

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**Dinámica poblacional de *Sinorhizobium meliloti* en semillas
de alfalfa (*Medicago sativa* L.) pelletizadas con diferentes
materiales, Ayacucho 2017.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

PRESENTADO POR:

Hugo Pacotaype Meza

Ayacucho - Perú

2018

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi padre Daniel Pacotaype Tucno y mi madre Francisca Meza Huincho, por su cariño y comprensión, por brindarme la educación necesaria y el apoyo incondicional. Sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

A mi esposa Ninkatty Soria Damaso por su amor, apoyo, comprensión y la motivación para la realización de mis sueños y metas.

A mis hermanos (as) Pastora, Fredy, Yanet y Yudy, por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTO

A Dios todopoderoso por ser el amigo que siempre ha estado presente en cada uno de los días de mi vida.

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Agronomía , a todos mis Profesores una enorme gratitud por su esfuerzo y paciencia para enseñar y forjar profesionales en una carrera tan hermosa como la agronomía.

A la Blga PhD. Nery Santillana Villanueva, por su asesoramiento, aporte y colaboración en el desarrollo y conducción del presente trabajo de investigación.

A todos los miembros del jurado por el tiempo que me brindaron durante todo lo que significó la elaboración de la tesis; y por las correcciones y consejos en beneficio del presente documento.

A mis mejores amigos de la Universidad, quienes me acompañaron y me apoyaron durante los cinco años de estudio.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Dedicatoria	i
Agradecimiento	ii
Índice general	iii
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras.....	vi
Índice de anexos.....	vii
Resumen.....	1
Introducción	3
 CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO.....	 5
1.1. Antecedentes.....	5
1.2. El Cultivo de la alfalfa.....	6
1.3. Fijación biológica en la simbiosis rizobio - leguminosa	19
1.4. Inoculación de semillas.....	35
1.5. Pelletización de semillas.....	39
 CAPÍTULO II METODOLOGÍA.....	 47
2.1. Ubicación.....	47
2.2. Material experimental.....	47
2.3. Diseño experimental	47
2.4. Factores en estudio	48
2.5. Tratamientos	52
2.6. Instalación y conducción del experimento	53
2.7. Análisis estadístico	57
 CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 58
3.1. Población bacteriana a los 0 días	58
3.2. Población bacteriana a los 3 días.....	60
3.3. Población bacteriana a los 7 días.....	61
3.4. Población bacteriana a los 14 días.....	63
3.5. Población bacteriana a los 21 días.....	65

3.6. Población bacteriana a los 28 días	66
3.7. Tendencia de la dinámica poblacional.....	68
Conclusiones	71
Recomendaciones.....	72
Referencia bibliográfica	73
Anexos	83

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2.1 Descripción de los tratamientos.....	52
Tabla 3.1 Análisis de varianza del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 0 días.....	58
Tabla 3.2 Análisis de varianza del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 3 días post pelleteado.....	60
Tabla 3.3 Análisis de varianza del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 7 días post pelleteado.....	62
Tabla 3.4 Análisis de varianza del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 14 días post pelleteado.....	63
Tabla 3.5 Análisis de varianza del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 21 días post pelleteado.....	65
Tabla 3.6 Análisis de varianza del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 28 días post pelleteado.....	67
Tabla 3.7 Ecuación para la determinación exacta del tiempo máximo post pelleteado que la población de <i>Sinorhizobium meliloti</i> se encuentra con valores superiores a 1000 rizobios/semilla.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 3.1 Prueba de Tukey (0.05) del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 0 días.....	59
Figura 3.2 Prueba de Tukey (0.05) del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 3 días post pelleteado.....	61
Figura 3.3 Prueba de Tukey (0.05) del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 7 días post pelleteado.....	62
Figura 3.4 Prueba de Tukey (0.05) del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 14 días post pelleteado.....	64
Figura 3.5 Prueba de Tukey (0.05) del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 21 días post pelleteado.....	66
Figura 3.6 Prueba de Tukey (0.05) del número de <i>Sinorhizobium meliloti</i> /semilla a los 28 días post pelleteado.....	67
Figura 3.7 Dinámica poblacional de <i>Sinorhizobium meliloti</i> en cinco tratamientos a través del tiempo.....	70

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Tabla de evaluación de resultados a los 0 días.....	84
Anexo 2. Tabla de evaluación de resultados a los 3 días post pelleteado.....	85
Anexo 3. Tabla de evaluación de resultados a los 7 días post pelleteado.....	86
Anexo 4 Tabla de evaluación de resultados a los 14 días post pelleteado.....	87
Anexo 5. Tabla de evaluación de resultados a los 21 días post pelleteado.....	88
Anexo 6. Tabla de evaluación de resultados a los 28 días post pelleteado.....	89
Anexo 7. Datos ordenados de la población de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	90
Anexo 8. Costo de pelletizado de semilla de alfalfa por hectárea.....	91
Anexo 9. Panel Fotográfico.....	92

RESUMEN

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, ubicado en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, con el objetivo de determinar la dinámica poblacional de *Sinorhizobium meliloti* en semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) pelletizadas con diferentes materiales. Se evaluaron cinco tratamientos que consiste en la pelletización de semillas de alfalfa empleando diferentes materiales adherentes y de recubrimiento, los cuales son: T1=Goma arábica + Carbonato de Calcio (control), T2=Maicena + Roca Fosfórica, T3=Maicena + Harina de Trigo, T4=Melaza de caña + Roca fosfórica y T5= Melaza de caña +Harina de Trigo. El experimento se condujo en el diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento y seis muestreos (0, 3, 7, 14, 21 y 28 días), en condiciones de solarío. El número de *Sinorhizobium meliloti* por semilla se determinó utilizando la técnica de dilución e infección en plantas. Los resultados se sometieron a un análisis de variancia y la prueba de significación de Tukey ($p=0.05$). Los tratamientos T5 (melaza de caña + harina de trigo), T3 (maicena + harina de trigo) y T4 (melaza de caña + roca fosfórica) mantuvieron el número de los rizobios por encima del mínimo exigido (1000 rizobios/semilla) hasta los 19 días; similar al tratamiento control (20 días). El tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) mantuvo el número adecuado de rizobios sólo hasta los 06 días.

De acuerdo a los resultados obtenidos el mejor adherente y material de recubrimiento para reemplazar la goma arábica y carbonato de calcio es la mezcla de melaza de caña + harina de trigo, melaza de caña + roca fosfórica y maicena + harina de trigo.

INTRODUCCIÓN

La alfalfa es una leguminosa, valorada por agricultores y ganaderos debido a que es capaz de fijar el nitrógeno atmosférico y aportar una gran riqueza en proteína de calidad destinada a la alimentación del ganado, especialmente rumiantes.

Racca et al. (2001) señalan que la fijación biológica del nitrógeno atmosférico en leguminosas es posible debido a la asociación simbiótica con bacterias del género *Sinorhizobium*. Sin embargo no todos los rizobios pueden formar nódulos y/o fijar nitrógeno con todas las leguminosas, ya que hay especificidad en la asociación o par simbiótico, tal es así que *Sinorhizobium meliloti* es la bacteria específica para alfalfa.

Asimismo señala que la inoculación es la tecnología desarrollada con la finalidad de incorporar rizobios altamente infectivos y altamente eficientes en las leguminosas de interés agropecuario y hay dos maneras de realizarlo: Inoculación convencional (simple) y la pelletización.

Solid OPD (2010) menciona que la inoculación consiste en incorporar cepas de *Rhizobium* a las semillas de las leguminosas antes de la siembra; el propósito es mejorar la implantación de la especie.

Ferrari (2008) señala que las semillas pelleteadas poseen un valor agregado que se refleja en una mejor implantación de la pastura y por ende en una mayor productividad, ya que la pelletización es una tecnología que permite extender el período de supervivencia de los rizobios sobre la semilla y por otra parte adecúa al medio ambiente que rodea a la semilla logrando una mejor implantación de la pradera. Entre las ventajas de la pelletización se puede mencionar una mayor protección en suelos ácidos y en condiciones de deficiencia hídrica en el momento de la siembra, evitando la germinación hasta que los niveles de humedad se eleven a valores cercanos a capacidad de campo.

Hoy en día, la tendencia es sembrar con mayor precisión y de manera más eficiente al menor costo posible. Una de las tecnologías que permite lograr la mayor eficiencia es el pelletrado, sin embargo, los costos de los insumos que se utilizan en esta práctica, como la goma arábica y el carbonato de calcio, son elevados, por lo que no está al alcance de todas las personas que se dedican al cultivo de la alfalfa u otro tipo de leguminosas, a razón de ello, en la presente investigación, se propone el uso de otros materiales de bajo costo y de fácil adquisición.

Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas, se ha planteado el presente trabajo de investigación, con los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar la dinámica poblacional de *Sinorhizobium meliloti* en semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) pelletizadas con diferentes materiales.

Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto sustitutorio de adherentes (maicena y melaza de caña) y materiales de recubrimiento (harina de trigo y roca fosfórica) en la población de *Sinorhizobium meliloti* en semillas pelletizadas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) evaluados a los 0, 3, 7, 14, 21 y 28 días de pelletrado
2. Determinar el mejor adherente y material de recubrimiento que sustituya a la goma arábica y al carbonato de calcio.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

Loría y Vásquez (2013), al evaluar el efecto de la pelletización de semillas sobre la germinación de tres cultivares de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en Costa Rica, registraron valores de germinación variables para cada uno de los tratamientos en estudio, donde el valor máximo fue de 93% perteneciente al tratamiento T1 (con pelletizado y variedad Patricia) y el valor mínimo de 36% perteneciente al tratamiento T6 (sin pelletizado y Variedad Mora). Además se llegó a la conclusión de que el porcentaje de germinación se incrementa considerablemente en las semillas pelletizadas independientemente de las variantes genéticas de las semillas (variedades), lograron diferencias altamente significativas en mejora del porcentaje de germinación, hasta en un 30% utilizando semillas previamente tratadas con el pelletizado y que las variedades muestran diferentes respuestas en cuanto a la germinación, independientemente de ser o no previamente tratadas para la germinación.

Referente al número mínimo de rizobios por semilla, que garantice una buena nodulación Racca et al. (2001), consideran que al inocular se debe incorporar una importante cantidad de rizobios por semilla. Para alfalfa son requeridos para una excelente nodulación más de 1000 rizobios por semilla. Asimismo Bonomi (1985) recomienda 10^5 rizobios por semilla grande, 10^4 rizobios por semilla mediana y 10^3 rizobios por semilla pequeña. Castillo (1989) recomienda 1000 rizobios por semilla pequeña como el trébol y alfalfa, 10000 rizobios por semilla mediana y 100000 rizobios por semilla grande.

Santillana (1995), al comparar la sobrevivencia de cepas de rizobios en semillas de trébol rojo inoculados, utilizando la técnica de inoculación simple y pelleteado, determinó que los rizobios sobreviven por más tiempo en semillas pelletizadas y encontró más de 1000 rizobios/semillas hasta los 14 días de almacenamiento. El experimento se realizó en condiciones de solarío, utilizando la técnica de dilución e infección en plantas para determinar el número de rizobios por gramo de semillas.

Date, citado por Vidor et al. (1983), obtuvo después de 7 días de almacenamiento 54% de la población inicial de rizobios en semillas de trébol subterráneo pelletizada y sólo 5% de semillas con inoculación simple.

Referente al uso de diversos materiales adherentes y de recubrimiento usados para la pelletización de semillas de leguminosas Acuña (1983) recomienda que se puede utilizar como adherente la goma arábica al 40% y el carbonato de calcio como material de recubrimiento. Racca et al. (2001) recomiendan que para la pelletización se puede utilizar como adhesivos la goma arábica o agua azucarada y el carbonato de calcio extra liviano y precipitado como polvo de recubrimiento. Motta (1990) recomienda pelletizar las semillas con roca fosfórica, a razón de entre 100 y 400 g/Kg de semilla o con carbonato de calcio, aplicando alrededor de 500 g/Kg de semilla; las cantidades pueden variar dependiendo de las características de las semillas a inocular. Asimismo CIAT (1985) recomienda que se puede usar la roca fosfórica como material de recubrimiento en la pelletización entre 200-400 g/kg semillas, dependiendo del tamaño de las semillas. Faria et al. (1985) recomiendan que los pequeños productores o agricultores pueden usar la harina de trigo como material de recubrimiento en la pelletización de las semillas.

1.2 EL CULTIVO DE LA ALFALFA

1.2.1 Origen e historia

D'Attellis (2005), señala que existe un consenso general de que *Medicago sativa* se originó en el "Cercano Oriente Central", según la clasificación de Vavilov, zona integrada por Asia Menor, Irán y la región montañosa de Turquía. Irán constituye el centro geográfico que más comúnmente se menciona como originario de la alfalfa.

Cook (2005), indica que la alfalfa (*Medicago sativa* L.) tiene su origen en la cuenca del Mediterráneo y el suroeste de Asia (Irán, Afganistán), siendo uno de los primeros cultivos de forraje que se domesticó.

González (2002), indica que su origen está en el Sudoeste de Asia, cultivándose primero en Persia. De allí se llevó a Grecia en el siglo V a.C. y a España en el siglo VIII d.C. Los españoles introdujeron a la alfalfa al norte y sur de América.

Muslera y Ratera (1991) indican que esta especie fue introducida a América del Sur en el siglo XVI, por los portugueses y españoles y en 1870 a Perú, México y Estados Unidos, por misioneros españoles. Bolton et al. (1975) mencionan que el cultivo de alfalfa fue inicialmente introducido en América por los conquistadores españoles y portugueses; al encontrarse con condiciones ideales en México y Perú, la planta de alfalfa prosperó y se extendió a Chile, Argentina y finalmente a Uruguay por el año de 1775.

Pozo (1983), menciona que la alfalfa está hoy prácticamente extendida por todo el mundo. Sin embargo dada la variedad de ecotipos existentes en el estado espontáneo en la región, se fija su área de origen en Asia Menor y sur de Cáucaso, abarcando esta zona geográfica Turquía, Siria, Irak, Irán, Afganistán, parte occidental de Paquistán y Cachemira. De aquí es probable que se haya extendido su cultivo a Grecia a consecuencia de las guerras médicas. Sería pues, los griegos quienes le dieron el nombre de médica, que recogido por los romanos se ha conservado hasta nuestros días como denominación de su género botánico.

Ibarra (1982), indica que la alfalfa tiene su área de origen en Asia Menor y sur del Cáucaso, abarcando países como Turquía, Irak, Irán, Siria, Afganistán y Pakistán. Los persas introdujeron la alfalfa en Grecia y de ahí pasó a Italia en el siglo IV a.C. La gran difusión de su cultivo fue llevada a cabo por los árabes a través del norte de África, llegando a España donde se extendió a toda Europa. Fue difundida en varias regiones y valles italianos (como Lucerna de Italia), luego en Suiza (donde se la conoce como lucerne), España, Francia y posteriormente en el resto de Europa. La caída del Imperio Romano marcó una virtual desaparición del cultivo en Europa.

Recién en el siglo XVI fue introducida nuevamente en Italia y desde allí se distribuyó al resto de Europa, Sudáfrica y Australia. La llegada de la alfalfa al continente americano se produce en el año 1519, en México. Posteriormente Hernán Cortez en 1525 trae más semillas a América y en 1530 Francisco Pizarro, en su conquista al Perú, introduce la alfalfa para la alimentación de sus caballos.

1.2.2 Importancia

CARE PERÚ (2006) indica que la alfalfa es importante por lo siguiente:

- La alfalfa es una planta forrajera con alto contenido proteico, carbohidratos, minerales y vitaminas, muy apetecida por el ganado, no es tóxica, de alto rendimiento y larga vida (10 años). Es una planta conocida como la reina de las forrajeras, sin embargo requiere especial cuidado en el manejo.
- Su importancia radica en que la alfalfa es una leguminosa que proporciona nitrógeno a las gramíneas asociadas (*Dactylis*, *Festuca*, etc.), por tanto incrementa el rendimiento por hectárea y la calidad de la hierba.
- Tiene la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico por medio de sus nódulos radiculares y posteriormente lo incorpora al suelo como abono.
- La alfalfa contribuye como cultivo de cobertura y perenne reduciendo los problemas de erosión del suelo.

Gonzáles (2002) señala que la alfalfa es una leguminosa de alto contenido proteico (18%) y de gran valor nutritivo. Su gran producción y su persistencia la hacen denominar “Reina de las forrajeras”.

Zaragoza et al. (2001) mencionan que la alfalfa es el alimento por excelencia para los animales en muchas partes del mundo. Fácil de cultivar, ha alimentado al ganado durante mucho tiempo. Ahora algunos investigadores han puesto sus ojos en la alfalfa y han descubierto propiedades nutritivas y para la salud muy interesantes.

León (2002) indica que la alfalfa es una leguminosa muy apetecida por el ganado vacuno, caballar, ovino y especies menores como cuyes y conejos, sea como forraje verde, heno y bajo forma de harina (alfarina). Se le usa sola o en mezcla con otras

gramíneas y leguminosas. En la sierra es común su cultivo para expendio en verde en las ferias de pueblos y ciudades.

Delgado (1998) menciona que la alfalfa es una maravilla de la economía rural y el encanto de los celosos agricultores, la principal cualidad se refiere a su alta capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, de hasta 463 Kg./ha/año.

Rivas et al. (2005) indica que la alfalfa es un cultivo que permite aumentar la carga animal, mantener el stock, mejorar la ganancia en peso o el rendimiento en producción individual de leche. Además, se constituye en la base de la oferta forrajera como un forraje de calidad, es posible cosecharlo y conservarlo como reserva forrajera, no limita a los sistemas de alta productividad, reduce costos variables, aumenta la estabilidad de producción, y, bien manejado, no extrae del sistema uno de los recursos más escasos, como el nitrógeno edáfico, sino que, por el contrario, incorpora materia orgánica y recupera fertilidad del suelo.

Rainero (2003) menciona que la difusión del cultivo se apoya en sus altos rendimientos de materia seca (MS) ha^{-1} , su excelente calidad forrajera y su gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales (suelo, clima y manejo). Su uso más importante es para pastoreo directo, y en segundo término para corte, destinándose su producción a la confección de rollos y fardos como reserva forrajera para el invierno

Basigalup et al. (2007) indican que la alfalfa por su capacidad para la fijación biológica del nitrógeno (FBN) atmosférico a través de la simbiosis con *Sinorhizobium meliloti* la convierte también en un importante componente de la sustentabilidad de los sistemas productivos.

1.2.3 Clasificación taxonómica

Pozo (1983) indica que la alfalfa pertenece a la familia de las leguminosas, cuyo nombre científico es *Medicago sativa*, y tiene la siguiente clasificación taxonómica:

Reino : Plantae
 División : Magnoliophyta
 Clase : Magnoliopsida
 Orden : Fabales
 Familia : Fabaceae
 Subfamilia : Faboideae
 Tribu : Trifolieae
 Género : *Medicago*
 Especie : *Medicago sativa*
 Nombre binomial: *Medicago sativa* L.

1.2.4 Descripción botánica

Basigalup et al. (2007) mencionan que el fruto de alfalfa es del tipo legumbre o vaina, monocarpelar, seco e indehisciente, generalmente alargado y comprimido, con las semillas alineadas en la hilera ventral. La vaina, por encorvamiento, desarrolla una espiral que generalmente posee 1 espira con autofecundación y 3 a 5 vueltas con fecundación cruzada. La dirección de la espira puede ser dextrógira (en sentido horario) o levógira (en sentido antihorario). Cada fruto contiene un número variable de semillas arriñonadas: 2-3 con autofecundación y alrededor de 9 semillas con fecundación cruzada. Pozo (1983) indica que el fruto típico que viene a dar el nombre a la familia de las leguminosas es la legumbre, se trata de un fruto seco, alargado y comprimido aunque adopta diversas formas, dehiscente, con las semillas en una fila. Usualmente contiene de una a ocho semillas.

Alarcón et al. (2012), mencionan que las semillas del alfalfa son de 1.5 por 2.5 mm y pesan en promedio 0.8 mg cada fruto contiene un número variable de semillas arriñonadas. Basigalup et al. (2007) por su parte señalan que las semillas poseen generalmente forma arriñonada y color amarillento, pero también se pueden encontrar semillas angulares y de coloración que varía desde el verde oliva a distintas tonalidades de marrón. Las semillas, en estado maduro, tienen aproximadamente 1-2 mm de longitud por 1-2 mm de ancho y 1 mm de espesor. Están constituidas por el funículo, el tegumento (testa), el embrión y el albumen. El funículo es el que mantiene unida la semilla al fruto; al secarse, se desprende y forma una cicatriz

llamada hilio. El tegumento o testa es la capa externa que rodea al embrión y le brinda protección, siendo además el responsable del color de la semilla.

Pozo (1983), señala que las raíces de la alfalfa son abundantes, profundas. Constan de una raíz principal, robusta y pivotante, y numerosas secundarias. Por su parte León (2003), menciona que el sistema radicular tiene una raíz bien definida que puede penetrar en el suelo 2m al segundo año, 4m al tercer año y luego hasta 9 m de profundidad. Asimismo, Basigalup et al. (2007) indican que el sistema radical de la alfalfa es robusto y profundo, y su función principal es la absorción de agua. Si no existen impedimentos en el perfil de suelo, la raíz puede alcanzar los 2 a 5 metros en sólo 2 a 4 años de vida, de modo que la posibilidad de extraerla de las capas profundas del suelo le ha conferido a la alfalfa su reputación de tolerante a la sequía.

Basigalup et al. (2007) indican que el tallo primario es cuadrado en su sección transversal y presenta estomas y pelos. No sólo tiene crecimiento primario sino que también posee un crecimiento secundario que da origen a un eje leñoso o porción perenne, que forma parte de la corona. En su parte herbácea, presenta nudos desde donde nacen las hojas. El número de los tallos depende de la edad y el vigor de la planta, y puede llegar hasta 20. El crecimiento de los tallos es inducido por su utilización (pastoreo o corte) o por un nuevo ciclo fisiológico de crecimiento. León (2003), menciona que los tallos son delgados, cilíndricos de color verde y erecto para soportar el peso de las hojas y de las inflorescencias, además son muy consistentes, por tanto es una planta muy adecuada para la siega. La parte superior de la raíz principal contiene todas las yemas vegetativas de las cuales nacen todos los tallos del primer corte, sin embargo en los rebotes subsiguientes, los tallos pueden desarrollarse también a partir de yemas axilares, ubicadas en los nudos basales de los tallos cortados. Los tallos pueden llegar a medir hasta 1.20 metros de altura dependiendo la variedad.

Basigalup et al, (2007) indican que la corona no es una estructura simple ni única sino que es una zona compleja que incluye varias estructuras separadas. Es conveniente resaltar la importancia funcional de la corona como estructura almacenadora de sustancias de reserva y sede de yemas a partir de las cuales se

producirán los nuevos rebrotes de la planta. El ciclo acumulación/utilización de sustancias de reservas es fundamental para la vida de la planta y condiciona las prácticas de manejo del cultivo. Ruiz (2003), indica que la corona es característica en esta forrajera como en otras leguminosas trifoliadas constituye la zona terminal de la parte superior de la raíz principal. Es una superficie que está a continuación de la raíz y su función es la de emitir nuevas yemas que originarán los nuevos tallos, en esta estructura se van almacenando los nutrientes necesarios para que la planta pueda emitir nuevos brotes después del corte. También señala que las hojas son trifoliadas, aunque las primeras hojas verdaderas son unifoliadas, con el pecíolo central más largo que los laterales, los folíolos son de color verde y de forma ovalada. Los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados.

Pozo (1983), manifiesta que las plantas leguminosas están normalmente dotadas de hojas compuestas. Estas hojas constan de estípulas, pecíolo, raquis, y folíolos. Las estípulas son una pareja de apéndices, que en el caso del género *Medicago* se encuentran soldadas a lo largo de uno de sus bordes, formando una sola pieza. El pecíolo es a modo de un pequeño tallo que une el raquis al resto de la planta. Se prolonga este pecíolo en el raquis o eje mediano de la hoja, donde se insertan los distintos folíolos. Estos folíolos son como conjunto de las cuales forman la hoja propiamente dicha. Basigalup et al. (2007) indican que la primera hoja de la plántula de alfalfa es unifoliolada y de forma orbicular. Las segundas y subsecuentes son pinnaticompuestas o imparipinnadas, y se originan en el ápice del tallo. Posteriormente, cuando la planta ya está desarrollada, las hojas pueden originarse del ápice del tallo o de las yemas laterales ubicadas en los nudos de los tallos. Las hojas se unen al tallo por el pecíolo y son usualmente trifolioladas, vale decir que se componen de tres folíolos peciolulados. Los folíolos son normalmente oblongos u obovados, pero se pueden encontrar formas desde redondeadas a obovado-oblongas e incluso lineales.

Alarcón et al. (2012), señalan que las flores de la alfalfa nacen en racimos oblongos multifloros (8-10 flores por racimo) sobre pedúnculo no aristado, con colores vistosos que suele variar del amarillo al violeta. Asimismo, Basigalup et al. (2007) indican que la flor de la alfalfa es completa y está formada por el cáliz, la corola, los

estambres y el gineceo. Responde a los caracteres sistemáticos de la subfamilia Papilionoidea, o sea que posee una corola papilionada en forma de mariposa. El cáliz consta de cinco sépalos soldados formando un tubo; sin embargo, cada sépalo termina en un lóbulo o diente que es mayor en longitud al largo del tubo calicino. La corola está formada por cinco pétalos desiguales: el estandarte, que es el superior y el más grande de los cinco; las alas, que son dos pétalos más pequeños que se ubican a ambos lados del estandarte; y la quilla, que está envuelta por las alas y que se forma por dos pétalos soldados que se ubican más internamente.

1.2.5 Requerimientos climáticos y edáficos.

Factores climáticos

- **Clima**

Basigalup et al. (2007), mencionan que las condiciones climáticas que favorecen la producción de semilla son: a) un período de crecimiento de por lo menos 150 días de duración; b) temperaturas promedio de 24-25°C durante el día y mayor a 18°C durante la noche a lo largo del período de floración; c) aire relativamente seco (< 50% de HR), tanto en el día como en la noche, durante el momento de floración; d) alta heliofanía y ausencia de vientos fuertes durante la floración, con un mínimo de días nublados y frescos; e) días largos, con un mínimo de 12 horas de luz; y f) una distribución de lluvias o riegos que provea de la adecuada humedad al suelo para promover un crecimiento vegetativo temprano y una reducción gradual de la humedad edáfica a partir del momento de la floración.

León (2003), indica que el cultivo de alfalfa se adapta desde un clima cálido seco hasta el templado y frío, es decir, desde el nivel del mar hasta 3000 msnm. La mejor altura está entre los 1.500 y 2.500 msnm. Se considera que son suficientes 900 mm, anuales de lluvia bien repartida. Es sensible al exceso de humedad.

- **Temperatura**

Pozo (1983), señala que la semilla de alfalfa comienza a germinar a una temperatura de 2-3° C, siempre que las demás condiciones ambientales lo permitan. A medida que se incrementa la temperatura la germinación es más rápida hasta alcanzar un óptimo a los 28-30° C. Temperaturas superiores a 38° C resultan letales para las

plántulas. También, Ruiz (2003) señala que la temperatura media anual para la producción forrajera está en torno a los 20° C.; siendo el rango óptimo de temperaturas, según las variedades de 18-28° C.

Soto (2000), afirma que el crecimiento de post-emergencia se ve favorecido con temperaturas entre 20° C y 30° C, que da como resultado una rápida expansión de las primeras hojas trifoliadas. A las seis semanas de crecimiento, las temperaturas entre 15° C y 20° C son más favorables para la alfalfa y ésta detiene su crecimiento con temperatura menor a 1° C.

- **Humedad**

León (2002) señala que son suficientes de 600 a 700 mm anuales de lluvias bien repartidas. La alfalfa requiere la administración hídrica de forma fraccionada, ya que sus necesidades varían a lo largo del ciclo productivo. Si el aporte de agua está por encima de las necesidades de la alfalfa disminuye la eficiencia de la utilización del agua disponible. El aporte de agua en caso de riego por inundación es de 1.000m³/ha. En riego por aspersión será de 880 m³ /ha.

- **Luminosidad**

León (2002) indica que es un factor muy importante que influye positivamente en el cultivo de la alfalfa, pues el número de horas de radiación solar aumenta a medida que disminuye la latitud de la región, el cultivo necesita un fotoperiodismo conveniente de 500 a 600 horas luz/corte.

Basigalup et al. (2007), señalan que la formación de flores es favorecida por un mínimo de 12 horas de luz, con alta intensidad luminosa y temperaturas mínimas por encima de 20° C. La duración del día afecta el número de días entre floraciones sucesivas, decreciendo de 38 a 28 y de 28 a 24 días con un incremento de la duración de luz de 12 a 14 y de 14 a 16 horas, respectivamente. La luz y la temperatura condicionan no sólo el desarrollo de las inflorescencias y la fertilidad del polen y de los óvulos, sino también la actividad de los polinizadores, la fecundación, el desarrollo embrionario, crecimiento y la maduración de las vainas.

Factores edafológicos

• Suelo

CARE PERÚ (2006) manifiesta que en terrenos muy pesados (arcillosos) o muy arenosos, siempre existe el peligro de perder el cultivo durante la etapa de establecimiento ya sea por la formación de costras duras o por la excesiva pérdida de humedad. Cuando existen encharcamientos por períodos prolongados (más de 5 días), las raíces mueren lentamente por asfixia y por eso no se debe seleccionar terrenos con empozamientos de agua. Se debe escoger los "Kallpares" de papa, avena o cebada y en lo posible evitar sembrar después de la cañihua.

León (2003) ha determinado que la alfalfa tiene una notable adaptabilidad a diversas clases de suelos, sin embargo para un buen desarrollo de la planta es indispensable suelos profundos, con subsuelos permeables, y bien drenados.

Gonzáles (2002) recomienda para la siembra suelos de buena profundidad, fértiles y con un buen drenaje.

Soto (2000) señala que la profundidad de arraigamiento determina requisitos básicos que debe cumplir el suelo para el establecimiento de alfalfa. Su profundidad debe ser más de un metro, siendo imprescindible la ausencia de capas impermeables de tosca que impidan la penetración de las raíces y que por otra parte, dificulten el drenaje interno. La mayor profundidad radical que alcance la alfalfa, al no tener impedimento para su desarrollo, le permitirá explorar un mayor volumen de suelo para obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo, y lograr una mejor tolerancia a la sequía, que se traducirá en altos niveles de producción.

Asimismo, Aguirre (1997) señala que la alfalfa requiere de suelos profundos de tipo migajón o franco, con subsuelos porosos, bien drenados, fértiles, neutros o ligeramente alcalinos y no se desarrolla bien en suelos ácidos y requiere grandes cantidades de cal. Los suelos poco profundos no son apropiados, los que contienen grandes cantidades de sales alcalinas son desfavorables para cultivar alfalfa.

Pozo (1977) indica que la alfalfa se desarrolla óptimamente en suelos profundos, sanos y bien drenados. En estas condiciones, incluso en climas de escasa precipitación, es capaz de rendir abundantes cosechas. Al comentar las características botánicas de la alfalfa se señalaba con gran énfasis el gran desarrollo radicular que esta planta llega a adquirir, razón por la cual es resistente a la sequía, ya que en épocas de escasez puede llegar a extraer el agua que necesitaba de las capas más profundas del suelo. El cultivo de la alfalfa en suelos menos de 60 centímetros de profundidad no es aconsejable.

- **pH**

Gonzáles (2002) indica que preferentemente el pH tiene que ser cercano al neutro (6,5 a 7,5). En el caso de suelos ácidos, se recomienda encalar previamente un mes antes de la siembra.

Pozo (1983) indica que el factor limitante en el cultivo de alfalfa es la acidez. El pH óptimo para el desarrollo de la planta fluctúa entre 6,5 y 7,8, y puede variar con la textura, contenido de materia orgánica y otras propiedades químicas del suelo. Las variaciones de pH bajo 5,8 provocan serios problemas de crecimiento y desarrollo de la planta, disminuyendo la disponibilidad de nutrientes, influyendo negativamente en la producción de forraje de alfalfa.

Soto (2000) señala que la acidez del suelo perjudica la nodulación de la raíz, puesto que la bacteria específica *Sinorhizobium meliloti*, responsable de la fijación simbiótica del nitrógeno, es muy sensible a la acidez del suelo.

Grupo Océano, (2002) indica que el factor limitante en el cultivo de la alfalfa es la acidez, excepto en la germinación, pudiéndose ser de hasta 4. El pH óptimo del cultivo es de 7,2, recurriendo a encalados siempre que el pH baje de 6,8, además los encalados contribuyen a incrementar la cantidad de iones de calcio en el suelo disponibles para la planta y reducir la absorción de aluminio y manganeso que son tóxicos para la alfalfa. Existe una relación directa entre la formación de nódulos y el efecto del pH sobre la alfalfa. La bacteria nodulante de la alfalfa es *Sinorhizobium meliloti*, esta especie es neutrófila y deja de reproducirse por debajo de pH 5, por

tanto falla la asimilación de nitrógeno en la alfalfa. León (2003), señala que el pH ideal es neutro o ligeramente alcalino (6.2 – 7.8), puede vegetar con pH de 9 y llegar a pH de 11, no soporta la acidez y su límite para el cultivo es de un pH 4.5 – 5.5.

- **Salinidad**

Soto (2000) indica que la alfalfa es muy sensible a la salinidad, cuyos síntomas comienzan con la palidez de algunos tejidos, la disminución del tamaño de las hojas y finalmente la detención vegetativa con el consiguiente achaparrado. El incremento de la salinidad induce desequilibrios entre la raíz y la parte aérea.

Pozo (1983), menciona que la alfalfa es una planta muy sensible a la salinidad, cuyos síntomas son en todo parecidos al de la sequía. Sus síntomas comienzan con la palidez de algunos tejidos, la disminución del tamaño de las hojas y finalmente la parada vegetativa con el consiguiente achaparrado. El incremento de la salinidad induce desequilibrios entre la raíz y la parte aérea.

1.2.6 Situación forrajera en el Perú

El MINAGRI (2017) señala que para el año 2021 la ganadería en el Perú habrá crecido hasta en un 6%, lo que se verá reflejado en los bolsillos de los productores pecuarios de todo el país, resultados que serán logrados a través del Programa Nacional de Pastos y Forrajes. Para el 2017, el Plan de Desarrollo Ganadero tuvo previsto sembrar 25,500 hectáreas en todo el país, siendo la meta final al 2021, la siembra total de 150 mil hectáreas con este forraje, que es de alto valor nutritivo para el ganado.

Bernet et al. (2000) señalan que en la sierra peruana el ganado lechero es criado por pequeños ganaderos sobre alfalfa (*Medicago sativa* L.) regada con manejo intensivo, avena y/o ryegrass-trébol cultivados en la parte inferior de los valles fríos. El ganado lechero es alimentado con limitadas cantidades de concentrados.

Valdivia (1996) indica que parcelas de alfalfas bien manejadas y bien regadas promedian 4 UA/ha a lo largo del año. En general, se ha estimado que hay 120 000 ha con alfalfa en el Perú, con la siguiente distribución entre departamentos:

Arequipa, 35 000 ha; Lima, 20 000 ha; Ancash y Ayacucho, 15 000 ha cada uno y Tacna, 10 000 ha.

Bernal (1993) señala que en el Perú independientemente del tamaño de finca, la alfalfa (*Medicago sativa* L.) regada y pastoreada directamente constituye el 75% del forraje, siendo el resto maíz (24%) y sorgo (1%).

Variedades comerciales de alfalfa en el Perú

El MINAGRI (2017) indica que entre las variedades más difundidas en el país están los siguientes:

- Ranger (dormancia 3-5). Para zonas altoandinas, bajo condiciones de riego y seco. Muy buena para pastoreo.
- Joya 1, Joya 2 (dormancia 4). Para zonas altoandinas. Multifoliadas. Prospera muy bien bajo condiciones de riego y seco. Muy buena para pastoreo
- Prince (dormancia 7). Alto valor nutritivo, buen rebrote al corte. Para zonas bajas, con riego.
- California 52 y California 55 (dormancia 9). Para zonas bajas y abrigadas, alto rendimiento.
- Moapa. Variedad que se adapta a valles de la costa y valles interandinos. Alto rendimiento, requiere riego.

La dormancia es una característica genética de las alfalfas que les permite mantenerse en estado latente durante el período de bajas temperaturas y heladas invernales, previa acumulación de reservas en la raíz y la corona, que facilitarán rebrotar en primavera, tan pronto como cesen las condiciones rigurosas del clima frío. Hay variedades de crecimiento postrado ideales para pastoreo. Variedades de alta dormancia (d=1-4) pueden prosperar bien en condiciones de seco y baja temperatura. Variedades de baja dormancia o no dormantes (d=5-9) requieren mejores condiciones de temperatura y riego para producir. La dormancia en alfalfa está muchas veces acompañada de un % de semillas duras, como característica de la variedad. Escala: 1–9.

Nolí et al. (2015) indican que la alfalfa WL Beacon tiene mejor rendimiento de forraje verde (16 t/ha/corte) y 31.86% de materia seca en la época seca con heladas en la Sierra Central del Perú, seguida de la alfalfa WL 625HQ (15 t/ha/corte) con 31.67% materia seca y la alfalfa California 55 (15 t/ha/corte) y 30.18% en materia seca. Estas tres variedades de alfalfa con dormancia 9 están adaptadas y son promisorias para la Sierra Central del Perú.

1.3 FIJACIÓN BIOLÓGICA EN LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA

1.3.1 Importancia en el contexto de una agricultura sustentable

Olivares et al. (2013) mencionan que a pesar de la abrumadora abundancia de este elemento en la atmósfera y rocas sedimentarias, el nitrógeno es un elemento que limita el crecimiento de plantas ya que éstas sólo son capaces de incorporarlo en sus formas reducidas (también llamadas combinadas). Todo el requerimiento nutricional de nitrógeno de animales y humanos es incorporado, directa o indirectamente de las plantas. Se estima que la población mundial prácticamente duplicó su número durante los últimos 50 años del siglo XX, este aumento se ha encontrado fuertemente asociado a la implementación de nuevas prácticas agrícolas dentro de las cuales, una de las más destacables es el comienzo de la utilización masiva de fertilizantes nitrogenados producidos industrialmente por el proceso Haber-Bosch.

Monza et al. (2004), mencionan que sólo un grupo minoritario de procariotas, conocidos como diazótrofos o fijadores de nitrógeno, son capaces de llevar a cabo la FBN. Los microorganismos diazótrofos presentan diferentes tipos de nutrición y estrategias para fijar nitrógeno. La FBN es responsable de la entrada a los ecosistemas de unas 250×10^6 toneladas de nitrógeno anuales, lo que significa que el 80 % del nitrógeno en los ecosistemas proviene de la atmósfera. La FBN llevada a cabo por fijadores simbióticos incluye a los sistemas más evolucionados y más eficientes en términos de cantidad de nitrógeno fijado

Vance et al. (1998) consideran que para un sistema agrícola sustentable, es de suma importancia utilizar recursos renovables que puedan maximizar los beneficios ecológicos y minimizar el daño ambiental. Asimismo, Badejo (1998) indica que en la

restauración agroecológica existe la necesidad de reducir la pérdida de nitrógeno por volatilización, erosión, lixiviación, evaporación y cosecha.

Alexander (1980) indica que una de las alternativas con alto potencial en la fertilización del suelo, es la utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico que se asocian con leguminosas, de estas la relación más importante es con el género *Rhizobium*, que posee la habilidad de penetrar los pelos radiculares e inducir la formación de nódulos y transformar el nitrógeno atmosférico a amonio (una de las formas mejor asimilables para las plantas).

La FAO (1995), Freire (1997) y Giller et al. (1995) consideran que la simbiosis *Rhizobium* - leguminosas es el más importante e eficiente sistema de sustentabilidad de la agricultura (producción de alimentos) y del medio ambiente. Desde los tiempos antiguos, las leguminosas han sido usadas como mejoradoras del suelo. Los agricultores de la Mesopotamia cultivaban arvejas y frejoles, pues sabían que los cereales daban mayores rendimientos cuando eran cultivados después de éstas leguminosas. Las leguminosas a través de la historia, siempre han sido usadas como un recurso de gran importancia para alimentación humana. Se cultivaban en todo el mundo, tanto en regiones tropicales como en las zonas templadas. Poseen un alto contenido de proteínas en los granos secos (17-25%) y desde el punto de vista energético, resulta más barato consumir las leguminosas que son por un lado, una fuente económica de proteínas y por otro lado, un suministro adicional de fibra a la dieta.

Newton (2000) señala que la fijación biológica del nitrógeno representa una alternativa a la fertilización nitrogenada ya que puede paliar muchos de los efectos negativos tanto a nivel medioambiental y sanitario.

1.3.2 El proceso de la fijación de nitrógeno atmosférico

Racca et al. (2001) sostiene que las especies que integran la familia de las leguminosas, entre ellas alfalfa, tienen una gran avidez por nitrógeno (N). Este elemento fundamental para el desarrollo de las plantas e integrante indispensable en la formación de proteínas es escaso en determinados suelos. Muchas especies de

leguminosas, en pos de obtener N, encontraron que asociándose con determinados microorganismos del suelo, podrían alcanzar este objetivo. Con la evolución se perfeccionó el intercambio creando un sistema, denominado simbiosis, donde los beneficios son mutuos. Como resultado del trueque se crea un nuevo órgano en las raíces de conocido como nódulo. Es a partir y dentro de este órgano de donde se obtiene el N tan codiciado por la leguminosa. Previamente la planta debe facilitar elementos azucarados a las bacterias para ayudarlas a transformar N_2 atmosférico en amonio, es decir N asimilable que es transportado rápidamente por los sistemas de conducción al resto de la planta. El nombre generalmente elegido para caracterizar este proceso es el de Fijación Biológica de N_2 (FBN). El buen funcionamiento de la simbiosis rizobio-leguminosa disminuye el consumo de N del suelo manteniendo la fertilidad del mismo.

Mayz (1997) indica que para que se establezca la relación simbiótica deben ocurrir las siguientes etapas: 1. Multiplicación de las bacterias en la rizósfera, 2. Colonización de la rizósfera, 3. Adsorción de las bacterias a la raíz, 4. Enortijamiento de los pelos radicales, ocurre en las raíces cuando la infección es vía pelos radicales y en algunas donde acontece vía unión raíces laterales-raíz principal, 5. Formación de los hilos o zonas intercelulares de infección, 6. Crecimiento del hilo de infección hacia las células corticales o invasión directa de las mismas, y 7. Diferenciación tisular y desarrollo del nódulo.

Salas (2015) señala que los rizobios y leguminosas se asocian a través de un complejo proceso de señalización que finaliza en la formación de nuevos órganos en las raíces de la planta especializados en la fijación de nitrógeno atmosférico (nódulos). La formación de esta interacción comprende una serie de cambios morfológicos y fisiológicos tanto del rizobio como de su planta huésped, todos procesos sumamente regulados por los interactuantes e influenciados por el ambiente en el que se encuentran. La complejidad es todavía mayor la asociación leguminosa – rizobio se inicia con el proceso de infección, cuando las bacterias reconocen las raíces de las plantas. La bacteria atraviesa las paredes de las raíces llegando al interior de las células vegetales dónde forma unas estructuras llamadas nódulos. Estos nódulos constituyen el hogar de las bacterias y es donde se realiza la reacción

química a través de la cual el N_2 atmosférico es convertido en amonio que es luego exportado al tejido vegetal para la formación de proteínas y otros compuestos nitrogenados. Por su parte, la glucosa fabricada por la planta durante la fotosíntesis es transportada a la raíz donde las bacterias la usan como fuente de energía. De esta relación ambos organismos (planta y bacteria) se benefician. Asimismo añade que el *Sinorhizobium meliloti* es una α -proteobacteria capaz de establecer asociaciones simbióticas con plantas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Esta asociación es el resultado de un complejo diálogo molecular entre los simbioses, que se diferencian a lo largo de la interacción para dar lugar a un nuevo órgano en las raíces de las plantas, el nódulo fijador de nitrógeno. El nicho simbiótico accesible a los rizobios está naturalmente limitado, y resulta ocupado por aquellas cepas que muestran ser más competitivas para acceder al mismo. Las evidencias actuales indican que la competitividad para la nodulación es un fenómeno complejo, en el que son particularmente relevantes los procesos que tienen lugar en la vida rizosférica temprana. Lamentablemente, y a pesar del detallado conocimiento actual del proceso de infección y desarrollo de nódulos por los rizobios, muy poco se conoce sobre las etapas críticas de la colonización rizosférica.

Cooper (2004) indica que en la mayoría de los casos el establecimiento de la simbiosis rizobio - leguminosa es un proceso altamente específico ya que cada rizobio es capaz de interaccionar con una o muy pocas especies vegetales. Asimismo, Jones et al. (2007) señalan que la especificidad de la asociación rizobio-leguminosa está dada por un reconocimiento mutuo, el cual es mediado por un diálogo molecular que desencadena programas genéticos en ambos organismos los cuales dan lugar a una secuencia de eventos altamente coordinados que permiten finalmente el establecimiento de la simbiosis y la formación del nódulo. Los rizobios tienen respuestas quimiotácticas frente a diferentes compuestos producidos y exudados por las raíces de las leguminosas, que llevan a estos microorganismos a colonizar y adherirse a las raíces de la planta. La producción de flavonoides (compuestos aromáticos) por parte de la planta hospedera es la primera señal en la interacción. Estos compuestos son secretados a la rizósfera donde funcionan como inductores de los genes Nod bacterianos, dando como resultado la producción de factores Nod (lipo-quito-oligosacáridos) por parte de la bacteria. Estos factores Nod activan una

compleja ruta de señalización en la planta que comienza a prepararse para recibir a su pareja simbiótica. Como resultado de la activación de esta ruta de señalización se da la curvatura del pelo radicular atrapando los rizobios que se encuentran adheridos. Los factores Nod junto con exopolisacáridos simbióticos (β -glucanos secretados por los rizobios) inducen en la planta la formación del hilo de infección, delgados túbulos rodeados por una membrana de origen vegetal repletos de bacterias que penetran en el tejido cortical de manera de permitir su acceso a las células blanco, las células del córtex interno. Estas células internalizan la bacteria al citoplasma mediante endocitosis, en un compartimento rodeado por una membrana de origen vegetal (membrana peribacteroidal). Este conjunto, compuesto por una o varias bacterias rodeadas de la membrana peribacteroidal es denominado simbiosoma. Una vez dentro del simbiosoma la bacteria sufre un proceso de diferenciación transformándose en bacteroide, que es la forma capaz de llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno. Esta asociación lleva finalmente a la formación en la planta de estructuras morfológicas especializadas llamadas nódulos, donde tiene lugar la FBN (Fijación Biológica del Nitrógeno).

Perret et al. (2000) indican que la marcada especificidad entre el huésped y el microorganismo infectivo es una de las características centrales de las asociaciones entre rizobios y leguminosas. Sin embargo, el rango de especificidad puede ser muy variado (existen algunos rizobios con un rango más extendido de huéspedes (amplio), que son capaces de infectar a varias especies y otros que sólo son capaces de asociarse simbióticamente con una única especie).

Asimismo, Downie (2010) manifiesta que la especificidad se encuentra determinada por varios factores que involucran moléculas de señalización de ambos interactuantes y además juegan un papel en este sentido los polisacáridos presentes en las paredes bacterianas de los rizobios y las proteínas que estos secretan

Jones et al. (2007) y Martínez (2013) señalan que uno de los sistemas modelo para estudiar esta interacción es el formado por la bacteria *Sinorhizobium meliloti* y algunas leguminosas del género *Medicago*, incluyendo *Medicago sativa* L. (alfalfa).

Ferguson et al. (2010) señalan que según la morfología y desarrollo nodular se distinguen dos tipos de nódulos, los indeterminados y los determinados. Los nódulos indeterminados tienen un aspecto alargado ocasionado por un meristema persistente que continuamente da lugar a nuevas células susceptibles de ser infectadas por los rizobios que se encuentran dentro del nódulo. Estos nódulos crecen de manera que las células invadidas senescentes se encuentran próximas a la raíz, mientras que las células con bacteroides funcionales ocupan la parte central del nódulo, resultando en un gradiente de etapas de desarrollo. Los nódulos determinados carecen de un meristema persistente, son redondos y no presentan un gradiente de desarrollo como los indeterminados.

Monza et al. (2004) señalan que la planta utiliza el nitrógeno proporcionado por la bacteria en forma de amonio para sintetizar sus aminoácidos, otorgando a cambio fuentes de carbono y un ambiente propicio para el desarrollo del microorganismo. El nódulo proporciona además condiciones óptimas para que se dé la FBN. Dado que el complejo nitrogenasa es irreversiblemente inactivado por O_2 , los diazótrofos han desarrollado distintos mecanismos de protección. En el caso de los rizobios el mecanismo de protección está dado por la barrera física que significa la presencia del bacteroide dentro de las células del hospedero. Por otra parte, el proceso de FBN es costoso energéticamente y requiere de una tasa de respiración activa. Para cubrir estas necesidades, las células del nódulo cuentan con una alta concentración de leghemoglobina. La leghemoglobina es una hemoproteína monomérica que actúa como proteína de transporte con alta afinidad por el O_2 , cuya función es mantener un correcto suministro de oxígeno en el nódulo de manera que sea suficiente para que tenga lugar la respiración celular pero no afecte la fijación de nitrógeno.

Amarelle (2016) indica que el hierro tiene un papel fundamental en el ciclo de vida de los rizobios. En el suelo y la rizósfera es importante para la sobrevivencia y competencia de la bacteria mientras que en la asociación con la planta es necesario para la correcta formación y desarrollo del nódulo así como para que se dé una fijación de nitrógeno efectiva.

Racca et al. (2001) manifiestan que la alfalfa (*Medicago sativa* L.) cuando está correctamente asociada a cepas específicas de *Sinorhizobium meliloti*, la alfalfa cumple un rol fundamental en el sostenimiento de la estructura y la fertilidad nitrogenada de los suelos en los que crece. Para alcanzar un desarrollo sustentable en lo relacionado al nitrógeno, la alfalfa depende de su capacidad simbiótica para incorporarlo de la atmósfera. En este sentido, las estimaciones sobre la cantidad de N fijado por la alfalfa varían entre 70 y 400 kg N ha⁻¹ año⁻¹, lo que equivale a 33 y 83% del N total acumulado en el forraje, respectivamente.

1.3.3 Bacterias fijadoras de nitrógeno

Amarelle (2016) menciona que las bacterias que fijan nitrógeno en simbiosis con leguminosas en estructuras especializadas denominadas nódulos, son designadas colectivamente rizobios. La palabra rizobio deriva del griego rhiza (raíz) y bios (vida). Hasta hace muy poco tiempo se consideraba que los rizobios pertenecían únicamente a la clase α -Proteobacterias y al orden Rhizobiales restringiéndose esta característica a cinco géneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium/Ensifer*. El estudio de microsimbiontes asociados a leguminosas de escaso uso agronómico permitió el descubrimiento de otros rizobios. En la última actualización (año 2013) del sitio de la Universidad de México dedicado a la taxonomía de rizobios, se reportaron un total de 133 especies de rizobios pertenecientes a 12 géneros dentro de las α -Proteobacterias: *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium/Ensifer* y *Shinella*. Con el avance actual en técnicas de secuenciación masiva y la posibilidad de disponer de genomas bacterianos completos, el área de la sistemática se ha visto revolucionada y la clasificación bacteriana sometida a un proceso de reevaluación. Los rizobios no son ajenos a esta reestructura y es así que frecuentemente surgen nuevos género de rizobios y nuevas reordenaciones. Por ejemplo recientemente se han agregado los géneros *Neorhizobium* y *Pararhizobium* y se han encontrado rizobios pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus* del grupo de las β -Proteobacterias.

Philippot et al. (2013) señalan que además de establecer asociaciones simbióticas con leguminosas, los rizobios son microorganismos saprófitos que habitan en el suelo, condición denominada “vida libre”. Suelen localizarse en la superficie de las raíces (rizoplasma), en el suelo que rodea inmediatamente la raíz (rizósfera) y en menor cantidad en suelos no rizosféricos. La rizósfera se define como la zona influenciada por compuestos liberados por la planta a través de sus raíces. Se estima que las plantas liberan entre un 20 % y un 50 % de sus fotosintatos a través de sus raíces. La rizósfera es considerada el mayor y uno de los más complejos ecosistemas de la Tierra donde una gran cantidad de organismos macroscópicos y microorganismos conviven, encontrándose entre ellos a los rizobios.

Pini et al. (2011) señalan que un tipo de bacterias muy importante a nivel agronómico es el formado por aquéllas que son capaces de establecer simbiosis mutualistas específicas con plantas leguminosas. En este grupo se enmarcan muchas de las especies pertenecientes al orden Rhizobiales, a las que colectivamente se les denomina rizobios. Entre ellas encontramos bacterias de los géneros *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (o *Ensifer*), *Azorhizobium* y *Methylobacterium*.

Salas (2015) indica que los rizobios son α - y β -proteobacterias habitantes del suelo que han adquirido, por transferencia horizontal de genes la capacidad de asociarse en simbiosis con raíces de plantas leguminosas para formar nódulos radiculares fijadores de nitrógeno atmosférico. Si bien la taxonomía de los rizobios está siendo revisada continuamente, la clasificación actual basada en criterios moleculares, aunque no es definitiva, agrupa a los rizobios en 14 géneros de α -proteobacterias: *Agrobacterium* (*Rhizobium*), *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) y 3 géneros de β -proteobacterias: *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Herbaspirillum*.

Brunel et al. (1988) indican que los rizobios son saprófitos de vida libre capaces de persistir por largos periodos de tiempo en el suelo o en las cercanías de las raíces.

Finan et al. (2007) señalan que la capacidad de adaptación de los rizobios a un ambiente tan complejo y heterogéneo como el suelo, sumado a la habilidad de estas bacterias de establecer interacciones simbióticas con las plantas se encuentra reflejada en el tamaño de sus genomas, los cuales tienden a ser grandes y multipartitos, conteniendo un gran número de genes asociados a un metabolismo diverso, al transporte y a la tolerancia a estrés. Los genes relevantes para la infección y la fijación de nitrógeno, en general, suelen encontrarse agrupados en plásmidos (pSym) o en islas genómicas (SIs, del inglés: Symbiotic Islands).

1.3.4 *Sinorhizobium meliloti*

Taxonomía

Según De Lajudie et al. (1994), *Sinorhizobium meliloti* tiene la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Alphaproteobacteria
Orden	: Rizobiales
Familia	: Rizobiaceae
Género	: <i>Sinorhizobium</i>
Especie	: <i>Sinorhizobium meliloti</i>

Amarelle (2016) indica que el género *Sinorhizobium*, deriva del latín medieval Sino (China), fue identificado originalmente en el año 1988 como un aislamiento de crecimiento rápido proveniente de soja en China. Con esa denominación se pretendía resaltar la diferencia con el género *Bradyrhizobium* (de brady: lento) al cual pertenecían los clásicos simbioses de soja.

Geddes et al. (2014) señalan que el *Sinorhizobium meliloti* es un bacilo gram-negativo, no esporulado, heterótrofo y aerobio. Como todos los rizobios, *Sinorhizobium meliloti* debe ser capaz de prosperar tanto en un medio complejo y competitivo como es la rizósfera, así como intracelularmente una vez establecida la simbiosis. Esto exige una gran versatilidad por parte de estos microorganismos que se ve reflejada a nivel del genoma. El *Sinorhizobium meliloti* presenta un genoma

complejo y de gran tamaño que le confiere una gran capacidad metabólica y le proporciona ventajas a la hora de adaptarse a los distintos nichos que coloniza.

Willems et al. (2003) al comparar cepas aisladas de *Ensifer* y *Sinorhizobium* concluyeron que *Ensifer* y *Sinorhizobium* eran sinónimos y propusieron mantener el nombre *Sinorhizobium* para ambos géneros.

Sawada et al. (2003) realizaron una revisión de la sistemática de rizobios, donde concluyen que efectivamente el género *Sinorhizobium* se agrupa con el género *Ensifer* y deberían ser amalgamados. Dado que el nombre *Ensifer* fue publicado primero, éste tendría prioridad y sería el apropiado, sin embargo, ambos nombres se siguen usando en la literatura. En esta tesis utilizaremos el nombre *Sinorhizobium* por ser el más conocido y utilizado en el ámbito de la rizobiología.

Según De Lajudie et al. (1994) el género *Sinorhizobium* pertenece a la familia Rhizobiaceae y está compuesto por 13 especies siendo una de ellas, *Sinorhizobium meliloti*.

Van Rhijn et al. (1995) indican que el *Sinorhizobium meliloti* es capaz de establecer asociaciones simbióticas principalmente con leguminosas del género *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*, induciendo la formación de nódulos indeterminados, característicos de estas especies vegetales. La simbiosis *Sinorhizobium meliloti* – *Medicago sativa* (planta conocida con el nombre vernáculo de alfalfa) es una de las interacciones bacteria-planta mejor estudiada.

Genoma de *Sinorhizobium meliloti*

Según Amarelle (2016) el tamaño del genoma de los rizobios varía entre 5,4 Mb y 9,2 Mb y el número de plásmidos que presentan varía entre 0 y 7. Muchos rizobios presentan plásmidos de gran tamaño, conocidos como megaplásmidos. Estos megaplásmidos tienen un tamaño mayor a 500 Kb y en algunos genomas contienen genes esenciales, haciendo que la distinción entre plásmidos y cromosomas en algunos casos no sea tan clara.

Harrison et al. (2010) definieron en el año 2010 una nueva clase de replicón, el crómido, en el que proponen tres criterios para definir un crómido: i) presentan sistemas de mantenimiento y replicación típicos de plásmidos; ii) presentan una composición nucleotídica similar a la del cromosoma; iii) poseen genes esenciales que se encuentran en el cromosoma en otras especies.

Galibert et al. (2001) indica que *Sinorhizobium meliloti* posee un genoma de 6,7 Mb distribuido en tres replicones, un cromosoma de 3,67 Mb y dos megaplásmidos pSymA y pSymB de 1,35 y 1,68 Mb, respectivamente. La primera bacteria del género *Sinorhizobium* completamente secuenciada fue *S. meliloti* 1021 elegida como cepa modelo.

Martínez (2013) informa que hasta mayo de 2013 existían seis genomas de cepas de *Sinorhizobium meliloti* totalmente secuenciados además del 1021. Estas son SM11, AK83, BL225C, GR4, Rm41 y 2011. El genoma de la cepa CCNWSX0020 aparece como borrador en la base de datos del NCBI, en la que también encontramos nuevos proyectos de secuenciación de varias cepas de *Sinorhizobium meliloti*.

Barloy et al. (2009) y López et al. (2012) indican que en general, el genoma de los rizobios es multipartito, compuesto habitualmente por un cromosoma y varios plásmidos (hasta 11 en *R. leguminosarum*) de diferente tamaño (desde 45 kb hasta alrededor de 2'5 Mb, siendo los plásmidos de pequeño tamaño poco comunes en rizobios). Todas las cepas de *Sinorhizobium meliloti* secuenciadas portan al menos dos replicones además del cromosoma, denominados megaplásmidos o plásmidos simbióticos por contener genes implicados en la simbiosis. En la cepa 1021, el megaplásmido de menor tamaño se denomina pSymA, y porta los genes necesarios para la nodulación (genes *nod*) y la fijación de nitrógeno (genes *fix* y *nif*). El megaplásmido de mayor tamaño, denominado pSymB, se caracteriza por contener grupos de genes involucrados en la síntesis de exopolisacáridos (requeridos para una nodulación efectiva), aunque también presenta genes asociados a otros procesos esenciales, como los genes *dctA*, *dctC* y *dctBD* del sistema de transporte de dicarboxilatos necesario para la fijación de nitrógeno o genes implicados en el catabolismo y transporte de azúcares. Este megaplásmido es considerado un

cromosoma verdadero por contener regiones necesarias para la viabilidad de la célula, mientras que pSymA es considerado un plásmido puesto que se pueden obtener células curadas de él.

Martínez (2013) indica que además de estos plásmidos simbióticos, en el genoma de *Sinorhizobium meliloti* podemos encontrar plásmidos dispensables para la simbiosis, denominados plásmidos accesorios o crípticos, que aparecen en bajo número de copias. La inestabilidad de este tipo de plásmidos se ve contrarrestada por la presencia de genes necesarios para el crecimiento o la supervivencia, lo cual hace que se mantengan en la población. Por tanto, la importancia de esta bacteria, que ha sido estudiada desde hace más de 30 años, radica en el elevado grado de competitividad que presenta cuando se compara con otras cepas del mismo género.

Martínez et al. (2010) menciona que en el género *Sinorhizobium* se han identificado tres copias del gen ribosomal. Plásmidos grandes e incluso megaplásmidos son comunes en estas especies y en algunos casos los genes simbióticos están localizados en un megaplásmido. La especie tipo, *Sinorhizobium meliloti* fue transferida del género *Rhizobium* y ha sido estudiada extensamente. En esta especie son comunes dos megaplásmidos, megaplásmido 1 (plásmido Sym) y megaplásmido 2 (plásmido Exo), con respectivos pesos moleculares de 1700 y 1400 kbp. En varios laboratorios se obtuvo las secuencias completas del cromosoma y los megaplásmidos.

1.3.5 Factores que afectan la simbiosis

Castillo (1989) indica que la fijación de nitrógeno es afectado por los siguientes factores:

- Factores físicos. Principalmente influyen en el desarrollo de la nodulación y fijación la temperatura y la humedad. La temperatura adecuada para la formación de los nódulos es de a lo menos 10 a 15°C y para la fijación simbiótica el óptimo es de 25 a 30°C. La humedad debe ser la suficiente para una buena colonización de las raíces por los rizobios y posteriormente tiene que ser aquella conveniente para el normal desarrollo de la planta. Condiciones extremas, sequías, por ejemplo, pueden no solamente afectar el desarrollo de la

planta, sino también impedir la infección de las raíces; igualmente son perjudiciales a ambos simbioses.

- Factores biológicos. En este aspecto se considera tanto la competencia de la cepa seleccionada con cepas nativas, como la actividad antagónica de organismo productores de antibióticos como los Actinomycetes, etc.

Factores físicos

• Temperatura

Según Castillo (1989) la temperatura adecuada para la formación de los nódulos es de a lo menos 10 a 15°C y para la fijación simbiótica el óptimo es de 25 a 30°C. Vincent (1965) manifiesta que la temperatura ejerce una influencia en todos los estados de asociación, formación y función de los nódulos presentando un óptimo entre 18 – 28 °C. Day (1979) indica que la temperatura óptima para nodulación y fijación de nitrógeno durante el crecimiento precoz por las especies de zona templada está entre los 20 – 25 °C y por las especies tropicales es de 25 – 35 °C. Los rangos de temperatura en que se encuentra la nodulación efectiva dependen de las especies y están controladas genéticamente por el huésped y el rizobio.

• Aireación

Stewart (1966) afirma que para una óptima fijación del N se requieren valores de oxígeno de 0.5 atm, esto indica que el requerimiento de la tensión del oxígeno en la formación de nódulos es extremadamente baja.

• Humedad

Según Holland et al. (1969) las condiciones adversas de humedad del suelo tienen acentuada influencia en la fijación del N, tanto en suelos anegados como secos, cerca al punto de marchitez permanente, tienen un efecto negativo en la simbiosis efectiva y cantidad de nitrógeno fijado. La humedad debe ser la suficiente para una buena colonización de las raíces por los rizobios y posteriormente tiene que ser aquella conveniente para el normal desarrollo de la planta. Condiciones extremas, sequías, por ejemplo, pueden no solamente afectar el desarrollo de la planta, sino también impedir la infección de las raíces; igualmente son perjudiciales a ambos simbioses.

Tang (1986) manifiesta que el agua es esencial para el crecimiento de las plantas e influye en el proceso de fijación simbiótica del N. En general, condiciones de humedad demasiadas bajas o altas van a producir trastornos, en el segundo caso debido a la merma del oxígeno que puede ocurrir por el encharcamiento que impide la toma de oxígeno, importante elemento para el metabolismo de la raíz y el proceso de fijación.

Day (1979) menciona que un trabajo realizado sobre la supervivencia de tres especies de *Rhizobium* encontró que *Rhizobium trifolii* tuvo más tolerancia a la sequía que *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium de lotus*.

- **Luz**

Tang (1986) señala que la luz ejerce un gran efecto sobre la fijación simbiótica de nitrógeno debido a su relación con la fotosíntesis, ya que en presencia de esta las plantas van a formar las sustancias necesarias para desarrollar eficientemente dicho proceso.

Feigenbaum et al. (1979) notaron que la disminución de la intensidad de la luz provocaba un descenso en el rendimiento de hojas, tallos y raíces producto de la menor actividad fotosintética, lo cual afecta el proceso de fijación ya que alrededor del 4-5% del total de compuestos fotosintetizados son trasladados a los nódulos y sirven al rizobio para su desarrollo. En algunos casos este transporte de sustancias es mayor y llega a estar entre el 10 y 30% del producto fotosintetizado total.

Day et al. (1969) indican que el peso de los nódulos y el tiempo de nodulación se ven afectados por la variación de la intensidad de la luz y la duración del día. Asimismo señala que la nodulación puede llevarse a cabo en completa oscuridad o baja intensidad de la luz. La infección del pelo radicular normalmente puede ocurrir en la oscuridad, aunque el crecimiento y desarrollo de los nódulos depende mucho más de la luz que el proceso de infección.

Factores químicos

Castillo (1989) indica que los factores químicos son importantes desde el punto de vista de la planta, ya que se sabe que cada especie de leguminosa desarrolla a un pH determinado, así mismo, se conoce que los *Rhizobium* se comportan también de diferentes maneras frente al nivel del pH del suelo. Así tenemos que:

- *Rhizobium phaseoli* (actualmente *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*) se desarrolla hasta pH 3.5
- *Rhizobium meliloti* (actualmente *Sinorhizobium meliloti*/*Ensifer meliloti*) requiere un mínimo de pH 5.5
- *Rhizobium trifolii* (actualmente *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*) se comporta bien entre pH 3.5 y 5.5, soportando hasta pH 8.9

Vidor et al. (1983), indica que el pH del suelo constituye uno de los principales factores limitantes en la fijación de nitrógeno por las leguminosas, debido al retardamiento o suspensión de la formación de nódulos. Sus efectos pueden ser directos, a través de la influencia sobre la sobrevivencia de la bacteria, o indirectamente por la mayor disponibilidad de nutrientes, en presencia de elementos tóxicos. La acidez del suelo, va normalmente asociada con la toxicidad del aluminio y manganeso, baja disponibilidad de nutrientes como calcio, magnesio y molibdeno, especialmente para la simbiosis.

Tang (1986) indica que es necesario tener en cuenta también los factores químicos y nutricionales en la fijación simbiótica del N₂, ya que la acción individual o combinada de ellos puede determinar el éxito o fracaso de la misma. Estos dos factores (pH y Ca) están muy relacionados con la toxicidad del Al y la del Mn que se ven incrementados a pH de 4,5 o menores, afectando considerablemente el rendimiento de la planta y su nodulación. Los macroelementos N, P y K poseen diversas e importantes funciones en la planta, las cuales están directa o indirectamente ligadas al proceso de nodulación. Aplicaciones adecuadas de N en pequeñas cantidades pueden estimular la nodulación; ocurre lo contrario al aplicar mayores dosis. Por su parte, el P es necesario para las leguminosas y está muy vinculado con el sistema energético que facilita la energía para este proceso;

mientras que el K se sabe que influye, pero aún no está clara su participación en el mismo, aunque se relaciona con la fotosíntesis y el traslado de compuestos fotosintetizados a los nódulos. Es necesario efectuar el control de otros micronutrientes como Mo y Co, ya que ellos forman parte de una serie de enzimas y coenzimas que actúan en distintas reacciones relacionadas con el proceso de fijación simbiótica. Otros micronutrientes como el Fe, Zn, Bo, etc., pueden también afectar en mayor o menor grado la fijación de N participando de forma directa o indirecta.

Peña et al. (2000) manifiestan que la acidez, así como la concentración de calcio, aluminio y magnesio, interactúan y afectan tanto la proliferación bacteriana, la infección de los pelos radicales y el crecimiento de las plantas.

Factores nutritivos

Castillo (1989) indica que la nodulación y el volumen de su tejido son inversos a la cantidad de nitrógeno del suelo. Los nitratos inhiben en mayor grado la fijación de nitrógeno que las sales amoniacales. En cuanto a la relación carbono/nitrógeno, indican que mientras más amplia sea la relación carbono/nitrógeno mejor es la fijación de este último elemento. Es decir a mayor cantidad de carbono, por ejemplo restos de cultivo, mejor es la actividad de las cepas eficientes de *Rhizobium*.

Trigoso (1970) señala que deficiencias de nutrimentos minerales afectan al crecimiento de la leguminosa así como la formación de los nódulos, la fijación del nitrógeno en los nódulos y la capacidad de las plantas para utilizar el nitrógeno que es fijado. Entre los nutrientes que cumplen un papel muy importante se encuentran: calcio, magnesio, fósforo, molibdeno, boro. Además de ellos existen otros que juegan un papel importante en la formación y desarrollo del nódulo, así como también en la fijación del N atmosférico, entre estos se cuentan azufre, potasio, nitrógeno, cobalto, cobre, hierro, cloro y manganeso.

Factores genéticos

Castillo (1989), indica que tanto el aspecto genético de la planta como la cepa de *Rhizobium* son importantes. Por ejemplo, una planta no inoculada tiende a aumentar las raíces laterales, en desmedro de la principal. La planta determina el volumen del

tejido activo del nódulo, la cepa del *Rhizobium* determinan la virulencia o agresividad de infección y además la eficiencia en la fijación de nitrógeno. Esto realza la importancia de un buen inoculante elaborado con cepas de alta efectividad

1.4 INOCULACIÓN DE SEMILLAS

Erdman (1968) indica que desde 1886 se hace uso del sistema de inoculación.

Por su parte Castillo (1989) indica que la inoculación de semillas tiene como objetivo la fertilización nitrogenada de estas plantas.

Bologna (2014) menciona que los objetivos de la inoculación son:

- Mejorar la velocidad de implantación de las leguminosas y adelanta los primeros pastoreos.
- Mayor producción total de forraje de la pastura durante su ciclo productivo.
- Aumentar la concentración de N y proteína en el forraje mejorando su valor nutritivo.
- Sustitución parcial de fertilizantes nitrogenados mejorando los resultados económicos de los productores.
- Mayor sustentabilidad de los sistemas de producción pastoriles al utilizar recursos naturales renovables (energía solar y nitrógeno del aire).
- Mejorar la fertilidad de los suelos y contribuir a mejorar los rendimientos de grano en rotaciones de pasturas con cultivos.

Solid OPD (2010) menciona que la inoculación consiste en incorporar cepas de *Sinorhizobium* a las semillas de las leguminosas antes de la siembra; el propósito es mejorar la implantación de la especie. Este proceso se realiza bajo sombra, evitando la exposición directa a los rayos solares. Las bacterias del género *Sinorhizobium* son microorganismos del suelo y al ser mezclados adecuadamente con las semillas de las leguminosas (alfalfa y trébol) van formando nódulos (nudos) en las raíces de estas especies, aquí acumulan nitrógeno del aire en forma simbiótica. Sólo puede existir fijación de nitrógeno cuando las leguminosas y el *Sinorhizobium* entran en asociación simbiótica. A pesar de existir varias características bien estudiadas de los *Sinorhizobium* y *Rhizobium*, ninguno de ellos tiene una acción general para todas las

especies. Las cepas son capaces de producir nódulos específicos en el huésped (existen cepas para alfalfa, para tréboles y cultivos como arveja). La cantidad de nitrógeno fijado está en íntima relación con el número de raíces, raicillas y pelos radiculares producidos por las leguminosas. Es por esta razón que, si las condiciones del suelo –fertilidad, aireación, nutrientes- son adecuadas, las perennes producen más nitrógeno que las anuales. También menciona que existen diferentes métodos de inoculación. Los más conocidos son: Inoculación simple y pelletizado de la semilla.

DGPA (2005) menciona que las leguminosas como la alfalfa, el trébol, y el lotus, tienen la habilidad de formar una relación simbiótica con una bacteria del suelo llamada rizobio. Un método de inoculación antes de la siembra es el de preparar una suspensión del inoculante, con agua azucarada según las recomendaciones del fabricante, para cubrir la semilla desnuda. Esta semilla inoculada debe usarse inmediatamente ya que los rayos del sol matan a las bacterias pero puede ser guardada en un lugar fresco y oscuro como máximo 24 horas. Para preparar la suspensión debe usarse agua limpia y sin residuos de pesticidas y definitivamente evitar el agua químicamente tratada (agua clorada). Este método es recomendable cuando la semilla es sembrada bajo condiciones favorables del suelo. Cuando las condiciones del suelo son desfavorables como por acidez (< 5.2) o sequedad, la supervivencia del rizobio puede lograrse pelletizando la semilla con goma arábica y carbonato de calcio micropulverizado. Pero desde que este último método es dificultoso para producir una alta calidad de semilla inoculada es mejor adquirir semilla comercialmente pelletizada. Fertilizantes de reacción neutra como el superfosfato si se pueden usar con la semilla inoculada con agua azucarada. La cobertura comercial Standard usada para pelletizar la semilla con el inóculo contiene cal finamente molida a la que se le puede agregar azufre y molibdeno dependiendo de las deficiencias que se presenten en suelo. Como exposición a altas temperaturas causa la muerte rápida del inoculante los paquetes deben ser refrigerados hasta su uso, pero de ninguna manera se deben congelar.

Racca et al. (2001) menciona que la inoculación es la tecnología desarrollada con la finalidad de incorporar rizobios altamente infectivos y altamente eficientes en las leguminosas de interés agropecuario. El proceso productivo comienza con una

exhaustiva selección de las cepas de rizobios contemplando infectividad y efectividad en laboratorio, invernáculo y campo. Las cepas más eficientes son aquellas que tienen mayor cantidad de nódulos medianos y grandes, arracimados y/o palmados siendo rojos en su interior, ubicados en raíz primaria y tienen rápida y prolongada fijación. Acompañada por una mayor producción de materia seca y de peso total de N.

En cambio las rizobios menos eficientes tienen nódulos más pequeños, ubicados en raíces secundarias y tienden a paralizar la FBN en etapas más tempranas presentando en esos casos nódulos de coloración verde. Los biotipos ineficientes tienen nódulos pequeños, alargados y son en su interior blancos desde etapas muy tempranas. Estos no realizan la FBN y son consideradas cepas parásitas. Además indica que hay tres maneras de incorporar los rizobios: Inoculación convencional, pelletización y la preinoculación y pelletización.

1.4.1 Los inoculantes

Castillo (1989), indica que la inoculación consiste en la aplicación de un cultivo de cepas seleccionadas y específicas de bacterias del género *Rhizobium* a las semillas. Este cultivo recibe el nombre de inoculante de leguminosas, que pueden ser de diferentes clases de acuerdo a su presentación física como:

Inoculantes líquidos.- Son cultivos bacteriológicos que se comercializan en los frascos originales de multiplicación. Se caracterizan por su alta concentración de *Rhizobium* por mililitro y poseen una vida más limitada que la mayoría de los otros tipos. Se puede aplicar al suelo. También se adaptan para ser utilizados en mezcla con algunos fertilizantes apropiados e inofensivos para las bacterias, como también pueden ser directamente empleados junto a la semilla o pelletizados junto a ella.

Cultivos liofilizados.- Son aquellos en que los gérmenes son deshidratados a bajas temperatura y se envasan en ampollas de vidrio. Tienen la ventaja de su larga duración, pero por el contrario poseen una elevada mortalidad de gérmenes. Pueden ser utilizados con las semillas. Su utilización comercial no es común.

Caldos Concentrados.- Son una forma modificada de los inoculantes líquidos, en que se elimina una gran parte del agua del cultivo hasta lograr formar bloques sólidos. Se utilizan en tratamientos a la semilla y son de corta vida útil.

Los inoculantes granulados.- Se pueden aplicar al suelo o previa mezcla con fertilizantes apropiados. Su vida es prolongada en términos generales, variando según cada material constituyente. Presentan un costo más alto que otros inoculantes, y por su volumen, muchas veces son incómodos de manejar en condiciones favorables para quienes los comercializan. Se producen en turba, yeso, en poliacrilamida (PER), alginatos (AER) o en xantatos (XER).

Inoculantes en turba.- Son los más conocidos y difundidos, prácticos por su apropiada vida útil y fácil conservación y manejo. Es un medio de cultivo muy favorable para el desarrollo de los *Rhizobium* y excelente medio de conservación para estas bacterias.

Otra forma de clasificar a los inoculantes se refiere a su forma de aplicación: inoculantes aplicados a la semilla, al suelo o a los fertilizantes.

Castillo (1989), menciona que en términos generales, se considera que los inoculantes deben poseer un mínimo de 1×10^9 *Rhizobium* viables por gramo en fábrica, y un 1×10^8 por gramos hasta el término de su vida útil. De igual manera, Racca et al. (2001), consideran que un buen inoculante para alfalfa debe proveer abundante número de rizobios por g de producto. La exigencia es de 1×10^9 rizobios por g de producto a la elaboración y de 1×10^8 rizobios por g de producto al vencimiento de 6 meses.

1.4.2 Beneficios de la inoculación

Labandera (2007), indica que en Uruguay la inoculación en leguminosas forrajeras es una práctica muy extendida con porcentajes de adopción cercanos al 100 %. Esta situación representa para el sector agropecuario y para el país, un ahorro anual de unos 300 millones de dólares por sustitución parcial de fertilizantes nitrogenados, que hubiera sido necesario importar para alcanzar los actuales niveles de

productividad de las pasturas y de los cultivos. Aun así, estos sistemas no hubieran sido sustentables en el tiempo, puesto que el mecanismo de la fijación biológica es ecológicamente más estable y hace uso de un recurso natural renovable.

Bologna (2014), indica que la inoculación es una inversión muy rentable equivalente a fertilizante nitrogenado de origen biológico, ya que las leguminosas forrajeras inoculadas pueden satisfacer 80% de sus requerimientos de nitrógeno por fijación biológica y con nodulaciones eficientes la fijación biológica para distintas especies puede alcanzar a 200-400 kg de N por año. Se estima un promedio de 30 kg N fijado por cada tonelada de materia seca producida por la leguminosa. Las gramíneas asociadas se benefician por la transferencia y utilización de hasta un 60 % del nitrógeno fijado por las leguminosas.

Racca et al. (2001), mencionan que el sistema de FBN (fijación biológica del nitrógeno) en alfalfa en la región pampeana funciona adecuadamente, aportando a la producción forrajera de la especie cantidades muy significativas de N a lo largo de la vida del cultivo, con un promedio de $235 \text{ kg N ha}^{-1}\text{año}^{-1}$, solo en la fitomasa aérea, especialmente bajo condiciones ambientales favorables para el crecimiento de las plantas. Si bien, es posible que existan rizobios en el suelo, con la inoculación con cepas seleccionadas en leguminosas forrajeras se aumenta la eficiencia de la FBN, la calidad de la producción del cultivo y en muchos casos los rendimientos y los niveles de proteína del forraje. Esto se traduce potencialmente en mayor producción de carne y/o leche.

1.5 PELLETIZACIÓN DE SEMILLAS

Duran (1989) afirma que la primera iniciativa para recubrir semillas es ya bastante antigua. La primera patente relacionada con el recubrimiento de semillas fue emitida en 1868. Sin embargo, su aplicación comercial no despertó gran interés hasta 1940, año en que Volgelsang aparece como uno de los primeros defensores de la “pelletización” de semillas, tal es así que organizó la primera compañía comercial con el objeto de producir y comercializar semillas “pelletizadas”. La compañía CERES en el año 1946 fue la que registró la primera patente mundial para

“pelletizar” semillas de remolacha. Peñuelas (2002) afirma que en el año 1974, el 43% de los productores de cultivos hortícolas de EE.UU. utilizaban esta técnica.

Bologna (2014) menciona entre los objetivos del pelletizado los siguientes:

- El pelletrado facilita la manipulación manual y mecánica de las semillas.
- Elimina los problemas prácticos, las pérdidas de tiempo y los errores asociados a la inoculación, pelletrado y aplicación de pesticidas a campo.
- El recubrimiento incluye pigmentos coloreados que facilitan una rápida identificación de las semillas tratadas mejorando el control de la siembra.

Giménez et al. (1992) indican que como objetivo general la aplicación de técnicas de recubrimiento persigue la modificación de algunas de las características intrínsecas de las semillas de cada una de las especies utilizadas, tales como el tamaño que presentan algunas semillas o la necesidad de protección fitosanitaria que precisan los cereales u otros cultivos.

Entre los objetivos indica lo siguiente:

- Modificar el peso, tamaño y/o la forma inicial de las semillas. Constituye uno de los objetivos más importantes. Estas modificaciones ofrecen las siguientes ventajas:
 - a) Permiten la siembra directa de precisión, incluso con semillas pequeñas, ligeras o de forma irregular, como suelen ser las de numerosas especies hortícolas, ornamentales o forrajeras.
 - b) Mejoran la trayectoria y uniformizan la distribución de mezclas a base de semillas y abonos, especialmente en siembras aéreas.
 - c) Aumentan la capacidad (velocidad y uniformidad) de penetración de las semillas en el suelo cuando con utilizadas en siembras aéreas, sobre vegetación ya existente o superficies previamente inundadas, como puede ser el caso de arroz y
 - d) Facilitan la visibilidad y localización de las semillas, lo que resulta especialmente interesante en el cultivo de especies ornamentales y en jardinería donde la realización de semilleros o el empleo de embalajes especiales es una práctica frecuente.

- Posibilitar el establecimiento de un microambiente más favorable para que los microorganismos útiles que hayan sido inoculados a las semillas puedan desarrollar plenamente su actividad.
- Proteger las semillas contra posibles ataques de hongos, insectos, pájaros y roedores, a través de la incorporación de productos fitosanitarios y repelentes.
- Posicionar y dosificar correctamente el suministro de nutrientes adecuados a las necesidades iniciales de cada cultivo.
- Aportar sustancias especialmente útiles o beneficiosas para la germinación de las semillas y el desarrollo inicial de las plántulas, tales como reguladores de crecimiento, vitaminas o sustancias capaces de liberar oxígeno.
- Potenciar la captación y el mantenimiento de la humedad en el microambiente que circunda cada semilla, a través de la incorporación de materiales específicos (turba, vermiculita, etc) durante el recubrimiento.
- Permitir un cierto control del tiempo necesario para que la germinación pueda producirse, a través del uso de sustancias estimulantes o retardantes del crecimiento.
- Facilitar el manejo de las malas hierbas con la incorporación de herbicidas selectivos o antídotos de los mismos.
- Aumentar la vida media (longevidad) del lote de semillas, manteniendo los beneficios de algún tratamiento suministrado a las semillas durante el periodo de almacenamiento.
- Ahorrar mano de obra, labores, semillas, etc. lo que reduce considerablemente los costos totales del cultivo.

Ferrari (2008), indica que las semillas pelleteadas poseen ventajas respecto a las semillas sin pelletear, el recubrimiento al ser higroscópico mejora la absorción del agua permitiendo una germinación más uniforme, los terapicos (funguicidas, insecticidas) las protegen de las adversidades que se presentan en el nacimiento como el ataque de hongos de suelo, de insectos. Además se pueden incorporar micronutrientes para una rápida disponibilidad de éstos en el momento de la emergencia radicular, mejorando el vigor de las plántulas. En el caso de leguminosas la pelletización asegura una concentración de bacterias infectivas sobre la semilla lo

que dará como resultado una buena nodulación, indispensable para una excelente fijación simbiótica del nitrógeno. También el autor añade que las semillas pelleteadas poseen un valor agregado que se refleja en una mejor implantación de la pastura y por ende en una mayor productividad.

DGPA (2005), indica que la pelletización de semillas se hace con la finalidad de evitar que la semilla sea atacada por agentes nocivos o para introducir en el suelo algunos microelementos deficitarios que afecten la germinación, crecimiento de la plántula y productividad de la pastura. Los insecticidas, fungicidas y nematocidas son las comúnmente usadas en las semillas comerciales para evitar que las semillas y las plántulas sean atacadas por agentes patógenos; pero, también existen coberturas de *Sinorhizobium*, molibdeno y carbonato que garantizarán que las bacterias nitrificantes puedan vivir y desarrollen la inoculación en las raíces de las leguminosas (simbiosis). Este último tipo de protección se realiza principalmente en las semillas de leguminosas como la alfalfa, trébol blanco y trébol rojo y al incrementar su peso, determina que haya menos semillas por kilogramo por lo que los ratios de siembra deben ser incrementados. En general se recomienda incrementar un 40 – 50% del peso definido, con lo cual se garantizará mantener el número de plantas por hectárea.

Racca et al. (2001) por su parte indican que la pelletización es una tecnología que permite extender el período de supervivencia de los rizobios sobre la semilla y por otra parte adecua al medio ambiente que rodea la semilla logrando una mejor implantación de la pradera. Entre las ventajas podemos mencionar una mayor protección en suelos ácidos y en condiciones de deficiencia hídrica en el momento de la siembra, evitando la germinación hasta que los niveles de humedad se eleven a valores cercanos a capacidad de campo.

Alarcón et al. (2000), indican que la pelletización, gracias a la característica de encapsulamiento de la semilla es una tecnología atractiva para los agricultores ya que permite el establecimiento exitoso de un cultivo agronómico. Este depende de varios factores como vigor de semilla, tipo de suelo y fertilidad, condiciones climáticas, ausencia o presencia de organismos antagonistas o benéficos como insectos,

micorrizas u otras plantas. Los agricultores pueden controlar algunos de estos factores aplicando herbicidas o fertilizantes químicos. Sin embargo, la aplicación de estos compuestos químicos puede ser costosa y el uso inadecuado podría causar grandes pérdidas económicas, degradación física y pérdida biológica del suelo. El uso de inoculantes, se convierte entonces, en una alternativa amigable con el medio ambiente, ya que su aplicación a los campos de cultivo favorece la disminución de fertilizantes químicos que ocasionan la degradación de suelos.

Bologna (2014), menciona que el pelleteado es la cobertura de las semillas con materiales de recubrimiento usando adhesivos específicos. Cuando se usa en leguminosas forrajeras el pelleteado incluye la inoculación a base de rizobios específicos y también puede incluir micronutrientes, funguicidas y/o insecticidas.

Capalbo et al. (2007), indican que la pelletización es una técnica que aporta condiciones óptimas para la germinación y desarrollo de las plántulas, logrando mayor eficiencia de implantación y nodulación que las semillas naturales. Con esta técnica de recubrimiento, también denominada incrustado, las semillas conservan su forma mientras son recubiertas por capas de diferentes insumos: terapicos (fungicidas e insecticidas), inoculantes (con *Rhizobium* spp, *Sinorhizobium* spp.), pigmentos, micronutrientes, fertilizantes, adhesivos y, por último, un inerte que puede ser talco, bentonita o carbonato de calcio. Puede ser aplicado tanto a leguminosas como a gramíneas, siendo requisito indispensable una semilla de muy buena calidad. Es decir, semillas que no presenten alteraciones en sus cubiertas debido a daños mecánicos, ambientales y/o biológicos; sin semillas de malezas, inertes ni cuerpos extraños; que posean buen poder germinativo, dentro de tolerancias comerciales y que registren una humedad óptima, acorde a un buen almacenaje según la especie. Nocelli (2013) indica que la semilla pelleteada técnicamente se refiere a una acumulación de material de revestimiento, de 8 a 34% del peso de la semilla.

SOLID (2010) indica que el pelletizado de semillas se trata de un método mediante el cual las bacterias se mezclan con un adherente (gomina); luego, se recubre con un polvo de revestimiento, protegiendo a las bacterias de contingencias negativas que

comprometan su permanencia (existen empresas comerciales que realizan este trabajo con gran éxito).

Peñuelas (2002), afirma que los tratamientos de la cubrición de las semillas pueden ser de varias clases:

- Semilla pelletizada, cuando la capa que la recubre es fina y constante de forma que el tratamiento no modifica significativamente el peso y la forma original
- Semilla pildorada, cuando la aplicación del revestimiento modifica claramente el tamaño y forma de la semilla; además junto con el material de revestimiento se suele aplicar otras sustancias como: nutrientes, pesticidas, productos hidrofílicos, colorante, etc.

Por otro lado también indica que con el recubrimiento de la semilla, por cualquiera de los métodos anteriormente expuestos, se consigue una mayor protección frente a los agentes físicos y biológicos, además de una mayor captación de humedad debido a las características higroscópicas de las sustancias con las que se cubren y un incremento en el tamaño de las semillas favorece la siembra de precisión y el manejo de semillas excesivamente pequeñas. También presenta la ventaja de poder realizar junto con el revestimiento otras sustancias acorde a la necesidad u objetivo que tiene el productor.

Giménez et al. (1992) Afirman que la pelletización de las semillas consiste en envolverlas con diversos materiales, normalmente inertes, que sean capaces de lograr un conjunto de características favorables que en condiciones naturales no se obtendría; de tal forma, que afecten la semilla, el suelo y/o la superficie común a ambos, permitiendo así la oportunidad de acondicionar e influir sobre el microambiente de cada semilla.

1.5.1 Materiales utilizados en la pelletización de semillas de leguminosas

Dutto (2002), indica que respecto a los polvos de pelleteo, se han utilizado una enorme cantidad de productos, muchos de los cuales son totalmente inadecuados por ser muy ácidos o muy alcalinos, o por contener componentes tóxicos. Los mejores

resultados en cuanto a polvos de pelleteo se han obtenido con productos a base de carbonato de calcio finamente molido. Los adherentes protegen a los rizobios de la desecación, por lo que su uso es imprescindible.

Racca et al. (2001), indican que los materiales que contemplan son a) semilla, b) Inoculante, c) Adhesivo y d) Polvo de recubrimiento y si fuese necesario cura semillas compatibles. Entre los adhesivos que pueden utilizarse puede mencionar la goma arábica, los derivados de carboximetilcelulosa, etc. preparados que no dañen al rizobio, es decir no sean diluidos con agua clorada y con el pH ajustado entre 6,5 a 7,5. El carbonato de calcio extra liviano y precipitado es un buen ejemplo de polvo de recubrimiento recomendable. En un primer paso se agrega mezcla del inoculante con el adhesivo sobre la semilla y posteriormente se agrega polvo de recubrimiento tratando de no superar en ningún caso el 30% del peso de la semilla (no más de 300 g de polvo por kg de semilla). En caso del curasemilla se puede agregar en una nueva capa separándolo del inoculante. Estas operaciones pueden hacerse en mezcladoras de cemento sin paletas o con pelletizadoras (algunas empresas nacionales ya disponen de prototipos al alcance del productor, semilleros, etc. Para obtener el mejor provecho de este sistema se requiere el empleo de materiales de alta calidad y rigurosidad en el protocolo y sobremanera evitar las combinaciones indeseables que provoquen una falla parcial o total del procedimiento. Entre las fallas más comunes se encuentra el exceso de polvo de recubrimiento, adhesivo mal preparado, la excesiva pildorización que atenta incluso con la germinación de la semilla, dado que esta última necesita respirar. Una buena pelletización puede almacenarse desde poco días hasta un mes según calidad final del pellet y el polvo usado.

Giménez et al. (1992), mencionan que el recubrimiento de semillas se emplea básicamente dos tipos de materiales: los adhesivos y materiales de cobertura y acabado. Las semillas son mezcladas con un adhesivo de manera que cada semilla sea encubierta. Los adhesivos deben ser solubles en agua y son generalmente utilizando polímeros orgánicos, amidos, resinas naturales, azúcares, colas de origen animal y mucílagos vegetales que son dispersos en agua para producir un fluido pulverizable, luego son agregados los sólidos de recubrimiento. La tecnología actual de los adhesivos permite que sean seleccionadas de acuerdo con sus características

especiales, encaminadas a satisfacer las distintas necesidades buscadas en cada recubrimiento: a) Mayor afinidad para determinados sustratos; b) distintos grados de solubilidad o insolubilidad en agua; c) resistencia y plasticidad para evitar fracturas y pulverulencia y d) viscosidad apropiada para facilitar su aplicación. Al igual que en el caso de los adhesivos, los materiales de recubrimiento o cobertura son muy numerosos. La elección de uno u otro depende de varios factores: a) La especie a recubrir) los objetivos perseguidos con el recubrimiento) las condiciones ambientales a que será expuesto el cultivo y d) las posibles compatibilidades con otros materiales y tratamientos suministrados de forma combinada a las semillas. Entre los materiales a ser utilizados para tal fin pueden ser minerales (arcillas) u orgánicos. Estos últimos a su vez pueden ser de origen vegetal (serrín, cascarillas, etc) o animal (harina de huesos).

Peñuelas (2002) señalan que los materiales de recubrimiento pueden ser sustancias minerales u orgánicas tales como: limo, yeso, dolomita, roca fosfatada, montmorillonita y vermiculita. El tamaño de las partículas de estos materiales es fundamental para que no se produzcan aglomeraciones y para que la semilla pueda respirar. Si las partículas son demasiado finas se puede producir una depresión en la germinación, debido al menor intercambio de gases entre la semilla y el suelo. Por ello, se recomiendan que estos materiales tengan una porosidad entre el 15 y el 25%. Los materiales de recubrimiento se deben unir a sustancias adhesivas, como la goma arábica, gelatina, caseína o sales de caseinato, que eviten que el cubridor se rompa o quiebre con cualquier impacto.

Por otro lado Peters et al. (2003) señalan que el proceso de pelletizado de semillas es un método efectivo y barato y se hace de la siguiente forma: en un recipiente a la semilla escarificada se le agrega adherente (evitar excesos) que puede ser goma arábica, solución azucarada, miel o leche. Cuando las semillas están impregnadas con el adherente se agrega el inóculo, se revuelve para que el inoculante se mezcle bien con la semilla, y luego se agrega roca fosfórica o yeso para recubrir y sellar, dejándose secar a la sombra por media hora. Las semillas inoculadas no se deben dejar por más de un día antes de sembrar y no deben recibir calor. También se puede inocular el suelo aplicando una solución de agua y rizobio.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga situada en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho, a una altitud de 2750 msnm, cuyas coordenadas son 13°09'56" Latitud Sur y 74°13'40" Longitud Oeste.

2.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

Los materiales de recubrimiento (carbonato de calcio, roca fosfórica y harina de trigo) y adherentes (goma arábiga, maicena y melaza de caña) para la pelletización así como las semillas de alfalfa (variedad California 55), fueron adquiridas de una tienda garantizada ubicada en el distrito de Ayacucho, el inoculante con *Sinorhizobium meliloti* fue proporcionado por el laboratorio de Rhizobiología.

2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la distribución de las unidades experimentales se utilizó el Diseño Completamente al Azar con tres repeticiones por tratamiento y seis muestreos (0, 3, 7, 14, 21 y 28 días después del pelletrado).

El modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ijk} : Variable de respuesta de la ij -ésima unidad experimental

μ : es la media general

T_i : es el efecto de i-ésimo tratamiento, $i=1, 2, \dots, t$ tratamientos

ε_{ij} : Es el error experimental

2.4 MATERIALES EN ESTUDIO

2.4.1 Materiales adherentes

Goma arábica

Lopera et al. (2009) indican que la goma arábica (GA) es un biopolímero obtenido del exudado del árbol acacia, de la familia Leguminosae, como parte del proceso de cicatrización de estos árboles conocido como gomosis para cerrar sus heridas y evitar de esta manera la entrada de gérmenes. Es originaria de Egipto y de uso milenario. Es una resina de color ámbar, recolectada normalmente a mano una vez seca. También señalan que el material nitrogenado presente en la goma arábica es de carácter proteico, corresponde hasta al 10% del peso total, y en particular en las especies *Senegal* y *Seyal* está alrededor del 2%. Por esta razón se ha denominado a la goma arábica como complejo proteico-arabinogalactano, razón por el que posee un carácter anfifílico, lo que le permite absorber en superficies lipofílicas, actuar como coloide protector y, por ende, como un buen agente formador de películas. En efecto, la goma arábica es uno de los materiales formadores de película más efectivo para microencapsular; sin embargo, el costo y su limitada disponibilidad comercial, han restringido su uso a nivel industrial

Carpio et al. (2017) señalan que la estructura química de la goma arábica corresponde a un complejo polisacárido que contiene pequeñas cantidades de material nitrogenado, bajo contenido proteico, formado por una mezcla compleja de monosacáridos (ácido D-glucurónico, L-ramnosa, L-arabinosa y D-galactosa) y proteínas (glicoproteínas ricas en hidroxiprolina).

Maicena

Flores (2010) señala que la maicena, conocida también como fécula o almidón de maíz es un polímero de la dextrosa, constituido por una mezcla de dos tipos de polisacáridos; la amilopectina y amilosa. Esta última es la que le imparte la propiedad de formar gel al cocinarse. Los almidones se encuentran acumulados en estructuras llamadas gránulos, los cuales difieren en forma, tamaño y proporciones

de amilosa-amilopectina dependiendo su origen, confiriéndole propiedades fisicoquímicas y funcionales específicas. También señala que es utilizado como agente espesante, estabilizante, ligante, agente de volumen, formador de gel, aglutinante, fuente de carbohidratos, adhesividad y formación de película.

Por su parte Gennaro (2003) indica que el almidón de maíz se utiliza ampliamente como aglutinante, en concentraciones que varían del 10 al 20%. Por lo común se prepara tal como se lo ha de usar dispersando el almidón de maíz en suficiente cantidad de agua fría purificada y se entibia en un baño de agua con agitación continua, hasta que se forma una pasta translúcida. Durante la formación de la pasta no se hidroliza todo el almidón y por consiguiente, la pasta de almidón no solo es útil como aglutinante, sino que también se emplea como método para incorporar algún desintegrante en el interior de los gránulos.

Melaza de caña

Financiera Rural (2011) indica que la melaza es el residuo de cristalización final del azúcar, del que no se puede obtener más azúcar por métodos físicos. Se elabora mediante la cocción del jugo de la caña de azúcar hasta la evaporación parcial del agua que éste contiene, formándose un producto meloso semi-cristalizado. Su aspecto es similar al de la miel de abeja aunque de color parduzco muy oscuro, prácticamente negro. El sabor es dulce, agradable, según los expertos, cuanto más oscura sea, más sabor y nutrientes tendrá.

Michel (2009) señala que la melaza contiene de 75 a 83% de materia seca, 30 a 40% de sacarosa, 2.5 a 4.5% de compuestos nitrogenados (predominado aspartato y glutamato) y aproximadamente, 0.4 a 1.5% de nitrógeno. La melaza contiene de 26 a 40% de sacarosa y de 12 a 25% de azúcares reductores, con un contenido total de azúcar de más de 50 a 60%. El contenido de proteína cruda normalmente es bastante bajo (cerca del 3%) y variable, el contenido de ceniza varía de 8-10%, constituido principalmente por K, Mg, Ca, Cl y sales de azufre.

2.4.2 Materiales de recubrimiento

Carbonato de calcio

Sánchez et al. (2017) señalan que el carbonato de calcio, viene a ser un compuesto químico ternario, es decir formado por tres elementos distintos: Calcio, Carbono y Oxígeno; representado por la fórmula química CaCO_3 ; contiene 12% de carbono, 40.04% de calcio y 47.95% de oxígeno. Es también una sustancia muy abundante en la naturaleza ya que es el componente principal de algunas rocas y también de los esqueletos, valvas de ciertos organismos como los corales y conchas, también la cascara de huevo. Añaden también que comercialmente el carbonato de calcio se presenta de dos formas: molido y precipitado. El carbonato de calcio obtenido por molienda requiere de un proceso menos complejo al obtenido por precipitación ya que solo es necesaria la transformación física de la materia prima. Por otro lado, el carbonato de calcio precipitado, denominado como PPC (Precipitated Calcium Carbonate), es aquel que se obtiene por precipitación del calcio en forma de carbonato. Esta precipitación requiere de procesos físico-químicos como la calcinación, hidratación y carbonatación.

YADESA (2016) menciona que el carbonato cálcico o carbonato de calcio es el producto obtenido por molienda fina o micronización de calizas extremadamente puras, por lo general con más del 98.5% de contenido en CaCO_3 . Además indica que el carbonato de calcio es un polvo blanco con cristales incoloros, inodoros e insípidos, insoluble en agua y alcohol, soluble en ácidos con desprendimiento de anhídrido carbónico. Comparte algunas propiedades de otros carbonatos como es su reacción con ácidos fuertes, liberando dióxido de carbono, también reacciona con agua carbonatada para formar bicarbonato de calcio y su punto de fusión es de 825°C.

Nocelli (2013) indica que de acuerdo con algunas compañías de semillas, el revestimiento de carbonato de calcio, afecta el pH del suelo que rodea la semilla a medida que germina y contrarresta la acidez de otros fertilizantes añadidos al mismo tiempo. Esto permite la sobrevivencia e infección de los rizobios en la raíz de la leguminosa.

Lus (2013) señala que durante el proceso de pelleteo se aplican sucesivas capas de productos, que incrementan el volumen de la semilla, lo cual confiere la ventaja adicional de permitir mejorar la plantabilidad al dejarla menos susceptible a las fluctuaciones de profundidad en la operación de siembra. Si bien estas ventajas están comprobadas con incrementos del 50 al 60% de carbonato de calcio, no se recomiendan incrementos mayores. Los incrementos desmedidos de volumen, pueden implicar desventajas por disminuir efectivamente la cantidad de gérmenes por kilogramo de semilla sembrada y reducir los beneficios mencionados.

Roca fosfórica

Zapata et al. (2007) señalan que la roca fosfórica es un nombre colectivo utilizado para denominar todos los minerales que contienen fosfatos. Las rocas fosfóricas constituyen un recurso natural finito, no renovable y los depósitos geológicos de diferente origen se encuentran en todo el mundo. También indican que la roca fosfórica es un mineral que sirve como materia prima para la producción de fertilizantes de fósforo. Consiste en varios tipos de apatitas (fosfato tricálcico) que pueden presentar propiedades físicas, químicas y cristalográficas diferentes. La calidad de roca fosfórica depende de su edad, tamaño de partícula, grado de sustitución en la estructura del cristal y solubilidad en los ácidos. En cuanto a la composición química señala que tiene fósforo (P_2O_5) 31.07%, Calcio (CaO) 43.16%, Potasio (K_2O) 0.06%, Silicio (SiO_2) 10.05%, Aluminio (Al_2O_3) 3.28%, Hierro (FeO) 0.96% y Sodio (Na_2O) 0.507%. Dado que las rocas fosfóricas son materiales relativamente insolubles, el tamaño de sus partículas tiene un efecto importante en su tasa de disolución en el suelo. Cuanto más fino es el tamaño de partícula, mayor es el grado de contacto entre la roca fosfórica y el suelo y, por lo tanto, más alta es la tasa de disolución de la roca fosfórica. Además, el incremento en el número de las partículas de roca fosfórica por unidad de peso de la roca aplicada aumenta la probabilidad para que los pelos radiculares absorbentes puedan interceptar las partículas de la roca fosfórica. La aplicación de una roca fosfórica finamente molida (normalmente a menos de 0,15 mm) favorece el aumento de la tasa de disolución de las rocas fosfóricas y de la absorción del P de la roca fosfórica en un suelo dado. Las leguminosas son particularmente adecuadas para la utilización de las rocas fosfóricas. Son efectivas en la disolución de la roca fosfórica y en la

absorción de los productos de disolución debido a su demanda de Ca y al efecto acidificante de la fijación de nitrógeno en el suelo cerca del sistema radicular (rizósfera).

Harina de trigo

Jaya (2010) indica que la harina de trigo es el producto que se obtiene de la molienda y tamizado del endospermo del grano de trigo (*Triticum vulgare*, *Triticum durum*) hasta un grado de extracción determinado, considerando al restante como un subproducto (residuos de endospermo, germen y salvado).

De la Vega (2009), indica que los componentes de la harina de trigo son: almidón (70 – 75 %), agua (14 %) y proteínas (10 - 12 %), además de polisacáridos no del almidón (2-3%) particularmente arabinoxilanos y lípidos (2%).

Rocha (2015) señala que la incorporación en la formulación del 10 % de harina de trigo en la elaboración de alimento concentrado pelletizado de alta y baja densidad nutricional para ganado bovino lechero, es dominante ya que disminuye el porcentaje de finos y aumenta el índice de durabilidad del pellet normal y modificado.

2.5 TRATAMIENTOS

Los tratamientos evaluados en el presente trabajo de investigación fueron los siguientes:

Tabla 2.1. Descripción de los tratamientos

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
T ₁	Goma arábica (3.5ml) + carbonato de calcio (30g) (control)*
T ₂	Maicena (3.5ml) + roca fosfórica (30g)*
T ₃	Maicena (3.5ml) + harina de trigo (30g)*
T ₄	Melaza de caña (3.5ml) + roca fosfórica (30g)*
T ₅	Melaza de caña (3.5ml) + harina de trigo (30g)*

* Cantidades por 50 g de semilla

Las razones por la que se ha optado por la harina de trigo y la roca fosfórica obedecen básicamente a que estos materiales poseen propiedades similares a la del carbonato de calcio en lo que respecta a la finura del tamaño de las partículas. Asimismo la accesibilidad en el mercado y el bajo costo sobretodo el de la harina de trigo; lo que hace que sean adecuados para utilizarlo como material de recubrimiento en la pelletización y sustituir al carbonato de calcio.

Con lo que respecta a la maicena y la melaza de caña, ambos tienen la propiedad de ser materiales adhesivos y a la vez son materiales más accesibles y de bajo costo en el mercado, lo que hace que dichos materiales se utilicen en el pelleteado como adhesivo y que pueden reemplazar a la goma arábica.

2.6 INSTALACIÓN Y CONDUCCIÓN DEL EXPERIMENTO

2.6.1 Preparación de tratamientos

Lavado de las semillas

Las semillas de alfalfa fueron lavadas con abundante agua con la finalidad de eliminar los productos que hayan sido utilizados para recubrirlas, luego se dejaron secar al ambiente (ver Anexo 9- Fotografía 1).

Preparación de los adherentes y de los materiales de revestimiento

Se utilizó la técnica recomendada por el laboratorio de Rhizobiología (Santillana S/F). Se procedió a preparar la goma arábica al 40% y la maicena al 7% las que se utilizaron, al igual que la melaza de caña en la proporción de 1300 ml por 20 Kg de semilla de alfalfa. El carbonato de calcio, la roca fosfórica y la harina de trigo se utilizó en la proporción de 12 Kg por 20 Kg de semilla de alfalfa.

Pelleteado de las semillas

Se procedió a mezclar el material adherente con el inoculante (250 g por 20 Kg de semilla) luego se adicionó la semilla y por último el material de recubrimiento. Las semillas pelletizadas fueron conservadas hasta su uso en bolsas de polietileno a temperatura del ambiente.

2.6.2 Control de viabilidad de *Sinorhizobium meliloti* en semillas pelleteadas

La viabilidad de los rizobios en las semillas pelletizadas con los diferentes materiales adherentes y de recubrimiento fueron controlados a los 0,3,7,14,21 y 28 días, para el cual se consideró un periodo de un mes post inoculación.

Para el control de viabilidad se empleó el método de Dilución e Infección en Plantas, que consta en lo siguiente:

Preparación del medio JENSEN (ver Anexo 9 – Fotografía 4 y 5)

Como medio de cultivo para la siembra de plantas en tubos se utilizó el medio Jensen, cuya composición es la siguiente:

Reactivos:

Solución Stock:

H ₃ BO ₃	0.31g
Na ₂ MoO ₄	0.01g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01g
KCl	0.0411g
CaCl ₂	0.001g

Todos estos reactivos se disolvieron en 250ml de agua destilada.

Elementos:

CaHPO ₄	1.0g
K ₂ HPO ₄	0.2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.2g
FeCl ₃	0.1g
Solución stock	5 ml
Agar Merk	6.5g
Agua destilada	1000 ml

Desinfección y germinación de semillas

La desinfección y la posterior germinación de la semilla se procedieron de la siguiente forma:

- Selección de las semillas sanas y de tamaño uniforme
- Colocación de las mismas en frascos estériles
- Desinfección sucesiva con clórox al 2.5% por 3 minutos
- Seguidamente se lavó vigorosamente con agua destilada estéril 5 a 6 veces
- Las semillas así desinfectadas se puso a germinar en placas Petri con papel filtro previamente esterilizadas y humedecidos durante 24 horas.

Siembra de plantas

Transcurrida las 24 horas, en cada tubo con medio Jensen esterilizados, se sembró dos plántulas pre germinadas con la ayuda de una asa de kolle en forma de “S” dichas plántulas se sembraron junto a las paredes del tubo para permitir un intercambio gaseoso y facilitar la observación de los nódulos (ver Anexo 9 – Fotografía 6). Los tubos con las plantas sembradas se colocaron en gradillas de madera (las que tienen la finalidad de sujetar el tubo y evitar la incidencia de la luz en la zona radicular) y posteriormente llevados al solarío por cinco días, al cabo de los cuales se escogió los tubos que presentaron plantas con buenas raíces (ver Anexo 9 - Fotografía 11). Estos tubos seleccionados fueron marcados de acuerdo a las claves de cada tratamiento.

Toma de muestras, preparación de las diluciones e inoculación de plantas

Para cada control de viabilidad se procedió a tomar muestras de la siguiente manera: De los diferentes tratamientos, es decir de las semillas pelletizadas con diferentes materiales adherentes y de recubrimiento se separó 100 semillas (para cada tratamiento y repetición) en papel kraff, posterior a la toma de muestras, las semillas pelletizadas fueron guardados a temperatura ambiente hasta el siguiente muestreo (ver Anexo 9 – Fotografía 7).

La preparación de diluciones y la inoculación de plantas (ver Anexo 9 – Fotografía 8, 9 y 10) se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

Las 100 semillas tomadas como muestra se colocaron en un frasco de 100ml de solución salina 0.85% previamente esterilizada (ver Anexo 9 – Fotografías 2 y 3) obteniéndose la dilución 10^{-2} , este frasco se agitó vigorosamente aproximadamente 100 veces ;a partir de este frasco, con una pipeta previamente desinfectada se tomó 100µl para pasar a un tubo EPENDORF de 1.5ml con 900µl de solución salina esterilizada, constituyéndose la dilución 10^{-3} , a partir de esta dilución y utilizando puntas desinfectadas para cada dilución se pasó 100µl previamente agitadas con la ayuda de un agitador a tubos sucesivos hasta obtener la dilución 10^{-6} . De las últimas cuatro diluciones (10^{-6} a 10^{-3}), y utilizando la punta de la última dilución, se aplicó 200µl por tubo, en orden decreciente, es decir la inoculación se inició con la dilución 10^{-6} y terminó en la dilución 10^{-3} . Cabe aclarar que para las muestras correspondientes al día 14, 21 y 28 se consideraron cuatro diluciones (10^{-5} a 10^{-2}), por recomendación del Laboratorio de Rhizobiología, ya que el número de bacterias disminuye con el transcurso de los días.

Las plantas inoculadas se dejaron en solario por un periodo de 40 días, las cuales recibieron 12 horas de iluminación artificial, controladas por un timer. Al cabo de dicho tiempo se procedió a la evaluación para determinar la dinámica poblacional, es decir el número más probable de *Sinorhizobium meliloti* (ver Anexo 9 – Fotografías 11, 12, 13 y 14).

Determinación del número más probable de *Sinorhizobium meliloti*

Se evaluó la formación de nódulos de cada tubo (ver Anexo 9 – Fotografías 15 y 16), considerando como positivo (+) aquellas plantas que presentaron nodulaciones y como negativas (-) los que carecían de ellas. Con el número de tubos positivos se buscó en la tabla de Fisher y Yates para obtener el número más probable de *Sinorhizobium meliloti*, posteriormente se realizó el cálculo del número más probable de *Sinorhizobium meliloti* por semilla pelletizada aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de } \textit{Sinorhizobium meliloti} \text{ por semilla} = \frac{MXD}{VXG}$$

Dónde:

M = NMP de tabla de Fisher y Yates

D = Menor dilución de serie impregnada

V = Volumen (ml) de muestra inoculada

G = 100 semillas pelletizadas

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las variables evaluadas, se ordenaron en cuadros y luego se realizó el Análisis de varianza (ANVA). Al encontrar significación estadística, se procedió a realizar la prueba de significación de Tukey (0.05).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 POBLACIÓN BACTERIANA A LOS 0 DÍAS

En la Tabla 3.1 se presenta el ANVA del número de rizobios por semilla a los 0 días, inmediatamente post pelleado, se encontró significación estadística entre los tratamientos, es decir, al menos en uno de los tratamientos el número de rizobios es diferente estadísticamente al resto, por lo que se procedió a realizar la Prueba de Tukey (0.05). El coeficiente de variación de 0.62% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.1. Análisis de varianza del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 0 días.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft 0.05
Tratamiento	4.00	1570900000.00	392725000.00	11781.75**	3.48
Error	10.00	333333.33	33333.33		
Total	14.00	1571233333.33			

CV= 0.62%

En la Figura 3.1 se muestra la Prueba de Tukey de la población promedio de rizobios/semilla a los 0 días. El mayor valor se encontró en los tratamientos T1 (goma arábica + carbonato de calcio) y tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo), ambos con valores de 34667 rizobios/semilla; seguido por el tratamiento T3 (maicena + harina de trigo) y tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) con 34500 rizobios/semilla. Todos los tratamientos antes mencionados presentaron diferencia estadística significativa respecto al tratamiento T4 (melaza de caña + roca fosfórica), que presentó el menor valor que fue de 9000 rizobios/semilla.

Referente al número de rizobios por semilla Racca et al. (2001), Bonomi (1985) y Castillo (1989) indican que para una excelente nodulación en la alfalfa se requiere mínimamente 1000 rizobios/semilla, número que fue superado en todos los tratamientos evaluados.

Santillana (1995) en semillas de trébol rojo pelleteado, a los 0 días, encontró 14125 rizobios/semilla. Podemos señalar que los resultados obtenidos a los 0 días son similares, con la diferencia de que en semillas de alfalfa la población bacteriana es mucho mayor en comparación a las semillas de trébol rojo.

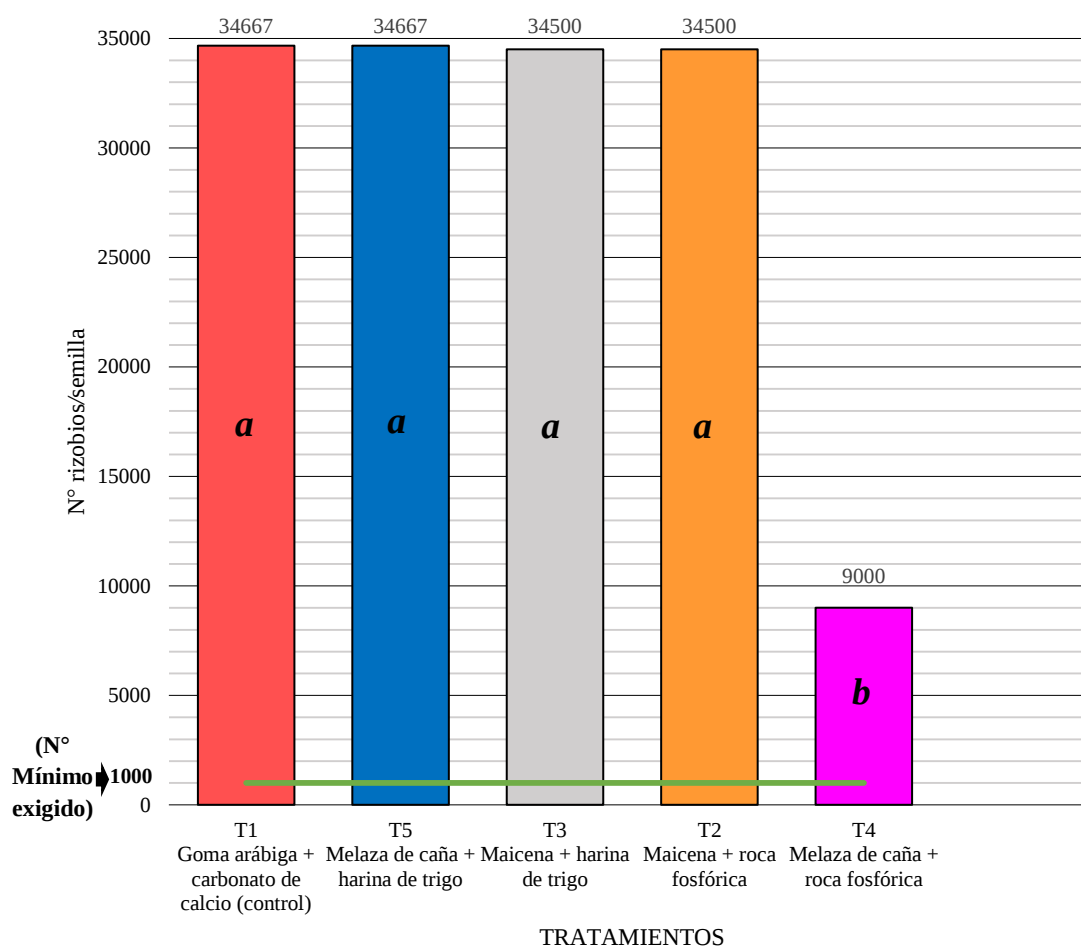


Figura 3.1. Prueba de Tukey (0.05) del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 0 días.

3.2 POBLACIÓN BACTERIANA A LOS 3 DÍAS

En la Tabla 3.2 se presenta el ANVA del número de rizobios por semilla a los 3 días post pelleteado, se encontró significación estadística entre los tratamientos, es decir, al menos en uno de los tratamientos el número de rizobios es diferente estadísticamente al resto, por lo que se procedió a realizar la Prueba de Tukey (0.05).

El coeficiente de variación de 0.53% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.2. Análisis de varianza del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 3 días post pelleteado.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft 0.05
Tratamiento	4.00	2351166666.67	587791666.67	35267.50**	3.48
Error	10.00	166666.67	16666.67		
Total	14.00	2351333333.33			

CV= 0.53%

En la Figura 3.2 se muestra la Prueba de Tukey de la población promedio de rizobios/semilla a los 3 días post pelleteado, siendo el valor más alto 34667 rizobios/semilla en el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio), seguido por el tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo) y el tratamiento T3 (maicena + harina de trigo) con 34500 rizobios/semilla. Todos los tratamientos antes mencionados presentaron diferencia estadística significativa respecto al tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) y el tratamiento T4 (melaza de caña + roca fosfórica), ambos con 9000 rizobios/semilla. Como en la evaluación anterior los valores obtenidos en todos los tratamientos superaron al mínimo exigido indicado por Racca et al. (2001), Bonomi (1985) y Castillo (1989).

Santillana (1995) en semillas de trébol rojo pelleteado, a los 3 días, encontró 13804 rizobios/semilla. Podemos señalar que los resultados obtenidos a los 3 días son

similares, con la diferencia de que en semillas de alfalfa la población bacteriana es mucho mayor en comparación a las semillas de trébol rojo.

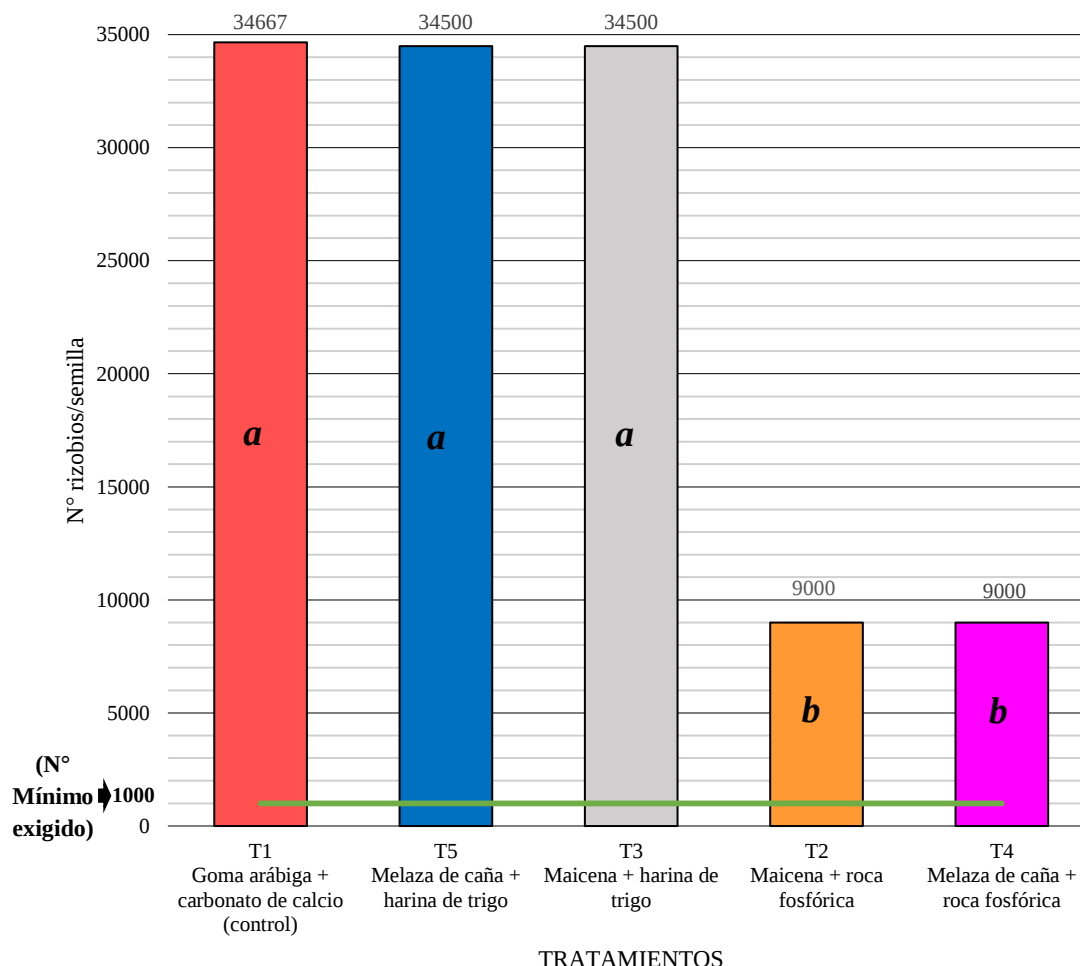


Figura 3.2. Prueba de Tukey (0.05) del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 3 días post pelleado.

3.3 POBLACIÓN BACTERIANA A LOS 7 DÍAS

En la Tabla 3.3 se presenta el ANVA del número de rizobios por semilla a los siete días post pelleado, se encontró significación estadística entre los tratamientos, es decir, al menos en uno de los tratamientos el número de rizobios es estadísticamente diferente al resto, por lo que se procedió a realizar la Prueba de Tukey (0.05) .

El coeficiente de variación de 0.62% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.3. Análisis de varianza del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 7 días post pelleteado.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft 0.05
Tratamiento	4.00	15761666.67	3940416.67	11821.25**	3.48
Error	10.00	3333.33	333.33		
Total	14.00	15765000.00			

CV= 0.62%

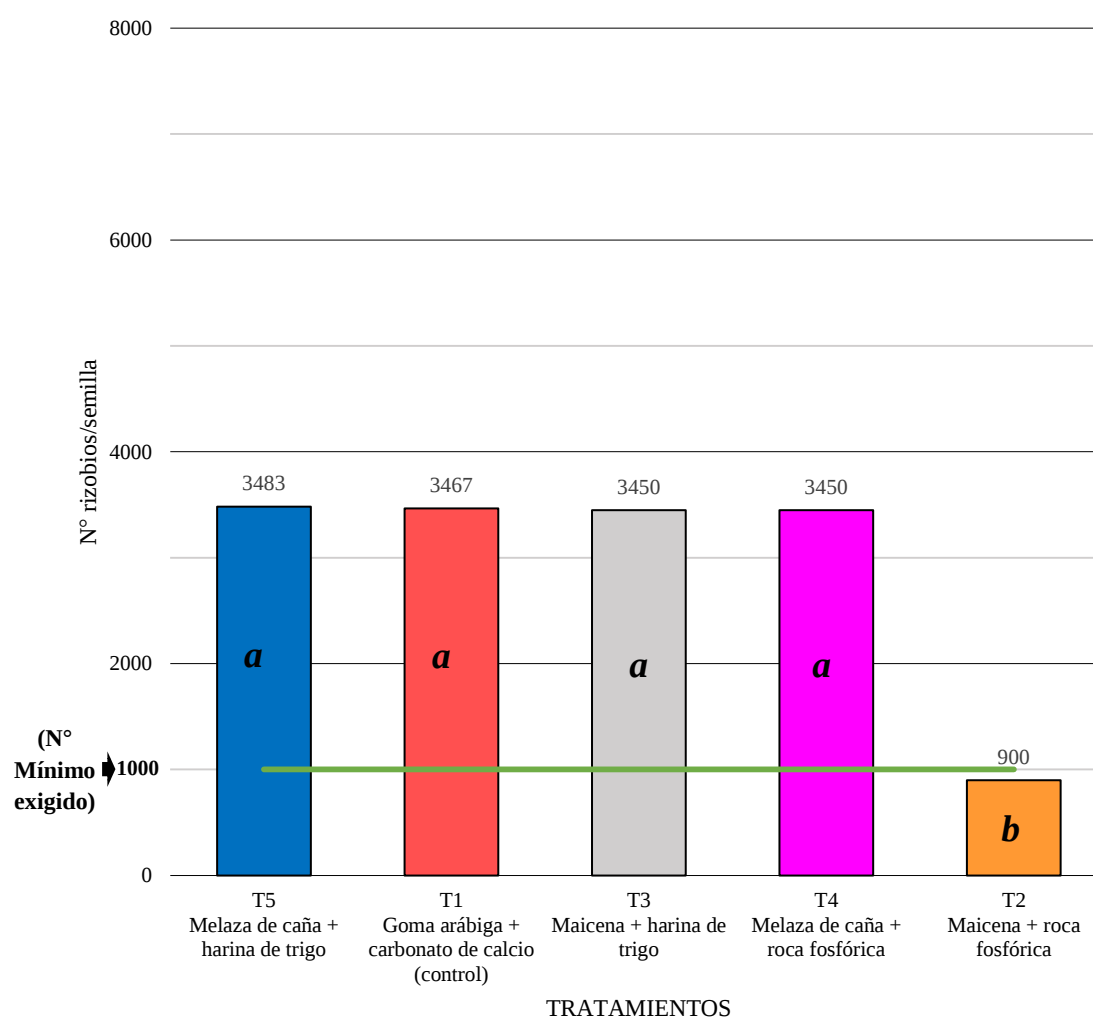


Figura 3.3. Prueba de Tukey (0.05) del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 7 días post pelleteado

En la Figura 3.3 se muestra la Prueba de Tukey de la población promedio de rizobios/semilla a los 7 días post pelleteado, se observa que el tratamiento T5

(melaza de caña + harina de trigo) presentó el valor más alto con 3483 rizobios/semilla, seguido por el tratamiento T1 (control) con 3467 rizobios/semilla y el tratamiento T3 (maicena + harina de trigo) así como el tratamiento T4 (melaza de caña + roca fosfórica) ambos con 3450 rizobios/ semilla. Todos los tratamientos antes mencionados no presentaron diferencias estadísticas entre sí, pero superaron con diferencia estadística significativa al tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) que presentó 900 rizobios/semilla. En todos los tratamientos se ha superado al valor mínimo exigido indicado por Racca et al. (2001), Bonomi (1985) y Castillo (1989), excepto en el tratamiento T2.

Por otro lado respecto al trabajo realizado por Santillana (1995), quien en semillas de trébol rojo, encontró a los 7 días 13804 rizobios/semillas. Los resultados obtenidos son similares en todos los tratamientos, ya que en ambos casos las cantidades bacterianas se encuentran por encima del mínimo exigido; excepto el tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica).

3.4 POBLACIÓN BACTERIANA A LOS 14 DÍAS

De acuerdo al ANVA mostrado en la Tabla 3.4 se encontró significación estadística entre los tratamientos, es decir a los 14 días post pelleteado, al menos en uno de los tratamientos el número de rizobios/semilla estadísticamente es diferente al resto, por lo que se procedió a realizar la Prueba de Tukey (0.05).

El coeficiente de variación que es de 0.48% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.4. Análisis de varianza del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 14 días post pelleteado.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft 0.05
Tratamiento	4.00	23953426.67	5988356.67	35930.14**	3.48
Error	10.00	1666.67	166.67		
Total	14.00	23955093.33			

CV= 0.48%

En la Figura 3.4 se muestra la Prueba de Tukey de la población promedio de rizobios/semilla a los 14 días post pelleteado, se observa que el tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo) presentó el valor más alto con 3467 rizobios/semilla, seguido por el tratamiento T3 (maicena + harina de trigo), tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) y tratamiento T4 (melaza de caña + roca fosfórica) todos ellos con 3450 rizobios/ semilla. Todos los tratamientos antes mencionados no presentaron diferencias estadísticas entre sí, pero superaron con diferencia estadística significativa al tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) que presentó 295 rizobios/semilla. En todos los tratamientos se ha superado al valor mínimo exigido indicado por Racca et al. (2001), Bonomi (1985) y Castillo (1989), excepto en el tratamiento T2.

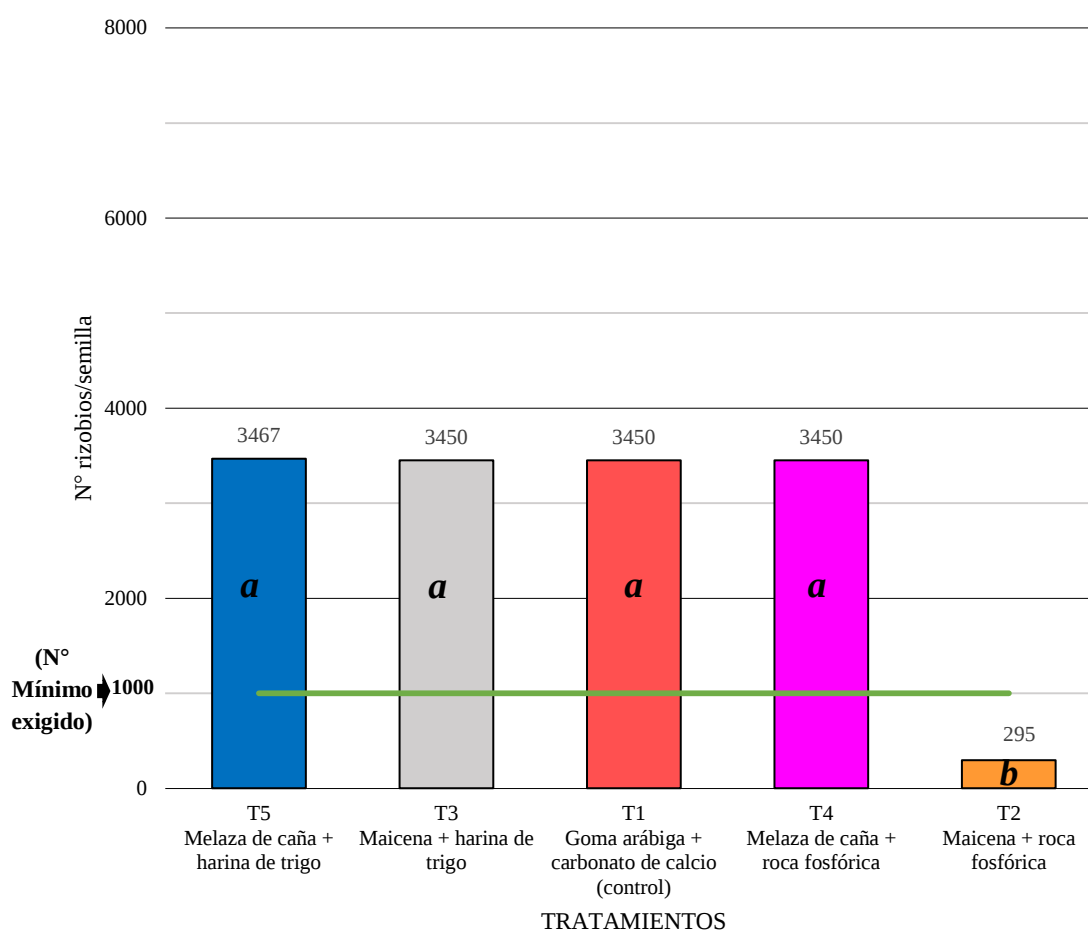


Figura 3.4. Prueba de Tukey (0.05) del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 14 días post pelleteado

Santillana (1995) encontró más de 1000 rizobios/semillas de trébol rojo a los 14 días de almacenamiento (13804 rizobios/semilla). Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron similares, ya que todos los tratamientos tuvieron valores superiores a 1000 rizobios/semilla, excepto el tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) que presentó 295 rizobios/semilla.

3.5 POBLACIÓN BACTERIANA A LOS 21 DÍAS

De acuerdo al ANVA mostrado en la Tabla 3.5 se encontró significación estadística entre los tratamientos, es decir a los 21 días post pelleteado, al menos en uno de los tratamientos el número de rizobios/semilla es diferente estadísticamente al resto, por lo que se procedió a realizar la Prueba de Tukey (0.05).

El coeficiente de variación que es de 1.46% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.5. Análisis de varianza del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 21 días post pelleteado.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft 0.05
Tratamiento	4.00	1255188.27	313797.07	11200.37**	3.48
Error	10.00	280.17	28.02		
Total	14.00	1255468.43			

CV = 1.46%

En la Figura 3.5 se muestra la Prueba de Tukey de la población promedio de rizobios/semilla a los 21 días post pelleteado, donde se observa que el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) presentó el valor más alto con 900 rizobios/semilla, el cual estadísticamente superó con diferencia significativa a todos los tratamientos. El tratamientos T2 (maicena + roca fosfórica), tratamiento T3 (maicena + harina de trigo) y tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo) con valores de 295 rizobios/semilla todas ellas, superaron con diferencia estadística significativa al tratamiento T4 (melaza + roca fosfórica) que presentó 22 rizobios/semilla, el valor más bajo. Los resultados obtenidos a los 21 días en todos

los tratamientos se encuentran por debajo del valor mínimo exigido, indicado por Racca et al. (2001), Bonomi (1985) y Castillo (1989).

Respecto al trabajo realizado por Santillana (1995), encontró menos de 1000 rizobios/semillas de trébol rojo a los 21 días (891 rizobios/semilla); similares a los resultados obtenidos en la presente investigación.

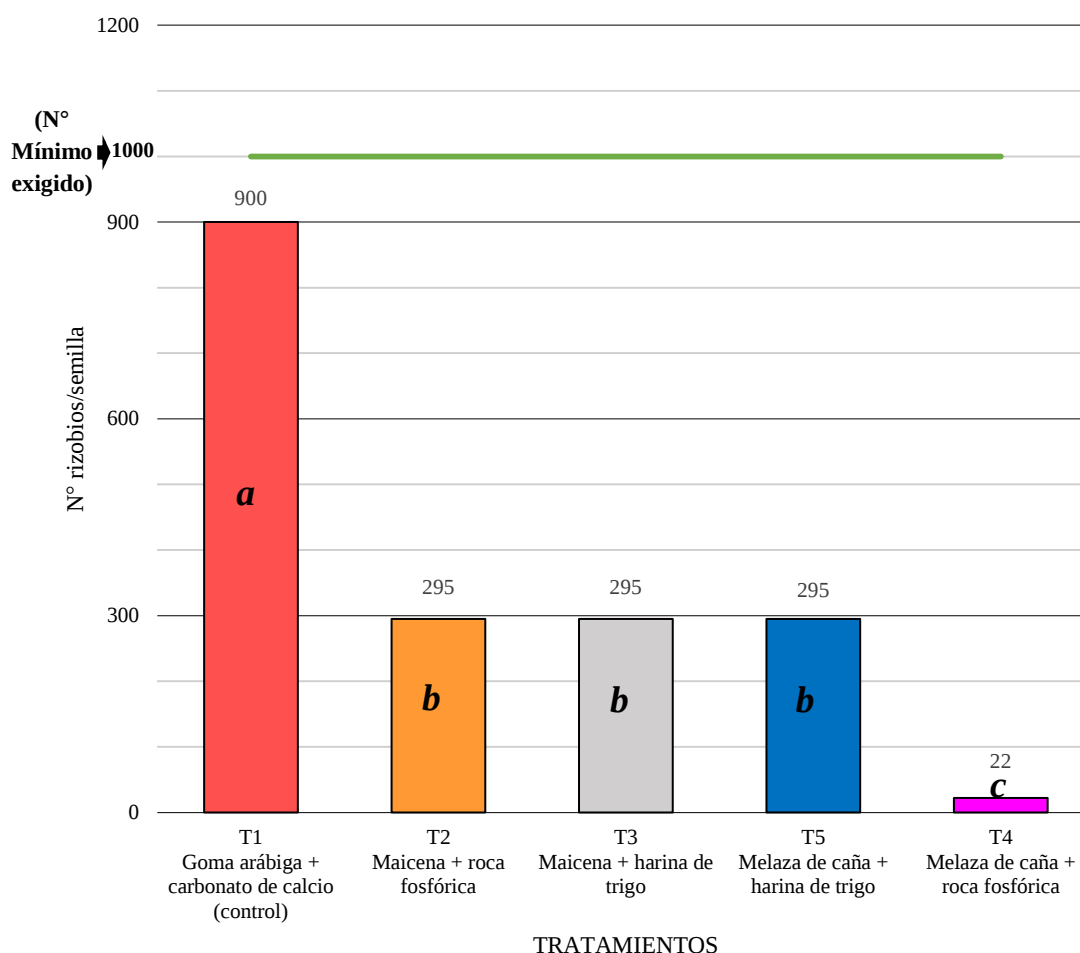


Figura 3.5. Prueba de Tukey (0.05) del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 21 días post pelletrado.

3.6 POBLACIÓN BACTERIANA A LOS 28 DÍAS

De acuerdo al ANVA mostrado en la Tabla 3.6 se encontró significación estadística entre los tratamientos, es decir a los 28 días post pelletrado, al menos en uno de los tratamientos el número de rizobios/semilla es estadísticamente diferente al resto, por lo que se procedió a realizar la Prueba de Tukey (0.05) .

El coeficiente de variación de 9.55% indica que el experimento ha sido conducido bajo condiciones de homogeneidad aceptables.

Tabla 3.6. Análisis de varianza del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 28 días post pelleteado.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	Ft
					0.05
Tratamiento	4.00	20406.27	5101.57	182.09**	3.48
Error	10.00	280.17	28.02		
Total	14.00	20686.43			

CV= 9.55%

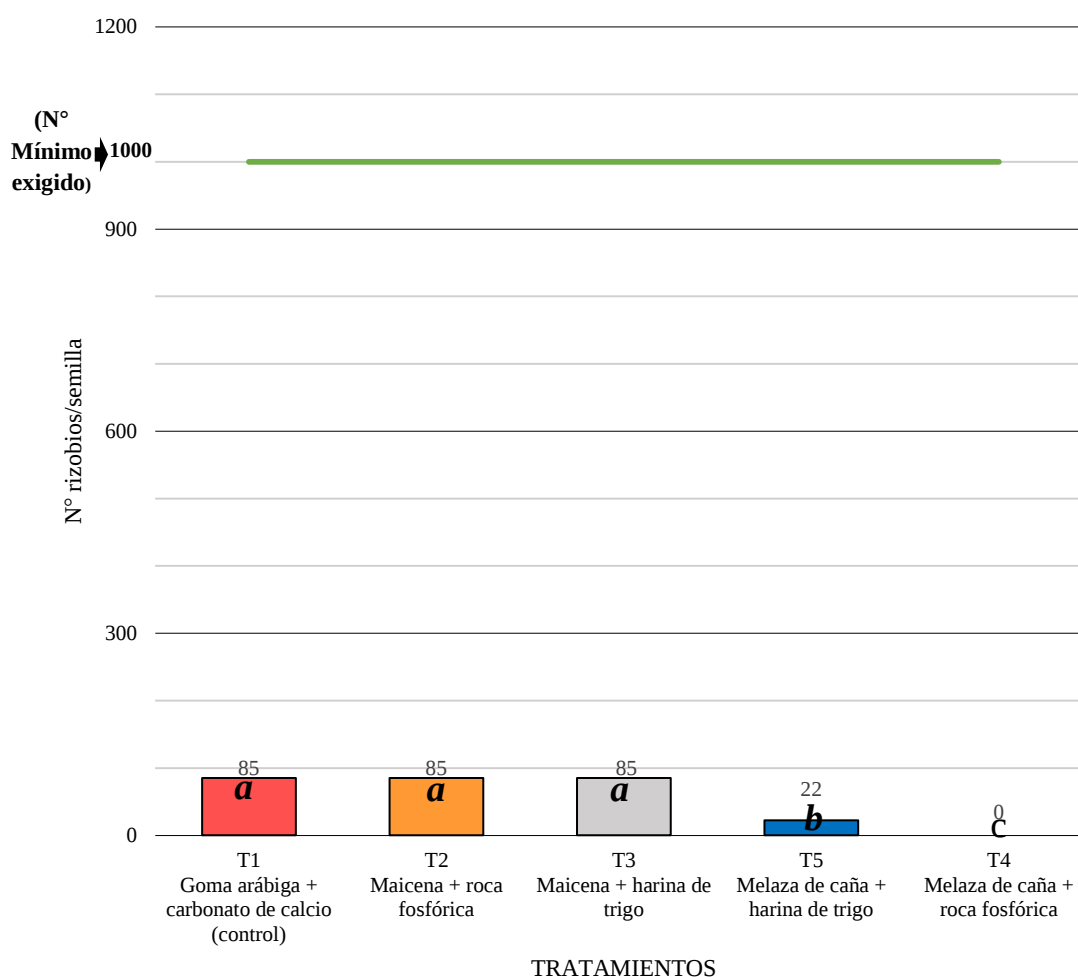


Figura 3.6. Prueba de Tukey (0.05) del número de *Sinorhizobium meliloti*/semilla a los 28 días post pelleteado.

En la Figura 3.6 se muestra la Prueba de Tukey de la población promedio de rizobios/semilla a los 28 días post pelleteado, donde se observa que el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio), tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) y tratamiento T3 (maicena + harina de trigo) presentan 85 rizobios/semilla, siendo éste el valor más alto. Dichos tratamientos superaron con diferencia estadística significativa al tratamiento T5 (melaza de caña + harina de trigo) que presentó 22 rizobios/semilla. El tratamiento T4 (melaza de caña + roca fosfórica) cuyo valor fue de 0 rizobios/semilla fue superado estadísticamente con diferencia significativa por todos los tratamientos. Los resultados obtenidos a los 28 días en todos los tratamientos se encuentran por debajo del valor mínimo exigido, indicado por Racca et al. (2001), Bonomi (1985) y Castillo (1989).

3.7 TENDENCIA DE LA DINÁMICA POBLACIONAL

En la Figura 3.7 se muestra la tendencia de la variación de la dinámica poblacional a lo largo del período de evaluación en cada tratamiento, donde se puede observar el número de días donde la población de rizobios se encuentra por encima de los 1000 rizobios/semillas, valor mínimo exigido, indicado por Racca et al. (2001), Bonomi (1985) y Castillo (1989).

Tabla 3.7. Ecuación para la determinación exacta del tiempo máximo post pelleteado que la población de *Sinorhizobium meliloti* se encuentra con valores superiores a 1000 rizobios/semilla.

Tratamiento	Ecuación	Tiempo máximo obtenido(días)
T1	$y = -364.29x + 8550$	20
T2	$y = -2025x + 15075$	06
T3	$y = -450.71x + 9760$	19
T4	$y = -489.69x + 10306$	19
T5	$y = -453.1x + 9810$	19

De acuerdo a las ecuaciones de la Tabla 3.7 el tratamiento T1 (goma arábica + carbonato de calcio) mantiene el número de rizobios/semillas exigidos para una buena inoculación hasta los 20 días post pelleteado. Los tratamientos T5 (melaza de caña + harina de trigo), tratamiento T3 (maicena + harina de trigo) y tratamiento T4

(melaza de caña + roca fosfórica) mantienen el número de rizobios/semillas exigidos para una buena inoculación hasta los 19 días post pelleteado. El tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) mantiene adecuada viabilidad de los rizobios en las semillas solamente hasta los 6 días.

La tendencia general en todos los tratamientos es la disminución del número de rizobios a lo largo del tiempo, al respecto Salema et al. (1982) y Hoben et al. (1991) indican que la muerte de rizobios en semillas pelletizadas se debe principalmente a la pérdida de humedad. El-Haddad (1985) señala que las semillas almacenadas entre temperaturas de 5 y 15°C mantienen mejor la sobrevivencia de rizobios. En el presente trabajo, las semillas pelletizadas fueron almacenadas a temperatura de laboratorio (20-25° C), hecho que también explica hasta cierto punto la disminución de la cantidad de rizobios, ya que es preciso también mencionar la particularidad de cada material utilizado, cuyos efectos se vieron reflejados en los resultados obtenidos a lo largo del periodo de evaluación.

López (1984) indica que las semillas de alfalfa con inoculación simple se deben sembrar el mismo día. Del mismo modo, Racca et al, (2004) señala también que la inoculación simple no asegura una alta supervivencia de los rizobios, por lo tanto la semilla debe ser sembrada inmediatamente a la aplicación, también indica que esta forma de inoculación no protege a los rizobios en suelos ácidos. DGPA (2005) por su parte señala que la semilla inoculada debe usarse inmediatamente ya que los rayos del sol matan a las bacterias pero puede ser guardada en un lugar fresco y oscuro como máximo 24 horas.

Por otro lado Racca et al. (2001) indican que una buena pelletización puede almacenarse desde pocos días hasta un mes según la calidad final del pellet y el polvo usado. En ese sentido, de acuerdo a los resultados obtenidos se puede indicar que los adherentes maicena y melaza de caña pueden reemplazar a la goma arábica, mientras que el carbonato de calcio puede ser sustituido por la harina de trigo y roca fosfórica, excepto la mezcla maicena + roca fosfórica, ya que ésta mantiene la viabilidad adecuada de los rizobios solo hasta los 6 días.

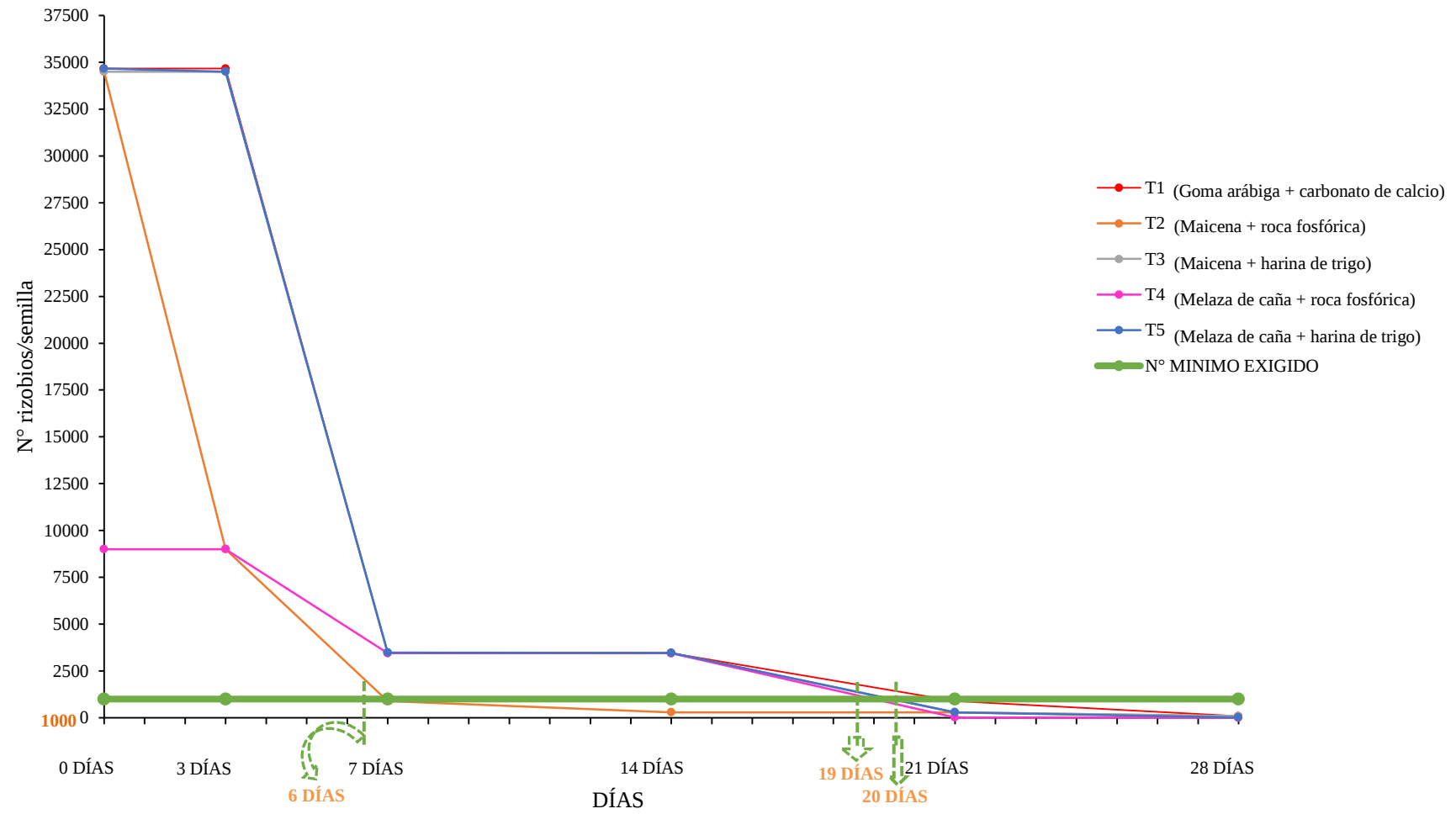


Figura 3.7. Dinámica poblacional de *Sinorhizobium meliloti* en cinco tratamientos a través del tiempo.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos, discusiones realizadas y bajo las condiciones en las cuales se condujo el presente trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Los materiales adherentes (maicena y melaza de caña) y material de recubrimiento (harina de trigo y roca fosfórica), excepto la mezcla maicena + roca fosfórica, no afectaron la población de *Sinorhizobium meliloti* obteniéndose valores similares al tratamiento control (goma arábica + carbonato de calcio).
2. De acuerdo a la determinación de tendencias de la dinámica poblacional, los tratamientos T5 (melaza de caña + harina de trigo), T3 (maicena + harina de trigo) y T4 (melaza de caña + roca fosfórica) mantuvieron la población de los rizobios por encima del mínimo exigido (1000 rizobios/semilla) hasta los 19 días; similar al tratamiento control (20 días), mientras que el tratamiento T2 (maicena + roca fosfórica) sólo hasta los 6 días.
3. El mejor adherente y material de recubrimiento para reemplazar la goma arábica y carbonato de calcio es la mezcla de melaza de caña + harina de trigo, melaza de caña + roca fosfórica y maicena + harina de trigo, ya que son los tratamientos con los que se han obtenido la mayor sobrevivencia del *Sinorhizobium meliloti*.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a las conclusiones del presente trabajo de investigación, se recomienda:

1. Utilizar para la pelletizacion de semilla de alfalfa la mezcla de melaza de caña + harina de trigo, melaza de caña + roca fosfórica y maicena + harina de trigo.
2. Realizar trabajos de investigación similares utilizando semillas de otras leguminosas y otros materiales adherentes y de recubrimiento
3. Evaluar los tratamientos de la presente investigación a nivel de campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña H. 1983.** Revestimiento e inoculación de semilla de leguminosas forrajeras. Investigación y Progreso Agropecuario. INIA Carillanca -Temuco, Chile.
- Aguirre F. 1997.** Evaluación de Tres Variedades de Alfalfa (*Medicago sativa* L.) en la producción Mecanizada de Forraje Establecidos en Santa Teresa de Sofía - Coahuila, México.
- Alarcón B. y Cervantes T. 2012.** Manual para la Producción de Semilla de Alfalfa en el Valle del Mezquital, Hidalgo. Chapingo, México. p.77.
- Alarcón A. y Ferrera R. 2000.** Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. Agric. Téc. México. 26(2):191-203.
- Alexander M. 1980.** Introducción a la microbiología del suelo. Segunda edición. Ed. John Wiley and Sons. New York. p.333-340.
- Amarelle V. 2016.** Elucidación de los sistemas implicados en la captación y utilización de hemina como fuente de hierro nutricional en *Sinorhizobium meliloti* 1021. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay.
- Badejo M. 1998.** “Agroecological restoration of savanna ecosystems”. Ecological Engineering 10: 209-219.
- Barloy F. y Jebbar M. 2009.** *Sinorhizobium meliloti* Megaplasms and Symbiosis in *S. meliloti*. In Microbial Megaplasms (edited by E Schwartz). 11 in Microbiology Monographs. p. 91–118.
- Basigalup H. y Rossanigo R. 2007.** El cultivo de la alfalfa en la Argentina. Ediciones INTA, Argentina. p. 15-17.
- Bernal L. 1993.** Caracterización de la ganadería lechera del sur. Arequipa (Irrigaciones El Cural, La Joya, San Isidro, San Camilo, Yuramayo, Santa Rita, y Majes). Tesis Ing. Zootecnista. Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú. p.99.
- Bernet T. y Velarde L. 2000.** *Income effects of fodder and herd management on small-scale milk producers in the northern Peruvian.* Livestock Research for Rural Development 12 (3). Consultado el 25 de febrero del 2017. Disponible en <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd12/3/bern123a.htm>

- Bolton L., Goplen P. y Baenziger H. 1975.** Alfalfa Science and Technology. Estados Unidos. p.7.
- Bologna J. 2014.** ¿Por qué inocular leguminosas forrajeras? Departamento técnico Barenbrug Palaversich. Buenos Aires, Argentina.
- Bonomi A.1985.** Technological development for *Rhizobium japonicum* growt. Proceedings of the workshop on *Rhizobium/legume* inoculants. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 263-271.
- Brunel B., Cleyet C., Normand P. y Bardin R. 1988.** Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. Applied and Environmental Microbiology 54: 2636-2642.
- Carpio R. y Figueroa T.2017.** Efecto de la adición de goma arábica y maltodextrina en el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en extracto de sancayo (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Facultad de Ingeniería de Procesos. Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias. Arequipa, Perú.
- Capalbo R. y Solá S. 2007.** Técnica del pildorado: un plus para la semilla. Rizobacter Argentina S.A. Nuevo ABC rural.
- CARE PERÚ. 2006.** Guía Práctica de Pastos Cultivados. Instalación, producción y manejo. Lima, Perú.
- Castillo D. 1989.** V Seminario de Leguminosas de Grano. Estación Experimental DIPEX. Temuco, Chile. p. 50-52.
- CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1985.** Guía Metodológica: Aislamiento, Caracterización y Evaluación de Rizobios para leguminosas Forrajeras en Suelos Ácidos de América Tropical. Cali, Colombia.
- Cook B. 2005.** The production of Tropical Forages: An Interactive Selection Tool. CSIRO Sustainable Ecosystems (CSIRO), Department of Primary Industries and Fisheries (DPI&F Queensland), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) and International Livestock Research Institute (ILRI). Consultado el 10 de marzo del 2017. Disponible en <http://www.tropicalforages.info/>
- Cooper J. 2004.** Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. Adv Bot Res 41:1–62.

- D'attellis R. 2005.** Alfalfa (*Medicago sativa*) producción de semilla. Gobierno de la provincia de Catamarca. Ministerio de producción y desarrollo. Catamarca, Argentina. p. 47.
- Day J. 1979.** Influencia de los factores ambientales en la fijación de nitrógeno por las leguminosas. Porto Alegre, Brasil. Microbiological Resources Center.
- Day M. y Dart J. 1969.** Nitrogen fixation by free-living microorganisms. Report of the Rothamsted Exp. Sta. Rep. 1:87.
- De Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins D., Dreyfus B., Kersters K. y Gillis M. 1994.** Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 44:715–733.
- De la Vega G. 2009.** Universidad Tecnológica de la Mixteca: Proteínas de la harina de trigo: Clasificación y propiedades funcionales. Oaxaca, México.
- Delgado I. 1998.** La Alfalfa: Estudio comparativo de variedades comercializadas en España Semillas y Cultivos. Madrid, España.
- DGPA. 2005.** Dirección de Crianzas. Manual de manejo de pastos cultivados para zonas altoandinas. Ayacucho, Perú.
- Downie J. 2010.** The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. FEMS Microbiology Reviews 34: 150-170.
- Duran J. 1989.** Pre – acondicionamiento y recubrimiento de semillas hortícolas. Agricultura, 679. p. 128 – 131.
- Dutto P. 2002.** Revista del Plan Agropecuario. Inoculación de leguminosas. Departamento de Microbiología de Suelos – MGAP. Montevideo, Uruguay.
- El – Haddad. 1985.** The present situation of *Rhizobium*/legume inoculants in Egypt. In: Proceedings of the Workshop on *Rhizobium*/legume inoculants. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 43-100.
- Erdman W. 1968.** Inocule sus leguminosas. Agricultura de las Américas. Estados Unidos. p.45- 48.

- Faria S. y Franco A. 1985.** Adesivos para inoculacao e revestimento de sementes de leguminosas. Brasil. p.169-176.
- FAO. 1995.** Manual Técnico de Fijación de Nitrógeno. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- Ferguson J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin H., Lin Y., Reid E. y Gresshoff M. 2010.** Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* 52:61–76.
- Feigenbaum S. y Mengel K. 1979.** The effect of reduced light intensity and suboptimal potassium supply on N₂ fixation and N turnover in *Rhizobium* infected lucerne. *Physiol Plant.* 45:245-249.
- Ferrari S. 2008.** ¿Por qué sembrar semillas pelleteadas? (en línea). Consultado el 15 de marzo del 2017. Disponible en <http://www.produccion-animal.com.ar/>
- Financiera Rural. 2011.** Monografía de la melaza de la caña de azúcar. México.
- Flores E. 2010.** Evaluación del efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento en la capacidad aglutinante de dos tipos de almidones para la formulación de comprimidos orales. Universidad de San Carlos de Guatemala - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
- Freire J. 1997.** Inoculation of soybeans. Exploring the legumes-rhizobium symbiosis in tropical Agriculture NIfTAL. p. 335-379.
- Galibert F., Finan M., Long R., Puhler A., Abola P., Ampe F., Barloy-Hubler F. y Barnett J. 2001.** The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668-672.
- Geddes B. y Oresnik I. 2014.** Physiology, genetics, and biochemistry of carbón metabolism in the alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Can J Microbiol* 60:491–507.
- Gennaro A. 2003.** Remington Farmacia. 20.^a ed. Madrid. Editorial Médica Panamericana. Tomo 2. p.996-1019.
- Giller K. y Cadish G. 1995.** Future Benefits from Biological Nitrogen fixation. *An Ecological Approach to Agriculture Plant and Soil.* 174 (01): 255-270.
- Giménez T., Durán J. y Sampaio V. 1992.** Revista Agropecuaria: Recubrimiento de semillas. Consultado el 25 de febrero del 2017. Disponible en: http://origin.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_Agri%2FAgri_1992_715_138_144.pdf.

- Gonzáles W. 2002.** Manual Práctico: Manejo de Pasturas y Pastizales. 1ra Edición. Lima, Perú.
- Grupo Océano, 2002.** Enciclopedia Práctica de la Agricultura y la Ganadería, MMII, Editorial OCÉANO. Barcelona, España.
- Harrison W., Lower J., Kim D. y Young W. 2010.** Introducing the bacterial “chromid”: not a chromosome, not a plasmid. Trends Microbiol 18:141–148.
- Hoben H., Aung N., Somasegaran P. y Kang U. 1991.** Oils as adhesives for seed inoculation and their influence on the survival of *Rhizobium* spp. and *Bradyrhizobium* spp. on inoculated seeds. World Journal Microbiology Biotechnology, Oxford. V.7. p. 324-330.
- Holland A., Street J. y Williams A. 1969.** Range legume inoculation and nitrogen fixation by root – nodule bacteria. California Agricultural Experiment Station. Bulletin N° 842. 18p.
- Ibarra A. 1982.** Guía para cultivar alfalfa en el Valle de México. INIA- CIANO. México. 16p.
- Jaya E. 2010.** Evaluación del potencial nutritivo y nutracéutico de donas elaboradas con una mezcla de harina de quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) y harina de trigo (*Triticum vulgare*). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador.
- Jones M., Kobayashi H., Davies W., Taga E. y Walker C. 2007.** How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. Nat Rev Microbiol 5:619–633.
- Labandera C. 2007.** Inoculación de leguminosas forrajeras. Montevideo, Uruguay.
- León E. 2003.** Pastos y Forrajes, Producción y Manejo. (Folleto pastos y forrajes). Universidad Central. Quito, Ecuador. 251p.
- León R. 2002.** Producción y manejo de pastos y forrajes. Editorial Universitaria. Quito, Ecuador. p. 130 – 136.
- Lopera S., Guzmán C., Cataño C. y Gallardo C. 2009.** Desarrollo y caracterización de micropartículas de ácido fólico formadas por secado por aspersión, utilizando goma arábica y maltodextrina como materiales de pared. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. p. 55-65.

- López J. 1984.** Inoculación de leguminosas forrajeras. Investigación y Progreso Agropecuario. La Platina N° 24. Santiago, Chile.
- López M., Ormeño E. y Acosta J. 2012.** Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. p. 149–158.
- Loría D. y Vásquez H. 2013.** Efecto de la pelletización de semillas sobre la germinación de tres cultivares de alfalfa (*Medicago sativa* L.) bajo condiciones de laboratorio en la localidad de Santa Clara, San Carlos, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, ITCR. Facultad de Agronomía.
- Lus J. 2013.** Impacto productivo del peso de mil semillas de alfalfa. El pelleado como factor que modifica el peso de mil semillas alfalfa. 43 GAAPnews. Año 9. N° 22. p. 2-4.
- Finan M. y Sadowsky J. 2007.** Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. Plant physiology 144: 615-622.
- Martínez L. 2013.** El genoma del endosimbionte diazotrófico *Sinorhizobium meliloti* GR4: Dispersión natural y aplicación biotecnológica de nuevos intrones del grupo II. Tesis Doctoral. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Universidad de Granada. Granada, España.
- Martínez J y López I. 2010.** *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Mayz J. 1997.** Simbiosis Leguminosas/Rizobia. Ediciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias IIAPUDO. Universidad de Oriente. Núcleo de Monagas. Maturín, Venezuela. p. 113.
- Michel J. 2009.** El efecto del nivel de melaza en raciones para corderos en la concentración de enzimas en sangre, minerales en hígado y lesiones hepáticas. Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- MINAGRI. 2017.** Ministerio de Agricultura y Riego. Consultado el 15 de marzo del 2017. Disponible en <http://www.minagri.gob.pe/portal/>
- Monza J. y Palacios J. 2004.** Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio – leguminosa. Edit. Almuzara. Córdoba, España. p. 15–38.

- Motta B. 1990.** Métodos analíticos del Laboratorio de Suelos. 5a. ed. IGAC. Bogotá. 502 p.
- Muslera E. y Ratera C. 1991.** Praderas y forrajes: Producción y aprovechamiento. Editorial Mundi Prensa. Madrid, España. p.674.
- Newton E. 2000.** Nitrogen fixation in perspective. In Pedresa, FO, ed. Nitrogen fixation: from moléculas to crop productivíty. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 3-8.
- Nocelli D. 2013.** Efecto del incremento de la pelletización sobre la implantación y productividad de la alfalfa (*Medicago sativa L.*). Programa de mejoramiento genético de alfalfa del INTA. Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. Córdoba, Argentina.
- Nolí E., Bojorquez R. y Ordoñez J. 2015.** Caracterización del Cultivo de Alfalfa con Dormancia 9 en Época Seca en la Sierra Central del Perú. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria INIEA. Huancayo, Perú.
- Olivares J., Bedmar E. y Sanjuán J. 2013.** Biological nitrogen fixation in the context of global change. Molecular plant-microbe interactions. p. 486-494.
- Peña J. y Cabriales J. 2000.** La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: El aporte de técnicas isotópicas. Improsa. México. 120p.
- Peñuelas J. 2002.** Junta de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente. Experiencias de Aplicación de Semillado Directo en la Restauración Forestal de Andalucía. Sevilla, España. p. 135-144.
- Perret X., Staehelin C. y Broughton J. 2000.** Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 180-201.
- Peters M., Franco L., Schmidt A. y Hincapié B. 2003.** Especies forrajeras multipropósito: Opciones para productores de Centroamérica. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 113 p.
- Philippot L., Raaijmakers M., Lemanceau P. y Van Der Putten H. 2013.** Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. Nat Rev Microbiol 11:789–99.
- Pini F., Galardini M., Bazzicalupo M. y Mengoni A. 2011.** Plant-Bacteria Association and Symbiosis: Are There Common Genomic Traits in Alphaproteobacteria? Genes, 2: 1017–1032.

- Pozo M. 1983.** La Alfalfa su cultivo y aprovechamiento. Madrid – España. Mundi-Prensa editorial. 380p.
- Pozo I. 1977.** La Alfalfa Su Cultivo y Aprovechamiento. 2ª. Edición Madrid Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Racca R., Collino D., Dardanelli J., Basigalup D., Gonzáles N., Brenzoni E., Hein N. y Balzarini M. 2001.** Contribución de la Fijación Biológica de Nitrógeno a la Nutrición Nitrogenada de la Alfalfa en la Región Pampeana. Editorial INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Rainero H. 2003.** Actualización en el control de malezas en alfalfa. Jornada Técnica Todo Alfalfa. INTA-EEA Manfredi, Argentina. 16p.
- Rivas M., Jacoboa C., Castañeda A. y Garay J. 2005.** Effect of three harvest systems on the productive performance of five commercial alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties. TEécCHPeAcu Méx 2005;43(1):79-92
- Rocha F. 2015.** Efecto de la granulometría de la mezcla con inclusión de harina de trigo suave *Triticum aestivum* en la calidad de pellet como alimento concentrado para vacas lechera. Universidad Técnica del Norte- Facultad Ingeniería Agroindustrial. Ibarra, Ecuador.
- Ruiz C. 2003.** “Proyecto de pelletizacion de alfalfa (*Medicago sativa*)”. Tesis en Ingeniería en Industrialización de Alimentos. Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito (en línea). Consultado el 15 de abril del 2017. Disponible en: <http://myslide.es/documents/226171.html>
- Sánchez E. y Huanio L. 2017.** Determinación de la granulometría óptima del carbonato de calcio obtenido de la cáscara de huevo para el mejoramiento de suelos ácidos del valle del Santa. Universidad Nacional del Santa - Facultad de Ingeniería. Chimbote, Perú. p. 28-29.
- Santillana N. 1995.** Evaluación de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biov. trifolii para la producción de inoculantes. Tesis para obtener el grado de Magister en Microbiología Agrícola y del Ambiente. Universidad Federal de Rio Grande del Sur. Porto Alegre – Brasil.
- Salas E. 2015.** La simbiosis fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti* – alfalfa: Aproximaciones ómicas aplicadas a la identificación y caracterización de determinantes genéticos del rizobio asociados a la colonización temprana

- de la raíz de alfalfa (*Medicago sativa*). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina.
- Salema M., Parker C., Kidby D. y Chatel D. 1982.** Death of rhizobia on inoculated seed. In: Soil Biology Biochemistry; Great Britain, V.14. p.13-14.
- Sawada H., Kuykendall D. y Young M. 2003.** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. J Gen Appl Microbiol 49:155–79.
- Solid OPD. 2010.** Tecnología productiva de lácteos. Producción de pastos y forrajes. Ayacucho, Perú.
- Soto P. 2000.** Alfalfa en la zona centro sur de Chile. Colección libros INIA N°4. Instituto de Investigación Agropecuaria. Chillán, Chile. 266 p.
- Stewart P. 1966.** Nitrogen fixation in plants. London, Athone. 168p.
- Tang M. 1986.** Pastos y Forrajes Vol 3 Factores que afectan la simbiosis leguminosa *Rhizobium*. Revista de la EEPF "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba.
- Trigoso R. 1970.** Algunos factores que afectan la fijación simbiótica del nitrógeno. Tesis de Grado de Magister Scientiae. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Departamento de Fitotecnia y Suelos. Turrialba. Costa Rica.
- Valdivia R. 1996.** Comparativo de 25 variedades e híbridos de lucerne en producción de forraje verde y materia seca en seis cortes, bajo condiciones de San Isidro-La Joya. Tesis Ing. Agrónomo, Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas. Universidad Católica Santa María. Arequipa, Perú.
- Vance P., Miller S., Driscoll T., Robinson L., Trepp G., Gantt S. y Samas A. 1998.** Nodule carbon metabolism: organic acids for N₂ fixation in Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Current Plant and Science and Biotechnology in Agriculture. Kluwer Academic Publishers. p. 443- 448.
- Van Rhijn P. and Vanderleyden J. 1995.** The *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiol Rev 59:124 – 142.
- Vidor C., Kolling J., Freire J., Scholles D., Brose E. y Pedroso M. 1983.** Fixação biológica do nitrógeno pela simbiose entre *Rhizobium* e leguminosas. IPAGRO. Boletín Técnico N° 11. Porto Alegre, Brasil.

- Vincent M. 1965.** Environmental factors in the fixation of nitrogen by the legumes. Madison, American Society of Agronomy. P. 4040- 4080.
- Willems A., Fernández M., Muñoz E., Goris J., De Vos P., Martínez E., Toro N., y Gillis M. 2003.** Description of new Ensifer strains from nodules and proposal to transfer Ensifer adhaerens Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. Int J Syst Evol Microbiol 53:1207–1217.
- YADESA – Yacimientos y Derivados S.A. de C.V. 2016.** Carbonato de calcio. Veracruz, México.
- Zapata F. y Roy R. 2007.** Utilización de las Rocas Fosfóricas para una Agricultura Sostenible. Boletín FAO No. 13. OIEA-FAO. Roma, Italia. 94 p.
- Zaragoza L. y Pérez J. 2001.** Cosechando alfalfa de alta calidad. Seminario de producción de alfalfa. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.

ANEXOS

Anexo 1.

Tabla de evaluación de resultados a los 0 días.

Tratamiento	Repetición	Diluciones							
		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶	
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T2 Maicena + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	+
	III	+	+	+	+	+	+	-	+
T3 Maicena + harina de trigo	I	+	+	+	+	+	+	-	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	-
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	-
	III	+	+	+	+	+	+	-	-
T5 Melaza de caña + harina	I	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	-	+
	III	+	+	+	+	+	+	-	+

(+) Presencia de nódulos

(-) Ausencia de nódulos

Anexo 2.

Tabla de evaluación de resultados a los 3 días post pelleteado

Tratamiento	Repetición	Diluciones							
		10^{-3}		10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}	
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T2 Maicena + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	-
	III	+	+	+	+	+	+	-	-
T3 Maicena + harina de trigo	I	+	+	+	+	+	+	+	
	II	+	+	+	+	+	+	-	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	-
	III	+	+	+	+	+	+	-	-
T5 Melaza de caña + harina de trigo	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	-
	III	+	+	+	+	+	+	+	-

(+) Presencia de nódulos

(-) Ausencia de nódulos

Anexo 3.

Tabla de evaluación de resultados a los 7 días post pelleteado

Tratamiento	Repetición	Diluciones							
		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵	
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T2 Maicena + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	-
	III	+	+	+	+	+	+	-	-
T3 Maicena + harina de trigo	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	-	+
	II	+	+	+	+	+	+	-	+
	III	+	+	+	+	+	+	-	+
T5 Melaza de caña + harina	I	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	+	-
	III	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Presencia de nódulos

(-) Ausencia de nódulos

Anexo 4.

Tabla de evaluación de resultados a los 14 días post pelleteado

Tratamiento	Repetición	Diluciones							
		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵	
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	-	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T2 Maicena + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	-	-	-
	II	+	+	+	+	+	-	-	-
	III	+	+	+	+	+	-	-	-
T3 Maicena + harina de trigo	I	+	+	+	+	+	+	-	+
	II	+	+	+	+	+	+	-	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	+	+	-
	II	+	+	+	+	+	+	+	-
	III	+	+	+	+	+	+	-	+
T5 Melaza + harina de trigo	I	+	+	+	+	+	+	+	+
	II	+	+	+	+	+	+	-	+
	III	+	+	+	+	+	+	+	-

(+) Presencia de nódulos

(-) Ausencia de nódulos

Anexo 5.

Tabla de evaluación de resultados a los 21 días post pelleteado

Tratamiento	Repetición	Diluciones							
		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵	
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	+	+	+	+	+	+	-	-
	II	+	+	+	+	-	+	+	-
	III	+	+	+	+	+	-	-	+
T2 Maicena + roca fosfórica	I	+	+	+	+	+	-	-	-
	II	+	+	+	+	-	+	-	-
	III	+	+	+	+	+		-	-
T3 Maicena + harina de trigo	I	+	+	+	+	-	+	-	-
	II	+	+	+	+	+		-	-
	III	+	+	+	+	+	-	-	-
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	+	+	+		-		-	-
	II	+	+	+	-	-	-	-	-
	III	+	+	+	-	-	-	-	-
T5 Melaza de caña + harina de trigo	I	+	+	+	+	-	-	-	+
	II	+	+	+	+	-	-	-	+
	III	+	+	-	+	+	+	-	-

(+) Presencia de nódulos

(-) Ausencia de nódulos

Anexo 6.

Tabla de evaluación de resultados a los 28 días post pelleteado

Tratamiento	Repetición	Diluciones							
		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵	
T1 Goma arábica + carbonato de calcio (control)	I	+	+	+	+	-	-	-	-
	II	+	+	+	+	-	-	-	-
	III	+	+	+	+	-	-	-	-
T2 Maicena + roca fosfórica	I	+	+	+	+	-	-	-	-
	II	+	+	+	+	-	-	-	-
	III	+	+	+	+	-	-	-	-
T3 Maicena + harina de trigo	I	+	+	+	+	-	-	-	-
	II	+	+	+	+	-	-	-	-
	III	+	+	+	+	-	-	-	-
T4 Melaza de caña + roca fosfórica	I	-	-	-	-	-	-	-	-
	II	-	-	-	-	-	-	-	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	-
T5 Melaza de caña + harina de trigo	I	+	+	-	+	-	-	-	-
	II	+	+	+	-	-	-	-	-
	III	+	+	+	-	-	-	-	-

(+) Presencia de nódulos

(-) Ausencia de nódulos

Anexo 7.

Datos ordenados de la población de *Sinorhizobium meliloti*.

Tratamiento	Rep.	Muestreos (N° rizobios/semilla)					
		0 días	3 días	7 días	14 días	21 días	28 días
T1 Goma arábica (3.5ml) + carbonato de calcio (30g) (control)*	I	34500	34500	3450	3450	900	85
	II	35000	35000	3500	3450	900	85
	III	34500	34500	3450	3450	900	85
	Promedio	34667	34667	3467	3450	900	85
T2 Maicena (3.5ml) + roca fosfórica (30g)*	I	34500	9000	900	295	295	85
	II	34500	9000	900	295	295	85
	III	34500	9000	900	295	295	85
	Promedio	34500	9000	900	295	295	85
T3 Maicena (3.5ml) + harina de trigo (30g)*	I	34500	34500	3450	3450	295	85
	II	34500	34500	3450	3450	295	85
	III	34500	34500	3450	3450	295	85
	Promedio	34500	34500	3450	3450	295	85
T4 Melaza de caña (3.5ml) + roca fosfórica (30g)*	I	9000	9000	3450	3450	8.5	0
	II	9000	9000	3450	3450	29	0
	III	9000	9000	3450	3450	29	0
	Promedio	9000	9000	3450	3450	22	0
T5 Melaza de caña (3.5ml) + harina de trigo (30g)*	I	35000	34500	3500	3500	295	29
	II	34500	34500	3450	3450	295	29
	III	34500	34500	3500	3450	295	8.5
	Promedio	34667	34500	3483	3467	295	22

* Cantidades por 50 g de semilla

Anexo 8.

Costo de pelletizado de semilla de alfalfa por hectárea.

Considerando densidad de siembra de alfalfa: 25Kg/ha

TRATAMIENTO CONTROL (GOMA ARÁBIGA + CARBONATO DE CALCIO)

DESCRIPCIÓN	UNIDAD	CANTIDAD	P.U.	COSTO/KG	COSTO/25 Kg
Insumos				S/. 53.07	S/. 1,326.75
Semilla de alfalfa variedad California 55	Kg	1	S/. 50.00	S/. 50.00	S/. 1,250.00
Inoculante	bolsa	0.05	S/. 15.00	S/. 0.75	S/. 18.75
Goma arábica	Kg	0.0026	S/. 200.00	S/. 0.52	S/. 13.00
Carbonato de Calcio	Kg	0.6	S/. 3.00	S/. 1.80	S/. 45.00

TRATAMIENTO T2 (MAICENA + ROCA FOSFÓRICA)

DESCRIPCIÓN	UNIDAD	CANTIDAD	P.U.	COSTO/KG	COSTO/25 Kg
Insumos				S/. 51.66	S/. 1,291.57
Semilla de alfalfa variedad California 55	Kg	1	S/. 50.00	S/. 50.00	S/. 1,250.00
Inoculante	bolsa	0.05	S/. 15.00	S/. 0.75	S/. 18.75
Maicena	Kg	0.00455	S/. 2.80	S/. 0.01	S/. 0.32
Roca fosfórica	Kg	0.6	S/. 1.50	S/. 0.90	S/. 22.50

TRATAMIENTO T3 (MAICENA + HARINA DE TRIGO)

DESCRIPCIÓN	UNIDAD	CANTIDAD	P.U.	COSTO/KG	COSTO/25 Kg
Insumos				S/. 51.90	S/. 1,297.57
Semilla de alfalfa variedad California 55	Kg	1	S/. 50.00	S/. 50.00	S/. 1,250.00
Inoculante	bolsa	0.05	S/. 15.00	S/. 0.75	S/. 18.75
Maicena	Kg	0.00455	S/. 2.80	S/. 0.01	S/. 0.32
Harina de trigo	Kg	0.6	S/. 1.90	S/. 1.14	S/. 28.50

TRATAMIENTO T4 (MELAZA DE CAÑA + ROCA FOSFÓRICA)

DESCRIPCIÓN	UNIDAD	CANTIDAD	P.U.	COSTO/KG	COSTO/25 Kg
Insumos				S/. 51.66	S/. 1,291.41
Semilla de alfalfa variedad California 55	Kg	1	S/. 50.00	S/. 50.00	S/. 1,250.00
Inoculante	bolsa	0.05	S/. 15.00	S/. 0.75	S/. 18.75
Melaza de caña	kg	0.0026	S/. 2.50	S/. 0.01	S/. 0.16
Roca fosfórica	Kg	0.6	S/. 1.50	S/. 0.90	S/. 22.50

TRATAMIENTO T5 (MELAZA DE CAÑA + HARINA DE TRIGO)

DESCRIPCIÓN	UNIDAD	CANTIDAD	P.U.	COSTO/KG	COSTO/25 Kg
Insumos				S/. 51.90	S/. 1,297.41
Semilla de alfalfa variedad California 55	Kg	1	S/. 50.00	S/. 50.00	S/. 1,250.00
Inoculante	bolsa	0.05	S/. 15.00	S/. 0.75	S/. 18.75
Melaza de caña	kg	0.0026	S/. 2.50	S/. 0.01	S/. 0.16
Harina de trigo	Kg	0.6	S/. 1.90	S/. 1.14	S/. 28.50

Anexo 9.
Panel Fotográfico



Fotografía 1: Secado a temperatura ambiente de semillas de alfalfa variedad California 55, luego de su lavado



Fotografía 2: Preparación de la solución salina.



Fotografía 3: Acondicionamiento de la solución salina y algunos materiales para su esterilización en el autoclave.



Fotografía 4: Preparación del medio Jensen, para la siembra de plantas en los tubos.



Fotografía 5: Llenado de medio Jensen en los tubos para su esterilización en el autoclave.



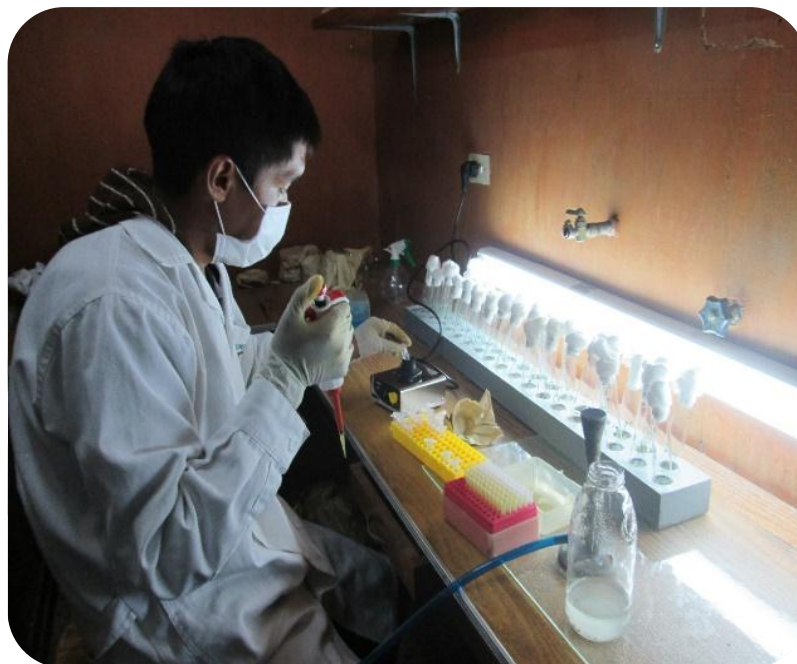
Fotografía 6: Siembra de plántulas pre germinadas de alfalfa en el medio Jensen.



Fotografía 7: Toma de muestras (100 semillas pelletizadas) de cada tratamiento para la inoculación.



Fotografía 8: Toma de 100 μ l de dilución 10^{-2} a los tubos EPENDORF (900 μ l), dilución 10^{-3} .



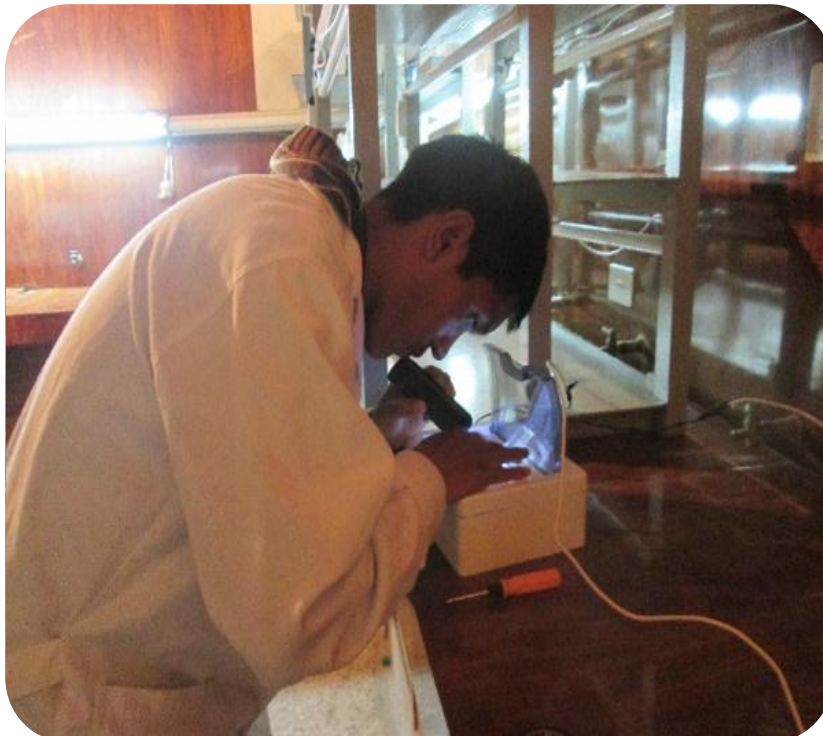
Fotografía 9: Agitado de las diluciones antes de realizar la inoculación correspondiente.



Fotografía 10: Inoculación de *Sinorhizobium meliloti* en plantas de alfalfa, se aplicó 200µl de dilución por tubo.



Fotografía 11: Colocado de las gradillas con las plantas ya inoculadas en el solario.



Fotografía 12: Configuración del Timer (temporizador) para regular con exactitud la cantidad de horas luz en el solario.



Fotografía 13: Vista del solario una vez terminado de inocular todos los tratamientos.



Fotografía 14: Vista de la ubicación de los tratamientos en el solario.



Fotografía 15: Plantas de alfalfa con nódulos.



Fotografía 16: Plantas de alfalfa sin nódulos.