el supuesto de equilibrio Hardy-Weinberg de la población, equilibrio de ligamiento y ausencia de epistasis.

La varianza aditiva y la varianza de dominancia se estimaron de acuerdo a las siguientes fórmulas propuestas por Molina (1992), utilizando la varianza genética y la varianza aditiva entre familia de medios hermanos:

$$\sigma_G = 3/4 \sigma_A + \sigma_D$$

$$\sigma_A = 1/4 \sigma_G$$

Despejando la varianza de dominancia en la formula se obtiene:

$$\sigma_D = \sigma_G / (0.75 * \sigma_A)$$

Cuadro 2. Análisis de varianza para variedades con diferente número de cortes y localidades.

| F.V. | G.L. | CM | E(CM) |
|--------------------------------|-----------------|----|--|
| Corte | C-1 | | |
| Localidad | L-1 | | |
| Corte x Localidad | (C-1)(L-1) | | |
| Corte x Localidad (repetition) | CL(R-1) | | |
| Variedad | V-1 | M1 | $\sigma_e^2 + r\sigma_{VCL}^2 + rC\sigma_{LV}^2 + rL\sigma_{CV}^2 + rCL\sigma_V^2$ |
| Corte x Variedad | (C-1)(V-1) | M2 | $\sigma_e^2 + r\sigma_{VCL}^2 + rL\sigma_{VC}^2$ |
| Localidad x Variedad | (L-1)(V-1) | M3 | $\sigma_e^2 + r\sigma_{VCL}^2 + rC\sigma_{VL}^2$ |
| Corte x Localidad x Variedad | (C-1)(L-1)(V-1) | M4 | $\sigma_e^2 + r\sigma_{VCL}^2$ |
| Error | CL(R-1)(V-1) | M5 | σ_e^2 |

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Varianzas genéticas de variedades en caracteres morfológicos

Los resultados obtenidos de estimadores genéticos de componentes de varianza (Cuadro 3), nos indican que la variabilidad genética es muy alta para los caracteres morfológicos en las 8 poblaciones estudiadas. La varianza genotípica (σ^2_G) fue mayor para rendimiento total, seguido de rendimiento de hoja y rendimiento de tallo, con un promedio de 26089, 7421 y 5755, respectivamente. La variedad con mayor σ^2_g fue Tanverde para biomasa acumulada y hoja, Júpiter fue mayor en rendimiento de tallo. La variedad INIA-76 presentó valores de varianza negativos y son consideradas como cero de acuerdo con Searle (1971) y que nos indica que en esta variedad se ha realizado ciclos de selección ya que estos reducen la varianza aditiva.

Los coeficientes de varianza aditiva (σ^2_A) estimados en las diferentes variedades muestran un valor promedio de variedades para rendimiento total de 6522; para rendimiento de hoja de 1855 y para rendimiento de tallo de 1438, indicando una variabilidad alta, lo que significa que en estas variedades se podría seguir realizando un programa de selección de medios hermanos que permita una mejor explotación de la varianza genética aditiva. Sin embargo, la σ^2_A fue tres veces menor que la varianza de dominancia (σ^2_D) presentando valores promedio de rendimiento total 21197; rendimiento de hoja 6029 y rendimiento de tallo 4676.

Las estimaciones de la varianza de dominancia fueron altas debido a que en el proceso de selección realizada con anterioridad en dichas variedades se ha aprovechado de manera importante la variación aditiva, de modo que los efectos de dominancia comienzan a manifestarse.

Los resultados aquí encontrados y retomando que la varianza de dominancia de un locus es igual a la suma de cuadrados de las desviaciones de dominancia, las diferencias entre efectos genotípicos y valores aditivos de los caracteres involucrados pueden ser tomados en cuenta para los siguientes años de mejoramiento (Molina, 1992).

La varianza de dominancia es el mayor componente de la varianza genética en esta investigación así que los caracteres podrían ser mejorados propiciando la hibridación. Brummer (1999) menciona que las investigaciones y los mejoradores en alfalfa han estado intentando desarrollar líneas puras para usarse como progenitores endogámicos de híbridos desde 1930, pero debido a la depresión endogámica, las líneas puras son difíciles o imposibles de producir y una alternativa podría ser la formación de semihíbridos basado en cruces de poblaciones y así evitar la necesidad de líneas puras y poder capturar algo de heterosis. Li y Brummer (2009) sugieren que la selección dentro de cada población parental seguido por un inter cruzamiento para producir poblaciones híbridas puede ser una mejor forma para mejorar la biomasa con este germoplasma que avanzar con híbridos dentro de un programa de selección recurrente. Riday y Brummer (2002 y 2005) trabajando con poblaciones híbridas entre *Medicago sativa* subsp. *sativa* y subsp. *falcata* han encontrado heterosis para producción de biomasa.

La varianza de la interacción genotipo x localidad (σ^2_{gl}) presenta valores promedio de variedades para rendimiento total de 2118911, para rendimiento de hoja de 607014 y para rendimiento de tallo de 449295. La varianza de la interacción genotipo x corte (σ^2_{gc}) presentó valores negativos excepto en rendimiento de hoja con un promedio de variedades de 46213. La varianza de la interacción triple; genotipo x corte x localidad presentó valores promedio de las variedades para rendimiento total de 718820, para rendimiento de hoja 107887 y para rendimiento de tallo de 168601.

Estos caracteres de rendimiento estudiados son influenciados por el ambiente y la interacción genotipo ambiente, la cual es muy alta (σ^2_{gl} , σ^2_{gc} , σ^2_{gcl}); lo que indica que la variabilidad genética entre variedades de cada carácter de rendimiento será altamente influenciado por las condiciones agroclimáticas y de manejo en cada región o parcela productiva (Alarcón, 2009).

Cuadro 3. Componentes de varianza genética para caracteres morfológicos en cada una de las variedades.

| | Atlixco | INIA-76 | Julia | Júpiter | Mácate | Mediterránea | Rustique | Tanverde |
|----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------------|----------|----------|
| Rendimiento total | | | | | | | | |
| σ^2_g | 49619 | -49563 | 43788 | 8659 | 19783 | 56545 | 18909 | 60979 |
| σ^2_A | 12405 | -12391 | 10947 | 2165 | 4946 | 14136 | 4727 | 15245 |
| σ^2_D | 40315 | -40270 | 35578 | 7035 | 16074 | 45943 | 15364 | 49546 |
| σ^2_{gl} | 2121413 | 2468223 | 2383571 | 2530303 | 1765651 | 1213482 | 2375030 | 2093620 |
| σ^2_{gc} | -12791 | -159436 | -111940 | -124221 | -104393 | -131683 | -118866 | -268267 |
| Rendimiento de hoja | | | | | | | | |
| σ^2_g | 10442 | -9297 | 7641 | -1576 | 11974 | 15838 | 4651 | 19696 |
| σ^2_A | 2611 | -2324 | 1910 | -394 | 2994 | 3959 | 1163 | 4924 |
| σ^2_D | 8484 | -7553 | 6208 | -1280 | 9729 | 12868 | 3779 | 16003 |
| σ^2_{gl} | 562329 | 736779 | 690964 | 758827 | 499033 | 342054 | 656713 | 609418 |
| σ^2_{gc} | 69140 | 37998 | 55669 | 89205 | 45855 | -11279 | 50970 | 32153 |
| σ^2_{gcl} | 18727 | 118220 | 88954 | 96375 | 61856 | 61111 | 104233 | 107887 |
| Rendimiento de tallo | | | | | | | | |
| σ^2_g | 5275 | -8895 | 9863 | 10899 | -2596 | 17306 | 4891 | 9303 |
| σ^2_A | 1319 | -2224 | 2466 | 2725 | -649 | 4327 | 1223 | 2326 |
| σ^2_D | 4286 | -7227 | 8014 | 8856 | -2109 | 14061 | 3974 | 7559 |
| σ^2_{gl} | 467389 | 519250 | 495873 | 508858 | 380717 | 246558 | 537163 | 438553 |
| σ^2_{gc} | -8836 | -39832 | -31518 | -35420 | -51745 | -19400 | -33517 | -70256 |
| σ^2_{gcl} | 43295 | 160481 | 106940 | 104831 | 103748 | 36472 | 100452 | 168601 |

2.3.2. Varianzas genéticas de variedades en caracteres de calidad de nutrientes

La varianza aditiva fue tres veces menor que la varianza de dominancia para PC, FDN y FDA. La varianza de interacción genotipo x localidad solo presentó valores positivos en PC en las poblaciones de Atlixco, Júpiter y Mácate. La varianza de interacción genotipo x corte obtuvo los valores más altos en las variedades Júpiter, Rustique y Julia para PC, FDN y FDA respectivamente. La varianza de interacción genotipo x corte x localidad fue la variedad INIA-76 la que presentó el valor más alto para PC y FDA, mientras que Julia lo presentó en FDN.

Los valores de los componentes varianza genética para caracteres nutricionales en su mayoría fueron negativos, Hallauer y Miranda (1981), establecen que pueden deberse a un modelo inadecuado, inadecuado muestreo y técnicas experimentales inadecuadas y existen en la literatura diversos casos de estimaciones negativas de componentes de varianza genética, así Espiricueta *et al.* (1973) encontraron estimaciones negativas de varianza aditiva y de dominancia al aplicar el modelo lineal, para estimar interacción génica no alélica en caracteres de variación continua en trigo, lo cual atribuyen a efectos epistáticos y a la interacción genético-ambiental. Asimismo Salazar *et al.* (1975) al estudiar la herencia de la altura de planta en trigos duros encontró valores negativos para varianza de dominancia atribuyendo esto a datos sesgados por el medio ambiente.

Los resultados encontrados en esta investigación para caracteres nutricionales y de acuerdo a lo anterior, estipulan las varianzas negativas a efectos epistáticos y efecto de la interacción genotipo-ambiente.

Cuadro 4. Componentes de varianza genética para caracteres de calidad de nutrientes en cada una de las variedades.

| | Atlixco | INIA-76 | Julia | Júpiter | Mácate | Mediterránea | Rustique | Tanverde |
|--------------------------------|---------|----------|----------|----------|---------|--------------|----------|----------|
| Proteína Cruda | | | | | | | | |
| σ^2_g | 1.5981 | -0.0909 | -1.2822 | -0.6828 | 0.7128 | -0.5861 | -0.0255 | 1.1744 |
| σ^2_A | 0.3995 | -0.0227 | -0.3206 | -0.1707 | 0.1782 | -0.1465 | -0.0064 | 0.2936 |
| σ^2_D | 1.2984 | -0.0739 | -1.0418 | -0.5548 | 0.5791 | -0.4762 | -0.0207 | 0.9542 |
| σ^2_{gl} | 0.9905 | -2.1356 | -0.0212 | 0.7889 | 0.4965 | -0.8845 | -1.6106 | -0.9960 |
| σ^2_{gc} | 7.9885 | 11.3607 | 12.9901 | 17.1542 | 8.7300 | 1.9654 | 10.6467 | 15.5494 |
| σ^2_{gcl} | -0.3589 | 5.5796 | -0.4060 | 2.0404 | 1.2793 | 1.7169 | 3.6794 | 1.5654 |
| Fibra Detergente Neutra | | | | | | | | |
| σ^2_g | 5.6376 | -2.9377 | -1.4098 | -2.0777 | 3.7136 | -2.3094 | -5.9189 | -3.6591 |
| σ^2_A | 1.4094 | -0.7344 | -0.3524 | -0.5194 | 0.9284 | -0.5774 | -1.4797 | -0.9148 |
| σ^2_D | 4.5805 | -2.3869 | -1.1454 | -1.6882 | 3.0173 | -1.8764 | -4.8091 | -2.9730 |
| σ^2_{gl} | -9.8454 | -19.8322 | -25.6240 | -17.6683 | -7.2623 | -12.2069 | -18.4097 | -9.3906 |
| σ^2_{gc} | -5.1651 | 27.2567 | -28.9749 | 24.5694 | 24.8639 | -18.6931 | 27.8910 | 29.6841 |
| σ^2_{gcl} | 36.4900 | 53.4490 | 68.7697 | 50.3064 | 25.8786 | 35.7096 | 53.1789 | 24.5912 |
| Fibra Detergente Acida | | | | | | | | |
| σ^2_g | 1.8725 | -1.1062 | 1.2005 | -1.5486 | 1.2836 | 1.9970 | 1.2305 | -0.6258 |
| σ^2_A | 0.4681 | -0.2765 | 0.3001 | -0.3872 | 0.3209 | 0.4992 | 0.3076 | -0.1564 |
| σ^2_D | 1.5214 | -0.8988 | 0.9754 | -1.2583 | 1.0429 | 1.6225 | 0.9998 | -0.5084 |
| σ^2_{gl} | -2.7556 | -13.1193 | -3.2780 | -6.7701 | -3.9939 | -4.7534 | -5.0142 | -1.9085 |
| σ^2_{gc} | 7.8028 | 5.1119 | 10.5603 | 9.9379 | 6.5258 | -5.3757 | 4.4505 | 8.9741 |
| σ^2_{gcl} | 3.4731 | 35.6308 | 11.8052 | 14.2869 | 10.5043 | 12.9493 | 21.7882 | 11.9400 |

2.3.3. Varianzas genéticas en caracteres morfológicos por corte

En el Cuadro 5 se presentan los componentes de varianza genética morfológicos por corte, se observa que la varianza total de los cinco cortes es mayor para Acolman en rendimiento total y rendimiento de tallo y Chapingo en rendimiento de hoja. La varianza de corte fue la más alta de todas siendo esta mayor en Chapingo. La varianza de interacción genotipo x corte fue negativa en todos los componentes morfológicos. La varianza genética más alta por corte en Acolman para rendimiento total fue en el corte 2, para rendimiento de hoja en el corte 1 y para rendimiento de tallo en el corte 2, en Chapingo la varianza genética por corte en rendimiento total fue mayor en el corte 3, para rendimiento de hoja el corte 4 y rendimiento de tallo en el corte 2. En Chapingo se observan mayor cantidad de varianzas negativas en diferentes cortes de cada uno de los componentes. Todos los caracteres estudiados tienen mayor componente de varianza de dominancia por lo que se requiere el método de hibridación para su mejoramiento, considerando como el más común a la selección recurrente por medios hermanos, seguido de poli cruza de al menos 100 progenitores no relacionados (plantas individuales So, cada uno un genotipo diferente), pero esto genera un inter cruzamiento de cargas genéticas de muchas variedades, reduciendo las posibilidades de mejora genética que deriva a una menor cantidad de alelos favorables con interacción génica complementaria e incrementa una mayor presencia de sintéticos, los cuales pudieron ser definidos como cultivares de polinización abierta producidos por cruzamiento aleatorio de muchos progenitores (clones o genotipos), y por tanto, con menores posibilidades de emplearse como progenitores en futuros programas de selección, también crea menores posibilidades de generación de alelos nuevos con potencial genético de rendimiento o calidad forrajera, debido a la pérdida de progenitores en ciclos iniciales.

Cuadro 5. Componentes de varianza genética para caracteres morfológicos por localidad en cada uno de los cortes y total.

| | <u>Localidad Acolman Edo. México</u> | | | | | Total | <u>Localidad Chapingo Edo. México</u> | | | | | Total |
|----------------------------|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|---------|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|---------|
| | corte 1 | corte 2 | corte 3 | corte 4 | corte 5 | | corte 1 | corte 2 | corte 3 | corte 4 | corte 5 | |
| Rendimiento total | | | | | | | | | | | | |
| σ^2g | 15584 | 29098 | 26715 | 12540 | 10563 | 19950 | -20415 | 2163 | 17715 | 7552 | -13948 | 8260 |
| σ^2A | 3896 | 7274 | 6679 | 3135 | 2641 | 4987 | -5104 | 541 | 4429 | 1888 | -3487 | 2065 |
| σ^2D | 12662 | 23642 | 21706 | 10189 | 8582 | 16209 | -16587 | 1757 | 14394 | 6136 | -11333 | 6712 |
| σ^2c | | | | | | 4408912 | | | | | | 7732201 |
| σ^2gc | | | | | | -7777 | | | | | | -9997 |
| Rendimiento de hoja | | | | | | | | | | | | |
| σ^2g | 15584 | 4998 | 2440 | 706 | -2902 | 4476 | -4283 | - 1043 | 4420 | 4463 | -8615 | 8260 |
| σ^2A | 3896 | 1249 | 610 | 177 | -726 | 1119 | -1071 | -261 | 1105 | 1116 | -2154 | 2065 |
| σ^2D | 12662 | 4061 | 1982 | 574 | -2358 | 3637 | -3480 | -847 | 3592 | 3626 | -7000 | 6712 |
| σ^2c | | | | | | 1384148 | | | | | | 2381279 |
| σ^2gc | | | | | | -3407 | | | | | | -2787 |

Continuación Cuadro 5...

| | <u>Localidad Acolman Edo. México</u> | | | | | General | <u>Localidad Chapingo Edo. México</u> | | | | | General |
|----------------------|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|---------|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|---------|
| | corte 1 | corte 2 | corte 3 | corte 4 | corte 5 | | corte 1 | corte 2 | corte 3 | corte 4 | corte 5 | |
| Rendimiento de tallo | | | | | | | | | | | | |
| σ^2g | 1514 | 10634 | 6156 | 6269 | 4705 | 5197 | -471 | 2695 | -545 | -735 | -2240 | 3573 |
| σ^2A | 379 | 2658 | 1539 | 1567 | 1176 | 1299 | -118 | 674 | -136 | -184 | -560 | 893 |
| σ^2D | 1230 | 8640 | 5002 | 5094 | 3823 | 4222 | -383 | 2189 | -443 | -597 | -1820 | 2903 |
| σ^2c | | | | | | 891205 | | | | | | 1787484 |
| σ^2gc | | | | | | -1002 | | | | | | -2710 |

2.3.4. Varianzas genéticas en caracteres de calidad de nutrientes por corte

El Cuadro 6 muestra la varianza genética total más alta en Acolman para PC y varianza genética total negativas en las dos localidades para rendimiento de hoja y tallo, la varianza de dominancia es mayor que la varianza aditiva, la varianza de corte fue mayor en todos los componentes bromatológicos en Chapingo y la varianza de interacción genotipo x corte fue mayor en Chapingo para rendimiento total pero mayor en Acolman para rendimiento de hoja y tallo.

El componente de varianza de mayor atribución al valor de varianza genética es la varianza de dominancia, sugiriendo la hibridación como método de selección, en donde un estudio realizado por Riday *et al.* (2002) sobre la heterosis de la calidad del forraje en alfalfa utilizando cruzas entre *Medicago sativa* y *falcata*, indican que el mejoramiento de la calidad del forraje se centra principalmente en el incremento de la digestibilidad, la cual puede ser realizada por decremento de la fibra o el incremento de la relación hoja/tallo, aunque la dominancia de subespecies lleva a un decremento de la calidad del forraje, demuestra una ventaja potencial de poblaciones híbridas comparadas con una simple cruce híbrida, ya que en esta selección intensiva y el mejoramiento es requerido para desarrollar combinación de alelos deseables e insertar nuevos alelos a líneas puras, por lo que, cuando las líneas puras son cruzadas para producir híbridos, estos híbridos solo expresan complementariedad conteniendo alelos favorables en las dos líneas puras que constituyen el híbrido, así en un sistema de población híbrida la fuerza colectiva de todo el conjunto de complementariedad de alelos favorables contenido en ambas poblaciones es expresada en la población media híbrida, teniendo como desventaja las poblaciones híbridas que si las poblaciones tienen una pesada carga genética, la complementación entre poblaciones tienen una menor probabilidad de cubrir alelos indeseables, una opción deseable es seleccionar poblaciones heteróticas con reducida carga genética.

Cuadro 6. Componentes de varianza genética para caracteres de calidad de nutrientes por localidad en cada uno de los cortes y total.

| | <u>Localidad Acolman Edo. México</u> | | | | <u>Localidad Chapingo Edo. México</u> | | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------|---------|----------|---------------------------------------|---------|---------|----------|
| | corte 1 | corte 2 | corte 3 | General | corte 1 | corte 2 | corte 3 | General |
| Proteína Cruda | | | | | | | | |
| σ^2_g | 0.3813 | 0.0871 | -0.0750 | 0.4157 | 0.5066 | 0.2845 | -0.0031 | 0.0862 |
| σ^2_A | 0.0953 | 0.0218 | -0.0187 | 0.1039 | 0.1266 | 0.0711 | -0.0008 | 0.0215 |
| σ^2_D | 0.3098 | 0.0708 | -0.0609 | 0.3378 | 0.4116 | 0.2311 | -0.0025 | 0.0700 |
| σ^2_c | | | | 59.2532 | | | | 297.9383 |
| σ^2_{gc} | | | | 0.4534 | | | | 0.5693 |
| Fibra Detergente Neutro | | | | | | | | |
| σ^2_g | 1.4401 | 6.2540 | 1.2088 | -0.9888 | -1.3119 | 1.4560 | -1.2788 | -0.6487 |
| σ^2_A | 0.3600 | 1.5635 | 0.3022 | -0.2472 | -0.3280 | 0.3640 | -0.3197 | -0.1622 |
| σ^2_D | 1.1701 | 5.0814 | 0.9822 | -0.8034 | -1.0659 | 1.1830 | -1.0391 | -0.5271 |
| σ^2_c | | | | -11.2581 | | | | 888.6142 |
| σ^2_{gc} | | | | 4.7798 | | | | 3.2921 |
| Fibra Acido Detergente | | | | | | | | |
| σ^2_g | 2.0177 | 0.3226 | 0.0312 | -0.6345 | -0.0066 | -0.1310 | 0.0247 | -0.4226 |
| σ^2_A | 0.5044 | 0.0807 | 0.0078 | -0.1586 | -0.0017 | -0.0327 | 0.0062 | -0.1056 |
| σ^2_D | 1.6394 | 0.2621 | 0.0254 | -0.5156 | -0.0054 | -0.1064 | 0.0201 | -0.3434 |
| σ^2_c | | | | 5.0163 | | | | 422.4862 |
| σ^2_{gc} | | | | 2.3568 | | | | 0.3575 |

2.4. CONCLUSIONES

La estimación de varianzas genéticas a partir del diseño de familias de medios hermanos, incremento la expresión fenotípica en cada una de las variables estudiadas, incrementando el valor de la varianza aditiva y precisando el valor de la varianza de dominancia, obteniendo como consecuencia una mayor precisión en la respuesta genética. La magnitud de las varianzas genéticas de dominancia y aditividad en caracteres morfológicos y nutrimentos fueron altamente influenciadas por el efecto de localidad y corte, razón por la cual dichos estimadores presentaron valores positivos como negativos, de acuerdo a las ecuaciones de varianzas para familia de medios hermanos en alfalfa (*Medicago sativa* L.).

2.5. LITERATURA CITADA

- Alarcón, Z. B. 2007. Transferencia de tecnología para el manejo fitosanitario de la alfalfa en el Valle del Mezquital, Hidalgo. *Innovando Juntos*. 5(16):10-15.
- Alarcón Z., B., R. Venegas O., M. Galicia J., C. Verduzco R., T. Cervantes M. 2009. Selección genética y molecular de genotipos de alfalfa (*Medicago sativa*) para el Valle del Mezquital. *Innovando Juntos*. 7(22): 18-31.
- Alarcón Z., B., G. C. Ortega N., S. S. Gonzales M., T. Cervantes M., R. Venegas O. 2011. Manual de la selección genética y molecular, producción de semilla de alfalfa en el Valle del Mezquital, Hidalgo. Fundación Hidalgo Produce A.C. México. 80 p.
- Brummer, C. E. 1999. Capturing heterosis in forage crop cultivar development. *Crop Sci* 39: 943-954.
- Casler D. M., and E. C. Brummer. 2008. Theoretical expected genetic gains for among-and-within-family selection methods in perennial forage crops. *Crop Sci*. 48:89-902.

- Dudley, J. W., and R. H. Moll. 1969. Interpretation and use of estimates of heritability and genetic variances in plant breeding. *Crop. Sci.* 9:257-262.
- Espericueta, R. T., J. Ortiz C., J. D. Molina G. 1973. Estimación de efectos génicos en el carácter panza blanca de *Triticum durum* Desf. *Agrociencia.* 11: 85-94.
- Falconer, D. S. 1975. Introducción a la genética cuantitativa. Editorial Continental. Traductor: Fidel Márquez Sánchez. 5 ed. México DF. 430 p.
- Fher R. W. 1987. Principles of cultivar development. v.2. Crop species. Department of agronomy. Iowa State University. Ames, Iowa, USA. 11-40 p.
- Fher, R. W. 1993. Principles of cultivar development. v. 1. Theory and technique crop species. Department of agronomy. Iowa State University. Ames, Iowa, USA. 535p.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la república mexicana). 4ª ed. México DF. 217 p.
- Hallauer, A. R., and J. B. Miranda. 1981. Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. 468 p.
- Li, X., and C. E. Brummer. 2009. Inbreeding depression for fertility and biomass in advanced generations of inter- and intraspecific hybrids of tetraploid alfalfa. *Crop Sci.* 49: 13-19.
- Márquez, S. F. 1985. Genotecnia vegetal. Tomo I. Editorial. AGT. México, DF. 657 p.
- Molina G., J. D. 1992. Introducción a la genética de poblaciones y cuantitativa (algunas implicaciones en genotecnia). AGT Editor. México, D.F. 349p.
- Navarro V., F., W. C. Youngquis, W. Compton. 1992. Estimación de varianzas genéticas en maíz a partir de líneas S1 y S2. *Agronomía Mesoamericana* 3: 9-15.
- Riday, H. and E. C. Brummer. 2002. Forage yield heterosis in alfalfa. *Crop Sci.* 42:716-723.

- Riday, H., E. C. Brummer, and J. K. Moore. 2002. Heterosis of forage quality in alfalfa. *Crop Sci.* 42: 1088-1093.
- Riday, H., and E. C. Brummer. 2005. Heterosis in a broad range of alfalfa germplasm. *Crop Sci* 45: 8-17.
- Salazar M., G., V. A. Rodríguez M., M. A. Quiñones. 1975. Herencia de altura de planta en trigos duros (*Triticum durum* Desf.) *Agrociencia.* 21: 133-143.
- Searle, S. R. 1971. Topics in variance component estimation. *Biometrics* 27: 1-76.
- Servicio meteorológico nacional. Disponible en la página de internet: www.smn.cna.org.mx.
Consultado (abril, 2012). México.
- Steel R. y J. Torrie. 1985. *Bioestadística: principios y procedimientos.* 2^{da} ed. McGraw Hill. México.
- Van Soest P., J. Robertson y B. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dietary Sci.*, 74: 3583 – 3597.

**CAPITULO III. VARIABILIDAD GENETICA INTRA E INTER POBLACIONAL
DE ALFALFA BAJO UN DISEÑO GENÉTICO DE FAMILIAS DE MEDIOS
HERMANOS POR MEDIO DE MARCADORES AFLP**

RESUMEN

La alfalfa es considerada como el cultivo forrajero de mayor importancia en la nutrición de animales domésticos, y se siembra en todo el mundo. A pesar de existir una amplia gama de variedades de alfalfa sembradas en México hay pocos estudios acerca de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones criollas, por lo que esta investigación tuvo el objetivo de estimar la variabilidad genética considerando a partir de marcadores AFLPs (*EcoRI* y *Mse*). El material genético se conformó de ocho poblaciones criollas de alfalfa con un diseño genético de 10 familias de medios hermanos, en Chapingo, Méx. Se incluyeron 5 individuos por FMH, con un total de 400 individuos. El análisis de agrupamiento se efectuó con el método de ligamiento promedio (UPMGA) y los valores de similitud y distancia genética con estimadores genéticos insesgados de Nei (1978). Las 10 combinaciones de oligonucleótidos amplificaron un total de 234 amplicones con el 100 % de polimorfismo en el análisis de las ocho poblaciones. El análisis del dendograma sugirió que existen dos grupos principales; 1) por las variedades Atlixco, Julia, Rustique, Júpiter, Macate, INIA-76, Tanverde; 2) por la variedad Mediterránea. Se realizó un análisis de las distancias genéticas entre y dentro de familias de medios hermanos (FMH) para cada población en donde se encontró una mayor variación genética entre FMH dentro de cada población que entre poblaciones, siendo Julia e INIA-76 las de mayor disimilitud genética con Mediterránea. Con el apoyo de AFLPs se identificaron poblaciones genéticamente divergentes asumiendo un mayor número de alelos contrastantes y con mayor heterocigosidad, que es la base de la productividad en especies forrajeras autoploiploides.

Palabras clave: Alfalfa, familias de medios hermanos, AFLP, variabilidad genética, heterocigosidad.

3.1. INTRODUCCIÓN

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es considerada como el cultivo forrajero de mayor importancia en la nutrición de animales domésticos, y se siembra en todo el mundo con 32 millones de hectáreas (Julier *et al.*, 2003). SIAP-SAGARPA (2011) reporta que México sembró durante el 2010 alrededor de 383,436 ha de alfalfa, con un rendimiento promedio de 77.06 t ha⁻¹ de alfalfa verde y los tres principales estados productores son: Chihuahua, Guanajuato e Hidalgo. En dichas regiones, las variedades comerciales se generan a partir de genotipos peruanos, africanos y chilenos, tales como San Miguelito, INIA-76, Atlixco, Tanverde, Tanhuato, Jupiter, Oaxaca, Moapa, entre otros. Estas variedades, también denominadas como poblaciones criollas, se siguen usando en Valles Altos Centrales de México desde décadas, por lo que su productividad y liberación de nuevas variedades a partir de dichas poblaciones criollas ha sido muy restringido y limitante por el desconocimiento de la variabilidad genética presente, la cual está determinada por diversos factores tales como origen genético, número poblacional, nivel de endogamia, ploidía, tamaño del genoma, introgresión génica, entre otros (Alarcón *et al.*, 2009). El tamaño del genoma de la alfalfa es de aproximadamente 800-1000 Mpb, con un número cromosómico de $x=8$ y existe en dos niveles de ploidia (diplode, $2n = 2x = 16$ y tetraploide tetrasómico, $2n = 4x = 32$) (Li y Brummer, 2012). La segregación meiótica autotetraploide intrapoblacional, con 4 alelos como máximo en estado somático, es muy variable: la tetraploidia de un genotipo AAaa produce una relación de autoprogenie de 35:1 si es autotetraploide, o una relación de 15:1 si es alotetraploide; cuando es retrocruzado con el genotipo homocigoto recesivo (aaaa), el AAaa tetraploide segrega 5:1 si es autotetraploide, o 3:1 si es alotetraploide (Alarcón *et al.*, 2004).

Por lo tanto, cuando solo se observa una generación segregante multialelica se puede obtener la máxima recombinación y complementariedad alélica, reflejado en un máximo rendimiento y adaptación. Bajo esta teoría, el vigor relativo de genotipos posibles sería tetraalélico ($a_i a_j a_k a_l$) >trialélico($a_i a_j a_k$) >dialélico dúplex ($a_i a_j a_i a_j$) >dialélico simplex ($a_i a_i a_j a_j$) >monoalélico ($a_i a_i a_i a_i$), donde diferentes subíndices indican diferentes alelos dentro de un cigoto (Alarcón *et al.*, 2011).

Por lo anterior, es conocido que la genética auto alotetraploide de alfalfa es muy compleja, y la diversidad genética es un eslabón importante para identificar las posibles fuentes de germoplasma en el establecimiento de programas de mejora genética. La diversidad genética puede estudiarse con base a evaluaciones morfológicas, histológicas ó citológicas, pero es un proceso muy largo y tedioso (McCoy y Bingham, 1988). El desarrollo de marcadores moleculares de ADN ha permitido estudiar las distancias genéticas, útiles para la caracterización poblacional entre especies animales o vegetales (Alarcón *et al.*, 2004). En alfalfa se han empleado diferentes tipos de marcadores moleculares para determinar la variabilidad genética, tales como polimorfismo de fragmentos largos restringidos (RFLP) (Kidwell *et al.*, 1999; Maureira *et al.*, 2004), ADN polimórfico aleatorio amplificado (RAPD) (Tucak *et al.*, 2008; Crochemore *et al.*, 1996; Gherardi *et al.*, 1998; Musial *et al.*, 2002), secuencias simples repetidas (SSR) (Falahati-anbaran *et al.*, 2007; Touil *et al.*, 2008, Flajoulot *et al.*, 2005), polimorfismo de secuencias-relacionadas amplificadas (SRAP) (Vandemark *et al.*, 2005) y polimorfismo de fragmentos largos amplificados (AFLP) (Segovia-Lerma *et al.*, 2003; Keivani *et al.*, 2010).

Es imprescindible conocer la magnitud de la variación genética de los caracteres de interés para el mapeo. Por ello la técnica de AFLP introducida por Zabeau y Vos (1993) y Vos *et al.* (1995) representa una ingeniosa herramienta para evaluar la diversidad genética de las plantas, debido a que son altamente repetibles con márgenes de error de menos del 2% (Thome *et al.*, 1996).

A pesar de existir una amplia gama de variedades de alfalfa sembradas en México, hay pocos estudios acerca de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones criollas, así como los programas de mejoramiento y selección de material entre y dentro de variedades. Por tanto, esta investigación tiene el objetivo de estimar la variabilidad genética intra e inter poblacional en ocho variedades de alfalfa (*Medicago sativa* L.) con un diseño genético de familias de medios hermanos y considerando los AFLPs como marcador molecular.

3.2. MATERIALES Y METODOS

3.2.1. Material experimental

El material genético fue constituido por ocho poblaciones criollas de alfalfa ampliamente utilizadas en los Valles Altos Centrales de México, provistas por el banco de germoplasma del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de Norteamérica. Cada población estaba conformada bajo un diseño genético de 10 familias de medios hermanos, con el objeto de evaluar parámetros genéticos de rendimiento y calidad nutritiva, no incluidos en este artículo. Dicho material genético se estableció en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Edo. de México, con ubicación geográfica en las coordenadas 19° 29' de latitud Norte y 98° 54' de longitud Oeste, a 2250 msnm (Cuadro 1). Cada familia de medios hermanos se sembró en parcelas experimentales de 6 hileras de 4 m en una densidad poblacional de 162 plantas. En cada familia, se incluyeron 5 plantas para el análisis molecular, con un total de 400 muestras de tejido foliar. La recolección de las muestras se hizo en septiembre de 2010 considerando aquellas plantas con las mejores características; con hojas jóvenes, sin áreas necróticas o lesionadas.

Cuadro 1. Descripción de los genotipos de *Medicago sativa* L. utilizados en el experimento, provistos por el Banco de Germoplasma del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de Norteamérica.

| Número | Accesión | Variedad | País de origen | Número de Familias de Medios Hermanos | Identificación de FMH en campo |
|--------|-----------|--------------|----------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | PI 172190 | Julia | Perú | 10 | 1 al 10 |
| 2 | PI 199271 | Rustique | Portugal | 10 | 11 al 20 |
| 3 | PI 199305 | Mácate | Perú | 10 | 21 al 30 |
| 4 | PI 310338 | Mediterránea | España | 10 | 31 al 40 |
| 5 | PI 343050 | Atlixco | México | 10 | 41 al 50 |
| 6 | PI 343053 | Tanverde | México | 10 | 51 al 60 |
| 7 | PI 343053 | INIA-76 | México | 10 | 61 al 70 |
| 8 | | Júpiter | México | 10 | 71 al 80 |

3.2.2. Extracción y cuantificación de ADN

El tejido foliar de cada planta se recolectó de las parcelas de campo, se almacenó 4 horas en un ultracongelador a -80°C (Thermoscientific®), después se liofilizó a una temperatura de -40°C por 4 días en una liofilizadora Labconco® y se molieron finamente en un TissueLyser Qiagen®. La extracción de ADN se realizó con el método de CTAB de acuerdo al protocolo de Sambrook y Russel (2001) modificado; en donde el tejido fue incubado en el amortiguador respectivo durante 60 min a temperatura de 65 °C y en agitación continua mediante un rotator.

Después se les adiciono 1000 µl de cloroformo:octanol y se agitaron por diez min en el rotator, se centrifugo a 5000 rpm durante 15 min (a temperatura ambiente), se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo, cuidando de no romper la interfase. Se repitió este procedimiento solo que se adiciona esta vez fenol:cloroformo, después se transfirió el ADN con una pipeta Pasteur a un tubo con 300 µl de agua y 4 µl de RNasa y se colocaron en incubadora a 37 °C por 20 minutos, luego se le adiciono 1000 µl de isopropanol frio, se mezclaron por inversión y se tomó con una pipeta Pasteur el ADN precipitado el cual se llevó a un tubo con 500 µl alcohol y enseguida se transfirió a otro tubo con 200 µl de TE. La cuantificación de ADN se realizó con un espectrómetro (Nanodrop Thermoscientific® 1000), y la dilución empleada fue de 20 ng ADN µL⁻¹, almacenándose las muestras a -20°C.

3.2.3. AFLP (Polimorfismo de Fragmentos Largos Amplificados).

Los análisis se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones indicadas en el manual IRDye® Fluorescent AFLP® Kit for large Plant Genome Analysis.

Digestión

Para la digestión del ADN se utilizaron los siguiente reactivos: 5x reacción buffer 2.5 µl, DNA (20 ng/µl) 5 µl, *EcoRI/MseI* mix 1 µl, agua desionizada 4 µl. Se mezcló, centrifugó y metió al termociclador a 37 °C por 2 h, 70 °C por 15 min y 4 °C α.

Ligación

Al tubo anterior con el ADN previamente digerido se le adicionaron los siguientes reactivos: Adapter mix 12 µl y ligasa DNA t4 0.5 µl. Se mezcló, centrifugó y se metió al termociclador a 20 °C por 2 h. Se realizó una dilución 1:10 (10µl + 90 µl TE).

Pre amplificación

Del tubo de la dilución (1:10) se tomaron 2.5 μ l y se le agrego AFLP® pre-amp primer mix 20 μ l, PCR reacción buffer (10X) 2.5 μ l y Taq DNA polimerasa (5U/ μ l) 0.5 μ l. Se mezcló, centrifugó, se le adicionó una gota de aceite y se metió al termociclador por 20 ciclos (94 °C por 30 s, 56 °C por 1 min y 72°C por 1 min) y 4 °C α . Al finalizar la reacción se realizó una dilución 1:40 (5 μ l + 195 μ l H₂O).

Amplificación selectiva

Del tubo de la dilución 1:40 se tomaron 2 μ l y se le adiciono: Taq DNA polimerasa (5U/ μ l) 0.1 μ l, primer A 2 μ l, primer B 2 μ l, dNTP's (2.5mM) 2 μ l, 10 X Buffer Fermentas 1.5 μ l y H₂O 5.4 μ l. Se mezcló, centrifugo y se le agrego una gota de aceite, en seguida se metió al termociclador: 1 ciclo (94°C 30 s, 65 °C 30 s y 72°C 1 min) 12 ciclos (94°C 30 s, 65°C 30 s y 72 1 min) y 23 ciclos (72°C 1 min, 94°C 30 s, 56°C 30 s y 72°C 1 min) y 4 °C α .

Para la amplificación selectiva previamente se realizó una evaluación con las diferentes combinaciones de iniciadores del Kit de AFLPs, considerando aquellas que produjeran diferencias claras en el patrón de bandeo.

Los fragmentos obtenidos en la amplificación selectiva se separaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% (19:1) de acrilamida:bisacrilamida, urea a 7.5 M. y el amortiguador TBE 1X, en una cámara horizontal C.B.S® a 300V por 3 horas y la tinción se realizó con plata y fueron fotografiados con un foto documentador BioDoc-It en luz blanca.

Cuadro 2. Combinaciones de primer de AFLP utilizados en el experimento.

| Combinación | <i>EcoRI</i> | <i>MseI</i> |
|-------------|--------------|-------------|
| 1+9 | AAC | CAA |
| 2+12 | AAG | CAT |
| 3+10 | ACA | CAC |
| 4+11 | ACC | CAG |
| 5+13 | ACG | CAT |
| 6+14 | ACT | CTC |
| 7+15 | AGC | CTG |
| 8+16 | AGG | CTT |
| 9+3 | ACA | CAA |
| 10+6 | ACT | CAC |

3.2.4. Análisis estadístico

Con el patrón de bandas generadas con los diferentes iniciadores se construyó una matriz en la que se codificó presencia (1) o ausencia (0) de bandas de ADN, a partir de esta base de datos generada se obtuvo la diversidad genética. El análisis de agrupamiento se efectuó con el método de ligamiento promedio (UPMGA) y los valores de similitud y distancia genética con estimadores genéticos insesgados de Nei (1978), usando el software Análisis de Poblaciones Genéticas (PopGen 32) versión 1.32.

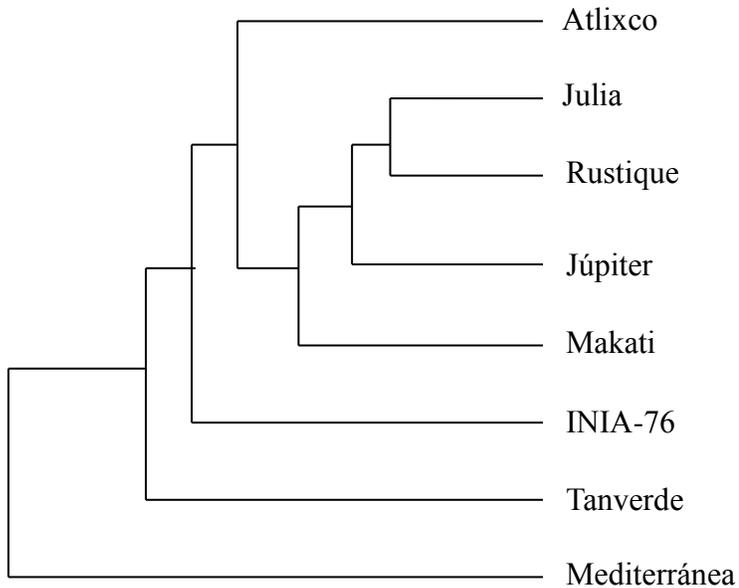
El UPGMA se encarga de medir la distancia mínima entre grupos, que consiste en obtener todas las distancias entre los individuos de cada grupo, es decir, es el promedio de todas las distancias entre los individuos de los grupos (Cervantes, 2007) y los estimadores genéticos de Nei (1978), estiman la frecuencia de la presencia o ausencia de un alelo en una población y se obtiene una matriz de similitud o disimilitud, que indica la distancia genética intra e inter poblacional de los individuos.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.3.1. Distancia genética inter poblacional

Las 10 combinaciones de oligonucleótidos amplificaron un total de 234 amplicones con el 100 % de polimorfismo en el análisis de las ocho poblaciones. El número de amplicones por cada combinación tuvieron un rango de 16-33, con un promedio de 23.4 amplicones por combinación. El análisis del dendograma (gráfica de agrupamiento) construido a partir de los valores de similitud genética determinados entre todos los genotipos (Fig. 1), sugirió que existen dos grupos principales: 1) variedades Atlixco, Julia, Rustique, Júpiter, Macate, INIA-76, Tanverde, lo que indica similitud genética para ambos genotipos y pudiera asociarse al origen ecogeográfico y de pedigrí; y 2) variedad Mediterránea indicando a esta como completamente distinto entre los demás genotipos.

Figura 1. Dendograma de 8 variedades de *Medicago sativa* L.



Lo anterior sugiere que se pueden agrupar aquellas poblaciones que genéticamente son similares (Atlaxco, Julia, Rustique, Júpiter, Mácate, INIA-76 y Tanverde), y que en genotecnia indica que no se incrementaría la variabilidad genética dentro de ellas, y por lo tanto la ganancia genética o respuesta a selección sería menor si las poblaciones más cercanas genéticamente se cruzan para conformar una nueva variedad o sintético de alfalfa (Alarcón *et al.*, 2009). Se identificaron poblaciones genéticamente divergentes asumiendo un mayor número de alelos contrastantes y con mayor heterocigosidad, que es la base de la productividad en especies forrajeras autoploiploides.

En especies diploides, la máxima heterocigosidad y heterosis se obtiene en una generación de cruzamiento entre dos poblaciones endogámicas contrastantes (cruzas simples), mientras que en tetraploides es progresiva y se maximiza hasta las cruzas dobles o generaciones sucesivas, dependiendo del nivel de recombinación entre los progenitores (Brummer, 1999). Las dificultades asociadas para distinguir individuos genéticamente divergentes ha forzado a muchos mejoradores genéticos de forrajes a incluir una cantidad grande de progenitores, en primer lugar para reducir problemas de consanguinidad y segundo para conservar la variabilidad genética dentro y entre los genotipos. Una alternativa es la formación de semi-híbridos que ofrece tres posibilidades: 1) cuando no se tiene una población natural base para un programa selectivo, una hibridación entre dos variedades puede constituir una población artificialmente creada sobre la cual trabajar eligiendo los mejores individuos, 2) reunir en una nueva forma las características favorables de los parentales y 3) obtener la ventaja que supone la heterosis al cruzar dos individuos genéticamente diferentes y permitir la combinación de alelos e incremento de tetrasómicos (Alarcón *et al.*, 2004; Brummer *et al.*, 2000).

La matriz de similitud entre las distintas poblaciones, indica que el valor más alto de similitud fue entre Julia y Rustique con 0.9907, y el valor más bajo de 0.9574 entre INIA-76 y Mediterránea. Dichos valores de similitud entre poblaciones experimentales puede considerarse muy bajos, asumiendo que las poblaciones provienen de mismo origen ecogeográfico progenitores, generando a las poblaciones criollas de Valles Altos Centrales de México. Las diferencias encontradas pueden asociarse a que los genotipos utilizados en cada estudio fueron distintos en origen ecogeográfico y las diferentes condiciones ambientales donde se desarrollaron los genotipos.

Cuadro 3.Matriz de similitud y disimilitud genética de las ocho poblaciones de alfalfa.

| Pop ID† | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | **** | 0.9797 | 0.9887 | 0.9848 | 0.9798 | 0.9739 | 0.9829 | 0.9754 |
| 2 | 0.0205 | **** | 0.9876 | 0.9873 | 0.9773 | 0.9574 | 0.9808 | 0.9823 |
| 3 | 0.0114 | 0.0125 | **** | 0.9905 | 0.9866 | 0.9757 | 0.9907 | 0.9803 |
| 4 | 0.0153 | 0.0128 | 0.0095 | **** | 0.9875 | 0.9764 | 0.9867 | 0.9868 |
| 5 | 0.0204 | 0.0230 | 0.0135 | 0.0125 | **** | 0.9806 | 0.9891 | 0.9830 |
| 6 | 0.0264 | 0.0435 | 0.0246 | 0.0239 | 0.0196 | **** | 0.9783 | 0.9607 |
| 7 | 0.0172 | 0.0194 | 0.0094 | 0.0134 | 0.0109 | 0.0220 | **** | 0.9807 |
| 8 | 0.0249 | 0.0179 | 0.0199 | 0.0133 | 0.0172 | 0.0401 | 0.0195 | **** |

†pop ID: 1(Atlixco); 2(INIA); 3(Julia); 4(Júpiter); 5(Macate); 6(Mediterránea); 7(Rustique); 8(Tanverde). Valores por arriba de la diagonal indican similitud genética y valores por debajo de esta indican disimilitud genética (Nei, 1978).

Vandemark *et al.* (2006) realizaron un estudio de estimaciones de relaciones genéticas, encontrando rangos de similitud genética menores a los de la presente investigación, quizá debido al origen genético y ecogeográfico de los cultivares probados ya que utilizaron 9 variedades de origen históricos y seis de origen comercial, lo que representa mayor distancia genética entre poblaciones, utilizando en total 15 poblaciones de alfalfa las cuales fueron examinadas con 14 SRAP (sequence related amplified polymorphism) obteniendo como resultado 249 amplicones de las cuales 23 (9.2 %) fueron monomórficos y 226 (90.8 %) fueron polimórficos.

El número de amplicones producidos por cada primer tuvo un rango de 10-31 con un promedio de 17.8 amplicones por combinación de oligonucleótidos y el porcentaje de polimorfismo producido por cada primer tuvo un rango de 66.7-100%. La similitud genética más alta fue de 0.78 entre PI 536532 (Ladak) y Vernal y el valor más bajo de 0.59 entre PI 536539 (African) y Oneida.

3.3.2. Distancia genética intra poblacional

El análisis de las distancia genética intra poblacional está dada por las 10 FMH dentro de cada población, mostrando en el Cuadro 4 los rangos de similitud genética de las FMH. Encontrando el valor más alto en diferencia de similitud en la variedad Júpiter seguida de Julia e INIA -76.

Podemos darnos cuenta como el diseño de familias de medios hermanos nos da un mejor panorama de la variabilidad genética que existe dentro de las poblaciones, conociendo de mejor manera cuales poblaciones son las que podemos seguir utilizando en un sistema de selección y ampliar las opciones de cruzamientos que nos ayuden a maximizar las ganancias genéticas de acuerdo a nuestros objetivos de mejora genética.

Cuadro 4. Rangos de similitud genética de las 10 familias de medios hermanos (FMH) dentro de cada una de las variedades.

| Variedad | Rango de similitud entre FMH |
|--------------|------------------------------|
| Atlixco | 0.7009-0.9185 |
| INIA-76 | 0.5428-0.9086 |
| Julia | 0.5688-0.9283 |
| Júpiter | 0.4512-0.9544 |
| Mácate | 0.6137-0.9457 |
| Mediterránea | 0.7390-0.9846 |
| Rustique | 0.7593-0.8973 |
| Tanverde | 0.5147-0.8876 |

Alarcón *et al.*(2004) encontraron una gran diversidad genética entre materiales diploides y tetraploides de alfalfa, llegando a la conclusión que la selectividad de material parental debe de ser hecho con base a la capacidad de interacción alélica múltiple y que el estudio de la variabilidad genética en *Medicago* por medio del análisis de isozimas (codominancia isoenzimática), ha resultado en mayor variabilidad génica en tetraploides que diploides, medido como porcentaje de heterocigosidad, por lo que la respuesta a selección hecha entre y dentro de variedades, se basa en la interacción génica complementaria, esto es, la aditividad que presentan más de dos alelos en un mismo locus, sobre todo cuando se recombinan cuatro alelos diferentes en un mismo locus (tetraalélicos).

Este conocimiento nos permitiría seleccionar con mayor precisión individuos con alelos divergentes dentro y entre variedades, con el objeto de incrementar la productividad de alfalfa. Si la diversidad a nivel de loci en marcadores refleja la diversidad de un loci ligado a un carácter de importancia agronómica/zootécnica, esta selección podría incrementar las probabilidades de tener al menos un alelo dominante favorable ligado a un carácter. En cambio, seleccionando progenitores con base a los mismos alelos homólogos de marcadores selectivos, resultaría en menor número de alelos contrastantes y recesivos, menor heterocigosidad, y por ende menor interacción alélica complementaria. La habilidad de las subespecies tetraploides para presentar un mayor rendimiento, persistencia, resistencia a plagas y enfermedades, está en un mayor porcentaje de plantas tri y tetra-alélicas dentro de la población, o en su habilidad para hibridar y recombinar alelos contrastantes asociados a caracteres de importancia agronómica y zootécnica.

El cultivar ideal para autotetraploides no se puede obtener con reproducción sexual, sino por medio de híbridos simples, tres-vías o cruza dobles de progenitores endogámicos con mezcla de genotipos tetraalélicos, e híbridos entre líneas endogámicas que presentan los tipos dialélicos y trialélicos. Las poblaciones originadas de progenitores no emparentados pueden tener diferentes complementos de segmentos cromosómicos, por lo que aumenta la proporción de tipos tetraalélicos en las poblaciones. Sintéticos de una base genética amplia, son poblaciones originadas de un gran número de progenitores no emparentados y tienen un alto nivel de heterocigosidad. En sintéticos comerciales el número mínimo de poblaciones es de 40, sobre todo para incrementar la probabilidad de obtener tetraalélicos dentro de la población.

3.4. CONCLUSIONES

Con el uso de AFLP y con la utilización de un diseño de familias de medios hermanos se identificaron poblaciones genéticamente divergentes asumiendo un mayor número de alelos contrastantes y con mayor heterocigosidad. Los valores de similitud y distancia genética encontrados indican que existe una amplia diversidad genética entre las poblaciones analizadas, pero es superior dicha variabilidad dentro de las poblaciones. Las poblaciones estudiadas representan un recurso genético valioso que puede ayudar a incrementar la variación genética en alfalfa en Valles Centrales de México.

3.5. LITERATURA CITADA

- Alarcón, Z., B., E.C. Brummer, K.J. Moore, D. Luth, and J. Robbins. 2004. Quantitative trait loci mapping of forage quality estimators in autotetraploid alfalfa (*M. sativa*). Plant and Animal Genome XII. The International Conference on the Status of Plant & Animal Genome Research. Jan 14-18. San Diego, Cal.
- Alarcón Z., B., R. Venegas O., M. Galicia J., C. Verduzco R., T. Cervantes M. 2009. Selección genética y molecular de genotipos de alfalfa (*Medicago sativa*) para el Valle del Mezquital. Innovando Juntos. 7(22): 18-31.
- Alarcón Z., B., G. C. Ortega N., S. S. Gonzales M., T. Cervantes M., R. Venegas O. 2011. Manual de la selección genética y molecular, producción de semilla de alfalfa en el Valle del Mezquital, Hidalgo. Fundación Hidalgo Produce A.C. México. 80 p.
- Cervantes M., C. 2007. Diplomado en biotecnología aplicada a la agricultura, modulo 7. Análisis estadístico de huellas genómicas. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. pp: 33-46.

- Brummer, C. E. 1999. Capturing heterosis in forage crop cultivar development. *Crop Sci* 39: 943-954.
- Brummer, C., E., M. S. Maroof and D. Luth. 2000. Reexamining the relationship between fall dormancy and winterhardiness in alfalfa. *Crop Sci.* 40: 971-977.
- Crochemore, M.L., C. Huyghe, C. Kerlanm, F. Durand, and B. Julier. 1996. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. *Agronomie* 16: 421–432.
- Falahati-anbaran, M. M., A. A. Habashi, M. Esfahany, S. A. Mohammadi, and B. Ghareyazie. 2007. Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centers of origin of the species. *J of Genet* 86: 59-63.
- Flajoulot, S., J. Ronfort, P. Baudouin, P. Barre, T. Huguet, C. Huyghe, and B. Julier. 2005. Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1420-1429.
- Gherardi, M., B. Mangin, B. Goffinet, D. Bonnet, and T. Huguet. 1998. A method to measure genetic distance between allogamous populations of alfalfa (*Medicago sativa*) using RAPD molecular markers. *Theor Appl Genet* 96: 406–412.
- Julier, B., S. Flajoulot, P. Barre, G. Cardinet, S. Santoni, T. Huguet and C. Huyghe. 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biology* 19 p.
- Keivani M., S. Sanaz, H. Soltanloo, R. Choukan, M. Naghavi, and M. Ranjbar. 2010. Genetic diversity assessment of alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations using AFLP markers. *Australian J. of Crop Sci.* 47:491-497.

- Kidwell, K. K., L. M. Hartweck, B. S. Yandell, P. M. Crump, E. C. Brummer, J. Moutray and T. C. Osborn. 1999. Forage yields of alfalfa populations derived from parents selected on the basis of molecular marker diversity. *Crop Sci.* 39: 631-641.
- Li, X., and E. C. Brummer. 2012. Applied genetics and genomics in alfalfa breeding. *Agronomy* 2: 40-61.
- McCoy, T. J., E. T. Bingham. 1988. Cytology and cytogenetics of alfalfa. In: Hanson AA, Barnes DK, Hill RR (Eds) *Alfalfa and alfalfa improvement*. Madison, USA
- Maureira, I. J., F. Ortega, H. Campos and T. C. Osborn. 2004. Population structure and combining ability of diverse *Medicago sativa* germplasms. *Theor. Appl. Genet.* (109):775-782.
- Musial, J. M., K. E. Basford, and J. A. G. Irwin. 2002. Analysis of genetic diversity within Australian Lucerne cultivars and implications for future genetic improvement. *Aust J of Agri Res* 53: 629-636.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Sambrook J., and D. Russel. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Tercera Edición. New York : Cold Spring. Harbour, cop.
- Segovia-Lerma, A., R. G. Cantrell, J. M. Conway, and I. M. Ray. 2003. AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasms using bulk DNA templates. *Genome* 46:51-58.
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP) 2011. Anuario estadístico de producción agropecuaria. <http://www.siap.gob.mx/>
- Thome, J., D., O. González, S. Bebbe, and M. C. Duque. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sci.* 36: 1375-1384.

- Touil, L., F. Guesmi, K. Fares, C. Zagrouba, and A. Ferchichi. 2008. Genetic diversity of some Mediterranean populations of the cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) using SSR markers. *Pak J of Biol Sci* 11:1923-1928.
- Tucak, M., S. Popovi, T. Upi, S. Grlju, S. Bolari, and V. Kozumplik. 2008. Genetic diversity of alfalfa (*Medicago* spp.) estimated by molecular markers and morphological characters. *Periodicum Biologorum* 110: 243–249
- Vandemark, G. J., T. J. Hughes, and R. C. Larsen. 2005. Genetic similarities between alfalfa cultivars based on sequence related amplified polymorphism (SRAP) DNA markers. *Plant & Animal Genomes XIII Conference* (January 15–19), San Diego, CA.
- Vandemark, G., J., J. J. Ariss, G. A. Bauchan, R. C. Larsen and T. J. Hughes. 2006. Estimating genetic relationships among historical sources of alfalfa germplasm and selected cultivars with sequence related amplified polymorphisms. *Euphytica*. 152:9-16.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Zabeau, M., P. Vos. 1993. Selective restriction fragment amplification a general method for DNA fingerprinting, European.

CAPITULO IV. CONCLUSION GENERAL

4.1. CONCLUSION

El diseño genético de familia de medios hermanos identificó claramente las variaciones genotípicas de componentes de rendimiento y calidad nutritiva, con lo cual se podrían establecer esquemas de selección más apropiados para el mejoramiento genético de alfalfa, ya que no sólo depende de la carga genética de cada población, sino también de la complementariedad génica que ocurre entre alelos presentes entre y dentro de poblaciones.

Con el apoyo de AFLPs se pudieron diferenciar e identificar progenitores genéticamente divergentes asumiendo un mayor número de alelos contrastantes y con mayor heterocigosidad, evitando de esta manera la selección de progenitores con base a los mismos alelos homólogos y obtener un menor número de alelos contrastantes y recesivos, es decir, mayor heterocigosidad, y por ende mayor interacción alélica complementaria con el apoyo de AFLPs, ya que la habilidad de las subespecies tetraploides de *Medicago sativa* para presentar un mayor rendimiento, persistencia, resistencia a plagas y enfermedades, está en un mayor porcentaje de plantas tri y tetra-alelicas dentro de la población, o en su habilidad para hibridar y recombinar alelos contrastantes asociados a caracteres de importancia agronómica y zootécnica.

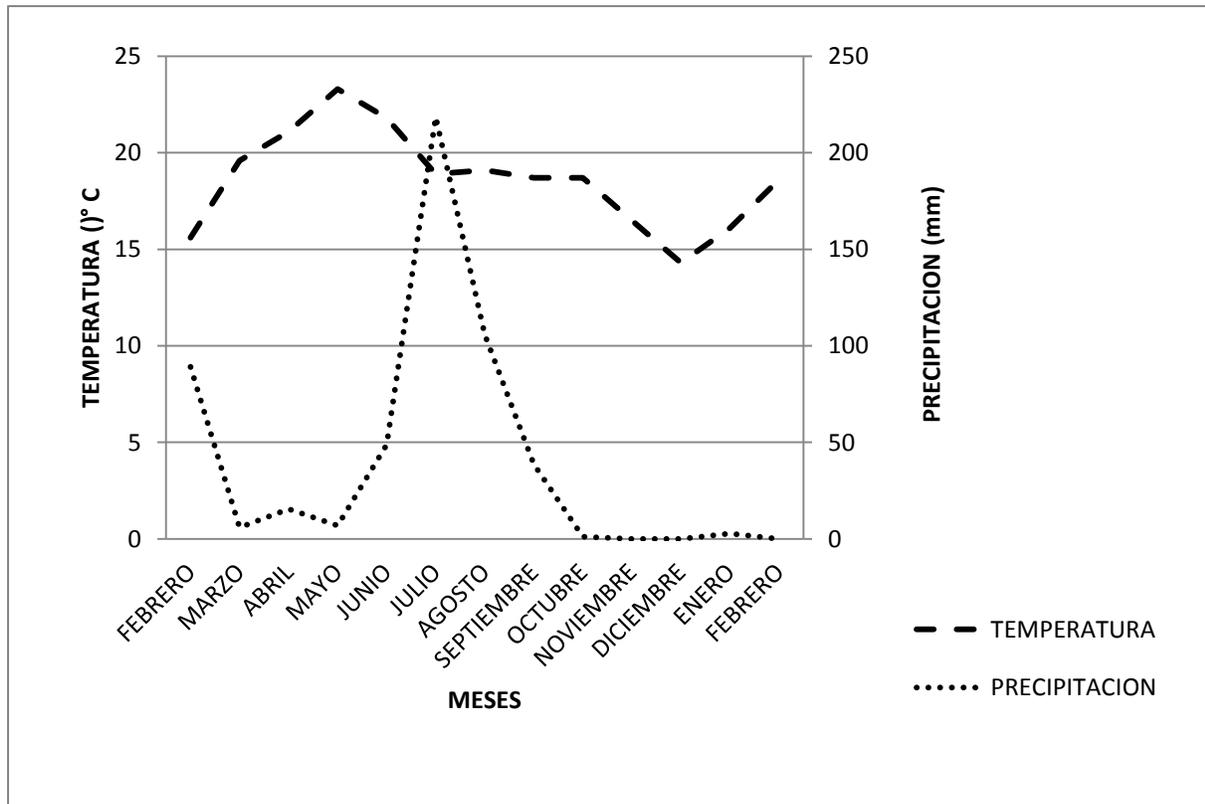
4.2. SUGERENCIAS

Se sugiere identificar los genes implicados y determinar su localización en el genoma (QTL) ya que la identificación de estos loci proporciona información de cuantos genes están relacionados a un carácter cuantitativo y si todos contribuyen de la misma manera o algunos genes influyen más que otros dentro de la variación fenotípica del carácter. Por lo que el uso de marcadores moleculares y el mapeo revela si los QTL asociados a un carácter están agrupados en un único

cromosoma o dispersos por todo el genoma, de esta manera se podría predecir la descendencia del cruzamiento entre dos parentales seleccionados por su genotipo, variabilidad y distancia genética, y se posibilitaría la predicción de la zona cromosómica donde buscar variabilidad. Con esto se abren nuevas perspectivas posibilitando la localización de caracteres cuantitativos entre los que se encuentra la mayoría de los caracteres de interés para el mejorador y que permitirán la selección indirecta. De esta manera se buscara la forma de caracterizar y localizar genes, como los de resistencia a enfermedades, rendimiento, morfología y calidad, principalmente. Todo esto con el objetivo principal de incrementar la producción, persistencia, calidad nutricional y resistencia a enfermedades de la alfalfa, e indirectamente mejorar los costos de alimentación animal.

5. ANEXOS

Anexo 1. Régimen promedio de temperatura (- - -) y precipitación (....) durante el periodo experimental (febrero, 2010 a febrero, 2011), según datos de la estación metrológica de la Universidad Autónoma Chapingo.



Anexo 2. Distribución de campo de 10 familias de medios hermanos de 8 variedades de alfalfa (*Medicago sativa*), Chapingo, México.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| | 1 m | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| REPETICION 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 60 mts |
| | 52 | 78 | 12 | 64 | 24 | 15 | 23 | 8 | 17 | 1 | 41 | 66 | 21 | 35 | 40 | 63 | 3 | 34 | 5 | 58 | |
| | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | |
| | 27 | 77 | 18 | 51 | 62 | 54 | 59 | 45 | 44 | 68 | 30 | 71 | 26 | 47 | 14 | 6 | 55 | 25 | 67 | 43 | |
| | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | |
| | 13 | 7 | 20 | 80 | 9 | 39 | 65 | 19 | 29 | 22 | 33 | 4 | 79 | 10 | 74 | 73 | 53 | 75 | 50 | 38 | |
| | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | |
| | 76 | 36 | 37 | 49 | 69 | 16 | 42 | 2 | 28 | 70 | 56 | 46 | 11 | 57 | 31 | 32 | 61 | 48 | 72 | 60 | |
| | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | |
| | 62 | 60 | 58 | 75 | 7 | 28 | 6 | 3 | 67 | 64 | 35 | 14 | 11 | 77 | 48 | 53 | 12 | 29 | 36 | 19 | |
| | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | |
| | 39 | 59 | 78 | 33 | 54 | 55 | 32 | 69 | 66 | 13 | 50 | 68 | 57 | 5 | 18 | 42 | 8 | 26 | 80 | 25 | |
| 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | | |
| 73 | 51 | 23 | 9 | 34 | 1 | 37 | 47 | 40 | 56 | 17 | 44 | 74 | 63 | 70 | 46 | 4 | 43 | 65 | 72 | | |
| 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | | |
| 31 | 27 | 22 | 10 | 41 | 2 | 30 | 76 | 24 | 15 | 38 | 21 | 52 | 16 | 79 | 49 | 71 | 20 | 61 | 45 | | |
| 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | | |
| 80 | 34 | 2 | 77 | 24 | 43 | 8 | 60 | 33 | 79 | 42 | 74 | 51 | 31 | 71 | 54 | 64 | 19 | 48 | 41 | | |
| 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | | |
| 75 | 59 | 20 | 39 | 30 | 52 | 37 | 11 | 63 | 25 | 70 | 21 | 13 | 58 | 26 | 12 | 56 | 44 | 18 | 10 | | |
| 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | | |
| 15 | 72 | 57 | 62 | 35 | 55 | 28 | 16 | 9 | 38 | 47 | 4 | 7 | 27 | 78 | 73 | 46 | 49 | 5 | 29 | | |
| 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | | |
| 68 | 69 | 14 | 3 | 23 | 53 | 67 | 61 | 17 | 22 | 40 | 76 | 32 | 36 | 66 | 45 | 50 | 1 | 6 | 65 | | |
| | 36 mts | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

NOTA: Cada parcela es representada como un cuadro donde viene la descripción del número de parcela (superior) y la familia de medios hermanos por población (inferior).

Anexo 3. Distribución de campo de 10 familias de medios hermanos de 8 variedades de alfalfa (*Medicago sativa*), Acolman, México.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|--|
| | | 1 m | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| REP I | 4m | 1 12 | 2 61 | 3 69 | 4 75 | 5 4 | 6 29 | 7 56 | 8 79 | 9 50 | 10 67 | 11 10 | 12 47 | 13 43 | 14 5 | 15 49 | 16 72 | 17 26 | 18 64 | 19 57 | 20 18 | 50 mts | |
| | | 21 15 | 22 2 | 23 71 | 24 36 | 25 33 | 26 46 | 27 39 | 28 42 | 29 11 | 30 37 | 31 30 | 32 60 | 33 53 | 34 70 | 35 6 | 36 55 | 37 16 | 38 7 | 39 76 | 40 19 | | |
| | | 41 13 | 42 41 | 43 52 | 44 58 | 45 31 | 46 17 | 47 38 | 48 78 | 49 9 | 50 25 | 51 1 | 52 51 | 53 8 | 54 45 | 55 35 | 56 80 | 57 63 | 58 32 | 59 14 | 60 59 | | |
| | | 61 54 | 62 24 | 63 28 | 64 22 | 65 27 | 66 40 | 67 77 | 68 80 | 69 66 | 70 74 | 71 62 | 72 65 | 73 68 | 74 3 | 75 21 | 76 34 | 77 23 | 78 20 | 79 48 | 80 73 | | |
| REP II | | 81 33 | 82 74 | 83 63 | 84 13 | 85 6 | 86 12 | 87 16 | 88 47 | 89 4 | 90 23 | 91 79 | 92 40 | 93 70 | 94 62 | 95 25 | 96 39 | 97 28 | 98 80 | 99 64 | 100 41 | | |
| | | 101 10 | 102 22 | 103 1 | 104 4 | 105 14 | 106 75 | 107 78 | 108 46 | 109 20 | 110 55 | 111 2 | 112 66 | 113 76 | 114 32 | 115 9 | 116 11 | 117 57 | 118 69 | 119 60 | 120 21 | | |
| | | 121 36 | 122 53 | 123 79 | 124 3 | 125 24 | 126 48 | 127 49 | 128 50 | 129 31 | 130 59 | 131 52 | 132 29 | 133 58 | 134 58 | 135 34 | 136 71 | 137 8 | 138 77 | 139 18 | 140 19 | | |
| | | 141 68 | 142 54 | 143 37 | 144 51 | 145 73 | 146 5 | 147 38 | 148 26 | 149 7 | 150 56 | 151 30 | 152 65 | 153 45 | 154 35 | 155 61 | 156 67 | 157 72 | 158 27 | 159 17 | 160 15 | | |
| REP III | | 161 49 | 162 19 | 163 56 | 164 22 | 165 2 | 166 14 | 167 21 | 168 27 | 169 74 | 170 62 | 171 69 | 172 53 | 173 17 | 174 73 | 175 61 | 176 66 | 177 20 | 178 78 | 179 76 | 180 63 | | |
| | | 181 54 | 182 18 | 183 71 | 184 65 | 185 50 | 186 32 | 187 55 | 188 67 | 189 58 | 190 4 | 191 47 | 192 60 | 193 1 | 194 15 | 195 80 | 196 6 | 197 75 | 198 72 | 199 68 | 200 70 | | |
| | | 36 mts | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

NOTA: Cada parcela es representada como un cuadro donde viene la descripción del número de parcela (superior) y la familia de medios hermanos por población (inferior).

Anexo 4. Datos del software QUANT⁺ para la predicción de las muestras para Proteína Cruda, Fibra Detergente Neutro y Fibra Detergente Acida.

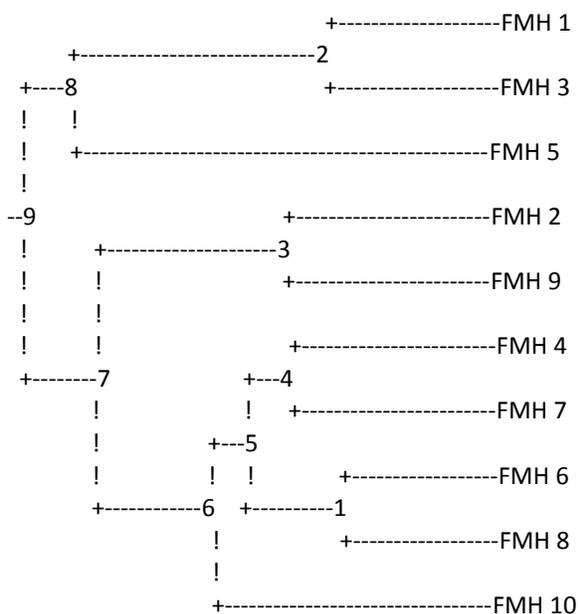
| | <u>Localidad: Chapingo</u> | | | <u>Localidad; Acolman</u> | | |
|-----------------------------------|----------------------------|---------|---------|---------------------------|---------|---------|
| | corte 1 | corte 2 | corte 3 | corte 1 | corte 2 | corte 3 |
| Proteina Cruda | | | | | | |
| Std Error of Prediction: Estimate | 0.2537 | 0.3057 | 0.3728 | 0.331 | 0.1927 | 0.04453 |
| Multiple Correlation | 0.9928 | 0.9944 | 0.9893 | 0.9955 | 0.997 | 0.9999 |
| Mean Property Value | 27.4 | 22.47 | 27.65 | 27.24 | 22.51 | 27.65 |
| % Variance (R squared) | 98.5636 | 98.886 | 97.8649 | 99.1016 | 99.4076 | 99.9786 |
| Std Error of Estimate (SEE) | 0.2117 | 0.282 | 0.3084 | 0.269 | 0.1546 | 0.03567 |
| F-valué | 156.3 | 202.2 | 117.9 | 215.1 | 327.2 | 5479 |
| Fibra Detergente Neutro | | | | | | |
| Std Error of Prediction: Estimate | 0.189 | 0.1032 | 0.1369 | 0.1162 | 1.321 | 0.1391 |
| Multiple Correlation | 0.9998 | 0.9999 | 0.9997 | 0.9998 | 0.9891 | 0.9993 |
| Mean Property Value | 37.15 | 45.64 | 33.25 | 36.15 | 37.27 | 19.73 |
| % Variance (R squared) | 99.9555 | 99.973 | 99.9482 | 99.9602 | 97.8298 | 99.8692 |
| Std Error of Estimate (SEE) | 0.1435 | 0.06488 | 0.09128 | 0.1026 | 1.165 | 0.1031 |
| F-valué | 3054 | 4381 | 2264 | 2268 | 61.31 | 1038 |
| Fibra Detergente Acido | | | | | | |
| Std Error of Prediction: Estimate | 0.1391 | 0.08891 | 0.6424 | 0.06111 | 0.2694 | 0.2346 |
| Multiple Correlation | 0.9993 | 0.9999 | 0.9795 | 0.9997 | 0.9963 | 0.9973 |
| Mean Property Value | 19.73 | 26.64 | 17.44 | 17.39 | 21.14 | 21.14 |
| % Variance (R squared) | 99.8692 | 99.9706 | 95.9333 | 99.9466 | 99.2597 | 99.47 |
| Std Error of Estimate (SEE) | 0.1031 | 0.06756 | 0.5479 | 0.04708 | 0.2422 | 0.2315 |
| F-valué | 1038 | 4952 | 50.13 | 2440 | 225.5 | 181.4 |

Anexo 5. Matriz de similitud y disimilitud genética de las 10 Familias de Medios Hermanos de la variedad Atlixco.

| Pop ID | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | **** | 0.8442 | 0.9092 | 0.7733 | 0.7866 | 0.7721 | 0.7832 | 0.7408 | 0.7639 | 0.7710 |
| 2 | 0.1694 | **** | 0.7552 | 0.7860 | 0.7791 | 0.8456 | 0.8354 | 0.8148 | 0.8939 | 0.8761 |
| 3 | 0.0952 | 0.2808 | **** | 0.8125 | 0.8008 | 0.7600 | 0.7780 | 0.7695 | 0.7009 | 0.7567 |
| 4 | 0.2571 | 0.2408 | 0.2076 | **** | 0.8686 | 0.8862 | 0.8920 | 0.8614 | 0.7537 | 0.8322 |
| 5 | 0.2401 | 0.2497 | 0.2221 | 0.1408 | **** | 0.7790 | 0.8327 | 0.7540 | 0.7428 | 0.7879 |
| 6 | 0.2586 | 0.1677 | 0.2744 | 0.1208 | 0.2498 | **** | 0.8914 | 0.9185 | 0.8001 | 0.8687 |
| 7 | 0.2444 | 0.1798 | 0.2511 | 0.1143 | 0.1831 | 0.1149 | **** | 0.8624 | 0.7612 | 0.8582 |
| 8 | 0.3000 | 0.2048 | 0.2620 | 0.1491 | 0.2823 | 0.0850 | 0.1481 | **** | 0.7900 | 0.8757 |
| 9 | 0.2694 | 0.1122 | 0.3554 | 0.2827 | 0.2973 | 0.2231 | 0.2729 | 0.2357 | **** | 0.8355 |
| 010 | 0.2600 | 0.1323 | 0.2788 | 0.1836 | 0.2384 | 0.1407 | 0.1529 | 0.1328 | 0.1797 | **** |

Valores por arriba de la diagonal indican similitud genética y valores por debajo de esta indican disimilitud genética (Nei, 1978).

Anexo 6. Dendograma de 10 Familias de Medios Hermanos de *Medicago sativa L.* variedad Atlixco.

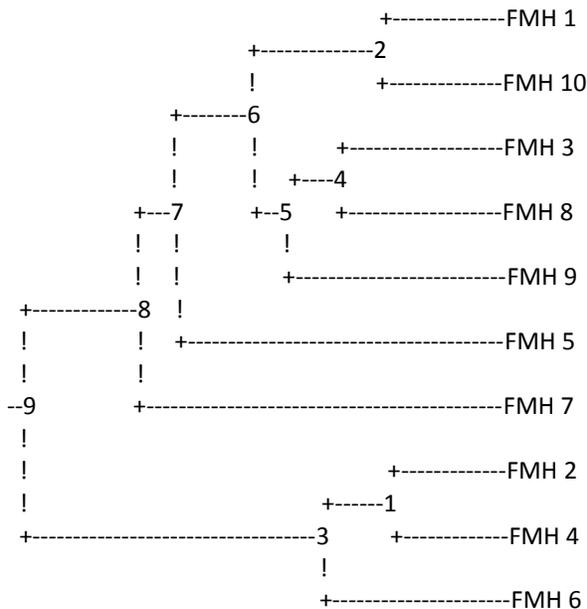


Anexo 7. Matriz de similitud y disimilitud genética de las 10 Familias de Medios Hermanos de la variedad INIA-76.

| Pop ID | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | **** | 0.5428 | 0.8033 | 0.6544 | 0.7841 | 0.5971 | 0.7910 | 0.8256 | 0.7933 | 0.9065 |
| 2 | 0.6109 | **** | 0.7552 | 0.9086 | 0.6354 | 0.8804 | 0.5923 | 0.7475 | 0.7320 | 0.5725 |
| 3 | 0.2190 | 0.2807 | **** | 0.8047 | 0.7301 | 0.7693 | 0.7129 | 0.8614 | 0.8230 | 0.8104 |
| 4 | 0.4241 | 0.0959 | 0.2172 | **** | 0.7468 | 0.8594 | 0.7118 | 0.7434 | 0.7510 | 0.6840 |
| 5 | 0.2432 | 0.4536 | 0.3146 | 0.2920 | **** | 0.5943 | 0.7227 | 0.7680 | 0.7692 | 0.8021 |
| 6 | 0.5156 | 0.1273 | 0.2623 | 0.1515 | 0.5205 | **** | 0.6674 | 0.7155 | 0.7848 | 0.6460 |
| 7 | 0.2345 | 0.5237 | 0.3384 | 0.3400 | 0.3248 | 0.4044 | **** | 0.7376 | 0.7264 | 0.8110 |
| 8 | 0.1917 | 0.2911 | 0.1493 | 0.2966 | 0.2639 | 0.3347 | 0.3044 | **** | 0.8487 | 0.8459 |
| 9 | 0.2315 | 0.3119 | 0.1949 | 0.2864 | 0.2624 | 0.2424 | 0.3197 | 0.1640 | **** | 0.8454 |
| 10 | 0.0982 | 0.5578 | 0.2103 | 0.3797 | 0.2205 | 0.4370 | 0.2095 | 0.1673 | 0.1679 | **** |

Valores por arriba de la diagonal indican similitud genética y valores por debajo de esta indican disimilitud genética (Nei, 1978).

Anexo 8. Dendograma de 10 Familias de Medios Hermanos de *Medicago sativa L.* variedad INIA-76.

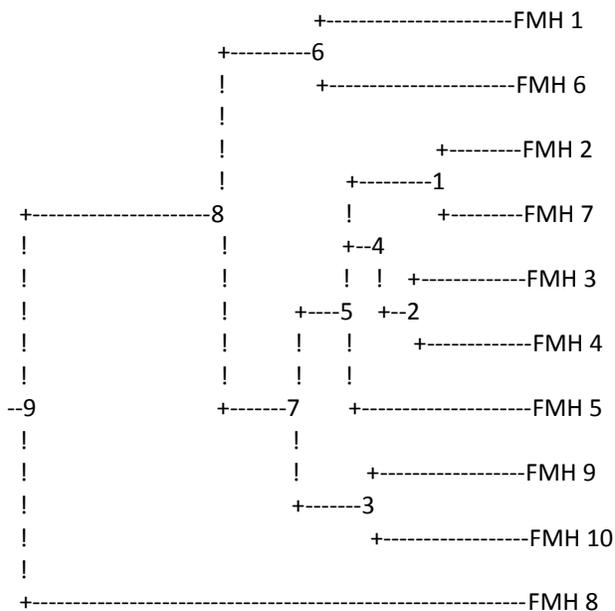


Anexo 9. Matriz de similitud y disimilitud genética de las 10 Familias de Medios Hermanos de la variedad Julia.

| Pop ID | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | **** | 0.7692 | 0.7903 | 0.7668 | 0.7741 | 0.8432 | 0.7736 | 0.8410 | 0.7838 | 0.7144 |
| 2 | 0.2624 | **** | 0.8730 | 0.8654 | 0.8772 | 0.7771 | 0.9283 | 0.6168 | 0.8587 | 0.7868 |
| 3 | 0.2353 | 0.1359 | **** | 0.8729 | 0.8628 | 0.7648 | 0.8548 | 0.6400 | 0.8500 | 0.8104 |
| 4 | 0.2655 | 0.1445 | 0.1359 | **** | 0.8259 | 0.8021 | 0.8591 | 0.6297 | 0.8620 | 0.8703 |
| 5 | 0.2560 | 0.1311 | 0.1476 | 0.1913 | **** | 0.8087 | 0.8418 | 0.6841 | 0.7943 | 0.7555 |
| 6 | 0.1706 | 0.2522 | 0.2681 | 0.2206 | 0.2123 | **** | 0.7826 | 0.6878 | 0.7792 | 0.7760 |
| 7 | 0.2567 | 0.0744 | 0.1568 | 0.1519 | 0.1722 | 0.2452 | **** | 0.6156 | 0.8620 | 0.7798 |
| 8 | 0.1732 | 0.4832 | 0.4463 | 0.4624 | 0.3797 | 0.3742 | 0.4852 | **** | 0.6536 | 0.5688 |
| 9 | 0.2437 | 0.1523 | 0.1625 | 0.1484 | 0.2303 | 0.2495 | 0.1485 | 0.4252 | **** | 0.8724 |
| 10 | 0.3363 | 0.2398 | 0.2102 | 0.1389 | 0.2804 | 0.2536 | 0.2487 | 0.5642 | 0.1366 | **** |

Valores por arriba de la diagonal indican similitud genética y valores por debajo de esta indican disimilitud genética (Nei, 1978).

Anexo 10. Dendograma de 10 Familias de Medios Hermanos de *Medicago sativa* L. variedad Julia.

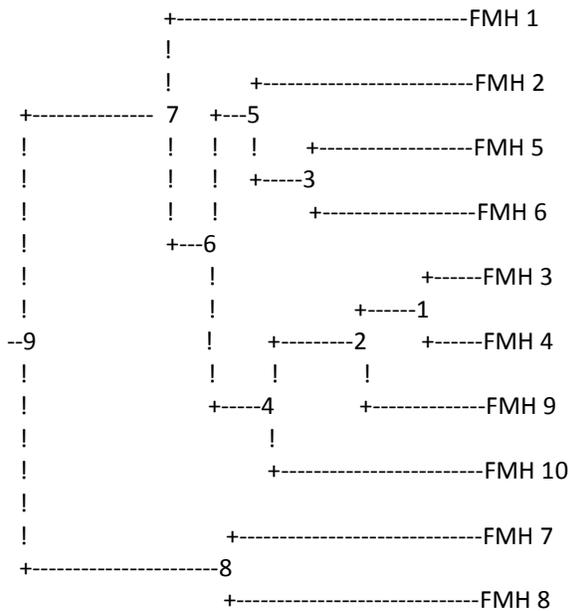


Anexo 11. Matriz de similitud y disimilitud genética de las 10 Familias de Medios Hermanos de la variedad Júpiter.

| Pop ID | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | **** | 0.8092 | 0.7919 | 0.7918 | 0.8201 | 0.7735 | 0.7850 | 0.6586 | 0.7868 | 0.8015 |
| 2 | 0.2117 | **** | 0.8568 | 0.8498 | 0.8760 | 0.8120 | 0.7379 | 0.4512 | 0.8183 | 0.8341 |
| 3 | 0.2333 | 0.1546 | **** | 0.9544 | 0.8475 | 0.7869 | 0.7771 | 0.5583 | 0.9118 | 0.8569 |
| 4 | 0.2334 | 0.1628 | 0.0466 | **** | 0.8386 | 0.7700 | 0.7800 | 0.5645 | 0.9124 | 0.8653 |
| 5 | 0.1983 | 0.1324 | 0.1655 | 0.1760 | **** | 0.8775 | 0.8192 | 0.5356 | 0.7940 | 0.8429 |
| 6 | 0.2568 | 0.2083 | 0.2397 | 0.2613 | 0.1307 | **** | 0.8265 | 0.6342 | 0.8107 | 0.7821 |
| 7 | 0.2420 | 0.3039 | 0.2522 | 0.2484 | 0.1994 | 0.1905 | **** | 0.7958 | 0.7709 | 0.7781 |
| 8 | 0.4176 | 0.7957 | 0.5829 | 0.5718 | 0.6243 | 0.4555 | 0.2284 | **** | 0.6107 | 0.6213 |
| 9 | 0.2398 | 0.2005 | 0.0923 | 0.0917 | 0.2306 | 0.2098 | 0.2602 | 0.4932 | **** | 0.8307 |
| 10 | 0.2213 | 0.1814 | 0.1544 | 0.1446 | 0.1709 | 0.2458 | 0.2509 | 0.4759 | 0.1855 | **** |

Valores por arriba de la diagonal indican similitud genética y valores por debajo de esta indican disimilitud genética (Nei, 1978).

Anexo 12. Dendograma de 10 Familias de Medios Hermanos de *Medicago sativa L.* variedad Júpiter.

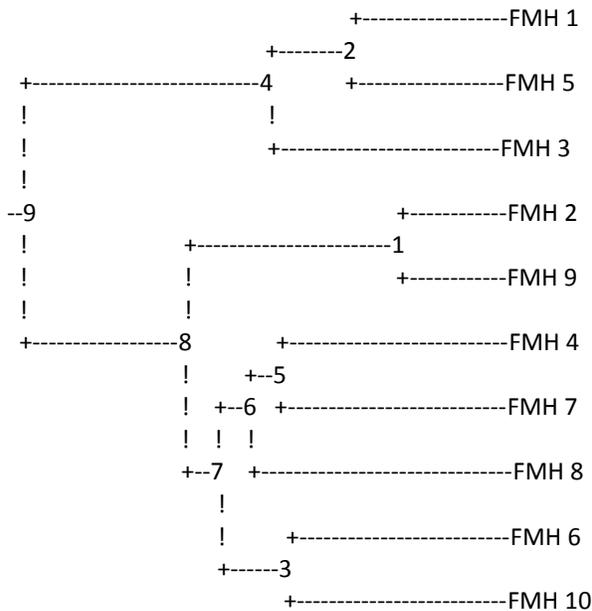


Anexo 13. Matriz de similitud y disimilitud genética de las 10 Familias de Medios Hermanos de la variedad Mácate.

| Pop ID | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | **** | 0.6137 | 0.8610 | 0.6523 | 0.9148 | 0.7250 | 0.7549 | 0.6567 | 0.6373 | 0.8112 |
| 2 | 0.4883 | **** | 0.7199 | 0.8734 | 0.7828 | 0.8047 | 0.8304 | 0.8578 | 0.9457 | 0.8349 |
| 3 | 0.1497 | 0.3286 | **** | 0.8043 | 0.8900 | 0.8102 | 0.8374 | 0.7509 | 0.7258 | 0.8427 |
| 4 | 0.4272 | 0.1353 | 0.2177 | **** | 0.7972 | 0.8274 | 0.8639 | 0.8605 | 0.8490 | 0.8485 |
| 5 | 0.0890 | 0.2449 | 0.1165 | 0.2267 | **** | 0.8481 | 0.8516 | 0.7629 | 0.7758 | 0.8580 |
| 6 | 0.3216 | 0.2173 | 0.2104 | 0.1894 | 0.1648 | **** | 0.8525 | 0.8374 | 0.8254 | 0.8787 |
| 7 | 0.2812 | 0.1859 | 0.1774 | 0.1463 | 0.1606 | 0.1596 | **** | 0.8478 | 0.8036 | 0.8681 |
| 8 | 0.4205 | 0.1534 | 0.2865 | 0.1502 | 0.2706 | 0.1775 | 0.1652 | **** | 0.8478 | 0.8607 |
| 9 | 0.4505 | 0.0559 | 0.3204 | 0.1637 | 0.2538 | 0.1919 | 0.2187 | 0.1651 | **** | 0.8290 |
| 10 | 0.2092 | 0.1804 | 0.1711 | 0.1642 | 0.1532 | 0.1293 | 0.1415 | 0.1500 | 0.1875 | **** |

Valores por arriba de la diagonal indican similitud genética y valores por debajo de esta indican disimilitud genética (Nei, 1978).

Anexo 14. Dendograma de 10 Familias de Medios Hermanos de *Medicago sativa* L. variedad Mácate.

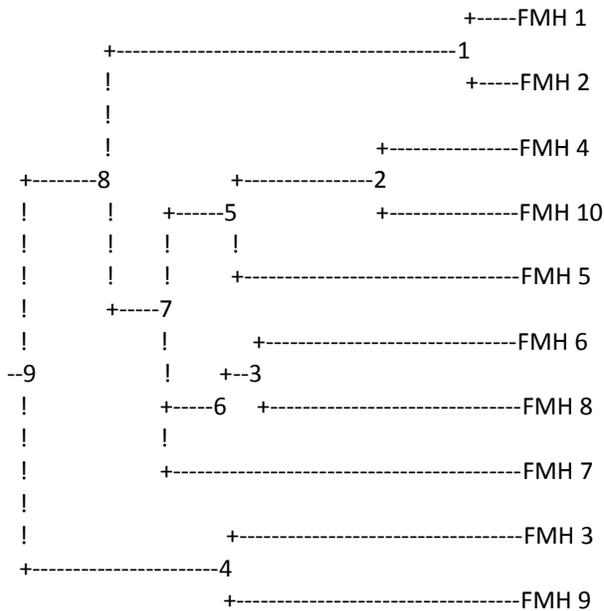


Anexo 15. Matriz de similitud y disimilitud genética de las 10 Familias de Medios Hermanos de la variedad Mediterránea.

| Pop ID | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | **** | 0.9846 | 0.7717 | 0.8665 | 0.8234 | 0.7912 | 0.8083 | 0.7928 | 0.7547 | 0.8567 |
| 2 | 0.0155 | **** | 0.7680 | 0.8261 | 0.8306 | 0.8148 | 0.8145 | 0.8102 | 0.7390 | 0.8511 |
| 3 | 0.2592 | 0.2640 | **** | 0.8063 | 0.8441 | 0.8100 | 0.8015 | 0.8000 | 0.8755 | 0.8386 |
| 4 | 0.1433 | 0.1910 | 0.2153 | **** | 0.8494 | 0.8247 | 0.8199 | 0.8355 | 0.7891 | 0.9309 |
| 5 | 0.1944 | 0.1857 | 0.1695 | 0.1632 | **** | 0.8648 | 0.8460 | 0.8142 | 0.8124 | 0.8880 |
| 6 | 0.2342 | 0.2049 | 0.2107 | 0.1928 | 0.1453 | **** | 0.8702 | 0.8760 | 0.7683 | 0.8747 |
| 7 | 0.2128 | 0.2052 | 0.2212 | 0.1985 | 0.1672 | 0.1391 | **** | 0.8647 | 0.7870 | 0.8518 |
| 8 | 0.2322 | 0.2105 | 0.2232 | 0.1797 | 0.2055 | 0.1323 | 0.1453 | **** | 0.7765 | 0.8703 |
| 9 | 0.2815 | 0.3025 | 0.1329 | 0.2369 | 0.2078 | 0.2636 | 0.2396 | 0.2529 | **** | 0.8338 |
| 10 | 0.1546 | 0.1613 | 0.1760 | 0.0716 | 0.1188 | 0.1339 | 0.1604 | 0.1389 | 0.1818 | **** |

Valores por arriba de la diagonal indican similitud genética y valores por debajo de esta indican disimilitud genética (Nei, 1978).

Anexo 16. Dendograma de 10 Familias de Medios Hermanos de *Medicago sativa* L. variedad Mediterránea.

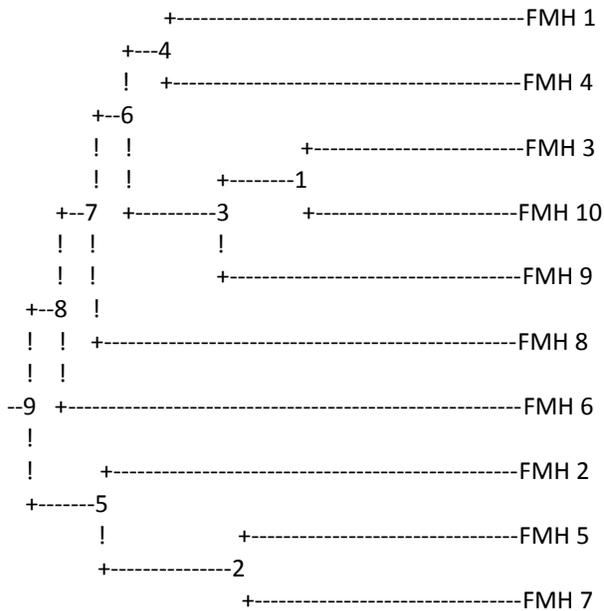


Anexo 17. Matriz de similitud y disimilitud genética de las 10 Familias de Medios Hermanos de la variedad Rustique.

| Pop ID | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | **** | 0.7772 | 0.8551 | 0.8427 | 0.8392 | 0.8172 | 0.8378 | 0.7903 | 0.7995 | 0.8435 |
| 2 | 0.2520 | **** | 0.8317 | 0.7821 | 0.8300 | 0.7593 | 0.8397 | 0.8245 | 0.8035 | 0.7836 |
| 3 | 0.1565 | 0.1843 | **** | 0.8290 | 0.8480 | 0.8238 | 0.8281 | 0.8663 | 0.8405 | 0.8973 |
| 4 | 0.1711 | 0.2457 | 0.1876 | **** | 0.7984 | 0.7997 | 0.8317 | 0.8305 | 0.8152 | 0.8340 |
| 5 | 0.1753 | 0.1864 | 0.1649 | 0.2251 | **** | 0.8225 | 0.8891 | 0.7922 | 0.7821 | 0.8455 |
| 6 | 0.2019 | 0.2754 | 0.1938 | 0.2235 | 0.1954 | **** | 0.8154 | 0.7986 | 0.8019 | 0.8528 |
| 7 | 0.1770 | 0.1747 | 0.1886 | 0.1843 | 0.1176 | 0.2041 | **** | 0.8161 | 0.7793 | 0.7914 |
| 8 | 0.2353 | 0.1930 | 0.1435 | 0.1857 | 0.2329 | 0.2249 | 0.2032 | **** | 0.8222 | 0.7923 |
| 9 | 0.2238 | 0.2188 | 0.1738 | 0.2044 | 0.2458 | 0.2208 | 0.2494 | 0.1957 | **** | 0.8903 |
| 10 | 0.1702 | 0.2438 | 0.1084 | 0.1815 | 0.1678 | 0.1592 | 0.2340 | 0.2329 | 0.1163 | **** |

Valores por arriba de la diagonal indican similitud genética y valores por debajo de esta indican disimilitud genética (Nei, 1978).

Anexo 18. Dendograma de 10 Familias de Medios Hermanos de *Medicago sativa L.* variedad Rustique.



Anexo 19. Matriz de similitud y disimilitud genética de las 10 Familias de Medios Hermanos de la variedad Tanverde.

| Pop ID | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | **** | 0.6945 | 0.8051 | 0.8468 | 0.6954 | 0.5147 | 0.5954 | 0.9581 | 0.8374 | 0.5185 |
| 2 | 0.3645 | **** | 0.7953 | 0.8401 | 0.7988 | 0.7895 | 0.8094 | 0.7918 | 0.7902 | 0.8187 |
| 3 | 0.2167 | 0.2291 | **** | 0.8519 | 0.8569 | 0.7704 | 0.7875 | 0.8540 | 0.8748 | 0.7539 |
| 4 | 0.1663 | 0.1742 | 0.1603 | **** | 0.8088 | 0.7534 | 0.8104 | 0.8424 | 0.8876 | 0.7659 |
| 5 | 0.3633 | 0.2247 | 0.1544 | 0.2122 | **** | 0.8072 | 0.8179 | 0.7764 | 0.8008 | 0.8250 |
| 6 | 0.6643 | 0.2364 | 0.2608 | 0.2831 | 0.2142 | **** | 0.8945 | 0.6573 | 0.7121 | 0.8862 |
| 7 | 0.5185 | 0.2115 | 0.2389 | 0.2103 | 0.2011 | 0.1115 | **** | 0.7019 | 0.7849 | 0.8573 |
| 8 | 0.0428 | 0.2334 | 0.1578 | 0.1715 | 0.2531 | 0.4196 | 0.3540 | **** | 0.8667 | 0.6433 |
| 9 | 0.1775 | 0.2355 | 0.1337 | 0.1192 | 0.2222 | 0.3396 | 0.2422 | 0.1431 | **** | 0.7201 |
| 10 | 0.6569 | 0.2000 | 0.2825 | 0.2667 | 0.1923 | 0.1208 | 0.1540 | 0.4411 | 0.3284 | **** |

Valores por arriba de la diagonal indican similitud genética y valores por debajo de esta indican disimilitud genética (Nei, 1978).

Anexo 20. Dendrograma de 10 Familias de Medios Hermanos de *Medicago sativa* L. variedad Tanverde.

