

Productividad y calidad nutricional de dos cultivares de alfalfa (*Medicago sativa* L) sometida a fertilización e inoculación

Guido Arnaldo Portillo¹ ✉  Vanessa Belén Ruiz Díaz Giménez ✉  Pedro Luís Paniagua Alcaráz ✉ 

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción, San Pedro del Ycuamandyyú, Paraguay

Productivity and nutritional quality of two alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L) subjected to fertilization and inoculation

Abstract. The study was carried out in two experimental phases to evaluate the influence of fertilization and inoculation on the productive and nutritional parameters of two alfalfa cultivars. A completely randomized design was used, with a 2 x 2 x 2 factorial arrangement. The factors were: cultivars (Alfalfa PF9000 (Group 9) and Roundup Ready-RR) and application or not of fertilizer and inoculant, resulting in eight treatments with four repetitions. Plant height, soil cover (%), percentage of dry matter (%DM), green and dry mass yield (GMV and DMV), crude protein content (CP), total digestible nutrients (TDN), non-fibrous carbohydrates (NFC), ether extract (EE), Ash (MM), lignin (LIG), neutral and acid detergent fiber (NDF and ADF) and protein insoluble in acid detergent (ADIP) were determined. Fertilization improved height (71.46 cm) and coverage in both phases (88.94 and 90.40 %), also yields in GM (9.41 t ha⁻¹) and DM (2.57 t ha⁻¹) and CP (15.22 %). The inoculation also improved the yields in GM (9.10 and 7.03 t ha⁻¹) and DM (2.41 and 1.57 t ha⁻¹) in both phases, also the MM (11.53%), while lower values were obtained for the EE (2.25 %), LIG (6.32 %), FDN (44.00 %) and FDA (32.21%). The PF9000 (Group 9) cultivar stood out in height (62.11 cm) and PIDA (9.77 %) and the RR cultivar in MM (11.60 %). There was interaction between fertilizer and inoculant on height, cover, ADIP and GM and DM yields. It is possible to reduce the use of fertilizers, specifically nitrogenous ones, by inoculating the alfalfa crop.

Keywords: *Medicago sativa* L., agronomic performance, nutritional quality, fertilizers, *Bradyrhizobium japonicum*.

Resumen. El estudio se realizó en dos fases experimentales para evaluar la influencia de la fertilización e inoculación sobre los parámetros productivos y nutricionales de dos cultivares de alfalfa. Fue utilizado el diseño completamente aleatorio, con arreglo factorial 2 x 2 x 2. Los factores fueron: cultivares (Alfalfa PF9000 (Grupo 9) y Roundup Ready-RR) y aplicación o no de fertilizante e inoculante, resultando en ocho tratamientos con cuatro repeticiones. Fueron determinadas la altura de la planta, cobertura del suelo (%), porcentaje de materia seca (% MS), rendimiento de masa verde y seca (RMV y RMS), contenido de proteína cruda (PB), nutrientes digestibles totales (NDT), carbohidratos no fibrosos (CNF), extracto etéreo (EE), materia mineral (MM), lignina (LIG), fibra detergente neutro y ácido (FDN y FDA) y proteína insoluble en detergente ácido (PIDA). La fertilización mejoró la altura (71.46 cm) y coberturas en ambas fases (88.94 y 90.40 %), también los rendimientos en MV (9.41 t ha⁻¹) y MS (2.57 t ha⁻¹) y la PB (15.22 %). La inoculación también mejoró los rendimientos en MV (9.10 y 7.03 t ha⁻¹) y MS (2.41 y 1.57 t ha⁻¹) en ambas fases, también la MM (11.53 %), mientras que menores valores obtuvo para el EE (2.25 %), LIG (6.32 %), FDN (44.00 %) y FDA (32.21 %). El cultivar PF9000 (Grupo 9) se destacó en la altura (62.11 cm) y PIDA (9.77 %) y el cultivar RR en MM (11.60%). Hubo interacción entre fertilizante e inoculante sobre la altura, la cobertura, la PIDA y los rendimientos en MV y MS. Es posible reducir el uso de fertilizantes específicamente el nitrogenado mediante la inoculación del cultivo de la alfalfa.

Palabras claves: *Medicago sativa* L., desempeño agronómico, calidad nutricional, fertilizantes, *Bradyrhizobium japonicum*.

Productividad e qualidade nutricional de duas cultivares de alfafa (*Medicago sativa* L.) submetidas a adubação e inoculação

Resumo. O estudo foi realizado em duas fases experimentais para avaliar a influência da adubação e da inoculação nos parâmetros produtivos e nutricionais de duas cultivares de alfafa. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 2 x 2. Os fatores foram: cultivares (Alfalfa PF9000 (Grupo 9) e Roundup Ready-RR) e aplicação ou não de fertilizante e inoculante, resultando em oito tratamentos com quatro repetições. Foram determinados a altura das plantas, cobertura do solo (%), porcentagem de matéria seca (%MS), rendimento de massa verde e seca (RMV e RMS), teor de proteína bruta (PB), nutrientes digestíveis totais (NDT), carboidratos não fibrosos (CNF), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), lignina (LIG), fibra em detergente neutro e ácido (NDF e FDA) e proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA). A adubação melhorou a altura (71,46 cm) e a cobertura em ambas as fases (88,94 e 90,40 %), também as produtividades em MV (9,41 t ha⁻¹) e MS (2,57 t ha⁻¹) e PB (15,22 %). A inoculação também melhorou as produtividades em MV (9,10 e 7,03 t ha⁻¹) e MS (2,41 e 1,57 t ha⁻¹) em ambas as fases, também o MM (11,53 %), enquanto valores inferiores foram obtidos para o EE (2,25 %), LIG (6,32 %), FDN (44,00 %) e FDA (32,21 %). A cultivar PF9000 (Grupo 9) destacou-se em altura (62,11 cm) e PIDA (9,77 %) e a cultivar RR em MM (11,60 %). Houve interação entre fertilizante e inoculante sobre altura, cobertura, PIDA e rendimentos em VM e MS. É possível reduzir o uso de fertilizantes, especificamente os nitrogenados, através da inoculação da cultura da alfafa.

Palabras claves: *Medicago sativa* L., desempenho agrônômico, qualidade nutricional, fertilizantes, *Bradyrhizobium japonicum*.

Introducción

La alfalfa (*Medicago sativa* L.), conocida como la reina de las forrajeras, es ampliamente difundida y utilizada en la alimentación de bovinos de carne y leche, ovinos, caprinos y equinos en las regiones subtropicales debido a su alta productividad, buena calidad nutricional y excelente palatabilidad, pudiendo ser utilizada bajo pastoreo directo, en forma de heno o de silaje (Rojas-García *et al.*, 2016; Ozkose, 2018; Silva, 2020).

El uso de este recurso forrajero permite aumentar la capacidad de carga de los pastizales (Tupy *et al.*, 2015); mejorar el desempeño productivo del rebaño (Cameron *et al.*, 2015) y reducir el costo de producción al disminuir el uso de alimentos concentrados (Santo, 2017). Por otra parte, la alfalfa es muy exigente en cuanto a nutrientes, principalmente de P y N (Sanz-Saez *et al.*, 2017).

El uso de fertilizantes sintéticos inorgánicos ha sido la práctica tradicional para subsanar la deficiencia nutricional y mejorar los rendimientos de los cultivos, sin embargo, ha sido demostrado que su uso desmedido provoca contaminación del medio ambiente y pérdida de la fertilidad de los suelos (Chávez-Díaz *et al.*, 2020).

Esto se ha convertido en motivos de preocupación tanto para la comunidad científica como también para los productores agropecuarios, por lo que últimamente se han integrado enfoques ecológicos que influyan de la misma manera sobre los rendimientos y que reduzcan al mínimo los impactos sobre el ambiente (Moreno-Reséndez *et al.*, 2018).

Para reducir el uso de fertilizantes sintéticos, se han desarrollado tecnologías amigables con el

medioambiente como el uso de microorganismos benéficos que pueden encontrarse de manera natural en el suelo o bien, aplicados como biofertilizantes, los cuales pueden favorecer el crecimiento de las plantas. Estos beneficios se obtienen mediante la fijación de N atmosférico, síntesis de fitohormonas, solubilización de P inorgánico y la mineralización de fosfato orgánico, incremento en la permeabilidad de la raíz, reducción de la toxicidad por metales pesados, entre otros beneficios (Esquivel-Cote *et al.*, 2013; Toniuti y Fonacero, 2020).

Las cepas comúnmente utilizadas en los cultivos de alfalfa son *Ensifer meliloti* y *Ensifer medicae* (Tabares-da Rosa *et al.*, 2019). Otra cepa muy utilizada en la inoculación de leguminosas con buenos resultados es *Bradyrhizobium japonicum*, la cual se aplica ampliamente en el cultivo de la soja. Por otro lado, se ha demostrado que este inóculo puede mejorar el desarrollo y productividad de leguminosas forrajeras (Benselama *et al.*, 2014), por lo que podría utilizarse en el cultivo de alfalfa para determinar su respuesta ante este tratamiento ya que existen pocas experiencias sobre su uso en el cultivo de alfalfa.

Por otro lado, la baja fertilidad de los suelos y la limitada disponibilidad de cultivares adaptados a condiciones tropicales y subtropicales pueden restringir la productividad de la alfalfa (Santos, 2017). En este sentido, los avances recientes en el mejoramiento genético de alfalfa para mejorar la persistencia de los cultivares pueden respaldar la intensificación de la frecuencia de la cosecha, lo que mejora simultáneamente el rendimiento del forraje y el valor nutricional (Eckberg *et al.*, 2022).



A pesar de estos avances, es necesario conocer el comportamiento agronómico y nutricional de los nuevos cultivares que se introducen en el país, motivo por el cual se realizó este estudio para evaluar el

comportamiento productivo y la calidad nutricional de dos cultivares de alfalfa recientemente introducidos en Paraguay, sometidos a fertilización e inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*.

Materiales y Métodos

Localización de la investigación y condiciones edafoclimáticas

El estudio se realizó en la comunidad denominada Ycua Pindo, distrito de General Elizardo Aquino, San Pedro, Paraguay (24°29'01" S y 56°47'21.8" W); entre junio y octubre de 2021. Durante la investigación se registró una temperatura mínima promedio de 15°C y una máxima promedio de 27°C y precipitación total de 543 mm (Figura 1).

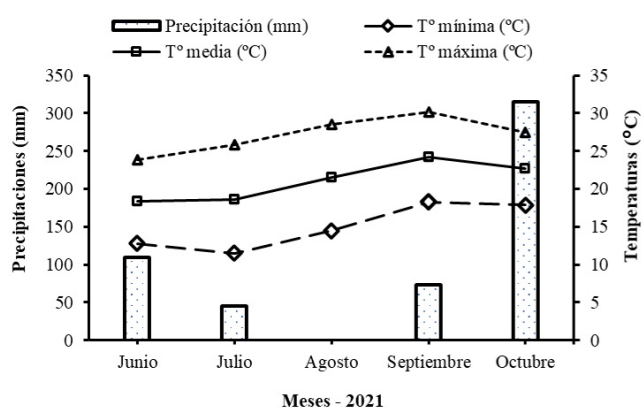


Figura 1. Temperaturas mínimas, máximas y precipitaciones, registradas durante la ejecución del experimento.

El área de suelo experimental corresponde a Mollic Paleudalf de textura franco-arenosa débilmente estructurada (López *et al.*, 1995). Las características físico-químicas del suelo según análisis fueron: pH= 4,90; MO= 0,7%; P= 5 mg kg⁻¹; Ca⁺²= 1,21 cmol kg⁻¹; Mg⁺²= 0,31 cmol kg⁻¹; K+= 0,08 cmol kg⁻¹; Na+= 0,01 cmol kg⁻¹; Al⁺³= 0 cmol kg⁻¹ y suma de base (BS)= 1,61 cmol kg⁻¹.

Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar, con arreglo factorial 2 x 2 x 2 (Cuadro 1), resultando en ocho combinaciones entre factores y cuatro repeticiones, con lo que se totalizó 32 unidades experimentales (UE).

Cuadro 1. Factores y sus niveles utilizados como los tratamientos de la investigación.

Factores	Conceptos	Descripción
Factor A	Cultivares	PF9000 (Grupo 9)
		Round up Ready (RR)
Factor B	Fertilización	Con fertilización
		Sin fertilización
Factor C	Inoculación	Con inoculación
		Sin inoculación

Manejo del experimento

Antes de la preparación del terreno se extrajo una muestra compuesta de suelo a 20 cm de profundidad, dicha muestra fue llevada al laboratorio de suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción para su análisis físico-químico. De acuerdo a los resultados obtenidos, se aplicó un mes antes de la siembra un calcáreo de liberación rápida (Calcítica) a razón de 2.08 t ha⁻¹ (95 % de la PRNT).

Luego del encalado, se realizaron dos pasadas de discos pesados y una pasada de discos livianos hasta que el suelo quedó homogéneo. Además, se delimitaron las unidades experimentales (3 m x 4 m) y luego se surcaron la tierra con distanciamiento de 40 cm y con una profundidad de 2 cm. Posteriormente se efectuaron las siembras de las semillas de manera manual a chorro continuo, las mismas fueron tratadas según lo detallado en el Cuadro 1, utilizándose una densidad de siembra de 8.68 kg ha⁻¹.

Para la inoculación se aplicó antes de la siembra la cepa *Bradyrhizobium japonicum* (1.0 x 10¹⁰ células mL⁻¹) a razón de 2 mL kg⁻¹ de semillas según indicación del prospecto del producto. Para los tratamientos con fertilización, se aplicaron de manera localizada y con dosis según análisis de suelo, 45 kg ha⁻¹ de urea (45:0:0), 130 kg ha⁻¹ de superfosfato triple (0:46:0) y 40 kg ha⁻¹ de Cloruro de Potasio (0:0:60) y en cobertura se volvió a aplicar 45 kg ha⁻¹ de urea.

Durante el experimento, las malezas y plagas fueron controladas según la aparición e intensidad de la infestación. El control de malezas se realizó semanalmente con azada manual; y el control de hormigas cortadoras (*Atta* y *Acromyrmex* spp) se realizó en cuatro ocasiones con la aplicación de Fipronil al 0,01% de concentración, y las orugas verdes y negras de la alfalfa se controlaron en tres ocasiones mediante la aplicación de Cipermetrina con dosis de 50 mL por 20 L de agua.

Se aplicó riego por goteo cada vez que fue necesario (5.67 L m² por ocasión) entre junio y septiembre (año 2021), donde se registró muy poca o ninguna precipitación debido a la sequía que afectó a la región (Figura 1). Este experimento se dividió en dos etapas: la fase de establecimiento que fue desde la emergencia de las plántulas hasta el primer corte (90 días después

de la emergencia (DDE)), y la segunda se denominó fase de recrecimiento y abarcó desde el primer hasta el segundo corte con una duración de 30 días y 122 DDE.

Determinaciones realizadas

Los cortes para las evaluaciones correspondientes se realizaron cuando el cultivo se encontraba en la etapa de floración del 10 % y los análisis bromatológicos se realizaron a partir de las muestras obtenidas en la fase de recrecimiento.

Para la determinar la altura de la planta (PH), se seleccionaron al azar 10 plantas de cada UE y se midieron a los 90 DDE (Establecimiento) y 122 DDE (Recrecimiento) según la metodología de Toledo y Schultze-Kraft (1982). Siguiendo la recomendación de los mismos autores, la cobertura (%) se midió antes de cada corte utilizando un cuadrado de 1 m² de área, con 16 subdivisiones de 0.25 m x 0.25 m, dentro de las cuales se cuantificaron las áreas cubiertas y descubiertas.

Posteriormente, las biomásas aéreas dentro del marco se cortaron a 5 cm del suelo y se pesaron para determinar el rendimiento de masa verde (RMV). Posteriormente se tomaron submuestras de 500 g de forraje verde y se secaron en estufa a 65 °C por 72 horas (hasta peso constante).

Comportamiento productivo

Se registraron interacciones significativas ($P < 0.05$) para la altura de la planta, cobertura, rendimientos en materia verde y materia seca mediante la combinación de inoculantes y fertilizantes (Figura 2). En cuanto a los

A partir de la relación porcentual entre el peso seco y fresco del forraje recolectado, se determinó el porcentaje de MS y dicho valor se utilizó para calcular el rendimiento en materia seca (RMS) y para determinación del número de nódulos, se procedió a extraer 10 plantas de cada UE, de las cuales se lavaron con agua las raíces para eliminar tierra y observar y cuantificar los nódulos.

Los contenidos de proteína cruda (PC), materia mineral (MM) y extracto etéreo (EE) se determinaron según AOAC (2007); mientras que la fibra detergente neutra (FDN), la fibra detergente ácida (FDA) y la lignina (LIG) según Van Soest *et al.* (1991), proteína insoluble en detergente ácido (PIDA) según Licitra *et al.* (1996), el contenido de carbohidratos no fibroso (CNF) según Sniffen *et al.* (1992) y los nutrientes digestibles totales (NDT) mediante la metodología de Weiss (1993).

Análisis estadísticos de los datos

Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza (ANAVA) mediante el Test de "F" y las medias que presentaron diferencias estadísticas fueron comparadas entre sí por el Test de Duncan ($P < 0.05$); utilizándose el paquete estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2018).

Resultados y Discusión

cultivares utilizados (Cuadro 2), no se observan diferencias en las variables estudiadas en la fase de establecimiento, sin embargo, en la fase de recrecimiento, hubo diferencias del 5.35 % en la altura de la planta a favor del cultivar PF9000 (G9).

Cuadro 2. Valores de la altura, cobertura, rendimiento en masa verde, porcentaje de masa seca (% MS), rendimiento en masa seca y número de nódulos de la alfalfa por efecto de los factores y niveles con que fueron empleados en el experimento.

Variables/fases	Cultivares		Fertilización		Inoculación		
	PF9000 (G9)	RR	Con	Sin	Con	Sin	CV (%)
Establecimiento							
Altura (cm pl ⁻¹)	70.16	70.00	71.46 ^a	67.79 ^b	68.12	71.04	5.80
Cobertura (%)	81.03	85.92	88.94 ^a	78.01 ^b	81.60	85.34	8.09
Rendimiento MV (t ha ⁻¹)	7.74	7.97	9.41 ^a	6.30 ^b	9.10 ^a	6.62 ^b	17.98
MS (%)	29.17	27.14	27.83	28.47	29.44	26.87	13.05
Rendimiento MS (t ha ⁻¹)	2.21	2.14	2.57 ^a	1.78 ^b	2.41 ^a	1.94 ^b	16.13
Nódulos (unidades)	0	0	0	0	0	0	-
Recrecimiento							
Altura (cm pl ⁻¹)	62.11 ^a	58.79 ^b	60.78	60.13	60.78	60.19	7.05
Cobertura (%)	88.53	86.59	90.44 ^a	84.68 ^b	89.25	85.88	5.41
Rendimiento MV (t ha ⁻¹)	6.45	6.35	6.43	6.38	7.03 ^a	5.77 ^b	8.70
MS (%)	22.76	22.11	22.36	22.51	22.91	21.96	4.41
Rendimiento MS (t ha ⁻¹)	1.43	1.43	1.44	1.43	1.57 ^a	1.30 ^b	7.90
Nódulos (unidades)	0	0	0	0	0	0	-

Medias seguidas de la misma letra en la fila, no difieren entre sí según el test de Duncan ($P > 0.05$).
CV: Coeficiente de variación.

Con respecto a la fertilización, hubo incrementos significativos ($P < 0.05$) en las variables de altura de la planta (5.41 %), cobertura del suelo (11.40 %), rendimientos en MV (49.37 %) y en MS (44.38 %) en la fase de establecimiento; mientras que, en la fase de recrecimiento, solo se observa incremento del 14 % en la cobertura. Stavarache *et al.* (2010), también reportaron mejoría del 48 % en el rendimiento en MS con la aplicación de fertilizantes a base de N y P.

Con relación a la nula influencia de la fertilización sobre los parámetros productivos en la fase de recrecimiento pudo deberse a que el suelo experimental presentó textura areno-franca cuya capacidad de retención nutrientes es baja (Brady y Weil, 2013; Centeno *et al.*, 2017) y la alfalfa extrae grandes cantidades de nutrientes y cuando son cortados ya no hay reposición de los mismos al suelo, lo que puede reducir la fertilidad (Glienke *et al.*, 2013). Sumado a esto, se registró precipitación acumulada de 315 mm durante la fase de recrecimiento (Figura 1), lo que pudo agravar la pérdida de nutrientes del suelo por erosión y lixiviación y de esta manera ya no se pudo observar efectos de la fertilización.

Por otra parte, la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* solo mejoró significativamente ($P < 0.05$) el rendimiento en masa verde (37.46 y 21.84 %) y masa seca (24.23 y 20.77 %) en las fases de establecimiento y recrecimiento, respectivamente. Mientras que, en las demás variables, no se evidenciaron diferencias. Mouhamd *et al.* (2017), también registraron incremento en la producción de MV y MS en el cultivo de alfalfa al inocular con *Bradyrhizobium japonicum*. Silva (2020) en

un estudio realizado, tampoco registró diferencias en la altura de la alfalfa, sin embargo, reportó incremento del 63.30 % en el rendimiento en MS mediante la inoculación de la alfalfa con *Sinorhizobium meliloti* semia, estando en concordancia con registrado en el presente estudio.

El incremento de los rendimientos (MV y MS) observados en el presente estudio podría ser por el N_2 atmosférico fijado, que una vez absorbido por las plantas pudo favorecer una mayor producción de biomasa de la parte aérea, abasteciendo al mismo tiempo, una mayor cantidad de reserva de carbohidratos para el sistema radicular tal como lo afirman Gomes *et al.* (2002).

Otra explicación a este comportamiento podría ser a que la mayoría de los microorganismos favorecen en la síntesis de fitohormonas lo que promueve el desarrollo y permeabilidad de las raíces, favoreciendo mayor absorción de agua y nutrientes, lo que también puede mejorar el crecimiento de las plantas (Toniutti y Fonacero, 2020).

Con respecto a la formación de nódulo de las raíces de la planta de alfalfa, no se registró formación en ninguna de las plantas evaluadas de cada tratamiento, lo cual indica que en el suelo donde se realizó el experimento tampoco contiene población microbiana nativa, esto tal vez por el sistema tradicional de labranza de la tierra practicada en el terreno. La aplicación del inoculante *Bradyrhizobium japonicum* tampoco promovió la nodulación, lo que se confirma por lo relatado por Prévost *et al.* (1999), quienes afirman que esta cepa no nodula alfalfa.

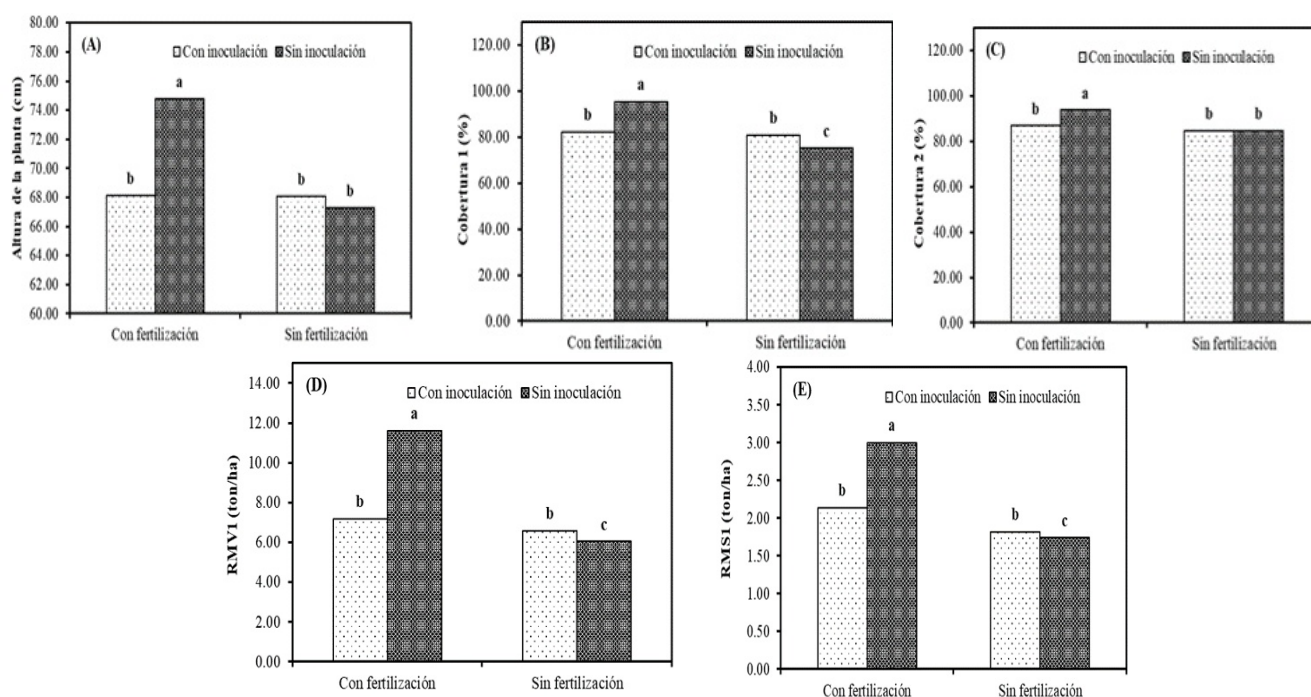


Figura 2. Altura de la planta (A), coberturas (B y C), rendimientos en masa verde y masa seca (RMV (D) y RMS (E)) de dos cultivares de alfalfa fertilizados e inoculados con *Bradyrhizobium japonicum*. Valores seguidos con las mismas letras no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

Al analizar las interacciones significativas registradas (fertilizantes x inoculante) para la altura, cobertura y rendimientos en MV y MS (Figura 2), se observa que con dicha combinación el comportamiento agronómico de la alfalfa no es similar como cuando son aplicados de forma separada, incluso se comportan al igual que el tratamiento testigo absoluto (sin fertilizar y sin inocular) y al tratamiento solo con inoculante, para las variables de altura y cobertura, pero fueron inferiores a los resultados con el tratamiento con fertilizante en 10.21 % (altura) y 9.89 % (cobertura).

Por otro lado, dicha combinación mejoró en los rendimientos en MV (9.44 %) y MS (17.58 %) con relación al testigo (sin fertilizantes ni inoculantes), pero muy inferiores en un 61.61 % (MV) y 64.84 % (MS) a los valores obtenidos con el tratamiento con fertilizantes. Este comportamiento pudo ser debido a que con la fertilización química que contiene fuente nitrogenada en la formulación, existen alta concentración de N mineral en el suelo, lo cual puede afectar la actividad biológica del inoculante aplicado conjuntamente con el fertilizante y que a su vez puede perjudicar la absorción del N por las raíces provocando reducción en la velocidad el crecimiento de las plantas tal como lo afirman Oliveira *et al.* (2003) y Oliveira y Tsai (2006).

Cuadro 3. Valores de las características bromatológicas de la alfalfa por efecto de los factores y niveles con que fueron empleados en el experimento.

Variables	Cultivares		Fertilización		Inoculación		
	PF9000 (G9)	RR	Con	Sin	Con	Sin	CV (%)
PB (%MS)	14.84	14.82	15.22 ^a	14.44 ^b	14.96	14.70	5.75
CNF (%MS)	27.23	26.26	26.32	27.17	27.27	26.22	10.08
NDT (%MS)	57.55	56.91	57.15	57.31	57.42	57.04	3.11
EE (%MS)	2.33	2.41	2.37	2.37	2.25 ^b	2.49 ^a	11.22
MM (%MS)	10.67 ^b	11.60 ^a	11.16	11.11	11.53 ^a	10.74 ^b	6.64
LIG (%MS)	6.71	6.52	6.66	6.57	6.32 ^b	6.91 ^a	8.66
FDN (%MS)	44.93	44.91	44.93	44.91	44.00 ^b	45.84 ^a	5.44
FDA (%MS)	33.34	34.30	33.79	33.85	32.21 ^b	35.43 ^a	5.02
PIDA (%PB)	9.77 ^b	11.40 ^a	10.31	10.80	9.83	11.29	17.36

Medias seguidas de la misma letra en la fila, no difieren entre sí según el test de Duncan ($P > 0.05$).
CV: Coeficiente de variación.

Los mayores valores registrados por el cultivar RR no indica que sea el mejor cultivar, debido a que la PIDA es la proteína ligada a la FDA (Detmann *et al.*, 2012) y no está disponible para la digestión a nivel ruminal ni intestinal (Guevara-Mesa *et al.*, 2011; Gaviria *et al.*, 2015), Además, este componente limita la disponibilidad de energía para los rumiantes (Weiss, 1993).

En este sentido, el cultivar PF9000 (G9) presentó mayor disponibilidad de proteína para el aprovechamiento animal que el otro cultivar (90.23 % vs 86.60 %). Sin embargo, los valores obtenidos en el presente estudio están por encima de nivel máximo

En cuanto al incremento en el rendimiento de la alfalfa con la combinación de fertilizante e inoculante y con la sola aplicación de inoculantes en comparación al tratamiento testigo, sugiere que el inoculante podría sustituir al fertilizante químico específicamente el Nitrogenado, aunque sería interesante estudiar más para determinar hasta qué punto podría darse esta sustitución ya que sería difícil una sustitución total, como puede constatarse con los efectos registrados en este trabajo, lo que concuerda con lo mencionado por Morais (2012).

Características bromatológicas

Se registró interacción significativa ($P < 0.05$) solamente entre la combinación de inoculante y fertilizante en la variable de proteína insoluble en detergente ácido (Figura 3). Considerando los cultivares evaluados en el estudio (Cuadro 3), el cultivar Round up Ready (RR) presentó valores superiores para el contenido de MM y de PIDA, con diferencias del 8.72 y 16.55 %, respectivamente.

recomendado por Licitra *et al.* (1996) y Medeiros y Marino (2015), el cual es del 7 % de la PB del forraje, aunque Van Soest (1994) afirma que la PIDA normalmente está entre el 5 y el 15 % en forrajes tropicales y subtropicales.

Por otra parte, la fertilización mejoró significativamente ($P < 0.05$) en un 5.40 % el contenido de PB; mientras que no afectó a las demás variables (Cuadro 3). Esto pudo ser por la alta disponibilidad de N en el suelo después de la aplicación del fertilizante, que una absorbido por las raíces se acumulan en los tejidos de la planta incrementando el valor de dicho

elemento, lo que se traduce en un mayor contenido proteico, coincidiendo con lo mencionado por Santos *et al.* (2009). Valor superior del incremento fue reportado por Wan *et al.* (2022), quienes al estudiar el contenido de PB en la alfalfa sometida a fertilización con N:P:K, reportaron un incremento del 7.70 % con relación al testigo.

Con respecto a la inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* (Cuadro 3), con este tratamiento disminuyó significativamente el contenido de extracto etéreo (EE), como también los componentes fibrosos de la alfalfa. En este sentido, el EE se disminuyó en un 9.63 %; mientras que el valor de la LIG en un 9.59 %, que es la responsable por la disminución de los valores de FDN y FDA en un 9.33 y 9.09 %; respectivamente.

Este comportamiento podría atribuirse a la inoculación que puede promover cambio en el patrón de expresión del metabolismo de carbohidratos incrementando los valores de hemicelulosa en la pared celular, reduciendo los valores de la LIG tal como indican Ghabooli *et al.* (2013). Otro factor que podría contribuir a su reducción es la dilución por efecto del N fijado, disponibilizado, absorbido y almacenado en las plantas de acuerdo con la afirmación de Van Soest (1994).

Por otro lado, este suceso es importante ya que la lignina interfiere negativamente con la digestibilidad total y el valor energético de la alfalfa para los rumiantes (Yu *et al.*, 2003). Del mismo modo, Liu *et al.* (2019) constataron disminución de los componentes fibrosos (FDN y FDA) de la alfalfa mediante la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento, coincidiendo con lo reportado en el presente experimento.

Con respecto al contenido de MM, la inoculación incrementó significativamente en un 10.74 % los valores

de esta variable. Este efecto pudo ser a que los microorganismos pudieron solubilizar los minerales presentes en el suelo, como también favorecer el desarrollo radicular e incrementar la absorción de dichos elementos, tal como lo afirman Esquivel-Cote *et al.* (2013) y Toniuti y Fonacero (2020). Por otra parte, Jafari *et al.* (2018) no registraron diferencias en el contenido de MM al inocular alfalfa con *Sinorhizobium meliloti* y co-inoculada con *Piriformospora indica*.

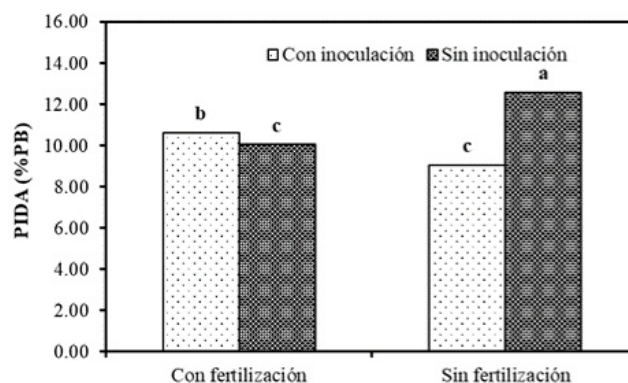


Figura 3. Proteína insoluble en detergente ácido (PIDA) de dos cultivares de alfalfa fertilizados e inoculados con *Bradyrhizobium japonicum*. Valores seguidos con las mismas letras no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

Al analizar la interacción significativa registrada (fertilizantes x inoculante) para la PIDA (Figura 3), se observa que con la aplicación de fertilizantes e inoculante se obtiene reducción similar para el valor de la PIDA lo cual fue de 24 % con relación al tratamiento testigo (sin fertilizar y sin inocular). Del mismo modo, al aplicar de manera combinada (fertilizar + inoculante) redujo significativamente con relación al testigo en un 15.50 %, pero fue significativamente inferior a las reducciones presentadas cuando son aplicados en forma separados. Esto indica que aplicado conjuntamente se reduce la eficiencia en un 35.42 %.

Conclusión

Entre los cultivares evaluados en el presente experimento, se observaron diferencias significativas en donde la alfalfa PF9000 (Grupo 9) presentó mejores resultados en las variables de altura de la planta y contenido de PIDA; mientras que el cultivar Roundup Ready arrojó mejor resultado para el tenor de MM.

La aplicación de fertilizantes aumentó significativamente la altura de la planta de la alfalfa, el rendimiento en MV y MS solo en la fase de establecimiento; mientras que la cobertura del suelo incrementó en ambas fases experimentales. Del mismo modo, mejoró el contenido de PB y sin embargo no influyó sobre las demás variables.

Del mismo modo, la aplicación de inoculante incrementó significativamente los rendimientos en MV y MS en ambas fases experimentales, así también, mejoró el contenido de MM, redujo los valores del EE y de los componentes fibrosos de la alfalfa (FDN, FDA, LIG y PIDA); mientras que no afectó a las demás variables.

Se registraron interacciones significativas al aplicar fertilizante e inoculante conjuntamente no presentando efectos sobre los valores de la altura y la cobertura, pero mejoraron los valores de PIDA y los rendimientos en MV y MS, aunque todos los valores fueron inferiores a los registrados por el tratamiento con fertilización.

En base a los resultados observados en el presente estudio se puede afirmar que podría utilizarse la inoculación como alternativa para reducir el uso de fertilizantes

químicos sintéticos, principalmente el nitrogenado y se recomienda realizar más estudios buscando determinar hasta qué punto podría darse esta reducción.

Agradecimientos: Se expresa especial agradecimiento a la Facultad de Ciencias Agraria (UNA), Filial San Pedro por la disponibilización de los recursos técnicos para la ejecución del proyecto de investigación.

Conflicto de intereses: Los autores afirman que no existe ningún conflicto de interés por declarar.

Contribuciones de los autores: **Guido Arnaldo Portillo:** autor principal encargado de elaborar, ejecutar el proyecto de investigación, análisis estadísticos y redacción del artículo. **Vanessa Belén Ruiz Díaz Giménez:** autora responsable de la planificación y ejecución del proyecto de investigación a campo, como también de la interpretación de resultados y redacción de artículo. **Pedro Luis Paniagua Alcaraz:** autor encargado de diseñar el proyecto y redacción del artículo.

Financiación: El proyecto de investigación fue financiado con recursos propios de los investigadores.

Editado por: Martin Alejandro Jaurena

Literatura Citada

- Association Analytical Chemists (AOAC). 2007. Official methods of analysis 18.ed. Gaithersburg, Maryland, USA; AOAC international. p. 21 - 22. ISBN-10: 0935584757.
- Benselama, A., Talah, S., Ounane, S., Mohamed, S., Bekki, A. 2014. Effects of inoculation by *Bradyrhizobium japonicum* strains on nodulation, nitrogen fixation and yield of *Lablab purpureus* in Algeria. Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences, 2: 1870-1876. <https://dergipark.org.tr/download/article-file/142354>
- Brady, NC., y Weil, RR., 2013. Elementos da natureza e propriedades dos solos. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 790 págs. ISBN: 978-85-65837-74-3.
- Centeno, LN., Guevara, MDF., Ceconello, ST., Sousa, ROD., Timm, LC., 2017. Textura do solo: Conceitos e Aplicações em Solos Arenosos. Revista Brasileira de Engenharia e Sustentabilidade, 4(1):31-37. <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/RBES/article/view/11576>
- Chávez-Díaz, IF., Zelaya-Molina, LX., Cruz-Cárdenas, CI., Rojas-Anaya, E., Ruíz-Ramírez, S., y Santos-Villalobos, S. de los., 2020. Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agrobiotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 11(6): 1423-1436. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2492>
- Comeron, EA., Ferreira, R., Vilela, D., Kuwahara, FA., y Tupy, O., 2015. Utilização da alfafa em pastejo para alimentação de vacas leiteiras. In: Ferreira, D Vilela, EA Cameron, AC Bernardi y D Karam, D. (Ed.). Cultivo e utilização da alfafa em pastejo para alimentação de vacas leiteiras. Brasília, DF: EMBRAPA Sede, 131-149 págs. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/131731/1/PROCI-2015REINALDO2.pdf>
- Detmann, E., Souza, MA., Valadares-Filho, SC., Queiroz, AC., Berchielli, TT., Saliba, EOS., Cabral, LS., Pina, DS., Ladeira, MM., y Azevedo, JAG. 2012. Métodos para análise de alimentos. Suprema: Visconde do Rio Branco, 214p. ISBN: 9788581790206.
- Di Rienzo, JA., Casanoves, F., Balzarini, MG., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, CW., 2018. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://infostat.com.ar>
- Eckberg, JO., Wells, SS., Jungers, JM., Lamb, JF., Sheaffer, CC., 2022. Alfalfa forage yield, milk yield and nutritive value under intensive cutting. Agrosystems, Geosciences and Environment, 5(2): e20246. <https://doi.org/10.1002/agg2.20246>
- Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R. Sheaffer, CC., 2022. Alfalfa forage yield, milk yield and nutritive value under intensive cutting. Agrosystems, Geosciences and Environment, 5(2): e20246. <https://doi.org/10.1002/agg2.20246>
- Gaviria, X., Rivera, J., y Barahona, R. 2015. Calidad nutricional y fraccionamiento de carbohidratos y proteína en los componentes forrajeros de un sistema silvopastoril intensivo. Pastos y Forrajes, 38(2): 194-201. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942015000200007
- Ghabooli, M., Khatabi, B., Ahmadi, F.S., Sepehri, M., Mirzaei, M., Amirkhani, A., Jorrín-Novo, J.V., Salekdeh, G.H. 2013. Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley. Journal of Proteomics, 94: 289-301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpro.2013.09.017>
- Glienke, CL., Soares, AB., Biezu, V., Assmann, TS., Assmann, AL., y Semler, TD., 2013. Teores de potássio no solo cultivado com alfafa em função de doses de adubação potássica em sistema de plantio direto. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Ciencia do Solo, 1-4 págs. <https://www.eventosolos.org.br/cbcs2013/anais/arquivos/2635.pdf>

- Gomes, FT., Borges, AC., Neves, JCL., Fontes, PCR., 2002. Nodulation, nitrogen fixation and alfalfa dry matter production as affected by rates of limestone with different calcium: magnesium ratios applied. *Ciencia Rural*, 32(6): 925-930.
- Guevara-Mesa, AL., Miranda-Romero, LA., Ramírez-Bribiesca, JE., González-Muñoz, SS., Crosby-Galvan, MM., Hernández-Calva, LM., y Del Razo-Rodríguez, OE., 2011. Protein fractions and *in vitro* fermentation of protein feeds for ruminants. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(1): 421-429. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000200008
- Jafari, M., Yari, M., Ghabooli, M., Sepehric, M., Ghasemi, E., y Jonke, A., 2018. Inoculation and co-inoculation of alfalfa seedlings with root growth promoting microorganisms (*Piriformospora indica*, *Glomus intraradices* and *Sinorhizobium meliloti*) affect molecular structures, nutrient profiles and availability of hay for ruminants. *Animal Nutrition*, 4(1): 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.008>
- Licitra, G., Hernandez, TM., Van Soest, PJ., 1996. Standardizations of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 57: 347-358. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00837-3](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00837-3)
- Liu, J., Tang, L., Gao, H., Zhang, M., Guo, C., 2019. Enhancement of alfalfa yield and quality by plant growth-promoting rhizobacteria under saline-alkali conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(1): 281-289. <https://doi.org/10.1002/jfsa.9185>
- López, O., González, E., Llamas, P., Molinas, A., Franco, E., García, S., Ríos, E., 1995. Estudio de reconocimiento de suelos, capacidad de uso de la tierra y propuesta de ordenamiento territorial preliminar de la Región Oriental del Paraguay. Asunción, PY, MAG/Banco Mundial. 284 págs. <https://www.geologiadelparaguay.com/Estudio-de-Reconocimiento-de-Suelos-Regi%C3%B3n-Oriental-Paraguay.pdf>
- Medeiros, SR., Marino, CT., 2015. Proteínas na nutrição de bovinos de corte. In: *Nutrição de bovinos de corte: Fundamentos e aplicações*, Embrapa, Brasília, DF, p.27-44. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/120040/1/Nutricao-Animal-livro-em-baixa.pdf>
- Morais, TP de., 2012. Nitrogen application and *Azospirillum brasilense* inoculation on maize hybrids. *Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)*. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 83 p. <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2012.73>
- Moreno-Reséndez, A., Carda-Mendoza, V., Reyes-Carrillo, JL., Vásquez-Arroyo, J., y Cano-Ríos, P., 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Rev. Colombiana Biotecnol.* 20(1): 68-83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Mouhamd, R., Latif, S., Yousir, S., Razaq, I., Iqbal, M., Abbas, M., Sajid, A., Nazir, A., 2017. Impact on hay under saline conditions of Arbusular-Mycorrhiza and *Bradyrhizobium japonicum*. *Current Science Perspectives*, 3(2): 97 - 104. https://www.researchgate.net/publication/311667213_Impact_on_hay_under_saline_conditions_of_Arbusular-Mycorrhiza_and_Bradyrhizobium_japonicum
- Oliveira, WS., Oliveira, PPA., Corsi, M., Trivelin, PCO., Tsai, SM., 2003. Disponibilidade hídrica relacionada ao conteúdo de nitrogênio e produtividade da alfafa (*Medicago sativa* L.). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32(6): 1275-1286. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000600001>
- Oliveira, PPA., y Tsai, SM., 2006. Avaliação da fixação biológica de nitrogênio em alfafa inoculada com estirpes comerciais de *Sinorhizobium meliloti*. *EMBRAPA. Comunicado Técnico*. 70: 1-6. ISSN 1981-206X
- Prévost, D., Drouin, P., Antoun, H., 1999. The potential use of cold-adapted rhizobia to improve symbiotic nitrogen fixation in legumes cultivated in temperate regions. In: Margesin, R., Schinner, F. (eds) *Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58607-1_11
- Rojas-García, AR, Torres-Salado, N., Joaquín-Cancino, S., Hernández-Garay, A., Maldonado-Peralta, M., y Sánchez-Santillán, P., 2017. Componentes del rendimiento en variedades de alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agrociencia*, 51: 697-708. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000700697
- Santos, IG., 2017. Seleção de caracteres complexos em alfafa por meio de inteligência computacional. *Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)*. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG: UFV, 91 págs. <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/16369/1/texto%20completo.pdf>
- Sanz-Saez, A., Morales, F., Arrese-Igor, C., y Aranjuelo, I. (2017). P Deficiency: A Major Limiting Factor for Rhizobial Symbiosis. *Legume Nitrogen Fixation in Soils with Low Phosphorus Availability*. Springer International Publishing. pp. 21-39 https://doi.org/10.1007/978-3-319-55729-8_2



- Silva, LA. 2020. Produção de biomassa e composição bromatológica da alfafa submetida a coinoculação com bacterias. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista (UNESP). Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. BR, Sao Paulo: UNESP, 52 págs. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/193018>
- Sniffen CJ., O'Connor, JD., Van Soest, PJ., Fox, DG., Russell, JB. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, 70: 3562-3577. <https://doi.org/10.2527/1992.70113562x>
- Stavarache, M., Muntianu, J., Vîntu, V., Samuil, C., y Popovici, CI., 2010. Research on the influence of inoculation and fertilization on the morphological and productive features of lucerne (*Medicago sativa* L.) under conditions of Moldavian forest steppe. *Lucrări Științifice*, 53(2): 243 - 248. http://www.uaiasi.ro/revagrois/PDF/2010_2_245.pdf
- Tabares-da Rosa, S., Signorelli, S., Del Papa, M., Sabatini, O., Reyno, R., Lattanzi, F., Rebuffo, M., Sanjuán, J., Monza, J., 2019. Rhizobia Inoculants for Alfalfa in Acid Soils: a Proposal for Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 23(2): 1-13. <https://doi.org/10.31285/agro.23.120>
- Toledo, JM., y Schultze-Kraft, R., 1982. Metodología para la evaluación agronómica de Pastos Tropicales. In: Manual para la Evaluación Agronómica. Red Internacional para la Evaluación Agronómica de Pastos Tropicales. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Serie CIAT 07SG-1, p.91-110. ISBN 84-89206-12-0
- Toniutti, MA., y Fornasero, LV., 2020. Efecto de la inoculación con rizobios y la fertilización fosfatada sobre la nodulación y producción de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en el centro de Santa Fe (Argentina) *Agriscientia*, 37(2): 1-10. <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v37.n2.24067>
- Tupy, O., Ferreira, R., Vilela, D., y Kuwaraha, FA., 2015. Viabilidade econômica e financeira do pastejo em alfafa em sistemas de produção de leite. EMBRAPA Pecuária Sudeste. Comunicado técnico N° 118, 57 págs. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/144730/1/Documentos118-Ainfo.pdf>
- Van Soest, PJ., Robertson, JB., Lewis, BA., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Van Soest, PJ., 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2° ed, Cornell University Press, Ithaca, NY, 436p. ISBN-10: 080142772X
- Wan, W., Li, Y., Li, H., 2022. Yield and quality of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in response to fertilizer application in China: A meta-analysis. *Front. Plant Sci.* 13:1051725. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1051725>
- Weiss, WP., 1993. Predicting energy value of feeds. *Journal of Dairy Science*, 76: 1802-1811. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77512-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77512-8)
- Yu P., Meier J., Christensen, DA., Rossnagel, B., McKinnon JJ., 2003. Using the NRC-2001 model and the DVE/OEB system to evaluate nutritive values of Harrington (malting-type) and Valier (feed-type) barley for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol*, 107:45-60. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00062-2)