

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Aislamiento e Identificación *Sinorhizobium meliloti* de Nódulos de Plantas de Alfalfa.

Por:

MARICELA ANTONIO DEL ANGEL

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA
Aislamiento e Identificación *Sinorhizobium meliloti* de Nódulos de Alfalfa

Por:

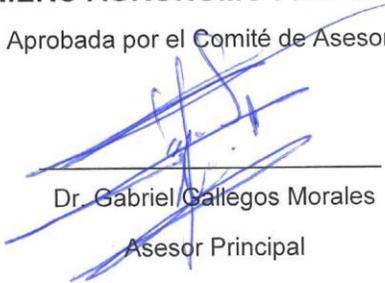
MARICELA ANTONIO DEL ANGEL

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Gabriel Gallegos Morales

Asesor Principal



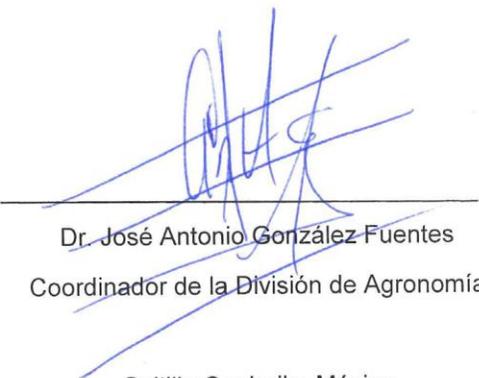
M.C. Omar Jiménez Pérez

Coasesor



Dr. Epifanio Castro del Angel

Coasesor


Dr. José Antonio González Fuentes

Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo Coahuila, México

Diciembre, 2021

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por no dejarme rendirme, me dio las suficientes fuerzas para seguir luchando hasta ahora, por la inteligencia, y la paciencia para terminar mis estudios.

A la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**, por haberme permitido realizar mis sueños y metas de estudiar, me dio la oportunidad de ser parte de su comunidad estudiantil, por la calidad y compromiso educativo que me ofreció durante mi formación académica profesional.

AI DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA por los conocimientos inculcados por sus excelentes y respetables catedráticos que, con su actitud, paciencia, compromiso y sus consejos, que me compartieron de sus conocimientos haciendo de mí un profesional lleno de entusiasmo y conocimientos, lleno de valores y responsabilidad sobre todo para dar solución a problemas actuales que se presentan en el campo, por su dedicación y tiempo dentro y fuera del aula.

A todos los **catedráticos** de la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** que me brindaron los conocimientos a lo largo de mi formación profesional.

Al **Dr. Gabriel Gallegos Morales** por darme la oportunidad de involucrarme en proyectos, brindarme la oportunidad de realizar esta investigación, así mismo agradezco por los conocimientos impartidos por la orientación y apoyo brindado durante todo el proceso de formación.

A la **Lic. Iris del Roció Escobedo Lara Y la Dra. Laura Lilia Escalante** por el gran apoyo y sobre todo la confianza que depositaron en mí, por los consejos y todo el amor que me brindaron.

A mis **Amigos** que siempre me apoyaron y estuvieron a mi lado en los momentos difíciles de mi vida.

A mis **Padres** por confiar plenamente en mí, por su apoyo incondicional moral brindado todo este tiempo a pesar de la distancia nunca me abandonaron.

A mis **Hermanos** por sus entusiasmos, su cariño incondicional, consejos que me han ayudado a salir de los obstáculos que se me han presentado a lo largo de la vida.

DEDICATORIA

A mis **padres Sabina del Angel del Angel y Feliciano Antonio Juana** por el apoyo incondicional que me brindaron en todo momento de mi carrera a pesar de la distancia el apoyo moral siempre estuvo ahí, gracias por la paciencia que han tenido para enseñarme, por el amor que me han dado en todo momento de mi vida, por esos regaños que me los merecía y no entendía,

A mis **hermanos y hermanas Federico, Anastacia, Ana Delia, Rossy, Nice, Landy, Maky y Naye**. Gracias a todos ustedes que siempre me impulsaron a salir adelante, sus consejos y por todo. No son nada más y nada menos que un solo conjunto, no podría sentirme más menos por la confianza puesta en mi persona, especialmente cuando he contado con su apoyo desde siempre.

A mi hermano **Federico** gracias por enseñarme lo es el amor incondicional y la amistad más profunda. Jamás te olvidare hermano vaya donde vaya siempre te llevare conmigo, te has convertido en un ángel y como lo fuiste en vida, seguiras iluminando el camino de todos hacia lo mejor que nos espera en nuestra vida, nuestra propia felicidad. Eres un ejemplo de vida a seguir tu perseverancia en vida es digna de imitar.

A mi **abuela Teresa Del Angel Del Angel** por los consejos que me diste, por valorar a las personas y sobre todo a salir adelante.

Índice

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA.....	III

INDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE CUADROS	VII
RESUMEN	VIII
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACION	2
OBJETIVO.....	2
OBJETIVOS ESPECIFICOS	2
HIPOTESIS	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Antecedentes.....	3
Generalidades del cultivo de melilotos (<i>Melilotus indicus</i>)	3
Impacto e Importancia del cultivo	3
Clasificación botánica de <i>Melilotus indicus</i>	4
Descripción botánica	4
Planta.....	5
Raíz	5
Tallo	5
Hojas.....	5
Flores.....	5
Fruto o legumbre	5
Nitrógeno.....	6
Asociaciones.....	6
<i>Sinorhizobium en Melilotus</i>	6
Características del Género <i>Sinorhizobium spp.</i>	7
Beneficios importantes del <i>Sinorhizobium</i>	8
Diversidad de <i>Shinorhizobium</i>	8
Fijación biológica de nitrógeno	9
Simbiosis <i>Rhizobium-Sinorhizobium-</i> Leguminosa	10
Infección de <i>Rhizobium</i> y Leguminosa	10
MATERIALES Y METODOS	11
Ubicación del experimento.....	11

Obtención de plantas de alfalfillas (<i>Melilotus</i> sp.).....	12
Recuperación de nódulos	13
Aislamiento de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	15
composición del medio selectivo de aislamiento de rizobacterias simbióticas de nitrógeno (agar-manitol).....	15
purificación de la bacteria	16
identificación del aislamiento	17
Pruebas bioquímicas de identificación	18
Ensayo de inoculación en plantas de <i>Melilotus</i> sp.	18
Caracterización molecular del aislamiento de rizobacterias de plantas de meliloto o alfalfa.	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
Características morfológicas de <i>Melilotus indicus</i> (L.).....	20
Aislamiento de <i>sinorhizobium spp.</i> , de nódulos de <i>Melilotus spp.</i>	22
Caracterización bioquímica	25
Ensayos de nodulación en semillas de melilotos en invernadero.....	26
Caracterización molecular de <i>Sinorhizobium spp.</i>	27
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA	29

INDICE DE FIGURAS

Figura 2: Mapa del Estado de Coahuila.	12
Figura 1: Departamento de Parasitología.....	12
Figura 3, 4. ubicación de las plantas de alfalfa <i>Melilotus</i> sp.	13

Figura 5. Racimos de semilla de ramas de <i>Melilotus spp.</i>	13
Figura 6. Nodulacion de raíces de alfalfa recolectada (<i>Melilotus sp.</i>)	14
Figura 7. Separación y macerado nódulos para el aislamiento de <i>Sinorhizobium spp</i>	14
Figuras 8. Preparación de medio de cultivo agar manitol liquido.	16
Figura 10. Rizobacteria purificada por estría simple.	17
Figura 9. Siembra por estría del macerado de nódulos de alfalfa y crecimiento de colonias típicas del genero <i>Rhizobium spp</i> en cultivo agar manitol.....	17
Figura 12. Detección y producción de polisacáridos mediante la prueba KOH.....	18
Figura 11. tinción de gram del cultivo aislado de nódulos de <i>melilotus spp.</i>	17
Figura 13. Crecimiento de rizobacteria (<i>Sinorhizobium spp</i>) recuperadas de nódulos de plantas de alfalfa (meliloto).....	19
Figura 14. Características múltiples de plantas de <i>Melilotus</i>	21
Figura 15. Tipos de melilotos encontrados en el campo experimental de Buenavista, Saltillo, Coahuila.	22
Figura 16. Muestra de semillas colectadas en el campo el bajío de Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, de varios tipos de <i>Melilotus sp.</i>	22
Figura 17. Nódulos rojizos lobulados característicos de la bacteria <i>Sinorhizobium meliloti</i>	23
Figura 19. Crecimiento de uno de los aislamientos recuperados nódulo de alfalfa de la bacteria del género <i>Sinorhizobium spp</i>	24
fFigura 18. Bacteroides de <i>Sinorhizobium meliloti</i> obtenidos de nódulos y observados al microscopio compuesto.	24
Figura 20. Pruebas bioquímicas de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	26
Figura 21. Cultivo de plantas de <i>Melilotus spp.</i> , en invernadero	27

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1: Diversidad de <i>Shinorhizobium</i>	8
CUADRO 2: Características morfológicas coloniales de <i>Shinorhizobium meliloti</i> . 25	
CUADRO 3: Pruebas bioquímicas y de crecimiento.	25

RESUMEN

Las plantas leguminosas como alfalfa-alfafilla, trébol silvestre (*Melilotus*), tiene la capacidad de asociarse a bacterias del suelo del género *Sinorhizobium*. Asociaciones que comprenden a la mayoría de las 18,000 especies de leguminosas y que resulta en una simbiosis fijadora de nitrógeno de importancia ecológica. El

objetivo de este proyecto fue caracterizar y aislar cepas de *Sinorhizobium* spp., de plantas de *Melilotus* a partir de nódulos de las mismas plantas colectadas en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Se logró recuperar tres aislamientos de esta bacteria de igual número de plantas y nódulos en el medio de cultivo Agar manitol. Cada aislamiento fue propagado en el mismo medio de cultivo en caldo, el cual se usó para inocular semillas de plantas de *Melilotus* spp., recuperadas de campo y sembradas en suelo estéril. Después de 60 días de cultivo se pudo comprobar la nodulación de las plantas del meliloto con nódulos similares a los cuales fueron aislados estas bacterias. Uno de los aislamientos fue secuenciado molecularmente y mostro similitud en un 97 % con las cepas tipos de GenBank y fue caracterizado como *Sinorhizobium meliloti*. Bajo las condiciones de suelos alcalinos plantas inoculadas de *Melilotus* spp., fueron capaces de ser noduladas por *Sinorhizobium meliloti* y desarrollarse sin ser estas fertilizadas artificialmente.

Palabras clave: *Melilotus*, *Sinorhizobium*, características morfológicas y simbiosis.

INTRODUCCIÓN

Las plantas arvenses que también se conocen como maleza, de la familias de las fabáceas tienen una importancia relevante en los sistemas agrícolas por su capacidad para asociarse simbióticamente con bacterias fijadoras de nitrógeno que le proveen de mejor calidad de suelo, generar forrajes ricos en proteína, tal como el caso de las alfalfillas o melilotos de color u olor. En México existen tres tipos de melilotos, el más común o de mayor adaptación a diversos climas es la especie *Melilotus indicus*, que crecen principalmente en ambientes rústicos de clima templado y se desarrollan como maleza en diferentes hábitats del mundo y además crece en áreas moderadamente salinas, donde no se pueden cultivar leguminosas forrajeras tradicionales (Al- Sherif, 2009).

Esta especie de maleza se clasifican dentro de la familia de las fabáceas, crece de manera común en los campos y se puede observar su desarrollo en los cultivos como lino, trigo, alfalfa, fríjol, remolacha, calabaza, cebada, maíz, centeno, frutales, ajo, algodón, avena, cártamo, chícharo, cítricos, espárrago, frutales, garbanzo, manzana, nopal, pradera, sorgo, soya, tomate y en las uvas (Sherif, 2009). Se le considera peligrosa en los cereales, principalmente en el trigo, debido a la presencia de cumarina en casi todas las partes de la planta, lo que hace que su olor característico de la misma se transmita al cereal, a los granos de este y posteriormente a la harina. Se le considera por esto maleza y plaga en la agricultura. Sus semillas pueden encontrarse entre los cuerpos extraños de la alfalfa, lino y muchos otros cereales por lo que sus semillas no son aceptables en todos estos cereales de consumo directo.

JUSTIFICACION

La fijación biológica de nitrógeno puede sustituir a los fertilizantes químicos en la agricultura, así también como prevenir pérdidas de la fertilidad del suelo mejorando los costos de producción, y prevenir la contaminación del medio ambiente. Este proceso de simbiosis **Fabáceae** – Leguminosa - *Sinorhizobium* ofrecen la oportunidad de biorremediación, mejoramiento y fertilización de suelos sobreexplotados en zonas agrícolas y ganaderas. El aislamiento, recuperación de semillas de melilotos y sus bacterias simbióticas pudiera favorecer la posibilidad de mejorar la calidad de los suelos sobreexplotados o erosionados al cultivar en ellos esta planta e inocularla con bacterias simbióticas específicas fijadoras de nitrógeno del tipo *Sinorhizobium meliloti*.

OBJETIVO

Caracterizar un aislamiento de la bacteria simbiótica del tipo *Sinorhizobium meliloti* recuperada de nódulos de melilotos o alfalfillas como una fuente de mejoramiento y fertilización natural de suelos agrícolas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Aislar e identificar microscópica, morfológicamente y molecularmente un aislamiento *Sinorhizobium meliloti* de *Melilotus indicus*.

Comprobar la capacidad nodulante de *Sinorhizobium meliloti* en semillas de *Melilotus indicus*.

HIPOTESIS

El aislamiento de *Sinorhizobium meliloti* obtenido en el laboratorio de nódulos de *Melilotus indicus* será capaz de nodular a plantas de *Melilotus indicus* cultivadas naturalmente en suelo agrícola.

REVISIÓN DE LITERATURA

Antecedentes

El meliloto (*Melilotus indicus* L.) se reporta como de origen del Mediterráneo, norte de África, Macaronesia y Europa, durante la conquista se distribuyó y adaptó ampliamente en América, Australia, Asia y Europa. En México se registra como maleza en la mayoría de los estados y es considerada una planta exótica (Pichardo y Vibrans 2009). En la actualidad no existen semillas comerciales en el mercado ya que su adaptación fue de manera natural, esto al propagarse entre otros granos de cereales y leguminosas durante la comercialización de estos (CONABIO 2009).

Esta fabácea tiene propiedades medicinales, es un buen anticoagulante, laxante, emoliente, y se usa para crear cataplasmas, como astringente y narcótico.

Generalidades del cultivo de Melilotos (*Melilotus indicus*)

Dentro de la subfamilia de las fabáceas, *Melilotus* es peligroso entre los cereales. Es una planta anual, crece principalmente en ambientes silvestres de climas templados. Es originario del mediterráneo y se le conoce con diferentes nombres: trébol oloroso, coronilla real, carretón oloroso, trébol dulce amarillo, anual, coronilla angosta de rey, meliloto oloroso, trébol menor, alfalfilla o meliloto de flor pequeña (Pérez, M., 2013). El meliloto es buena planta forrajera, abono verde, también es una buena opción para el mejoramiento y nitrogenación de suelos ya que este tiene la capacidad de realizar asociaciones simbióticas de manera natural (Arcoya, E., 2021).

Impacto e Importancia del cultivo

Melilotus spp. Esta registrada como maleza, no es deseable encontrarla entre semillas comestibles de los cereales por la presencia de cumarina en casi todas sus partes, hace que el olor característico de la misma se transmita a los cereales, a los granos de este y posteriormente a la harina ya que por esta razón ha sido declarado plaga agrícola en Argentina (Villaseñor y Espinosa, 1998).

Nair *et al.*, (2010) menciona que el contenido de cumarina es variable entre diferentes especies de *Melilotus*, también entre variedades, ecotipos e individuos de la misma especie. Su contenido también varía a lo largo del crecimiento de la planta, siendo máximo en hojas nuevas y yemas o como respuesta a factores de estrés bióticos (plagas y enfermedades) o abióticos (salinidad, alcalinidad, deficiencias nutricionales en el suelo, etc.) Otro factor importante que permite la elección de este forraje, es la capacidad que tiene para fijar nitrógeno atmosférico simbióticamente, permitiendo disminuir los costos de producción en cuanto a las labores de fertilización, además de mejorar las propiedades químicas del suelo (Flores, 2015).

Clasificación botánica de *Melilotus indicus*.

Reino: Plantae.

Subreino: Traqueobionta

División: Magnoliophyta.

Superdivisión: Spermatophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae.

Género: *Melilotus*.

Especie: *Melilotus indicus*, L.

Descripción botánica

Mondragón *et al.*, (2002) describieron al género *Melilotus* tal y como sigue:

Planta

Anual, arvense, erecta, con ramas que proceden del tallo principal, las que dependen de las condiciones ambientales, siendo de gran importancia la densidad poblacional, pues también inciden en la altura y dureza del tallo; cuenta con hojas trifoliadas, tiene un tallo ramificado, es una buena planta forrajera, útil como abono verde y apta para la praderizar de terrenos alcalinos.

Raíz

Su raíz principal es pivotante, robusta, larga y profunda, con numerosas raíces secundarias, que le permiten captar los minerales alejados de la superficie.

Tallo

Piloso, son delgados y erectos, soportan muy bien el peso de las hojas y de las inflorescencias, y son muy estables, lo que hace que la planta sea muy propicia para la siembra.

Hojas

La primera hoja se origina a partir de los cotiledones, es opuesto y de forma orbicular. Las hojas definitivas trifoliales lanceolados, a veces casi lineares de 1 -2 cm de largo y de 3 - 5 mm de ancho. El tamaño puede variar de acuerdo a las condiciones ambientales.

Flores

Florece en primavera, las flores son pequeñas con corola amarilla reunidas en racimos terminales o axilares de las hojas de 3 a 5 cm de largo.

Fruto o legumbre

El fruto es una legumbre, apiculada con una sola semilla (monospermo) pequeña y redonda con estrías.

Nitrógeno

Contribuye al proceso de la nutrición biológica de las plantas de manera simbiótica al asociarse con rizobacterias, tolerando un buen aprovechamiento de nitrógeno atmosférico con un sistema extenso, y promoviendo una mayor solubilidad y conductividad de nutrientes (Yañez, 2017).

La fijación biológica de nitrógeno es la conversión enzimática de nitrógeno gaseoso a amonio; es una característica de procariontes y se encuentra distribuida en muchos géneros de bacterias (Young, 1992). Existen bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre a si como bacterias del suelo que se asocian a plantas como lo es el grupo de las especies del género *Sinorhizobium* y otros que se relacionan y asocian a leguminosas (Martínez y Hernández, 1999).

Asociaciones

En campo abierto la asociación de bacterias benéficas fijadoras de nitrógeno y plantas, sobresale la relación simbiótica rizobio-leguminosa integrado por *Sinorhizobium meliloti* y *Medicago sativa* (alfalfa), como un modelo de referencia para la investigación de interacciones que permita conocer con precisión los fenómenos moleculares a través de los cuales se desarrolla la simbiosis entre rizobios – leguminosas, y como estos se encuentran regulados, permite sentar las bases racionales para abordar la manipulación y el mejoramiento de las simbiosis con propósitos prácticos en el marco agroeconómico (Lagares, 2015).

Sinorhizobium es una bacteria cuyo hábitat se encuentra en el suelo, es capaz de colonizar las raíces de leguminosas y fija el nitrógeno atmosférico mediante en simbiosis (Amarelle *et al.*, 2010).

Sinorhizobium* en *Melilotus

Las especies del género *Shinorhizobium* se caracterizan por formar nódulos en las raíces o tallos de las leguminosas y se establecen dentro de estas en sus raíces, donde proliferan, se diferencian y fijan nitrógeno. Existen especificidad en esta

relación dado que una especie de leguminosas establece simbiosis con específico número de especies del género *Sinorhizobium* (Yañes, 2017). Hoy en día se describen ocasionalmente nuevas plantas de leguminosas y un mayor número de especies de esta bacteria fijadora simbiótica de nitrógenos (Yañes, 2017).

El nitrógeno como fertilizante químico inhibe formación de los nódulos y la fijación de nitrógeno atmosférico cuando este se incorpora a plantas ya noduladas. El proceso de la fijación de nitrógeno es muy costoso energéticamente y este a su vez facilita o permite pérdida o inhibición de la expresión de los genes (Martínez *et al.*, 1999). El proceso de asimilación es el cambio enzimático de nitrógeno a amonio, es una característica principal de procariontes y se encuentra distribuido en diferentes géneros de bacterias (Young, 1992).

Existen bacterias del suelo que se asocian a plantas, en particular las rizobacterias de los géneros *Rhizobium* - *Sinorhizobium* y otros relacionados que se asocian a leguminosas (Martínez y Hernández, 1999).

En la actualidad existen muchos estudios de bacterias que nodulan (García *et al.*, 2010). Ormeño *et al.*, (2006), menciona que las bacterias que nodulan *Melilotus indicus* de un modo eficiente se incluyen dentro de la familia Rhizobiaceae siendo uno de los géneros *Sinorhizobium* y *Rhizobium*.

Características del Género *Sinorhizobium* spp.

Es un bacilo Gram negativo no esporulado, heterótrofo y aerobio, *S.melloti* es capaz de prosperar tanto en un medio complejo y competitivo como en la rizosfera, así como intracelularmente una vez establecida la simbiosis. Posee una gran versatilidad como microorganismo lo cual se refleja a nivel genoma (complejo y de gran tamaño) que le confiere una gran capacidad metabólica con ventajas para colonizar distintos nichos que coloniza (Amarelle, 2016).

Los bacilos de *Sinorhizobium* miden entre 0.5-1.0 x 1.2-3.0 μm , poseen plásmidos grandes o megaplásmidos que son comunes en estas especies y en algunos casos

los genes simbióticos están localizados en ellos. La especie tipo, *S. meliloti* fue transferida del género *Rhizobium* (Graham, 1994) al género *Sinorhizobium*.

Beneficios importantes del *Sinorhizobium* (Yañes, 2017)

- Disminución de costos de la producción
- Aumento de producción agrícola
- Disminución de costos en la aplicación de fungicidas y protección al agricultor
- Contribuye a la reparación de los suelos pobres.

Diversidad de *Sinorhizobium*

Van Berkum y Eardly (1998) publica las relaciones filogenéticas con enfoque molecular de estas bacterias. A continuación, se hace un listado de especies y géneros de *Sinorhizobium*.

Cuadro 1. Diversidad de *Sinorhizobium*.

Género	Especie	Huésped
<i>Allorhizobium</i> , <i>Azorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> ,	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max (soya)</i>
	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>
<i>Mesorhizobium</i> ,	<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i>
	<i>M. amorphae</i> ,	<i>Amorpha fruticosa</i>
	<i>M. ciceri</i> ,	<i>Cicer arietinum (garbanzo)</i>
	<i>M. huakuui</i> ,	<i>Astragalus</i>
	<i>M. mediterraneum</i> ,	<i>Cicer mediterranium</i>
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Leucaena</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>M. tianshanense</i> .	<i>Glycyrrhiza, Sophora, Glycine y otras.</i>
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris(frijol)</i>
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i>
	<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. giardini</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. hainanense</i>	<i>Stylosantes, centrosema, desmodium</i>
		<i>Sesbania herbacea</i>
	<i>R. hautiense</i>	<i>Vicia(chicharo) trifolium (trébol)</i>
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Medicago ruthenica, phaseolus vulgaris.</i>	

	<i>R. mongolense</i>	Phaseolus vulgaris, Leucaena.
	<i>R. tropici</i>	Neptunia natans.
	<i>R. undicola</i>	
<i>Sinorhizobium.</i>	<i>S. arboris,</i>	<i>Acacia Senegal, prosopis chilensis.</i>
	<i>S. fredii,</i>	<i>Glycine max.</i>
	<i>S. kostiense,</i>	<i>Acacia Senegal, prosopis chilensis.</i>
	<i>S. medicae,</i>	<i>Medicago spp.</i>
	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa (alfalfa)</i>
	<i>S. saheli,</i>	<i>Sesbania</i>
	<i>S. terangae</i>	<i>Sesbania, acasia</i>
	<i>S. xinjiangense.</i>	<i>Glicine max</i>

La fijación simbiótica de nitrógeno aporta anualmente unos 90 millones de toneladas de nitrógeno fijo para cultivos de leguminosas como la soja, el trébol rojo y los guisantes. *S meliloti* es una bacteria simbiótica fijadora de nitrógeno de la familia Rhizobiacea que de forma común se asocia con cultivos como la alfalfa (Biondi, 2009).

Fijación biológica de nitrógeno

Uno de los elementos químicos esenciales para todos los organismos vivos es el nitrógeno, forma parte de los ácidos nucleicos, proteínas y por ello es esencial en la estructura y metabolismo celular (Paer, 1998). Las plantas toman el nitrógeno directamente del suelo en forma de nitratos o amonio, algo que los animales no pueden hacer, pues necesitan ingerirlo o absorberlo como un compuesto orgánico. Solo ciertos procariontes pueden absorber el nitrógeno directamente desde la atmosfera, vía fijación de nitrógeno convertido en nitrógeno molecular en nitrógeno asimilable por otros seres vivos. El nitrógeno es un elemento muy abundante en la atmosfera, la conversión de este es una de las vías más importantes para el mantenimiento del ciclo del nitrógeno del cual forma parte las bacterias fijadoras de nitrógeno, junto a otros grupos de bacterias que llevan a cabo procesos intermedios de transformación de compuestos nitrogenados y de desnitrificación, que permite nueva y finalmente el nitrógeno a la atmosfera (Paerl, 1998).

La enzima responsable de fijación de nitrógeno se denomina nitrogenasas que es una metaloproteína compuesta con Fe (ferroproteína o nitrogenasa reductasa) y otra con Fe y Mo (ferromolibdoproteína o nitrogenasa) propiamente dicha como grupos activos (García, 2011).

Simbiosis *Rhizobium-Sinorhizobium*- Leguminosa

La asociación mutualista de *Rhizobium-Sinorhizobium* y leguminosa ha sido de las más estudiadas debido a su gran importancia agrícola, económica, y social que tiene estas plantas a escala mundial. Ambas bacterias tienen la capacidad de crecer independientemente, así también como los dos se benefician mutuamente de la asociación que caracteriza por la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en mayoría de las fabáceas-leguminosas se forman en la raíz (Gibson, 2008).

La interacción bacteriana y la planta se inicia con la señalización o síntesis en las raíces y exudación de flavonoides que son señales químicas de reconocimiento entre ambos organismos (Spaink *et al.*, 1998). Los compuestos de manera fenólica que inician la expresión de las bacterias de los genes para nodular, lo que le permite la síntesis y secreción de lipopolisacáridos llamadas factores nodulación (Geurts *et al.*, 2005; Lerouge *et al.*, 1990; Spaink *et al.*, 1998) que por la raíz se promueven a la planta, diversos cambios morfológicos celulares dependiendo del tipo de leguminosa (Bauer y Mathesius, 2004).

Infección de *Rhizobium* y leguminosa.

Rhizobium una vez que invade las células de las raíces de la planta de leguminosa, proliferan y se diferencian como bacteroides, responsables de la fijación de nitrógeno en el interior de la célula, estos bacteroides están rodeados por una membrana peribacteroidea de origen vegetal y constituyen un nuevo orgánulo denominado simbiosoma. La planta aporta carbohidratos o hidratos de carbono para el metabolismo del bacteroide a través del floema y, por su parte el bacteroide aporta amonio en forma de diferentes aminoácidos a la planta (Lodwing y Poole, 2003). Para que tenga lugar la reducción de N₂, el ambiente del simbiosoma debe

ser microaerofílico, puesto que la nitrogenasa es muy sensible a la oxidación por O₂ (Zehr *et al.*, 1993). La protección de la nitrogenasa frente al oxígeno se lleva a cabo la leghemoglobina, una proteína monomérica cuya función es combinarse con gran afinidad con el oxígeno, transportándolo hasta la membrana de los simbiosomas, manteniendo en su interior una concentración de O₂ libre de tan solo 10-50 nM. Por eso, los nódulos efectivos presentan una coloración rojiza debido a la presencia de leghemoglobina.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del Experimento

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología y en el campo experimental (invernadero) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).



Figura 1: Depto. Parasitología

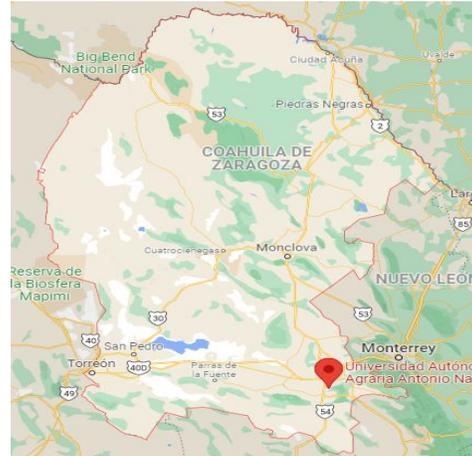


Figura 2: Mapa del estado de Coahuila.

Obtención

de plantas de alfalfillas (*Melilotus* sp.)

Se localizaron plantas de alfalfilla dentro de un área de cultivo de ajo y en el campo experimental el bajo de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Buenavista, municipio de Saltillo, del estado de Coahuila.

De manera aleatoria se sacaron dichas plantas, con todo y suelo, partir de ellas se buscó la presencia de nódulos en las raíces de esta Fabaceae buscando nódulos rojizos a rosáceos que indican la presencia de rizobacterias bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno (Aguilar *et. Al* 2004), tal y como podemos observar en la (Figura 3, 4). Estas plantas se caracterizan por tener varios tallos erectos, con hojas trifoliales de tipo lanceolados muy parecidos a las hojas del meliloto o de la alfalfa.



Figura 3, 4. Ubicación de las plantas de alfalfa *Melilotus* sp., en el campo el bajo y en cultivo de ajo.

También se recuperó manualmente semillas de la misma planta del meliloto, una vez que la planta completo su ciclo y ya secas se colecto los granos dispuestos en ramas con racimos de semillas tal y como se observa en la siguiente figura.



Figura 5. Racimos de semilla de ramas de *Melilotus* spp.

Recuperación de Nódulos

Se separaron los nódulos rojizos de las plantas recuperadas de alfalfillas (melilotos) de sus raíces secundarias, de los cuales se obtuvieron nódulos más grandes y

vigorrosos (Figura 6), que se presentaron en forma ovalada, coloración rosada - rojizo, que se colocaron en tubos de plástico donde se le realizó un lavado de asepsia con agua normal-purificada para quitar el exceso de tierra, enseguida se desinfectó (4 veces) con agua purificada con cloro al 3%, por último se lava con agua estéril (3 veces) (Figura 7 a), posteriormente se hace un macerado con la ayuda de una varilla de vidrio hasta obtener una suspensión líquida derivado de los nódulos tal y como se muestra en la (Figura 7 b).



Figura 6. Nodulación de raíces de alfalfa recolectada (*Melilotus* sp.)



Figura 7. Separación y macerado nódulos para el aislamiento de *Sinorhizobium* spp. **a)** Nodulo lavado y desinfectado. **b)** Macerado de nódulos

Aislamiento de *Sinorhizobium meliloti*

Con el líquido obtenido del macerado de nódulos y con la ayuda de una asa bacteriológica se sembró por estrías una muestra del macerado a placas Petri conteniendo medio sólido de Agar-Manitol, se incubaron a 28°C por 2 días hasta observar el crecimiento y cambio de coloración con puntos rojos en las colonias típicas del género. (Figura 9).

Composición del medio selectivo de aislamiento de rizobacterias simbióticas de nitrógeno (Agar-Manitol)

El medio de cultivo agar manitol contiene los siguientes nutrientes en las concentraciones por cada 1000 mililitros de agua destilada.

- 0.5 gr de K_2HPO_4
- 0.2 gr de $MgSO_4$
- 0.1 gr de NaCl
- 10.0 gr de manitol
- 1.0 gr de extracto de levadura
- 15 gr de Agar
- Rojo Congo
- pH 7.0 \pm 2

El medio de cultivo se preparó en matraces Erlen Meyer para su esterilización a una temperatura de 120°C 15 lb de presión a vapor por 15 minutos, para después vaciarlo en placas de Petri estériles desechables, como se puede observar en las siguientes figuras.



Figuras 8. a) Preparación de medio de cultivo agar- manitol para *Shinorhizobium* sp.
b) Esterilización, **c)** Vaciado de medio de cultivo en cajas petri.

Purificación de la bacteria

Del macerado obtenido de los nódulos se procedió a realizar la siembra por estría en placas con el medio de cultivo Agar Manitol con Extracto de levadura-Rojo Congo (Yañes, 2017). Se procedió a realizar la purificación de la bacteria en condiciones asépticas para evitar la contaminación, y ya sembradas se incubaron a una temperatura de 28°C por 2 a 3 días. De una colonia aislada (Figura 9). Característica del género se resembró por estría la rizobacteria hasta purificarla en el mismo medio de cultivo (Figura 10).

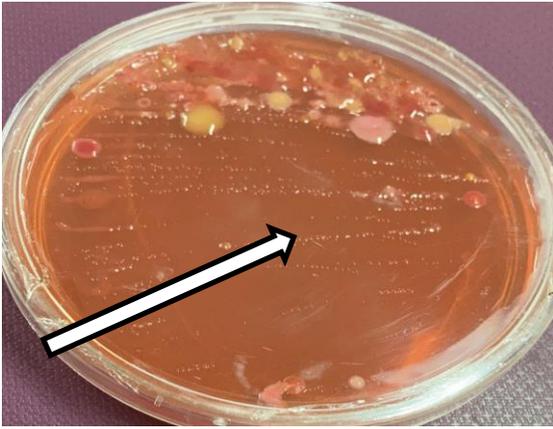


Figura 9. Siembra por estría del macerado de nódulos de alfalfa y crecimiento de colonias típicas del genero *Rhizobium* spp en cultivo agar manitol.

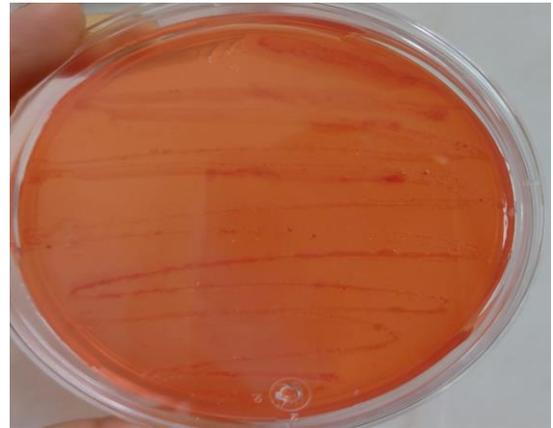


Figura 10. Rizobacteria purificada por estría simple.

Identificación del aislamiento

El aislamiento bacteriano fue caracterizado morfológicamente a través de observaciones in vivo al microscopio compuesto y también a través de pruebas de tinción como la tinción de Gram (Figura 11) para observar su forma, además de la presencia de flagelos y capsula. La bacteria aislada presento una tinción característica rojiza que indica su tipo de Gram (-).

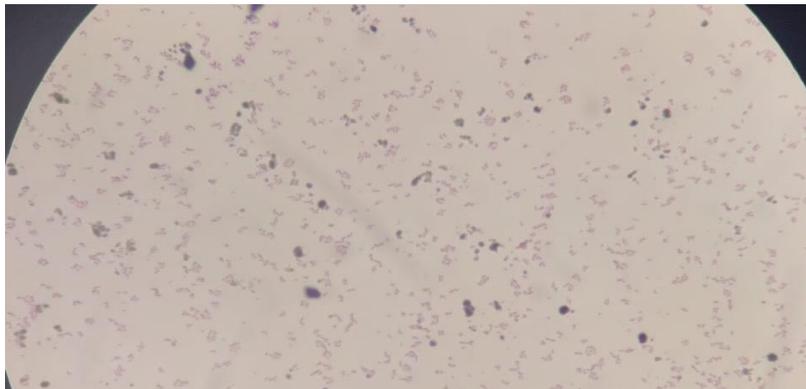


Figura 11. Tinción de Gram del cultivo aislado de nódulos de *Melilotus* spp.

Pruebas bioquímicas de identificación

Se realizaron las siguientes pruebas: presencia de flagelos, producción de polisacárido (KOH), crecimiento en cloruro de sodio y temperatura de desarrollo.

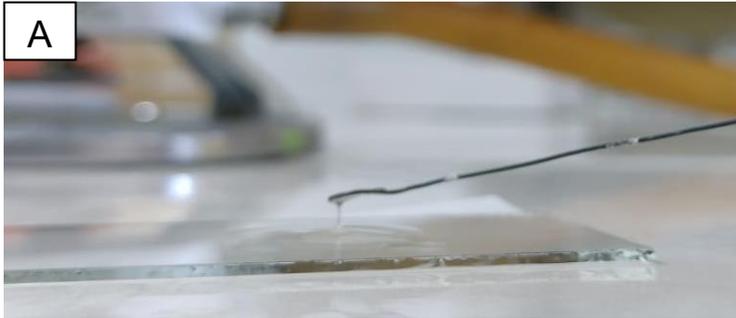


Figura 12. a) Detección y producción de polisacáridos mediante la prueba KOH.

Ensayo de inoculación en plantas de *Melilotus sp.*

Semillas recolectadas de plantas de meliloto fueron beneficiadas o inoculadas con la rizobacteria obtenida de nódulos de la misma planta, que fue cultivada en el medio líquido de caldo manitol con extracto de levadura, las semillas fueron inoculadas directamente con el caldo de cultivo directo y propagado durante 72h hasta obtener un crecimiento viscoso tal y como se observa en la figura. 13. Las semillas inoculadas en maceta fueron finalmente cubiertas con suelo estéril hasta su germinación, crecimiento y floración procurando mantener húmedo las macetas inoculadas hasta su floración, tiempo en el cual se sacaron las plantas del meliloto con todo y raíz para comprobar la nodulación por la bacteria.



Figura 13. Crecimiento de rizobacteria (*Sinorhizobium* spp) recuperadas de nódulos de plantas de alfalfa (meliloto) en medio líquido caldo manitol.

Caracterización molecular del aislamiento de rizobacterias de plantas de Meliloto o alfalfa.

Uno de los aislados purificado e identificado morfológicamente como posiblemente *Rhizobium meliloti.*, fue enviada para su caracterización molecular al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) para que mediante pruebas de PCR y secuenciación de genes de las regiones interespecíficas (ITS) del DNA genómico y a través del método de didesoxinucleótidos marcados en los secuenciadores 3500 y 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), poder caracterizar molecularmente este aislamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características morfológicas de *Melilotus indicus* (L.)

Las plantas presentaron características típicas del género *Melilotus* (CONABIO, 2009) cuyas características son las siguientes; hojas lanceoladas casi lineares, tallos de 5 a más ramificaciones horizontales y verticales con estipulas lanceoladas, se encontrando 2 tipos de plantas algunas con altura media de 59 cm, mientras que otras alcanzaron los 98 cm aproximadamente como se puede observar en la siguiente figura 14. Estas características ubican a la planta dentro del género *Melilotus sp.*

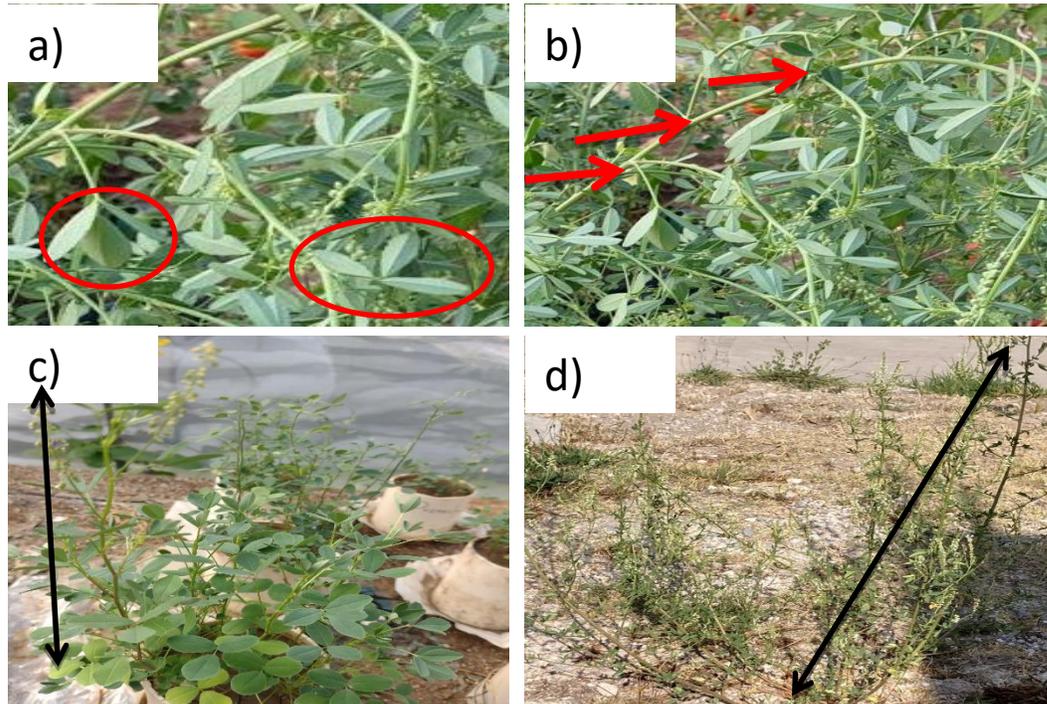


Figura 14. Características morfológicas de Plantas de *Melilotus*. **a)** Hojas lanceoladas casi lineales, **b)** Tallo ramificado, **c)** *Melilotus* spp., de porte bajo (59 cm), **d)** *Melilotus* spp., porte alto (98cm).

Los nódulos de las plantas de alfalfa colectados son probablemente de una mezcla de al menos de dos especies dado que la floración que se presentaron fueron flores amarillas pequeñas de 1-3 mm de largo y otras de floración blanca de 4 - 5 mm de largo, como se muestra en la imagen de la figura 15. El racimo es corto, compacto y con pedúnculo corto igual de largo que la hoja portante al inicio, pero más largo al final de la floración, las vainas son muy pequeñas y de forma esférica al igual que las semillas (Figura 16). Esta descripción coincide con la de Mondragón (2002).



Figura 15. Tipos de Melilotos encontrados en el campo experimental de Buenavista, Saltillo, Coahuila. Nótese las diferencias de color de las flores de *Melilotus* sp. **a)** Flor amarilla (*Melilotus indicus*) y **b)** Flor amarilla (*Melilotus albus*).



semillas colectadas en el campo El Bajío de Coahuila, México, de varios tipos de *Melilotus* sp.

Aislamiento de *Sinorhizobium* spp., de nódulos de *Melilotus* spp.

A partir de un nódulo rosáceo o rojizo individual por planta tal y como se muestra en la figura 17 recuperadas de plantas de alfalfilla o melilotos se lograron tres aislamientos muy similares de colonias translucidas de rizobacterias características del género *Rhizobium*.



Figura 17. Nódulos rojizos lobulados característicos de la bacteria *Sinorhizobium meliloti*.

Al macerar cada nódulo se logró observar al microscopio compuesto tal y como se muestra en la figura 18, las bacteroides existentes dentro de las células radiculares y característicos de esta bacteria, los que no muestran una forma definida por carecer de pared celular por lo que son amorfos tal como lo mencionan Aguilar *et al*, (2004) y Lodwing y Poole, (2003).

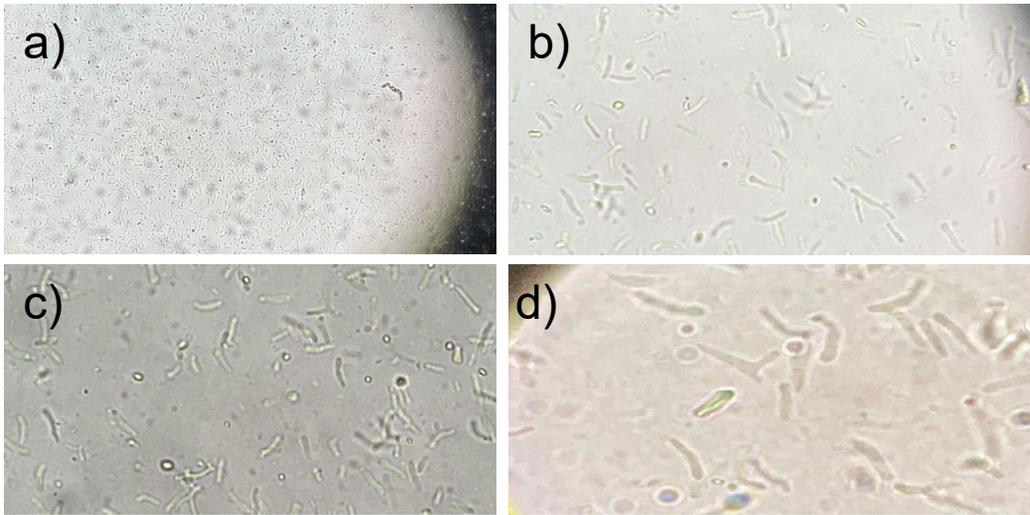


Figura 18. Bacteroides de *Sinorhizobium meliloti* obtenidos de nódulos y observados al microscopio compuesto: **a)** 4X, **b)** 10X, **c)** 40X, **d)** 100X.

Las colonias observadas después del desarrollo de esta bacteria en agar manitol tal y como se observa en la (Figura 19), poseen la característica mucoide del crecimiento típico de bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. La placa muestra el aislamiento recuperado de melilotos después de 2 a 4 días de incubación en el medio de Agar manitol. El crecimiento que se observa es típico reportado para este género, según Yañes, (2017).



Figura 19. Crecimiento de uno de los aislamientos recuperados nódulo de alfalfa de la bacteria del género *Shinorhizobium* spp.

La forma de las colonias fue uniforme, presentó una elevación con bordes lisos y tamaño grande en los tres aislamientos, por lo que se consideró que posiblemente la misma cepa puesto que fueron recuperadas de plantas de melilotos o alfalfillas de la misma área y cultivo.

Cuadro 2: Características morfológicas coloniales de *Shinorhizobium M.*

Cepa	Forma	Borde	Elevación	Aspecto	Luz	Consistencia
1	Circular	Entero	Convexa	Mucoide	Transparente	Suave
2	Circular	Entero	Convexa	Mucoide	Transparente	Suave
3	Circular	Entero	Convexa	Mucoide	Transparente	Suave

Caracterización bioquímica

Las pruebas bioquímicas son utilizadas principalmente para diferenciar el género de estas bacterias donde se destacan tinción negativa de Gram, la producción de indol, presencia de flagelo, KOH y crecimiento a pH ácido que se muestra en la figura 20 y en el siguiente cuadro 3(Kuykenday *et al.*, 2005)

Cuadro 3: Pruebas Bioquímicas y de crecimiento.

PRUEBA	CEPAS		
	1	2	3
Crecimiento en NaCl 2%	+	+	+
Crecimiento en NaCl 3%	+	+	+
Crecimiento en NaCl 5%	±	±	±
Presencia de flagelos	+	+	+
Tinción de Gram	-	-	-
Producción indol	+	+	+
Crecimiento a pH ácidos	+	+	+

KOH	+	+	+
-----	---	---	---

(+)Prueba positiva (-) prueba negativa

El comportamiento que manifestaron los tres aislamientos en el crecimiento fue de manera uniforme en medios conteniendo NaCl al 2, 3 y 5% que diferencia la capacidad de este género para identificarse como *Sinorhizobium* y crecer en medios salinos así también como crecer en un alto rango de pH ácido y alcalinos igualmente en medios con levadura donde crecen abundantemente, estos resultados concuerdan con la descripción de Kuykendall *et al.*, (2005) quienes identifican aislamientos de obtenidos de raíces de alfalfa como *Ensifer meliloti* B399.

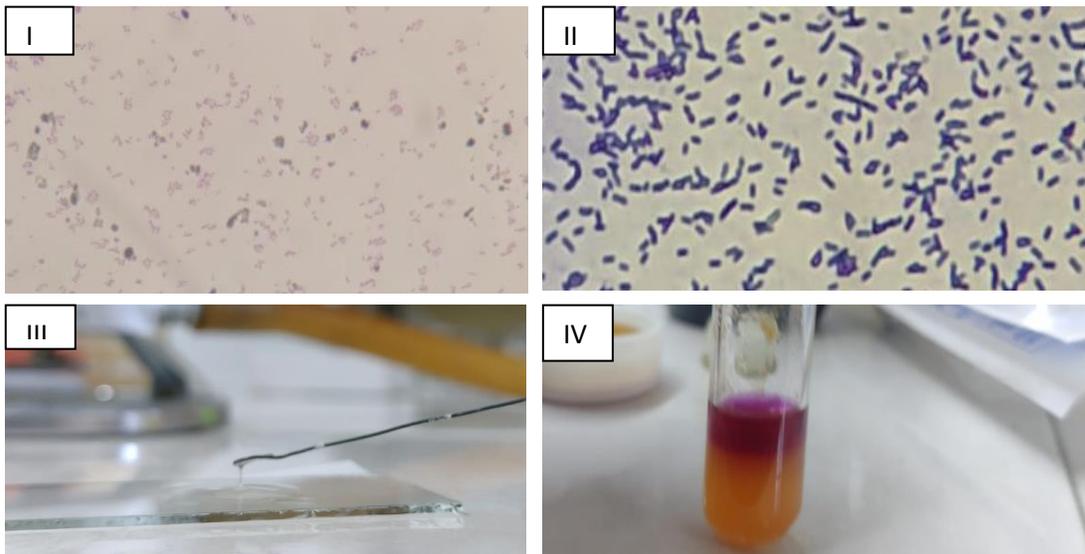


Figura 20. Pruebas bioquímicas de *Sinorhizobium meliloti*. **I)** Tinción de Gram, **II)** Flagelos, **III)** Producción de polisacáridos, **IV)** Producción de indol.

Ensayos de nodulación en semillas de melilotos en invernadero

Del ensayo realizado en invernadero al sembrar e inocular semilla de meliloto se logró observar que la cepa utilizada produjo nódulos indeterminados de forma cilíndrica y ramificada (Figura 21) que son característicos de los nódulos simbióticos de alfalfa o de alfalfilla característicos del género *Rhizobium meliloti* o de *Sinorhizobium meliloti* (Amarelle, V. 2016).

De las plantas de alfalfillas recuperadas para determinar la capacidad de nodulación y la fijación de nitrógeno, se encontró que en todas ellas existió nodulación como se muestra en la siguiente figura 21. Lo que confirma que los aislados recuperados inicialmente en Agar Manitol, y propagado posteriormente e inoculados en semillas de la planta de meliloto, son la misma bacteria fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti*.

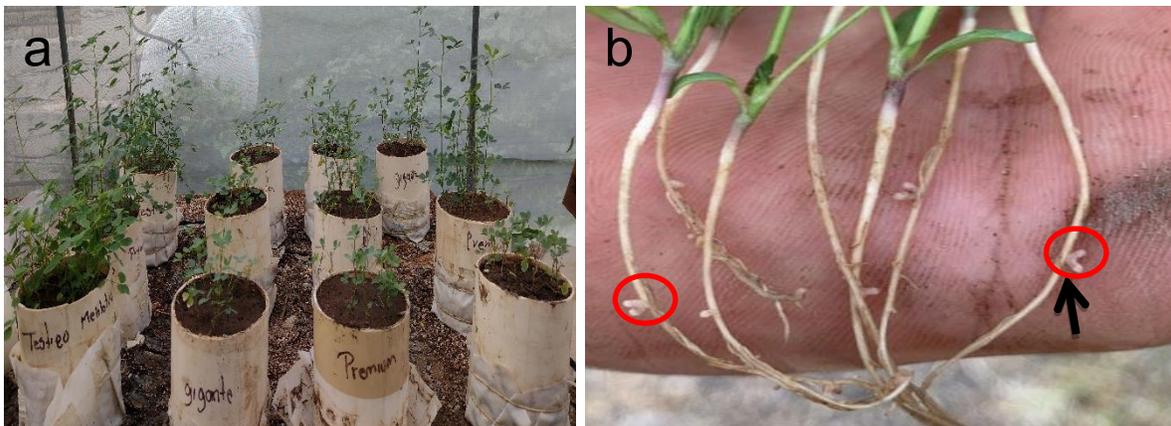


Figura 21. Cultivo de plantas de *Melilotus* spp., en invernadero. a) Macetas inoculados con rizobacterias aisladas de la misma planta, b) Raíces de plantas de meliloto con presencia de nódulos rosáceos lobulados de *Sinorhizobium meliloti*.

Caracterización molecular de *Sinorhizobium* spp.

El resultado del análisis de la secuenciación blast de la regiones interespecíficas genómicas (ITS) de ADN genómico del aislado obtenido y comparando con las secuencias reportadas en el banco de genes (GenBank/NCBI) arrojó que esta cepa es *Shinorhizobium meliloti* con 97.26 % de identidad con la cepa tipo de esta especie y con clave de acceso MT197373.1. Diferentes autores reportan a este aislado bacteriano como microorganismos que se asocia de manera simbiótica con leguminosa y con gran capacidad de fijar nitrógeno y formar nódulos en raíces de estas plantas aun en suelos sumamente alcalinos (Farhan *et al* 2019; Yañes, 2017).

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones que se realizó esta investigación podemos concluir:

Se caracterizó morfológicamente plantas de maleza de alfalfa del campo experimental región el bajío de Buenavista, Saltillo Coahuila, México al nivel del género *Melilotus* sp., siendo factible que al menos existan dos especies *Melilotus indicus* y *Melilotus albus*.

Se recuperaron tres aislamientos de la bacteria fijadora de nitrógeno a partir de nódulos de raíz de plantas de *Melilotus* sp., una de ellas fue identificadas morfológicamente y molecularmente como *Shinorhizobium meliloti*.

Sinorhizobium meliloti induce la formación de nódulos rosáceos en plantas de semilla de *Melilotus* spp., sembradas en macetas de invernadero e inoculados con cultivos de laboratorio de esta rizobacteria.

BIBLIOGRAFÍA

Allan D., Graham, P. (2002). Soil biology and Fertility symbiotic Nitrogen Fixation. *Other N 2-Fixing simbiosis.* 8(24):1-20. <http://www.soils.agri.umn.edu/academics/classes/soil3612/SymbioticNitrogenFixation/Other.htm>

Arcoya, E. (2012) Generalidades de *Melilotus indicus* herbario nacional de México, UNAM. <https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:656408>.

Anguiano-Cabello, J., Flores-Olivas, A., Ochoa-Fuentes, Y., Arredondo-Valdez, R. Y Olalde-Portugal, V. (2017). Detección rápida de auxinas mediante técnica de microplaca, *American Journal of Plant Sciences.* 8, 171-177. <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=73646>

Amarelle, V. (2016). Elucidación de los sistemas de imolicados en la captación y utilización de hemina como fuente de hierro nutricional en *Sinorhizobium meliloti*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/8853/1/uy2418174>.

Booguer, F., & van Rossum, D. (1997). Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium* a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 5-7.

Bécquer, C., J. (2002). La simbiosis leguminosa-*rizobio*: características generales e importancia productiva. *Pastos y Forrajes.* 25 (2), 63.

Cobas, G. (1964). Leguminosas para la región semiárida pampeana. Hoja informativa, Estación Experimental Agropecuaria de Anguil, Argentina, 64: 5-12. <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-publi64.pdf>.

Covas, G. 1965. Asociación de pasto lloron con trébol de olor. EEA Anguil. Argentina. CREA. 56: 3-6.

https://repositorio.inta.gov.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/6099/INTA_CR_LaPampaSanLuis_EEAAnguil_Kent_F_Tr%C3%A9boles_de_olor.pdf?sequence=1&isAllowed

Caballero, M. J., & E. Martínez-Romero. (1999). Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis*, 26: 111-121.

De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K., y Gillis, M. (1994). Polyphasic taxonomy of Rhizobia. Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. *Shinorhizobium saheli* sp. Nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. Nov. *Int. J Syst. Bacteriol*; 44,715-733.

Emad, A. AlSherif. (2009). A salt-tolerant wild leguminous herb, *Flora Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. Issue 737746, ISSN 0367-2530, <https://doi.org/10.1016/j.flora.2008.10.004>

Espinosa, F., J. y Sarukhán., J. (1997). *Manual de Malezas del Valle de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F.43:407. <https://doi.org/10.21829/abm43.1998.1126>

Ferguson, B., J. y Mathesius, U. (2003). Señalar interacciones durante el desarrollo de nódulos. *Revista de Regulación del Crecimiento de las Plantas*. 22:47-72. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-003-0032-9#citeas>

Flórez, D., D., F. (2015). La alfalfa (*Medicago sativa*): origen, manejo y producción. *Conexión Agropecuaria JDC*, 5(1): 27-43.

<https://jdc.edu.co/revistas/index.php/conexagro/article/view/520>

Fontana, L., M. C. (2014). Efecto de la utilización de leguminosas anuales como abono verde sobre las condiciones del suelo y la productividad de cultivos subsiguientes. *Escuela para Graduados Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Córdoba*. 72.

García, C., S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Universidad de Salamanca, España. 3:173-186.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3761553>

García, C., Alexander, G., González, G., Macarena, Ganzoni, F., Susana. 2010. Tesis posgrado. Tolerancia a estrés hídrico y promoción del crecimiento en alfalfa (*Medicago sativa*) inoculada con bacterias de la rizósfera. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Dirección de Postgrado, Chillán, Chile. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/3363>

Geurts, R., Fedorova, E. y Bisseling, T. (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. Biol; 8: 346-352.

Guerrero-Rodríguez, J. de D. (2018). Leguminosas forrajeras. Opciones para la producción de rumiantes en el Estado de Puebla. Agro Productividad, 2(3). <http://www.revistaagroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/603>

Lagares, A. (2015). La simbiosis fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti* - alfalfa (*Medicago sativa*) caracterización del rol biológico del ARN pequeño sm8 en la vida libre y simbiótica de los rizobios. Ciencias Exactas. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/66185>.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J. C. y Denarie, J. (1990). Symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature 344:781-784.

López, C., Odorizzi, A., Basigalup, D., Arolfo, D., Martínez, M., J. (2016). El trébol de color blanco y su uso en la provincia de México, INTA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, INTA. ISBN. 716:17-20.

https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_el_trebol_de_olor_blanco_y_su_uso_en_la_provincia_de_cordoba.pdf

Mondragón *et al.* (2002). *Melilotus indicus* (L.) All., Una hierba leguminosa silvestre tolerante a la sal con alto potencial para su uso como cultivo forrajero en suelos afectados por sal, Universidad Beni Suef, Facultad de Ciencias, Departamento de Botánica. La Habana Cuba, Rev. Cub. C. Agrí. 37: 217-226.

Muñoz., M, J. F.; Sarmiento S., D. G. (2010). Tesis pre-grado. Valoración comparativa de dos métodos de secado de plantas medicinales a través de la cuantificación de flavonoides y cumarinas, Universidad de Cuenca, Ecuador.

Murillo Carpio, J.M., Chaves Sánchez, M., Troncoso de Arce, A., Barroso Paz, M. y Hernández Reina, J.M. 1981. La marisma del Guadalquivir como zona natural de pastoreo. II. Vegetación espontánea. Pastagens e Forragens, 2 (2), 29-37.

<https://idus.us.es/handle/11441/66030>.

Ormeño-Orrillo, E., Vinuesa, P., Zúñiga-Dávila, D. y Martínez-Romero, E. 2006. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. Sys. Appl. Microbiol. 29: 253–262.

Paerl, H. W. 1998. Microbially mediated nitrogen cycling. En Techniques in microbial Ecology, Jersey City, NJ 07306, pp.3-30. <https://eric.ed.gov/?id=EJ943875>

Peñagaricano, J. A., Arias, W., Llana, J. N. 1997. Ensilaje. Manejo y utilización de las reservas forrajeras, Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_el_trebol_de_olor_blanco_y_su_uso_en_la_provincia_de_cordoba.pdf

Perez, M., 2013. Botánica y Jardines. Ficha de *Melilotus indicus* - Botánica Y Jardines. <http://www.botanicayjardines.com/melilotus-indicus/>

Pichardo, M., F. Y Vibrans, H. (2009). Manual de malezas de México. CONABIO
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/melilotus-indica/fichas/ficha.htm>

Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/melilotus-indica/fichas/ficha.htm>

Shamayim, T. Ramírez, Ormeño, E., Marco A. Rogel, Martha G. López, Aline López, Martínez, J., Negrete, S., y Martínez E. (2006). La diversidad de los rizobios nativos de México a la luz de la genómica. Rev. Mex. de Biodiv. 90:1870-3473.
<http://revista.ib.unam.mx/index.php/bio/article/view/2681/0>

Spaink, H. P., A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas. 1998. The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Rev. Microbiol. 54: 257-288

Soriano, B., B y González, V., A. 2012. El efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* sobre crecimiento vegetal pprika, *Capsicum annuum* var. Longum, y lechuga, *Lactuca sativa*. Departamento de microbiología y parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas pp.5.

Stevenson, G. 1969. An agronomic and taxonomic review of the genus *Melilotus*. Can. J. Plant Sci. 49:1-20, 1969

Toll, V, J. R. 2018. Los tréboles de olor como recurso forrajero. Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Agronomía y Zootecnia CDD 633.2 1-94
https://www.produccionanimal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas%20artificiales/239-Melilotus.pdf

Traverso, J.E.; Dreussi, L.W. 1989. Evaluación del germoplasma y mejoramiento genético en *Melilotus* spp. Informativo de Tecnología Agropecuaria para la Región Semiárida Pampeana. EEA INTA Anguill. Pg. 5-7.
<https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-publi64.pdf>

Traverso, J., E. Babinec, F., J. Y Troiani, E. (2005). Caracterización y agrupación de entradas por compatibilidad de caracteres fenotípicos en el género *Melilotus*. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa, Santa Rosa, La Pampa. publicación técnica 64:16

Van Berkum P. 1998. Laboratorio de Investigación de la Soja y la Alfalfa. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos - Servicio de Investigación Agrícola, Syst. Appl. Microbiol. 29: 207-215.
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/70252/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Veneciano, J. H; Terenti, O. A. y Privitello, M. L. J. 1993. Crecimiento, acumulado de *Melilotus alba* medikus, producción y composición morfológica de la forrajimasa ISSN. Revista facultad de agronomía uanlPam.argentina. 7:13-24.
<http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revagro/agrov07n2a02veneciano.pdf>

Villaseñor R., J. L. y F. J. Espinosa G., 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/melilotusindica/fichas/ficha.htm>.

Wang, T., Romero, M, J., López L, I. 1968. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas, Laboratorio de Microbiología Agrícola, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.
<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>

Yañez, A, A. 2017. Recuperación de rizobacterias del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de San Andrés tlalamac, Estado de México Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. pg.8-10.

Young J.P.W. 1996. Filogenia y taxonomía de los rizobios. En: Elkan GH, pchurch RG (Eds). Temas actuales en la fijación simbiótica de nitrógeno. Desarrollos en Ciencias de Plantas y Suelos. 8:2. <https://www.jstor.org/stable/2558639>.