



"Enseñar la Explotación de la
Tierra No la del Hombre"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIO EN ZOOTECNIA
POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FILOGENÉTICA DE VARIEDADES MEJORADAS DE ALFALFA PARA VALLES ALTOS CENTRALES DE MÉXICO

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

BAÑOS GALINDO JESÚS EMMANUEL

Bajo la supervisión de: **BALDOMERO ALARCÓN ZÚÑIGA, Ph. D**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
ORIGINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Julio de 2016
Chapingo, Estado de México

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FILOGENÉTICA DE VARIEDADES
MEJORADAS DE ALFALFA PARA VALLES ALTOS CENTRALES DE
MÉXICO**

Tesis realizada por **JESÚS EMMANUEL BAÑOS GALINDO** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

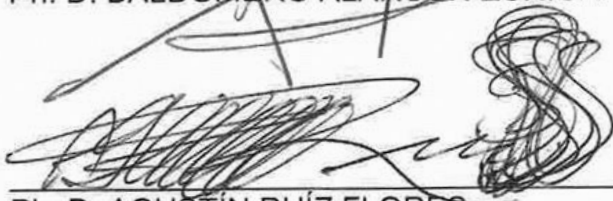
MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:



Ph. D. BALDOMERO ALARCÓN ZÚNIGA

ASESOR:



Ph. D. AGUSTÍN RUÍZ FLORES

ASESOR:



Ph. D. RODOLFO RAMÍREZ VALVERDE

ASESOR:



Ph. D. RAFAEL NÚÑEZ DOMÍNGUEZ

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
DEDICATORIAS.....	viii
AGRADECIMIENTOS.....	ix
DATOS BIOGRÁFICOS.....	x
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Objetivo general	2
1.1.1 Objetivos particulares.....	2
1.2. Hipótesis.....	3
1.3. Estructura de la tesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. <i>Medicago sativa</i> L.....	4
2.1.1. Morfología de la Alfalfa.....	4
2.1.2. Composición de la alfalfa.....	7
2.2. Importancia de la alfalfa <i>Medicago sativa</i> L.....	8
2.3. Proteómica.....	12
2.3.1 Proteínas presentes en alfalfa.....	13
2.4. Uso de marcadores SSRs en filogenética de alfalfa.....	14
2.5. Literatura citada.....	16
3. Caracterización morfológica y calidad nutritiva en 12 variedades de alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.).....	20
3.1. Resumen.....	20
3.2. Abstract.....	21
3.3. Introducción	22
3.4. Materiales y métodos.....	23
3.4.1. Ubicación y clima del área experimental.....	23

3.4.2.	Material genético y diseño experimental.....	26
3.4.3.	Variables de respuesta morfológica y bromatológicas.....	28
3.4.4.	Relaciones filogenéticas entre variedades y poblaciones recombinantes de familias de medios hermanos.....	28
3.4.5.	Análisis estadístico	29
3.5.	Resultados y discusión.....	30
3.5.1.	Composición morfológica y nutritiva.....	30
3.5.2.	Inflorescencia	35
3.5.3.	Rendimiento de Hoja.....	36
3.5.4.	Rendimiento de Tallo.....	37
3.5.5.	Rendimiento de la Parcela	38
3.5.6.	Componentes de calidad nutritiva.....	45
3.5.7.	Análisis filogenético.....	51
3.6.	Conclusiones	53
3.7.	Agradecimientos.....	54
3.8.	Literatura citada	55

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
1	Producción anual por estado de alfalfa verde en México, 2014.	11
2	Características y composición química del suelo de los dos sitios experimentales.	25
3	Descripción de genotipos de <i>Medicago sativa</i> L. utilizados.	27
4	Combinaciones de primer de AFLP utilizados en el experimento.	29
5	Modelos lineales utilizados para el análisis de las variables de respuesta.	30
6	Modelos lineales utilizados para cada una de las variables de respuesta analizadas. Los valores de “p” para cada componente se indican en su celda correspondiente.	33
7	Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g), fibra detergente neutro (FDN, %), fibra detergente ácido (FDA, %) y proteína cruda (PC, %) para las diferentes variedades cultivadas en Chapingo, Méx. y Mixquiahuala, Hgo.	34
8	Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g), para las diferentes variedades por localidad, Chapingo, Méx. y Mixquiahuala, Hgo.	40
9a	Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g) para las variedades cultivadas en Chapingo, Méx., en el primer y segundo corte.	41
9b	Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g) para	42

	las variedades cultivadas en Chapingo, Méx., en el tercer y cuarto corte.	
10a	Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g) para las variedades cultivadas en Mixquiahuala, Hgo., en el primer y segundo corte.	43
10b	Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g) para las variedades cultivadas en Mixquiahuala, Hgo., en el tercer y cuarto corte.	44
11	Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para fibra detergente neutro (FDN, %), fibra detergente ácido (FDA, %) y proteína cruda (PC, %) para las diferentes variedades cultivadas en Chapingo, Méx. y Mixquiahuala, Hgo.	47
12	Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para fibra detergente neutro (FDN, %), fibra detergente ácido (FDA, %) y proteína cruda (PC, %) para las variedades cultivadas en Chapingo, Méx. a través de los diferentes cortes.	48
13	Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para fibra detergente neutro (FDN, %), fibra detergente ácido (FDA, %) y proteína cruda (PC, %) para las variedades cultivadas en Mixquiahuala, Hgo. a través de los diferentes cortes.	49
14	Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) subclases de la triple interacción Localidad x Corte x Variedad para proteína cruda (PC, %) en Chapingo, Méx. y Mixquiahuala, Hgo.	50

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
1	Morfología de la planta de alfalfa (tallo, hoja compuesta y raíz).	6
2	Morfología de la planta de alfalfa (flor, vaina y semillas).	7
3	Promedio de peso de los diferentes componentes de la planta obtenidos para las variedades cultivadas en Chapingo, México.	32
4	Promedio de peso de los diferentes componentes de la planta obtenidos para las variedades cultivadas en Hidalgo.	32
5	Dendograma de 8 variedades de <i>Medicago sativa</i> L.	52

DEDICATORIAS

A mi mamá María Gloria Galindo Robles que siempre me alentó a seguir adelante, que superara mis miedos, a que no me rindiera bajo ninguna circunstancia para lograr hacer cosas importantes, y a trabajar duro. Que nunca perdió la confianza en mí, que me enseñaste el valor del trabajo y del conocimiento, te amo mamá.

A mi papá Jesús Baños Carpinteyro que me has ayudado en todo y que en el camino de la vida me has apoyado en cada una de mis decisiones, por mostrarme que investigar, leer y adquirir cada día un nuevo conocimiento es una de las cosas más hermosas de esta vida; por presionarme para que no me diera por vencido, te amo papá.

A mi hermana y mi cuñado que ha sido mi apoyo y respaldo porque me han alentado siempre y otras tantas formas, gracias por ser como son, los amo.

A ti que has estado conmigo en las buenas y en las malas que nunca me has dejado que cuando sentí caer sostuviste mi mano para que no desmayara, y que ahora vemos juntos esto hecho realidad, tú que siempre has estado conmigo.

Sinceramente a todas las personas que confiaron siempre en mí.

Jesús Emmanuel

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por concederme financiamiento para cursar mis estudios de Maestría en Ciencias.

A la Universidad Autónoma Chapingo que me dio la oportunidad de ser orgullosamente parte de ella, pues me brindó la oportunidad de experimentar valiosas experiencias en lo académico y en lo personal que son fundamentales en mi vida.

A Dios por iluminar mi camino y llegar a este punto satisfactorio de mi vida.

Al Ph.D. Baldomero Alarcón Zúñiga por su ayuda, confianza, disposición, compromiso y por su inmensa sabiduría que hizo posible este gran proyecto.

A mi comité asesor Ph.D. Agustín Ruíz Flores, Ph.D. Rodolfo Ramírez Valverde y Ph.D. Rafael Núñez Domínguez por su orientación soporte y enseñanzas que contribuyeron a esta tesis.

Al Ph.D. Maximino Huerta Bravo por el apoyo brindado durante la maestría y el término de ella.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Jesús Emmanuel Baños Galindo

Fecha de nacimiento: 17 de enero de 1990

Lugar de nacimiento: Texcoco, Estado de México

CURP: BAGJ900117HMCXLS08

Profesión: Ingeniero en Biotecnología

Cédula profesional: 08737166



Desarrollo académico

2014-2015	Maestro en Ciencias en Innovación Ganadera. Posgrado en Producción Animal. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
2010-2011	Ingeniero en Biotecnología División de Biotecnología. Universidad Tecnológica de Tecámac. Tecámac, Estado de México.
2007-2009	Técnico Superior Universitario en Biotecnología. División de Biotecnología. Universidad Tecnológica de Tecámac. Tecámac, Estado de México.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las leguminosas pertenecientes a la familia de las *Fabaceae*, son las más importante en términos económicos para la alimentación humana y animal, con más de 754 géneros y 20,140 especies, es la tercera familia más grande de angiospermas (Stevens, 2001). La alfalfa (*Medicago sativa* L.) pertenece a la familia *Fabaceae*, y es una leguminosa ampliamente empleada para la producción agropecuaria, ya que se aprovecha en la alimentación de ganado lechero en regiones áridas, semiáridas y templadas del mundo (García *et al.*, 2010; Rojas, 2011). Además, es utilizada como ingrediente en alimentos procesados para no-rumiantes por su alto valor nutritivo, rendimiento y digestibilidad (Li *et al.*, 2014; Printz *et al.*, 2015; Abd El-Naby *et al.*, 2016) así como significativos beneficios para los sistemas de cultivos sostenibles gracias a su sistema radicular profundo, y por su naturaleza perene que limita la erosión del suelo, permite una mejor labranza y generando simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, proporcionándoselo a la planta y al suelo para cultivos subsecuentes (Li y Brummer, 2012).

Los cultivares de alfalfa en México incluyen variedades peruanas, chilenas, africanas y estadounidenses, siendo las variedades peruanas las de mayor extensión en la región de valles altos centrales de México (Alarcón, 2007). Sin embargo, entre 85 y 90% de las variedades comerciales actualmente cultivadas en México se importan de otros países, donde la selección de las mismas se realiza bajo condiciones climáticas distintas a las presentes en México (Salinas, 2005). Esta situación establece la necesidad de generar variedades sobresalientes para cada región agroecológica del país.

En México, existen una gran cantidad de empresas e instituciones dedicadas a la producción de alfalfa, sin embargo, aun con el mejoramiento tradicional de dicho recurso forrajero y el de hectáreas sembradas, los rendimientos reportados no han tenido cambios notables en las últimas décadas, con una producción de 67.15 ton ha⁻¹ en 1980 hasta 80.1 ton ha⁻¹ en 2014 (Alarcón *et al.*, 2009; SIAP-

SAGARPA, 2016). Se ha demostrado que existen altos niveles de similitud a nivel genómico entre las especies de invierno, como *Medicago sativa* o *Medicago truncatula* (Kalo et al., 2004), por lo que es importante conocer todas las posibles fuentes genéticas de alfalfa que han sido ampliamente utilizadas durante décadas por productores, tanto nacionales como internacionales, que cuenten con características de rendimiento y calidad nutritiva contrastantes.

Por lo anterior, es prioritario determinar la variabilidad y adaptación de genotipos de alfalfa para Valles Altos Centrales. Con base en experiencias previas en el Programa de Mejoramiento Genético de Alfalfa de la Universidad Autónoma Chapingo, se han generado esquemas basados en la selección genotípica, que consiste en evaluar individuos sobresalientes en ensayos de rendimiento y calidad nutritiva bajo diferentes ambientes, a través de pruebas de progenie, con familias de medios hermanos o hermanos completos, y posteriormente hibridar los progenitores candidatos. Por tanto, los objetivos de la investigación fueron evaluar el comportamiento morfo-productivo, y analizar la composición de calidad de genotipos contrastantes de alfalfa generadas en el programa de mejora genética de alfalfa de la Universidad Autónoma Chapingo, como variedades ampliamente estudiadas, para incluir la información en los futuros esquemas de selección.

1.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento productivo y la calidad nutritiva de variedades seleccionadas de alfalfa bajo dos sistemas de producción (aguas blancas y negras), así como identificar la relación filogenética entre poblaciones seleccionadas y variedades testigo y comerciales.

1.1.1 Objetivos particulares

- Estimar la productividad y calidad nutritiva de variedades mejoradas de alfalfa por familia de medios hermanos bajo dos sistemas de riego en Valles Altos Centrales de México.

- Determinar la magnitud de componentes de rendimiento morfométricos en variedades mejoradas para Valles Altos Centrales de México.
- Analizar filogenéticamente ocho variedades, mediante marcadores tipo AFLP.

1.2 Hipótesis

- La selección y mejora genética de alfalfa, basan su respuesta en la constitución genómica, recombinación y combinación alélica tetrasómica, siendo mayor su respuesta productiva y persistencia, a mayor diversidad tetrasómica de los genotipos que constituyen la población.

En el primer capítulo se presentan los elementos generales del estudio, constituyendo una introducción de aspectos teóricos donde se establecen los objetivos e hipótesis, justificando la necesidad de realizar esta investigación, para incluir la información obtenida en los esquemas de selección próximos.

El segundo capítulo se compone de la parte de caracterización morfológica realizada en campo, incluye la composición botánica de la planta y los parámetros nutricionales y de digestibilidad de los genotipos mejorados y siete genotipos testigo recomendadas por la *North American Alfalfa Improvement Conference*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Medicago sativa* L.

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una leguminosa de importancia tanto en pastoreo directo como en las diversas formas de conservación de forraje para la producción agropecuaria. La alfalfa es originaria de la región montañosa Transcaucasia Asia menor, Turkmenistán y noreste de Irán, y endémica del Mediterráneo, gran parte de Europa, Norte de África, Oriente Medio, Siberia, Norte de la India y este de China (Quiros y Bauchan, 1988; Alarcón, 2012; Li y Brummer, 2012).

2.1.1. Morfología de la alfalfa

El género *Medicago* pertenece a la familia Fabaceae orden Fabales, dentro de este género se encuentra la alfalfa (*M. sativa* L.), de gran interés, debido a su importancia como cultivo forrajero. La alfalfa es un cultivo tetraploide tetrasómico ($2n = 4x = 32$), con un número básico de ocho cromosomas y tamaño de genoma entre 800 y 1000 Mpb (Li *et al.*, 2014).

La alfalfa emerge con plántulas dicotiledóneas y de tallo cuadrado en su sección transversal, presenta estomas y pelos a los cuatro días aproximadamente, seguida de hojas alternas, pinadas, trifoliadas, estipuladas y soldadas a la base del peciolo. La planta (Figura 1) es herbácea perenne con un ciclo vital de entre cinco y veinte años o más, dependiendo de la variedad utilizada y clima en el que se encuentre, su tamaño varía de 30 a 90 cm de altura, presenta entre 5 a 20 tallos erectos o más que continuamente emergen de yemas basales y axilares de la corona conforme maduran los tallos o son cosechados; aunque no está exento el crecimiento de tallos cortos durante el desarrollo de la planta, e inclusive durante la floración y llenado de vainas (Alarcón, 2012).

Raíz. El sistema radical principal es pivotante, hasta 9 m de longitud en condiciones favorables, permanece toda la vida de la planta y generalmente tiene

numerosas raíces secundarias mayormente predominantes en suelos compactos, pero menos predominantes en suelos porosos.

Tallos. Los tallos son delgados y erectos para soportar el peso de hojas e inflorescencias y presenta nudos desde donde nacen las hojas. Tiene crecimiento primario y secundario que da origen a un eje leñoso o porción perenne, que forma parte de la corona. El número de los tallos depende de la edad y el vigor de la planta, puede llegar a más de 20.

Hojas. Dicotiledóneas unifoliadas las primeras hojas verdaderas, posteriormente trifoliadas generadas en el ápice del tallo. Al desarrollarse la planta, las hojas pueden originarse del ápice del tallo o de las yemas laterales dispuestas en los nudos de los tallos. Los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados. Los folíolos de 5 a 20 mm de largo y 3 a 10 mm de ancho, son oblongos, dentados en el ápice y pubescentes. La hoja es entera o dentada en la base. Alrededor de 48% del peso de la planta corresponde a las hojas (Alarcón, 2012).

Flores. El nacimiento de las flores (Figura 2) es en racimos oblongos multifloros sobre pedúnculos no aristados, la característica de esta familia es de color violeta, amarilla, blancas o púrpura, y de tipos variegados, una corola violácea o azul, legumbre glabra o pubescente. El receptáculo está encerrado por el tubo del cáliz consistiendo de cinco sépalos finalizados por cinco lóbulos. El receptáculo sirve como base de la corola, pistilo, estambre y nectario. La alfalfa tiene una corola papilionácea de 6 a 12 mm de largo, que consiste de cinco pétalos: un estandarte largo, dos pétalos alados laterales, y dos pétalos fusionados o quillas. La flor tiene cinco sépalos en el primer verticilo, el segundo verticilo está compuesto por uno estandarte, dos alas y dos pétalos fusionados formando la quilla que recubre los órganos reproductivos, 10 estambres de los nueve estambres fusionados en un tubo estaminal con antera y filamento, el décimo es libre y cerca del estandarte, y un carpelo en el cuarto verticilo, la mayor floración se presenta de marzo y julio (Alarcón, 2012).

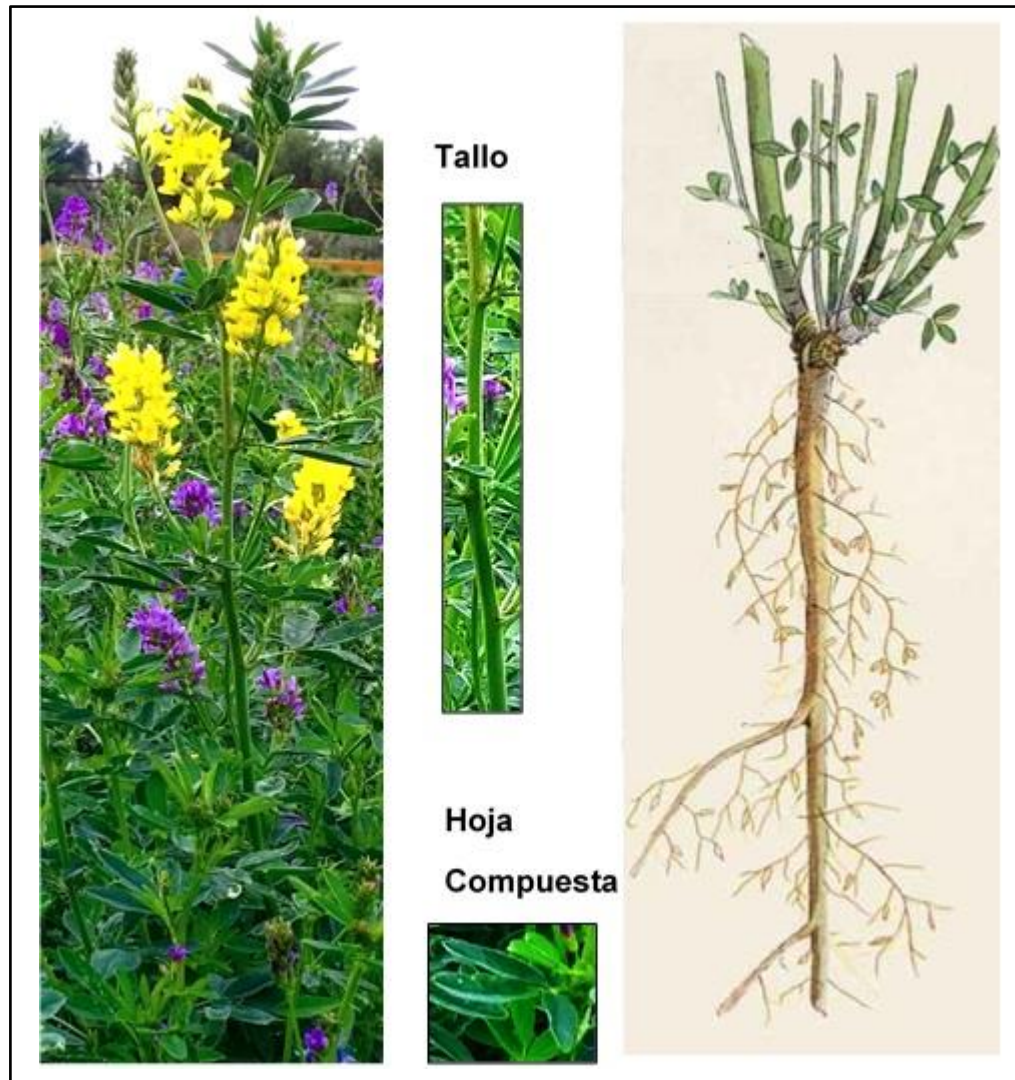


Figura 1. Morfología de la planta de alfalfa (tallo, hoja compuesta y raíz).

Fruto. Es una vaina doblada en espiral, que usualmente contiene de una a ocho semillas de forma riñonada color verde olivo y un tamaño de 1.5 por 2.5 mm, ovals, de un peso aproximado de 0.8 mg. Aunque existe floración en todo el año, se presenta una mayor floración entre marzo y julio (Del Pozo, 1983).



Figura 2. Morfología de la planta de alfalfa (flor, vaina y semillas).

2.1.2. Composición de la alfalfa

La palabra alfalfa se origina de la palabra árabe alfasasat, que significa “padre de todos los alimentos”, aunque se cultiva y utiliza principalmente como forraje para el consumo animal o suplementos alimenticios, por sus componentes nutricionales como proteínas y carbohidratos. Por otra parte, los metabolitos secundarios generados por las plantas pueden influir en la elección de las fuentes de alimento en los insectos y animales (Stochmal *et al.*, 2001; Goławska *et al.*, 2010).

El contenido proteico de la materia verde de la alfalfa oscila entre 15 y 23% de la proteína total (Alarcón, 2012). La alfalfa es rica en aminoácidos no esenciales, monoinsaturados (oleico), ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico), poliinsaturados (linoleico, linolénico), vitamina A (β -caroteno), B1, B2, B3(PP), B5, B6, B8, B9, B12, C, D, E, K, U, y minerales Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Zn y Si, ácidos orgánicos: málico y fumárico. El contenido de fibra cruda en el material verde es relativamente alto 230 a 300 g kg⁻¹ (Gawel, 2012).

Las fracciones de celulosa y lignina (FDA) constituyen de 40 y 45% del peso seco, pero no solo incluye nutrientes, minerales y vitaminas, sino también sustancias fitoquímicas como caroteno, clorofila, cumarinas, beta-sitosterol, alcaloides, saponinas, criptoxantina, daidzeína, genisteína, limoneno, luteína, y zeaxantina, metabolitos secundarios de plantas como fitoestrógenos (isoflavonas y cumestrol) y componentes antinutricionales (fitatos, L-canavanina, saponinas) (Gawel, 2012).

Las saponinas y taninos son considerados los principales componentes antinutricionales encontrados en la alfalfa que pueden reducir la utilización de los nutrientes, alterando la permeabilidad del intestino delgado (Kumar, 2011), pero a su vez pueden tener efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa.

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

La importancia de la alfalfa *Medicago sativa* L. en la agricultura mundial, radica en el bajo costo de producción, gran rendimiento, alto contenido en proteínas, minerales y por constituir una buena fuente de vitaminas y digestibilidad (Peyraud *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Abd El-Naby *et al.*, 2016). Su adaptabilidad tiene significativos beneficios para los sistemas de cultivos sostenibles gracias a su sistema radicular profundo, y por su naturaleza perenne limita la erosión del suelo, permitiendo mejor labranza. Como leguminosa la alfalfa genera simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, proporcionándolo a la planta y

aumentando la cantidad de este en el suelo para cultivos subsecuentes (Li y Brummer, 2012).

En México la alfalfa es el recurso forrajero de alta demanda para la alimentación de ganado. Debido a su alta producción de biomasa y a que es considerada una forma económica de obtención de alto contenido de proteínas (Radović *et al.*, 2009). La producción de alfalfa se establece en diversas regiones, debido a que los requerimientos para su cultivo son diversos y presenta una gran adaptabilidad a condiciones climáticas y tipos de suelos, se adapta mejor a alturas entre 700 y 2800 msnm, lo que genera que se adapte a diversas regiones. La alfalfa tolera el calor y la sequía moderada; con sistemas de riego disponibles, en cuanto a climas húmedos templados su producción es determinada por las enfermedades fúngicas contraídas por el clima. El cultivo necesita terrenos permeables y profundos, y pH óptimo de 7.5, ya que se limita su crecimiento en pH inferiores a 5, es sensible a encharcamientos y ligera salinidad. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 15 y 25 °C durante el día, y durante la noche entre 10 y 20°C (Alarcón, 2007).

La producción de semilla de alfalfa no satisface la demanda existente en el territorio mexicano, aunque hay ecotipos locales, entre 85 y 90% de la semilla utilizada anualmente proviene de Estados Unidos, España y Australia, por lo que se depende de variedades de regiones distintas a las zonas productoras del país (Salinas, 2005).

La producción en México de alfalfa en 2014, de acuerdo a SIAP-SAGARPA (2016) fue de 31 millones de toneladas, con rendimiento promedio de 81.69 ton ha⁻¹. La alfalfa es el quinto cultivo de mayor producción en México y segundo forrajero, de los cuales los cuatro principales estados productores son Chihuahua, Guanajuato, Durango e Hidalgo (Cuadro 1), ya que tradicionalmente la alfalfa ha sido el forraje usado por los productores lecheros. En Hidalgo se cuenta con una superficie sembrada de 47,488.50 ha repartidas en los distritos

de riego de Mixquiahuala 44,647.00 ha, Huichapan 1,389.50 ha, Tulancingo 1,229.00 ha, Pachuca 191 ha y Zacualtipán 32 ha.

El incremento del área sembrada en Hidalgo a partir de 1980 fue de 27,505 ha a 44,647 ha en 2014(SIAP-SAGARPA, 2016). Este incremento es debido a una mayor disponibilidad de tierras para cultivo y a un aumento en los precios de los granos y subproductos agroindustriales, lo cual ha provocado que los productores de bovinos busquen fuentes de alimentación más nutritivas y rentables para sus sistemas de producción.

La base genética para las variedades de alfalfa en México, se clasifica en tres grupos: 1) *Medicago sativa ssp. sativa*, Peruanos y Africanos (dan su nombre por ser el lugar de explotación y selección), región central de México; 2) *M. ssp. sativa*, Chilenos, región el norte de México; y 3) *M. ssp. falcata*, regiones montañosas. Los ecotipos peruanos y africanos fueron utilizados para la generación de 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-76 y Tanverde (Alarcón, 2007).

Cuadro 1. Producción anual por estado de alfalfa verde en México, 2014.

Ubicación	Superficie Sembrada (Ha)	Superficie Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (TonHa ⁻¹)	PMR (\$Ton ⁻¹)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Chihuahua	84,845.24	84,845.24	7,036,798.35	82.94	403.36	2,838,374.74
Guanajuato	45,557.82	45,557.82	3,526,130.26	77.40	622.48	2,194,961.76
Durango	30,048.50	30,027.50	2,603,511.35	86.70	468.85	1,220,650.72
Hidalgo	47,488.50	47,488.50	4,057,601.72	85.44	288.59	1,170,970.22
San Luis Potosí	14,633.00	14,633.00	1,788,638.05	122.23	651.17	1,164,702.74
Baja California	27,871.00	27,078.00	2,199,560.30	81.23	523.01	1,150,399.07
Coahuila	23,187.39	23,148.39	1,788,118.52	77.25	576.04	1,030,025.47
Sonora	27,631.00	27,231.00	1,976,387.70	72.58	457.51	904,208.22
Zacatecas	13,525.89	13,387.89	1,127,376.83	84.21	477.05	537,818.02
Puebla	18,686.15	18,669.15	1,071,881.20	57.42	396.86	425,391.04
Jalisco	9,477.60	9,466.60	873,624.89	92.28	468.41	409,212.74
Querétaro	8,559.00	8,559.00	711,917.93	83.18	470.18	334,731.12
Aguascalientes	5,756.00	5,756.00	516,131.55	89.67	553.08	285,460.76
Michoacán	6,153.25	6,153.25	356,598.49	57.95	764.18	272,505.08
México	7,645.25	7,645.25	618,137.19	80.85	299.23	184,966.93
Baja California Sur	4,022.50	3,993.00	556,750.00	139.43	312.20	173,819.59
Tlaxcala	3,002.00	2,947.00	196,699.00	66.75	667.51	131,297.64
Oaxaca	3,758.30	3,758.30	272,904.10	72.61	420.03	114,626.86
Sinaloa	2,789.92	2,789.92	100,184.04	35.91	623.77	62,491.52
Nuevo León	2,302.00	2,302.00	124,629.10	54.14	411.85	51,327.97
Veracruz	271.00	271.00	14,189.50	52.36	510.82	7,248.30
Morelos	146.00	146.00	6,326.00	43.33	818.95	5,180.70
Tamaulipas	89.00	89.00	8,380.00	94.16	461.26	3,865.35
Distrito Federal	28.50	28.50	2,202.20	77.27	653.93	1,440.08
Nayarit	87.00	87.00	3,150.00	36.21	449.71	1,416.60
Guerrero	10.00	5.00	271.00	54.20	790.77	214.30
TOTAL	387,571.8					
NACIONAL	1	386,063.31	31,538,099.27	81.69	465.38	14,677,307.54

Fuente: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>, consultada el 01 de abril de 2016.

2.3. Proteómica

Recientemente se ha completado la secuenciación de diversos genomas vegetales, incluyendo el de *Medicago truncatula*, y se ha iniciado la era de estudios postgenómicos que incluyen: la genómica, la proteómica, el interactoma, el metaboloma y la biología de sistemas.

El término proteoma lo utilizó por Wilkins en 1996, para describir el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma (Anderson y Anderson, 1998). El proteoma de una célula es la expresión de su fenotipo característico, y las diferencias entre un tipo celular y otro, o entre un mismo tipo celular en diferentes situaciones, que logran determinar los cambios que tienen lugar en la expresión y funcionalidad de sus proteínas (Ferrer *et al.*, 2006). Lo anterior es aplicado indiscriminadamente a cualquier conjunto de proteínas, y su acepción más precisa es la que refiere al conjunto de proteínas que componen una célula o tipo celular dado, a condiciones determinadas (Cieslak, 2009).

El crecimiento en el número de proyectos de investigación orientados a estudiar proteoma de forma sistemática dio lugar a la aparición de un nuevo concepto, "Proteómica". Este término se usó para el uso de mediciones cuantitativas a nivel de proteínas de la expresión génica para caracterizar procesos biológicos tales como procesos de enfermedad y efecto de drogas, y poder descifrar los mecanismos de control de la expresión de genes. Como tal, la proteómica se centra en la descripción dinámica de la regulación de genes y al hacerlo, ofrece algo mucho más potente que una proteína equivalente al ADN de bases de datos: el concepto de regulación molecular como una ciencia sistemática. Por esta razón, la proteómica enfatiza la cuantificación y el montaje de grandes cuerpos de experimentación y observaciones en bases de datos numéricos (Anderson y Anderson, 1998). Algunos autores prefieren definir la Proteómica como la parte de la Genómica Funcional que centra su atención en el estudio directo de las proteínas (Perea, 2005).

2.3.1. Proteínas presentes en alfalfa

Existe una gran diversidad de proteínas en las plantas, con diferentes funciones metabólicas, transporte, conformacionales, etc. Las proteínas que se presentan comúnmente como albúminas, son solubles en agua y en soluciones salinas diluidas; precipitan en soluciones de sulfato de amonio a una concentración cercana a la saturación; por otra parte, las globulinas, generalmente insolubles en agua, pero solubles en soluciones salinas diluidas; otras son las prolaminas, proteínas solubles en etanol al 60-70% o l-propanol al 50%. El nombre de prolaminas fue acuñado debido a su alto contenido de prolina y nitrógeno amídico proveniente de la glutamina, que es el aminoácido presente en altas cantidades (Segura-Nieto y Jiménez-Flores, 1999). Otro grupo son las glutelinas, que se caracterizan por ser solubles en medios ácidos o alcalino; por ejemplo, la oricenina del arroz y su representante más conocido son las gluteninas aisladas del trigo (Huang y Khan, 1997).

Las fracciones más importantes de las leguminosas son las albúminas y las globulinas, mientras que para los cereales son las prolaminas y glutelinas. Las albúminas incluyen algunas moléculas que poseen propiedades funcionales y muchas son enzimas que metabolizan las sustancias almacenadas en la semilla; por ejemplo, las glucosidasas y las proteasas, que tienen un papel importante en la degradación proteínica durante la germinación. Otras participan en la defensa de la planta, como son los inhibidores de tripsina y las lectinas (Gueguen y Cerletti, 1994).

Soberón (2009) menciona que el consumo diario de concentrado proteico obtenido de *Medicago sativa L.*, como suplemento alimenticio, por un período de 25 días, estimulo el incremento los valores de recuento de reticulocitos, y por lo que aumentó significativamente los niveles de albúmina en niños menores de seis años con desnutrición crónica.

2.4. Uso de marcadores SSRs en filogenética de alfalfa

La secuencia simple repetida (SSR's) o microsatélites son de herencia codominante; son abundantes en el genoma ya que se encuentran en regiones codificantes y no codificantes, tienen una alta reproducibilidad, por lo que son altamente informativos; se han utilizado en estudios de genética molecular, en la elaboración de mapas genéticos para calcular la diversidad genética y estructura de algunas poblaciones de alfalfa (Sledge *et al.*, 2005; Şakiroğlu *et al.*, 2010), mapeo comparativo (Choi *et al.*, 2004), estudios filogenéticos y selección asistida por marcadores moleculares en alfalfa (Campbell, 2000). Por ejemplo, los genotipos de falcata tienen alta resistencia al frío, sequía y enfermedades, características que juegan un papel importante en el mejoramiento de alfalfa (Li *et al.*, 2009).

Campbell (2000) investigó la posibilidad de aumentar la hibridación en la alfalfa (*Medicago sativa* L.). Sin embargo, la depresión endogámica es muy severa en la alfalfa, y un problema potencial asociado con la utilización de autoincompatibilidad para aumentar la hibridación es la supuesta relación positiva entre la auto-incompatibilidad y la endogamia. Por lo que se escogieron con base en estimaciones de distancia genética (GD) (calculado a partir de los marcadores RAPD y AMSP) y el número de loci tri- y tetra-alélicos, alélica del análisis SSR, lo que es una buena base para un sistema de alfalfa híbrida, o para su uso en otros sistemas de selección diseñados para minimizar la endogamia y aumentar al máximo la heterosis.

Entre otros investigadores, He *et al.* (2009) realizó estudios previos de identificación de marcadores SSR en el genoma de alfalfa para evaluar su capacidad de separar progenitores reconocidos de la alfalfa en América del Norte, construyendo dendogramas mediante análisis de conglomerados, utilizando los análisis de los amplificados de SSR y concluyeron que tienen excelente utilidad para la evaluación polimórfica, con aplicación potencial en estudios filogenéticos y mapeo genético en estudios de alfalfa.

Por su parte, Şakiroğlu *et al.* (2010) analizaron la diversidad en alfalfa evaluando las relaciones genéticas de germoplasma cultivado, variación poco conocida en el germoplasma diploide en el complejo *M. sativa-falcata*, en una colección de 374 genotipos individuales derivados de 120 adhesiones diploides no mejoradas, incluyendo *M. sativa subsp. caerulea*, *falcata*, y *hemicycla*. Las evaluaciones se realizaron con 89 loci polimórficos SSR para estimar la diversidad genética, inferir las bases genéticas basados en la morfología de la taxonomía actual y la estructura de población determinada. La alfalfa diploide es muy variable. Sin embargo, en un análisis de agrupamiento basado en el modelo de los datos genómicos se identificaron dos subpoblaciones claramente diferenciadas, que corresponden a *falcata* y *caerulea*, subespecies morfológicamente definidas, con la evidencia de la naturaleza híbrida de la subespecie *hemicycla* y apoyados en la composición del genoma; los resultados mostraron que las relaciones taxonómicas basadas en la morfología se reflejan en los datos de marcadores genéticos con algunas excepciones, y que las distinciones claras entre las subespecies son evidentes a nivel diploide, proporcionando una línea base a partir del cual evaluar sistemáticamente la variabilidad en la alfalfa tetraploide y sirve como punto de partida para explorar la alfalfa diploide para los experimentos genéticos y de mejoramiento.

En la investigación de Zhou *et al.* (2014) se utilizó etiqueta de secuencia expresada con repeticiones de secuencias simples (EST-SSRs), considerando el alto polimorfismo, estos se pueden aplicar para evaluar la diversidad genética, estructura de la población, la relación, la evolución, la vinculación de cartografía y protección cultivar de alfalfa cultivada para facilitar los programas de mejoramiento.

Qiang *et al.* (2015) mencionaron que la información sobre la diversidad genética y la estructura de la población de una colección de alfalfa tetraploide podría ser valiosa para el uso eficaz de los recursos genéticos, por lo que investigó un conjunto de 336 genotipos de alfalfa tetraploide (*Medicago sativa subsp. sativa L.*) de todo el mundo, los que fueron genotipados con 85 marcadores SSR

distribuidos en todo el genoma, para revelar la diversidad genética y la estructura de la población en la alfalfa. Los resultados indicaron que el análisis cuantitativo de la estructura y la diversidad genética de la población, podría ser útil para el análisis genético y genómico, y posteriormente utilizar la variación genética en el mejoramiento de alfalfa.

2.5. Literatura citada

- El-Naby, A. Z. M., F. M. Sultan, H. S. A. El-Maksoud, and T. K. A. El-Aziz. 2016. Fertility and seed setting of ten alfalfa genotypes. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 16: 432-441.
- Alarcón, Z. B. 2007. Transferencia de tecnología para el manejo fitosanitario de la alfalfa en el Valle del Mezquital, Hgo. *Innovando Juntos* 5: 10-15.
- Alarcón, Z. B., y T. Cervantes M. 2012. Manual para la producción de semilla de alfalfa en el Valle del Mezquital, Hidalgo. Universidad Autónoma Chapingo. Depto. Zootecnia-Fundación Hidalgo Produce A. C. México. 77 p.
- Alarcón Z., B., R. Venegas O., M. Galicia J., C. Verduzco R., y T. Cervantes M. 2009. Selección genética y molecular de genotipos de alfalfa (*Medicago sativa*) para el Valle del Mezquital. *Innovando Juntos* 7: 18-31.
- Anderson, N. L, and N. G. Anderson. 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19: 1853-1861.
- Campbell, T. A. 2000. Molecular analysis of genetic relatedness among alfalfa clones differing in levels of self-incompatibility. *Canadian Journal Plant Science* 80: 559-564.
- Choi, H-K., K. Dongjin, U. Taesik, E. Limpens, L. Hyunju, M. Jeong-Hwan, P. Kalo, R. V. Penmetsa, A. Seres, O. Kulikova, A. Roe B., T. Bisseling, G. B. Kiss, and R. C. Douglas. 2004. A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker collinearity with *M. sativa*. *Genetics Society of America*. 166: 1463–1502.
- Cieslak, A., y I. Ribera. 2009. Aplicaciones de proteómica en ecología y evolución. *Ecosistemas* 18: 34-43.
- Del Pozo, M. I. 1983. La alfalfa: su y su aprovechamiento. 3a edición, Mundi-Prensa. Madrid, España. 380 p.

- Ferrer, N. M. 2006. Análisis de los proteomas de dos micoplasmas. Tesis de Doctorado. Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España. 115 p.
- García, L. C., B. R. Vázquez-De-Aldana, L. F. Lorenzo M., A. García-Ciudad, C. Petisco, S. Vicente T., y B. García C. 2010. Evaluación de 26 cultivares de alfalfa en el oeste español. *Pastos: Revista de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos* 40: 189-210.
- Gawel, E. 2012. Chemical composition of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria* 11: 303–310.
- Goławska, S., I. Łukasik, A. Goławski, I. Kapusta, and B. Janda. 2010. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) apigenin glycosides and their effect on the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Polish Journal of Environmental Studies* 19: 913-919.
- Gueguen, J., and P. Cerletti. 1994. Proteins of some legume seeds: soybean, pea, faba bean and lupin. *In* New and Developing Sources of Food Proteins. B. J. F. Hudson (ed.). Chapman and Hall. London, U. K. pp: 145-196.
- He, C., Z. L. Xia, T. A. Campbell, and G. R. Bauchan. 2009. Development and characterization of SSR markers and their use to assess genetic relationships among alfalfa germplasms. *American Society of Agronomy* 49 (6): 2176-2186.
- Huang Y. D., and K. Khan. 1997. Characterization and quantification of native glutenin aggregates by multistacking sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) procedures. *Cereal Chemistry* 74: 229-234.
- Kalo, P., A. Seres, S. A. Taylor, J. Jakab, Z. Kevei, A. Kereszt, G. Endre, T. H. N. Ellis, and G. B. Kiss. 2004. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Molecular Genetics and Genomics* 272: 235-246.
- Kumar, S. 2011. Biotechnological advancements in alfalfa improvement. *Journal of Applied Genetics* 52: 111–124.
- 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.
- Li, X., and E. C. Brummer. 2012. Applied genetics and genomics in alfalfa breeding. *Agronomy* 2: 40-61.

- 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., Y. Han, Y. Wei, A. Acharya, A. D. Farmer, J. Ho, M. J. Monteros, and E. C. Brummer. 2014. Development of an Alfalfa SNP array and its use to evaluate patterns of population structure and linkage disequilibrium. *PLOS ONE* 9: 1-9.
- Li, X., Y., Y. Wei, A. Acharya, Q. Jiang, J. Kang, and E. C. Brummer. 2014. A saturated genetic linkage map of autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) developed using genotyping-by-sequencing is highly syntenous with the *Medicago truncatula* genome. *G3 (Bethesda)* 4: 1971–1979.
- Perea, E. J. 2005 La microbiología oral en la era de la genómica y la proteómica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 23: 113-115.
- Peyraud, J., L. A. Le Gal, and A. Luscher. 2009. Potential food production from forage legume-based-systems in Europa: an overview. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 48:115-135.
- Printz, B., G. Guerriero, K. Sergeant, J. Renaut, S. Lutts, and J. F. Hausman. 2015. Ups and downs in alfalfa: proteomic and metabolic changes occurring in the growing stem. *Plant Science* 238: 13–25.
- Qiang, H., Z. Chen, Z. Zhang, X. Wang, H. Gao, and Z. Wang. 2015. Molecular diversity and population structure of a worldwide collection of cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* subsp. sativa L.) germplasm as revealed by microsatellite markers. *PLOS ONE* 10(4): 1-12.
- Quiros, C. F., and G. R. Bauchan. 1988. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. *In: Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Madison, Wisconsin 3–124.
- Radović, J., D. Sokolović, and J. Marković. 2009. Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25: 465–475.
- Rojas G., R. A. 2011. Dinámica de crecimiento y rendimiento de forraje de diez variedades de alfalfa. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 81 p.
- SAGARPA. Consulta de Indicadores de Producción Nacional, Precios y Márgenes de Comercialización de alfalfa. www.siap.sagarpa.gob.mx. Consultada el 9 de mayo de 2016.

- 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. Consultada el 10 de febrero de 2015.
- Şakiroğlu, M., J. J. Doyle, and E. C. Brummer. 2010. Inferring population structure and genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions using SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 121: 403-415.
- Segura-Nieto M., and R. Jiménez-Flores. 1999. Genetic modifications of plant seed storage proteins for food production. *In: Molecular Biotechnology for Plant Food Production*. O. Paredes-López (ed.). Technomic Publishing Co. Inc. USA. pp: 411-474.
- Sledge, M. K., I. M. Ray, and G. Jiang. 2005. An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 111: 980–992.
- Soberón, M., R. Oriondo, E. Estrada, I. Arnao, A. Cordero, L. Velásquez, and I. Arteaga. 2009. Impacto de una intervención alimentaria con un concentrado proteico de *Medicago sativa* L (alfalfa), en niños pre escolares con desnutrición crónica. *Anales de la Facultad de Medicina* 70: 168-174.
- Stevens, P. F. 2001. Angiosperm Phylogeny Website. Version 13, September 2013. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Consultada el 12 de mayo de 2015.
- Stochmal, A., S. Piacente, C. Pizza, F. De Riccardis, R. Leitzand, and W. Oleszek. 2001. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 753–758.
- Zhou, Q., T. Chen, Y. Wang, and Z. Liu. 2014. The development of 204 novel EST-SSRs and their use for genetic diversity analyses in cultivated alfalfa. *Biochemical Systematics and Ecology* 57: 227–230

3. Caracterización morfológica, productiva y contenido de proteína de genotipos de alfalfa (*Medicago sativa* L.)

3.1. Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento morfo-productivo, la composición de calidad, y filogenia de genotipos de alfalfa. Se evaluaron tres variedades mejoradas de alfalfa, dos comerciales en México, y siete recomendadas por NAAIC, en dos localidades, en Chapingo, Méx. y Mixquiahuala, Hgo. Se usó un diseño de bloques incompletos completamente al azar con medidas repetidas a través del tiempo: invierno, primavera y verano. Los resultados indican que el rendimiento total de forraje fresco fue de 11,910 kg ha⁻¹, distribuido en hoja con 5,344 kg ha⁻¹, tallos 6,519 kg ha⁻¹ e inflorescencias 774 kg ha⁻¹; el rendimiento de hoja fue mayor en invierno entre variedades ($P < 0.05$), en verano mayor rendimiento de tallos, y mayor la acumulación de inflorescencia en primavera. La interacción época x localidad x variedad fue significativa para dichos componentes. En cuanto a las medias de las localidades, la variedad FMH fue superior en rendimiento total, mientras que la Población T1 fue superior en hoja e inflorescencia; y la variedad ABI700 en tallo. La época de invierno mostró el mayor promedio de relación hoja:tallo (1.42) y proteína cruda (25.1%), sobresaliendo Población T1 (32.4%), Compuesto FMH (30.0%) y FMH (26.1%). Las poblaciones seleccionadas FMH y T1 contaron con mejores rendimientos en invierno. Además, se realizó el análisis filogenético para diversidad genética de cinco variedades y tres poblaciones agrupándolas en poblaciones genéticamente similares, donde la matriz de similitud entre las distintas poblaciones, indica que el valor más alto de similitud fue entre Júpiter, Española y Moapa con 0.9907, y el valor más bajo de 0.9574 entre Alfagraze y compuesto FMH. Estas diferencias pueden ser asociadas a que los genotipos utilizados son de distinto origen ecogeográfico.

Palabras clave: rendimiento, alfalfa, proteína cruda, *Medicago sativa* L.

Morphological and productive characterization and protein content of alfalfa genotypes (*Medicago sativa* L.)

3.2. Abstract

The objective of this study was to evaluate the morpho-productive performance, the quality composition and phylogenetic analysis of alfalfa forage. Three improved varieties of alfalfa, two commercial and seven recommended by NAAIC were evaluated at two locations, in Chapingo, Mex, and Mixquiahuala, Hgo. A randomized incomplete block design with measurements repeated over time was used. Findings show that the total yield of fresh forage was 11,910 kg ha⁻¹, leaf 5,344 kg ha⁻¹, distributed in stems 6,519 kg ha⁻¹ and inflorescence 774 kg ha⁻¹. The yield of leaf was greater in winter among varieties ($P < 0.05$), in summer higher yield of stems, and greater accumulation of inflorescence in spring. The interaction season x location x variety was significant for these components. In averages of the localities, the Population FMH was higher in total yield, while the Population T1 was greater in leaf and inflorescence biomass, and ABI700 in stem. The winter season showed the highest leaf-stem ratio (1.42) and crude protein (25.1%), outstanding Population T1 (32.4%), Composite FMH (30.0%) and FMH (26.1%). Selected populations of FMH and T1 had the best yields in winter. In addition, phylogenetic analysis was carried out for genetic diversity of five varieties and three populations by grouping them into genetically similar populations, in which matrix similarity among different populations indicates that the highest value of similarity was among Jupiter, Española and Moapa with 0.9907, and the lowest was 0.9574 between Alfragraze and Composite FMH. Differences may be due to that used genotypes are different eco-geographical origin and there are different environmental conditions where they were developed.

Key words: yield, alfalfa, crude protein, *Medicago sativa*. L.

Master of Science Thesis, Universidad Autonoma Chapingo
Author: Jesús Emmanuel Baños Galindo
Advisor: Baldomero Alarcón Zúñiga, Ph.D.

3.3. Introducción

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es el cultivo forrajero más importante a nivel mundial, debido a su contribución en la alimentación humana y animal. En la agricultura, la importancia de la alfalfa puede atribuirse a un número de variables morfológicas y características fisiológicas; en la producción agropecuaria es la leguminosa mayormente utilizada en la alimentación de bovinos lecheros en regiones áridas, semiáridas y templadas (Radović *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010; Rojas, 2011).

Además, gracias a su gran adaptabilidad tiene varios beneficios para cultivos sostenibles, debido a su sistema radicular profundo y por su naturaleza perenne limita la erosión del suelo, permitiendo mejor labranza; genera simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, proporcionándolo a la planta y al suelo para cultivos subsecuentes (Li y Brummer, 2012). Sin embargo, entre 85 y 90% de las variedades comerciales empleadas en México son importadas, donde la selección de las mismas se realiza bajo condiciones climáticas distintas a las de México (Salinas, 2005). Dicha situación establece la necesidad de generar variedades sobresalientes para cada región agroecológica del país.

En México, el rendimiento de alfalfa a nivel nacional ha mostrado incrementos moderados, pasado de 67.15 ton ha⁻¹ en 1980 a 80.1 ton ha⁻¹ en 2014 (SIAP-SAGARPA, 2016). Se ha demostrado que existen altos niveles de sintenia a nivel genómico entre las especies de invierno, como *Medicago sativa* o *Medicago truncatula* (Kalo *et al.*, 2004), por lo que es importante conocer las posibles fuentes genéticas de alfalfa que han sido ampliamente utilizadas a través de décadas por productores, tanto nacionales como internacionales, que cuenten con características de rendimiento y calidad nutritiva contrastantes.

Por tal motivo, es importante determinar las fuentes genéticas prioritarias para la región de Valles Altos Centrales de México, bajo esquemas de selección genotípica e individual, donde se seleccionen individuos sobresalientes en ensayos de rendimiento y calidad nutritiva bajo diferentes ambientes, a través de pruebas de

progenie, con familias de medios hermanos o hermanos completos, y posteriormente hibridar los progenitores candidatos. Por tanto, el objetivo de la investigación fue evaluar el comportamiento morfo-productivo y análisis de composición de calidad de genotipos por familias de medios hermanos, y variedades recomendadas por North American Alfalfa Improvement Conference (NAAIC) para poder realizar una comparación del comportamiento en la región de Valles Centrales de México, además de realizar un análisis filogenético en ocho variedades, para agruparlas en poblaciones genéticamente similares, mediante la marcadores tipo AFLP.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Ubicación y clima del área experimental

El experimento se fraccionó en tres etapas, siendo la primera etapa mediante la preparación del material vegetativo en el Invernadero de Forrajes del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) en donde los diferentes genotipos se sembraron en semilleros de poliestireno de 200 cavidades y sustrato PeatMoss Kekkila®, con riego diario los primeros 30 días y posteriormente cada tercer día, fertilización mensual en una dosis 20-30-20 (Verde-Abon®) hasta el trasplante. La segunda etapa fue el ensayo morfo-productivo en dos localidades: Campo Agrícola Experimental “Tabla San Juan”, de la UACH, 19° 29'54.7" N y 98° 51'25.8" W, 2318 msnm, en el Estado de México; y Centro del Desarrollo y Productividad de Cinta Larga en Mixquiahuala, 20°11'23.2" N y 99°14'32.2" W, a 2000 msnm, en el estado de Hidalgo.

El clima de Chapingo, de acuerdo con la clasificación climática de Köppen, corresponde a un Cb(wo)(w)(i') g (García, 2004), según CONAGUA-SMN (2016), reporta una precipitación media anual es de 618.5 mm, y temperatura media anual de 16.4 °C (rango, 7.6 a 25.1 °C). Para el Centro de Desarrollo y Productividad de Cinta Larga en Mixquiahuala, Hidalgo, es un clima templado semi-árido BSkw(i')w", según CONAGUA-SMN (2016) reporta precipitación media anual acumulada de 459.8 mm, con invierno seco y lluvias en verano temperatura media anual de 17.3 °C (rango, 9.0 a 25.5 °C).

Con base en el análisis de suelo realizado en el Laboratorio Central de Suelos de la UACH (Cuadro 2), el Campo Experimental Tabla San Juan de la UACH presenta un suelo franco arcillo arenoso moderadamente alcalino, moderadamente alto en potasio, calcio, magnesio, y manganeso; alto en boro; medio en fósforo, hierro, y cobre; moderadamente bajo en zinc; bajo en nitrógeno; y pobre en materia orgánica. El suelo del Centro de Desarrollo y Productividad de Cinta Larga en Mixquiahuala, Hgo. es un suelo franco arenoso alcalino, moderadamente rico en materia orgánica, muy alto en fósforo, potasio, calcio, magnesio, cobre, zinc, y boro; medio en hierro, y manganeso; pero pobre en nitrógeno.

El lote experimental del CAE-UACH en Chapingo, Méx., se riega con aguas subterráneas o también denominadas aguas blancas. Sin embargo, el lote experimental del Centro del Desarrollo y Productividad de Cinta Larga en Mixquiahuala, Hgo, está bajo riego rodado con aguas negras de la Ciudad de México.

Cuadro 2. Características y composición química del suelo de los dos sitios experimentales.

Módulo	pH	MO []	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Mn (ppm)	B (mg kg ⁻¹)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Textura
CAE- UACH	8.05	1.08	12.1	18.68	404	1930	1253	11.98	1.15	1.15	12.68	1.80	52.8	24.0	23.2	Franco Arcillo Arenoso
CDP- Cinta Larga	8.37	1.88	2.4	40.36	720	5624	825	9.16	4.72	14.61	11.93	4.21	56.8	26.0	17.2	Franco Arenoso

pH: Potenciómetro relación suelo agua 1:2; M.O. Materia orgánica por Walkley y Black recuperación de C [], N (%): Nitrógeno, extraído con cloruro de potasio 2 N y determinado por arrastre de vapor. P (ppm): Olsen partes por millón (ppm); K: Extraído en acetato de amonio 1.0 N pH 7.0 relación 1:20 y determinado por espectrofotometría de emisión de flama; Ca, Mg: Extraído en acetato de amonio 1.0 N pH 7.0 relación 1:20 y determinado por espectrofotometría de absorción atómica. Fe, Cu, Zn, Mn: Extraído con DTPA relación 1:4 y determinado por espectrofotometría de absorción atómica. B: Extraído con CaCl₂ 1.0 M fotolorimetría de azometina-H. Textura: Hidrómetro de Bouyoucos.

3.4.2. Material genético y diseño experimental

Se utilizaron doce variedades de alfalfa (Cuadro 3) que estuvieron integradas por cinco poblaciones contrastantes que comprenden dos variedades comerciales, tres variedades mejoradas de alto contenido de PC, y siete variedades testigo recomendadas por la North American Alfalfa Improvement Conference (NAAIC, 2014). Las variedades generadas en el Programa de Forrajes de la Universidad Autónoma Chapingo se iniciaron en 2006 con la evaluación de 1,430 accesiones de alfalfa (Plant Introduction, PI) provistas por el Banco de Germoplasma del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (NPGS, por sus siglas en inglés); evaluándose las características de rendimiento, adaptación, altura, persistencia y resistencia/tolerancia a plagas y enfermedades.

El periodo de evaluación de las accesiones fue de 2006 a 2008, seleccionando 317 accesiones para un policruzamiento dirigido manual y generar una población recombinante (población recombinante T1). En noviembre de 2008, se sembró en un ensayo de evaluación para la población recombinante T1 y se colectó semilla de las mejores plantas en verano de 2009, generando 200 familias de medios hermanos (FMH), las cuales fueron evaluadas en 2011-2012 con base en caracteres morfológicos, rendimiento y contenido de proteína cruda, FDN y FDA. En el año 2013, se seleccionaron las mejores FMH y se realizó nuevamente un policruzamiento de las mejores familias y plantas dentro de familias, para obtener una población recombinante FMH (AMBG).

Además del material genético anterior, se incluyeron dos variedades comerciales (variedades Española y Júpiter) ampliamente difundidas en la región de los Valles Altos Centrales de México. Conjuntamente se incluyó un panel de siete variedades control, recomendadas por North American Alfalfa Improvement Conference (NAAIC) como estándares para la evaluación de variedades o genotipos seleccionados para la región de Norteamérica y para realizar una comparación de rendimiento, morfología, calidad nutricional y resistencia/tolerancia a plagas y enfermedades.

Cuadro 3. Descripción de genotipos de *Medicago sativa* L. utilizados.

Variedades seleccionadas	Proteína cruda
Variedad Española	BCPC
Júpiter (comercial)	ICPC
Población recombinante FMH (AMBG)	ACPC
Familias de Medios Hermanos (FMH)	ACPC
Población recombinante (T1)	ACPC
Variedades testigo - NAAIC	
Alfagraz	
Moapa	
Archer	
Pierce	
ABI-700	
Legend	
MSC5246	

PC=Proteína Cruda, BCPC (bajo contenido de proteína cruda): 20-22%, ICPC (intermedio contenido de proteína cruda): 22-24%, ACPC (alto contenido de proteína cruda): >24%

Se establecieron en un diseño lineal de bloques incompletos aleatorizados con medidas repetidas, para cortes sucesivos a una altura de 5 cm del nivel del suelo (4 cortes). Se estableció cada genotipo experimental en parcelas de 5 hileras de 4 x 1.6 m (6.4 m²), 40 cm de separación entre hileras y 20 cm entre plantas, con densidad de población de 105 plantas por parcela. En Chapingo, Méx., se manejaron 3 bloques con 12 parcelas por bloque con un área total de 964.8 m², y en Mixquiahuala, Hgo., fueron 3 bloques con 12 parcelas por bloque, con una superficie total de 715.2 m².

Los lotes experimentales se mantuvieron libres de malezas, y se aplicó fertilizante foliar sólido N-P-K (20-30-10), con toma de datos morfológicos y muestras para

análisis en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.4.3. Variables de respuesta morfológicas y bromatológicas

En cada uno de los cuatro cortes se tomaron en consideración 10 plantas, aleatorizadas en cada parcela, a las cuales se les determinó la composición morfológica en peso fresco de inflorescencia (Pinflo), peso hoja (Phoja), peso tallo (PTallo) y peso total de la parcela (PParcela). La muestra se pesó en verde y se obtuvo una sub-muestra de aproximadamente 150 a 250 g, la cual se secó en una estufa de aire forzado a 55°C durante 72 h.

Se estimó la calidad del forraje con base en las concentraciones de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) (Van Soest, 1991) y nitrógeno total por microKjeldahl (Chapman y Pratt, 1961).

3.4.4. Relaciones filogenéticas entre variedades y poblaciones recombinantes de familias de medios hermanos

Se realizó la extracción de ADN del tejido foliar compuesto de 25 plantas solamente de 5 variedades (variedades Española, Júpiter, Moapa, MSC5246, y Alfagraze) y 3 poblaciones seleccionadas (Población 1 recombinante T1, Compuesto de Familias de Medios Hermanos y población recombinante de Familias de Medios Hermanos) recombinantes establecidas en campo para cada localidad. El tejido foliar se almacenó 4 h a -80 °C, se liofilizó a -40 °C por 4 días y se molieron finamente en un disruptor TissueLyser (Qiagen®). La extracción de ADN se hizo con el método de CTAB, de acuerdo con el protocolo de Sambrook y Russel (2001) con modificaciones. El ADN se conservó en buffer 200 µL Tris-etilendiaminotetraacético, para posteriormente estimar la concentración de ADN con un espectrofotómetro a una relación de 260/280 entre 1.7 y 1.9, y la dilución empleada fue 20 ng ADN µL⁻¹, almacenándose las muestras a -20 °C.

AFLP (Polimorfismo de Fragmentos Largos Amplificados): El procedimiento fue establecido con base en el manual IRDye® Fluorescent AFLP Kit for Large Plant Genome Analysis (Licor®). La digestión se hizo con EcoRI y MseI, y la ligación fue hecha con adaptadores, de acuerdo con la secuencia de restricción de las dos enzimas. La amplificación selectiva fue realizada con las combinaciones de oligonucleótidos EcoRI y MseI (Cuadro 4).

Cuadro 4. 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

3.4.5. Análisis estadístico

El modelo incluyó los efectos de localidad y repetición como aleatorios y el de variedad y corte como fijo, y las interacciones entre efectos (Cuadro 5) fueron considerados como mixtos (Lynch y Walsh, 1998). La proporción de la varianza para variedades y localidad, fueron determinados por PROC MIXED (SAS Versión 9.3) con medidas repetidas en el tiempo. La comparación de medias se efectuó mediante

la prueba de Tukey ajustada ($\alpha=0.05$). Los modelos para el análisis estadístico se indican en el Cuadro 5:

Cuadro 5. Modelos lineales utilizados para el análisis de las variables de respuesta.

Variable de respuesta	L	C	B _k	Var	L*C	L*Var	C*Parcela	C*Var	L*C*Var
PC	√	√		√	√				√
FDA	√	√	√	√	√	√		√	
FDN	√	√	√	√	√			√	
PInflo	√	√	√	√	√				
PTallos	√	√	√	√	√				
PHoja	√	√	√	√	√				
Pparcela	√	√	√	√	√	√	√		

PC= proteína cruda; **FDA**= fibra detergente ácida; **FDN**= fibra detergente neutro; **PInflo**= peso de la inflorescencia; **PTallos**= peso de los tallos; **PHoja**= peso de las hojas; **Pparcela**= peso total de la parcela; **L_i**= efecto de la i-ésima localidad i: 1, 2; **C_j**= efecto de j-ésimo corte j: 1, 2, 3, 4; **B_k**= efecto de k-ésimo bloque k: 1, 2, 3; **Var_m**= efecto de la m-ésima variedad m: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12; **L*C_{ij}**= interacción de la localidad x corte; **L*Var_{im}**= interacción de la localidad x variedad; **C*Var_{im}**= interacción de corte x variedad; **L*C*Var_{ijm}**= triple interacción localidad x corte x variedad; **e_{ijklmn}**= error experimental.

Análisis filogenético: 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 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.

3.5. Resultados y discusión

3.5.1. Composición morfológica y nutritiva

La variabilidad genética entre razas, poblaciones o genotipos, siempre está representada por caracteres morfológicos que determinan el rendimiento y persistencia de los cultivos forrajeros, aunado con la calidad nutricional condicionados por dichos caracteres morfológicos. La estimación de la magnitud y rangos permiten identificar progenitores o variedades sobresalientes para cada nicho agroecológico, que maximizará su rendimiento siempre y cuando se les

proporcione las mejores condiciones de manejo (Douglas, 1981). Por tal razón, el estudio de caracteres morfológicos, brinda un panorama muy amplio de la productividad de las variedades forrajeras, así como sirve en la identificación de genotipos sobresalientes, que pudieran emplearse en programas de mejora genética.

Por lo anterior, en las figuras 3 y 4 se presentan el promedio de 4 cortes realizados en dos localidades para los componentes morfológicos de inflorescencia, hoja y tallo de los genotipos y controles empleados en este ensayo experimental. Se identificó un claro efecto de localidad (Mixquiahuala vs Chapingo) para dichos componentes morfológicos, siendo la variedad Pierce la de mayor acumulación de biomasa por planta en Chapingo, Méx., seguido del compuesto de familias de medios hermanos (FMH) y la población recombinante T1; las variedades con menos acumulación de biomasa fueron Alfagraze, Legend y variedad española (Aragonesa). En relación con los resultados obtenidos en la localidad de Mixquiahuala, Hgo., la población recombinante T1, compuesto recombinante de familias de medios hermanos (AMBG) y la variedad comercial Júpiter (Berentzen®), presentaron las mayores acumulaciones de biomasa, y los de menor acumulación fueron Alfagraze, Moapa-69 y Archer, variedades control que sugiere North American Alfalfa Improvement Conference (NAAIC) para los ensayos de rendimiento, morfométricos y resistencia a plagas/enfermedades de variedades o genotipos mejorados.

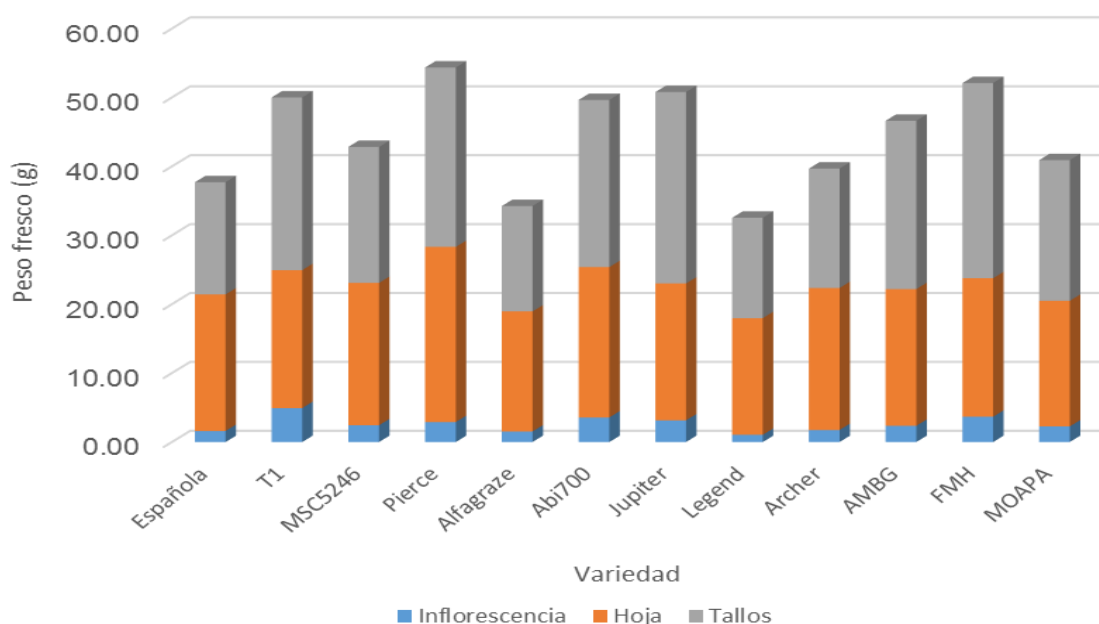


Figura 3. Promedio de peso de los diferentes componentes de la planta obtenidos para las variedades cultivadas en Chapingo, México.

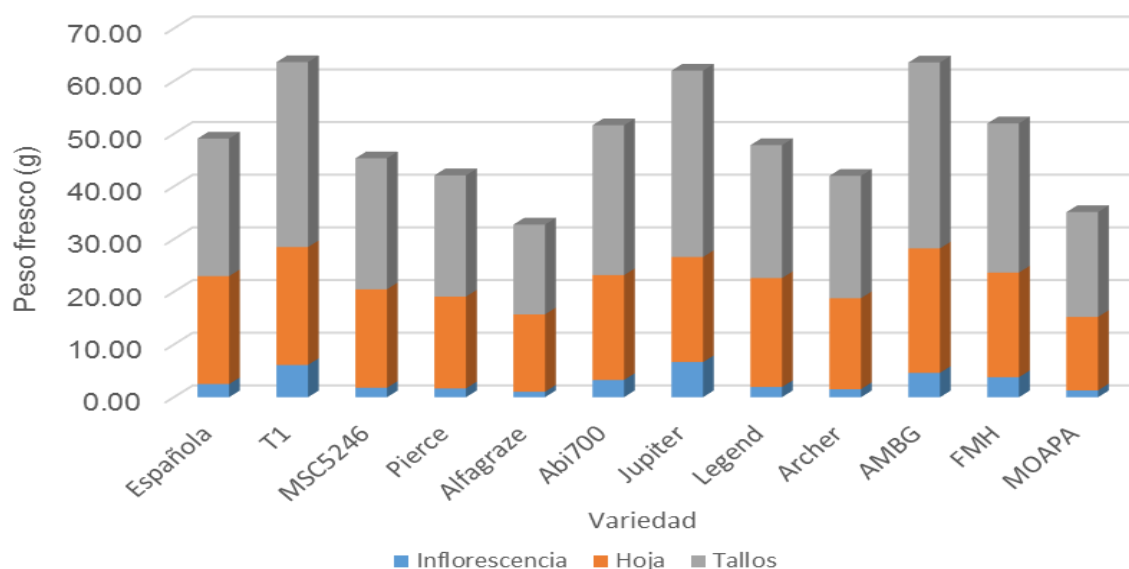


Figura 4. Promedio de peso de los diferentes componentes de la planta obtenidos para las variedades cultivadas en Mixquiahuala, Hidalgo.

En el Cuadro 6 se presentan los niveles de significancia para los efectos considerados en los modelos de análisis de cada una de las variables de respuesta analizadas.

Cuadro 6. Modelos lineales utilizados para cada una de las variables de respuesta analizadas. Los valores de “p” para cada componente se indican en su celda correspondiente.

Var	L	C	Var	L*C	L*Var	C*Var	L*C*Var
PC	<0.0001	<0.0001	0.0002	<0.0001			0.0006
FDA	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0003	0.0047	
FDN	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		0.0010	
PInflo	0.0132	<0.0001	<0.0001	<0.0001			
PTallos	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001			
PHoja	0.7382	<0.0001	0.0173	<0.0001		0.1007	
Pparcela	0.2331	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		

Var: variable; PC: proteína cruda; FDA: fibra detergente ácida; FDN: fibra detergente neutro; PInflo: peso de inflorescencia; PTallos: peso de los tallos; PHoja: peso de hojas; Pparcela: peso total de la parcela; L: localidad; C: corte (medidas repetidas); Var: variedad; L*C: localidad por corte; L*Var: localidad por variedad; C*Var: corte por variedad.

Las medias de mínimos cuadrados (LSM) de componentes morfológicos para rendimiento entre genotipos (Cuadro 7), para mayor y menor peso de inflorescencia ($p<0.05$) fueron la población recombinante T1 y Alfagraze, respectivamente; para mayor y menor peso de hoja ($p<0.05$) fueron el compuesto familia recombinante (AMBG) y alfagraze, respectivamente; para mayor y menor peso de tallos ($p<0.05$) fueron la población recombinante T1 y Alfagraze, respectivamente; y para mayor peso de parcela ($p<0.05$) fue el compuesto de familias de medios hermanos (FMH) con 11,048 g y el menor Alfagraze con 2,886 g. La variedad Alfagraze tuvo las menores acumulaciones de cada componente morfológico, en ambas localidades, indicando que es una variedad de poco rendimiento.

Con relación al contenido de proteína, FDN y FDA, se encontró que la variedad Alfagraze tuvo los mayores porcentajes promedio en cuatro cortes para proteína cruda (24.7%), y el de menor porcentaje fue Júpiter (21.9). De la misma manera, la variedad con mayor contenido de fibra detergente neutro y ácido fue el compuesto de familias de medios hermanos (FMH) con 32.3 y 22.2 %, respectivamente. De la misma manera, la variedad con menor FDN y FDA fue Alfagraze con 27 y 17.8%, respectivamente.

Cuadro 7. Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g), fibra detergente neutro (FDN, %), fibra detergente ácido (FDA, %) y proteína cruda (PC, %) para las diferentes variedades cultivadas en Chapingo, Méx. y Mixquiahuala, Hgo.

Var	PInflo	PHoja	PTallos	Pparcela	FDN	FDA	PC
Española	2.05 $\pm$ 0.53 ^{bc}	20.2 $\pm$ 1.11 ^{ab}	21.2 $\pm$ 1.55 ^{bcd}	8546 $\pm$ 430 ^{bcd}	29.7 $\pm$ 0.42 ^{bc}	20.2 $\pm$ 0.34 ^{bc}	22.6 $\pm$ 0.47 ^{abc}
T1	5.53 $\pm$ 0.53 ^a	21.2 $\pm$ 1.11 ^{ab}	30.1 $\pm$ 1.55 ^a	9501 $\pm$ 430 ^{abc}	31.4 $\pm$ 0.42 ^{ab}	21.9 $\pm$ 0.34 ^{ab}	23.2 $\pm$ 0.47 ^{abc}
MSC5246	1.82 $\pm$ 0.78 ^{abc}	20.4 $\pm$ 1.64 ^{ab}	23.2 $\pm$ 2.29 ^{bcd}	5766 $\pm$ 637 ^{ef}	27.2 $\pm$ 0.61 ^d	18.4 $\pm$ 0.50 ^e	24.3 $\pm$ 0.69 ^{abc}
Pierce	2.14 $\pm$ 0.59 ^{abc}	21.7 $\pm$ 1.25 ^a	24.8 $\pm$ 1.75 ^{abc}	4876 $\pm$ 487 ^{fg}	30.9 $\pm$ 0.47 ^{abc}	21.1 $\pm$ 0.38 ^{abc}	22.9 $\pm$ 0.53 ^{abc}
Alfagraz	1.42 $\pm$ 0.59 ^{bc}	15.9 $\pm$ 1.26 ^b	16.0 $\pm$ 1.76 ^d	2886 $\pm$ 487 ^g	27.0 $\pm$ 0.47 ^d	17.8 $\pm$ 0.39 ^e	24.9 $\pm$ 0.53 ^a
Abi700	3.44 $\pm$ 0.59 ^{ab}	20.8 $\pm$ 1.25 ^{ab}	26.2 $\pm$ 1.75 ^{abc}	7679 $\pm$ 487 ^{cde}	30.7 $\pm$ 0.47 ^{abc}	20.7 $\pm$ 0.38 ^{bc}	22.7 $\pm$ 0.53 ^{abc}
Júpiter	4.92 $\pm$ 0.53 ^{abc}	19.9 $\pm$ 1.11 ^{ab}	31.6 $\pm$ 1.55 ^a	10552 $\pm$ 430 ^{ab}	31.9 $\pm$ 0.42 ^a	22.3 $\pm$ 0.34 ^a	21.9 $\pm$ 0.47 ^{bc}
Legend	1.50 $\pm$ 0.53 ^c	18.8 $\pm$ 1.11 ^{ab}	19.9 $\pm$ 1.55 ^{cd}	8420 $\pm$ 430 ^{bcd}	27.4 $\pm$ 0.42 ^d	18.4 $\pm$ 0.34 ^{de}	24.0 $\pm$ 0.46 ^{ab}
Archer	1.91 $\pm$ 0.55 ^{bc}	18.9 $\pm$ 1.16 ^{ab}	20.3 $\pm$ 1.62 ^{cd}	6915 $\pm$ 451 ^{def}	28.7 $\pm$ 0.44 ^{dc}	19.6 $\pm$ 0.36 ^{cd}	23.3 $\pm$ 0.48 ^{abc}
AMBG	3.50 $\pm$ 0.53 ^{bc}	21.7 $\pm$ 1.11 ^{ab}	29.9 $\pm$ 1.55 ^a	9552 $\pm$ 430 ^{abc}	31.4 $\pm$ 0.42 ^{ab}	21.7 $\pm$ 0.34 ^{ab}	23.2 $\pm$ 0.47 ^{abc}
FMH	3.75 $\pm$ 0.53 ^{ab}	19.9 $\pm$ 1.11 ^{ab}	28.3 $\pm$ 1.55 ^{ab}	11048 $\pm$ 430 ^a	32.3 $\pm$ 0.42 ^a	22.2 $\pm$ 0.34 ^a	22.8 $\pm$ 0.47 ^{abc}
MOAPA	1.75 $\pm$ 0.76 ^{bc}	16.2 $\pm$ 1.61 ^{ab}	20.4 $\pm$ 2.26 ^{cd}	5725 $\pm$ 626 ^{efg}	31.3 $\pm$ 0.60 ^{abc}	21.7 $\pm$ 0.49 ^{abc}	22.0 $\pm$ 0.68 ^c
DMS $\alpha=0.05$	2.63	5.55	7.77	2155	2.08	1.70	2.33

Medias de mínimos cuadrados con literal diferente entre columnas indica diferencia ($p < 0.05$) entre variedades.

DMS; Diferencia significativa mínima

3.5.2. Inflorescencia

La inflorescencia en alfalfa está correlacionada con la producción de semilla, es un parámetro fácil de utilizar para la selección en mejoramiento genético (Bolaños *et al.*, 2004; Huyghe, 2001). Por otra parte, la inflorescencia es utilizada como una señal de maduración, y reduciendo los niveles de floración se puede controlar la aparición de malas hierbas (Sevilla y Agnusdei, 2016; Raoofi *et al.*, 2016). Es por esto que es importante determinar el peso de inflorescencia de las variedades mejoradas de alfalfa en las dos regiones de evaluación.

Las medias de mínimos cuadrados para componentes morfológicos por localidad se presentan en el Cuadro 8. En relación con el peso de inflorescencias por planta, las variedades con mayor y menor acumulación de inflorescencias fueron la población recombinante T1 y Legend para la localidad de Chapingo, Méx, mientras que para Mixquiahuala fueron Júpiter y Moapa-69, respectivamente. La mayor acumulación floral fue más notoria previo a la época de lluvia, de febrero a mayo, aunque también a finales de la época de lluvias y previo a la época invernal (Alarcón *et al.*, 2011). Con respecto al efecto de corte sobre el peso de inflorescencia (cuadro 9a-b), se encontraron diferencias ($p < 0.05$) para los cortes 2, 3 y 4 en la localidad de Chapingo, con una acumulación floral para todas las variedades y genotipos evaluados; aunque en el corte 1 solo presentaron inflorescencias las variedades Población Recombinante T1, Júpiter, Archer y Compuesto de Familia de Medios Hermanos (AMBG). La fecha de muestreo del corte 3 (16 de mayo, 2015) fue la que presentó una mayor acumulación de inflorescencias en la cual la variedad con mayor acumulación fue Población Recombinante T1 con 11.4 ± 1.48 g; indicando que la población puede ser una alternativa de producción de semilla para la región de Chapingo y Mixquiahuala.

En la localidad de Mixquiahuala (Cuadro 10a, b) se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre cortes, principalmente entre los cortes 3 y 4, y las variedades que tuvieron nula acumulación floral en el corte 3 fueron Alfagraz y Archer y para el corte 4 solamente Alfagraz. El corte 1 presentó mayor acumulación de inflorescencias, pero no hubo diferencias significativas entre variedades.

El mayor periodo de floración de la alfalfa en Valles Altos Centrales de México es durante la primavera, sin importar la localidad dentro de esta región, como se observó en las localidades estudiadas. Fombelida (2001) reporta una relación estrecha entre la falta de riego con una producción rápida de flor por lo que esta información se corrobora, ya que en el mes anterior al corte 3 se obtuvo menor riego por cuestiones ajenas al experimento en Chapingo; también el autor reporta que existe relación entre el aumento de temperatura y el adelanto de la floración, debido a que acelera el desarrollo de la planta, una estrategia para la disminución de temperatura fue el riego continuo que aminora el aumento de temperatura en la base de la planta. Según Mendoza *et al.* (2010) el aumento de la inflorescencia se ve afectada por la disminución en el periodo de corte, sin embargo en Mixquiahuala las condiciones de humedad y temperatura son las idóneas para el crecimiento vegetativo de la planta, sin importar la humedad en relación con la disminución de la acumulación de inflorescencias.

3.5.3. Rendimiento de hoja

Uno de los principales puntos a considerar en el mejoramiento genético de alfalfa es la relación hoja:tallo ya que esta relación implica el aumento en la digestibilidad y por ende el aumento del valor nutritivo de este producto forrajero (Calser, 2001). Además, mientras la maduración de la planta aumenta, la relación hoja:tallo, digestibilidad y contenido de energía neta disminuyen, lo que permite utilizarlo como indicador para considerar el desarrollo de la planta (Yari *et al.*, 2012; Islam *et al.*, 2011).

En la localidad de Chapingo se determinó que la variedad que obtuvo el mayor peso ($p < 0.05$) de hoja fue Pierce y la variedad con menor peso fue Legend (ver, Cuadro 8). Con respecto al efecto de corte (Cuadro 9a-b) se observaron diferencias ($p < 0.05$) entre variedades para el corte tres. La variedad Española presentó los mayores pesos de hoja en los primeros dos cortes, la variedad Legend en el corte dos y la variedad MSC5246 en el corte cuatro. Por otra parte, la variedad mejorada que presentó mayor peso de hoja en los primeros tres cortes fue AMBG. Al igual que Rojas (2011) y Mendoza *et al.* (2010) se observó

que los mayores aportes de hoja son en invierno y van disminuyendo hasta el último corte en verano. En el corte uno, realizado en invierno, se obtuvo el mayor peso de hoja y la variedad con mayor peso fue Española.

En la localidad de Mixquiahuala la variedad que presentó mayor peso de hoja ($p < 0.05$) fue AMBG y la de menor MOAPA-69. Con respecto al efecto de corte (Cuadro 10a-b) se observaron diferencias ($p < 0.05$) entre variedades para los cortes tres y cuatro. Las variedades mejoradas FMH y AMBG fueron las que presentaron mayor peso de hoja en el corte tres y cuatro respectivamente; la variedad Legend fue para el corte 1. A diferencia de Chapingo en esta localidad, en el corte dos, se determinó el mayor peso de hojas y la variedad mejorada con mayor peso fue AMBG.

Ya que la alfalfa es utilizada principalmente para los bovinos lecheros debido al alto valor nutritivo de sus hojas (Printz *et al.*, 2015) es un punto importante que se debe de tomar en la maduración de las hojas. Se puede observar que el peso de la hoja fue diferente entre localidades, variedades y cortes. McGraw y Nelson (2003) mencionan que se debe considerar la madurez de la planta, ya que al aumentar la madurez se disminuye la calidad de la hoja, por lo que se tiene que determinar la relación entre la época de corte, días de corte tomando en cuenta el rendimiento de la variedad.

3.5.4. Rendimiento de tallos

La calidad del tallo disminuye a mayor velocidad que la calidad de la hoja, por lo que el desarrollo de la planta y la relación hoja-tallo son de gran importancia para la digestibilidad. Al mismo tiempo el contenido de energía neta tiende a disminuir debido a la maduración de la planta (McGraw y Nelson, 2003; Islam *et al.*, 2011; Yari *et al.*, 2012).

En Chapingo el mayor peso ($p < 0.05$) de tallo correspondió a FMH y el menor a Legend (Cuadro 8). Con respecto al efecto de corte (Cuadro 9a, b) se observaron diferencias ($p < 0.05$) para el corte uno y tres. Los mayores pesos de tallo se

observaron en la variedad Júpiter en el corte uno, en T1 para el corte tres, y en FMH para el corte dos y cuatro. Se observó un incremento en el peso de los tallos conforme se acercó el verano, obteniendo el mayor peso de tallos en esta temporada. Mendoza *et al.* (2010) reportó que la estación con mayor aporte de tallo fue en verano debido a la cantidad de agua y el aumento de temperatura generando las condiciones idóneas para el desarrollo de la planta.

En Mixquiahuala las variedades con mayor peso de tallo ($p < 0.05$) fueron Júpiter, AMBG y T1, pertenecientes a un grupo específico estadístico, y con el menor Alfagraze. Con respecto al efecto de corte (Cuadro 10a, b) se observaron diferencias ($p < 0.05$) entre variedades para los cortes dos, tres y cuatro. La variedad con mayor peso de tallo en el corte dos fue AMBG, en el corte tres fue FMH y en el corte cuatro fue Júpiter. El corte uno fue el que obtuvo el mayor peso de tallo, siendo la variedad Legend la más pesada.

La alfalfa es uno de los principales alimentos para bovinos lecheros a nivel mundial, por lo que el desarrollo de la planta es de gran importancia ya que conforme avanza la madurez de los tallos hay una mayor pérdida de valor nutritivo (Printz *et al.*, 2015, McGraw y Nelson, 2003). En Mixquiahuala se observó que al llegar la época de lluvias la alfalfa disminuyó su rendimiento.

3.5.5. Rendimiento de la parcela

En cuanto al rendimiento de la parcela, se puede observar en los componentes morfológicos estudiados que la presencia de lluvia en días previos al corte afectó la respuesta productiva de la alfalfa (Alarcón *et al.*, 2004)

En Chapingo se observó que el mayor peso de parcela ($p < 0.05$) fue para FMH y el menor para Alfagraze (Cuadro 8). Con respecto al efecto de corte (Cuadro 9a, b) se observaron diferencias entre variedades ($p < 0.05$) para los cortes uno, dos y tres. La variedad que presentó mayor peso de parcela en el corte uno fue Júpiter; en el corte dos, tres y cuatro fue FMH.

En Mixquiahuala se observó que la variedad con mayor peso de parcela ($p < 0.05$) fue AMBG y Alfagraze con el menor. Con respecto al efecto de corte (Cuadro 10a, b) presentaron diferencias entre variedades ($p < 0.05$) para los cuatro cortes. La variedad con mayor peso en todos los cortes fue AMBG. Bauder *et al.* (1978) mencionan que la producción de alfalfa depende de la humedad de suelo debido a la relación de la humedad y variedad, ya que la alfalfa presenta una alta transpiración. El cuarto corte se realizó en el mes de agosto, por lo que presentó menor peso de parcela en todas las variedades estudiadas (Cuadro 9b). Esto se puede deber a la cantidad de lluvia, Alarcón *et al.* (2004) observó que la presencia de lluvia en días previos al corte afectó la respuesta productiva de la alfalfa. Por su parte Riday y Brummer (2005) mencionan que la respuesta productiva depende principalmente en la carga genética de cada variedad y subespecie, más que en su complementariedad genética entre estas, siendo afectadas por variaciones climatológicas extremas. Lamb *et al.* (2006) por su parte sugieren que los aumentos del rendimiento de alfalfa son principalmente al resultado de una mejor resistencia a enfermedades, probablemente debido a la mejora soportar la longevidad. Por su parte Thivierge *et al.* (2016) mencionan que los cambios más evidentes bajo climas futuros proyectados y sin adaptación, los rendimientos de forraje anual se incrementaron en la zona más fría y disminuye en la zona con mayor temperatura. En ambas áreas, el rendimiento de primer corte se incrementó debido a la creciente acumulación grados-día, mientras que el rendimiento rebrote disminuyó debido a mayores tensiones agua y temperatura, y por otra parte en la zona más caliente el valor nutritivo del forraje se redujo el valor nutritivo.

Cuadro 8. Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g), para las diferentes variedades por localidad, Chapingo, Méx. y Mixquiahuala, Hgo.

Variedad	Chapingo, Méx.				Mixquiahuala, Hgo.			
	PInflo (g)	PHoja (g)	PTallos (g)	Pparcela (g)	PInflo	PHoja	PTallos	Pparcela
Española	1.60 $\pm$ 0.52 ^{bc}	19.8 $\pm$ 1.49 ^{ab}	16.3 $\pm$ 1.99 ^{cde}	6703 $\pm$ 510 ^{cde}	2.5 $\pm$ 0.93 ^{ab}	20.5 $\pm$ 1.51 ^{ab}	26.1 $\pm$ 2.38 ^{ab}	10388 $\pm$ 761 ^{abc}
T1	4.93 $\pm$ 0.52 ^a	20.0 $\pm$ 1.49 ^{ab}	25.1 $\pm$ 1.99 ^{abc}	8499 $\pm$ 510 ^{abc}	6.13 $\pm$ 0.93 ^{ab}	22.4 $\pm$ 1.51 ^{ab}	35.1 $\pm$ 2.38 ^a	10504 $\pm$ 761 ^{abc}
MSC5246	2.34 $\pm$ 0.56 ^{abc}	21.4 $\pm$ 1.58 ^{ab}	20.9 $\pm$ 2.12 ^{abcde}	6536 $\pm$ 542 ^{cde}	1.27 $\pm$ 1.69 ^{ab}	19.5 $\pm$ 2.74 ^{ab}	25.4 $\pm$ 4.31 ^{ab}	4998 $\pm$ 1375 ^{de}
Pierce	2.90 $\pm$ 0.52 ^{abc}	25.4 $\pm$ 1.49 ^a	26.0 $\pm$ 1.99 ^{ab}	7875 $\pm$ 510 ^{bcd}	1.37 $\pm$ 1.17 ^{ab}	17.9 $\pm$ 1.89 ^{ab}	23.6 $\pm$ 2.98 ^{ab}	1876 $\pm$ 949 ^e
Alfagraze	1.53 $\pm$ 0.52 ^{bc}	17.43 $\pm$ 1.49 ^b	15.3 $\pm$ 1.99 ^{de}	5049 $\pm$ 510 ^e	1.32 $\pm$ 1.17 ^b	14.3 $\pm$ 1.89 ^b	16.8 $\pm$ 2.98 ^b	722 $\pm$ 952 ^e
Abi700	3.57 $\pm$ 0.52 ^{ab}	21.8 $\pm$ 1.49 ^{ab}	24.3 $\pm$ 1.99 ^{abcd}	7161 $\pm$ 510 ^{cde}	3.31 $\pm$ 1.17 ^{ab}	19.8 $\pm$ 1.89 ^{ab}	28.2 $\pm$ 2.98 ^{ab}	8199 $\pm$ 949 ^{bcd}
Júpiter	3.15 $\pm$ 0.52 ^{abc}	19.9 $\pm$ 1.49 ^{ab}	27.8 $\pm$ 1.99 ^a	10017 $\pm$ 510 ^{ab}	6.68 $\pm$ 0.93 ^a	19.9 $\pm$ 1.52 ^{ab}	35.4 $\pm$ 2.38 ^a	11087 $\pm$ 761 ^{ab}
Legend	1.05 $\pm$ 0.52 ^c	16.9 $\pm$ 1.49 ^b	14.6 $\pm$ 1.99 ^e	6050 $\pm$ 510 ^{de}	1.95 $\pm$ 0.93 ^{ab}	20.7 $\pm$ 1.52 ^{ab}	25.2 $\pm$ 2.38 ^{ab}	10790 $\pm$ 761 ^{abc}
Archer	1.79 $\pm$ 0.56 ^{bc}	21.4 $\pm$ 1.58 ^{ab}	18.1 $\pm$ 2.12 ^{bcde}	6054 $\pm$ 542 ^{cde}	1.91 $\pm$ 0.97 ^{ab}	16.6 $\pm$ 1.58 ^{ab}	22.7 $\pm$ 2.48 ^{ab}	7804 $\pm$ 793 ^{abc}
AMBG	2.37 $\pm$ 0.52 ^{bc}	19.8 $\pm$ 1.49 ^{ab}	24.4 $\pm$ 1.99 ^{abcd}	6344 $\pm$ 510 ^{cde}	4.63 $\pm$ 0.93 ^{ab}	23.6 $\pm$ 1.51 ^a	35.3 $\pm$ 2.38 ^a	12759 $\pm$ 761 ^a
FMH	3.68 $\pm$ 0.52 ^{ab}	20.1 $\pm$ 1.49 ^{ab}	28.3 $\pm$ 1.99 ^a	10745 $\pm$ 510 ^a	3.82 $\pm$ 0.93 ^{ab}	19.9 $\pm$ 1.51 ^{ab}	28.3 $\pm$ 2.38 ^{ab}	11349 $\pm$ 761 ^{ab}
Moapa	2.27 $\pm$ 0.52 ^{bc}	18.2 $\pm$ 1.49 ^b	20.4 $\pm$ 1.99 ^{abcde}	5140 $\pm$ 510 ^e	1.23 $\pm$ 1.68 ^{ab}	14.2 $\pm$ 2.72 ^b	20.4 $\pm$ 4.29 ^b	6310 $\pm$ 1369 ^{cd}
DMS $\alpha=0.05$	2.50	7.12	9.54	2439	5.3989	8.7574	13.793	4401.6

Medias de mínimos cuadrados con literal diferente entre columnas indica diferencia ($p < 0.05$) entre variedades.

DMS; Diferencia significativa mínima

Cuadro 9a. Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g) para las variedades cultivadas en Chapingo, Méx., en el primer y segundo corte.

Variedad	Corte 1 (15/2/15)				Corte 2 (30/3/2015)			
	PInflo	PHoja	PTallos	Pparcela	PInflo	PHoja	PTallos	Pparcela
Española	*	30.1	16.00 ^b	4351 ^b	0.67 ^{bc}	18.7	14.5	7186 ^{ab}
T1	0.87	24.3	18.73 ^{ab}	6231 ^{ab}	1.80 ^{ab}	21.7	24.1	9963 ^{ab}
MSC5246	*	24.3	16.20 ^b	3896 ^b	0.60 ^{bc}	20.6	16.7	7239 ^{ab}
Pierce	*	36.6	26.13 ^{ab}	6015 ^{ab}	1.00 ^{abc}	23.2	22.7	9451 ^{ab}
Alfagraze	*	25.6	14.07 ^b	3629 ^b	0.67 ^{bc}	15.2	14.1	5617 ^b
Abi700	*	27.6	23.73 ^{ab}	4277 ^b	1.07 ^{abc}	22.7	21.3	7438 ^{ab}
Júpiter	0.27	35.9	37.27 ^a	9303 ^a	0.93 ^{bc}	21.2	28.0	12428 ^a
Legend	*	20.5	11.47 ^b	3892 ^b	0.40 ^c	13.7	13.3	6964 ^{ab}
Archer	0.07	28.9	14.93 ^b	4147 ^b	0.87 ^{bc}	17.5	14.5	6941 ^{ab}
AMBG	0.53	22.7	17.67 ^{ab}	4495 ^b	1.40 ^{abc}	20.3	22.5	7035 ^{ab}
FMH	*	27.3	30.27 ^{ab}	8849 ^a	2.27 ^a	23.3	28.5	12678 ^a
MOAPA	*	22.0	19.47 ^{ab}	3091 ^b	0.67 ^{bc}	15.5	13.3	5975 ^b
EEM	± 0.26	± 3.67	± 3.39	± 822	± 0.26	± 2.45	± 3.73	± 1164
DMS $_{\alpha=0.05}$	1.33	18.9	20.6	4226	1.33	12.6	19.2	5989

Medias de mínimos cuadrados con literal diferente entre columnas indica diferencia ($p < 0.05$) entre variedades.

*No presente; DMS; Diferencia significativa mínima

Cuadro 9b. Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g) para las variedades cultivadas en Chapingo, Méx., en el tercer y cuarto corte.

Variedad	Corte 3 (16/5/2015)				Corte 4 (30/6/2015)			
	PInflo	PHoja	PTallos	Pparcela	PInflo	PHoja	PTallos	Pparcela
Española	5.13 ^{ab}	19.5 ^{abc}	18.5 ^{ab}	7552 ^{ab}	0.60 ^c	11	16.1	7723
T1	11.40 ^a	19.5 ^{abc}	31.3 ^{ab}	9205 ^{ab}	5.67 ^a	14.6	26.1	8595
MSC5246	8.27 ^{ab}	23.2 ^{ab}	29.3 ^{ab}	6623 ^b	0.93 ^{bc}	14.5	16.7	8097
Pierce	8.40 ^{ab}	26.6 ^a	30 ^{ab}	7897 ^{ab}	2.2 ^{abc}	15.3	25.3	8139
Alfagraze	4.87 ^{ab}	16.6 ^{bc}	18.4 ^{ab}	5077 ^b	0.6 ^c	12.3	14.6	5873
Abi700	10.93 ^a	23.1 ^{ab}	30.4 ^{ab}	7383 ^{ab}	2.27 ^{abc}	13.9	21.5	9544
Júpiter	7.33 ^{ab}	10.5 ^c	22.7 ^{ab}	8267 ^{ab}	4.07 ^{abc}	11.9	23.2	10070
Legend	3.13 ^b	19.9 ^{ab}	16.8 ^b	6141 ^b	0.67 ^c	13.6	16.7	7204
Archer	5.60 ^{ab}	22.8 ^{ab}	22.3 ^{ab}	6226 ^b	0.47 ^c	13.2	17.5	6789
AMBG	5.20 ^{ab}	27.3 ^a	34.5 ^a	6632 ^b	2.33 ^{abc}	9.1	23.1	7216
FMH	7.73 ^{ab}	16.5 ^{bc}	27.9 ^{ab}	10947 ^a	4.73 ^{ab}	13.3	26.6	10507
MOAPA	6.33 ^{ab}	20.4 ^{ab}	24.9 ^{ab}	5526 ^b	2.07 ^{abc}	15.1	24.1	5969
EEM	± 1.48	± 1.81	± 3.29	± 805	± 0.77	± 2.46	± 3.48	± 1212
DMS $\alpha=0.05$	7.61	9.33	16.91	4142	3.94	12.67	17.91	6233

Medias de mínimos cuadrados con literal diferente entre columnas indica diferencia ($p < 0.05$) entre variedades.

DMS; Diferencia significativa mínima

Cuadro 10a. Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g) para las variedades cultivadas en Mixquiahuala, Hgo., en el primer y segundo corte.

Variedad	Corte 1 (1/5/2015)				Corte 2 (7/06/2015)			
	PInflo	PHoja	PTallos	Pparcela	PInflo	PHoja	PTallos	Pparcela
Española	6.73 $\pm$ 3.50	24.1 $\pm$ 3.95	28.5 $\pm$ 6.01	13610 $\pm$ 1882 ^{ab}	2.27 $\pm$ 0.93	26.3 $\pm$ 3.51	31.7 $\pm$ 4.16 ^{ab}	11651 $\pm$ 1841 ^{ab}
T1	14.73 $\pm$ 3.50	25.7 $\pm$ 3.95	43.7 $\pm$ 6.01	11617 $\pm$ 1882 ^{abc}	5.00 $\pm$ 0.93	30.9 $\pm$ 3.51	45.3 $\pm$ 4.16 ^a	12896 $\pm$ 1841 ^{ab}
MSC5246	1.89 $\pm$ 6.33	19.1 $\pm$ 7.14	24.3 $\pm$ 10.87	6913 $\pm$ 3401 ^{abc}	1.71 $\pm$ 1.68	27.2 $\pm$ 6.34	34.7 $\pm$ 7.52 ^{ab}	5544 $\pm$ 3327 ^{ab}
Pierce	3.86 $\pm$ 4.38	26.4 $\pm$ 4.94	34.6 $\pm$ 7.51	2654 $\pm$ 2350 ^{bc}	0.43 $\pm$ 1.16	21.3 $\pm$ 4.38	25.2 $\pm$ 5.2 ^{ab}	1946 $\pm$ 2298 ^b
Alfagraz	5.36 $\pm$ 4.39	20.7 $\pm$ 4.95	27.1 $\pm$ 7.52	47 $\pm$ 2356 ^c	0.04 $\pm$ 1.16	20.7 $\pm$ 4.39	22.0 $\pm$ 5.21 ^{ab}	1596 $\pm$ 2304 ^b
Abi700	10.38 $\pm$ 4.38	24.5 $\pm$ 4.94	42.4 $\pm$ 7.51	10143 $\pm$ 2350 ^{abc}	2.32 $\pm$ 1.16	30.0 $\pm$ 4.38	37.9 $\pm$ 5.2 ^{ab}	10280 $\pm$ 2298 ^{ab}
Júpiter	15.0 $\pm$ 3.50	22.7 $\pm$ 3.95	40.8 $\pm$ 6.01	14107 $\pm$ 1882 ^{ab}	5.93 $\pm$ 0.93	25.5 $\pm$ 3.51	40.2 $\pm$ 4.16 ^{ab}	11740 $\pm$ 1841 ^{ab}
Legend	6.73 $\pm$ 3.50	37.0 $\pm$ 3.95	48.5 $\pm$ 6.01	15737 $\pm$ 1882 ^a	0.80 $\pm$ 0.93	21.1 $\pm$ 3.51	24.9 $\pm$ 4.16 ^{ab}	12883 $\pm$ 1841 ^{ab}
Archer	5.40 $\pm$ 3.65	23.9 $\pm$ 4.12	34.8 $\pm$ 6.26	10524 $\pm$ 1961 ^{abc}	1.41 $\pm$ 0.97	22.7 $\pm$ 3.65	29.9 $\pm$ 4.34 ^{ab}	9724 $\pm$ 1918 ^{ab}
AMBG	9.80 $\pm$ 3.50	20.6 $\pm$ 3.95	33.7 $\pm$ 6.01	17076 $\pm$ 1882 ^a	4.27 $\pm$ 0.93	37.5 $\pm$ 3.51	48.1 $\pm$ 4.16 ^a	14327 $\pm$ 1841 ^a
FMH	10.07 $\pm$ 3.50	22.6 $\pm$ 3.95	33.9 $\pm$ 6.01	14372 $\pm$ 1882 ^a	2.27 $\pm$ 0.93	25.9 $\pm$ 3.51	33.4 $\pm$ 4.16 ^{ab}	13084 $\pm$ 1841 ^{ab}
MOAPA	1.23 $\pm$ 6.30	22.8 $\pm$ 7.11	33.7 $\pm$ 10.82	7697 $\pm$ 3386 ^{abc}	2.56 $\pm$ 1.67	14.8 $\pm$ 6.31	14.2 $\pm$ 7.49 ^b	7913 $\pm$ 3311 ^{ab}
DMS $\alpha=0.05$	22.87	25.79	39.23	12280	6.06	22.9	27.2	12010

Medias de mínimos cuadrados con literal diferente entre columnas indica diferencia ($p < 0.05$) entre variedades.

DMS; Diferencia significativa mínima

Cuadro 10b. Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para peso de inflorescencias (PInflo, g), peso de hoja (PHoja, g), peso de tallos (PTallos, g), peso de la parcela (Pparcela, g) para las variedades cultivadas en Mixquiahuala, Hgo., en el tercer y cuarto corte.

Variedad	Corte 3 (8/7/2015)				Corte 4 (8/8/2015)			
	PInflo	PHoja	PTallos	Pparcela	PInflo	PHoja	PTallos	Pparcela
Española	0.27 $\pm$ 0.18 ^b	17.5 $\pm$ 1.50 ^{ab}	25.1 $\pm$ 2.54 ^{ab}	9340 $\pm$ 1367 ^{ab}	0.73 $\pm$ 0.59 ^b	14.0 $\pm$ 1.82 ^{ab}	19.3 $\pm$ 2.98 ^{abc}	6953 $\pm$ 960 ^{ab}
T1	1.47 $\pm$ 0.18 ^a	16.7 $\pm$ 1.50 ^{ab}	23.0 $\pm$ 2.54 ^{ab}	9281 $\pm$ 1367 ^{ab}	3.33 $\pm$ 0.59 ^{ab}	16.3 $\pm$ 1.82 ^{ab}	28.5 $\pm$ 2.98 ^{abc}	8222 $\pm$ 960 ^a
MSC5246	0.23 $\pm$ 0.33 ^b	14.8 $\pm$ 2.70 ^{ab}	20.8 $\pm$ 4.59 ^{ab}	4156 $\pm$ 2470 ^{ab}	1.25 $\pm$ 1.07 ^{ab}	17.0 $\pm$ 3.29 ^{ab}	21.9 $\pm$ 5.39 ^{abc}	3379 $\pm$ 1736 ^{ab}
Pierce	0.51 $\pm$ 0.23 ^{ab}	14.0 $\pm$ 1.87 ^{ab}	20.8 $\pm$ 3.17 ^{ab}	1818 $\pm$ 1706 ^b	0.69 $\pm$ 0.74 ^b	10.2 $\pm$ 2.27 ^{ab}	13.7 $\pm$ 3.72 ^{bc}	1087 $\pm$ 1199 ^b
Alfagraze	*	6.00 $\pm$ 1.87 ^b	6.40 $\pm$ 3.18 ^b	473 $\pm$ 1710 ^b	*	9.60 $\pm$ 2.28 ^{ab}	11.6 $\pm$ 3.73 ^c	772 $\pm$ 1202 ^b
Abi700	0.1 $\pm$ 0.23 ^b	14.5 $\pm$ 1.87 ^{ab}	19.5 $\pm$ 3.17 ^{ab}	7134 $\pm$ 1706 ^{ab}	0.43 $\pm$ 0.74 ^b	10.0 $\pm$ 2.27 ^{ab}	13.0 $\pm$ 3.72 ^{abc}	5239 $\pm$ 1199 ^{ab}
Júpiter	1.07 $\pm$ 0.18 ^{a^b}	16.3 $\pm$ 1.5 ^{ab}	27.2 $\pm$ 2.54 ^a	9691 $\pm$ 1367 ^{ab}	4.73 $\pm$ 0.59 ^a	15.3 $\pm$ 1.82 ^{ab}	33.3 $\pm$ 2.98 ^a	8811 $\pm$ 960 ^a
Legend	0.13 $\pm$ 0.18 ^b	11.4 $\pm$ 1.5 ^{ab}	12.5 $\pm$ 2.54 ^{ab}	7790 $\pm$ 1367 ^{ab}	0.13 $\pm$ 0.59 ^b	13.3 $\pm$ 1.82 ^{ab}	14.9 $\pm$ 2.98 ^{abc}	6751 $\pm$ 960 ^{ab}
Archer	*	8.1 $\pm$ 1.56 ^{ab}	11.1 $\pm$ 2.65 ^{ab}	5886 $\pm$ 1424 ^{ab}	0.92 $\pm$ 0.62 ^{ab}	11.9 $\pm$ 1.9 ^{ab}	14.9 $\pm$ 3.11 ^{abc}	5083 $\pm$ 1001 ^{ab}
AMBG	0.80 $\pm$ 0.18 ^{ab}	17.9 $\pm$ 1.50 ^a	27.9 $\pm$ 2.54 ^a	11080 $\pm$ 1367 ^a	3.67 $\pm$ 0.59 ^{ab}	18.5 $\pm$ 1.82 ^a	31.5 $\pm$ 2.98 ^{ab}	8553 $\pm$ 960 ^a
FMH	0.67 $\pm$ 0.18 ^{ab}	18.0 $\pm$ 1.50 ^a	26.0 $\pm$ 2.54 ^{ab}	9831 $\pm$ 1367 ^{ab}	2.27 $\pm$ 0.59 ^{ab}	12.9 $\pm$ 1.82 ^{ab}	19.9 $\pm$ 2.98 ^{abc}	8111 $\pm$ 960 ^a
MOAPA	0.79 $\pm$ 0.33 ^{ab}	11.9 $\pm$ 2.69 ^{ab}	19.2 $\pm$ 4.57 ^{ab}	5546 $\pm$ 2458 ^{ab}	0.34 $\pm$ 1.06 ^b	7.50 $\pm$ 3.28 ^b	14.7 $\pm$ 5.36 ^c	4085 $\pm$ 1728 ^{ab}
DMS $\alpha=0.05$	1.19	9.76	16.6	8917	3.86	11.9	19.5	6267

Medias de mínimos cuadrados con literal diferente entre columnas indica diferencia ($p < 0.05$) entre variedades.

*No presente; DMS; Diferencia significativa mínima

3.5.6. Componentes de calidad nutritiva

La variabilidad en el valor nutritivo de la alfalfa está afectada por diversos factores intrínsecos, como madurez, altura de corte, edad del cultivo, entre otros, así como extrínsecos, como época, fertilidad del suelo, manejo de defoliación, entre otros. Pero un aspecto importante es que el suministro potencial de nutrientes para el animal se reduce con el avance de la madurez de la alfalfa, ya que la madurez disminuye la relación hoja:tallo, por consecuencia, el contenido de proteína y la digestibilidad disminuyen (Yari *et al.*, 2012).

El contenido de las fracciones de fibra (FDN y FDA) presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.001$) entre localidades y variedad. En Chapingo (Cuadro 11), la variedad Legend tuvo el menor porcentaje de FDN y FDA, mientras que el compuesto de Familias de Medios Hermanos (FMH) el mayor. En la localidad de Mixquiahuala, Hgo, la de menor porcentaje de FDN y FDA fue Alfagraze y la de mayor fracción en fibras fue Moapa-69. El efecto de fecha de corte (Cuadro 12) tuvo un efecto significativo en el contenido de componentes de fibra en cada variedad o población, siendo muy variable entre variedades y localidad; en promedio las variedades Legend y Moapa-69 en Chapingo, Méx., presentaron los menores contenido de fibra, pero sin incremento en el porcentaje de proteína cruda. En el caso de Mixquiahuala, Hgo. (Cuadro 13), las variedades MSC5246 y Alfagraze en el corte tres y cuatro, tuvieron los menores contenidos de fibra. El cuarto corte se realizó en Mixquiahuala, Hgo., durante agosto, 2015, y presentó menor porcentaje de FDN y FDA en todas las variedades estudiadas; esto se puede deber a la presencia de lluvia y el fotoperiodo, disminuyendo el crecimiento vegetativo corroborando lo que cita DePeters (1993), que un factor determinante para el patrón del crecimiento es el fotoperiodo así mismo Halim (1988) reporta que el la ralentización de la maduración y el crecimiento de la planta el estrés de agua representa un factor responsable de esto.

La relación existente en las variables nutritivas es grande. Varios autores han señalado que la maduración afecta la calidad de la alfalfa aumentando el porcentaje de FDN FDA y disminuyendo el de PC. En el Cuadro 11 se muestra

los contenidos de FDA y FDN, sin encontrar diferencias por la fecha del corte uno, dos y tres ($P>0.05$) en la localidad de Mixquiahuala, Hgo. Este comportamiento hace difícil predecir el comportamiento de la composición del forraje durante esta época, y puede atribuirse a la estabilidad estacional de la temperatura y el fotoperiodo en estas fechas, debido a que el desarrollo fenológico de la planta está relacionado con estos factores (DePeters, 1993; Douglas, 1981). Por otra parte, el desarrollo de la planta es un punto importante para el aumento de FDN y FDA (Yari *et al.*, 2012; Islam *et al.*, 2011) y debido a que los mayores contenidos se encuentran en los tallos como reporta Camacho y García (2003) los meses con mayores rendimientos de tallos fueron los que obtuvieron mayores porcentajes de FDN y FDA.

En relación con el contenido de proteína cruda por localidad (Cuadro 14) se encontraron diferencias ($P<0.001$), siendo mayor para Mixquiahuala que Chapingo, y las variedades con mayor porcentaje de proteína cruda fueron la Población Recombinante T1 y menor fue Moapa-69 en la localidad Chapingo, mientras que Alfagraz fue mayor y la variedad comercial Júpiter, ampliamente sembrada en el Valle del Mezquital, Hidalgo, tuvo el menor ($P<0.05$). La fecha de corte afectó el porcentaje de proteína, siendo notorio una reducción de proteína cruda conforme avanzaban la fecha de corte. La población 1 recombinante (T1) y población recombinante FMH (AMBG) tuvieron los mayores contenidos de proteína, alcanzando hasta 32.4% en el primer corte en Chapingo, Méx., con una variación de 13% entre el primero y cuarto corte. En la localidad de Mixquiahuala, Hgo., tuvieron diferencias entre variedades a través de los cuatro cortes, con excepción del segundo corte; la variedad Alfagraz destacó por un mayor contenido de proteína cruda.

Se identificó un efecto de interacción corte por variedad, siendo mayor el contenido de proteína en el primer corte en la localidad de Chapingo, y el tercer corte fue superior en la localidad de Mixquiahuala, Hgo., asumiendo que la temperatura en Chapingo fue mayor en los cortes subsecuentes favoreciendo la maduración de la planta y generando una acumulación menor de proteína. La

temperatura en Mixquiahuala en el mes de desarrollo del corte 3 fue menor, por ende, la acumulación de proteínas fue mayor que en los otros cortes. Camacho y García (2003) por su parte indican que el mayor contenido de proteína está presente en las hojas (25.9%), seguidas por la planta completa (23.5%) y los tallos (19.9%), corroborando los datos obtenidos que el mayor porcentaje de PC fue en invierno con una mayor producción de hojas y relación hoja:tallo.

Cuadro 11. Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para fibra detergente neutro (FDN, %), fibra detergente ácido (FDA, %) y proteína cruda (PC, %) para las diferentes variedades cultivadas en Chapingo, Méx. y Mixquiahuala, Hgo.

Variedad	Chapingo, Méx.			Mixquiahuala, Hgo.		
	FDN (%)	FDA (%)	PC (%)	FDN (%)	FDA (%)	PC (%)
Española	28.1 $\pm$ 0.59 ^{dbc}	18.8 $\pm$ 0.48 ^{cde}	22.2 $\pm$ 0.74 ^a	31.2 $\pm$ 0.61 ^{abc}	21.7 $\pm$ 0.5 ^{abc}	23.0 $\pm$ 0.42 ^{cde}
T1	29.9 $\pm$ 0.59 ^{ab}	20.5 $\pm$ 0.48 ^{abc}	23.6 $\pm$ 0.74 ^a	32.7 $\pm$ 0.61 ^{ab}	23.3 $\pm$ 0.5 ^a	22.8 $\pm$ 0.42 ^{cde}
MSC5246	26.9 $\pm$ 0.62 ^{dc}	17.5 $\pm$ 0.51 ^{de}	23.1 $\pm$ 0.78 ^a	27.4 $\pm$ 1.11 ^d	19.3 $\pm$ 0.91 ^{cd}	25.6 $\pm$ 0.76 ^{ab}
Pierse	29.9 $\pm$ 0.59 ^{ab}	20.0 $\pm$ 0.48 ^{abc}	21.7 $\pm$ 0.74 ^a	31.9 $\pm$ 0.77 ^{ab}	22.1 $\pm$ 0.63 ^{ab}	24.2 $\pm$ 0.52 ^{abcde}
Alfa graze	26.4 $\pm$ 0.59 ^d	17.2 $\pm$ 0.48 ^e	23.5 $\pm$ 0.74 ^a	27.6 $\pm$ 0.77 ^{dc}	18.4 $\pm$ 0.63 ^d	26.5 $\pm$ 0.52 ^a
Abi700	29.5 $\pm$ 0.59 ^{abc}	19.8 $\pm$ 0.48 ^{bcd}	21.5 $\pm$ 0.74 ^a	31.8 $\pm$ 0.77 ^{ab}	21.6 $\pm$ 0.63 ^{abc}	23.9 $\pm$ 0.52 ^{abcde}
Júpiter	31.8 $\pm$ 0.59 ^a	22.3 $\pm$ 0.48 ^a	21.6 $\pm$ 0.74 ^a	31.9 $\pm$ 0.61 ^{ab}	22.3 $\pm$ 0.5 ^{ab}	22.3 $\pm$ 0.42 ^{de}
Legend	25.5 $\pm$ 0.59 ^d	16.6 $\pm$ 0.48 ^e	22.9 $\pm$ 0.74 ^a	29.3 $\pm$ 0.61 ^{bcd}	20.2 $\pm$ 0.5 ^{bcd}	25.0 $\pm$ 0.42 ^{abc}
Archer	26.5 $\pm$ 0.62 ^d	17.7 $\pm$ 0.51 ^{de}	22.0 $\pm$ 0.78 ^a	30.8 $\pm$ 0.64 ^{abc}	21.5 $\pm$ 0.52 ^{abc}	24.7 $\pm$ 0.44 ^{abcd}
AMBG	30.2 $\pm$ 0.59 ^{ab}	20.8 $\pm$ 0.48 ^{abc}	23.4 $\pm$ 0.74 ^a	32.7 $\pm$ 0.61 ^{ab}	22.7 $\pm$ 0.5 ^{ab}	23.1 $\pm$ 0.42 ^{cde}
FMH	32.2 $\pm$ 0.59 ^a	22.0 $\pm$ 0.48 ^{ab}	22.4 $\pm$ 0.74 ^a	32.5 $\pm$ 0.61 ^{ab}	22.4 $\pm$ 0.5 ^{ab}	23.3 $\pm$ 0.42 ^{bcde}
Moapa	29.4 $\pm$ 0.59 ^{abc}	19.9 $\pm$ 0.48 ^{bc}	21.4 $\pm$ 0.74 ^a	33.3 $\pm$ 1.1 ^a	23.4 $\pm$ 0.91 ^a	22.6 $\pm$ 0.75 ^e
DMS $\alpha=0.05$	2.81	2.31	3.52	3.5567	2.9149	2.4193

Cuadro 12. Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para fibra detergente neutro (FDN, %), fibra detergente ácido (FDA, %) y proteína cruda (PC, %) para las variedades cultivadas en Chapingo, Méx. a través de los diferentes cortes.

	Corte 1 (15/2/15)			Corte 2 (30/3/2015)			Corte 3 (16/5/2015)			Corte 4 (30/6/2015)		
Variedad	FDN	FDA	PC	FDN	FDA	PC	FDN	FDA	PC	FDN	FDA	PC
Española	22.7 ^{bcd}	15.2 ^{bc}	25.6 ^{abc}	26.3 ^{ab}	17.3 ^{ab}	23.7	27.7 ^{ab}	17.9 ^{abcd}	20.4	35.7 ^{abcde}	24.5 ^{abc}	18.9 ^{bcd}
T1	25.7 ^{abc}	18.3 ^{ab}	32.4 ^a	29.2 ^{ab}	19.2 ^{ab}	23.5	29.1 ^{ab}	19.7 ^{abcd}	19.6	35.9 ^{abcd}	24.7 ^{ab}	18.9 ^{bcd}
MSC5246	22.3 ^{cd}	14.7 ^c	25.4 ^{abc}	25.1 ^b	16.9 ^{ab}	24.9	27.0 ^{ab}	16.8 ^{bcd}	20.9	32.2 ^{bcde}	21.2 ^{bcd}	21.6 ^{abc}
Pierce	24.7 ^{abc}	16.7 ^{abc}	21.3 ^c	29.2 ^{ab}	19.2 ^{ab}	25.8	29.4 ^{ab}	19.1 ^{abcd}	21.4	36.6 ^{abcd}	25.2 ^{ab}	18.5 ^{cd}
Alfagraze	22.5 ^{bcd}	15.4 ^{bc}	24.3 ^{bc}	26.1 ^{ab}	17.1 ^{ab}	25.0	25.8 ^b	16.6 ^{cd}	21.9	31.3 ^{de}	19.9 ^{cd}	22.6 ^a
Abi700	24.3 ^{abcd}	16.6 ^{abc}	22.5 ^{bc}	28.9 ^{ab}	18.2 ^{ab}	22.8	29.6 ^{ab}	20.4 ^{abc}	19.8	35.1 ^{abcde}	23.8 ^{abcd}	20.7 ^{abc}
Júpiter	27.1 ^a	18.7 ^a	23.1 ^{bc}	30.9 ^{ab}	22.7 ^a	25.5	31.2 ^a	21.5 ^a	20.7	37.8 ^{ab}	26.5 ^a	16.9 ^d
Legend	20.4 ^d	13.7 ^c	25.9 ^{abc}	26.6 ^{ab}	17.8 ^{ab}	23.1	25.1 ^b	15.7 ^d	20.8	30.0 ^e	19.3 ^d	22.0 ^{ab}
Archer	21.6 ^{cd}	14.5 ^c	22.7 ^{bc}	26.3 ^{ab}	17.8 ^{ab}	21.7	26.6 ^{ab}	17.9 ^{abcd}	21.6	31.5 ^{cde}	20.9 ^{bcd}	21.7 ^{ab}
AMBG	27.2 ^a	18.7 ^a	30.0 ^{ab}	28.3 ^{ab}	19.8 ^{ab}	22.2	28.1 ^{ab}	19.1 ^{abcd}	21.9	37.1 ^{abc}	25.5 ^{ab}	19.3 ^{bcd}
FMH	26.7 ^{ab}	18.3 ^{ab}	26.1 ^{abc}	33.5 ^a	22.3 ^{ab}	23.5	31.5 ^a	21.4 ^{ab}	20.3	36.9 ^{abcd}	26.1 ^a	19.9 ^{abcd}
MOAPA	23.3 ^{abcd}	15.9 ^{abc}	22.8 ^{bc}	24.4 ^b	16.5 ^b	23.6	30.3 ^{ab}	20.4 ^{abc}	20.3	39.5 ^a	26.7 ^a	18.9 ^{bcd}
EEM	± 0.83	± 0.63	± 1.51	± 1.51	± 1.17	± 1.78	± 1.03	± 0.90	± 1.36	± 1.11	± 0.91	± 0.61
DMS $\alpha=0.05$	4.28	3.24	7.79	7.75	6.04	9.18	5.31	4.65	7.00	5.70	4.68	3.15

Medias de mínimos cuadrados con literal diferente entre columnas indica diferencia ($p < 0.05$) entre variedades.

DMS; Diferencia significativa mínima

Cuadro 13. Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para fibra detergente neutro (FDN, %), fibra detergente ácido (FDA, %) y proteína cruda (PC, %) para las variedades cultivadas en Mixquiahuala, Hgo. a través de los diferentes cortes.

	Corte 1 (1/5/2015)			Corte 2 (7/06/2015)			Corte 3 (8/7/2015)			Corte 4 (8/8/2015)		
Variedad	FDN	FDA	PC	FDN	FDA	PC	FDN	FDA	PC	FDN	FDA	PC
Española	30.2 $\pm$ 1.30	20.2 $\pm$ 0.88	23.2 $\pm$ 0.59 ^{ab}	31.2 $\pm$ 1.03	21.8 $\pm$ 0.76 ^{ab}	22.5 $\pm$ 0.63	34.8 $\pm$ 1.09 ^a	25.2 $\pm$ 0.89 ^a	23 $\pm$ 0.95 ^b	28.7 $\pm$ 0.84 ^{bc}	19.6 $\pm$ 0.56 ^{cde}	23.3 $\pm$ 0.67 ^{ab}
T1	31.9 $\pm$ 1.30	22.0 $\pm$ 0.88	22.4 $\pm$ 0.59 ^{ab}	33.0 $\pm$ 1.03	23.1 $\pm$ 0.76 ^{ab}	21.6 $\pm$ 0.63	35.2 $\pm$ 1.09 ^a	25.2 $\pm$ 0.89 ^a	23.8 $\pm$ 0.95 ^{ab}	30.8 $\pm$ 0.84 ^{bc}	22.7 $\pm$ 0.56 ^{abc}	23.3 $\pm$ 0.67 ^{ab}
MSC5246	27.0 $\pm$ 2.36	18.3 $\pm$ 1.59	24.2 $\pm$ 1.07 ^{ab}	27.6 $\pm$ 1.86	19.7 $\pm$ 1.37 ^{ab}	24.7 $\pm$ 1.13	27.8 $\pm$ 1.98 ^b	20.1 $\pm$ 1.61 ^b	29.1 $\pm$ 1.72 ^a	27.2 $\pm$ 1.53 ^c	19 $\pm$ 1.02 ^{de}	24.2 $\pm$ 1.21 ^a
Pierce	31.2 $\pm$ 1.63	20.9 $\pm$ 1.10	22.6 $\pm$ 0.74 ^b	31.6 $\pm$ 1.29	22.5 $\pm$ 0.95 ^{ab}	24.7 $\pm$ 0.78	32.8 $\pm$ 1.37 ^{ab}	23.3 $\pm$ 1.11 ^{ab}	27.1 $\pm$ 1.19 ^{ab}	32 $\pm$ 1.06 ^{abc}	21.6 $\pm$ 0.7 ^{bcd}	22.4 $\pm$ 0.84 ^{ab}
Alfagraz	27.2 $\pm$ 1.63	18.3 $\pm$ 1.10	25.1 $\pm$ 0.74 ^{ab}	27.7 $\pm$ 1.29	18.6 $\pm$ 0.95 ^b	24.8 $\pm$ 0.78	29.5 $\pm$ 1.37 ^{ab}	20 $\pm$ 1.11 ^{ab}	29.3 $\pm$ 1.19 ^{ab}	25.9 $\pm$ 1.06 ^c	16.7 $\pm$ 0.71 ^e	26.9 $\pm$ 0.84 ^a
Abi700	31.5 $\pm$ 1.63	20.6 $\pm$ 1.10	23.6 $\pm$ 0.74 ^{ab}	31.6 $\pm$ 1.29	22.0 $\pm$ 0.95 ^{ab}	22.2 $\pm$ 0.78	32.9 $\pm$ 1.37 ^{ab}	23.3 $\pm$ 1.11 ^{ab}	26.2 $\pm$ 1.19 ^{ab}	31.3 $\pm$ 1.06 ^{abc}	20.5 $\pm$ 0.7 ^{bcd}	23.6 $\pm$ 0.84 ^{ab}
Júpiter	30.9 $\pm$ 1.30	21.2 $\pm$ 0.88	22.0 $\pm$ 0.59 ^b	30.9 $\pm$ 1.03	21.9 $\pm$ 0.76 ^{ab}	21.9 $\pm$ 0.63	36 $\pm$ 1.09 ^a	25.3 $\pm$ 0.89 ^a	23 $\pm$ 0.95 ^b	30 $\pm$ 0.84 ^{bc}	20.8 $\pm$ 0.56 ^{bcd}	22.2 $\pm$ 0.67 ^{ab}
Legend	29.0 $\pm$ 1.30	19.7 $\pm$ 0.88	24.7 $\pm$ 0.59 ^{ab}	30.0 $\pm$ 1.03	20.7 $\pm$ 0.76 ^{ab}	24.0 $\pm$ 0.63	30.8 $\pm$ 1.09 ^{ab}	21.9 $\pm$ 0.89 ^{ab}	26.3 $\pm$ 0.95 ^{ab}	27.3 $\pm$ 0.84 ^c	18.3 $\pm$ 0.56 ^{de}	25.2 $\pm$ 0.67 ^a
Archer	29.2 $\pm$ 1.36	19.9 $\pm$ 0.92	25.6 $\pm$ 0.62 ^a	30.7 $\pm$ 1.07	21.5 $\pm$ 0.79 ^{ab}	23.7 $\pm$ 0.65	34.5 $\pm$ 1.14 ^a	25 $\pm$ 0.93 ^a	25.4 $\pm$ 0.99 ^{ab}	28.8 $\pm$ 0.88 ^{bc}	19.5 $\pm$ 0.59 ^{bcde}	24.1 $\pm$ 0.7 ^{ab}
AMBG	33.5 $\pm$ 1.30	22.2 $\pm$ 0.88	22.0 $\pm$ 0.59 ^b	29.7 $\pm$ 1.03	20.7 $\pm$ 0.76 ^{ab}	24.2 $\pm$ 0.63	34.3 $\pm$ 1.09 ^a	24.6 $\pm$ 0.89 ^{ab}	23.9 $\pm$ 0.95 ^{ab}	33.2 $\pm$ 0.84 ^{ab}	23.4 $\pm$ 0.56 ^{ab}	22.4 $\pm$ 0.67 ^{ab}
FMH	32.8 $\pm$ 1.30	20.9 $\pm$ 0.88	23.5 $\pm$ 0.59 ^{ab}	32.0 $\pm$ 1.03	22.9 $\pm$ 0.76 ^{ab}	22.9 $\pm$ 0.63	35.1 $\pm$ 1.09 ^a	25 $\pm$ 0.89 ^a	24.1 $\pm$ 0.95 ^{ab}	30.3 $\pm$ 0.84 ^{bc}	20.8 $\pm$ 0.56 ^{bcd}	22.9 $\pm$ 0.67 ^{ab}
MOAPA	27.4 $\pm$ 2.34	18.9 $\pm$ 1.59	23.3 $\pm$ 1.07 ^{ab}	33.3 $\pm$ 1.85	23.4 $\pm$ 1.37 ^a	21.8 $\pm$ 1.13	35.3 $\pm$ 1.97 ^a	25.7 $\pm$ 1.6 ^{ab}	24.7 $\pm$ 1.71 ^{ab}	37 $\pm$ 1.52 ^a	25.6 $\pm$ 1.01 ^a	20.6 $\pm$ 1.21 ^b
DMS $\alpha=0.05$	8.50	5.76	3.87	6.72	4.95	4.09	7.14	5.79	6.21	5.5134	3.68	4.38

Medias de mínimos cuadrados con literal diferente entre columnas indica diferencia ($p < 0.05$) entre variedades.
DMS; Diferencia significativa mínima

Cuadro 14. Medias de mínimos cuadrados ($\pm$ error estándar) para la subclase de la triple interacción Localidad x Corte x Variedad para proteína cruda (PC, %) en Chapingo, Méx. y Mixquiahuala, Hgo.

Variedad	Chapingo, Méx.				Mixquiahuala, Hgo.			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Española	25.3 $\pm$ 1.27	23.4 $\pm$ 1.27	20.1 $\pm$ 1.27	18.7 $\pm$ 1.27	22.3 $\pm$ 1.24	22.3 $\pm$ 1.24	22.9 $\pm$ 1.24	23.2 $\pm$ 1.24
T1	32.6 $\pm$ 1.24	23.7 $\pm$ 1.24	19.8 $\pm$ 1.24	19.1 $\pm$ 1.24	21.5 $\pm$ 1.24	21.5 $\pm$ 1.24	23.7 $\pm$ 1.24	23.2 $\pm$ 1.24
MSC5246	25.2 $\pm$ 1.24	24.5 $\pm$ 1.51	20.7 $\pm$ 1.24	21.4 $\pm$ 1.24	24.6 $\pm$ 2.14	24.6 $\pm$ 2.14	30.1 $\pm$ 2.14	25.8 $\pm$ 2.14
Pierce	21.7 $\pm$ 1.24	26.2 $\pm$ 1.24	21.8 $\pm$ 1.24	18.9 $\pm$ 1.24	24.5 $\pm$ 1.51	24.5 $\pm$ 1.51	27.7 $\pm$ 1.51	23.3 $\pm$ 1.51
Alfagraze	24.4 $\pm$ 1.24	25.1 $\pm$ 1.24	22.0 $\pm$ 1.24	22.7 $\pm$ 1.24	25.2 $\pm$ 1.51	25.2 $\pm$ 1.51	29.2 $\pm$ 1.51	26.5 $\pm$ 1.51
Abi700	22.4 $\pm$ 1.24	22.7 $\pm$ 1.24	19.7 $\pm$ 1.24	20.6 $\pm$ 1.24	22.9 $\pm$ 1.55	22.9 $\pm$ 1.55	26.7 $\pm$ 1.55	24.2 $\pm$ 1.55
Júpiter	23.5 $\pm$ 1.26	25.9 $\pm$ 1.26	21.1 $\pm$ 1.26	17.4 $\pm$ 1.26	21.7 $\pm$ 1.23	21.7 $\pm$ 1.23	22.8 $\pm$ 1.23	22.0 $\pm$ 1.23
Legend	25.8 $\pm$ 1.26	23.0 $\pm$ 1.26	20.7 $\pm$ 1.26	22.0 $\pm$ 1.26	24.3 $\pm$ 1.25	24.3 $\pm$ 1.25	26.6 $\pm$ 1.25	25.5 $\pm$ 1.25
Archer	22.4 $\pm$ 1.24	21.4 $\pm$ 1.24	21.3 $\pm$ 1.24	21.6 $\pm$ 1.51	24.5 $\pm$ 1.23	24.5 $\pm$ 1.23	25.4 $\pm$ 1.23	23.5 $\pm$ 1.23
AMBG	30.1 $\pm$ 1.25	22.2 $\pm$ 1.25	21.9 $\pm$ 1.25	19.4 $\pm$ 1.25	24.4 $\pm$ 1.25	24.4 $\pm$ 1.25	24.1 $\pm$ 1.25	22.6 $\pm$ 1.25
FMH	26.2 $\pm$ 1.24	23.6 $\pm$ 1.24	20.4 $\pm$ 1.24	20.1 $\pm$ 1.24	22.9 $\pm$ 1.24	22.9 $\pm$ 1.24	24.1 $\pm$ 1.24	23.0 $\pm$ 1.24
MOAPA	22.6 $\pm$ 1.24	23.4 $\pm$ 1.24	20.1 $\pm$ 1.24	18.7 $\pm$ 1.24	21.8 $\pm$ 2.14	21.8 $\pm$ 2.14	25.1 $\pm$ 2.14	21.0 $\pm$ 2.14

3.5.7 Análisis filogenético

Las 10 combinaciones de oligonucleótidos amplificaron 178 amplicones con 100 % de polimorfismo en el análisis de las ocho poblaciones. El número de amplicones por cada combinación tuvieron un rango de 16-33, promedio 17.8 amplicones. El dendograma (gráfica de agrupamiento) construido a partir de los valores de similitud genética determinados entre todos los genotipos (Figura 5), sugirió que existen dos grupos principales; el primero y más numeroso está integrado por la variedad Española, Júpiter y Moapa, seguido de MSC5624 y Alfagraze. Esto indica similitud genética para ambos genotipos y pudiera asociarse al origen ecogeográfico y de pedigrí y el segundo por variedades americanas que se han desarrollado en condiciones específicas y de poblaciones adaptables a una latitud norte superior a 35°.

El dendograma obtenido de los resultados filogenéticos entre las 5 variedades y 3 poblaciones recombinantes, sugiere que se pueden agrupar las poblaciones genéticamente similares (Júpiter, Española y Moapa) y sobre todo identificar las variedades que son distintas genéticamente como el caso de Alfagraze, y que con base a este análisis se pueden identificar genotipos contrastantes genéticamente o no emparentados, 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.

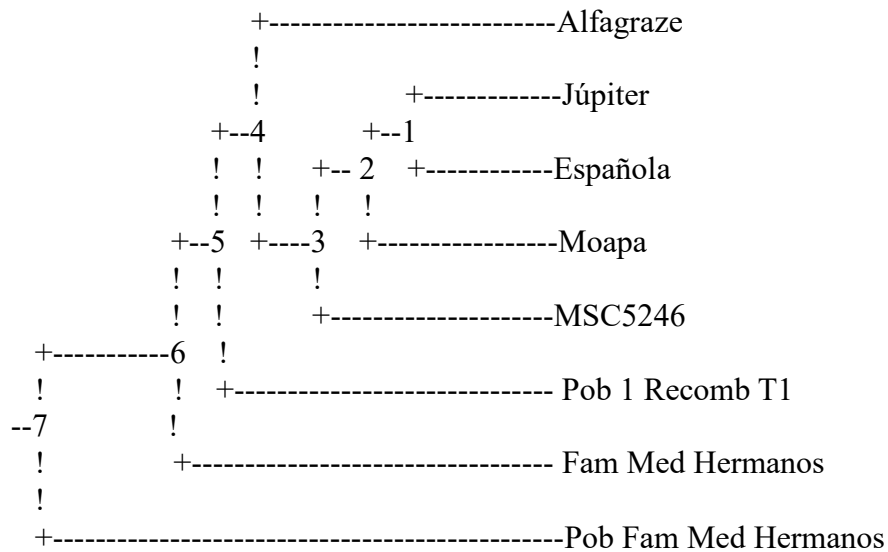


Figura 5. Dendrograma de 8 variedades de *Medicago sativa* L.

Con base en los resultados de las poblaciones recombinantes seleccionadas en el Programa de Mejoramiento Genético de Alfalfa, se concluye que las poblaciones recombinantes son distintas genéticamente de las poblaciones mediterráneas (Júpiter, Española y Moapa), así como de MSC5246 y Alfagraze de origen norteamericano. Esto sugiere que la recombinación entre genotipos o poblaciones incrementa la diversidad genética poblacional, y puede ser una medida importante en el incremento de la heterocigosidad en las variedades, como medida de incrementar la mayor productividad, y probablemente la concentración de proteínas en las variedades.

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 han 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 poblaciones estudiadas indica que el valor más alto de similitud fue entre Júpiter, Española y Moapa, 0.9907, y el valor más bajo entre Alfagraze y Compuesto de Familia de Medios Hermanos, con 0.9574. Estos valores de similitud entre poblaciones experimentales pueden considerarse bajos, asumiendo que las poblaciones provienen de mismo origen ecogeográfico o 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.

3.6. Conclusiones

El contenido nutrimental de las variedades mejoradas evaluadas no fue consistente a lo largo de los cuatro cortes evaluados. Tampoco hubo una variedad con un comportamiento superior a las demás para todas las variables. Dependiendo del contenido del nutriente que se desee mejorar habría que seleccionar la variedad más adecuada. La respuesta productiva, morfológica y contenido nutrimental de las variedades de alfalfa producidas en el Campo Agrícola Experimental “Tabla San Juan”, de la UACh, en Chapingo, Estado de México, y Centro del Desarrollo y Productividad de Cinta Larga en Mixquiahuala, Hidalgo, dependen principalmente de la época del año en que se produce. En los meses más cálidos la madurez se alcanza rápidamente y la calidad del forraje desciende de forma más apresurada; en el caso de Chapingo es mayor el efecto

de localidad en el contenido nutricional con base en las fechas de muestreo. Las variedades mejoradas tuvieron un comportamiento morfológico más adecuado en Mixquiahuala, Hgo., debido a que las variedades evaluadas fueron seleccionadas en esta región. En Chapingo, Méx. se identificaron variaciones de calidad y rendimiento debido a que los cortes se realizaron en diferentes épocas.

El contenido de proteína presente en las variedades mejoradas, durante época de invierno fue mayor y descendió hasta obtener menores valores en época de lluvias.

Las poblaciones recombinantes son distintas genéticamente de las poblaciones mediterráneas (Júpiter, Española y Moapa), así como de MSC5246 y Alfragaze de origen norteamericano, demostrando que la recombinación entre genotipos incrementa la diversidad genética poblacional y la heterocigosidad en las variedades, lo cual puede aumentar la productividad y probablemente la concentración de proteínas.

3.7. Agradecimientos

Al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por concederme financiamiento para cursar mis estudios de maestría

Al apoyo financiero de DGIP-UACH, Campo Agrícola Experimental UACH, Coordinación Nacional de Becas para la Educación Superior, Departamento de Enseñanza e Investigación en Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.8. 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., G. C Ortega, N., S. S. González, M., T. Cervantes M., y 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. Universidad Autónoma Chapingo. 80 p.

- 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: 18-31.
- Bauder, J., A. Bayer, J. Ramírez, and D. Cassel. 1978. Alfalfa water use and production on dry land and irrigation sandy loam. *Agronomy Journal* 70: 95-99.
- Brummer E. C. 1999. Capturing heterosis in forage crops cultivar development. *Crop Science* 39: 943-954
- Brummer E. C., J. H. Bouton, M. Sledge and G. Kochert. 2000a. Molecular mapping in alfalfa and related species. In: *DNA-based markers in plants*. I. K. Vasil and R. Phillips (ed.). Kluwer Acad. Dordrecht. Netherlands. pp. 169-180.
- Bolaños-Aguilar E. D., C. Huyghe, y B. Julier. 2004. El peso de la inflorescencia como criterio de selección para aumentar la producción de la semilla en alfalfa. *Técnica Pecuaria México* 42: 397-409.
- Camacho, G. J. L., y M.J. García. 2003. Producción y calidad del forraje de cuatro variedades de alfalfa asociadas con trébol blanco, ballico perenne, festuca alta y pasto ovillo. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en Producción Animal. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. Edo. México. México. 30p.
- Casler, D. M. 2001. Breeding forage crops for increased nutritional value. *Advances in Agronomy* 71: 51-107.
- CONAGUA. Normales Climatológicas por Estado. <http://smn.cna.gob.mx/es/climatologia/informacion-climatologica>. Consultada el 10 de mayo de 2016.
- Chapman, H. D., and F. P. Pratt. 1961. Ammonium vanadate-molybdate method for determination of phosphorus. In: *Methods of Analysis for Soils, Plants and Water*. First Ed. California: California University, Agriculture Division, pp: 184-203
- DePeters, E. J. 1993. Forage Quality and Its Implications. 23rd California Alfalfa Symposium.
- Douglas, J. 1981. The production and utilization of lucerne in New Zealand. *Grass and Forage* 41:81-127.

- Fombellida, V. Á. 2001. Variabilidad del ecotipo de alfalfa tierra de campos (*Medicago sativa* L.). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. España. 2001.
- García, E. 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la república mexicana). 5ª ed. México DF. 91 p.
- García, L. C., B. R. Vázquez-De-Aldana, L. F. Lorenzo M., A. García-Ciudad, C. Petisco, S. Vicente T., y B. García C. 2010. Evaluación de 26 cultivares de alfalfa en el oeste español. *Pastos: Revista de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos* 40: 189-210.
- Halim, R. A., D. R. Buxton, M. J. Hattendorf, and R. E. Carlson. 1989. Water-stress effects on alfalfa forage quality after adjustment for maturity differences. *Agronomy Journal* 81: 189-194.
- Huyghe C., B. Julier, E. D. Bolaños-Aguilar, C. Ecalte, and J. Hacquet. 2001. Effect of cultivar and environment on seed yield in alfalfa. *CIHEAM* 45: 127-130.
- Islam, M. R., M. Ishida, S. Ando, T. Nishida & N. Yoshida. 2011. Whole crop rice silage: Predictions of yield and content of metabolizable energy, metabolizable protein and other nutrients for dairy cows from crop maturity and botanical fractions at harvest. *Animal Feed Science and Technology*, 163: 222-230.
- Jensen, E. H., M. A. Massengale and D. O. Chilcote. 1967. Environmental effects on growth and quality of alfalfa. *Nevada Agric.* 36 p.
- Kalo, P., A. Seres, S. A. Taylor, J. Jakab, Z. Kevei, A. Kereszt, G. Endre, T. H. N. Ellis, and G. B. Kiss. 2004. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Molecular Genetics and Genomics* 272: 235-246.
- 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 Science* 46: 902-909.
- Li, X., and E. C. Brummer. 2012. Applied genetics and genomics in alfalfa breeding. *Agronomy* 2: 40-61.
- Lynch and Walsh. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Inc; Sunderland MA, p. 1375
- McGraw L. R. and J. C. Nelson. 2003. Legumes for Northern areas. In: Barnes F. R. Nelson C. J., Colling M., Moore K. J. (editors). *Forages: An Introduction to Grassland Agriculture*. 6th ed. Iowa State Press. USA. pp: 171-190.

- Mendoza, P. S. I., A. Hernández-Garay, P. J. Pérez, C. A. R. Quero, E. J. A. Escalante, R. J. L. Zaragoza, and O. R. Ramírez. 2010. Respuesta productiva de la alfalfa a diferentes frecuencias de corte. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1: 287-296.
- NAAIC. 2016. Requests for seed of alfalfa standard checks. <https://www.naaic.org/> Consultado 20 de febrero de 2014
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Printz, B., G. Guerriero, K. Sergeant, J. Renaut, S. Lutts, and J. F. Hausman. 2015. Ups and downs in alfalfa: Proteomic and metabolic changes occurring in the growing stem. *Plant Science* 238: 13–25.
- Radović, J., D. Sokolović and J. Marković. 2009. Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25: 465–475.
- Raoofi, M., M. T. Alebrahim, M. A. Baghestani, and M. Khanjani. 2016. The effect of different harvest times of first cutting in perennial alfalfa on percentage of dry weight of weeds and alfalfa in second cutting. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 4: 112-116.
- Riday H., and E. C. Brummer. 2005. Heterosis in a broad range of alfalfa germplasm. *Crop Science* 45: 8-17.
- Rojas G., R. A. 2011. Dinámica de crecimiento y rendimiento de forraje de diez variedades de alfalfa. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. 81 p.
- SAGARPA. Consulta de Indicadores de Producción Nacional, Precios y Márgenes de Comercialización de alfalfa. www.siap.sagarpa.gob.mx. Consultada el 9 de mayo de 2016.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2100 p.
- 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. Consultada el 10 de febrero de 2015.
- Sevilla, G. H. and M. G. Agnusdei. 2016. Efecto del agregado de fósforo y nitrógeno en el crecimiento de cultivos de alfalfa en rebrotes de primavera y verano en un suelo vertisol de Entre Ríos. *Revista de investigaciones agropecuarias* 42: 93-101.

- Thivierge, M. N., G. Jégo, G. Bélanger, A. Bertrand, G. F. Tremblay, C. A. Rotz, and B. Qian. 2016. Predicted yield and nutritive value of an alfalfa–timothy mixture under climate change and elevated atmospheric carbon dioxide. *Agronomy Journal* 108: 585-603.
- Van Soest, P. V., J. B. Robertson, and B. A. Lewis 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583–3597.
- Yari, M., R. Valizadeh, A. A. Naserian, G. R. Ghorbani, P. R. Moghaddam, A. Jonker, and P. Yu. 2012. Botanical traits, protein and carbohydrate fractions, ruminal degradability and energy contents of alfalfa hay harvested at three stages of maturity and in the afternoon and morning. *Animal Feed Science and Technology* 172: 162-170.