

## Androesterilidad citoplasmática-génica en alfalfa (*Medicago sativa* L.), cultivar 'Saranac'<sup>1</sup>

C. B. BANCHERO<sup>2</sup>, R. P. MURPHY y L. V. CROWDER<sup>3</sup>

(Recibido : 27 de julio, 1970)

### RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio de la microsporogénesis en un clon androestéril del cultivar de alfalfa «Saranac», hallándose que, a pesar de que el proceso meiótico transcurría normalmente, al estado de madurez polínica los lóculos de las anteras se hallaban desprovistos de granos de polen fértiles. Se comprobó que el proceso de la microsporogénesis era regular hasta que las microsporas fueron liberadas de las tetradas. La reducción del número de microsporas dentro del lóculo de la antera comenzaba al final del estado uninucleado; en este estado las células del tapete mostraban una discontinuidad anormal.

Trabajando con progenies originadas por el cruzamiento de los 18 clones estériles y los polinizadores: 'Saranac', clon 49-18, 'Iroquois' y selección experimental 'N', se halló que la característica de androesterilidad variaba dependiendo principalmente de la fuente del polen. El clon 49-18 dió lugar a progenies con muy altos porcentajes de esterilidad, mientras que el cultivar 'Saranac' se comportó como el más restaurador de fertilidad de todos los polinizadores utilizados.

Se llevaron a cabo tres series diferentes de cruzamientos utilizando el método de polinización a mano. En la primera serie cinco clones androestériles del cultivar 'Saranac' fueron cruzados con diez líneas, con endocria previa de un año del cultivar 'Saranac'. En la segunda y tercera serie de cruzamientos, los cinco androestériles fueron cruzados con los polinizadores Utah 55 B y una selección dentro de clones mantenedores de Wisconsin. Los resultados de estas dos últimas series fueron menos variables que los anteriores. En general se encontró alta variabilidad en el comportamiento de los clones androestériles siendo ésta atribuida a una posible diferencia en el genotipo.

Con excepción de la progenie originada por el uso de 'Saranac' como polinizador, el comportamiento de los clones androestériles fue más estable, es decir, la capacidad de restauración de los distintos polinizadores fue más o menos similar. Sin embargo, se notó grandes diferencias en la capacidad de restauración entre los distintos clones androestériles; esto posiblemente indique la necesidad de encontrar mantenedoras de fertilidad específicas para los diferentes androestériles.

Se llevaron a cabo estudios de fertilidad y producción de semilla a campo, utilizándose como hembras a los 18 clones androestériles y como polinizadores el cultivar 'Iroquois' y la selección experimental 'N'. El rendimiento de semilla fue bajo, posiblemente debido a la baja actividad de las abejas en los clones hembras, aparentemente motivado por factores que hacían a los clones androestériles menos atractivos para las abejas. También los resultados fueron alterados por ataques de insectos.

<sup>1</sup> Trabajo de tesis del autor principal para optar al título de «Master of Science». Trabajo desarrollado en el «Department of Plant Breeding and Biometry, Cornell University, USA».

<sup>2</sup> Becario de la Universidad de Buenos Aires en la Universidad de Cornell (1968-1970). Profesor adjunto del Departamento de Biología y Ecología, orientación Genética y Fitomejoramiento.

<sup>3</sup> Profesores de Fitomejoramiento de la Universidad de Cornell, EE. UU. que actuaron como presidente y consejero, respectivamente, en el comité especial de estudios de postgrado del autor principal.

## SUMMARY

A study of microsporogenesis in a male-sterile clone of the alfalfa cultivar 'Saranac' was carried out. Meiosis was normal, but it was found that at the stage of mature pollen grain the anther locules were empty. The breakdown of the regular pattern of microsporogenesis appeared after the microspores were released from their tetrads. The reduction in number of microspores inside the locule began at the end of the uninucleate stage. At this stage the tapetum cells showed discontinuity and breakdown.

Working with progenies which arose from the crosses of the 18 malesterile clones with 'Saranac', clone 49-18, 'Iroquois', and Experimental Synthetic 'N' as pollen sources, it was found that the expression of male sterility was variable, depending upon the pollen source. Clone 49-18 produced the least restoration, that is, the highest male sterility, and 'Saranac' the most restoration. Using the hand-pollination method three sets of crosses were made. In the first set five male-sterile clones of 'Saranac' were crossed with ten one-year inbred lines of 'Saranac' as male parents. For the second and third sets of crosses the male sterile clones were crossed with the male parents Utah 55 and a Wisconsin selection (W. C. W.). The results were less variable than with the other clones. Some variation among the male-sterile clones was found, however, and may have been due to genotypic differences among the male-sterile clones. With the exception of the progeny which arose using 'Saranac' as pollinator, the amount of restoration was more or less similar for all the pollen sources. Notable differences did occur in the amount of restoration between male-sterile clones. This indicated the need for specific maintainers for different male-sterile clones.

The fertility and seed set of the male sterile clones was studied at field locations, using two different male-cultivars 'Iroquois', and Experimental Synthetic 'N'. The seed yield was very low due to some lack of the bee activity on the male-sterile plants. The male-sterile clones appeared to be less attractive to bees than the male-fertile clones. Also, a difference in insect infestation caused a reduction in seed set.

## INTRODUCCION

Los híbridos de la primera generación exhiben un vigor superior al de los progenitores que los originaron. Con el descubrimiento de un caso de esterilidad citoplasmática-génica en el cultivar de alfalfa "Saranac" (*Medicago sativa* L.) se hizo necesaria la evaluación de la primera generación híbrida, así como también la búsqueda de medios por los cuales la semilla híbrida pudiera ser producida económicamente.

Existen tres tipos conocidos de esterilidad masculina: génica, citoplasmática y citoplasmática-génica. La más común de todas es la génica, generalmente determinada por un gen recesivo simple. El tipo más interesante para el fitotecnista es la citoplasmática-génica que es gobernada por la interacción de uno o más genes con el citoplasma. Este es el más utilizado para la producción de semilla híbrida en gran escala, puesto que permite el uso de líneas restauradoras y mantenedoras de fertilidad. Estas líneas son de suma importancia en aquellos cultivos donde el producto comercial es la semilla. En forrajeras o en todo cultivo en el que la producción esté basada en la parte vegetativa de la planta, las líneas restauradoras de fertilidad no

son necesarias para la producción comercial. Este es el caso típico de la alfalfa.

*Clasificación y causas de la androesterilidad en los vegetales.* DORSEY (1914) define la esterilidad masculina como la condición resultante de la malformación del grano de polen.

LEWIS (1941) indica que lo más común es encontrar esterilidad masculina en progenies híbridas, puesto que es sumamente difícil que se produzca como mutación natural.

JAIN (1958) postula que la esterilidad masculina puede ser atribuida a un ancestro híbrido, o sea, que puede originarse como resultado de una hibridación intra o interespecífica. El mismo autor propone la clasificación de la androesterilidad en cinco categorías: teratológica, anatómica, evolutiva, ambiental y no clasificadas.

*Esterilidad masculina en alfalfa.* ARMSTRONG y WHITE (1935) estudiaron la esterilidad polínica de ocho F<sub>2</sub> obtenidas de la autofecundación de una sola planta, y concluyeron que la esterilidad era debida a uno o más factores nucleares.

GRUN (1935) demostró la falta de relación entre las irregularidades meióticas y la esterilidad polínica.

CHILDERS (1952) describió dos clases de andro-

esterilidad: completa y parcial. Encontró que la androesterilidad completa iba generalmente asociada con una gran turgencia de las células del tapete embrionario en la profase temprana. En el caso de la androesterilidad parcial observó nuevamente un comportamiento anormal de las células del tapete, pero esta vez durante el período de crecimiento rápido de las microsporas.

ARMSTRONG (1952) describió tres causas de androesterilidad en alfalfa: irregularidades meióticas, disturbios fisiológicos y autoincompatibilidad.

CHILDERS (1962) señaló un caso de androesterilidad completa atribuida a tres genes recesivos de herencia disómica.

MCLENNAN y CHILDERS (1964) transfirieron un factor génico de una planta tetraploide a una diploide, cuando estudiaron la herencia a nivel de la última.

DAVIS y GREENBLATT (1967) clasificaron la androesterilidad citoplasmática-génica en alfalfa, desde el punto de vista genético, en los siguientes tipos: el tipo "Cms" con el factor para la esterilidad citoplasmática pero el núcleo sin factores recuperadores; el tipo "C" con el citoplasma normal y el núcleo sin factores recuperadores, y el tipo "R" con citoplasma normal y el núcleo con factores recuperadores.

CHILDERS (1967) observa que el trabajo de su colega BRADNER, muestra un caso neto de esterilidad citoplasmática, dado que la planta "oMs-5" mostró un 95 % de granos de polen abortados o vacíos.

DAVIS (1967) halló variación en la preferencia de las abejas por las líneas androestériles.

#### MATERIALES Y METODOS

*Origen del material utilizado.* En el año 1966 el doctor R. P. Murphy encontró un clon del cultivar de alfalfa 'Saranac' que se comportaba como totalmente estéril. En 1966-67 este clon androestéril fue cruzado con plantas elegidas al azar dentro del cultivar 'Saranac'. Cada una de 250 progenies, fueron autofecundadas y su contenido de polen revisado. Luego del análisis de las progenies resultantes se seleccionaron 18 plantas, buscando alta fertilidad cruzada y androesterilidad total. Los padres utilizados como fuente de polen fueron cultivares 'Saranac', 'Iroquois', selección experimental 'N'

(flores amarillas) y el clon 49-18, de Cornell; Utah 55 B y W.C.W., descritos como mantenedores de fertilidad por W. N. Pedersen y E. T. Bingham, respectivamente.

Además del estudio con el clon original se llevó a cabo otro programa con cinco clones androestériles (S-63, S-91, S-352, S-512 y S-536) provenientes de los clones paternos del cultivar 'Saranac'. La esterilidad de estos clones fue comprobada por medio de cruzamientos a mano con progenies resultantes de la autofecundación de otros clones paternos del mismo cultivar.

*Estudios citológicos.* Con el fin de comprobar la esterilidad se provocó el desenlace floral sobre la platina de un microscopio y se clasificó el material en fértil o estéril. Este estudio fue complementado con otro más preciso que consistió en fijar los botones florales en Carnoy I para luego hacer frotis utilizando carmín acético como colorante.

Con el fin de estudiar la estructura interna de las anteras y del microsporocito se aplicó la técnica de Feulgen a los clones 40-79 y 222 androestéril y androfértil respectivamente. El objeto de este método de coloración fue, específicamente, estudiar el estado en el cual los microsporocitos comienzan a entrar en meiosis.

Nuevamente se empleó la técnica del carmín acético para estudiar las distintas etapas en la formación de los granos de polen. Las etapas estudiadas fueron:

1. Microsporocito.
2. Meiosis.
3. Cuarteto.
4. Microspora.
5. Grano de polen maduro.

Otro estudio similar se llevó a cabo empleando la técnica de hematoxilina de Heidenhain, con la finalidad de observar el comportamiento de las células del tapete embrionario en el proceso de formación del grano de polen.

*Herencia y producción de semilla. Polinización por abejas.* Los 18 clones androestériles fueron propagados vegetativamente con el objeto de obtener suficiente material para 5 diferentes tratamientos. Cada tratamiento fue colocado en la cámara de polinización por abejas en el siguiente orden:

1. Androestériles solamente.
2. Androestériles más plantas del cultivar 'Saranac' como fuente de polen.
3. Androestériles más plantas del cultivar 'Iroquois' como fuente de polen.
4. Androestériles más plantas de la selección experimental 'N' como fuente de polen.
5. Androestériles más plantas del clon 49-18 como fuente de polen.

Luego de una semana las plantas fueron instaladas en el invernáculo, donde se cosechó separadamente la semilla de cada una de ellas. En diciembre de 1968 las progenies fueron sembradas en terrinas de germinación y luego transplantadas a terrinas definitivas dentro del invernáculo, bajo un régimen de luz continua y temperatura 25-30° C.

En enero de 1969 se inspeccionó el contenido de polen de las progenies resultantes de cada uno de los cinco tratamientos. Sobre la base de los resultados obtenidos se dividió el material en tres diferentes categorías.

1. Sin polen (O).
2. Trazas de polen (X).
3. Contenido "normal" de polen (XX).

El número de plantas revisadas fue 1276.

*Polinización a mano.* En febrero de 1969 se hicieron cruzamientos a mano utilizando como hembra el androestéril original y otros androestériles provenientes de clones paternos del cultivar 'Saranac'. Como fuente de polen se utilizaron las progenies resultantes de la autofecundación de clones paternos del cultivar 'Saranac'. También se realizaron cruzamientos utilizando como progenitores padres a las líneas mantenedoras de fertilidad U55B y W.C.W.

*Estudio de la fertilidad y la producción de semilla en el campo.* En mayo de 1968 se establecieron dos lotes experimentales de producción de semilla híbrida en dos localidades cercanas a la Universidad de Cornell. Los polinizadores utilizados fueron 'Iroquois' en un sitio y la selección experimental 'N' en el otro sitio. Como hembras se utilizaron los 18 clones androestériles originales, transplantados con una distancia entre plantas de aproximadamente 1 m. La relación femenina-masculina fue de 2:1, es decir: dos líneas femeninas por cada masculina; de esta forma las líneas femeninas

tenían siempre una línea masculina a su lado. El diseño utilizado fue el de bloques al azar.

El julio de 1969 se tomaron notas de producción de semilla y contenido de polen de los 18 clones. La producción de semilla fue clasificada en: pobre, regular y buena. El contenido de polen en: ninguno, trazas y normal. En cada repetición se inspeccionaron treinta flores de cada clon.

En agosto de 1969 se cosechó las semillas de las hembras, por separado. Los resultados fueron analizados por el método de Student y el coeficiente de correlación de rangos de Spearman.

## RESULTADOS

*Estudios citológicos.* Se confirmó que los 18 clones originales eran totalmente androestériles. Cabe destacar el hecho que durante los primeros estados de la microsporogénesis no se notó ninguna diferencia entre la morfología externa de las anteras de las plantas estériles y las fértiles. Las diferencias se hicieron perceptibles recién en los estados finales de la microsporogénesis; los cambios observados fueron el oscurecimiento y arrugamiento de las anteras de los androestériles.

La estructura interna y el contenido de microsporocitos de las anteras de los androestériles en los estados tempranos de la microsporogénesis, fueron normales (fig. 1). También se observó que todos los clones androestériles formaban cuartetos perfectamente normales luego de una meiosis regular.

El paso siguiente fue estudiar más detalladamente los estados intermedios entre la formación del cuarteto y la formación del grano de polen maduro. En las figuras 2 y 3, se pueden observar que entre los cuartetos del androestéril y los del macho normal no existen diferencias ni en número ni en morfología. El tamaño del botón floral, en el cual los cuartetos fueron hallados, está representado por el de la extrema izquierda en la figura 13, aquí los microsporos se encontraban en el estado uninucleado. Nuevamente no fueron halladas diferencias entre la planta estéril y la fértil (figs. 4, 5 y 6). El siguiente estado estudiado está representado en la figura 13 por el tercer botón floral de la izquierda, en él los microsporos se encontraban al estado binucleado y fue aquí donde por primera vez se notaron diferencias entre la estructura interna de la antera del androestéril y la del andro-

fértil. Las anteras de los clones androestériles se mostraban arrugadas dado que la cantidad de microsporas que contenían era mucho menor que la que contenían las anteras de las plantas fértiles. También se notó que las células del tapete embrionario no formaban una capa continua como lo hacían las del androfértil (figs. 7 y 8).

En el cuarto estado (representado en la figura 13 por el botón floral de la extrema derecha) fue estudiada la etapa final, es decir, cuando las anteras deberían mostrar granos de polen maduros. Las anteras del clon androfértil se encontraban llenas de granos de polen aparentemente normales, no así las anteras del clon androestéril, que mostraban en el fondo del lóculo residuos de granos de polen abortados (Figs. 9 y 11). Las figuras 10 y 12 muestran una antera llena correspondiente a un clon androfértil y una vacía, correspondiente a un clon androestéril, respectivamente.

*Herencia y producción de semilla. Polinización por abejas:* Cuando cada uno de los androestériles fueron colocados en la cámara de polinización sin otra fuente de polen que el de ellos mismos, la producción fue sumamente baja y las plantas originadas de esas semillas fueron prácticamente 100% androestériles.

Las progenies obtenidas cuando se usó el cultivar 'Saranac' como polinizador, arrojaron solamente un 56% de plantas estériles. Los porcentajes de androesterilidad obtenidos cuando 'Iroquois' y la selección experimental 'N' actuaron como polinizadores, fueron 85 y 88%, respectivamente. El porcentaje de esterilidad más elevado (91%) fue obtenido en la progenie resultante del uso del clon 49-18 como fuente de polen. Estos datos están resumidos en el cuadro 1.

CUADRO 1. — Resumen de los datos obtenidos al analizar las progenies resultantes del cruzamiento de los clones androestériles con diferentes polinizadores.

Fuente de polen	Total de plantas revisadas N°	Proporción esterilidad : fertilidad N°	Porcentaje de esterilidad
'Saranac' . . . . .	151	85 : 66	56
49-18 . . . . .	287	260 : 27	91
'Iroquois' . . . . .	450	381 : 69	85
Selección 'N' . . . . .	377	330 : 47	88

Los porcentajes de androesterilidad resultaron altos, puesto que tres polinizadores diferentes produjeron progenies que oscilaban entre 85 y 91% de androesterilidad. El porcentaje de androesterilidad fue bajo solamente cuando se utilizó 'Saranac' como fuente de polen; este cultivar fue el que dio origen al androestéril original y parece ser que tuviera más genes restauradores que los otros polinizadores no emparentados. Es importante destacar que, a pesar de que los porcentajes de androesterilidad fueron altos, ninguno de los polinizadores mostró un 100% de capacidad mantenedora.

*Polinización a mano:* La primera serie de estos cruzamientos fue llevada a cabo entre cinco clones androestériles y diez polinizadores provenientes de la autofecundación de clones paternos del cultivar 'Saranac'. Los porcentajes de esterilidad masculina fueron divididos en tres categorías: bajos, intermedios y altos. En la primera categoría se incluyeron las progenies que mostraban menos de 80% de esterilidad masculina; en ella se encontraban las progenies resultantes de los cruzamientos con los polinizadores 232 y 356. En la categoría intermedia (entre 80 y 90% de esterilidad masculina) se encontraban las progenies en las cuales habían actuado como padres las líneas 683, 664, 842, 1023 y 1066. En la categoría alta (más del 90% de esterilidad) se encontraban las progenies resultantes de la cruce de los androestériles por las líneas 528, 646 y 1028.

Los resultados arrojaron una gran diferencia en la capacidad restauradora de fertilidad de los polinizadores utilizados.

En la segunda y tercera serie de cruzamientos se utilizaron como fuente de polen flores de los clones mantenedores de fertilidad U55B y W.C.W., respectivamente. La esterilidad de las progenies resultantes fue aproximadamente 98%, es decir, fueron los porcentajes de esterilidad más altos obtenidos. También se notó que la influencia sobre la esterilidad de la progenie debida al clon androestéril que actuó como madre, era mucho menor.

Es necesario destacar que, con excepción de la progenie resultante de la polinización con 'Saranac', las diferencias en esterilidad provocadas por los distintos polinizadores fueron menores que las diferencias provocadas por los clones que actuaban como receptores de polen.

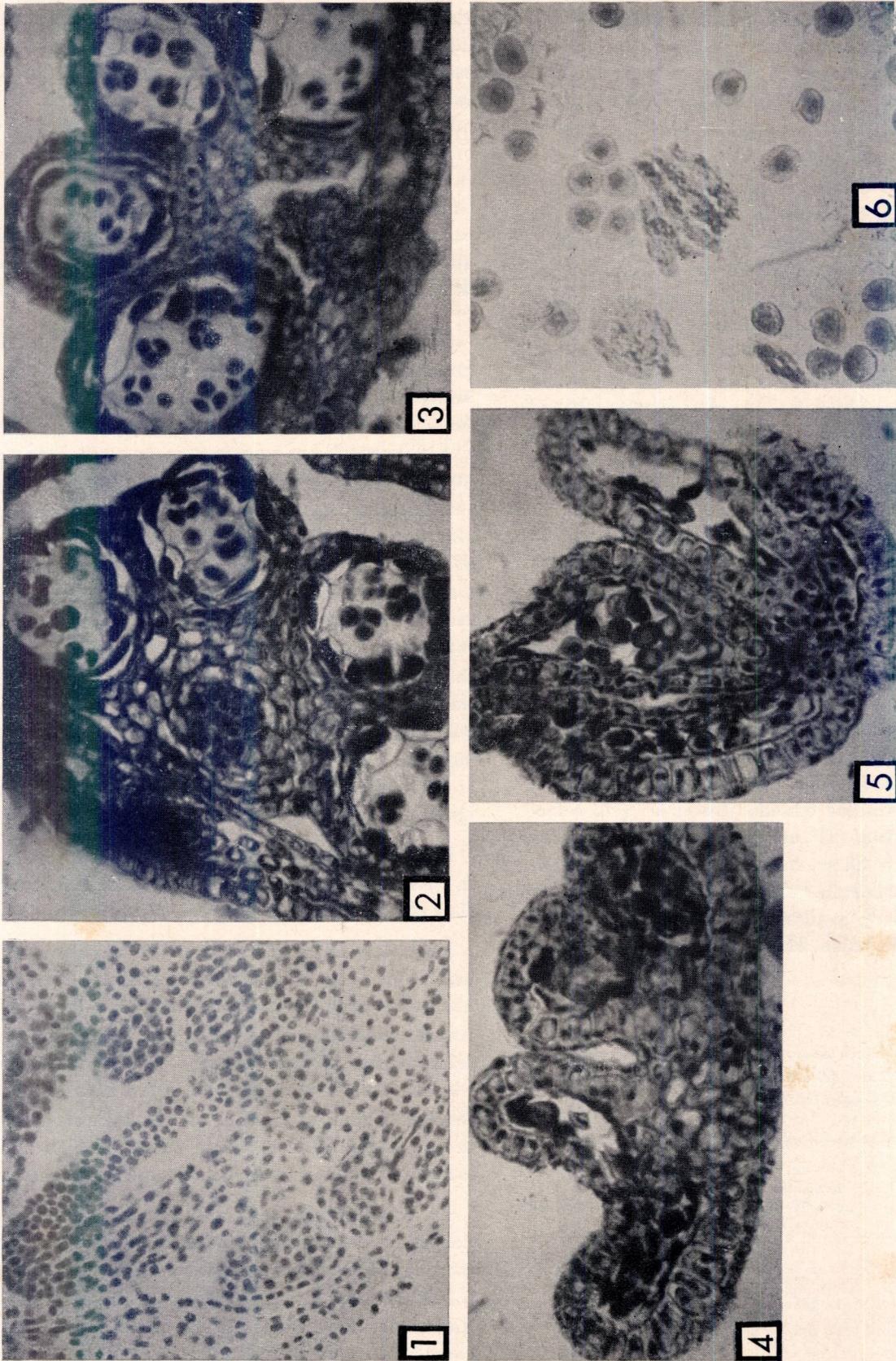


Fig. 1, Clon androestéril 40-79 : anteras llenas de microsporocitos. Fig. 2, Clon androfértil U2B : anteras llenas de microsporocitos en el estado de cuartetos. Fig. 3, Clon androestéril 40-161 : anteras llenas de microsporocitos en el estado de cuartetos. Fig. 4, Clon androfértil U2B : anteras llenas de microsporas en el estado uninucleado. Fig. 5, Clon androestéril 40-161 : anteras llenas de microsporas en el estado uninucleado. Fig. 6, Microsporas del clon androestéril 40-161.

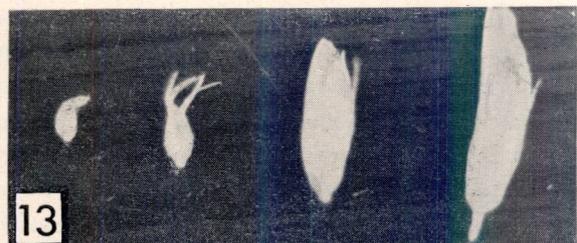
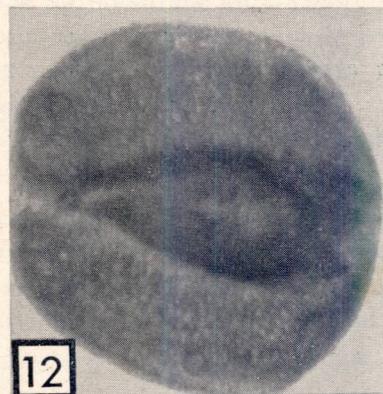
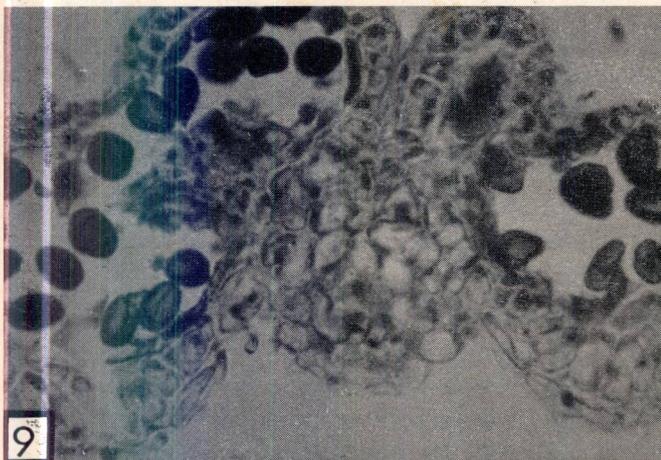
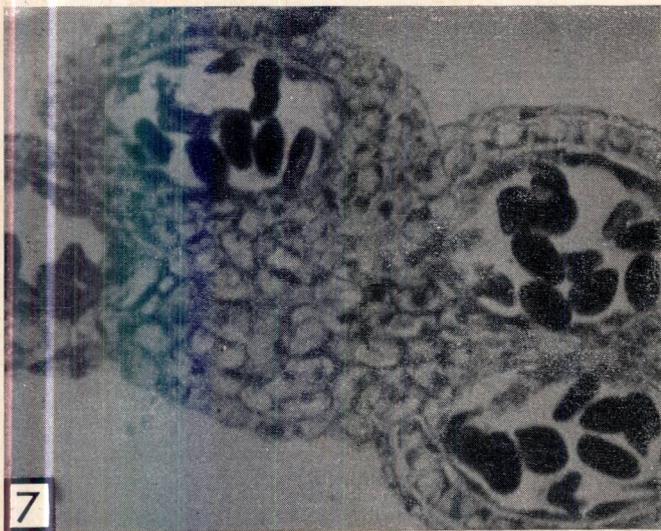


Fig. 7, Clon androfértil U2B: anteras llenas de microsporas en el estado binucleado. Fig. 8, Una antera del clon androestéril 40-161: notable disminución en el contenido de microsporas en el estado binucleado. Fig. 9, Clon androfértil U2B: anteras llenas de microsporocitos maduros. Fig. 10, Antera llena de microsporocitos maduros pertenecientes al clon androfértil U2B. Fig. 11, Clon androestéril 40:161: anteras vacías al estado de madurez polínica. Fig. 12, Antera vacía correspondiente al clon androestéril 40-161 al estado de madurez polínica. Fig. 13, Botones florales en los estados en los cuales se extrajo material para el estudio de las distintas etapas.

*Estudio de la fertilidad y la producción de semilla en el campo.* El comportamiento de los clones androestériles fue estudiado en dos lotes de producción de semilla híbrida y se utilizó como polinizadores abejas domésticas y salvajes. Sobre estos dos lotes se llevaron a cabo estimaciones en la producción de polen y semillas en los distintos clones.

En el lote que había sido polinizado con el cultivar 'Iroquois' se encontró que solamente tres plantas femeninas poseían trazas de polen. La capacidad potencial en producción de semilla de este lote fue clasificada como regular. En el lote que había tenido como padre la selección experimental 'N' se encontró esterilidad total entre las hembras y la capacidad potencial para la producción de semilla fue clasificada como pobre.

En agosto de 1969 la semilla producida por los distintos clones madres fue cosechada, trillada y pesada individualmente.

#### DISCUSION

*Estudios citológicos.* En los estudios citológicos de las plantas de alfalfa androestériles al estado de madurez polínica, se encontraron las anteras completamente arrugadas, y con algunos granos de polen vacíos. Esto concuerda con la descripción que hacen DAVIS y GREENBLATT (1967) de su androestéril total.

La mayor diferencia en estructura interna entre los androestériles y los androfértiles fue el comportamiento de las células del tapete embrionario durante el estado uninucleado de las microsporas.

La capa del tapete se tornó discontinua en el clon androestéril, pero permaneció continua en el androfértil. CHILDERS y McLENNAN (1960), estudiaron un comportamiento similar al tapete en un caso de esterilidad completa en alfalfa. Encontraron una marcada separación entre las células del tapete y la pared interna del lóculo, así como también la pérdida de solución de continuidad por las células del tapete. En el caso del androestéril 'Saranac' solamente se encontró la separación entre células, pero no fueron halladas diferencias significativas entre el androestéril y el androfértil con respecto a la distancia tapete-pared interna del lóculo.

*Herencia.* Todos los polinizadores utilizados en este estudio, con excepción del cultivar 'Saranac', originaron progenies con altos porcentajes de androesterilidad, pero por otro lado, ninguna de ellos dio origen a progenies con el 100% de esterilidad masculina.

La baja proporción de esterilidad arrojada por la progenie proveniente del uso del cultivar 'Saranac' como polinizador, puede ser atribuida a que este cultivar dio origen al androestéril original, y por lo tanto puede que posea más factores recuperadores de fertilidad que aquellos padres no emparentados. El comportamiento de los distintos polinizadores, así como también la variabilidad hallada en el comportamiento de los clones androestériles, deja entrever una posible herencia cuantitativa del carácter restauración de fertilidad.

Considerando que el androestéril posee un citoplasma con factores para androesterilidad y un núcleo no-restaurador (Rrrr), y que es cruzado con diferentes líneas que poseen el citoplasma acondicionado para la fertilidad y un núcleo no-restaurador, sería posible obtener genotipos "S" RRrr que podrían contener una cantidad de polen similar a la normal.

Actualmente es necesario hallar líneas mantenedoras que originen 100% de esterilidad en las progenies. Posiblemente esto se pueda conseguir por medio de cruzamientos consanguíneos seguidos por la aplicación de una intensa presión selectiva en las progenies resultantes.

*Producción de semilla híbrida a campo.* Las plantas demostraron ser perfectamente androestériles con la excepción de tres clones en cada uno de los cuales se halló que una planta presentaba trazas de polen. Estas plantas tienen poca o ninguna influencia cuando los cruzamientos son efectuados a mano, su influencia es mucho mayor cuando los cruzamientos son hechos en el campo y usando abejas como polinizadores. Se debe tener en cuenta que estas plantas se encuentran en las líneas femeninas del lote, y a pesar de que las líneas femeninas serán visitadas menos frecuentemente por las abejas, la cantidad de polen, aunque relativamente pequeña, puede llegar a influenciar notablemente sobre el genotipo de la progenie obtenida por dicho cruzamiento. Por lo tanto otro derrotero en el estudio de la producción de semilla híbrida de alfalfa, por medio de la androesterilidad citoplasmática, se-

ría la eliminación de aquellas plantas con trazas de polen.

El bajo rendimiento de semilla obtenida puede ser atribuido a la baja actividad de las abejas en las líneas androestériles, pues se observó que ellas no trabajaban en los androestériles tan intensamente como lo hacían en los polinizadores. Esta observación concuerda con los estudios hechos por CHILDERS (1967) y DAVIS (1969).

#### CONCLUSIONES

1. Los estudios citológicos permiten afirmar que la androesterilidad aparece luego de que las microsporas son liberadas de las tetradas y que, al final del estado uninucleado el número de microsporas dentro del lóculo de la antera comienza a disminuir. Esta disminución, en número, progresa rápidamente durante el estado uninucleado y da como resultado la carencia total de granos de polen en las anteras maduras. La única anormalidad observada, en la morfología interna de la antera, fue la discontinuidad de las células del tapete embrionario.

2. Se comprobó que, definitivamente, existía un alto porcentaje de esterilidad masculina que era transmitido a la progenie y que la variabilidad hallada dependía, en cierto casos del polinizador utilizado, pero que también existía una variación debida al clon androestéril utilizado como receptor de polen. Los altos porcentajes de esterilidad obtenidos con el uso de los polinizadores: clon 49-18, U55B y W.C.W., son sumamente prometedores para futuras investigaciones en busca de líneas mantenedoras de fertilidad.

3. Los dos lotes de producción de semilla híbrida en el campo, mostraron diferencias significativas de rendimiento, al analizar los resultados por el

método de Student. Sin embargo, es imposible llegar a conclusiones definitivas sobre la diferencia del comportamiento en el campo de los androestériles, frente a distintos polinizadores dado que las repeticiones eran solamente dos y que se hizo imposible evaluar la interacción "localidad-polinizador". A pesar de ello, se puede señalar a las líneas androestériles 40-104, 40-83 y 40-55, como las más rendidoras en ambas localidades.

#### BIBLIOGRAFÍA

- ARMSTRONG, J. M., 1952. *Self-sterility studies in alfalfa*. Sci. Agr. 32 : 153-162.
- ARMSTRONG, J. M. and WHITE, W. J., 1935. *Factors influencing seed-setting in alfalfa*. Jour. Agr. Sci. 25 : 161-179.
- CHILDERS, W. R., 1952. *Male sterility in M. sativa L.* Sci. Agr. 32 : 351-364.
- 1967. *Sterility studies and possible effects upon breeding program*. 14th Meeting of the Eastern Alfalfa Improvement conference, 13-17.
- DAVIS, W. H., 1967. *Hybrid alfalfa via male sterility*. Trabajo presentado en la Reunión Annual de la A. S. A., p. 8.
- DAVIS, W. H. and GREENBLATT, H. M., 1967. *Cytoplasmic male sterility in alfalfa*. Journal of Heredity 58 : 301-305.
- DORSEY, M. J., 1914. *Pollen development in the grape with special reference to sterility*. Minn. Agri. Exp. Stat. Bull. 144 : 60.
- GRUN, P., 1951. *Variations in the meiosis of alfalfa*. Amer. Jour. Bot. 38 : 475-482.
- JAIN, S. K., 1959. *Male sterility in flowering plants*. Bibliographia genetica XVIII : 101-166.
- LEWIS, D., 1941. *Male sterility in natural population of hermaphrodite plants*. New Phytologist 40 (1) : 56-63.
- MCLENNAN, H. A. and CHILDERS, W. R., 1964. *The transfer of genetic male sterility from tetraploid to diploid alfalfa and inheritance at the diploid level*. Proc. Xth Can. Soc. Agron. Meeting. Fredericton, N.B. p. 79.
- MURPHY, R. P. and LOWE, C. C., 1966. *Registration of Saranac alfalfa*. Crop Science 6 : 611.

