

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



EVALUACIÓN DE RIZOBIOS NATIVOS PARA LA INOCULACIÓN DE ALFALFA
(*MEDICAGO SATIVA L.*) EN EL SECANO INTERIOR DE LA REGIÓN DEL
MAULE

POR

DIEGO EDUARDO HERRERA FUENTEALBA

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

CHILLÁN – CHILE
2025

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DE RIZOBIOS NATIVOS PARA LA INOCULACIÓN DE ALFALFA
(*MEDICAGO SATIVA* L.) EN EL SECANO INTERIOR DE LA REGIÓN DEL
MAULE**

POR

DIEGO EDUARDO HERRERA FUENTEALBA

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

**CHILLÁN – CHILE
2025**

Aprobada por:

Profesor Asociado. Macarena Gerding G.
Ing. Agrónomo, Ph. D.

Guía

Profesor Asociado. Christian Guajardo F.
Ing. Agrónomo, Dr.

Asesor

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

Asesor

Soledad Espinoza T.
Ing. Agrónomo, M. Sc. Dr.
INIA Quilamapu

Asesor Externo

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

Decano

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto Fondecyt N° 1180821: “Landraces of alfalfa as a source of germplasm tolerant to abiotic stresses: selecting plant-rhizobia genotypes for a harsh future environment”.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Summary.....	1
Introducción	2
Materiales y Métodos	4
Resultados y Discusión	11
Conclusiones	17
Referencias	18
Anexos	25
Apéndices	27

INDICE DE FIGURAS, TABLAS, ANEXOS Y APÉNDICES

	Página
Figura 1 Índice de nodulación en plantas de alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) inoculadas con diferentes cepas de rizobios, además de dos testigos, N- (sin inoculación ni fertilización nitrogenada) y N+ (sin inoculación, con fertilización nitrogenada)	12
Figura 2 Cladograma de los aislados de cada cepa rizobiana muestreada desde las unidades experimentales inicialmente inoculadas y los tratamientos (T) con las cepas de rizobios originales usadas para la inoculación ...	13
Figura 3 Contenido de materia seca aérea muestreado en dos fechas diferentes: 7 meses después de la siembra (A) (enero 2022) y 16 meses después de la siembra (B) (octubre 2022)	14
Figura 4 Población de plantas de alfalfa (plantas m ⁻²) con diferentes tratamientos de inoculación bacteriana (AG-xx) más dos testigos sin inoculación (N- y N+)	16
Figura 5 Altura de plantas de alfalfa (cm) inoculadas con diferentes cepas de rizobios (AG-xx) más dos testigos sin inoculación N- y N+	17
Tabla 1 Origen y especies de cepas de rizobios seleccionadas para su inoculación en semillas de alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	5
Tabla 2 Fertilización de suelo de acuerdo con análisis químico de muestra tomada en terreno, se muestra fertilizante utilizado y dosis en kilogramos por hectárea (kg ha ⁻¹) y su equivalente en gramos por unidad experimental (g unidad experimental ⁻¹)	7
Tabla 3 Mezcla de reactivos para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados, para un volumen final de 20 µL	9

Tabla 4	Programa utilizado para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados asociados a alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	10
Anexo 1	Sistema de clasificación de la nodulación para sistemas radiculares jóvenes (adaptado de Tiwari y Kulasooriya, 2012)	25
Anexo 2	Comparación de las precipitaciones acumuladas (mm) en la zona del ensayo entre los años 2021 y 2022	26
Apéndice 1	Diseño experimental del ensayo en terreno	27

EVALUACIÓN DE RIZOBIOS NATIVOS PARA LA INOCULACIÓN DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) EN EL SECANO INTERIOR DE LA REGIÓN DEL MAULE

EVALUATION OF NATIVE RHIZOBIA FOR THE INOCULATION OF ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) IN THE MAULE REGION INTERIOR DRYLAND

Palabras índice adicionales: *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium*, nodulación, materia seca

RESUMEN

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una leguminosa forrajera utilizada en alimentación animal por su alto valor nutritivo, asociada simbióticamente con un grupo de bacterias del suelo (rizobios) para la fijación de nitrógeno atmosférico. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la inoculación de diferentes cepas bacterianas de *Rhizobium spp.* y *Sinorhizobium meliloti* en el desarrollo y producción de alfalfa en condiciones de secano. En Cauquenes, región del Maule, se estableció un ensayo con alfalfa 'Altasierra' en condiciones de secano, sembrada en otoño e inoculada con rizobios de distintas zonas de Chile y una cepa comercial australiana. Se evaluó nodulación, ocupación nodular, además de producción de materia seca aérea de alfalfa, población de plantas y la altura de estas. La inoculación con las cepas AG-227 y AG-225 provenientes de la región de Arica y Parinacota logró una mayor producción de materia seca en las dos fechas de corte: 7 y 16 meses después de la siembra ($P \leq 0,05$). La cepa AG-227 y AG-245, promovieron una mayor nodulación en comparación con los testigos ($P \leq 0,05$). Las cepas AG-06 (Australia) y AG-225 estimularon una mayor población de plantas por m^2 y las cepas AG-227, AG-225, AG-245 y AG-119 estimularon una mayor altura de planta ($P \leq 0,05$). En conclusión, las cepas de Arica y Parinacota AG-227 y AG-225 destacan como rizobios promisorios para siembra de alfalfa en condiciones de secano.

SUMMARY

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is a forage legume used in animal feed for its high

nutritional value. It forms a symbiotic association with a group of soil bacteria (rhizobia) that allow nitrogen fixation. The objective of this research was to evaluate the effect of inoculating of different bacterial strains of *Rhizobium* spp. and *Sinorhizobium meliloti* on the development and production of alfalfa under rainfed conditions. An field experiment was carried out in Cauquenes, Maule region, with alfalfa 'Altasierra' under rainfed conditions. Alfalfa was sown in autumn and inoculated with rhizobia from different regions of Chile and an Australian commercial strain. Nodulation, nodule occupancy, alfalfa dry matter production, plant population and plant height were evaluated. Inoculation with strains AG-227 and AG-225 from Arica and Parinacota region, resulted in higher dry matter production at both cutting dates: 7 and 16 months after sowing ($P \leq 0.05$). Strains AG-227 and AG-245 promoted higher nodulation than the controls ($P \leq 0.05$). Strains AG-06 (Australia) and AG-225 stimulated higher plant population per m² and strains AG-227, AG-225, AG-245 and AG-119 stimulated higher plant height ($P \leq 0.05$). In conclusion, the Arica y Parinacota strains AG-227 and AG-225 stand out as promising rhizobia for alfalfa establishment under rainfed conditions.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas pertenecen a la familia Fabaceae y se subdividen en tres subfamilias, Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae, las cuales comprenden 751 géneros y 19.500 especies (LPGW, 2013). Es la segunda familia con mayor importancia económica luego de las gramíneas (Familia Poaceae) (Lewis *et al.*, 2013) y destaca por su amplia distribución mundial, desarrollándose en ecosistemas tan diversos que abarcan desde selvas tropicales, pasando por zonas templadas, hasta ambientes áridos y desérticos (LPGW, 2013).

Dentro de las leguminosas forrajeras, destaca alfalfa, la cual es una planta herbácea perenne, posee hojas trifoliadas pinnadas y flores dispuestas en racimos. La planta desarrolla un hábito de crecimiento erecto y vigoroso alcanzando una altura de hasta 120 cm. Las raíces son pivotantes, concentrándose en los primeros 50 cm del perfil del suelo, pero bajo condiciones edáficas favorables pueden explorar varios metros de profundidad (Julier *et al.*, 2017; Sheaffer *et al.*, 2020).

Alfalfa se caracteriza por su alto contenido de proteína cruda (18 – 29 %), nutrientes digestibles totales y energía metabolizable, además de un bajo contenido de fibra detergente neutra (Gawel y Grzelak 2014; Duguma *et al.*, 2014; Karayilanli y Ayhan 2016; Gawel *et al.*, 2017; Rupitak y Srisaikham, 2021).

Otra cualidad de la alfalfa es el grado de reposo o latencia invernal, característica genética en la cual hay una reducción del crecimiento en respuesta a la disminución del fotoperiodo y la temperatura, permitiéndole a la planta aclimatarse y sobrevivir al invierno (Spada, 2007; Bertrand *et al.*, 2017).

Las leguminosas en general se caracterizan por desarrollar una asociación simbiótica con un grupo de bacterias fijadoras de nitrógeno llamadas rizobios, dicha relación mutualista tiene lugar en las raíces y trae consigo beneficios para ambas partes. Las bacterias reciben carbono de la fotosíntesis a cambio de fijar nitrógeno atmosférico (Powel y Klironomos, 2007). Se describen seis géneros de rizobios, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*, los cuales se asocian de forma específica con diferentes leguminosas. Alfalfa en particular se asocia a *Sinorhizobium meliloti* y el proceso involucra la expresión de genes, además de una serie de señales químicas entre la planta y la bacteria, resultando en la entrada del rizobio vía infección de pelos radicales a través de un hilo infeccioso, dando lugar a la formación de nódulos y finalmente la simbiosis (Powel y Klironomos, 2007; Bottomley y Myrold, 2007).

Como se mencionó anteriormente, alfalfa presenta un alto contenido de proteína cruda, lo que significa un alto requerimiento de nitrógeno (Racca y Gonzales, 2007) y los rizobios son los encargados de suplir dichas necesidades mediante la fijación biológica de nitrógeno. Berenji *et al.* (2015), estimaron que el 70 % del contenido de nitrógeno en los brotes de alfalfa inoculada derivó de la fijación biológica de nitrógeno en el primer año. Por otro lado, Issah *et al.* (2020) observaron que alfalfa fijó aproximadamente el 93 % del nitrógeno derivado de la atmósfera en el brote, raíz y planta completa.

Diversos factores abióticos pueden limitar el desarrollo de la simbiosis rizobio-leguminosa, tales como temperatura, pH y relaciones hídricas, los cuales pueden perturbar tanto a rizobios como interferir con el proceso de nodulación (Andrés *et*

al., 2012). Sin embargo, algunos rizobios pueden adaptarse y sobrevivir en escenarios ambientales poco favorables, tal como señalan diversos estudios con especies del género *Sinorhizobium* como también cepas de *Sinorhizobium meliloti* en condiciones de sequía, salinidad, altas y bajas temperaturas (Prévost *et al.*, 2003; Sanz-Sáez *et al.*, 2012; Sakrouhi *et al.*, 2016; Mrabet *et al.*, 2010). Además, Loiko *et al.* (2011), demostraron que la cepa *Sinorhizobium meliloti* P221 fue capaz de formar células de reposo bajo condiciones desfavorables y resistir altas temperaturas. Azib *et al.* (2019), demostraron que cepas de *Sinorhizobium meliloti* tolerantes a estrés hídrico mejoraron el rendimiento de alfalfa en zonas áridas.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la inoculación de cepas nativas de *Rhizobium spp.* y *Sinorhizobium meliloti* en el desarrollo y producción de alfalfa en condiciones de secano con clima mediterráneo subhúmedo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antecedentes generales

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Campus Chillán, Región de Ñuble, Chile.

El ensayo en terreno se realizó en el centro experimental INIA Cauquenes, ubicado en la ruta 128, kilómetro 4, comuna de Cauquenes, Provincia de Cauquenes, Región del Maule, Chile (35°57'27" S, 72°17'15" O; 180 msnm).

Origen del material bacteriano

Las nueve cepas rizobianas utilizadas en el ensayo pertenecen a la especie *Sinorhizobium meliloti* o al género *Rhizobium sp.* (Tabla 1), y provienen de la colección de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción Campus Chillán, las cuales se recolectaron y seleccionaron en investigaciones anteriores desde diferentes regiones, tales como la Región de Arica y Parinacota, Región Metropolitana, Región de la Araucanía y Región de Magallanes (Galaz, 2019; Cerda, 2020) (Tabla 1). Además, se sumó la cepa de uso comercial de origen australiano WSM2141 (AG-06 en la colección UDEC). Dichas cepas se mantienen criopreservadas a - 80 °C en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de

Agronomía de la Universidad de Concepción Campus Chillán, desde donde fueron reactivadas para su multiplicación.

Tabla 1. Origen y especies de cepas de rizobios seleccionadas para su inoculación en semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L).

Cepa	Origen	Especie
AG-06	Cepa de uso comercial WSM2141, Australia	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
AG-115	Ruta CH-257, orilla de camino frente a Manantiales, Región de Magallanes	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
AG-119	Sector Luz Aurora, Región de Magallanes	<i>Rhizobium</i> sp.
AG-220	Taltape, Región de Arica y Parinacota	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
AG-224	Illapata, Región de Arica y Parinacota	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
AG-225	Illapata, Región de Arica y Parinacota	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
AG-227	Valle de Lluta, Región de Arica y Parinacota	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
AG-233	La Platina, Región Metropolitana	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
AG-245	Sector Bellavista, Lonquimay, Región de la Araucanía	<i>Sinorhizobium meliloti</i>

Preparación del material bacteriano

La reactivación y multiplicación de las cepas se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar para evitar contaminación externa. Utilizando un asa de siembra, se extrajeron muestras de las bacterias criopreservadas y se sembraron en estrías sobre agar manitol levadura (AML) en una placa Petri, buscando formar colonias puras. Una vez las colonias estuvieron formadas, se extrajeron con el asa de siembra y se inocularon en matraces de 250 ml con caldo manitol levadura. Cada cepa se inoculó individualmente en un matraz, los cuales se ubicaron en un agitador orbital a 25 °C en oscuridad, para la multiplicación de las bacterias. Una vez colonizado el caldo de cultivo, se ajustó la densidad óptica (DO) de las bacterias en 0,2 a una longitud de onda de 600 nm. Luego, se vertieron 50 ml de cada cepa en tubos Falcon, los cuales, en el momento del ensayo en terreno, se diluyeron en un litro de agua destilada para lograr una concentración de 1×10^8 bacterias por m^2 .

Ensayo en terreno

Sitio experimental. El ensayo se estableció el mes de junio en el centro experimental INIA Cauquenes, ubicado en la Ruta 128, kilómetro 4, comuna de Cauquenes, Provincia de Cauquenes, Región del Maule, Chile (35°57'27" S, 72°17'15" O; 180 msnm).

Características edafoclimáticas del sitio experimental. El suelo de tipo granítico, correspondiente a la serie Cauquenes y clasificado como Alfisol (Stolpe, 2006; Ovalle *et al.*, 2015).

La zona se clasifica como secano interior, de topografía mayoritariamente ondulada, con paisajes de lomas y llanos. Las características climáticas corresponden a clima mediterráneo subhúmedo, con temperaturas promedio mínimas y máximas de 4,7 °C en julio y 27,0 °C en enero respectivamente, con un periodo libre de heladas de 6 a 7 meses. La precipitación invernal entre los meses de junio y agosto es de 386 mm, mientras que la precipitación estival entre los meses de diciembre y marzo es de 32 mm (Del Pozo y Del Canto, 1999; Ovalle *et al.*, 2015).

Manejo y preparación del suelo. Se tomó una muestra compuesta de suelo, a la cual se le realizó un análisis químico con el fin efectuar una fertilización de acuerdo con los requerimientos del cultivo. El detalle de los fertilizantes utilizados y sus respectivas dosis se indican en la Tabla 2.

A principio del mes de mayo se preparó el suelo, donde se realizaron labores de eliminación de malezas, utilizando el herbicida sistémico Centurion Super (control de gramíneas), además, de labores de rotura y mullido, donde se utilizó arado de discos seguido de motocultor. Posteriormente se delimitaron las unidades experimentales, en las cuales, por cada unidad, se realizaron cinco surcos de 2 cm de profundidad por un metro de largo para la siembra de las semillas.

Siembra e inoculación. El día 15 de junio de 2021 se sembraron manualmente las semillas en cada surco a una dosis de 0,4 g por surco, procurando una distribución homogénea. El cultivar de alfalfa utilizado corresponde al ecotipo sin reposo invernal Alta Sierra Illapata (Ovalle *et al.*, 2015). La dosis de siembra fue equivalente a 20 kg ha⁻¹ y se utilizó semilla desnuda sin desinfectar para no ocasionar daños a los

rizobios inoculados. Una vez fueron depositadas las semillas en el suelo y con la ayuda de un pulverizador manual de 500 ml, se asperjaron los surcos de cada unidad experimental con los diferentes tratamientos previamente preparados. Por cada surco de un metro lineal, se aplicaron 20 mL de solución bacteriana, equivalente a 100 ml de solución por unidad experimental. Inmediatamente después de la inoculación, se cubrieron los surcos para evitar daño hacia las bacterias por exposición a la radiación solar. Transcurridos 100 días desde la siembra, se realizó una nueva inoculación utilizando un pulverizador de espalda, donde se asperjó un litro de cada tratamiento por unidad experimental correspondiente, con igual concentración inicial de bacterias. Esto con el fin de asegurar la presencia de las bacterias en el suelo y colonización de las raíces.

Tabla 2. Fertilización de suelo de acuerdo con análisis químico de muestra tomada en terreno, se muestra fertilizante utilizado y dosis en kilogramos por hectárea (kg ha^{-1}) y su equivalente en gramos por unidad experimental ($\text{g unidad experimental}^{-1}$).

Fertilizante	kg ha^{-1}	$\text{g unidad experimental}^{-1}$
Fertiyeso	250	25
Superfosfato triple (SFT)	250	25
Muriato de potasio	100	10
Boronatrocálcita	20	2
Urea	50	5

Diseño Experimental

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con 4 repeticiones y 11 tratamientos de inoculación: Cepa AG-06 (cepa comercial); Cepa AG-227; Cepa AG-225; Cepa AG-220; Cepa AG-224; Cepa AG-233; Cepa AG-245; Cepa AG-115; Cepa AG-119; testigo N- Sin Inoculación ni fertilización nitrogenada; testigo N+ Sin inoculación, con nitrógeno mineral.

Las unidades experimentales fueron de 1 m^2 de superficie, cada unidad se enumeró para facilitar su identificación en terreno (Apéndice 1).

Evaluaciones

Índice de nodulación. Transcurridos 140 días desde la siembra se muestrearon tres plantas completas desde hileras centrales por cada unidad experimental. En laboratorio se determinó el número total de nódulos por sistema radicular y el índice de nodulación, donde se registró la ubicación y tamaño de los nódulos en la raíz de acuerdo con la escala de nodulación propuesta por el Centre for *Rhizobium* Studies (CRS) (CRS, 2012; Tiwari y Kulasooriya, 2012) (Anexo 1). Además, se consideró como mínimo aceptable un número mayor a 10 nódulos pequeños de color rosado (Yates *et al.*, 2016).

Aislamiento y verificación de ocupación nodular. Se removieron los nódulos de las plantas muestreadas y se realizó el aislamiento de rizobios con el objetivo de verificar la ocupación nodular por parte de las bacterias inicialmente inoculadas. Los nódulos fueron removidos junto a trozos de raíz. Luego, se depositaron en un infusor y fueron desinfectados superficialmente mediante inmersión en etanol al 70 % (V/V) por un minuto, seguido de inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % por 90 segundos, finalmente fueron lavados seis veces en agua destilada estéril pasando el infusor de un recipiente a otro con el fin de remover los desinfectantes. Una vez desinfectados, se trituraron con una pinza estéril de punta roma sobre una placa Petri para extraer su contenido. Utilizando un asa bacteriológica esterilizada, el contenido extraído de los nódulos fue sembrado en estrías en placas Petri con el medio de cultivo AML más rojo congo como indicador. Las placas fueron incubadas a 25 °C verificando cada 24 horas el crecimiento de los rizobios y/o posibles organismos contaminantes. Finalmente se identificaron y seleccionaron las colonias aisladas que presentaron características típicas de los géneros de rizobios (Hungria *et al.*, 2016). Todos los procedimientos se realizaron en una cámara de flujo laminar.

Preparación de células para PCR. El procedimiento consistió en suspender tres asadas en tubos Eppendorf con 1 ml de solución salina (NaCl al 0,89 % P/V) estéril, cada suspensión fue centrifugada a 5.000 rpm durante un periodo de tres minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante para eliminar los exopolisacáridos e inmediatamente después se suspendieron nuevamente en solución salina estéril. Cada suspensión se estandarizó a una densidad óptica (DO) de 6,0 a 600 nm de

longitud de onda. Todo el proceso fue realizado en tres oportunidades (Gerding, 2011).

Determinación de la huella genética. La identidad de los aislados fue comparada con las cepas originales a través de la amplificación de la huella genética (ADN polimórfico (RAPDs)) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polymerase Chain Reaction) utilizando el partidor RPO1 (5' AATTTTCAAGCGTCGTGCCA 3'), el cual amplifica regiones conservadas y variables del gen *nif* de bacterias fijadoras de nitrógeno (Richardson *et al.*, 1995; Gerding *et al.*, 2012). La mezcla de reacción para cada muestra estuvo compuesta por los reactivos y concentraciones indicados en la Tabla 3.

Para verificar la amplificación de los fragmentos, los productos de la PCR fueron sometidos a una electroforesis en geles de agarosa al 2 % (P/V) previamente teñidos con 10.000 X en Gel Red TM Nucleic Acid Stain (Biotium). Los productos de la PCR de cada aislamiento fueron mezclados con 2 μ L de buffer de carga 6x (Winkler) y depositados en cada celdilla y dejando una libre al comienzo para depositar 18 μ L de marcador KAPA Universal Ladder. La electroforesis fue realizada a 100 Volts por tres horas (Gerding, 2011) y las bandas se visualizaron en un transiluminador UV conectado a una cámara digital. Las condiciones de PCR para la amplificación del ADN se encuentran descritas en la Tabla 4.

Tabla 3. Mezcla de reactivos para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados, para un volumen final de 20 μ L.

Reactivo	Volumen (μ L)
Preparado celular	1,0
Cloruro de magnesio [50Mm]	2,4
Buffer (5x)	4,0
Taq Polimerasa Go tag	0,5
Desoxirribonucleótidos trifosfato [10mM]	0,4
Partidor RP01 [100 uM]	0,5
Agua ultrapura	11,2

Tabla 4. Programa utilizado para la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) de los aislados asociados a *Medicago sativa*.

Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos (N°)
95	300	1
94	30	5
50	10	
72	90	
94	30	35
55	25	
72	90	
72	300	1
4	indefinido	

Producción de materia seca aérea. Transcurridos 229 días post siembra, se realizó el primer corte de plantas en las tres hileras centrales, correspondiente a la primera temporada (año uno). Transcurridos 474 días post siembra, se realizó el segundo corte de plantas en las tres hileras centrales, correspondiente a la segunda temporada (año dos). Se tomaron las plantas muestreadas de cada unidad experimental y se secaron en un horno de ventilación forzada a 65 °C, hasta lograr peso constante. Los datos se expresaron en kilos de materia seca (MS) por hectárea (kg MS ha^{-1}).

Población de plantas. Transcurridos 229 días post siembra, se contabilizó el número de plantas en 25 cm lineales en las tres hileras centrales por cada unidad experimental. Los datos se expresaron en población de plantas (plantas ha^{-1}).

Altura de planta. Transcurridos 474 día post siembra y previo al corte, se promedió la altura no disturbada (cm) de 10 plantas al azar por cada unidad experimental medidas desde la base.

Análisis de datos

En la primera temporada se evaluó índice de nodulación, población de plantas y producción de materia seca aérea. Los datos de índice de nodulación y población de plantas fueron sometidos a análisis no paramétrico de Kruskal Wallis y la prueba de separación de medias de Conover ($P \leq 0,05$). Los datos de producción de materia seca aérea fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) con nivel de

significancia del 95 %, previa comprobación de los supuestos, luego fueron sometidos a la prueba de comparación de medias de LSD Fisher con un nivel de confianza del 95 %.

En la segunda temporada se evaluó producción de materia seca aérea y altura de plantas. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA), previa comprobación de los supuestos. Para los datos de producción de materia seca aérea y altura de plantas se utilizó la prueba de separación de medias LSD Fisher con un nivel de confianza de 95 %. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa estadístico Infostat (Balzarini *et al.*, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

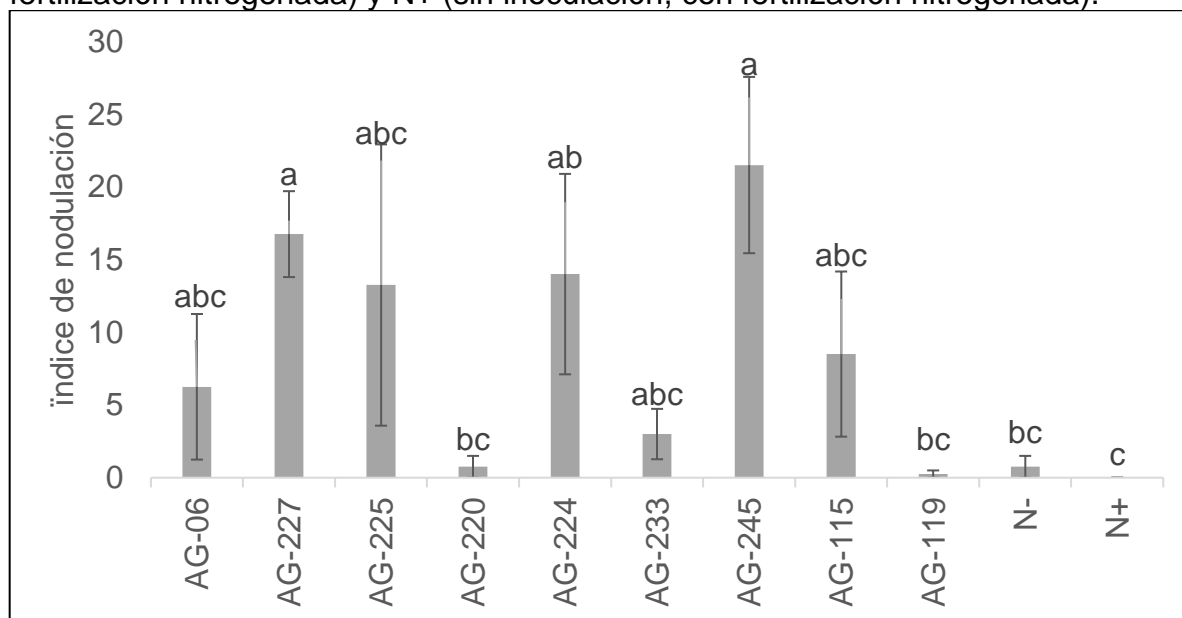
Índice de nodulación

La totalidad de las plantas inoculadas mostraron evidencia de formación de nódulos en sus raíces 140 días después de la siembra. La Figura 1 muestra el índice de nodulación alcanzado por alfalfa con la inoculación de las diferentes cepas. El índice de nodulación asigna puntuación al sistema radicular de las plantas según la cantidad, el tamaño y la posición de los nódulos (Yates *et al.*, 2016) (Anexo 1).

Todas las cepas de rizobios, provenientes tanto de la Región de Arica y Parinacota como de las regiones Metropolitana, de la Araucanía y de Magallanes fueron capaces de inducir nodulación en las plantas de alfalfa en las condiciones de este estudio. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas significativas entre sí ni frente a los testigos sin inoculación N- y N+. Sólo las plantas inoculadas con las cepas AG-227 y AG-245 fueron diferentes a ambos testigos sin inoculación ($P \leq 0,05$). La mejor nodulación por parte de la cepa AG-227 proveniente de la Región de Arica y Parinacota, se podría atribuir una mejor adaptación a altas temperaturas y estrés hídrico en los meses de verano (Loiko *et al.*, 2011 y Azib *et al.*, 2019). Por otro lado, la cepa AG-245 proveniente de Lonquimay en la Región de la Araucanía, podría presentar una mayor tolerancia a bajas temperaturas invernales. D'Amours *et al.* (2022) y D'Amours *et al.* (2024), demostraron que plantas inoculadas con diferentes cepas de *Sinorhizobium meliloti* y expuestas a estrés por congelamiento, mostraron un mayor número y peso seco

nodular, además de un menor daño de nódulos por frío. Por otro lado, Bravo (2021), demostró que existen cepas de rizobios capaces de formar colonias y nodular a bajas temperaturas.

Figura 1. Índice de nodulación en plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) inoculadas con diferentes cepas de rizobios, además de dos testigos, N- (sin inoculación ni fertilización nitrogenada) y N+ (sin inoculación, con fertilización nitrogenada).



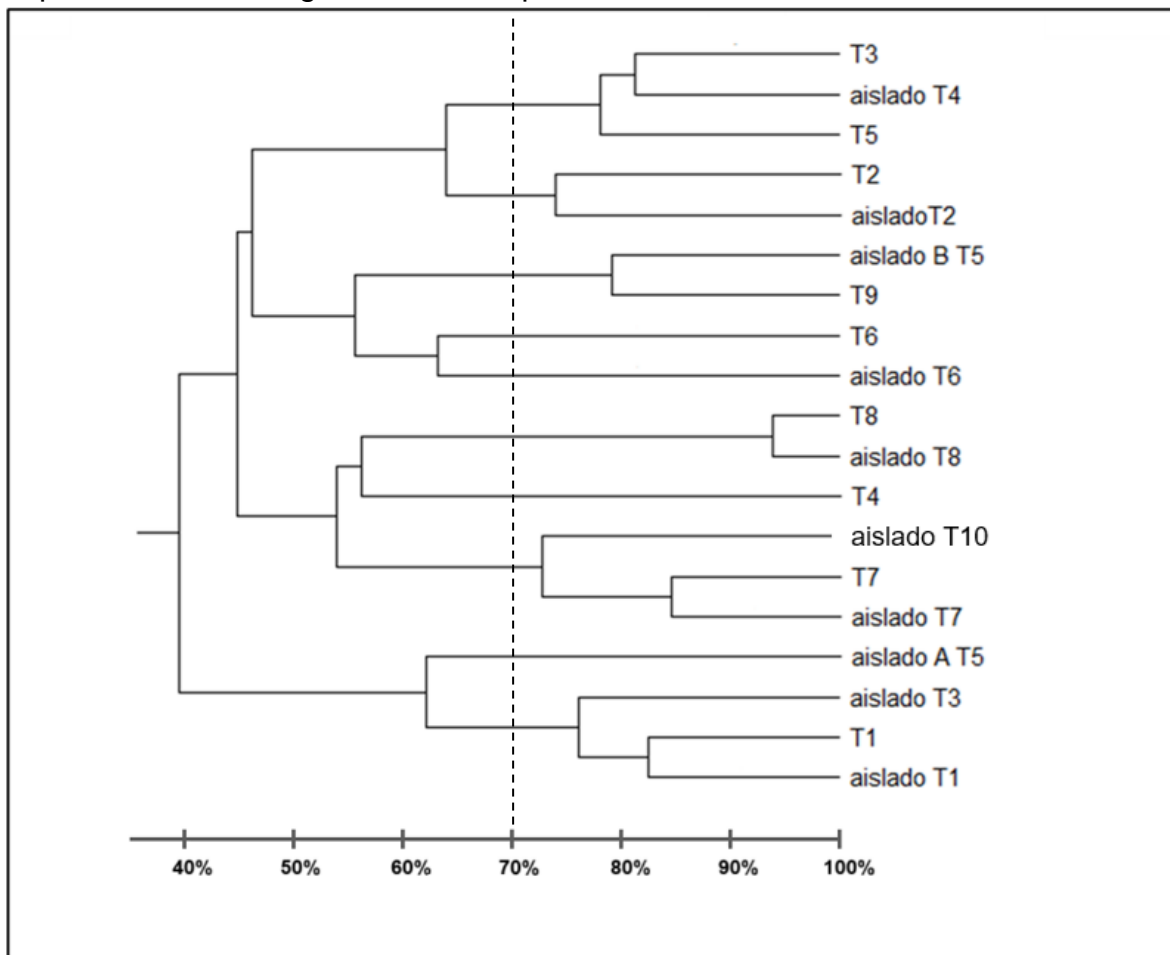
* Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Aislamiento y verificación de ocupación nodular.

Uno de los principales factores que pueden afectar la nodulación en leguminosas es la competencia con cepas de rizobios naturalizadas o nativas. Esto lleva a que la planta de alfalfa pueda nodular con cepas diferentes a las inicialmente inoculadas, como también compartir espacio con otras cepas dentro de un mismo nódulo (Rahamán *et al.*, 2023; Checucci *et al.*, 2016). Esto podría explicar los resultados obtenidos en la ocupación nodular presentados en el cladograma (Figura 2), donde se observó, basado en un criterio de similitud genética mayor o igual al 70 %, que sólo las cepas AG-06 (T1), AG-227 (T2), AG-245 (T7) y AG-115 (T8) coincidieron con los aislados recuperados de las plantas del ensayo. Esto se podría atribuir a una baja habilidad competitiva frente a rizobios nativos, ya que, a pesar de que los rizobios utilizados para la inoculación fueron seleccionados por su alta efectividad en condiciones controladas, fueron menos competitivos frente a la presencia de

cepas nativas, las cuales tienden a ser más hábiles en colonizar, pero menos eficientes (Mendoza-Suárez *et al.*, 2021; Rahamán *et al.*, 2023). Lo que explicaría la baja coincidencia genética entre los tratamientos y los aislados recuperados desde las unidades experimentales.

Figura 2. Cladograma de los aislados de cada cepa rizobiana muestreada desde las unidades experimentales inicialmente inoculadas y los tratamientos (T) con las cepas de rizobios originales usadas para la inoculación.



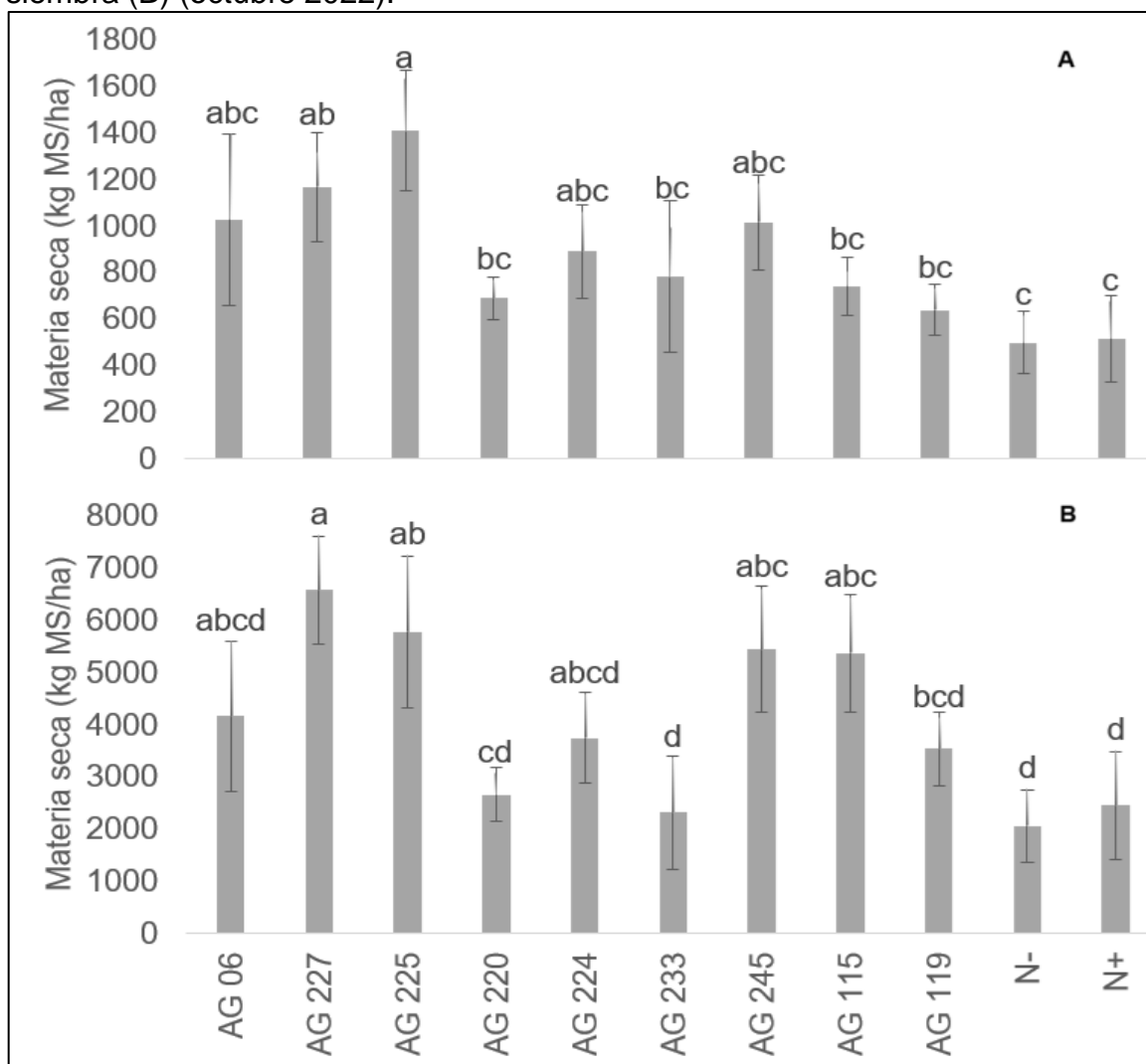
Producción de materia seca aérea

La producción de materia seca aérea en dos temporadas: siete meses después de la siembra (A) (enero 2022) y 16 meses después de la siembra (B) (octubre 2022) se muestran en la Figura 3. En el primer corte, realizado siete meses después de la siembra (Figura 3 A), hubo diferencias significativas entre el tratamiento AG-225 (1.410 kg MS ha⁻¹) en comparación a ambos testigos sin inoculación N- (499 MS kg

ha⁻¹) y N+ (516 kg MS ha⁻¹).

En el corte realizado 16 meses después de la siembra (Figura 3 B) se evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P \leq 0,05$). Donde las plantas inoculadas con las cepas AG-227 (6.584 kg MS ha⁻¹), AG-225 (5.776 kg MS ha⁻¹), AG-245 (5.448 kg MS ha⁻¹) y AG-115 (5.376 kg MS ha⁻¹), fueron estadísticamente similares entre sí, pero diferentes a ambos testigos sin inoculación N- (2.064 kg MS ha⁻¹) y N+ (2.448 kg MS ha⁻¹).

Figura 3. Contenido de materia seca aérea muestreado en dos fechas diferentes: siete meses después de la siembra (A) (enero 2022) y 16 meses después de la siembra (B) (octubre 2022).



* Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Estos resultados se podrían relacionar con las precipitaciones caídas en la zona de estudio (Anexo 2), ya que se constató que hubo diferencias entre ambos periodos previos a las fechas de corte A y B, siendo el periodo previo al primer corte (A) menos lluvioso que el periodo previo al segundo corte (B), lo que podría explicar mayores rendimientos de alfalfa en este último.

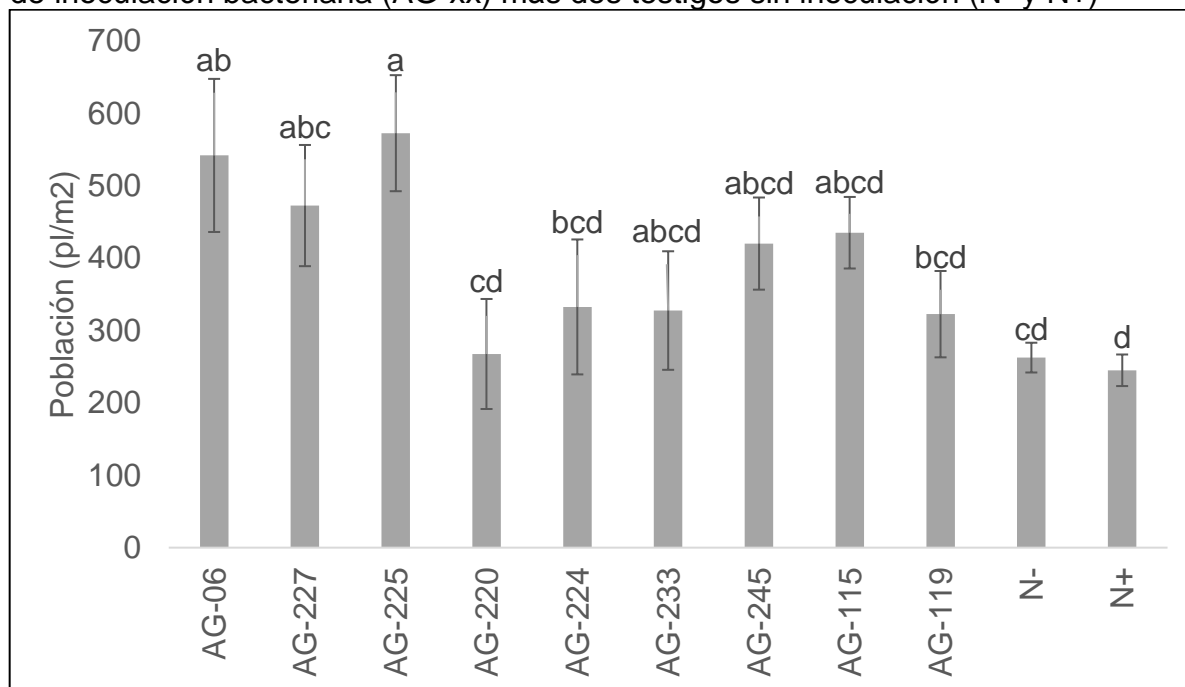
La disponibilidad de agua en el suelo es un factor limitante de la fijación biológica de nitrógeno, ya que el estrés hídrico reduce la infección de raíces por los rizobios llevando a una disminución en la nodulación, además de una baja en el rendimiento de alfalfa (Mabrouk *et al.*, 2018). Wang *et al.* (2024) concluyeron que un contenido de humedad adecuado en el suelo (70 % de la capacidad hídrica del campo) mejoró la actividad de la nitrogenasa en los nódulos contribuyendo a la fijación biológica de nitrógeno, además de mejorar características nutricionales de alfalfa. Morugan-Coronado *et al.* (2019) demostraron que la humedad del suelo influye positivamente en las comunidades microbianas además de mejorar el potencial de fijación de Nitrógeno. Por otro lado, Inostroza *et al.* (2021) informaron que los rendimientos de alfalfa aumentaron de un año a otro a medida que se incrementó la cantidad de lluvia o agua agregada a los experimentos.

Población de plantas.

En la evaluación de población de plantas (Figura 4), hubo diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación ($P \leq 0,05$). Los tratamientos AG-06 y AG-225, fueron superiores a ambos testigos sin inoculación N- y N+. En general la inoculación de rizobios no se considera relevante en la germinación, ya que la infección por parte de los rizobios comienza cuando la planta ya está emergida y con formación tanto de raíces como de pelos radiculares (Jennings y Foster, 2020; Concha y Doerner, 2020; Dalla *et al.*, 2016). Además, factores como humedad, oxígeno, temperatura y luz inciden directamente en la germinación y establecimiento de alfalfa (Butler *et al.*, 2014; Mouradi *et al.*, 2018).

Sin embargo, se ha confirmado la capacidad de ciertas cepas de rizobios de producir fitohormonas como ácido indol acético, riboflavina, brasinoesteroides y giberelinas que pueden estimular la germinación y crecimiento temprano de la planta (Jaiswal *et al.*, 2021; Fahde *et al.*, 2023).

Figura 4. Población de plantas de alfalfa (plantas m⁻²) con diferentes tratamientos de inoculación bacteriana (AG-xx) más dos testigos sin inoculación (N- y N+)



* Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

A la producción del lipo-quito oligosacárido Factor Nod, molécula fundamental en la comunicación rizobio - leguminosa, también se le han atribuido efectos en promotores de la germinación de semillas (Dakora, 2003; Kidaj *et al.*, 2012). Esto podría estar indicando que las cepas de rizobios no sólo aportan al crecimiento y producción de alfalfa a través de la fijación biológica de nitrógeno, sino también mediante la estimulación de la germinación y crecimiento temprano.

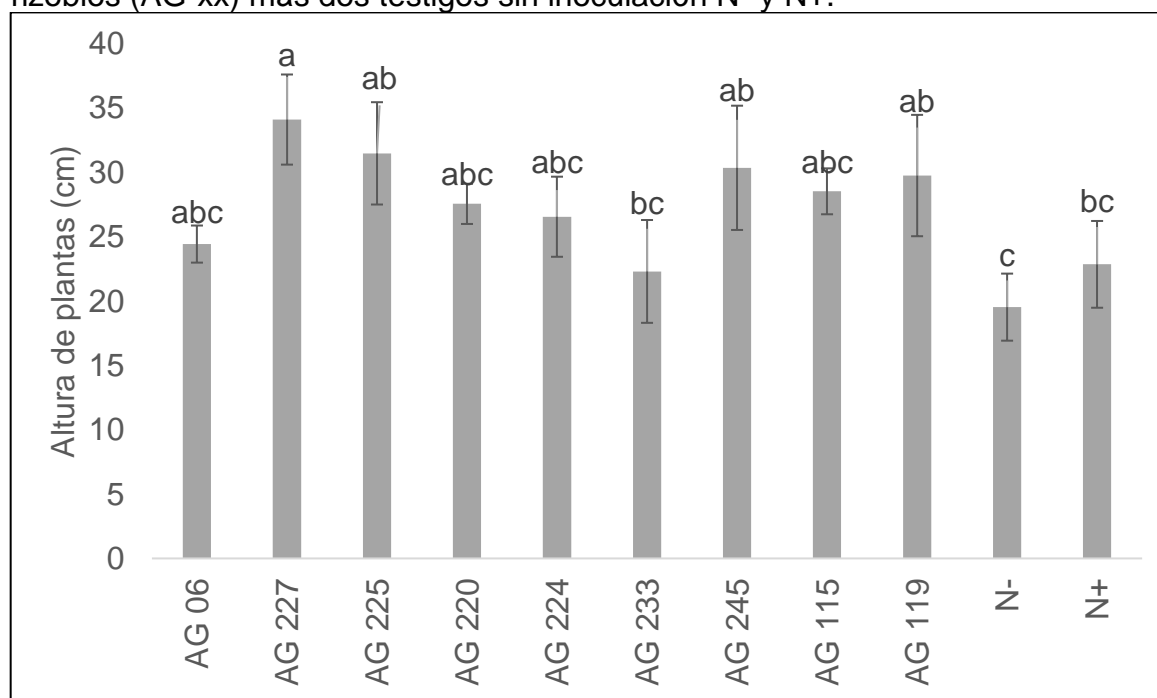
Altura de plantas.

Como se muestra en la Figura 5, las plantas inoculadas con la cepa AG-227 fueron significativamente superiores en altura (34,1 cm) a ambos testigos sin inoculación N- y N+ (19,5 cm y 22,9 cm respectivamente). Resultados similares informaron Silva *et al.* (2020), donde la altura de plantas de alfalfa inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* fue superior a los dos testigos absolutos, sin inoculación ni fertilización nitrogenada y sin inoculación más fertilización nitrogenada.

Diversos factores pueden determinar la altura de las plantas, entre los cuales destacan, el aporte de nitrógeno, características fenotípicas y fisiológicas, tales como número de nudos, longitud de entrenudos y fitohormonas endógenas. Entre

éstas últimas, el ácido indol acético y giberelina influyen en la elongación de entrenudos y tallos, traduciéndose en un aumento en la altura de las plantas (Fang *et al.*, 2023; Mabrouk *et al.*, 2018). El aporte de nitrógeno, por otro lado, tiene un importante papel en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Kosyreva *et al.* (2020), concluyeron que, con el aporte de nitrógeno vía fijación biológica, se obtuvieron las mayores alturas en todos los años experimentales, sin embargo, con aporte inicial de nitrógeno mineral, se obtuvieron alturas mayores sólo en el año de siembra hasta el primer corte.

Figura 5. Altura de plantas de alfalfa (cm) inoculadas con diferentes cepas de rizobios (AG-xx) más dos testigos sin inoculación N- y N+.



* Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

CONCLUSIONES

Las cepas de *Sinorhizobium meliloti* AG-225 y AG-227, provenientes de la Región de Arica y Parinacota destacaron como inoculantes rizobianos promisorios para alfalfa en las condiciones del secano interior del Maule. Ambas cepas bacterianas estimularon la producción de materia seca en alfalfa. La cepa AG-225 promovió una mayor población de plantas y la cepa AG-227 indujo además una mayor nodulación en alfalfa y estimuló una mayor altura de plantas.

REFERENCIAS

1. AGROMET. 2017. Datos Históricos De Estación [en línea]. Red Agroclimática Nacional. Chile. <<https://www.agromet.cl/datos-historicos>>. [Consulta: 01 enero 2021 – 31 diciembre 2022].
2. Andrés, J.A., M. Rovera, L.B. Guiñazú, N.A. Pastor and S.B. Rosas. 2012. Interactions Between Legumes and Rhizobia Under Stress Conditions. pp: 77-94. In: D.K. Maheshwari (Ed.). *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Springer. Heidelberg, Alemania.
3. Azib, S., H. Cheloufi, S. Attab and N. Bouras. 2019. Improvement of alfalfa growth under water stress by inoculation with *Sinorhizobium meliloti* strains from the Algerian Sahara. *Pont.* 75(7/1): 35-43.
4. Balzarini, M.G., L. González, M. Tablada, F. Casanoves, J.A. Di Rienzo y C.W. Robledo. 2008. InfoStat: software estadístico. Manual del usuario. Versión 2008. Brujas. Córdoba, Argentina.
5. Berenji, S., D.J. Moot, J.L. Moir, y H.J. Ridgway. 2015. Lucerne dry matter and fixation. When sown with or without lime and inoculation. *Jour. of New Zea. Grass.* 77: 109-116.
6. Bertrand, A., M. Bipfubusa, A. Claessens, S. Rocher and Y. Castonguay. 2017. Effect of photoperiod prior to cold acclimation on freezing tolerance and carbohydrate metabolism in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Pl. Sci.* 264(2017): 122-128.
7. Bottomley, P.J. and D.D. Myrold. 2007. Biological N Inputs. pp: 365-387. In: E.A. Paul (Ed.). *Soil microbiology and biochemistry*. (3rd. Ed.). Academic Press.
8. Bravo, F. 2021. Selección de rizobios tolerantes al frío para inoculación de alfalfa (*Medicago sativa* L.). Memoria de Título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
9. Butler, T. J., A. E. Celen, S. L. Webb, D. Krstic and S. M. Interrante. 2014. Temperature Affects the Germination of Forage Legume Seeds. *Crop Sci.* 54(2014): 2846-2853.
10. Cerda, C. 2020. Diversidad y efectividad simbiótica de rizobios asociados a alfalfa (*Medicago sativa*) en la Región de Arica y Parinacota. Memoria de Título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de

Agronomía. Chillán, Chile.

11. Checucci, A., E. Azzarello, M. Bazzicalupo, M. Galardini, A. Lagomarsino, S. Mancuso, L. Marti, M. C. Marzano, S. Mocali, A. Squartini, M. Zanardo and A. Mengoni. 2016. Mixed Nodule Infection in *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* Symbiosis Suggest the Presence of Cheating Behavior. *Front. Plant Sci.* 7(835).
12. Concha C. and P. Doerner. 2020. The impact of the rhizobia-legume symbiosis on host root system architecture. *Jour. of Exp. Bot.* 71(13): 3902-3921.
13. D'Amours, E., Bertrand, A., Cloutier, J., Claessens, A., Rocher, S. and Seguin, P. 2022. Impact of *Sinorhizobium meliloti* strains and plant population on regrowth and nodule regeneration of alfalfa after a freezing event. *Plant Soil.* 500: 161-179.
14. D'Amours, E., Bertrand, A., Cloutier, J., Claessens, A., Rocher, S. and Seguin, P. 2024. Selection of effective and competitive *Sinorhizobium meliloti* strains that nodulate alfalfa under low temperature. *Rhizosphere.* 29: 100860.
15. Dalla, V., M. E. Zanetti and F. Blanco. 2016. How legumes recognize rhizobia. *Plant Sign. & Beh.* 11(2): 1120396.
16. Duguma, B., G. Eshete, T. Zewdu and A. Tolera. 2014. Comparison of Nutritive Value of Alfalfa, Rhodes Hay, Cynodon Pasture and Linseed Cake-Maize Mixture at Hawassa College of Agriculture, Ethiopia. *Academ. Journ. Of Nutr.* 3(2): 19-21.
17. Dakora, F. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phyto.* 158: 39-49.
18. Fang, J., S. Shi, Y. A. J. Guan, B. Lu, B. Wu, W. Wang, R. Ma and P. Nan. 2023. Analysis of Phenotypic and Physiological Characteristics of Plant Height Difference in Alfalfa. *Agro.* 13(7): 1744.
19. Fhade, S., S. Boughribil, B. Sijilmassi y A. Amri. 2023. Rhizobia: A Promising Source of Plant Growth-Promoting Molecules and their Non-Legume Interactions: Examining Applications and Mechanisms. *Agriculture.* 13: 1279.
20. Galaz, L. 2019. Diversidad de rizobios asociados a praderas de alfalfa (*Medicago sativa*) en la Región de Magallanes. Memoria de Título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán,

Chile.

21. Gawel, E. and M. Grzelak. 2014. Protein from lucerne in animals supplement diet. *Jour. Food, Agr. Env.* 12(2): 314-319.
22. Gawel, E., M. Grzelak and M. Janyszek. 2017. Lucerne (*Medicago sativa* L.) in the human diet – Case reports and short reports. *Jour. Herb. Med.* 10: 8-16.
23. Gerding, M. 2011. Phylogenetic and ecological characterisation of the root nodule bacteria from legumes in the African genus *Lessertia*. Thesis, Doctor of Philosophy. Murdoch University. Perth, Australia.
24. Hungria, M., G.W. O'Hara, J.E. Zilli, R.S. Araujo, R. Deaker and J.G. Howieson. 2016. Isolation and growth of rhizobia. pp: 39-60. In: J.G. Howieson and M.J. Dilworth (Eds.). *Working with rhizobia*. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.
25. Inostroza, L., S. Espinoza, V. Barahona, M. Gerding, A. Humphries, A. Del Pozo and C. Ovalle. 2021. Phenotypic Diversity and Productivity of *Medicago sativa* Subspecies from Drought-Prone Environments in Mediterranean Tipe Climates. *Plants*. 10(5): 862.
26. Issah, G., J.J. Schoenau, H.A. Lardner and J.D. Knight. 2020. Nitrogen Fixation and Resource Partitioning in Alfalfa (*Medicago sativa* L.), Cicer Milkvetch (*Astragalus cicer* L.) and Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Using ¹⁵N Enrichment under Controlled Enviroment Conditions. *Agr.* 10(9): 1438.
27. Jaiswal S.K., M. Mohammed, F.Y.I. Ibny and F.D. Dakora. 2021. Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. *Front. Sustain. Food Syst.* 4: 619676.
28. Jennings, J. and J. Foster. 2020. Legume Structure and Morphology. pp: 51-64. In: K. J. Moore, M. Collins, C. J. Nelson and D. D. Redfearn. *Forages: The Science of Grassland Agriculture*. John Wiley & Sons Ltd. USA.
29. Julier, B., F. Gastal, G. Louarn, I. Badenhausser, P. Annicchiarico, G. Crocq, D. Le Chatelier, E. Guillemot, and J. Emile. 2017. Lucerne (Alfalfa) in European Cropping Systems. pp: 168-192. In: D. Murphy-Bokern, F.L. Stoddard and C.A. Watson (Eds.). *Legumes in Cropping Systems*. CABI. Boston, USA.
30. Karayilanli, E. and V. Ayhan. 2016. Investigation of feed value of alfalfa (*Medicago sativa* L.) harvested at different maturity stages. *Leg. Res.* 39(2):

237-247.

31. Kidaj, D., J. Wielbo and A. Skorupska. 2012. Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions. *Microb. Res.* 167: 144-150.
32. Kosyreva, M., L. Basieva, A. Nagham, A. Chibirova and K. Khetagurov. 2020. Growth and developmen of Alfalfa depending on the type of nitrogen nutrition. *BIO Web of Conf.* 23: 03007.
33. Lewis, G.P., B.D. Schrire, B.A. Mackinder, L. Rico and R. Clark. 2013. A 2013 linear secueence legume genera set in a phylogenetic context – A tool for collections management and taxon sampling. *South African Journal of Botany.* 89: 76-84.
34. Loiko, N.G., N.A. Kryazhevskikh, N.E. Suzina, E.V. Demkina, A. Yu. Muratova, O.V. Turkovskaya, A.N. Kozlova, V.F. Galchenko, and G.I. El'-Registan. 2011. Resting Forms of *Sinorhizobium meliloti*. *Mik.* 80(4): 472-482.
35. LPWG (Legume Phylogeny Working Group). 2013. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Tax.* 62(2): 217-248.
36. Mabrouk, Y., I. Hemissi, I. Ben Salem, S. Mejri, M. Saidi and O. Belhadj. 2018. Potential of Rhizobia in Improving Nitrogen Fixation and Yields of Legumes. pp: 107-122. In: Everlon Rigobelo (Ed.). *Simbiosis*. IntechOpen. London, United Kingdom.
37. Mendoza-Suárez, M., S.U. Andersen, P.S. Poole and C. Sánchez-Cañizares. 2021. Competition, Nodule Occupancy, and Persistence of Inoculant Strains: Key Factors in the *Rhizobium*-Legume Symbioses. *Front. Plant Sci.* 12(2021): 690567.
38. Mouradi, M., M. Farissi, A. Bouizgaren, Y. Lahrizi, A. Qaddoury and C. Ghoulam. 2018. Alfalfa and Its Symbiosis Responses to Osmotic Stress. pp: 149-168. In: R. L. Edvan and L. R. Bezerra. *New Perspectives in Forage Crops*. Books on Demand. InTech. Rijeka, Croatia.
39. Morugán-Coronado, A., F. García-Orenes, M. McMillan and L. Pereg. 2019. The effect of moisture on soil microbial properties and nitrogen cycles in Mediterranean sweet orange orchard under organic and inorganic fertilization. *Sci. of The Tot. Env.* 655: 158-167.

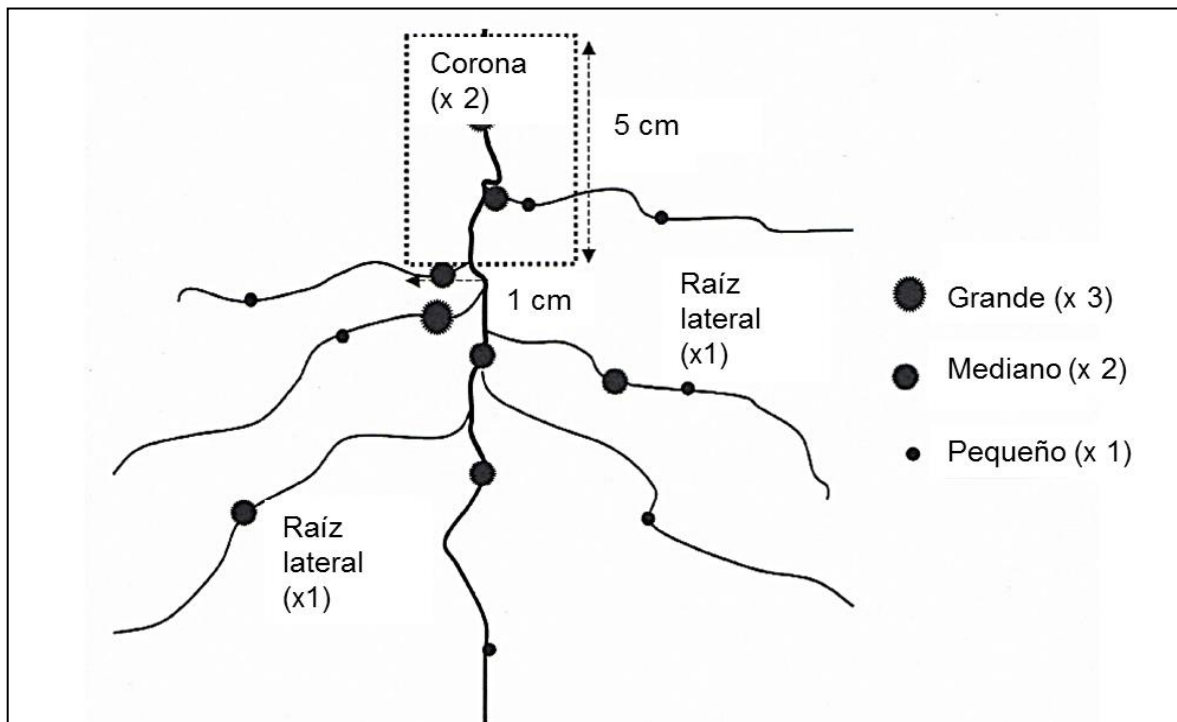
40. Mrabet, M., K. Zribi, H. Mhadhbi, N. Djébali, R. Mhamdi, M.E. Aouani and K. Nakamura. 2010. Salt tolerance of a *Sinorhizobium meliloti* strain isolated from dry lands: growth capacity and protein profile changes. *Ann. Microbiol.* 61(2): 361-369.
41. Ovalle, C., S. Espinoza, V. Barahona, M. Gerding and A. del Pozo. 2016. Productivity of alfalfa cultivars in dryland Mediterranean environments of central Chile. *Opt. Medit.* 114: 195-199.
42. Ovalle, C., S. Espinoza, V. Barahona, M. Gerding, A. Humphries and A. del Pozo. 2015. Lucerne and others perennial legumes provide new options for rainfed livestock production in the Mediterranean-climate región of Chile. *Cienc. Inv. Agr.* 42(3): 461-474.
43. Powel, J. and J. Klironomos. 2007. The Ecology of Plant-Microbial Mutualisms. pp: 257-281. In: E.A. Paul (Ed.). *Soil microbiology and biochemistry.* (3rd. Ed.). Academic Press.
44. Pozo, A. del, C. Ovalle, S. Espinoza, V. Barahona, M. Gerding and A. Humphries. 2017. Water relations and use-efficiency, plant survival and productivity of nine alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars in dryland Mediterranean conditions. *Europ. Jour. Of Agron.* 84(2017): 16-22.
45. Pozo, A. del y P. del Canto. 1999. Áreas agroclimáticas y sistemas productivos en la VII y VIII regiones. Serie Quilamapu N°113. INIA Quilamapu. Chillán, Chile.
46. Prévost, D., P. Drouin, S. Laberge, A. Bertrand, J. Cloutier, and G. Lévesque. 2003. Cold-adapted rhizobia for nitrogen fixation in temperate regions. *Can. J. Bot.* 81(12): 1153-1161.
47. Racca, R.W. y N. González. 2007. Nutrición nitrogenada de la alfalfa e impacto de la fijación biológica del nitrógeno. pp: 67-79. En: D. Basigalup (Ed.). *El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina.* Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina.
48. Rahamán, A., M. Mancini, C. Nadon, I.A. Pérez, W.F. Farsamin, M.T. Lampe, T.H. Le, L. Martínez, A. J. Weisberg, J.H. Chang and J.L. Sachs. 2023. Competitive interference among rhizobia reduces benefits to hosts. *Current Bio.* 33(14): 2988-3001.

49. Richardson, A.E., L.A. Viccars, J.M. Watson and A.H. Gibson. 1995. Differentiation of Rhizobium strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. *Soil Biol. Biochem.* 27(4-5): 515-524.
50. Rupitak, Q. and S. Srisaikhom. 2021. Evaluation of Yield Production and Chemical Composition of Three Types of Forage Legumes at Different Cutting Intervals and Cutting Times to Assess Their Benefits as Ruminant Animal Feed. *CMUJ. Nat. Sci.* 20(3): e2021046.
51. Sanz-Sáez, A., G. Erice, J. Aguirreolea, J.J. Irigoyen and M. Sánchez-Díaz. 2012. Alfalfa yield under elevated CO₂ and temperature depends on the *Sinorhizobium* strain and growth season. *Env. Exp. Bot.* 77: 267-273.
52. Sakrouhi, I., M. Belfquih, L. Sbabou, P. Moulin, G. Bena, A. Filali-Maltouf and A. Le Quéré. 2016. Recovery of symbiotic nitrogen fixing acacia rhizobia from Merzouga Desert sand dunes in South East Morocco – Identification of a probable new species of *Ensifer* adapted to stressed environments. *Sys. App. Mic.* 39(2): 122-131.
53. Sheaffer, C.C., G.W. Evers and J.M. Jungers. 2020. Cool-Season Legumes for Humid Areas. pp: 263-275. In: K.J. Moore, M. Collins, C.J. Nelson and D.D. Redfearn (Eds.). *Forages: The Science of Grassland Agriculture Vol. II.* (7th. Ed.). John Wiley & Sons Ltd. New Jersey, USA.
54. Silva, L., J. Silva, M. Hungria, A. Moreira, M. Nogueira and C. Soares. 2020. Biomass Yield, Nitrogen Content and Uptake, And Nutritive Value of Alfalfa Co-Inoculated with Plant-Growth Promoting Bacteria. *Int. Jour. for Inn. Ed. And Res.* 8(5): 400-420.
55. Spada, M. 2007. Evaluación de cultivares y panorama varietal. pp: 131-151. En: D. Basigalup (Ed.). *El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina.* Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina.
56. Stolpe, N.B. 2006. Descripción de los principales suelos de la VIII Región de Chile. Publicación del Departamento de Suelos y Recursos Naturales N°1. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
57. Wang, Y., C. He, P. Meng, S. Sun, J. Gao, J. Zhang and J. Cai. 2024. Effects of Different Moisture Conditions on Biological Nitrogen Fixation Capacity and Nutritive Value of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Seedlings. *Jour. of Soil Sci. and Pl. Nutr.* 24: 8235-8247.

58. Yates, R.J., Howieson, J.G., Hungría, M., Bala, A., O'Hara, G.W. and Terpolilli, J. 2016. Authentication of rhizobia and assessment of the legume symbiosis in controlled plant growth systems. pp: 73-108. In: J.G. Howieson and M.J. Dilworth (Eds.). Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia.

ANEXOS

Anexo 1. Sistema de clasificación de la nodulación para sistemas radiculares jóvenes (adaptado de Tiwari y Kulasooriya, 2012).



Centre for *Rhizobium* Studies (2012).

Anexo 2. Comparación de las precipitaciones acumuladas (mm) en la zona del ensayo entre los años 2021 y 2022.

	2021												Total
Mes	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sept	oct	nov	dic	
Lluvia (mm)	19,6	0,6	0,2	22,8	127,2	58,2	45,7	69,3	45,8	7	0	0	396,4
	2022												
Mes	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sept	oct	nov	dic	
Lluvia (mm)	0	0	3,2	33,8	49,6	146,7	135,8	57,6	15,1	9,9	16,2	0	467,9

AGROMET, Red Agroclimática Nacional (2017).

APÉNDICES

Apéndice 1. Diseño experimental del ensayo en terreno.

Bloque	Tratamiento										
I	AG-06	AG-224	AG-225	AG-233	AG-115	N-	AG-227	N+	AG-119	AG-245	AG-220
II	AG-225	AG-233	AG-06	AG-227	AG-245	AG-119	AG-115	AG-220	AG-224	N+	N-
III	AG-245	AG-115	N-	AG-220	AG-224	AG-06	N+	AG-225	AG-233	AG-119	AG-227
IV	AG-119	AG-227	AG-220	AG-225	AG-115	AG-233	AG-224	AG-245	AG-06	N-	N+