










# Evaluación de la germinación y vigor de alfalfa (*Medicago sativa* L.) Con rizobacterias y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Evaluation of germination and vigour of alfalfa (*Medicago sativa* L.) With rhizobacteria and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Mario Francisco-Santoyo de la Cruz<sup>1</sup> ✉ / Abdul Khalil-Gardezi<sup>1</sup>  - Guillermo Carrillo Castañeda<sup>1</sup>   
Héctor Manuel-Ortega Escobar<sup>2</sup>  / Oscar Raúl Mancilla Villa<sup>1</sup>  / Juan Enrique-Rubiños Panta<sup>1</sup>   
José Abel-López Buenfil<sup>1</sup>  / Mario Ulises-Larque Saavedra<sup>3</sup>  / Gabriel-Haro Aguilar<sup>1</sup>  /  
Cristian Alejandro-Ali Gamboa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados-Montecillo. Departamento de Hidrociencias. Texcoco, estado de México. México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco. Departamento de análisis de sistemas. Ciudad de México. México.

<sup>3</sup>Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Costa Sur, Departamento de Producción Agrícola, Autlán de Navarro, Jalisco, México.

✉ Correspondencia: [kabdul@colpos.mx](mailto:kabdul@colpos.mx)

Recepción: 08-03-2022 / Aceptación: 01-07-2022 / Publicación: 30-05-2024

© Nova Scientia / ISSN 2007-0705 / CC BY-NC-SA 4.0 Internacional / <https://doi.org/10.21640/ns.v16i32.3144>

---

## Resumen

Los contaminantes metálicos en suelos y aguas representan un problema serio en crecimiento debido a las actividades antropogénicas. Algunas técnicas de fitorremediación con rizobacterias, pueden emplearse como una solución alternativa a la descontaminación de sitios afectados por metales. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la germinación de semilla de Alfalfa en soluciones con siete concentraciones de sulfato de cobre y, analizar el vigor y germinación de la Alfalfa inoculada con rizobacterias. Semillas de Alfalfa se germinaron en soluciones de sulfato de cobre, las semillas se inocularon con suspensiones bacterianas de dos cepas de *Pseudomonas* M40 y M67 y los porcentajes de germinación se determinaron y, se hicieron pruebas de vigor. El mayor porcentaje de germinación se logró a los siete días en las soluciones de sulfato de cobre  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  M, la inoculación de semillas de Alfalfa con la cepa M40 presentó 91.3% de germinación en dos días y la variedad Aragón inoculada con la cepa M40 presentó mayor crecimiento de tallo. Entre mayor fue la concentración de sulfato de cobre menor germinación se produce, sin embargo, si logra tolerar pequeñas concentraciones de sulfato de cobre. *Medicago sativa* es una alternativa viable para la descontaminación de sitios afectados por metales potencialmente tóxicos.

**Palabras clave:** Cobre, fitorremediación, germinación, leguminosas forrajeras, inoculación de bacterias, metales potencialmente tóxicos, pruebas de vigor, *Pseudomonas*, semillas.

## Abstract

Metallic contaminants in soil and water represent a serious growing problem due to anthropogenic activities. Some phytoremediation techniques with rhizobacteria can be used as an alternative solution to the decontamination of sites affected by metals. The objective of this work was to evaluate the germination of alfalfa seed in solutions with seven concentrations of copper sulphate and to analyse the vigour and germination of Alfalfa inoculated with rhizobacteria. Alfalfa seeds were germinated in copper sulphate solutions, the seeds were inoculated with bacterial suspensions of two strains of *Pseudomonas* M40 and M67 and the germination percentages were determined, and vigour tests were made. The highest percentage of germination was achieved after seven days in the solutions of copper sulphate  $10^{-4}$  to  $10^{-5}$  M, the inoculation of Alfalfa seeds with the strain M40 presented 91.3% germination in two days and the variety Aragón inoculated with the strain M40 it presented greater stem growth. The higher the concentration of copper sulphate, the less germination occurs, however, if it manages to tolerate small concentrations of copper sulphate. *Medicago sativa* is a viable alternative for the decontamination of sites affected by potentially toxic metals.

**Keywords:** Bacterial inoculation, copper, forage legumes, germination, phytoremediation potentially toxic metals, *Pseudomonas*, seeds, vigour tests.

---

## 1. Introducción

Los contaminantes metálicos en suelos y aguas representan un problema serio que ha venido creciendo debido a las actividades antropogénicas. Entre las principales fuentes contaminantes esta la minería, la metalurgia, la agricultura, los vehículos. Los principales mecanismos de toxicidad son: bloqueo de grupos funcionales esenciales en biomoléculas, debido a la alta afinidad de los cationes; desplazamiento de centros catiónicos en enzimas y por la formación de especies reactivas de oxígeno (Covarrubias & Peña, 2017). Por lo cual se ven afectados numerosos sitios en donde están en contacto con seres vivos y esto representa un riesgo a la salud por el potencial dañino de ciertos metales como el cobre que pueden producir cánceres, problemas de gestación en mujeres y deformaciones congénitas.

El cobre (Cu) es un micronutriente esencial para las plantas, desempeña un papel importante en procesos biológicos y fisiológicos tales como fotosíntesis, síntesis de proteínas y procesos respiratorios. La concentración de Cu en el tejido vegetal varía de 5 a 30 mg kg<sup>-1</sup>. La deficiencia de cobre inhibe el proceso de fotosíntesis y provoca crecimiento deficiente y envejecimiento con escasa biomasa. Por el contrario, el exceso de Cu puede alterar la germinación de las semillas, el crecimiento y la morfología de las plantas. Su continuo y prolongado uso en agricultura, como antibacteriano y antifúngico, ha llevado a fuerte contaminación del suelo (Ballabio *et al.*, 2018).

La fitorremediación puede emplearse como una solución alternativa a la descontaminación de sitios afectados por metales pesados, como es el caso de la fitoextracción de metales, en la cual se utilizan plantas aptas para este fin que deben cumplir los siguientes criterios: metalotolerancia hacia elementos presentes en niveles tóxicos; alta producción de biomasa y acumulación de metales. El concepto general de restauración de áreas contaminadas mediante fitoextracción consiste en el cultivo de especies vegetales apropiadas *in situ*, recolectando la biomasa que contiene metales tóxicos y tratándola para disminuir su volumen y peso (Suman *et al.*, 2018).

El cultivo de la Alfalfa (*Medicago sativa* L.) se emplea comúnmente para la alimentación del ganado bovino, éste cuenta con investigaciones de respuestas a estrés salino en la etapa de germinación (González *et al.*, 2011). Es de la familia de las *Fabaceae*, perenne, usada como abono verde para mejorar la fertilidad del suelo. Se cultiva en todo el mundo en zonas templadas (Gaafar *et al.*, 2019). Tiene un sistema de raíces profundas y amplia adaptabilidad a niveles relativamente altos de estrés abiótico que incluye resistencia al frío, calor, sequía, metales pesados y salinidad. Las leguminosas como la alfalfa se usan para la rotación de cultivos y fijar nitrógeno atmosférico al suelo para mejorar la calidad y cantidad de la cosecha, es de polinización cruzada (Gardezi *et al.*, 2013; Peralta *et al.* 2002; Radović *et al.* 2009). Se ha estudiado el efecto de ciertos metales pesados y la absorción en la planta de alfalfa, a varios valores de pH y también se ha demostrado el potencial de fitorremediación de esta planta (Peralta *et al.*, 2002a). Ciertos aislamientos bacterianos promueven el desarrollo de las plántulas de alfalfa (Carrillo *et al.*, 2002), aumentan la capacidad de asimilación de cobre de la planta (Carrillo *et al.*, 2002a) y modulan el intercambio de cobre entre la raíz y la parte aérea de esta planta (Carrillo *et al.*, 2005).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal defienden la salud de las plantas de forma ecológica, están involucradas en diversas actividades bióticas del ecosistema del suelo para hacerlo dinámico (Gupta *et al.*, 2021). Colonizan el sistema de raíces de las plantas y mejoran el crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos, incluida la solubilización de fosfato, la producción de ácido indol-3-acético (IAA), sideróforos, 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa y cianato de hidrógeno; degradación de contaminantes ambientales y producción de hormonas. Pueden inferir en actividades de desintoxicación de metales tóxicos, tolerancia a la salinidad y control biológico (Gouda *et al.*, 2018).

Las *Pseudomonas* son el género más representado entre las bacterias cultivables, es omnipresente en el suelo y tiene una adaptabilidad genética, ambiental y fisiológica bien conocida para sobrevivir en cualquier ambiente (Flores *et al.*, 2022).

La fitoextracción consiste en extraer contaminantes del suelo o del agua de las raíces de las plantas. Los agentes quelantes ayudan a aumentar las propiedades de almacenamiento de metales de las plantas. Mediante la formación de complejos metálicos solubles acuosos con el agente quelante, aumenta la solubilidad de los metales pesados. Por lo tanto, el metal se puede extraer de los diferentes componentes del suelo. Los agentes quelantes como el Ácido Etilendiaminotetraacético Sintético (EDTA) se estudian para extraer metales de suelos y sedimentos. Es eficaz para eliminar metales de los suelos. Además, es poco probable que los metales que no se liberan mediante el lavado con (EDTA) se movilicen mediante procesos naturales y, por lo tanto, pueden tener poca importancia medioambiental (Dhaliwal *et al.*, 2020).

En este trabajo se analiza el efecto de la germinación en dos variedades de Alfalfa (Victoria y Aragón) que fueron inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal extracelular del género *Pseudomonas* las cuales se seleccionaron del trabajo de (Romero *et al.*, 2020) por sus resultados favorables (cepa M40 y M67) y en siete soluciones de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), para determinar en qué medida las cepas bacterianas como promotoras del desarrollo de plántulas de Alfalfa, mejoran la capacidad de asimilación de Cu en plántulas de Alfalfa.

## 2. Métodos, técnicas e instrumentos

La idea del trabajo fue comparar dos variedades disponibles de Alfalfa en tiendas de semillas agrícolas y se encontraron las variedades (Victoria y Aragón).

### *Germinación con agua destilada*

La germinación se llevó utilizando 50 semillas por caja Petri de 9 cm de diámetro, sobre papel filtro humedecido con 4 mL de agua destilada (cada tratamiento con tres repeticiones por variedad). El porcentaje de germinación fue determinado diariamente hasta finalizar la germinación.

### *Germinación en soluciones de siete concentraciones de sulfato de cobre*

Para determinar las concentraciones de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  para las dos variedades de Alfalfa se llevó a cabo una prueba de germinación. Se realizó una dilución de sulfato de cobre 0.1 M, para ello se prepararon 0.747 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 30 mL de agua destilada. De la solución anterior, se tomaron 3 mL para realizar las siguientes diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ . Se contaron 48 lotes de 50 semillas de cada una de las dos variedades de alfalfa y se colocaron en placas Petri con papel filtro absorbente. A cada placa se le agregaron 4 mL de las diluciones anteriormente mencionadas (Carillo *et al.*, 2005). Se realizaron 3 repeticiones por cada dilución y 3 repeticiones sin  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Las semillas fueron colocadas en una cámara de germinación ajustada a 28-30 °C y diariamente se contaron las semillas que habían germinado, hasta que ya no presentaron más germinaciones o cumplieron con el 100% de germinación.

### *Inoculación de la semilla con suspensiones bacterianas y determinación de la germinación y el vigor de las semillas de alfalfa*

Para realizar la inoculación de la semilla, los cultivos bacterianos se prepararon en placas de Petri que contenían medio B de King que se incubaron durante 24 h a 28-30 °C. A partir de los cultivos, se prepararon suspensiones bacterianas en agua destilada estéril ajustado a una densidad óptica de entre 0.8 y 1. Para preparar el medio B de King se utilizó el método descrito en Allaert and Escolá (2002).

A partir del banco de bacterias del laboratorio de Genética Molecular del departamento de Genética del Colegio de Postgraduados, se prepararon los cultivos de las cepas de bacterias para inocular las muestras de semillas de las 2 variedades de Alfalfa con tres repeticiones. La inoculación de semillas se realizó en dos bloques con tres repeticiones cada una. En el primer bloque se probaron la cepa M40 en el segundo bloque la cepa M67, estas cepas se seleccionaron por presentar los mejores resultados en el trabajo de Romero *et al.*, (2020). Las semillas se mezclaron con la suspensión bacteriana (50 semillas mezcladas con 0.8 mL de suspensión bacteriana), esta preparación se dejó por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las semillas inoculadas se colocaron sobre dos láminas de papel de filtro humedecidas con 4 mL de agua destilada en cajas Petri de plástico de 9 cm de diámetro. Las semillas se colocaron en una cámara de germinación a 28-30 °C y se contaron diariamente las semillas que habían germinado, semillas en las que la punta de la raíz ya era visible.

### *Pruebas de vigor*

De las semillas de alfalfa inoculadas con las cepas M40 Y M67 un lote de cada variedad se sembró en charolas de unicel con sustrato de Peat Moss de la marca Rekyva comprado en tienda de semillas agrícolas. Una vez que las plantas crecieron durante 30 días se procedió a extraerlas con mucho cuidado de no dañar las estructuras vegetales y se midió en papel milimétrico las longitudes de raíz y el tallo. Enseguida 15 plántulas seleccionadas de cada variedad que habían sido inoculadas con suspensiones de las dos cepas bacterianas fueron utilizadas para separar la parte aérea de la parte radicular, se colocaron en hojas de papel de estraza para secar las muestras en la estufa a 28 °C por 4 días y en otra estufa por 4 días a 70 °C para determinar el peso de biomasa seca en una balanza digital.

### Análisis estadístico

En la germinación de alfalfa de las dos variedades inoculadas con suspensiones celulares de dos cepas de bacterias (M40 y M67), se realizó la prueba  $t$  ( $p < 0.05$ ) para dos muestras con el uso del análisis de datos del software Excel.

### 3. Resultados y discusión

Los resultados de la presente investigación arrojan que las variedades de Alfalfa (Victoria y Aragón) con agua destilada mostraron el máximo porcentaje de germinación en los días 3 y 4. La Alfalfa Aragón presentó 97.3 % de germinación en el día 3 y la Alfalfa Victoria 95.3 % en el día 4, estos resultados se utilizaron como control de referencia y de acuerdo al análisis estadístico no tienen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

#### 3.1 Germinación en soluciones de sulfato de cobre

En la solución  $10^{-1}$  M de sulfato de cobre la germinación de Alfalfa Victoria en el día 3 fue menos de dos por ciento (tabla 1), lo que indica que el sulfato de cobre tiene un efecto negativo en la germinación. Mientras en la variedad de Alfalfa Aragón tampoco hubo germinación.

La variedad Alfalfa Aragón presentó más porcentaje de germinación en menos días (87 %) en el día 3 en la concentración de  $10^{-4}$  M y (82.6%) en la concentración  $10^{-5}$  M en el día dos, por lo que en esta variedad las semillas tienen el más alto porcentaje de germinación en el menor tiempo, sin embargo, también presenta alta germinación (87.1 %) en el día siete en la concentración  $10^{-6}$  M, mientras que la variedad Victoria su máximo porcentaje de germinación lo presenta en el día séptimo (81.9 %) en la concentración de  $10^{-6}$  M lo que sugiere que el sulfato de cobre tiene un efecto positivo en el porcentaje de germinación con respecto a la germinación testigo (variedad Victoria 81.5 % en el séptimo día) y (variedad Aragón 86.4 % en el séptimo día)

Como punto de discusión podemos mencionar que Samma, (2017) investigó los efectos de estrés en la germinación de Alfalfa con  $\text{CuCl}$  en comparación con la muestra control, la tasa de germinación, longitud de la raíz y peso fresco de las plántulas, el autor notó disminución progresiva a medida que aumentaba la concentración de  $\text{CuCl}$  (0.75 a 6 mM) en la última concentración hubo inhibición de la germinación. Lo que muestra efecto negativo del cobre en la germinación. Sin embargo, en este trabajo no representa letalidad ya que a partir de la concentración  $10^{-4}$  M de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  logra estimular la germinación. En la (figura 1) se aprecian las germinaciones de alfalfa en las siete concentraciones de sulfato de cobre en las dos variedades en el día dos.

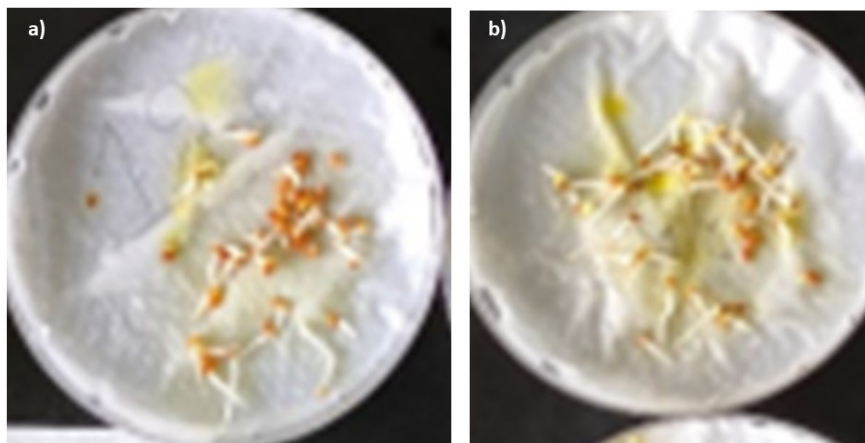


Figura 1. Aspecto de las semillas de Alfalfa en el día dos, con  $10^{-4}$  M de sulfato de cobre pentahidratado, a) variedad Victoria y b) variedad Aragón.

*Fuente:* Generada por los autores.

Figure 1. Figure 1. Appearance of Alfalfa seeds on day two, with  $10^{-4}$  M copper sulphate pentahydrate, a) Victoria variety and b) Aragón variety.

*Source:* Generated by the authors.

Tabla 1. Porcentaje de germinación en frecuencia acumulada de dos variedades de Alfalfa con siete concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado.

Table 1. Percentage of germination in accumulated frequency of two varieties of Alfalfa with seven concentrations of copper sulphate pentahydrate.

Concentración de CuSO <sub>4</sub>	Variedades Alfalfa	Días de germinación								Error estándar de CuSO <sub>4</sub>
		0	1	2	3	4	5	6	7	
10 <sup>-1</sup>	Victoria	0	0	0	1.33	1.33	1.33	1.33	1.33	0.17
	Aragón	0	0	0	0	0	0	0	0	
10 <sup>-2</sup>	Victoria	0	13.3	73.3	79.9	80.2	80.2	80.2	80.8	6.30
	Aragón	0	14	70.6	77.2	77.8	77.8	77.8	81.1	
10 <sup>-3</sup>	Victoria	0	14.6	65.2	71.2	72.5	72.5	72.5	73.1	5.91
	Aragón	0	12.6	67.2	75.8	77.8	77.8	77.8	79.1	
10 <sup>-4</sup>	Victoria	0	12.6	77.2	79.8	81.1	81.1	81.1	81.1	6.68
	Aragón	0	18	84.6	87.2	87.2	87.2	87.2	87.2	
10 <sup>-5</sup>	Victoria	0	13.3	72.6	78.6	78.6	78.6	78.6	78.6	0.17
	Aragón	0	15.3	82.6	86	86	86	86	87.2	
10 <sup>-6</sup>	Victoria	0	11.3	71.3	79.3	80.6	80.6	80.6	81.9	6.51
	Aragón	0	21.3	78.6	85.2	86.5	86.5	86.5	87.1	
10 <sup>-7</sup>	Victoria	0	13.3	68.6	77.23	78.53	78.53	78.53	79.8	6.16
	Aragón	0	20.6	75.9	82.5	83.1	83.1	83.1	83.7	
Control	Victoria	0	9.3	72.9	78.9	80.2	80.2	80.2	81.5	6.51
	Aragón	0	22.6	79.2	85.2	85.8	85.8	85.8	86.4	
Error estándar	Victoria		1.66	9.03	9.61	9.73	9.73	9.74	9.82	
	Aragón		2.56	9.83	10.44	10.51	10.51	10.51	10.62	

Fuente: Generada por los autores.

Source: Generated by the authors.

Se ha encontrado que aumentar la concentración de Cu entre 0.002 y 6.5 mg L<sup>-1</sup>, condujo a un aumento de Cu en concentraciones de 41 % a 120 %, respectivamente, en vacuolas de brotes aislados. Se ha demostrado que la presencia de Fe puede aumentar la absorción de Cu, pero no alteró la translocación de Cu de raíz a disparar en *T. latifolia* (Carrillo *et al.*, 2002a).

Otro aspecto interesante de mencionar es el efecto que tiene el ion sulfato en la germinación de Alfalfa, por ejemplo, Redmann, (1974) encontró inhibición de la germinación de semillas de Alfalfa en tres variedades (Rambler, Roaemer y Beaver) con sulfato de sodio y potasio, se lo atribuye a los potenciales osmóticos que presentan las sales de sulfato y la toxicidad iónica. Aunque también menciona que depende del tipo de sal. Este fenómeno se pudo haber presentado en la concentración de 10<sup>-1</sup> M en este experimento, donde mostró inhibición en la germinación en la mayoría de las semillas.

### 3.2 Germinación de Alfalfa de las dos variedades inoculadas con suspensiones celulares de dos cepas de bacterias (M40 y M67)

En el caso de la germinación de la variedad de alfalfa Victoria inoculada con células de la cepa bacteriana M40 presenta 91.3 % de germinación en el día 2 siendo la que tiene más porcentaje de germinación. Esta misma variedad, pero con la cepa M67 presenta 90.6 % de germinación en el día dos de germinación (figura 2). De acuerdo al análisis estadístico ( $p < 0.05$ ) no hay diferencias significativas entre la cepa M40 y M67 en la variedad Victoria, ni tampoco existe diferencia significativa en la cepa M40 y M67 en la variedad Aragón.

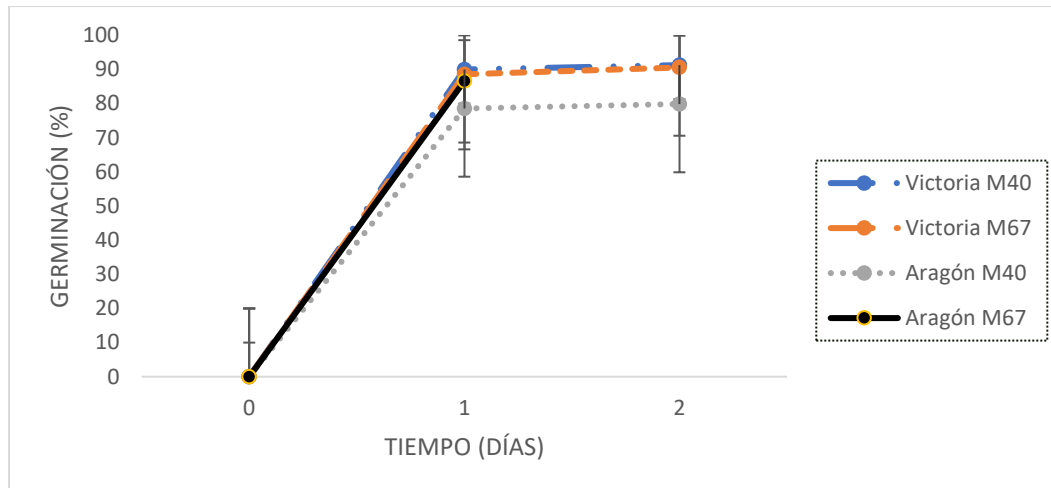


Figura 2. Germinación de semillas de las variedades Alfalfa Victoria y Aragón inoculadas con suspensiones celulares de dos cepas bacterianas (M40 y M67).

Fuente: Generada por los autores.

Figure 2. Germination of seeds of the Victoria and Aragón Alfalfa varieties inoculated with cell suspensions of two bacterial strains (M40 and M67).

Source: Generated by the authors.

Resultados de investigación de Gardezi *et al.* (2019), encontró que la inoculación con la cepa Avm de *Pseudomonas fluorescens* promueven la estimulación del crecimiento vegetal de (altura de planta, diámetro del tallo, longitud de la raíz y peso seco de brotes) además pueden ayudar a disminuir los efectos negativos de la contaminación de aguas residuales y el estrés biológico de las plantas, en ambos trabajos hubo estimulación de desarrollo vegetal. En el trabajo de Zhu *et al.* (2020) la tasa de germinación de (*Medicago sativa*) disminuyó significativamente en condiciones de estrés por NaCl, pero no se vio afectada por la inoculación bacteriana. En condiciones de NaCl 0 mM, cuando se inocularon con las bacterias NRCB001, NRCB002 y NRCB003, los pesos secos de las plántulas aumentaron significativamente ( $P < 0,05$ ) por lo que mejora la germinación y crecimiento e induce tolerancia a la salinidad.

Se han encontrado resultados satisfactorios inoculando semillas de Alfalfa con *Pseudomonas* sp (cepas: NT15, NT19, NT20 y NT27) en donde se observó aumento en el crecimiento de la plántula en la germinación en condiciones normales y de estrés por cromo demostrando su potencial de interacción con la planta y también en la interacción con suelos contaminados por metales potencialmente tóxicos (Tirry *et al.*, 2021). Las diferencias de los porcentajes de germinación entre variedades de Alfalfa observadas en este trabajo puede estar relacionada con la genética de cada variedad y por ejemplo Zhang *et al.*, (2021) menciona autotoxicidad de Alfalfa en ambientes artificiales, esto en respuesta a los mecanismos de las autotoxinas que son principalmente metabolitos secundarios, las variedades son sensibles pero depende al diferente contenido de autotoxinas de cada variedad, como consecuencia la inhibición de la germinación de semillas.

### 3.3 Pruebas de vigor de las variedades de alfalfa

En la (figura 4) se presentan los resultados del crecimiento del tallo y raíz de las dos variedades de Alfalfa (Victoria y Aragón) en donde se aprecia que la variedad Aragón inoculada con suspensiones de la cepa bacteriana M67 tiene menor crecimiento de tallo, pero presenta crecimiento de raíz parecido a las demás variedades, en cambio la misma variedad y la variedad Victoria inoculada con la cepa M40 tienen mayor crecimiento de tallo por lo que en este caso esta cepa tiene mejor efecto de crecimiento. En la (figura 3) se muestran las plántulas de Alfalfa inoculadas con las cepas (M40 y M67) en donde se observa la raíz y la parte aérea a los 30 días de cultivo.

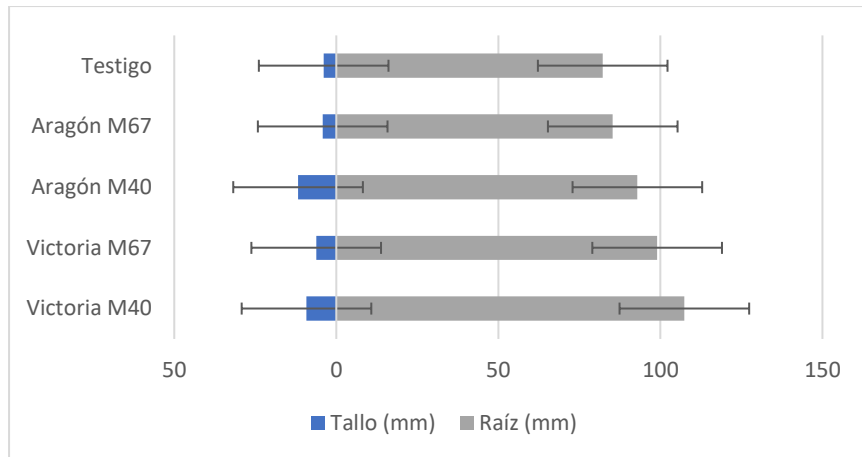


Figura 4. Comparación de promedio de longitudes de 15 plántulas de las dos variedades de Alfalfa inoculadas con suspensiones celulares de dos cepas de bacterias.

*Fuente:* Generada por los autores.

Figure 4. Comparison of the average length of 15 seedlings of the two varieties of Alfalfa inoculated with cell suspensions of two strains of bacteria.

*Source:* Generated by the authors.

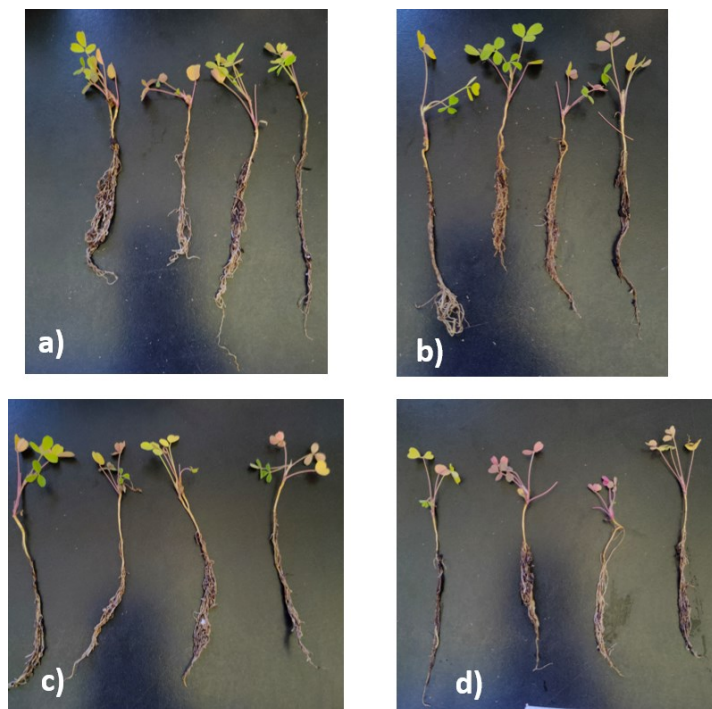


Figura 3. Aspecto de las plántulas de Alfalfa que se utilizaros para determinar la longitud de tallo, raíz y peso de biomasa seca. Variedad Victoria inoculada con la cepa a) M40 y b) M67. La variedad Aragón inoculada con la cepa c) M40 y d) M67.

*Fuente:* Generada por los autores.

Figure 3. Appearance of the Alfalfa seedlings that were used to determine the length of stem, root and weight of dry biomass. Victoria variety inoculated with strain a) M40 and b) M67. The Aragón variety inoculated with strain c) M40 and d) M67.

*Source:* Generated by the authors.

La variedad Victoria inoculada con la cepa M40 presentó mayor efecto de crecimiento de raíz y la variedad Aragón con la misma cepa tiene menor efecto de crecimiento de raíz, notándose que las dos cepas de bacterias (M40 y M67) tienen resultados no tan alejados unos de otros. Estudios de cepas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con *Enterobacter aerogenes* (LJL-5) y *Pseudomonas aeruginosa* (LJL-13) en Alfalfa cultivada en condiciones salinas y alcalinas presentaron aumento de la biomasa, aumento en la altura de los brotes, los pesos fresco y seco, el rendimiento y el contenido de proteína cruda de las plantas de Alfalfa, pero disminuyó el contenido de fibra (Liu *et al* 2019).

En la (figura 5) se presenta los resultados obtenidos del peso de biomasa seca de tallo y raíz, observándose que la variedad Victoria inoculada con la cepa M40 presenta mayor peso seco de tallo (220 mg) y la variedad Aragón con la misma cepa es menor el peso (180 mg). La longitud del tallo de las plántulas varía al inocular semillas, esto podría ser por la diversidad genética de las cepas y de las variedades mejoradas, por lo tanto, se podrían considerar como criterios de selección.

Es importante mencionar que lo que ocurre en el momento de la germinación y desarrollo de las plántulas en el laboratorio y que solo se observa en los primeros días de desarrollo de la plántula, es diferente a lo que ocurre en el desarrollo de las plántulas en invernadero, ya que, al medir la longitud del tallo y raíz de las plantas en el invernadero, se pueden notar diferencias en la eficiencia entre cepas.

En el trabajo de Toniutti y Fornasero, (2020) donde realizaron la inoculación con rizobios (*Ensifer meliloti*) mostró aumento de la producción de materia seca a los 120 días de siembra, lo que sugiere que este comportamiento está asociado con beneficios en la nutrición logrando mejor rendimiento del cultivo de Alfalfa. En el caso del peso seco de la raíz la variedad Aragón inoculada con la cepa M67 y M40 presenta menor peso, que la variedad Victoria inoculada con ambas cepas.

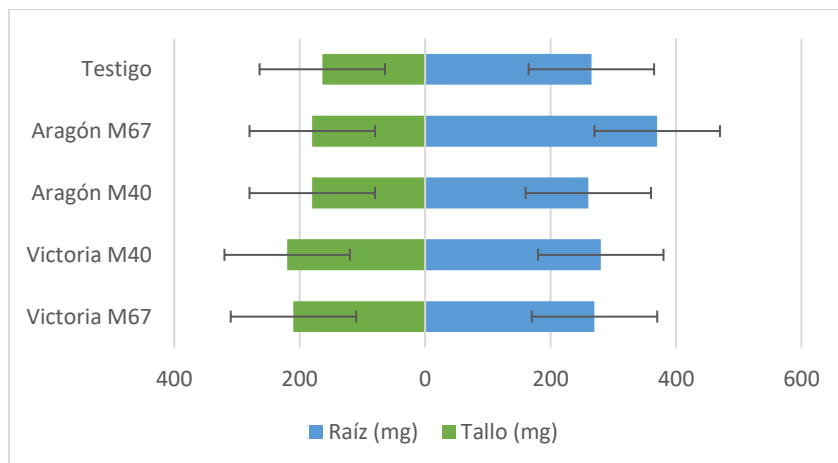


Figura 5. Comparación del promedio del peso de biomasa seca, de 15 plántulas de dos variedades de Alfalfa, inoculadas con suspensiones de dos cepas de bacterias.

Fuente: Generada por los autores.

Figure 5. Comparison of the average dry biomass weight of 15 seedlings of two varieties of Alfalfa, inoculated with suspensions of two strains of bacteria.

Source: Generated by the authors.

#### 4. Conclusiones

En las concentraciones de  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M de sulfato de cobre pentahidratado se presentan los más altos porcentajes de germinación en el menor tiempo en la variedad Aragón. Entre mayor fue la concentración de sulfato de cobre menor germinación se produce, sin embargo, si logra tolerar pequeñas concentraciones de sulfato de cobre. Lo anterior refleja el potencial de la planta de *Medicago sativa* como una alternativa viable para la descontaminación de sitios afectados por metales potencialmente tóxicos. Las semillas inoculadas con suspensiones bacterianas de la cepa M40 y M67 mostraron mayor germinación en la variedad Victoria y no pasó lo mismo en la variedad Aragón donde presentó ligeramente menores porcentajes de germinación con respecto al testigo, lo que sugiere una mayor aceptación de las células de la cepa M40 como alternativa de promover la germinación y el crecimiento de plántulas de Alfalfa en la variedad Victoria. En las pruebas de vigor



se encontró que la cepa M40 presenta mayores crecimientos de las plantas de Alfalfa en la variedad Victoria y Aragón en este sentido esta cepa promueve más el crecimiento y vigor de la planta.

## 5. Información adicional

No.

### Información de los autores

Mario Francisco-Santoyo de la Cruz<sup>1</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-8239-428X>

Abdul Khalil-Gardezi<sup>1</sup>  <https://orcid.org/0000-0003-2636-1579>

Guillermo Carrillo Castañeda<sup>1</sup>  <https://orcid.org/0000-0003-3444-3902>

Héctor Manuel-Ortega Escobar<sup>2</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-1580-4795>


Óscar Raúl Mancilla Villa<sup>1</sup>  <https://orcid.org/0000-0003-4845-1188>

Juan Enrique-Rubiños Panta<sup>1</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-9788-0280>

José Abel-López Buenfil<sup>1</sup> 

Mario Ulises-Larque Saavedra<sup>3</sup> 

Gabriel-Haro Aguilar<sup>4</sup>  <https://orcid.org/0000-0003-4483-2426>

Cristian Alejandro-Ali Gamboa<sup>1</sup> 

### Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

### Referencias

- Allaert, C. y Escolá, M. (2002). Métodos de análisis microbiológicos de alimentos. Díaz de Santos S. A., 123-126.
- Ballabio, C., Panagos, P., Lugato, E., Huang, J., Orgiazzi, A., Jones, A. y Montanarella, L. (2018). Copper distribution in European top-soils: an assessment based on LUCAS soil survey. *Science of the total environment*, (636), 282-298. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.268>.
- Carrillo, C. G., Juárez, M., J., Peralta, V., J., Gómez, E., Tieman, K.J. y Gardea, T. J. L. (2002). Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Advances in environmental research*, 6, 391-399. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(02\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(02)00054-0)
- Carrillo, C. G., Juárez, M., J., Peralta, V., J., Gómez, E., Tieman, K.J. y Gardea, T. J. L. (2002a). Plant growth-promoting bacteria promote copper and iron translocation from root to shoot in alfalfa seedlings. *Journal of plant nutrition*, 26 (9), 1801-1814. <https://doi.org/10.1081/PLN-120023284>
- Carrillo, C. G., Juárez, M., J., Peralta, V., J., Gómez, E., Tieman, K.J. y Gardea, T. J. L. (2005). Modulation of uptake and translocation of iron and copper from root to shoot in common bean by siderophore-producing microorganisms. *Journal of plant nutrition*, 28, 1853-1865. <https://doi.org/10.1080/01904160500251340>
- Covarrubias, S. A. y Peña, C. J. J. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33, 7-21. DOI: 10.20937/RICA.2017.33.esp01.01
- Dhaliwal, S.S., Singh, J. y Taneja, P.K. (2020). Remediation techniques for removal of heavy metals from the soil contaminated through different sources: a review. *Environmental science and pollution research*, 27, 1319-1333. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06967-1>
- Flores, D. N. J., Mateos, N. E., Redondo G. S., Pajuelo, E., Rodríguez L. I. D. y Navarro T. S. (2022). Role of nodulation-enhancing rhizobacteria in the promotion of *Medicago sativa* development in nutrient-poor soils. *Plants*, 11, 1164. <https://doi.org/10.3390/plants11091164>
- Gardezi, A. K. (2013). Efectos de un fungicida sobre *Glomus intrarradices* asociado con diferentes genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), avena (*Avena sativa*) y trigo (*Triticum aestivum*) en dos tipos de suelo. Aplicación geomántica de la región central de México, cuenca de Mexitlan y cuenca del valle de México. Colegio de Postgraduados.
- Gardezi, A. K., Marquez, B. S. R., Carrillo, C. G., Flores, M. H., Haro, A. G., Valdes, V. E., Escalona, M. M. J. y Larque, S. M. U. (2019). Sewage water effects on okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) growth affected by organic matter, and Avm of *Pseudomonas fluorescens*. *World journal of agriculture and soil science*, 1, 5. DOI: 10.33552/WJASS.2019.01.000524

- Gaafar, Y. Z. A., Richert, P. K. R., Maaß, C., Heinrich, V. J. y Ziebell, Z. (2019). Characterisation of a novel nucleorhabdovirus infecting alfalfa (*Medicago sativa*). *Virology journal*, 16, 55. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1147-3>
- Gouda, S., Rout, G. K., Gitishree, D., Spiros, P., Han, S. S. y Kumar, P. J. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agricultura. *Microbiological research*, (206), 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- González, R. S. L., Franco, M. O., Ramírez, A. C., Ortega, E. H. M., Quero, C. A. R. y Trejo, L. C. (2011). Germinación y crecimiento de alfalfa bajo condiciones salinas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2, 1. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342011000100014&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342011000100014&lng=es&nrm=iso)
- Gupta, K., Dubey, N. K., Singh, S. P., Kheni, J. K., Gupta, S. y Varshney, A. (2021). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for crop improvement in: Yadav A.N., Singh J., Singh C., Yadav N. (eds) current trends in Microbial biotechnology for sustainable agriculture. *Environmental and microbial biotechnology*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-6949-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-15-6949-4_9)
- Liu, J. Tang, L. Gao, H. Zhang, M y Guo, C. (2019). Enhancement of alfalfa yield and quality by plant growth-promoting rhizobacteria under saline-alkali conditions. *Science of food and agriculture*. 99. (1), 281-289. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9185>
- Peralta, V. J., Gardea, T. J.L., Gómez, E., Tieman, K. J., Parsons, J. G., De la Rosa, G. y Carrillo, C. G. (2002). Potential of alfalfa plant to phytoremediated individually contaminated montmorillonite-soils with cadmium (II), chromium (VI), copper (II), nickel (II), and zinc (II). *The bulletin of environmental contamination and toxicology*, 69, 74-81. DOI: 10.1007/s00128-002-0012-y
- Peralta, V. J., Gardea, T. J.L., Gómez, E., Tieman, K. J., Parsons, J. G., De la Rosa, G. y Carrillo, C. G. (2002a). Effect of mixed cadmium, cooper, nickel and zinc at different pH's upon alfalfa and heavy metal uptake. *Enviromental pollution*, 119, (3), 291-301. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00105-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00105-7)
- Radović, J., Sokolović, D. y Marković, J. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnol animimal husbandry*. (25), 465-475.
- Redmann, R. E. (1974). Osmotic and specific ion effects on the germination of alfalfa. *Canadian journal of botany*, 52, 4. <https://doi.org/10.1139/b74-104>
- Romero, A. K. N, Carrillo, C. G, Gardezi, A. K, Flores, M. H., Valdés, V. E., Larqué, S. M. U. y Haro, A. G. (2020). Criteria for the Selection of vegetable growth-promoting bacteria to be applied on roselle crop (*Hibiscus Sabdariffa* L.) and bioremediation. *International journal of environmental & agriculture research* 6: 12. <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4405070>
- Samma, M.K., Zhou, H. y Cui, W. (2017). Methane alleviates copper-induced seed germination inhibition and oxidative stress in *Medicago sativa*. *Biometals*, (30), 97-111. <https://doi.org/10.1007/s10534-017-9989-x>
- Suman, J., Uhlik, O., Viktorova, J. y Macek, T. (2018). Phytoextraction of heavy metals: A promising tool for clean-up of polluted environment? *Frontiers in plant science*, 9, 1476. doi: 10.3389/fpls.2018.01476
- Tirry, N., Kouchou, A. y El Omari, B. (2021). Improved chromium tolerance of *Medicago sativa* by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of genet engineering and Biotechnology*, (19), 149; <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00254-8>
- Toniutti, M. A y Fornasero, L. V. (2020). Efecto de la inoculación con rizobios y la fertilización fosfatada sobre la nodulación y producción de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en el centro de Santa Fe (Argentina). *Agriscientia*, 37 (2), 1-10. <https://dx.doi.org/10.31047/1668.298x.v37.n2.24067>
- Zhang, X.-Y., Shi, S.-L., Li, X.-L., Li, C.-N., Zhang, C.-M., A. Y., Kang, W.-J. y Yin, G.-L. (2021). Effects of autotoxicity on Alfalfa (*Medicago sativa*): Seed germination, oxidative damage and lipid peroxidation of seedlings. *Agronomy*, 11, (6), 1027. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061027>
- Zhu, Z., Zhang, H. y Leng, J. (2020). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on the growth of *Medicago sativa* L. under salinity conditions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113, 1263-1278. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01434-1>