

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**PREDICCIÓN DE CALIDAD EN LÍNEAS DE ALFALFA TOLERANTES A
SEQUÍA BASADO EN TECNOLOGÍA NIRS**

POR

SOFÍA IGNACIA CABEZAS DOSSOW

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

CHILLÁN – CHILE
2026

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**PREDICCIÓN DE CALIDAD EN LÍNEAS DE ALFALFA TOLERANTES A
SEQUÍA BASADO EN TECNOLOGÍA NIRS**

POR

SOFÍA IGNACIA CABEZAS DOSSOW

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

CHILLÁN – CHILE
2026

Aprobada por:

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

Guía

Luis Inostroza F.
Ing. Agrónomo, Dr. Cs Agropecuarias
INIA Quilamapu

Guía externo

Profesor Asistente, Miguel Garriga C.
Lic. Biología, Dr. Cs. Agrarias

Asesor

Profesor Asociado, Manuel Faúndez S.
Ing. Agrónomo, Mg. Cs.

Decano

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto Fondecyt 1230399.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Summary.....	1
Introducción	2
Materiales y Métodos	5
Resultados y Discusión	9
Conclusiones	20
Referencias	20
Apéndices	18
Anexos	20

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Relación entre los valores observados y predichos de proteína cruda (PC), en muestras de alfalfa, obtenidos mediante la calibración de modelos predictivos.....	11
Figura 2 Relación entre los valores observados y predichos de fibra detergente neutro (FDN) en muestras de alfalfa, obtenidos mediante la calibración de modelos predictivos.....	12
Figura 3 Relación entre los valores observados y predichos de fibra detergente ácido (FDA) en muestras de alfalfa, obtenidos mediante la calibración de modelos predictivos.....	13
Tabla 1 Media, rango de variación (mínimo y máximo) y desviación estándar (DE) de proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) evaluadas en 125 muestras de alfalfa utilizadas para la calibración (n=87) y validación (n=38) del modelo predictivo de calidad de forraje de alfalfa.....	10
Tabla 2 Estadísticos descriptivos para modelos de calibración y predicción de componentes nutricionales de alfalfa.....	10
Tabla 3 Medidas de dispersión de las 250 poblaciones de alfalfa.	18
Tabla 4 Poblaciones de alfalfa que destacan en el 5% superior con respecto a producción de materia seca (kg MS/ha), proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y valor relativo del alimento (VRA).....	19

PREDICCIÓN DE CALIDAD EN LÍNEAS DE ALFALFA TOLERANTES A SEQUÍA BASADO EN TECNOLOGÍA NIRS

PREDICTION OF QUALITY IN DROUGHT-TOLERANT ALFALFA LINES BASED ON NIRS TECHNOLOGY

Palabras índice adicionales: Valor nutritivo del forraje, mejoramiento genético, ambientes mediterráneos de secano.

RESUMEN

La alfalfa (*Medicago sativa*) es un cultivo forrajero estratégico para sistemas ganaderos de secano mediterráneo, siendo clave la selección de poblaciones con elevada calidad nutricional y adaptación a la sequía para la sostenibilidad productiva. En este contexto, la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) surge como una herramienta eficiente para la determinación de calidad de forraje. Los objetivos de este trabajo fueron i) predecir calidad nutricional (proteína cruda (PC), fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA)) en alfalfa mediante el ajuste de modelos predictivos basados en espectroscopía NIR; ii) estimar la calidad de forraje de 250 progenies de medios hermanos de alfalfa desarrolladas por INIA, y iii) seleccionar las progenies con mayor calidad de forraje en ambientes mediterráneos de secano. Se desarrollaron modelos NIRS a partir de 125 muestras de forraje de alfalfa mediante regresión PLS, los cuales presentaron elevada capacidad predictiva. Estos modelos permitieron estimar PC, FDN y FDA en 1.000 muestras de forraje de alfalfa provenientes de la Estación Experimental Cauquenes del INIA. Los resultados demuestran la eficacia de NIRS como herramienta robusta y precisa para la determinación de calidad de forraje en alfalfa, contribuyendo una base técnica sólida para programas de mejoramiento genético de alfalfa.

SUMMARY

Alfalfa (*Medicago sativa*) is a key forage crop for Mediterranean rainfed livestock systems. The selection of populations with high nutritional quality and drought

tolerance is essential for ensuring the long-term productivity of these systems. In this context, near-infrared spectroscopy (NIRS) emerges as an efficient tool for determining forage quality. This study aimed to i) predict the quality of alfalfa forage in terms of crude protein (CP), acid detergent fiber (ADF) and neutral detergent fiber (NDF) by adjusting predictive models based on NIRS; ii) estimate the forage quality of 250 alfalfa half-sib progenies developed by INIA, and iii) select the progenies with the highest forage quality in Mediterranean rainfed environments. NIRS models were developed using PLS regression on 125 alfalfa forage samples, which showed high predictive power. These models enabled the prediction of CP, NDF, and ADF in 1,000 alfalfa forage samples from INIA's Cauquenes Experimental Station. The results demonstrate the effectiveness of NIRS as a robust and accurate tool for determining forage quality in alfalfa and provide a solid technical basis for alfalfa breeding programs.

INTRODUCCIÓN

El cambio climático hace referencia a un cambio significativo en las condiciones del clima, como, precipitaciones, temperatura, viento o patrones de nieve. Se proyecta que el cambio climático tendrá impactos significativos en la agricultura de manera directa e indirecta en cultivos, suelos, ganado y plagas (Hatfield *et al.*, 2020). La producción agrícola puede verse drásticamente disminuida debido a la variabilidad climática asociada a los aumentos de temperatura y de la concentración de dióxido de carbono, así como a los cambios en los patrones de las precipitaciones (Eftekhar, 2022). Junto con lo anterior, ha ido en aumento la ocurrencia de fenómenos meteorológicos extremos, tales como sequías, olas de calor e intensas lluvias que provocan inundaciones, incrementando la lixiviación, erosión del suelo y la escorrentía (Bibi y Rahman, 2023).

En Chile, las precipitaciones han disminuido entre 2 y 4% por década en los últimos 50 años, lo que ha afectado negativamente el establecimiento y la producción de cultivos en el territorio nacional.

El secano mediterráneo de Chile es una de las zonas más vulnerables a la disminución en las precipitaciones, debido a que depende exclusivamente del agua

proveniente de las lluvias. El secano mediterráneo comprende cerca de 2,5 millones de hectáreas ubicadas en la vertiente occidental (secano costero) y oriental (secano interior) de la cordillera de la Costa, entre las regiones de O'Higgins (33,9° latitud sur) y Biobío (37,8° latitud sur). Se caracteriza por precipitaciones concentradas mayoritariamente en los meses de invierno (80 %), y por una temporada estival que puede variar entre 4 y 6 meses secos y calurosos (Inostroza *et al.*, 2024).

Los sistemas agrícolas mediterráneos chilenos se caracterizan por el establecimiento de cultivos mixtos y por la producción ganadera. La utilización de cultivos intensivos con labranza convencional ha provocado un deterioro de las características físicoquímicas del suelo y en muchas zonas, la producción se ha limitado debido a compactación del suelo, disminución de la infiltración y contenido de nutrientes, aumento de la escorrentía y erosión del suelo (Martínez *et al.*, 2011, 2012). Por otra parte, la producción ganadera se sustenta en pasturas anuales y está fuertemente limitada por la escasez de forraje disponible desde el verano hasta el otoño (Del Pozo *et al.*, 2017).

Con la finalidad de extender la temporada de forraje en los sistemas de producción de secano, surge como alternativa el uso de leguminosas perennes con sistema radical profundo. Las especies perennes suelen presentar una mayor proporción de raíces por brote y una mayor extensión de las raíces laterales en comparación con las especies anuales (Cocks, 2001; Schenk y Jackson, 2002). Además, especies con raíces profundas tienen la capacidad de absorber nutrientes de horizontes más profundos en suelos deficientes en nutrientes (McCulley *et al.*, 2004) y son capaces de mejorar las características físicoquímicas del suelo (Holford *et al.*, 1998; Cocks, 2001; Dear *et al.*, 2003).

Entre las leguminosas perennes, la alfalfa (*Medicago sativa* L., Fabaceae) podría utilizarse como estrategia de adaptación al cambio climático en regiones semiáridas, aumentando la resiliencia y sostenibilidad de los sistemas de producción de secano (Porqueddu *et al.*, 2016; Ghahramani *et al.*, 2020).

La alfalfa es una de las leguminosas perennes más tolerantes a la sequía (Li *et al.*, 2008) y puede sobrevivir a largos períodos secos debido a su profundo sistema de raíces (Ward *et al.*, 2001). Además, la pubescencia de las hojas, la cutícula

gruesa y el área foliar reducida mejoran la tolerancia de la alfalfa a la sequía. Cuando la disponibilidad de agua en el suelo es baja o nula en verano, la alfalfa permanece inactiva y cuando comienzan las lluvias a principios de otoño, se reinicia el crecimiento (Humphries y Auricht, 2001). Asimismo, se caracteriza por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en asociación con bacterias simbiotes de la especie *Sinorhizobium meliloti*, mejorando las características químicas del suelo, lo que favorecerá el rendimiento del próximo cultivo que se establezca (Latta *et al.*, 2001; Dear *et al.*, 2003). Sin embargo, la alfalfa no se encuentra adaptada al anegamiento (Hill, 1996), es sensible a los suelos ácidos (Munns, 1965) y no tolera el pastoreo continuo (McKinney, 1974).

Pese a que la alfalfa es una especie con características deseables de adaptación a condiciones de déficit hídrico, la domesticación de esta ha reducido la diversidad genética y los cultivares comerciales se encuentran menos adaptados al estrés ambiental (Muller *et al.*, 2006). Debido a lo anterior, se requieren nuevos cultivares con mayor tolerancia a la sequía para ayudar a mitigar los efectos del cambio climático (Humphries *et al.*, 2020).

Los cultivares de alfalfa de secano se seleccionan en función de la supervivencia durante el establecimiento, la tolerancia al pastoreo (Humphries *et al.*, 2006), la adaptación general (Bouton, 2012) y la persistencia en condiciones de sequía (Marshall *et al.*, 2008).

En Chile, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) ha trabajado en los últimos 15 años en el desarrollo de germoplasma tolerante a la sequía en especies leguminosas forrajeras perennes, entre ellas, la alfalfa. INIA ha seleccionado germoplasma de alfalfa con tolerancia a la sequía y ha iniciado un programa de mejoramiento genético de la especie denominado “Programa de Alfalfas de Secano (PAS)”. El desarrollo de nuevos cultivares de alfalfa involucra la caracterización fenotípica (tolerancia a sequía y valor agronómico de poblaciones), selección de padres con atributos sobresalientes, policruzamientos, evaluación agronómica de progenies y cruzamientos dirigidos para el desarrollo de cultivares sintéticos. Como resultado de los años de trabajo en el mejoramiento genético de la

alfalfa, se obtuvo la primera variedad de alfalfa adaptada a condiciones de secano mediterráneo denominada “Kauke” (Inostroza *et al.*, 2024).

El PAS-INIA ha desarrollado cultivares tolerantes a sequía en función de productividad y persistencia en condiciones de estrés hídrico, sin considerar la calidad nutricional de la alfalfa, factor clave en los sistemas ganaderos. Lo anterior, se debe al elevado costo de la mano de obra y del análisis químico por muestra. El uso de métodos indirectos basados en tecnología de Espectroscopía de Reflectancia del Infrarrojo Cercano (NIRS) surge como una alternativa para optimizar tiempo y recursos.

La tecnología NIRS permite la predicción instantánea del valor nutritivo de alimentos y forrajes (Garrido, 1997). En comparación con métodos analíticos de laboratorio de tipo convencional, es un método no destructivo, no requiere reactivos y permite la determinación de múltiples componentes como proteína cruda (PC), materia orgánica digestible (MOD), fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutro (FDN), entre otros. La implementación de la tecnología NIRS para estimar calidad de forraje requiere un proceso de calibración, que consiste en la obtención del espectro NIRS y la realización de análisis químico tradicional en muestras individuales de forraje. Con esta información, se ajustan modelos predictivos que luego se utilizan de forma rutinaria para la estimación (Stuth *et al.*, 2003). Programas de mejoramiento genético a nivel global utilizan la tecnología NIRS para la estimación de parámetros de calidad de forraje en alfalfa (Julier *et al.*, 2000; Biazzi *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2020, 2025)

Los objetivos de este trabajo fueron i) predecir calidad nutricional (PC, FDN y FDA) en alfalfa mediante el ajuste de modelos predictivos basados en espectroscopía NIR; ii) estimar la calidad de forraje de 250 progenies de medios hermanos de alfalfa desarrolladas por INIA, y iii) seleccionar las progenies con mayor calidad de forraje en ambientes mediterráneos de secano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El programa de mejoramiento genético de alfalfa del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-Chile) introdujo 70 accesiones de alfalfa provenientes de diversas regiones, incluidas Chile, Azerbaiyán, Kazajistán, Estados Unidos, Australia y España. La colección estuvo compuesta por variedades locales, cultivares y líneas genéticas avanzadas, seleccionadas por su potencial tolerancia a condiciones de sequía. El objetivo de esta iniciativa fue ampliar la diversidad genética de la alfalfa en Chile e identificar rasgos asociados a la adaptabilidad en condiciones de estrés hídrico, contribuyendo al mejoramiento de los cultivares nacionales.

De las accesiones evaluadas, se seleccionaron 25 por sus valores genéticos superiores en producción de materia seca y persistencia. Posteriormente, se eligieron 10 genotipos por accesión, que se clonaron mediante el enraizamiento de secciones de tallo de 5 centímetros, obteniéndose cinco clones por genotipo.

En total, 250 genotipos de alfalfa se establecieron en un diseño de bloques completos al azar, con cinco réplicas (clones), para realizar un policruzamiento. Dentro de una jaula a prueba de insectos, las plantas se cruzaron con la ayuda de abejorros (*Bombus terrestris* L.), obteniéndose un total de 250 progenies de medios hermanos, denominadas “Población de Alfalfa Tolerante a la Sequía”.

Las 250 semillas de progenie de medios hermanos se sembraron en bandejas de germinación con turba (*Kekkila*, Finlandia) como sustrato. El sustrato se regó diariamente y se fertilizó periódicamente con una solución de 1,1 g L⁻¹ de Phostrogen (Bayer, Reino Unido). Las plántulas fueron inoculadas con una suspensión de *Sinorhizobium meliloti* (cepa WSM2141) y cultivadas durante dos meses en invernadero.

Sitio experimental y establecimiento de plantas

El estudio se llevó a cabo en la Estación Experimental Cauquenes del INIA (Chile), ubicada en las coordenadas 35°57'S y 72°19'O. Cauquenes, presenta un clima mediterráneo con marcada estacionalidad y condiciones propensas a la sequía, adecuadas para la evaluación de tolerancia a sequía en alfalfa.

Durante el período 2020-2023, la temperatura media anual fue de 14,7 °C. En el mes de enero se registraron temperaturas mínima y máxima promedio de 11,2 °C

y 31,7 °C, respectivamente, mientras que los meses de enero y febrero, registraron temperaturas máximas medias superiores a 31,5 °C. Por el contrario, julio correspondió al mes más frío, con temperaturas inferiores a 2,5 °C. En relación con la pluviometría, la precipitación media anual fue de 485 mm, inferior al promedio histórico regional (650 mm).

Posterior al trasplante de las 250 progenies de medios hermanos en octubre de 2020, se registraron periodos de sequía durante tres temporadas consecutivas: noviembre de 2020 a abril de 2021, noviembre de 2021 a abril de 2022 y noviembre de 2022 a abril de 2023, con precipitaciones acumuladas de 43,2, 47,6 y 30,2 mm, respectivamente.

Las parcelas experimentales consistieron en cuatro hileras de 1 m de longitud, separadas por 20 cm, con plantas espaciadas a 10 cm dentro de cada hilera, totalizando 40 plantas por parcela.

El estudio se estableció según un diseño experimental α -lattice con cuatro repeticiones. Cada repetición incluyó 10 bloques parciales, cada uno con 25 progenies, lo que totalizó 1.000 parcelas experimentales.

Manejo del suelo y fertilización

El suelo del sitio se clasifica como Ultic Palexeralf, con las siguientes características a 0-20 cm de profundidad: pH de 5,7 (en solución acuosa 1:2,5), 2,7 % de materia orgánica y concentraciones disponibles de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) de 45 mg kg⁻¹, 17 mg kg⁻¹ y 250 mg kg⁻¹, respectivamente.

Previo al trasplante, el terreno fue preparado mediante arado de cincel y rastra de discos, y fertilizado con 200 kg ha⁻¹ de superfosfato triple (46 % P₂O₅), 2.000 kg ha⁻¹ de carbonato de calcio (CaCO₃), 100 kg ha⁻¹ de sulfato de potasio (50 % K₂O y 54 % SO₄) y 20 kg ha⁻¹ de boronatocalcita (11 % B).

Análisis químico de muestras de alfalfa

Para la calibración de los modelos predictivos de calidad nutricional, se emplearon 125 muestras de forraje de alfalfa, recolectadas desde predios experimentales del INIA (Santa Rosa, Hidango y Cauquenes) y predios agrícolas, de las comunas de Pueblo Seco y El Carmen. Las muestras incluyeron variedades comerciales y líneas

genéticas desarrolladas por el INIA, representando una elevada variabilidad agroecológica y de calidad nutricional.

Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de Bromatología de INIA Osorno, donde se determinó proteína cruda (PC) según la AOAC (AOAC, 1990), y el contenido de fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutro (FDN) según el procedimiento descrito por Van Soest (Van Soest *et al.*, 1991).

Obtención de datos NIRS

Las 125 muestras de forraje de alfalfa, previamente secadas y homogenizadas, fueron analizadas en el Laboratorio de Suelos y Medioambiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, utilizando un espectrómetro FT-NIR Bruker Matrix-I (*Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemania*), en un rango espectral de 12.000 a 4.000 cm^{-1} . Cada espectro se obtuvo a partir de 128 exploraciones aleatorias con una resolución de 2 cm^{-1} .

Para el control del equipo y la obtención de las firmas espectrales se utilizó el software OPUS v7.5 (*Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemania*).

Modelo predictivo de calidad nutricional

Previo al desarrollo de los modelos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) con el fin de explorar la variabilidad de las muestras y detectar posibles valores atípicos. Posteriormente, a partir de los resultados bromatológicos de PC, FDN y FDA, junto con las firmas espectrales de cada una de las 125 muestras de alfalfa, se desarrollaron los modelos para estimar calidad nutricional.

Los datos fueron inicialmente preprocesados mediante el método Variable Normal Estándar (SNV, *Standard Normal Variate*), con el objetivo de reducir la variabilidad física asociada al tamaño de partícula de las muestras, utilizando el software Pirouette v3.11. Sobre esta base, los modelos se construyeron mediante regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS, *Partial Least Squares*).

La calibración de los modelos se efectuó mediante una partición aleatoria de los datos, destinando el 70% de las muestras ($n=87$) para el conjunto de la calibración del modelo, y el 30% restante ($n=38$) fue utilizado para el conjunto de validación externa, también denominado conjunto de predicción.

La selección del modelo predictivo se sustentó en tres criterios: i) coeficiente de determinación (R^2) cercano a 1; ii) valores bajos en el error cuadrático medio de la predicción (RMSEP); iii) desviación residual predictiva (RPD) mayor a 2,4 (Tabla 2) (Locher *et al.*, 2005; Nie *et al.*, 2009). El RPD permitió evaluar la precisión de los modelos, y fue calculado como la relación entre la desviación estándar de los valores de referencia y el error cuadrático medio de predicción (RMSEP) (Parrini *et al.*, 2018).

Predicción de calidad nutricional

Las 1.000 unidades experimentales establecidas en la Estación Experimental Cauquenes del INIA fueron cosechadas en noviembre de 2023. En cada una se evaluó la producción de materia seca y se extrajo una submuestra de 400 g, la cual fue secada en horno con ventilación forzada a 65°C y posteriormente homogenizada mediante molienda hasta un tamaño de partícula de 500 μm (molino Retsch SM 300, Alemania).

Las muestras se analizaron en el espectrómetro ubicado en el Laboratorio de Suelos y Medioambiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, donde se estimaron las concentraciones de proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) aplicando los modelos previamente calibrados.

Análisis estadístico

Las variables de calidad del forraje y de producción de materia seca se analizaron mediante el ajuste de modelos mixtos en el software R. Los modelos se ajustaron mediante el método de máxima verosimilitud restringida (REML) con el paquete Agricolae en R. El modelo ajustado fue el siguiente: $Y_{ijm} = \mu + g_i + r_j + IB_m + \varepsilon_{ijm}$. Donde Y_{ijm} corresponde al valor fenotípico del i -ésimo genotipo (g) en la j -ésima repetición (r), en el m -ésimo bloque incompleto (IB), μ es la media poblacional y ε el error experimental. El genotipo (población) se consideró como efecto fijo, y la repetición y el bloque incompleto, como efectos aleatorios. Las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (DMS-Fisher) con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de muestras de alfalfa

La composición química de las 125 muestras de alfalfa fue determinada mediante química húmeda (Tabla 1). Se observó un amplio rango de variación en proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) debido a que las muestras provienen de ambientes agroecológicos diversos.

Tabla 1. Media, rango de variación (mínimo y máximo) y desviación estándar (DE) de proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) evaluadas en 125 muestras de alfalfa utilizadas para la calibración (n=87) y validación externa (n=38) del modelo predictivo de calidad de forraje de alfalfa.

Calibración				
Componente	Mínimo	Máximo	Media	DE
PC (%)	13,30	25,30	19,60	2,48
FDN (%)	29,24	56,75	43,75	6,09
FDA (%)	21,60	47,72	36,15	5,57
Validación externa				
PC (%)	11,20	29,10	18,38	5,32
FDN (%)	27,36	53,45	40,69	8,31
FDA (%)	19,40	41,50	31,40	7,24

Modelo predictivo de calidad nutricional

El modelo predictivo para proteína cruda (PC) obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,96 en el conjunto de validación externa, lo que indica que el 96% de la variabilidad de los datos de referencia es explicada por el modelo predictivo (Figura 1). El error cuadrático medio de predicción (RMSEP) fue de 1,56%, lo que implica que el error promedio de predicción es de $\pm 1,56$ puntos porcentuales respecto al valor de referencia. La desviación residual predictiva (RPD) calculada fue de 3,41, lo que permite clasificar al modelo predictivo de PC como altamente robusto y preciso (Tabla 2).

El modelo predictivo para fibra detergente neutro (FDN) obtuvo un R^2 de predicción de 0,96, lo que indica que el 96 % de la variabilidad de los datos de referencia es explicada por el modelo (Figura 2). El RMSEP fue de 1,98 %, lo que implica que el error promedio de predicción es de $\pm 1,98$ puntos porcentuales

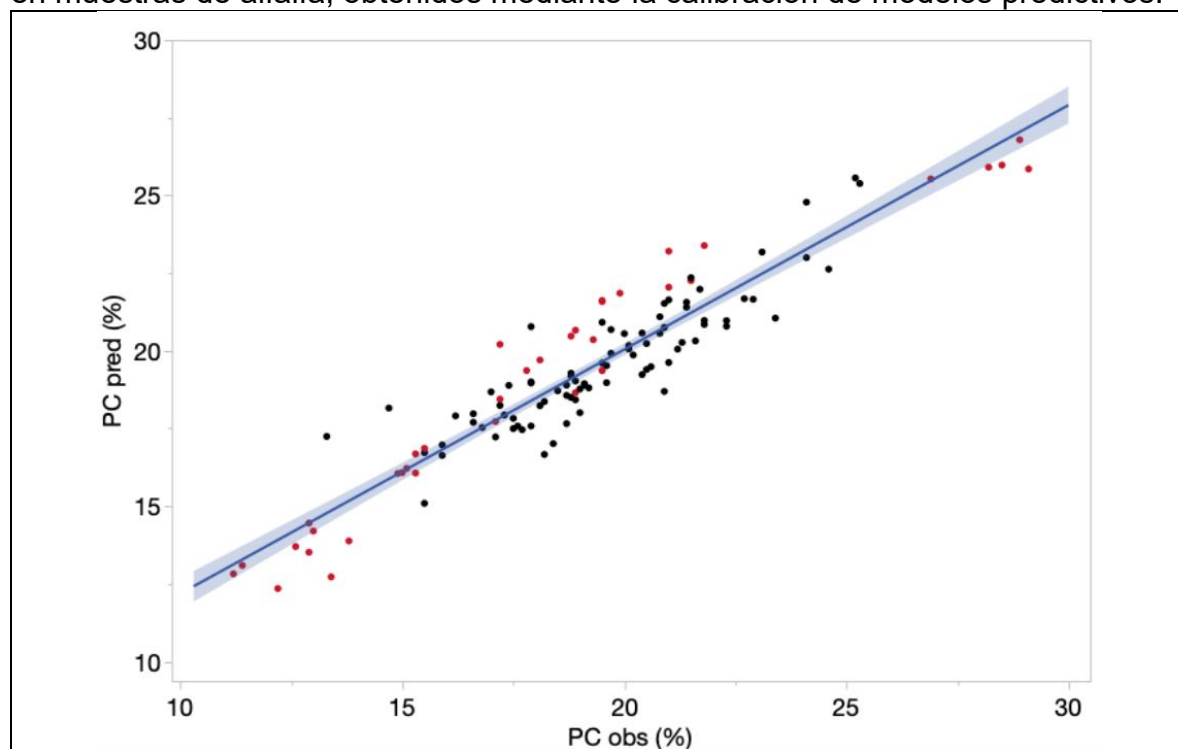
respecto al valor de referencia. El RPD calculado fue de 4,19, lo que permite clasificar al modelo como altamente robusto y preciso (Tabla 2).

Tabla 2. Estadísticos descriptivos para modelos de calibración y predicción de componentes nutricionales de alfalfa.

	Calibración		Predicción		
	R ² c	RMSEC	R ² p	RMSEP	RPD
Proteína cruda	0,8940	1,13	0,9650	1,56	3,41
Fibra detergente neutro	0,9196	2,25	0,9651	1,98	4,19
Fibra detergente ácido	0,9200	2,42	0,9518	3,36	2,15

R²c: Coeficiente de determinación para calibración, R²p: Coeficiente de determinación para predicción, RMSEC: error cuadrático medio de la calibración, RMSEP: error cuadrático medio de predicción, RPD: desviación residual predictiva.

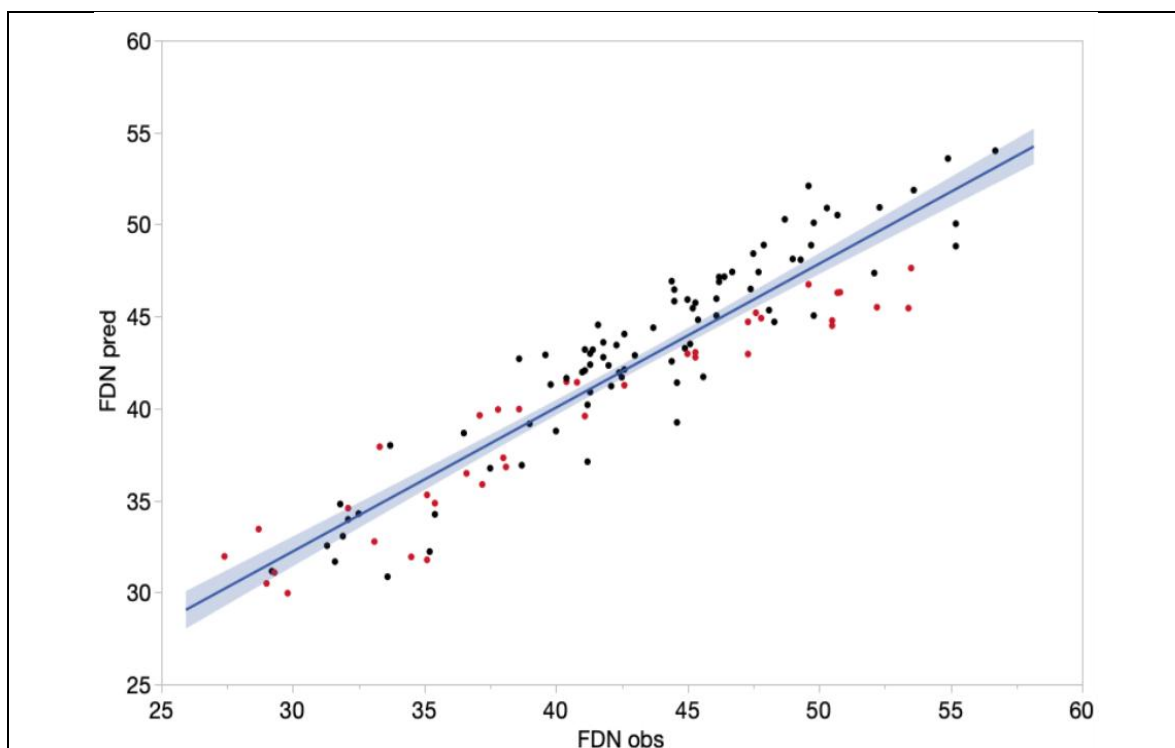
Figura 1. Relación entre los valores observados y predichos de proteína cruda (PC) en muestras de alfalfa, obtenidos mediante la calibración de modelos predictivos.



*Puntos rojos indican valores predichos por el modelo y puntos negros corresponden al modelo calibrado.

El modelo predictivo para fibra detergente ácido (FDA) obtuvo un R^2 de predicción de 0,95 (Figura 3), presentó un RMSEP de 3,36 % y un RPD de 2,15. A pesar de que el modelo no superó el umbral de RPD ($>2,4$), el elevado R^2 de predicción permite validar el uso de este modelo para los fines de este trabajo (Tabla 2).

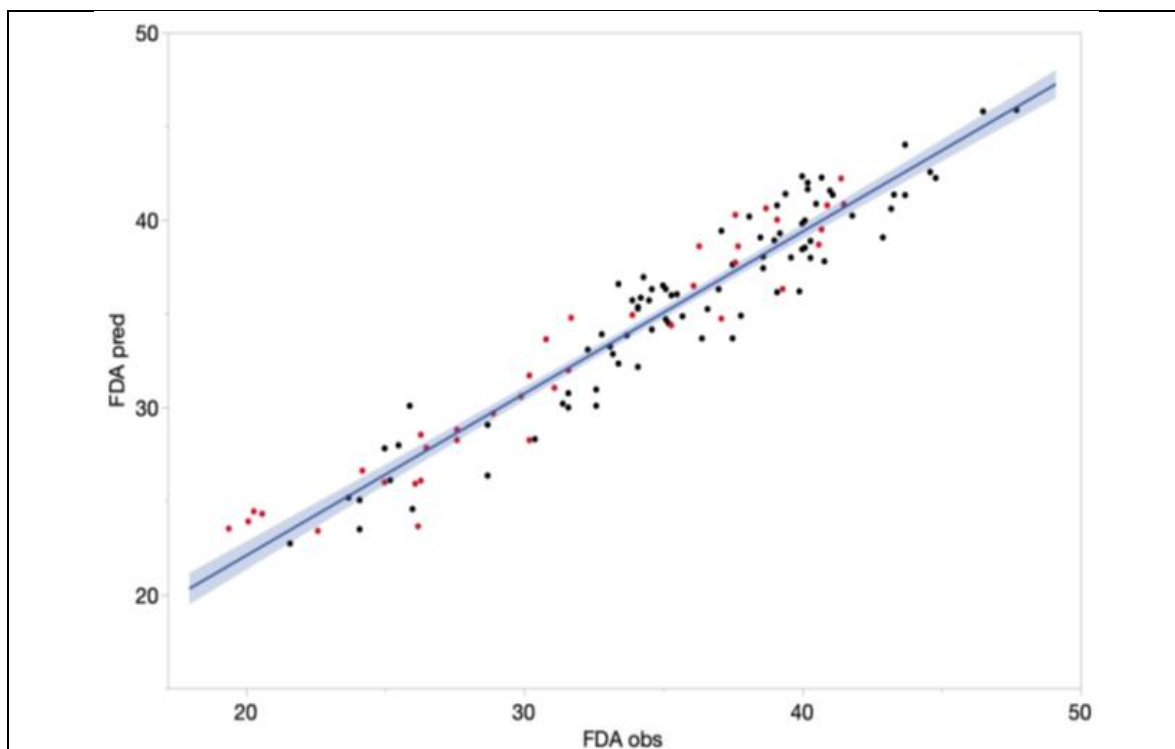
Figura 2. Relación entre los valores observados y predichos de fibra detergente neutro (FDN) en muestras de alfalfa, obtenidos mediante la calibración de modelos predictivos.



*Puntos rojos indican valores predichos por el modelo y puntos negros corresponden al modelo calibrado.

En general, los modelos predictivos para proteína cruda, fibra detergente neutro y fibra detergente ácido, mostraron un buen ajuste estadístico en base a los valores de coeficiente de determinación de la predicción (R^2_p), error cuadrático medio de la predicción (RMSEP) y desviación residual predictiva (RPD). Lo que permite el uso de estos modelos para predecir calidad nutricional en alfalfa.

Figura 3. Relación entre los valores observados y predichos de fibra detergente ácido (FDA) en muestras de alfalfa, obtenidos mediante la calibración de modelos predictivos.



*Puntos rojos indican valores predichos por el modelo y puntos negros corresponden al modelo calibrado.

Calidad nutricional de poblaciones de alfalfa

De acuerdo con los modelos predictivos generados, se determinó calidad nutricional de 1.000 muestras, provenientes de 250 progenies de medios hermanos de alfalfa.

Proteína cruda. La concentración de proteína cruda varió significativamente entre las poblaciones ($P < 0,001$; Tabla 3). La proteína cruda varió entre 11,17 % y 19,22 % de materia seca (Tabla 3). Destacan en el 5% superior las poblaciones: AlfaL47-10, AlfaL33-6, AlfaL62-5, AlfaL28-2, AlfaL40-7, AlfaL35-10, AlfaL56-8, AlfaL57-5, AlfaL4-5, AlfaL62-6, AlfaL62-3 y AlfaL5-9, que, en promedio, alcanzaron un 18 % de proteína cruda (Tabla 4).

Los valores de PC obtenidos en este estudio son bajos en comparación con un alfalfar establecido en condiciones de riego en el valle central de Chile, donde se han reportado valores cercanos al 26 %. En un estudio previo, se determinó en alfalfa establecida en la zona sur de Chile un 26,15 %, 20,68 % y 18,91 % de PC en

estado vegetativo, botón floral y floración (Anrique y Molina, 2014). Las diferencias se deben principalmente a las condiciones limitantes que impone el secano de Cauquenes, donde la alfalfa debe crecer y producir forraje en un suelo granítico de baja fertilidad y con una temporada estival que supera los cinco meses.

Sin embargo, al comparar los resultados de este estudio con información del secano mediterráneo de Chile, se observa que la alfalfa es una especie que produce forraje de alta calidad. Por ejemplo, una pradera natural de la zona de la precordillera de la región del Maule, presentó valores de proteína cruda de un 11,9 %, 18,8 % y 10,2 % en los meses de septiembre, octubre y diciembre, respectivamente (Gutiérrez *et al.*, 1883). Por otra parte, una pradera de trébol subterráneo de la precordillera de la región del Biobío, presentó valores de proteína de 11,3 %, 13,2 % y 11,1 % en los meses de octubre, noviembre y diciembre, respectivamente (Klee *et al.*, 1985). En una pradera anual del secano interior de la región subhúmeda *Lolium multiflorum* como especie dominante, se alcanzó valores de proteína cruda de un 17 % en estado vegetativo, 15 % en elongación del tallo floral, 12 % floración y 8 % en fructificación (Ovalle, 1986).

La fracción de proteína cruda generalmente depende de la cantidad de nitrógeno disponible (Watson *et al.*, 2002) y, la alfalfa es una especie forrajera eficaz en la fijación de nitrógeno, superior en un 10 a 30 % en comparación con otras leguminosas (Gierus *et al.*, 2012). El grado de fijación de nitrógeno determina la disponibilidad de nitrógeno para la producción de proteínas, no obstante, existen otros factores limitantes para la producción de biomasa, como la disponibilidad de agua. En soja, se identificó la absorción de nitrógeno como un factor importante para la producción de biomasa en condiciones de sequía (Nakayama *et al.*, 2007), y en el cultivo del maní, se observó una disminución de la fijación de nitrógeno en condiciones de estrés hídrico (Pimratch, 2012). La simbiosis entre *Sinorhizobium meliloti*, y alfalfa, se puede ver afectada negativamente en condiciones de sequía, tanto por la pérdida de viabilidad de las bacterias, como por la deshidratación de los nódulos que las albergan (Andrés *et al.*, 2012). Esto sugiere que la disminución en las fracciones de proteína cruda en alfalfa sometida a condiciones de estrés hídrico

es causada por una respuesta a este por la limitación de agua junto con una disminución en la fijación de nitrógeno.

En los rumiantes, la proteína de la dieta cumple dos funciones: i) cubrir la demanda de nitrógeno de los microorganismos del rumen, y ii) aportar la proteína para cubrir la demanda de nitrógeno aminoacídico a nivel tisular, asociada a procesos de mantenimiento y producción (McDonald *et al.*, 2013). Cuando no se cubren los requerimientos de proteína cruda, resulta difícil mantener niveles adecuados de bacterias ruminales para la digestión del forraje, lo que disminuye la ingesta y la digestibilidad de estos. Sin embargo, si un forraje tiene un contenido muy alto de proteína cruda y se exceden los requerimientos por parte del animal, gran parte de esta puede perderse en la orina en forma de urea y, además, no estar disponible para el rumiante (Cherney y Parsons, 2020).

Fibra detergente neutro y fibra detergente ácido. Las paredes celulares vegetales se caracterizan por las fracciones de fibra detergente neutro (FDN), compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina, y la fibra detergente ácida (FDA), compuesta por celulosa y lignina. La fibra detergente ácida se asocia de forma más consistente con la digestibilidad, mientras que otros componentes, en particular la hemicelulosa contenida en la fibra detergente neutra, se relacionan estrechamente con la ingesta voluntaria (Van Soest., 1994). Se considera beneficioso una concentración menor de fibra, ya que favorece una mayor ingesta de forraje y un aumento en la digestibilidad del forraje (Liu *et al.*, 2018).

Las poblaciones de alfalfa mostraron diferencias significativas con respecto a la concentración de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) ($P < 0,001$; Tabla 3). La FDN fluctuó entre 34,86 % y 48,41 %. La FDA fluctuó entre 26,16 % y 40,27 % (Tabla 3). Las poblaciones con la menor concentración de FDN fueron: AlfaL40-7, AlfaL39-6, AlfaL62-7, AlfaL60-4, AlfaL62-5, AlfaL28-2, AlfaL5-9, AlfaL61-4, AlfaL47-10, AlfaL52-3, AlfaL40-5 y AlfaL36-5. Por otro lado, las poblaciones con la menor FDA fueron: AlfaL29-2, AlfaL28-3, AlfaL62-7, AlfaL4-10, AlfaL61-4, AlfaL47-10, AlfaL5-9, AlfaL39-6, AlfaL35-3, AlfaL36-5, AlfaL40-5 y AlfaL52-3 (Tabla 4).

Las muestras de forraje de este estudio corresponden al mes de noviembre (primavera), momento en el cual la alfalfa está expresando su máxima calidad nutricional. En esta época, la planta aún no induce la floración y el criterio de corte es la altura de la planta. Debido a lo anterior, los niveles de FDN y FDA de algunas poblaciones son comparables a los de ambientes con condiciones más favorables para el crecimiento y desarrollo de la alfalfa. Para ejemplificar, un cultivo de alfalfa establecida en la zona sur de Chile posee, en estado vegetativo, un 31,09 % de FDN y 26,65 % de FDA; en estado de botón, 29,74 % de FDN y 22,57 % de FDA; y en estado de flor, 36,99 % de FDN y 29,05 % de FDA (Anrique y Molina, 2014).

Generalmente, los forrajes que limitan el consumo de alimento presentan mayores concentraciones de FDN y paredes celulares más lignificadas (Buxton, 1996). Dado que los tallos de alfalfa contienen más FDN que las hojas, los cambios morfológicos, como la relación biomasa hoja-tallo, suelen afectar los valores de FDN y la digestibilidad. Tras la maduración de la alfalfa más allá de la etapa vegetativa, se produce un rápido aumento de la concentración de FDN (Albrecht *et al.*, 1987).

En los animales rumiantes, existe una relación positiva entre la digestibilidad de los alimentos y su consumo. La ingestión está más estrechamente relacionada con el *ritmo de digestión* de las raciones que con la digestibilidad *per se*, aunque ambas medidas suelen estar interrelacionadas. En otros términos, los alimentos cuya digestión es rápida y que, además, son de alta digestibilidad, provocan ingestiones elevadas. Cuanto más rápido es el ritmo de la digestión, más rápido se vacía el tracto digestivo y más espacio queda disponible para la siguiente comida. El componente químico de los alimentos que determina su ritmo de digestión es la FDN, que es una medida del contenido en paredes celulares, por tanto, existe una relación negativa entre el contenido de FDN de los alimentos y el ritmo de digestión (McDonald *et al.*, 2013).

Valor Relativo del Alimento. El Valor Relativo del Alimento (VRA) es un índice que refleja objetivamente, las diferencias en la calidad del forraje (Moore, 1994). Este índice de calidad de forraje corresponde a un número único que representa la combinación del potencial de consumo voluntario y el valor nutritivo de un forraje,

permitiendo comparaciones relativas entre forrajes con diferencias en genotipo, época de crecimiento y madurez (Rohweder *et al.*, 1978).

El VRA se determina con dos respuestas de los animales: la ingesta de materia seca y la concentración de materia seca digestible, calculadas a partir de FDN y FDA, respectivamente. Valores de VRA más altos indican una mayor calidad general que la de la alfalfa madura. Actualmente, el USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) enumera los estándares de calidad para el heno en las categorías Prime, 1, 2, 3, 4 y 5, y se enumeran los valores PC, FDA, FDN y VRA, utilizando este último como base (Cherney Parsons, 2020).

Las poblaciones de alfalfa mostraron diferencias significativas respecto al VRA ($P < 0,001$; Tabla 3); este fluctuó entre 95,64 % y 176,21 % (Tabla 3). Destacan en el 5 % superior las poblaciones: AlfaL52-3, AlfaL40-5, AlfaL36-5, AlfaL5-9, AlfaL47-10, AlfaL29-2, AlfaL62-7, AlfaL4-10, AlfaL62-5, AlfaL39-6, AlfaL60-4 y AlfaL28-2 (Tabla 4). Este grupo de poblaciones alcanzó un VRA promedio de 170,79 %, lo que lo sitúa en la categoría Prime según los estándares del USDA.

Producción de materia seca. Las poblaciones de alfalfa mostraron diferencias significativas en la producción de materia seca (kg MS ha^{-1}) ($P < 0,001$; Tabla 3), con un amplio rango de variación que va desde 1.317 a 5.805 kg de MS ha^{-1} (Tabla 3). Destacan en el 5% superior las poblaciones: AlfaL46-5, AlfaL52-3, AlfaL40-4, AlfaL28-8, AlfaL40-2, AlfaL62-6, AlfaL4-5, AlfaL60-1, AlfaL57-2, AlfaL61-8, AlfaL62-9 y AlfaL56-4 (Tabla 4).

Al contrastar los valores de producción de materia seca obtenidos en las poblaciones de alfalfa establecidas en la zona de Cauquenes, con una pradera natural de la zona de la precordillera de la región del Maule, esta última presentó, rendimientos de 2,59, 2,37, 3,34 y 2,51 t MS ha^{-1} en el mes de septiembre, octubre, noviembre y diciembre, respectivamente (Gutiérrez *et al.*, 1883). Por otra parte, una pradera naturalizada de trébol subterráneo fertilizada en la precordillera de Ñuble, sector Cato, obtuvo un rendimiento de 4,84 t MS ha^{-1} (Ruiz *et al.*, 1977).

La alfalfa es una especie forrajera que puede cortarse varias veces al año, según la zona agroecológica en la que se encuentre establecida. El momento de corte de la alfalfa es una decisión de gran relevancia, ya que a medida que la alfalfa

madura, el rendimiento aumenta, pero la calidad de forraje disminuye. Asimismo, si los cortes son frecuentes, la persistencia de la plantación podría verse afectada por el bajo nivel de reservas acumuladas para el posterior rebrote (Orloff, 2007). Se considera que una floración de hasta un 10 % es un buen predictor del tiempo de maduración para una cosecha de alta biomasa y calidad (Bosworth y Stringer, 1992). Lo anterior se debe a que, tras el inicio de la floración, se produce una importante reasignación de recursos fotosintéticos desde las hojas hacia las nuevas estructuras reproductivas (Ruan *et al.*, 2012). Además, la transición a la floración se acompaña de un aumento de la lignificación del tejido (Wang *et al.*, 2013) y de la proporción tallo-hoja; la calidad del tejido del tallo disminuye con la madurez, mientras que la calidad del tejido de la hoja es relativamente más estable (Fick *et al.*, 1988; Kalu y Fick, 1981). Las pérdidas de calidad del forraje pueden alcanzar aproximadamente el 45 % en el VRA tras la floración (Bosworth y Stringer, 1992). Se estima que una pérdida del 1 % en la digestibilidad del forraje conlleva una reducción del 3 % en la ganancia diaria de peso del ganado vacuno (Casler y Vogel, 1999).

De acuerdo con lo observado por otros estudios, existe una relación directa entre el rendimiento en producción de materia seca y la cantidad de riego aplicada (Li y Su, 2017).

Tabla 3. Medidas de dispersión de las 250 poblaciones de alfalfa.

Componente nutricional	Mínimo	Máximo	Media	Pr (>F)
MS (Kg MS/ha)	1.317	5.805	3.195	0.00006551
PC (%)	11,18	19,23	15,32	0.001524
FDN (%)	34,87	48,42	40,56	0.003759
FDA (%)	26,16	40,27	32,53	0.001064
VRA (%)	95,65	176,22	145,78	0.002306

MS: materia seca, PC: proteína cruda, FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, VRA: valor relativo del forraje.

Tabla 4. Poblaciones de alfalfa que destacan en el 5% superior con respecto a producción de materia seca (kg MS/ha), proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y valor relativo del alimento (VRA).

Poblaciones	MS (kg/ha)	Poblaciones	PC (%)	Poblaciones	FDN (%)	Poblaciones	FDA (%)	Poblaciones	VRA (%)
AlfaL46-5	5.805,7	AlfaL47-10	19,23	AlfaL40-7	37,13	AlfaL29-2	28,93	AlfaL52-3	176,22
AlfaL52-3	5.524,5	AlfaL33-6	18,30	AlfaL39-6	37,06	AlfaL28-3	28,87	AlfaL40-5	175,35
AlfaL40-4	5.523,8	AlfaL62-5	18,03	AlfaL62-7	37,03	AlfaL62-7	28,81	AlfaL36-5	174,36
AlfaL28-8	5.505,7	AlfaL28-2	17,92	AlfaL60-4	36,90	AlfaL4-10	28,77	AlfaL5-9	171,96
AlfaL40-2	5.294,8	AlfaL40-7	17,79	AlfaL62-5	36,50	AlfaL61-4	28,60	AlfaL47-10	170,89
AlfaL62-6	5.060,9	AlfaL35-10	17,78	AlfaL28-2	36,46	AlfaL47-10	28,52	AlfaL29-2	170,27
AlfaL4-5	4.852,2	AlfaL56-8	17,64	AlfaL5-9	36,42	AlfaL5-9	28,41	AlfaL62-7	169,74
AlfaL60-1	4.831,5	AlfaL57-5	17,64	AlfaL61-4	35,87	AlfaL39-6	28,38	AlfaL4-10	169,71
AlfaL57-2	4.783,3	AlfaL4-5	17,62	AlfaL47-10	35,86	AlfaL35-3	28,10	AlfaL62-5	169,01
AlfaL61-8	4.777,9	AlfaL62-6	17,60	AlfaL52-3	35,20	AlfaL36-5	27,54	AlfaL39-6	167,87
AlfaL62-9	4.760,1	AlfaL62-3	17,57	AlfaL40-5	35,06	AlfaL40-5	26,84	AlfaL60-4	167,56
AlfaL56-4	4.682,7	AlfaL5-9	17,55	AlfaL36-5	34,86	AlfaL52-3	26,16	AlfaL28-2	166,64

Los resultados presentados en la Tabla 4 constituyen una base de alto valor para programas de mejoramiento genético orientados a la selección de poblaciones de alfalfa con desempeño sobresaliente tanto en calidad nutricional como en producción de materia seca. En este contexto, la utilización de estos resultados permite llevar a cabo procesos de selección de manera objetiva y eficiente, facilitando la identificación de genotipos superiores a partir de amplios conjuntos de datos. En consecuencia, se optimizan los tiempos de evaluación y la asignación de recursos técnicos y económicos, fortaleciendo la toma de decisiones y contribuyendo al desarrollo de genotipos con mayor valor productivo y nutricional.

CONCLUSIONES

La presente investigación demostró que la tecnología de espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) es una herramienta eficaz y precisa para predecir la calidad nutricional de *Medicago sativa* L. Los modelos desarrollados para proteína cruda, fibra detergente neutro y fibra detergente ácido presentaron altos niveles de ajuste y capacidad predictiva, con coeficientes de determinación de la predicción (R^2_p) de 0,96, 0,96 y 0,95, respectivamente. Los valores de RMSEP y RPD confirmaron la robustez de las calibraciones, destacando el desempeño sobresaliente de los modelos de proteína cruda y fibra detergente neutro, aptos para su uso en la estimación de calidad nutricional de poblaciones genéticamente diversas.

Las diferencias observadas en la calidad nutricional y el rendimiento entre las progenies analizadas reflejan la variabilidad genética de la población evaluada, lo cual constituye un punto de partida relevante para programas de mejoramiento genético orientados a la obtención de genotipos con mayor valor nutritivo.

En conclusión, los resultados obtenidos validan los objetivos planteados y aportan una base técnica sólida para la incorporación de la tecnología NIRS en la evaluación de la calidad nutricional de alfalfa en Chile. Se recomienda mantener actualizadas las calibraciones mediante la inclusión periódica de nuevas muestras, garantizando así la estabilidad y la precisión predictiva de los modelos ante la variabilidad ambiental y genética de futuras poblaciones.

REFERENCIAS

1. AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Vol 1. Arlington, USA: Association of Official Analytical Chemist. 746 p.
2. Albrecht, K.A., W.F. Wedin y D.R. Buxton. 1987. Composición de la pared celular y digestibilidad de los tallos y hojas de alfalfa. Crop Science. doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183X002700040027x>.
3. 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.

4. Anrique, R. y X. Molina. 2014. Composición de Alimentos para el Ganado Bovino. Corporación Consorcio Lechero. <<https://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/20.500.13082/148731>>. [consulta: 6 septiembre 2025].
5. Biazzi, E., N. Nazzicari, L. Pecetti, E.C. Brummer, A. Palmonari. 2017. Genome-Wide Association Mapping and Genomic Selection for Alfalfa (*Medicago sativa*) Forage Quality Traits. *PLoS One* 12(1): e0169234. doi: 10.1371/journal.pone.0169234.
6. Bibi, F. and A. Rahman. 2023. An Overview of Climate Change Impacts on Agriculture and Their Mitigation Strategies. *Agriculture (Switzerland)*, 13(8), 1508. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE13081508/S1>.
7. Bosworth, S.C. and W.S. Stringer. 1992. Cutting Management of Alfalfa, Red Clover, and Birdsfoot Trefoil. Agronomy Facts No. 7, Penn State College of Agricultural Sciences, Cooperative Extension. State College, PA: Pennsylvania State University.
8. Bouton, J.H. 2012. Breeding lucerne for persistence. *Crop and Pasture Science* 63:95-106.
9. Buxton DR. 1996. Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. *Anim Feed Sci Tech.* 1996;59:37–49.
10. Casler, M.D. and K.P. Vogel. 1999. Accomplishments and impact from breeding for increased forage nutritional value. *Crop Sci.* 39,12–20.
11. Cherney, D. J. and D. Parsons. 2020. Predicting Forage Quality. *Forages: The Science of Grassland Agriculture: Volume 2, 7th Edition*, 2, 687–699. <https://doi.org/10.1002/9781119436669.CH38>.
12. Cocks, P.S. 2001. Ecology of herbaceous perennial legumes: a review of characteristics that may provide management options for the control of salinity and waterlogging in dryland cropping systems. *Aust. J. Agric. Res.* 52, 137–151.
13. Dear, B.S., G.A. Moore and S.J. Hughes. 2003. Adaptation and potential contribution of temperate perennial legumes to the southern Australian wheatbelt: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 43, 1–18.
14. del Pozo, A., C. Ovalle, S. Espinoza, V. Barahona, M. Gerding y H. Humphries. 2017. Water relations and use-efficiency, plant survival and productivity of nine alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars in dryland Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2016.12.002>.

15. Eftekhari, M.S. 2022. Impacts of Climate Change on Agriculture and Horticulture. In *Climate Change: The Social and Scientific Construct*; Bandh, S.A., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, pp. 117–131. ISBN 978-3-030-86290-9.
16. Fick, G.W., D.A. Holt and D.G. Lugg. 1988. Environmental Physiology and Crop Growth. In *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, (Hanson, A. A., Barnes, D. K. and Hill, R. R., eds), pp. 163–194. Agronomy Monograph N 29, Chapter 5. Madison, WI: ASA-CSSA-SSSA.
17. Garrido, A. 1997. Currents and future applications of NIRS technology. *Options Méditerranéennes, Series Cahiers*, 26: 87-92.
18. Ghahramani, A., R.S. Kingwell and T.N. Maraseni. 2020. Land use change in Australian mixed crop-livestock systems as a transformative climate change adaptation. *Agric. Syst.* 180, 102791 <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2020.102791>.
19. Gierus, M., J. Kleen, R. Loges and F. Taube. 2012 Forage legume species determine the nutritional quality of binary mixtures with perennial ryegrass in the first production year. *Anim Feed Sci Tech.* 2013;172:150–61.
20. Gutiérrez, G., N. Figueroa y P. Soto. 1983. Sistemas de mejoramiento de la pradera natural precordillera andina de la VIII Región. *Agricultura Técnica (Chile)*, 43(4):305-312.
21. Hatfield, J.L., J. Antle, K.A. Garrett, R.C. Izaurralde, T. Mader, E. Marshall, M. Nearing, G. Philip Robertson and L. Ziska. 2020. Indicators of climate change in agricultural systems. *Clim. Chang.* 163, 1719–1732.
22. Hill, M.J. 1996. Potential adaptation zones for temperate pasture species as constrained by climate: a knowledge-based logical modelling approach. *Australian Journal of Agricultural Research* 47:1095-1117.
23. Holford, I.C.R., B.E. Schweitzer and G.J. Crocker. 1998. Comparative effects of subterranean clover, medic, lucerne, and chickpea in wheat rotations on nitrogen, organic carbon, and moisture in two contrasting soils. *Aust. J. Soil Res.* 36, 57–72.
24. Humphries A.W., and G.C. Auricht. 2001. Breeding lucerne for Australia's southern dryland cropping environments. *Australian Journal of Agricultural Research* 52:153-169.
25. Humphries, A.W., E.T. Kobelt, W.D. Bellotti, and G.C. Auricht. 2006. Tolerance of Australian lucerne (*Medicago sativa*) germplasm to grazing by sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 46:1263-1270.

26. Humphries, A.W., C. Ovalle, S. Hughes, A. del Pozo, L. Inostroza, V. Barahona, L. Yu, S. Yerzhanova, T. Rowe, J. Hill, G. Meirman, S. Abayev, C.E. Brummer, D.M. Peck, S. Toktarbekova, B. Kalibayev, S. Espinoza, J. Ivelic-Saez, E. Bingham and B. Kilian. 2020. Characterization, preliminary evaluation and pre-breeding of diverse alfalfa crop wild relatives originating from drought-stressed environments. *Crop Sci.* 61, 69–88.
27. Inostroza, L., A. del Pozo, P. Etcheverría, V. Barahona, S. Espinoza, C. Ovalle, M. Gerding, E. Cisternas, R. Galdames y G. Monzón. 2024. Manual para la producción de alfalfas de secano. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín N° 500, 76p.
28. Julier, B., C. Huyghe, and C. Ecalte. 2000. Within- and Among-Cultivar Genetic Variation in Alfalfa: Forage Quality, Morphology, and Yield. *Crop Sci.* 40(2): 365–369. doi: <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.402365x>.
29. Kalu, B.A. and G.W. Fick. 1981. Quantifying morphological development of alfalfa for studies of herbage quality¹. *Crop Sci.* 21, 267–271.
30. Klee G.G., L.C. Crempien, P.H. Acuña y R.M. Fernández. 1985. Elaboración de un sistema de producción ovina para la cordillera del Biobío. *Agricultura Técnica (Chile)*, 45(1): 1-7.
31. Latta, R.A., L.J. Blacklow, and P.S. Cocks. 2001. Comparative soil water, pasture production, and crop yields in phase farming systems with Lucerne and annual pasture in Western Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 52:295-303.
32. Li, G.D., G.M. Lodge, G.A. Moore, A.D. Craig, B.S. Dear, S.P. Boschma, T.O. Albertsen, S.M. Miller, S. Harden, R.C. Hayes, S.J. Hughes, R. Snowball, A.B. Smith, and B.C. Cullis. 2008. Evaluation of perennial pasture legumes and herbs to identify species with high herbage production and persistence in mixed farming zones in southern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48:449-466.
33. Li, Y. and D. Su. 2017. Alfalfa Water Use and Yield under Different Sprinkler Irrigation Regimes in North Arid Regions of China. *Sustainability* 2017, Vol. 9, Page 1380, 9(8), 1380. <https://doi.org/10.3390/SU9081380>.
34. Lin, S., C.A. Medina, B. Boge, J. Hu, S. Fransen. 2020. Identification of genetic loci associated with forage quality in response to water deficit in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *BMC Plant Biol.* 20(1): 303. doi: 10.1186/s12870-020-02520-2.
35. Lin, S., C.A. Medina, S.B. Patel, Z. Xu, G.I. Zanton. 2025. Identification of genetic loci associated with protein and fiber digestibility in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Crop Sci.* 65(1): e70004. doi: 10.1002/CSC2.70004.

36. Liu, Y., Q. Wu, G. Ge, G. Han, and Y. Jia. 2018. Influence of drought stress on alfalfa yields and nutritional composition. *BMC Plant Biol.* 18(1): 13. doi: 10.1186/s12870-017-1226-9.
37. Locher, F., H. Heuvelink, R. Gutser and U. Schmidhalter. 2005. The legume content in multispecies mixtures as estimated with near infrared reflectance spectroscopy: Method validation. *Agronomy Journal*, 97(1), 18–25. <https://doi.org/10.2134/AGRONJ2005.0018>;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION.
38. Marshall, E.M., A.W. Humphries, E.T. Kobelt, T.D. Rowe and G.C. Auricht. 2008. Drought response of lucerne in South East and Mallee environments in SA. Available online at: http://www.sardi.sa.gov.au/__data/assets/pdf_file/0003/116553/Persistence_Drought_response_of_Lucerne.pdf.
39. Martínez, I., C. Ovalle, A. del Pozo, H. Uribe, V. Valderrama, C. Prat, M. Sandoval, F. Fernández, E. Zagal. 2011. Influence of conservation tillage and soil water content on crop yield in dryland compacted alfisol of central Chile. *J. Agric. Res.* 71, 615–622.
40. Martínez, I., C. Prat, C. Ovalle, A. del Pozo, N. Stolpe and E. Zagal. 2012. Subsoiling improves conservation tillage in cereal production of severely degraded Alfisols under Mediterranean climate. *Geoderma* 189 (-190), 10–17.
41. McCulley, R.L., E.G. Jobbágy, W.T. Pockman and R.B. Jackson. 2004. Nutrient uptake as a contributing explanation for deep rooting in arid and semi-arid ecosystems. *Oecologia* 141, 620–628.
42. McDonald, P., R.A. Edwards, J.F.D. Greenhalgh, C.A. Morgan, L.A. Sinclair and R.G. Wilkinson. 2013. *Nutrición animal* (7.^a ed.). Acribia, S.A.
43. McKinney, G.T. 1974. Management of lucerne for sheep grazing on the Southern Tablelands of New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 14:726-734.
44. Moore, J.E. 1994. Forage quality indices. In: *Forage Quality, Evaluation, and Utilization* (ed. G.C. Fahey Jr. et al.), 967–998. Madison, WI: ASA, CSSA, and SSSA.
45. Muller, M.H., C. Poncet, J.M. Prosperi, S. Santoni and J. Ronfort. 2006. Domestication history in the *Medicago sativa* species complex: inferences from nuclear sequence polymorphism. *Mol. Ecol.* 15, 1589–1602.

46. Munns, D.N. 1965. Soil acidity and the growth of a legume. II. Reactions of aluminium and phosphate in solution and effects of aluminium, phosphate and calcium, and pH on *Medicago sativa* L. and *Trifolium subterraneum* L. in solution culture. Australian Journal of Agricultural Research 16:743-755.
47. Nakayama N, H. Saneoka, R. Moghaieb and G.S. Premachandra. 2007. Response of growth, photosynthetic gas exchange, translocation of ¹³C-labelled photosynthate and N accumulation in two soybean (*Glycine max* L. Merrill). Cultivars to drought stress. Int J AgricBiol. 2007;9:669–74.
48. Nie, Z., G.F. Tremblay, G. Bélanger, R. Berthiaume, Y. Castonguay y A. Bertrand. 2009. Predicción mediante espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano de carbohidratos solubles en detergente neutro en fleo y alfalfa. Journal of Dairy Science 92:1702-1711. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1599>.
49. Orloff, S. 2007. Choosing appropriate sites for alfalfa production. In: Irrigated alfalfa management for Mediterranean and desert zones. University of California.
50. Ovalle, C. 1986. Etude du système écologique sylvo-pastoral à *Acacia caven* (Mol.) Hook. et Arn: applications à la gestion des ressources renouvelables dans l'aire climatique méditerranéenne humide et sub-humide du Chile. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier. 224 p.
51. Parrini, S., A. Acciaioli, A. Crovetto and R. Bozzi. 2018. Use of FT-NIRS for determination of chemical components and nutritional value of natural pasture. *Italian Journal of Animal Science*, 17(1), 87–91. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1345659>.
52. Pimratch S., S. Jogloy, N. Vorasoot, B. Toomsan, T. Kesmala, A. Patanothai and C. Holbrook. Association of nitrogen fixation to water uses efficiency and yield traits of peanut. Int J Plant Prod. 2013;7:225–41.
53. Porqueddu, C., S. Ates, M. Louhaichi, A.P. Kyriazopoulos, G. Moreno, A. del Pozo, C. Ovalle, M.A. Ewing and P.G.H. Nichols. 2016. Grasslands in 'Old World' and 'New World' Mediterranean-climate zones: past trends, current status and future research priorities. Grass Forage Sci. 71, 1–356. <https://doi.org/10.1111/gfs.12212>.
54. Rohweder, D.A., R.F. Barnes and N.J. Jorgenson. 1978. Proposed hay grading standards based on laboratory analysed for evaluating quality. J. Anim Sci. 47: 747–759.
55. Ruan, Y.L., J.W. Patrick, M. Bouzayen, S. Osorio and A.R. Fernie. 2012. Molecular regulation of seed and fruit set. Trends Plant Sci. 17, 656–665.

56. Ruiz N.I., O.P. Soto, G.G. Klee, K.L. Soto, P.I. Franco y G.F. Cosio. 1977. Praderas de secano y sistemas de producción de carne en la cuenca del Biobío. Análisis económico. Convenio PNUD-INIA (Quilamapu). Chillán, Chile. 113 p.
57. Schenk, H.J., R.B. Jackson. 2002. Rooting depths, lateral root spreads and below-ground/above-ground allometries of plants in water-limited ecosystems. *J. Ecol.* 90, 480–494.
58. Stuth, J., A. Jama and D. Tolleson. 2003. Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy. *Field Crops Research* 84(1-2): 45-56.
59. Van Soest P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch poly saccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 74:3583–3597.
60. Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2e. Ithaca, NY: Cornell University Press.
61. Wang, X., Y. Fu, L. Ban, Z. Wang, G. Feng, J. Li and H. Gao. 2013. Selection of reliable reference genes for quantitative real-time RT-PCR in alfalfa. *Genes & Genetic Systems* 90, 175–180.
62. Ward, P.R., F.X. Dunin, and S.F. Micin. 2001. Water balance of annual and perennial pastures on a duplex soil in a Mediterranean environment. *Australian Journal of Agricultural Research* 52:203-209.
63. Watson, C.A., H. Bengtsson, M. Ebbesvik, A.K. Løes, A. Myrbeck and E. Salomon. 2002. A review of farm-scale nutrient budgets for organic farms as a tool for management of soil fertility. *Soil Use Manag.* 2002;18:264–73.