

Crecimiento y desarrollo foliar de plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L.), inoculadas con cepas de *Rhizobium*, aisladas de pajuro (*Erythrina edulis*)

Growth and foliar development of alfalfa plants (*Medicago sativa* L.), inoculated with strains of *Rhizobium*, isolated from pajuro (*Erythrina edulis*)

Ernestina R. Vásquez Castro¹, Carlos E. Millones Chanamé²

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar el crecimiento, desarrollo foliar, nodular y radicular de plantas de alfalfa (*M. sativa* L.), inoculadas con cepas de *Rhizobium* aisladas de pajuro (*E. edulis*). Se recolectaron nódulos radiculares de *E. edulis*, las cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos, posteriormente se aislaron 5 cepas de rizobios de *E. edulis* las cuales fueron inoculadas en alfalfa y soya. Los resultados mostraron que el empleo de hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos, fueron los adecuados para la asepsia de los nódulos radiculares de *E. edulis*. Las cinco cepas de *E. edulis* inoculadas en plantas de alfalfa cv. CUF, no mostraron capacidad para inducir nódulos radiculares, en tanto, la cepa ch-04-18 de *E. edulis* alcanzó a formar nódulo radicular a los 7 días de inoculados, pudiendo ser considerada la soya una NOD+ frente a la cepa ch-04-18.

Palabras clave: *Erythrina edulis*, *Medicago sativa*, *Rhizobium*, inoculación.

ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objective of evaluating the growth, foliar, nodular and radicular development of alfalfa plants (*M. sativa* L.), inoculated with strains of *Rhizobium* isolated from pajuro (*E. edulis*). Radicular nodules of *E. edulis* were collected, which were disinfected with 2% sodium hypochlorite for 15 minutes, then 5 strains of rizobio of *E. edulis* were isolated which were inoculated in alfalfa and soybean. The results showed that the use of 2% sodium hypochlorite for 15 minutes was adequate for the asepsis of the radicular nodules of *E. edulis*. The five strains of *E. edulis* inoculated in alfalfa plants cv. CUF, showed no ability to induce root nodules, while the ch-04-18 strain of *E. edulis* reached to form a root nodule 7 days after inoculation, and soybean could be considered a NOD + against strain ch-04 -18.

Keywords: *Erythrina edulis*, *Medicago sativa*, *Rhizobium*, inoculation.

¹Master en Ciencias, Microbióloga, Profesora Auxiliar, Departamento Académico de Biología y Química, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), e-mail: ernestina.vasquez@untrm.edu.pe

²Dr. En Genética y Mejoramiento de Plantas, Profesor Principal, Departamento Académico de Biología y Química, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), e-mail: carlos.millones@untrm.edu.pe

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura en el Perú desafía diferentes problemas, siendo uno de los principales los relacionados con la carencia de tecnologías de producción eficientes y de variedades altamente productivas, según el Sistema Integrado de Estadística Agraria SIEA de la Dirección General de Seguimiento y Evaluación de Políticas de la Dirección Estadística Agraria, señala a Amazonas con uno de los departamentos con un menor rango de producción de alfalfa, menor a 4000 TN. (Boletín estadístico de producción agrícola, pecuaria y avícola. Ministerio de Agricultura y Riego, 2016). Vásquez y Guevara (2016) aislaron y caracterizaron cepas de *Rhizobium*, aisladas de pajuro, de dos distritos de la región Amazonas, determinando que el promedio de los nódulos aislados de los sistemas radiculares varía entre 6 a 10 mm, presentando además un color rojo intenso, los cuales, según López-Alcocer et al (2017) corresponden a las líneas de *Rhizobium* más eficientes en la fijación del nitrógeno. No obstante, estos estudios no evaluaron la efectividad de dichas cepas como promotoras de crecimiento vegetal.

A nivel de Latinoamérica se han realizado diversos estudios para mejorar el rendimiento en la producción de alfalfa; Yugan y Gonzalo (2010) reportaron que el mejor tratamiento para la producción de alfalfa fue la combinación de *Rhizobium meliloti* (500 g/ha) con estiércol de cuy (20 tn/ha). Además, con la finalidad de buscar mejoras en el desarrollo y el valor nutritivo de la alfalfa, Martínez et al. (2016) emplearon para su inoculación dos especies bacterianas diferentes a rizobios (i.e., *Ensifer meliloti* y *Halomonas maura*), logrando mejorar su cultivo en condiciones de salinidad aumentando su composición nutricional y funcional.

En Perú, estudios previos evaluaron el efecto de los niveles de microorganismos eficaces como alternativa de fertilización en el manejo del cultivo de la alfalfa en condiciones agroecológicas de Andabamba-Huánuco, encontrando efecto significativo en relación a la altura de la planta, número de tallos por metro cuadrado, peso de forraje verde, materia seca y rendimiento, (Castillo y Sánchez, 2014). Sin embargo, las cepas empleadas en dichos estudios han provenido de leguminosas diferentes al pajuro. En tal sentido, la presente investigación tuvo como objetivo Evaluar el crecimiento, desarrollo foliar, nodular y radicular de plantas de alfalfa (*M. sativa* L.), inoculadas con cepas de *Rhizobium* aisladas de pajuro (*E. edulis*).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron muestras de nódulos de plantas de pajuro (*E. edulis*) del distrito de Chachapoyas, eligiendo la planta con buena vigorosidad y sanidad. Se utilizó una lampa para extraer las raíces y se recolectaron alrededor de 20 nódulos, los cuales fueron conservados en bolsas tipo Ziploc y colocados en refrigeración para su posterior uso en los ensayos correspondientes.

Los nódulos colectados se hidrataron, hasta que alcanzar turgencia; posteriormente se desinfectaron con alcohol 70° por un minuto; luego en hipoclorito de sodio al 2% por 4 minutos; finalmente se enjuagó por 5 veces con agua destilada estéril hasta eliminar por completo los residuos de hipoclorito de sodio. Esterilizados los nódulos, estos fueron macerados y se sembrados en placas Petri con medio Levadura Manitol Agar (LMA) más rojo congo, en estrías paralelas, sembradas las placas se incubarán a 28 °C por espacio de 2 a 7 días hasta observar crecimiento bacteriano. Posteriormente se realizaron las pruebas de caracterización cultural y bioquímica de las cepas de *Rhizobium* adaptando la metodología de Vásquez y Guevara (2014).

Las cepas de *Rhizobium* se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo medio de cultivo líquido Extracto de Levadura Manitol (ELM), pH 7 y se incubarán con agitación constante por 24 h a 30°C a 250 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se ajustaron a crecimiento de: 1 x 10⁵ UFC/mL, 1 x 10⁷ UFC/mL y 1 x 10⁹ UFC/mL, respectivamente. La inoculación de las cepas se hará al momento de la siembra y consistirá en aplicar 1 mL de inóculo por plántula de alfalfa (Granda et al., 2016).

Inoculación in vitro.- Semillas de alfalfa cv. CUF fueron sembradas en medio basal y vitaminas MS, suplementado con sacarosa 3%, myo-inositol 100mg/L y solidificado con 0,7% de agar-agar. Fueron colocados 50 mL en contenedores, y autoclavados a 121°C por 15 minutos. Las semillas de alfalfa cv. CUF fueron lavadas y desinfectadas con lejía comercial al 10% (0,4 % de hipoclorito de sodio), luego enjuagadas con agua destilada estéril hasta remover por completos los restos de lejía. Las semillas fueron colocadas en los recipientes con el medio de cultivo y fueron incubadas en ambiente a 24 ± 2°C, y fotoperiodo de 16/8. Germinadas las semillas se inoculó las plántulas con 1 mL del inóculo correspondiente. Se realizó las evaluaciones a los 7 días posteriores a la inoculación.

Inoculación en sustrato PROMIX.- Semillas de alfalfa cv. CUF fueron sembradas en macetas de

plástico que contenían sustrato PROMIX a capacidad de campo, y estas colocadas en ambiente a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, y fotoperiodo de 16/8. Germinadas las semillas se inoculó las plántulas con 1 mL de inóculo correspondiente. Se realizó las evaluaciones a los 7 días posteriores a la inoculación. Similar procedimiento se realizó para la inoculación de plántulas de soya.

III. RESULTADOS

Se recolectaron nódulos radiculares de plantas de pajuro (*Erythrina edulis*) de huertos del distrito de Chachapoyas, seleccionando aquellas de mejor aspecto, vigorosidad y sanidad (Figura 1a-c). Los nódulos colectados registraron un diámetro promedio de $10,2 \pm 2,3$ mm y un peso promedio de 290 ± 130 mg.

El empleo de hipoclorito de sodio al 2% por 4 minutos, fue la concentración y periodo adecuado para eliminar los microorganismos de la cubierta de los nódulos radiculares (Figura 2a), permitiendo realizar el aislamiento de las cepas de los nódulos de pajuro.

En la presente investigación se aislaron cinco cepas de *Rhizobium* a partir de nódulos radiculares de pajuro, registrando todas ellas características morfológicas como crecimiento abundante, de color opaco, producción de abundante mucilago, bordes regulares, forma del bacilo corto delgado y gram (-) (Tabla 1, Figura 2b-d).

Las pruebas bioquímicas de las cinco cepas aisladas en la presente investigación se caracterizaron porque las cepas crecieron en abundancia en el medio ALM-RC sin absorción del colorante rojo congo, crecimiento ligero en el medio APG-PBC, producción de ketolasa negativo y crecimiento ligero en medio ALM-AB (Tabla 2).

Las cepas ch-01-18 y ch-05-18 mostraron similar crecimiento abundante en pH 5.5, 6.8 y temperatura de 28°C , ligero crecimiento en concentración de NaCl 1%, pH 9.0 y temperatura de 10°C , ausencia de crecimiento en concentración de NaCl 2% y temperatura de 37°C (Tabla 3). La cepa ch-02-18, registró sólo abundante crecimiento a temperatura de 28°C , crecimiento moderado a pH 6.8, ligero crecimiento en concentración de NaCl 1%, 2%, pH 5.5, 9.0, y temperatura de 10°C , ausencia de crecimiento a temperatura de 37°C . La cepa ch-03-18 se caracterizó por tener un crecimiento abundante en concentración de NaCl 1% y 2%, en los tres niveles de pH (5.5, 6.8 y 9.0) y temperatura de 28°C , ligero crecimiento a temperaturas de 10°C y 37°C .

La cepa ch-04-18 se caracterizó por presentar abundante crecimiento en NaCl 1%, pH 5.5 y 6.8 y a temperatura de 28°C , ligero crecimiento en pH 9.0, temperatura de 10°C y ausencia de crecimiento en NaCl 1% y temperatura de 37°C .

Las inoculaciones de las cinco cepas de *E. edulis* aisladas no mostraron capacidad para inducir nódulos radiculares en plántulas de alfalfa cv. CUF, tanto en la inoculación *in vitro* (Figura 3a-c), como en la inoculación realizada en sustrato PROMIX (Figura 3d-e).

Las inoculaciones de las cinco cepas de *E. edulis* aisladas mostraron una escasa capacidad para inducir nódulos radiculares en plántulas de soya (10%), germinadas en sustrato PROMIX (Figura 4a-b), siendo la cepa ch-04-18 la que alcanzó formar nódulo a los 7 días de inoculados, induciendo dos nódulos (Figura 4c).

IV. DISCUSIÓN

Los nódulos colectados registraron un diámetro promedio de $10,2 \pm 2,3$ mm y un peso promedio de 290 ± 130 mg, parámetros mayores a los registrados por Vásquez y Guevara (2016) (diámetro 6,62 mm y peso de 79,29 mg) en la localidad de Chachapoyas

En la presente investigación se aislaron cinco cepas de *Rhizobium* a partir de nódulos radiculares de pajuro, registrando todas ellas características morfológicas como crecimiento abundante, de color opaco, producción de abundante mucilago, bordes regulares, forma del bacilo corto delgado y gram (-) (Tabla 1). Vásquez y Guevara (2015), reportaron similares características morfológicas en 11 cepas de pajuro a las halladas en la presente investigación, como alta velocidad de crecimiento, colonias grandes, translúcidas y gomosas, bacilos gram (-) finos y esporulados.

Las pruebas bioquímicas de las cinco cepas aisladas en la presente investigación se caracterizaron porque las cepas crecieron en abundancia en el medio ALM-RC sin absorción del colorante rojo congo, crecimiento ligero en el medio APG-PBC, producción de ketolasa negativo y crecimiento ligero en medio ALM-AB (Tabla 2). Vásquez y Guevara (2015), aislaron cepas de pajuro sin absorción del colorante rojo congo, característica de las cepas de *Rhizobium*; asimismo, las cepas mostraron reacción negativa de la enzima ketolactasa, también característica bioquímica de las cepas de *Rhizobium*.

Vásquez y Guevara (2015), indican que el desarrollo de cepas en concentraciones de NaCl 1% y 2%

obtuvieron crecimiento moderado en ambas concentraciones, similar crecimiento fue registrado en el presente estudio en la cepa ch-02-18, en tanto, la cepa ch-03-18 mostró un crecimiento abundante en ambas concentraciones de NaCl; Vásquez y Guevara (2015) registraron que a pH 6.8 y 9.0 se obtiene un crecimiento óptimo, similar resultado al registrado en la cepa ch-03-18, el resto de cepas mostraron un ligero crecimiento a pH 9.0; c Vásquez y Guevara (2015) reportaron que en temperaturas de 28°C y 36°C las cepas mostraron un mejor crecimiento, no obteniendo crecimiento cuando fueron cultivadas a temperatura de 10°C, en el presente estudio las cinco cepas mostraron un abundante crecimiento cuando fueron cultivadas a 28°C, no en tanto, mostraron ausencia de crecimiento a 37°C a excepción de la cepa ch-03-18 que registró un ligero crecimiento, asimismo, las cinco cepas mostraron ligero crecimiento cuando fueron cultivadas a 10°C.

Moreno-Chirinos *et al* (2016) reportaron que en la autenticación de 50 cultivos evaluados, sólo 20 cultivos formaron nódulos en simbiosis con *P. sativum* var. Selección Junín considerándolos NOD+, mientras que el resto de cultivos no formaron nódulos, considerándolos NOD-. En la presente investigación, las inoculaciones realizadas con las cinco cepas de *E. edulis* aisladas no mostraron capacidad para inducir nódulos radiculares en plántulas de alfalfa cv. CUF, tanto en la inoculación *in vitro* (Figura 3a-c), como en la inoculación realizada en sustrato PROMIX (Figura 3d-e), pudiendo considerar que las plantas de alfalfa cv. CUF, son NOD- frente a las cepas de *E. edulis*. En tanto, las plantas de soya son NOD+ frente a la cepa ch-04-18 de *E. edulis*, pero con una baja frecuencia de raíces noduladas (Figura 4c).

V. CONCLUSIONES

El empleo de 2% de hipoclorito de sodio por 4 minutos, fueron los parámetros adecuados para eliminar los microorganismos de la cubierta de los nódulos radiculares de *E. edulis*.

Se aislaron cinco cepas de *Rhizobium* a partir de nódulos radiculares de *E. edulis*, registrando todas ellas características morfológicas como crecimiento abundante, de color opaco, producción de abundante mucílago, bordes regulares, forma del bacilo corto delgado y gram (-).

Las cinco cepas de *E. edulis* aisladas no mostraron capacidad para inducir nódulos radiculares en plántulas de alfalfa cv. CUF, tanto en la inoculación *in vitro*, como en la inoculación realizada en sustrato PROMIX. pudiendo ser considerada la alfalfa una

NOD- frente a las cepas de rizobio de *E. edulis*.

La cepa ch-04-18 de *E. edulis* aislada mostró escasa capacidad para inducir nódulos radiculares en plántulas de soya (10%), germinadas en sustrato PROMIX (Figura 4a-b), alcanzando a formar nódulo a los 7 días de inoculados, pudiendo ser considerada la soya una NOD+ frente a la cepa ch-04-18.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boletín estadístico de Producción agrícola, pecuaria y avícola. Ministerio de Agricultura y Riego. 2016.
- Cárdenas, S. E. (2012). El Pajuro (*Erythrina edulis*) alimento andino en extinción. *Investigaciones Sociales*, 16(28), 97-104.
- Castillo Gibaja, W. N., & Sánchez Casimiro, Y. (2014). Niveles de microorganismos eficaces y bioabonos en el rendimiento del cultivo de alfalfa (medicago sativa l.), en condiciones agroecológicas de Andabamba-Huánuco 2014. Universidad Nacional Hermilio Valdizán.
- Delgado Enguita, I., Núñez Seoane, E., Muñoz Pérez, F., & Andueza Urrea, J. D. (2015). Cómo maximizar el cultivo de la alfalfa.
- Granda, I., García, M. C., Robles Carrión, Á. R., Alvarado-Capó, Y., & Torres Gutiérrez, R. (2016). Respuesta de *Phaseolus vulgaris* cv. Mantequilla a la inoculación de cepas de *Rhizobium* nativas de Ecuador en casas de cultivo. *Centro Agrícola*, 43(4), 49-56.
- López-Alcocer, J. D. J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macias, R., López-Alcocer, E., & Olalde-Portugal, V. (2017). Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(1), 73-81.
- Lloveras Vilamanyà, J., Chocarro, C., & Santiveri Morata, P. (2013). La fertilización de la alfalfa. *Tierras de Castilla y León*, 2013, núm. 200, p. 122-126.
- Pérez, A., Grisales, T., & Fuentes, J. (2011). Determinación de morfotipos nativos de *Rhizobium* asociados a la leguminosa *Teramnus volubilis* Sw en fincas ganaderas del municipio de Tolú en el departamento del Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 3(1), 62-89.
- Martínez, R., Kapravelou, G., Porres, J. M., Melesio, A. M., Heras, L., Cantarero, S., ... & López-Jurado, M. (2016). Medicago sativa L., a functional food to relieve hypertension and metabolic disorders in a spontaneously hypertensive rat model. *Journal of*

Functional Foods, 26, 470-484.
 Pizarro, E. A. (2005). Especies arbustivas, gramíneas y leguminosas para el trópico americano. *IX Seminario de Pastos y Forrajes*, 30-49.
 Yungán, A., & Gonzalo, R. (2013). Efecto de la Aplicación de Diferentes Niveles de Bacterias Rhizobium Meliloti con la Adición de Estiercol de Cuy en la Producción Forrajera del Medicago Sativa. (Alfalfa) (Bachelor's thesis).

Vásquez-Castro, E., Guevara, Z. R. (2014). Aislamiento y caracterización de cepas de Rhizobium de pajuro (*Erythrina edulis*). *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(1).

Tabla 1. Características morfológicas de las cepas aisladas de nódulos radiculares de *E. edulis* en medio ALM.

Nº cepa	Crecimiento	color	producción de mucílago	bordes	forma	tinción
ch-01-18	(+++)	opaco	(+++)	Regular	bacilo corto delgado	Gram negativo
ch-02-18	(+++)	opaco	(+++)	Regular	bacilo corto delgado	Gram negativo
ch-03-18	(+++)	opaco	(+++)	Regular	bacilo corto delgado	Gram negativo
ch-04-18	(+++)	opaco	(+++)	Regular	bacilo corto delgado	Gram negativo
ch-05-18	(+++)	opaco	(+++)	Regular	bacilo corto delgado	Gram negativo
(+) ligero	(++) moderado	(+++) abundante				

Tabla 2. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas de nódulos radiculares de *E. edulis*.

Nº cepa	ALM-RC	APG-PBC	Producción de Ketolactasa
ch-01-18	(+++)	(+)	negativo
ch-02-18	(+++)	(+)	negativo
ch-03-18	(+++)	(+)	negativo
ch-04-18	(+++)	(+)	negativo
ch-05-18	(+++)	(+)	negativo
(+) ligero	(++) moderado	(+++) abundante	

Tabla 3. Desarrollo de las cepas aisladas en ALM a diferentes concentraciones de NaCl, pH y temperaturas de incubación.

Nº cepa	Concentración de NaCl		pH			Temperatura (°C)		
	1%	2%	5.5	6.8	9.0	10	28	37
ch-01-18	(+)	(-)	(+++)	(+++)	(+)	(+)	(+++)	(-)
ch-02-18	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+++)	(-)
ch-03-18	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+)	(+++)	(+)
ch-04-18	(+++)	(-)	(+++)	(+++)	(+)	(+)	(+++)	(-)
ch-05-18	(+)	(-)	(+++)	(+++)	(+)	(+)	(+++)	(-)
	(-) negativo	(+) ligero	(++) moderado	(+++) abundante				

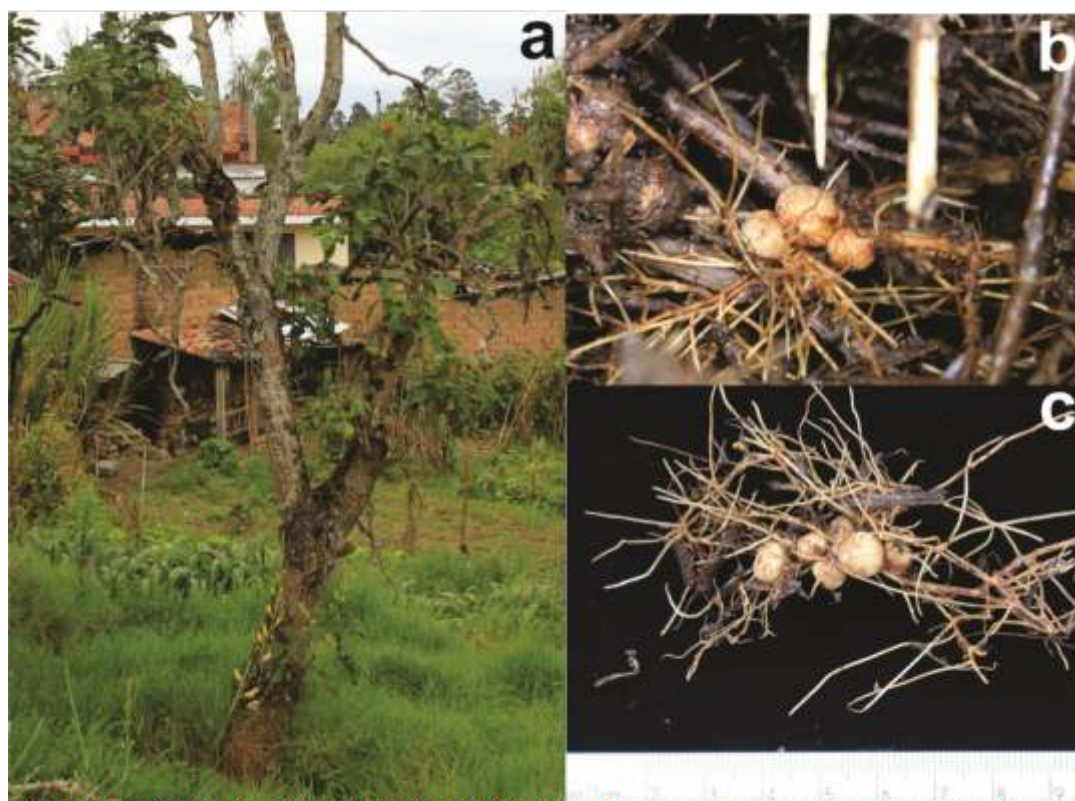


Figura 1. Recolección de nódulos radiculares de *Erythrina edulis*. a. Planta de *E. edulis* donadora de nódulos radiculares. b y c. Nódulos radiculares de *E. edulis*.

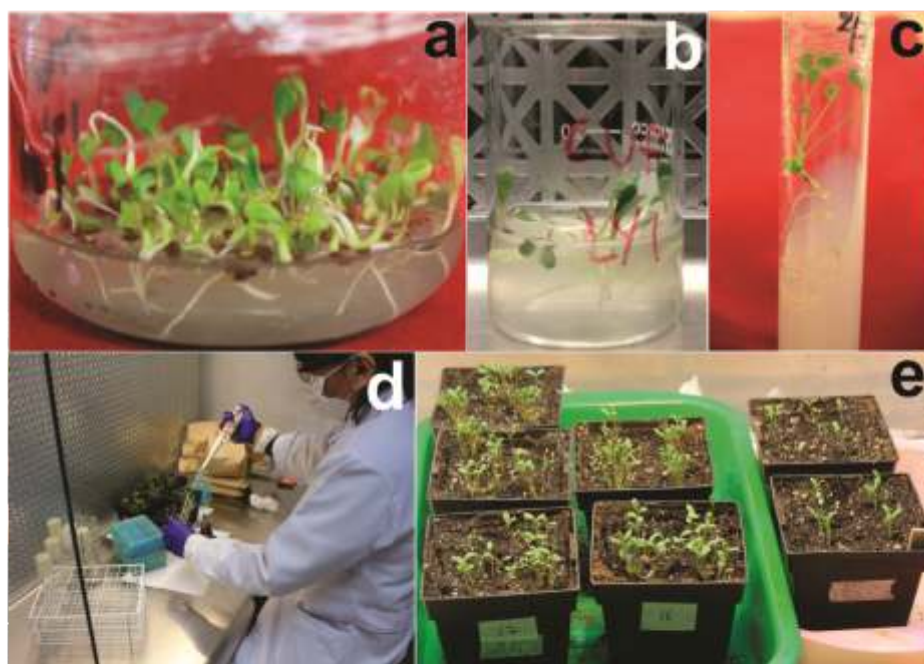


Figura 3. Ensayos de inoculación de cepas de pajuro (*Erythrina edulis*) en plántulas de alfalfa. **Inoculación in vitro:** a. Germinación *in vitro* de semillas de alfalfa cv. CUF, b. Inmersión de plántulas de alfalfa germinadas *in vitro* en soluciones con cepas de *E. edulis*. c. Crecimiento de plántula de alfalfa inoculada con cepas de pajuro, no registrando la nodulación en raíces. **Inoculación en sustrato PROMIX:** d. Inoculación de cepas en plántulas germinadas de alfalfa cv. CUF. e. Crecimiento y desarrollo de plántulas de alfalfa cv. CUF.

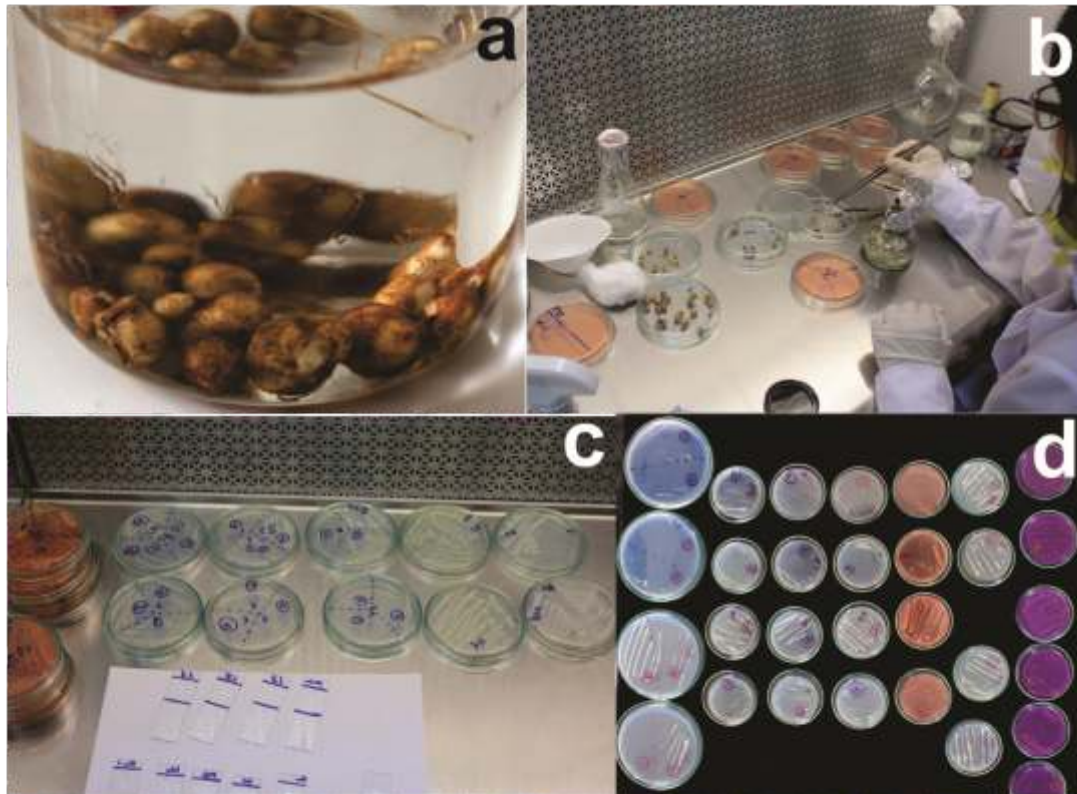


Figura 2. Aislamiento de cepas de pajuro (*Erythrina edulis*). a. Desinfección de nódulos radiculares de *E. edulis* b. aislamiento de cepas de nódulos radiculares de *E. edulis*. c. Identificación de cepas del género *Rhizobium*. d. Pruebas bioquímicas de aislamientos de nódulos radiculares de *E. edulis*.

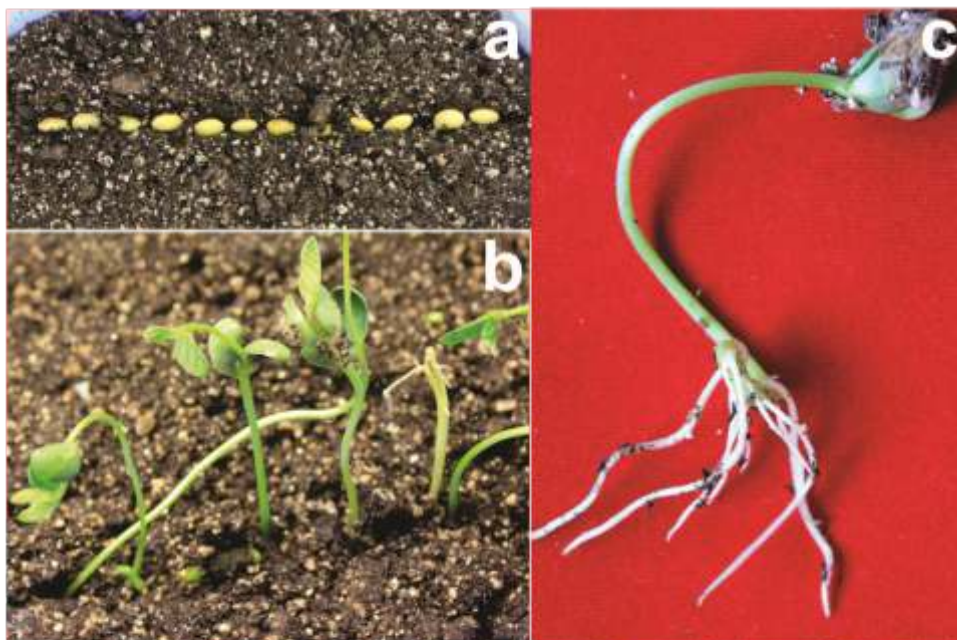


Figura 4. Ensayos de inoculación de cepas de pajuro (*Erythrina edulis*) en plántulas de soja. a. Siembra de semillas de soja en sustrato promix. b. Emergencia de plántulas de soja inoculadas con cepas de *E. edulis*. c. Inicio de formación de nódulos radiculares en plantas de soja inoculadas con cepas de *E. edulis*.