ITEA (2001), Vol. 97V N.° 1, 60-72

SELECCIÓN DE ALFALFA "TIERRA DE CAMPOS" PARA PASTOREO Y PARA SIEGA INCORPORANDO IDENTIFICACIÓN MEDIANTE HOMOCIGOSIS PARA UN *LOCUS* ISOENZIMÁTICO

M.R. Morales*, S.A. Cordero, M.C. Crespo****

* Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales, Universidad de Salamanca, Avda. Filiberto Villalobos, 119, 37007, Salamanca, España. e-mail: reme@gugu.usal.es

** Servicio de Investigación, Desarrollo y Tecnología Agraria (SIDTA), Junta de Castilla-León, Apdo. oficial, 37007, Salamanca, España

RESUMEN

Durante cuatro años se ha llevado a cabo un proceso de selección de alfalfa, ecotipo "Tierra de Campos", seleccionando por un lado plantas con aptitud para ser aprovechadas mediante siega y por otro plantas con aptitud para ser aprovechadas mediante pastoreo. De las plantas seleccionadas se hizo una nueva selección buscando las homocigóticas para distintos alelos del *locus Pgi-2*. Estos grupos homocigóticos pueden ser utilizados como plantas madre para la obtención de futuras variedades sintéticas y llevarían incorporado una forma de identificación que las diferenciaría del resto de las variedades comerciales existentes que serían polimórficas para este enzima. Con este tipo de selección evitamos que se planteen problemas de identificación de una nueva variedad. Mediante el análisis de algunos de los caracteres fisiológicos y morfológicos más relevantes de alfalfa hemos comprobado que este tipo de homogeneización no afecta negativamente a las características básicas de la alfalfa.

Palabras clave: Caracterización, Homocigosis, *Locus* isoenzimático.

SUMMARY

SELECTION OF ALFALFA "TIERRA DE CAMPOS" FOR GRAZING AND FOR HARVESTING INCORPORATING IDENTIFICATION THROUGH HOMOZYGOSIS FOR AN ISOZYMATIC *LOCUS*

For four years a process for the improvement of alfalfa of the "Tierra de Campos" ecotype was carried out, selecting on the one hand plants suitable for harvesting and on the other hand plants suitable for grazing. A new selection was then made of the plants selected, seeking the homozygotic ones for different alleles of the *locus Pgi-2*. These homozygotic groups can be used as mother plants for obtaining future synthetic varieties and would incorporate a kind of identification that would differentiate them from the other extant commercial varieties which would be polymorphic for this isozyme. With this type of selection we avoid problems in the identification of a new variety. Analysis of the more relevant physiological and morphological characteristics of alfalfa confirmed that this type of homogenization does not have a negative effect on cultivation.

Key words: Charecterization, Homozygotic, Isozymatic *locus*.

Introducción

La alfalfa es una especie que cuenta con una amplia diversidad de variedades comerciales y ecotipos, procedentes la mayor parte de híbridos de *M. sativa* y *M. falcata* (LESINS, 1970), caracterizados por ser un material vegetal de alta variabilidad causada principalmente por su naturaleza tetraploide y tipo de fecundación alógama. (QUIRÓS y BAUCHAN, 1988). En España existe una gran riqueza en cuanto a tipos de alfalfas cultivadas y además contamos con ecotipos desarrollados en distintas zonas de nuestra geografía, con una adaptación idónea a los medios en que se han originado (DEL POZO, 1983). A pesar de ello, cada vez se introducen más cultivares extranjeros que aunque sean de adaptación inferior, compiten con los nuestros por la gran difusión de sus casas comerciales.

La comercialización de algunos de los tipos más importantes de semillas de alfalfa (caso del ecotipo "Tierra de Campos") se ve amenazada por la alta contaminación con otros tipos mejor establecidos en el mercado. Hoy día, la industria de comercialización y producción de semilla demanda una mayor claridad y facilidad en la identificación de alfalfas que se cultivan. Ante la amplia gama de variedades comerciales, se plantea la necesidad de buscar un método de caracterización de los recursos vegetales que garantice al agricultor el uso de un material concreto (ESQUINAS, 1993). La actual caracterización oficial de variedades cultivadas se lleva a cabo mediante el estudio de características morfológicas, agronómicas y fisiológicas. Con este tipo de análisis no se encuentran diferencias claras entre las distintas variedades, lo cual provoca que se planteen, de forma frecuente, dudas en la identificación de éstas. Los problemas surgen como consecuencia de la gran variabilidad intravarietal y de la gran influencia que sobre este tipo de caracteres tienen las condiciones del medio. El estudio de este tipo de caracteres tiene también el inconveniente de necesitar para su evaluación un mínimo de tres años (BEN CHAABANE, 1990).

El ecotipo "Tierra de Campos" se cultiva en secano, con aprovechamiento mixto: siega, pastoreo y semilla. Se caracteriza por su resistencia al frío y a la sequía y por su larga duración en el terreno (HIDALGO y MARTÍNEZ, 1985). CORDERO y CRESPO (1995) llevaron a cabo un trabajo de caracterización analizando caracteres morfológicos, fisiológicos y agronómicos sobre 97 poblaciones de alfalfas de "Tierra de Campos" encontrando gran variabilidad entre las distintas muestras y gran variabilidad dentro de cada muestra. Tras este trabajo los autores concluyeron que los caracteres agromorfológicos eran poco precisos en su uso como diferenciadores de variedades de alfalfas.

Se hace necesario encontrar un método que permita determinar de forma rápida y clara el tipo de alfalfa que se comercializa, para lo cual es preciso recurrir a estudios genéticos que posibiliten la obtención de un tipo de marcadores de las distintas variedades. La electroforesis de isoenzimas es propuesta por ARÚS *et al.* (1982) como método para determinar la pureza de lotes de semillas. Se han realizado trabajos de caracterización de algunas variedades de alfalfa con RAPDs (BRUMMER *et al.*, 1995), RFLPs (KIDWELL *et al.*, 1994) y con isoenzimas (BRUNEL, 1982; QUIRÓS, 1983; MORALES *et al.*, 1996). Estos estudios no llegan a diferenciar las variedades cercanas genéticamente por lo que siempre será difícil distinguir una nueva variedad sintética de la variedad de partida.

Ante la problemática actual, en este trabajo se propone que puede ser de gran interés cuando se desarrolle un programa de selec-

ción y obtención de una variedad sintética en especies alógamas (en el que se parte de un número limitado de plantas parentales), usar plantas isoenzimáticamente uniformes como plantas madre (DOUGLAS, 1983). La utilización de este material de partida, permitiría diferenciar perfectamente a la nueva variedad obtenida incluso de las más cercanas genéticamente. Sin embargo, es necesario comprobar que una selección varietal que incorpora una expresión homogénea para un isoenzima no hace variar características agronómicas y de calidad del cultivo.

MORALES *et al.* (1997), en su análisis del *locus Pgi-2* encuentran 5 alelos distintos que pueden dar lugar a 70 genotipos diferentes en alfalfa (figura 1). Con el fin de diferenciar futuras variedades de alfalfa "Tierra de Campos", en este estudio hemos realizado una selección de líneas de mejora para siega y para pastoreo buscando al mismo tiempo individuos homocigóticos para los alelos a', a b y d de este *locus* polimórfico.

Los objetivos que se plantean con el trabajo son:

1. Iniciar un plan de selección del ecotipo "Tierra de Campos" utilizando tres líneas seleccionadas para aprovechamiento mediante siega y tres líneas para aprovechamiento mediante pastoreo.

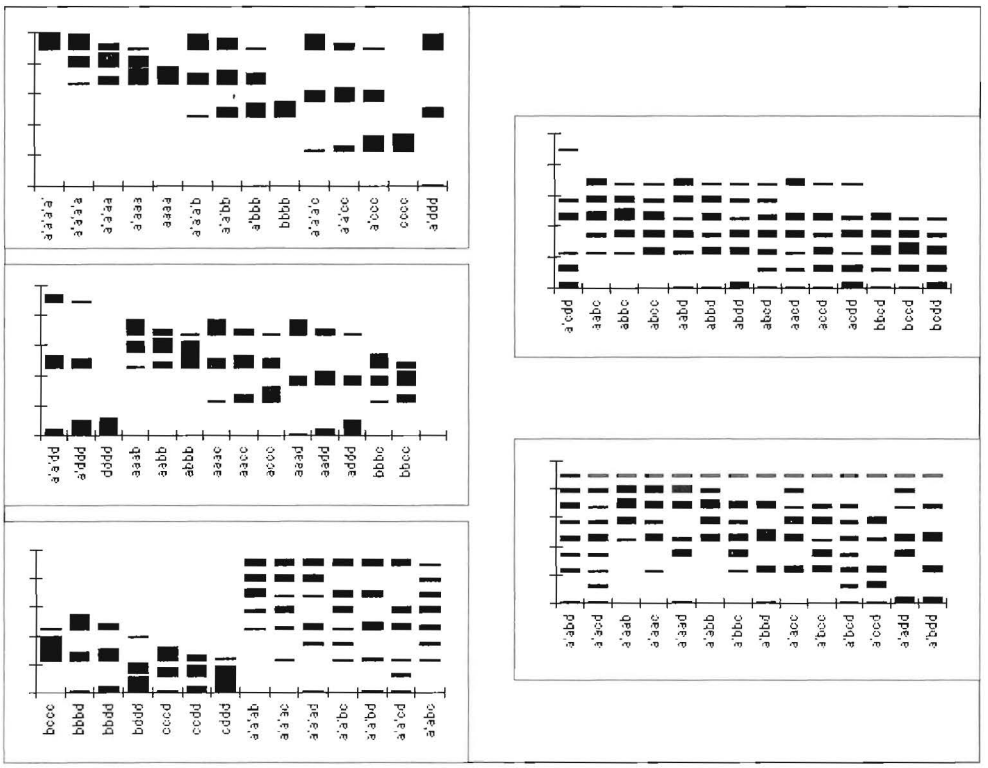


Figura 1. Genotipos para *Pgi-2* que pueden aparecer en alfalfas tetraploides.
Figure 1. Genotypes for Pgi-2 that can appear in tetraploid alfalfas.

2. Buscar grupos de plantas uniformes para un el *locus Pgi-2* que puedan ser utilizadas como plantas madre en el plan de obtención de una futura variedad comercial, lo cual permitirá diferenciar perfectamente a la nueva variedad.

3. Comprobar que una selección varietal que incorpora un expresión homogénea para un *locus* isoenzimático no varía los principales parámetros de caracterización del ecotipos "Tierra de Campos".

Material y métodos

Procedencia del material vegetal

En el proceso de mejora se partió de seis líneas del ecotipo "Tierra de Campos" seleccionadas tras el trabajo de caracterización realizado por CORDERO y CRESPO (1995) que resultaron más productivas, de rebrote más homogéneo, de mayor relación hoja/tallo y menos dañadas por el hielo. En esta selección se hicieron dos grupos distintos según el criterio de porte; las más erectas: líneas 63 (Villerías de Campos), 80 (Villanueva de Campos) y 92 (Gatón de Campos) como más adecuadas para aprovechamiento en siega y las que presentaron un mayor porcentaje de plantas semierectas: líneas 3 (Revellinos), 6 (Villafrechos) y 24 (Vega de Ruiponce) para aprovechamiento mediante pastoreo.

Formación de grupos de plantas homocigóticas para el *locus Pgi-2*

En el año 1991 se sembraron en terrenos del S.I.D.T.A. de Salamanca 6 filas de 120 plantas cada una, separadas un metro, correspondientes a estas 6 selecciones del ecotipo de "Tierra de Campos". Por otro lado, este mismo año, se sembraron en secano, en este mismo lugar, dos parcelas de 3000 m^2 cada una. Una de ellas con una mezcla de semillas de las 3 líneas seleccionadas para siega, fue sometida a este aprovechamiento durante 4 años y la otra con mezcla de semilla de las 3 líneas seleccionadas para pastoreo, fue sometida a pastoreo continuo durante 4 años con una carga de 26 ovejas. Las ovejas fueron recogidas durante los fines de semana y su alimentación se suplementó con heno de alfalfa.

En la primavera de 1995 se seleccionaron 100 plantas de cada una de estas parcelas, atendiendo en el caso de siega, a su porte erecto, alta relación hoja/tallo, y planta sana. En el caso de pastoreo, el número de plantas que quedaban en la parcela se había reducido considerablemente y de las plantas que habían soportado este aprovechamiento se seleccionaron 100 que presentaron porte bajo, alta relación hoja/tallo y planta sana.

Con las 100 plantas seleccionadas de cada grupo se hicieron esquejes para conservarlas en macetas y se analizaron mediante electroforesis en gel de almidón para determinar su genotipo respecto al *locus Pgi-2*. La técnica llevada a cabo para ello es la recogida por SOLTIS y SOLTIS (1990). De aquellas que presentaron genotipos homocigóticos para los alelos de este *locus* se hicieron nuevos esquejes (3 de cada planta).

En el año 1995 se determinaron también los genotipos respecto al *locus Pgi-2* de las 120 plantas de las 6 líneas de "Tierra de Campos" sembradas individualmente en líneas, realizándose a finales del verano de este mismo año nuevos esquejes de las plantas que presentaron genotipos homocigóticos (3 de cada una de ellas).

De estos análisis (920 plantas) se obtuvieron directamente: 9 plantas de genotipo aaaa,

13 de genotipo bbbb y 3 de genotipo dddd. A través de cruzamientos dirigidos con plantas seleccionadas de las parcelas de pastoreo y de siega (con genotipos heterocigóticos en los que se repetía dos o tres veces el mismo alelo) obtuvimos nuevas plantas homocigóticas para estos 3 alelos y plantas con genotipo a'a'a'a', que no habíamos encontrado directamente en los campos. No llegamos a obtener el genotipo cccc, ni plantas con genotipo a'a'a'a' procedentes de selección para pastoreo. Estos dos alelos aparecen en las alfalfas "Tierra de Campos" con una frecuencia muy reducida (MORALES *et al.*, 1997) por lo que no ha sido posible encontrar directamente homocigóticos en la población analizada.

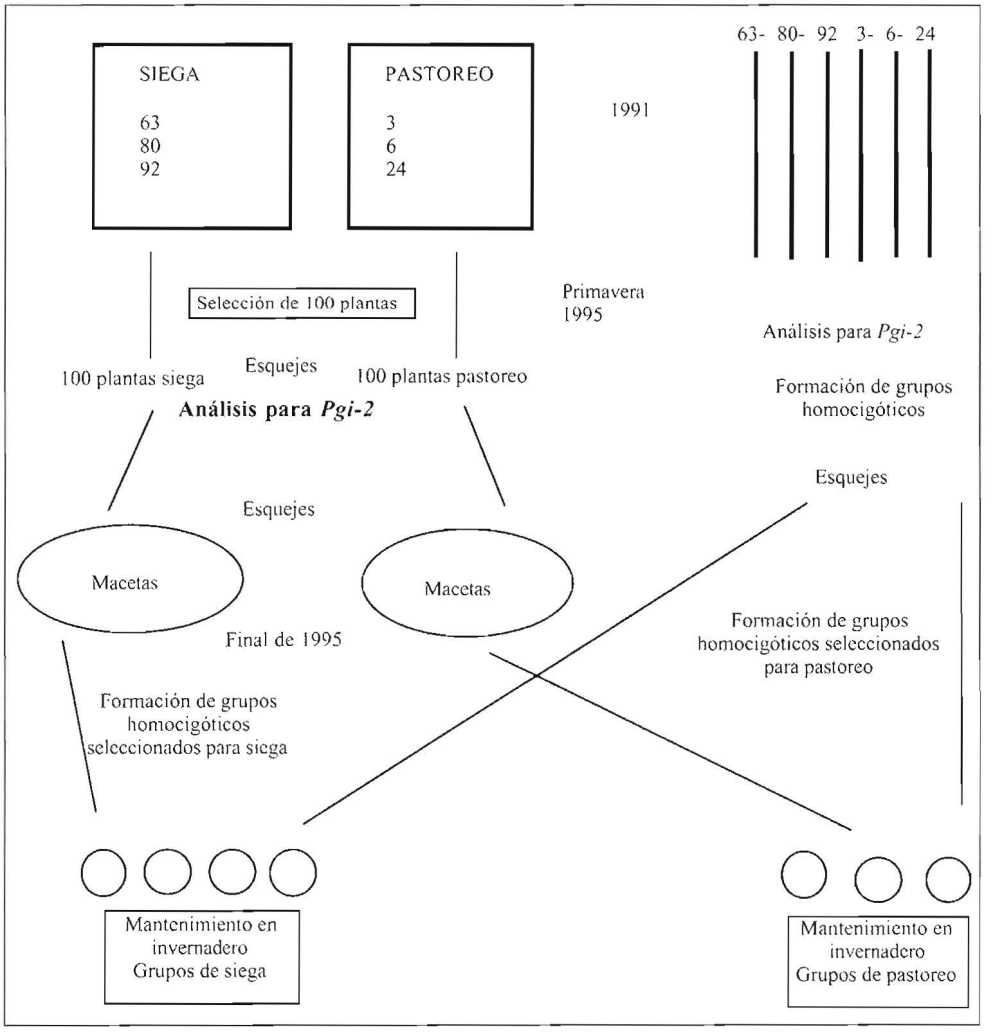


Figura 2. Esquema del proceso de selección llevado a cabo en las 6 líneas de "Tierra de Campos".
Figure 2. Flow diagram of the selection process carried out on the 6 lines of "Tierra de Campos".

Para evaluar si la homocigosis para este *locus* podía afectar a caracteres agronómicos, morfológicos y fisológicos determinantes en el cultivo de alfalfa se establecieron, al inicio de 1996, en el S.I.D.T.A. de Salamanca 7 miniparcelas trasplantando 15 plantas homocigóticas de cada grupo, manteniendo entre cada planta 1 m de distancia y 2 m entre grupos. Los grupos establecidos fueron: dddd siega, dddd pastoreo, bbbb siega, bbbb pastoreo, aaaa siega, aaaa pastoreo y a'a'a'a' siega.

Análisis de caracteres agromorfológicos de los grupos de plantas homocigóticos para el *locus Pgi-2*

Los caracteres analizados fueron los siguientes:

• Peso de 1000 semillas. Se valoró mediante el peso de 200 semillas procedentes de vainas maduras.

• Color de las semillas. Se evaluó mediante contraste de una escala de colores realizada previamente con semillas de alfalfa (violeta, marrón, castaño, ámbar y verde).

• Días a floración. Se contaron los días transcurridos a partir del 1 de mayo hasta el momento de la aparición de la primera flor.

• Color de las flores. Se estimó el porcentaje de flores blancas, variegadas, azul claro y azul oscuro.

• Porte de las plantas. Se valoró el porcentaje de plantas erectas, semierectas y rastreras.

• Longitud del tallo principal. Se midió en el momento de aparición de la primera flor.

• Número de entrenudos del tallo principal.

• Longitud y anchura de las hojas. Se tomaron los datos en el foliolo central de la 3.ª hoja bajo la inflorescencia del tallo principal.

• Velocidad del rebrote. Se midió como la altura adquirida 12 días después del corte que fue realizado el día 15 de abril de 1997.

• Vigor del rebrote. Se tomó al final del invierno (marzo de 1997), considerando la densidad de brotes en la corona y estimación de la masa foliar de los brotes. Escala 1-10.

• Relación hoja/tallo. Varía según el momento en que se encuentre la planta (CARLSON *et al.*, 1970) ya que las hojas son más abundantes en la fase vegetativa y van disminuyendo según se progresa en la fase reproductiva. Se valoró el 12 de mayo de 1997, antes de la formación del botón floral, tomando muestras de 3 ramas de cada planta, separando por un lado hoja y por otro tallo. Se obtuvo peso de materia seca de hoja y de tallo mediante secado en estufa con circulación de aire a 60 °C durante 48 horas.

• Contenido en proteína (PB = N x 6,25. Método Kjendahl). El 18 de mayo de 1997, antes de la formación de los botones florales, se recogieron muestras de 2 ramas por planta. Se secaron a 60 °C durante 48 horas y se molieron, tomando 0,3 g de cada muestra sobre la cual se determinó el contenido en nitrógeno por este método.

Análisis de datos

Mediante el programa Statgraphic-Plus hemos estudiado los caracteres cuantitativos para cada grupo, calculando medias y desviaciones típicas. Se ha determinado mediante un análisis ANOVA, si existían diferencias entre los grupos homocigóticos formados, tratando de estudiar si la agrupación por homocigosis para distintos alelos del *locus Pgi-2* tiene influencia en el carácter analizado. Para cada uno de los caracteres cualitativos se calcularon frecuencias relativas y se

realizó una comparación de éstas entre los distintos grupos mediante el análisis de χ^2.

Resultados y discusión

Los valores medios y desviaciones estándar de los caracteres analizados en los grupos de 15 plantas homocigóticas para distintos alelos del *locus Pgi-2*, procedentes de la selección para siega y para pastoreo, quedan reflejados en los cuadros 1 y 2.

En los 10 parámetros cualitativos analizados sólo aparecen diferencias significativas entre los distintos grupos de plantas homocigóticas para peso de 1.000 semillas y Longitud del tallo principal. Todos los

Cuadro 1. Valores medios y desviaciones estándar (σ) de algunos parámetros medidos sobre alfalfas procedentes de selección para siega homocigóticas para distintos alelos del *locus Pgi-2*

Table 1. Mean values and standar deviations (σ) of some parameters measured on alfalfas from the selection for harvesting and homozygotic for different alleles of Pgi-2 locus

Carácter observado	a'a'a'a' siega		aaaa siega		bbbb siega		dddd siega	
	Media	σ	Media	σ	Media	σ	Media	σ
Peso de 1.000 semillas (g.)	2,49	0,37	2,41	0,08	2,33	0,28	2,51	0,33
Color de las semillas								
% castaño	0		50		25		16	
% verde	66		0		9		9	
% marrón	0		0		0		0	
% ámbar	34		50		66		75	
Días a floración desde el 1-V	35,25	2,19	35,5	0,71	34,33	2,53	36,41	2,71
Color de las flores								
% blancas	0		0		0		0	
% variegadas	0		0		0		0	
% azul claro	0		50		17		83	
% azul oscuro	100		50		83		17	
Porte de las plantas								
% erectas	50		0		83,3		83,3	
% semierectas	50		100		16,7		16,7	
% rastreras	0		0		0		0	
Longitud del tallo principal (cm)	68,12	2,53	74	4,24	76,5	13,67	68,66	11,8
N.º de entrenudos del tallo principal	13,62	1,18	15,5	4,94	15,17	2,29	15,41	1,97
Longitud del foliolo (mm)	24,25	6,32	27,5	3,53	26,33	5,38	28,00	5,48
Anchura del foliolo (mm)	12,00	1,93	12,50	0,71	12,33	3,36	12,00	2,17
Velocidad del rebrote (tras el 1.er corte)	15	5,34	14,5	0,71	16,36	2,94	12,5	6,46
Vigor del rebrote	6,62	0,52	6,75	0,35	5,36	1,28	6	1,54
Relación hoja/tallo (g. m.s./g. m.s.)	0,55	0,21	0,71	0,28	0,79	0,2	0,60	0,11
Contenido en proteína (% m.s. parte aérea)	21,25	2,33	21,70	1,06	23,75	2,94	20,22	1,3

valores obtenidos en el estudio de los distintos caracteres, están dentro de las cifras obtenidas por CORDERO y CRESPO (1995) en el trabajo de caracterización del ecotipo "Tierra de Campos".

El test de Duncan para el peso de 1.000 semillas nos indica los grupos entre los que aparecen diferencias:

dddd-pastoreo	aaaa-pastoreo	bbbb-pastoreo
2,132	2,172	2,185
x	x	x

bbbb-siega	aaaa-siega
2,327	2,410
xy	xy

a'a'a'a'-siega	dddd-siega
2,491	2,515
y	y

Se obtienen dos grupos homogéneos (grupo x, grupo y) dentro de los que no existen diferencias significativas. Puesto que nos encontramos en ambos grupos plantas del mismo alelo parece que esta característica no es influyente en el peso de la semilla, siendo más determinante el tipo de aprovechamiento.

Para la longitud del tallo principal aparecen tres grupos (grupo x; grupo y; grupo z) dentro de los que no existen diferencias significativas:

dddd-pastoreo	a aaa-pastoreo	bbbb-pastoreo
53,36	66,27	66,58
x	y	y

a'a'a'a'siega	dddd-siega
68,12	68,66
yz	yz

aaaa-siega	bbbb-siega
74,0	76,5
yz	z

Ya que aparecen en distintos grupos plantas del mismo alelo (alelo a), consideramos que como en el caso anterior, las diferencias se deben a la selección por tipo de aprovechamiento, teniendo en cuenta que las plantas procedentes de pastoreo muestran valores menores que las de siega. El conjunto de las 75 líneas de "Tierra de Campos" estudiadas por CORDERO y CRESPO (1995), presentaron una longitud del tallo principal de 62,7 cm., valor que se ha mejorado en los grupos de siega (cuadro 2).

La fecha de floración es un carácter estrechamente ligado a las condiciones climáticas de cada año (Guy *et al.*, 1971). En general, las alfalfas de "Tierra de Campos" se comportan como semiprecoces, siendo ésta la tendencia seguida por nuestros grupos.

Los grupos de pastoreo son de rebrote algo más lento que los de siega. Este ecotipo muestra un crecimiento del rebrote algo más lento que las alfalfas de tipo Aragón y de tipo Flamenco, aunque algunas alfalfas de los grupos de siega se acercan a velocidades de rebrote de 15 cm de altura , a los 12 días después del primer corte.

La relación hoja/tallo es un parámetro muy importante en la mejora de alfalfa. El ecotipo "Tierra de Campos" presenta valores altos comparados con alfalfas tipo Aragón (media: 0,59) o tipo Flamencas (media: 0,55). Puesto que en la selección de plantas que se ha llevado a cabo hemos tenido en cuenta este carácter, cuatro de nuestros grupos presentan una media superior a la del ecotipo (media: 0,64). La relación hoja/tallo está relacionada con el contenido proteico, debido a que la hoja muestra valores más altos que el tallo. LUNA (1996), obtiene valores de proteína bruta en hojas del 29,6% y en tallos del 14,0% en el momento del corte al inicio de la floración, señalando, que al disminuir la relación hoja/tallo conforme avanza el ciclo productivo, descienden también los valores

Cuadro 2. Valores medios y desviaciones estándar (σ) de algunos parámetros medidos sobre alfalfas procedentes de selección para pastoreo homocigóticas para distintos alelos del *locus Pgi-2*

Table 2. Mean values and standar deviations (σ) of some parameters measured on alfalfas from the selection for grazing and homozygotic for different alleles of Pgi-2 locus

Carácter observado	aaaa pastoreo		bbbb pastoreo		dddd pastoreo	
	Media	σ	Media	σ	Media	σ
Peso de 1.000 semillas (g.)	2,17	0,14	2,18	0,23	2,13	0,26
Color de las semillas						
% castaño	12		58		50	
% verde	0		25		10	
% marrón	0		8		20	
% ámbar	88		9		20	
Días a floración desde el 1-V	37,36	1,38	33,41	6,91	36,72	1,79
Color de las flores						
% blancas	0		0		0	
% variegadas	0		0		0	
% azul claro	27		83,3		9	
% azul oscuro	73		16,6		91	
Porte de las plantas						
% erectas	18,8		0		0	
% semierectas	63,64		25		60	
% rastreras	18,18		75		40	
Longitud del tallo principal (cm)	66,27	9,39	66,58	8,08	53,36	12,78
N.º de entrenudos del tallo principal	15,45	2,07	14,50	2,11	14,27	2,00
Longitud del foliolo (mm)	25,27	3,29	23,16	5,32	22,81	3,57
Anchura del foliolo (mm)	11,73	0,90	13,16	5,13	12,54	2,38
Velocidad del rebrote (tras el 1.er corte)	13,72	5,14	13,42	2,10	10,50	4,03
Vigor del rebrote	6,09	1,64	6,33	1,15	5,5	1,84
Relación hoja/tallo (g. m.s./g. m.s.)	0,80	0,09	0,77	0,23	0,60	0,11
Contenido en proteína (% m.s. parte aérea)	21,56	1,05	20,5	0,63	19,02	0,92

medios de proteína bruta en la parte aérea. Los valores medios de proteína bruta dados por ALIBÉS Y TISSERAND (1990) para alfalfa verde al 50% de la floración son del 18,7%. DEL POZO (1983) señala valores al inicio de la floración del 24% en hojas y del 10,7% en tallos. Las plantas obtenidas presentan valores del 19% al 23,7%, consideradas cifras medias para parte aérea en plantas de alfalfa poco antes del inicio de la floración.

Los colores de semillas predominantes en la mayor parte de los grupos son el castaño y el ámbar. Hay que tener en cuenta que el color de las semillas varía con su estado de madurez, comenzando con el verde y tornado a tonos ámbar o marrones conforme se avanza en el estado. Al haberse realizado la recolección el mismo día (1 de septiembre de 1996), el estado de madurez de las diversas plantas era desigual, lo que pudo provo-

Cuadro 3. Anova para distintos parámetros de caracterización de alfalfa tomados en los grupos seleccionados para siega o para pastoreo, homocigóticos para diferentes alelos del *locus Pgi-2*

Table 3. Anova for different alfalfa characterization parameters in the group of alfalfas from the selection for harvesting or for grazing, homozygotic for different alleles of the Pgi-2 locus

Carácter	Suma de cuadrados entre los grupos	Suma de cuadrados dentro de los grupos	Suma de cuadrados total	Df entre los grupos	Df dentro de los grupos	Df total	Media de cuadrados entre los grupos	Media de cuadrados dentro de los grupos	F	P
Peso de 1.000 semillas	1,42702	4,13529	5,5623	6	58	64	0,2378	0,0713	3,34	0,0068 **
Fecha de floración	133,537	769,227	894,765	6	61	67	22,2562	12,4791	1,78	0,1175
Longitud del tallo principal	3277,28	7018,19	10295,5	6	61	67	546,214	115,052	4,75	0,005 **
N.° de nudos del tallo principal	27,0149	266,867	293,882	6	61	67	4,50249	4,37488	1,03	0,4152
Longitud de la hoja	238,907	1534,15	1773,06	6	61	67	39,8179	25,15	1,58	0,1674
Anchura de la hoja	15,139	557,742	578,882	6	61	67	2,523	9,143	0,28	0,946
Altura del rebrote	212,447	1255,64	1468,12	6	59	65	35,4129	21,2821	1,66	0,1459
Vigor del rebrote	12,625	116,621	129,246	6	59	65	2,10417	1,97663	1,06	0,3941
Relación hoja/tallo	0,54322	1,91373	2,45695	6	44	50	0,09054	0,04344	2,08	0,0747
Contenido en proteína	38,8448	36,6348	75,4796	6	12	18	6,4741	3,0529	2,12	0,1262

car que aparecieran diferencias marcadas entre los distintos grupos establecidos y dentro de las muestras del mismo grupo. Por ello, consideramos que las diferencias encontradas en el color de las semillas se deben principalmente al estado de maduración en el momento de la recolección y no a causas genéticas.

A pesar de que en alfalfas de "Tierra de Campos" pueden aparecer flores blancas y variegadas, sólo hemos encontrado colores azul claro y azul oscuro. Se ha observado variabilidad entre los diferentes grupos y también dentro de las muestras del mismo grupo se detecta una alta heterogeneidad en cuanto a este carácter.

Como cabía esperar, los grupos de selección por siega han presentando plantas con fenotipo erecto y semierecto, mientras que los de selección por pastoreo presentan fenotipo semierecto y rastrero (cuadro 1). Aparecen diferencias significativas entre todos los grupos excepto para el grupo de selección por siega con genotipo bbbb con el grupo de selección por siega y genotipo dddd (cuadro 4).

Tras el análisis de estos resultados, consideramos que cuando se desarrolle un programa de selección y obtención de una variedad sintética en especies alógamas y poliploides partiendo de un número limitado de plantas parentales, puede ser de gran interés buscar grupos isoenzimáticamente uniformes para un *locus* polimórfico, lo cual permite diferenciar perfectamente a la nueva variedad obtenida incluso de las más cercanas genéticamente. No planteamos la homogeneización conjunta para más *loci* para no llegar a influir en la variabilidad genética, lo cual podría afectar a las características de adaptabilidad y rusticidad de este

Cuadro 4. Diferencias encontradas con el tests χ^2 para el porte de las plantas, en los grupos de alfalfas procedentes de selección por siega o por pastoreo homocigóticos para distintos alelos del *locus Pgi-2*

Table 4. Differences found with the χ^2 test for the stem aspect in groups of alfalfas from for harvesting or grazig, homozygotic for different alleles of the Pgi-2 locus

	a'a'a'a' siega	aaaa siega	bbbb siega	dddd siega	aaaa pastoreo	bbbb pastoreo	dddd pastoreo
a'a'a'a' siega	-						
aaaa siega	**	-					
bbbb siega	**	**	-				
dddd siega	**	**	N.S.	-			
aaaa pastoreo	**	**	**	**	-		
bbbb pastoreo	**	**	**	**	**	-	
dddd pastoreo	**	**	**	**	**	**	-

(**) Diferencias significativas para $p < 0,01$.

(*) Diferencias significativas para $p < 0,05$.

ecotipo (HILL y BAYLOR, 1983). Actualmente, debido a los problemas que tienen las variedades de alfalfa en su uso para pastoreo y puesto que la Política Agraria de la Unión Europea se centra en la ganadería extensiva, primando el pastoreo, pensamos que sería muy interesante para posteriores trabajos, conseguir una variedad sintética apta para pastoreo sometiendo a un nuevo programa de selección recurrente a uno de los grupos de plantas con aptitud para pastoreo homocigóticos para un alelo de *Pgi-2*.

Conclusiones

Se ha realizado un trabajo de selección del ecotipo de alfalfa "Tierra de Campos" para siega y para pastoreo seleccionando al mismo tiempo plantas homocigóticas para distintos alelos del *locus Pgi-2*, comprobándose que este tipo de agrupación no hace variar los parámetros más importantes definidores del ecotipo.

Se han obtenido 4 grupos de plantas homocigóticos para distintos alelos del *locus Pgi-2* seleccionados para siega y 3 grupos de plantas homocigóticos para distintos alelos del *locus Pgi-2* seleccionados para pastoreo. El mejor de cada uno de ellos podría ser utilizado como plantas madre para una variedad sintética del ecotipo "Tierra de Campos" con cualidades para siega o para pastoreo, que sería perfectamente diferenciable del resto de las variedades existentes.

Agradecimientos

Queremos agradecer al profesor Jesús Ortiz Marcide de la E.T.S.I.A de Madrid su asesoramiento y ayuda en este trabajo.

Bibliografía

ALIBES X., TISSERAND J.L., 1990. Tabloux de la valeur alimentaire pour les rumiants des fourrages et sous-produits d'origine mediterraneennes, Options Mediterraneennes, serie B, N.° 4, 89 páginas.

ARUS P., TANKSLEY S.D., ORTON T.J., JONES R.A., 1982. Electrophoresis variation as a tool for determining seed purity and for breeding hybrids varieties of *Brassica oleracea*, Euphytica, 31: 417-428

BEN CHAABANE A., 1990. Etude de la variabilité d'une collection de luzernes spontanees (*Medicago sativa* L.) dans le but de son amelioration genetique. Tesis Master of Science, C.I.H.E.A.M. Zaragoza.

BRUMMER E.C., BOUTON J.H., KOCHERT G., 1995. Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers, Genome, 38: 362-367.

BRUNEL D. 1982. Mise en evidence de 4 *locus* enzymatiques chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) di- et tétraploïde, Agronomie 2 (2): 133-148.

CARLSON G.E., HART R.H., HANSON G.H., PEARCE R.B., 1970. Overcoming barriers to higher forage yields through breeding for physiological characteristics, Proc. 11th. Int. Grass. Congr., Queensland (Australia), pp. 248-251.

CORDERO S.A., CRESPO M.C., 1995. Caracterización del ecotipo de alfalfa Tierra de Campos, Pastos 25.

DEL POZO M.,1983. La alfalfa. Su cultivo y aprovechamiento, Ed. Mundi Prensa. Madrid.

DOUGLAS C.B., 1983. Isozymic variation and plant breeders's rights. In: Isozymes in Plant genetics and Breeding, Part A., Ed.: S.D. Tanksley and T.J. Orton, Amsterdam, Elsevier, pp. 425-441.

ESQUINAS J.T., 1993. Plant Genetics Resources, En: Plant Breeding: Principles and Prospects. M.D. Hayward, N.O. Bosemark and I. Romagosa (Eds.). Zaragoza, pp. 33-51.

GUY P., BLONDON F., DURAND J., 1971. Action de la temperature et de la durée d'eclairement sur la croissance et la floration de deux types eloignes de luzerne cultivée, Ann. Amelior. Plant, 21: 409-422.

HIDALGO F., MARTÍNEZ A.,1985. La conservación genética de la alfalfa Tierra de Campos, XXV Reunión de la S.E.E.P., Tomo 2: 1-25.

HILL R.R., BAYLOR J.E., 1983. Genotype x environment interaction for yield in alfalfa, Crop Sci. 23: 811-815.

KIDWELL K.K., AUSTIN D.C., OSBORN T.C., 1994. RFLP Evaluation of nine *Medicago* accesions representing the original germoplasm sources for North America alfalfa cultivars, Crop Sci. 34: 230-236.

LESINS K., 1970. Alfalfa, Lucerne, *Medicago sativa* (Leguminosae- papilionaceae), pp. 165-68, In: Evolution of Crop Plants. (Ed.N.W. Simmonds). Longman Group. London.

LUNA L.,1996. Efecto de la altura y frecuencia de corte sobre la producción de forraje, la calidad y la movilización de reservas de la alfalfa cv. Aragón, Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.

MORALES M.R., CRESPO M.C., CORDERO S.A. 1997. El *locus Pgi-2* en la identificación de variedades tetraploides de *Medicago sativa* y de otras especies del mismo género, Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg., 12 (1, 2 y 3): 15-25.

MORALES M.R., CRESPO M.C., CORDERO S.A. 1996. Estudio isoenzimático en diferentes muestras de *Medicago sativa* tetraploide. Pastos XXVI (2): 197-213.

QUIRÓS, C.F., 1983. Perennial alfalfa and its closely related species, In: Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B, Ed: S.D. Tanksley and T.J. Orton., Amsterdam, Elsevier. pp. 253-294.

QUIROS C.F., BAUCHAN G.R., 1988. The *genus Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex, In: Alfalfa and alfalfa improvement, Hanson A. A., Barnes D.K., Hill R.R. (Eds), Madison, Wisconsin, USA, Agronomy series, 29, pp. 93-124.

SOLTIS D.G., SOLTIS P.S., 1990. Isozymes in Plant Biology, Chapman add Hall, 267 pp., London (England).

(Aceptado para publicación el 9 de marzo de 2001)