


El sistema alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* como interacción útil para la fijación de nitrógeno y mejorador de suelo. Revisión



Gabriel Gallegos Morales ^a

Omar Jiménez Pérez ^a

Juan Manuel Sánchez Yañes ^b

Perpetuo Álvarez Vázquez ^a

Francisco Castillo Castillo ^{c*}

^a Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología. Calzada Antonio Narro # 1923, Buenavista, Saltillo, 25315 Coahuila, México.

^b Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones en Química y Biología. Michoacán, México.

^c Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Saltillo. Coahuila, México.

* Autor de correspondencia: reyes.francisco@inifap.gob.mx

Resumen:

Ante los retos por la necesidad de fertilizantes para mantener la producción agrícola, ocurre naturalmente un proceso biológico de fijación de nitrógeno atmosférico por parte de un grupo de bacterias simbióticas que forman una asociación muy estrecha con plantas del grupo de las leguminosas, entre las que se encuentran las alfalfas o tréboles silvestres (*Melilotus* spp.). Desde el punto de vista ecológico esta planta tiene una función muy importante por la buena capacidad de asociarse a bacterias nativas del suelo fijadoras de nitrógeno del género *Sinorhizobium*. Un aspecto fundamental es que esta especie vegetal puede crecer normalmente en suelos alcalinos, lo que le convierte aún más como doble importante, ya que, por un lado, fija nitrógeno y por el otro puede incorporarse como abono

verde. Con ello, se mejoran las propiedades físico-químicas del suelo y, se incrementan los niveles de materia orgánica, condición que es muy pobre en las áreas de zonas áridas. Adicionalmente, esta especie puede resistir bajas temperaturas y crecer satisfactoriamente en invierno. Este documento presenta una síntesis del género *Melilotus* y su simbionte *Sinorhizobium meliloti*, así como su importancia como posible mejorador natural del suelo.

Palabras clave: *Melilotus*, *Sinorhizobium*, Simbionte, Nitrógeno, Suelo.

Recibido: 05/07/2023

Aceptado: 20/10/2023

Introducción

Dentro de la familia de las fabáceas, las plantas arvenses conocidas como maleza tienen un enorme valor en los sistemas agrícolas, por la capacidad para asociarse simbióticamente con bacterias que fijan nitrógeno^(1,2), lo que se convierte en un abastecimiento de N y un mejoramiento de la calidad suelo, además de propiciar la producción de forrajes más ricos en proteína⁽³⁾, entre estas especies se encuentra la alfalfa o *melilotus* de olor o color⁽⁴⁾. Se reportan para México tres especies de *Melilotus*⁽⁵⁾, donde la especie *Melilotus indica* (L.) es la de mayor adaptación o más común como maleza en todo el mundo, en ambientes rústicos como climas templados, además, se desarrolla en áreas moderadamente salinas, donde las leguminosas forrajeras tradicionales no se pueden cultivar exitosamente^(6,7). Esta maleza es clasificada en la familia de las fabáceas⁽⁸⁾, su crecimiento es muy común y puede estar presente en los cultivos como trigo, tomate, soya, sorgo, remolacha, nopal, manzana, maíz, lino, garbanzo, frutales, frijón, espárrago, cítricos, chícharo, centeno, cebada, cártamo, calabaza, avena, algodón, alfalfa, uva y ajo⁽⁶⁾. El crecimiento de *M. indica* asociado a ciertos cultivos se le considera peligroso, como en el trigo, ya que es común la presencia de cumarina en casi todas las partes de la planta, lo que hace que se transmita al cereal el olor característico de la misma, a los granos de éste y posteriormente a la harina⁽⁸⁾. Por esta razón se le considera en la agricultura como maleza nociva. También en esta especie pueden encontrarse semillas como cuerpos extraños en semilla de alfalfa, lino y muchos otros cereales, lo que limita su consumo directo. Por otra parte, la fijación de N por microorganismos del suelo tiene una función importante en la agricultura, ya que puede sustituir o reducir el uso de los fertilizantes químicos de alto costo económico, disminuir la contaminación en el medio ambiente, prevenir pérdidas de la fertilidad del suelo y mejorar los costos de producción. La simbiosis leguminosa-*Sinorhizobium* ofrece una oportunidad para la biorremediación, así como el mejoramiento y fertilización de suelos sobreexplotados en zonas agrícolas y pecuarias⁽⁹⁾. La recuperación de semillas de *Melilotus*

y el aislamiento de las bacterias asociadas a esta leguminosa, pudieran beneficiar la posibilidad de regenerar la calidad de los suelos esquilados o erosionados, al sembrar en ellos esta planta de *M. indica* inoculada con la bacteria *Sinorhizobium meliloti* fijadora de nitrógeno. Por lo que este documento presenta una revisión general de la especie de *Melilotus* spp. y su simbionte *Sinorhizobium meliloti* como un posible potencial mejorador de la calidad del suelo.

Origen y distribución

El género *Melilotus*, en la familia de las leguminosas o fabaceas, incluye diferentes especies, generalmente conocidos como tréboles de olor⁽⁷⁾. Su origen se encuentra en Europa y Asia⁽¹⁰⁾. Durante la conquista se dispersó y adaptó abundantemente en América y Australia, aunque actualmente tiene distribución cosmopolita. Se señala que en México⁽⁵⁾, en la mayoría de los estados se registra como maleza y se considera como una planta exótica, siendo la especie *Melilotus indica* (L.) la más ampliamente distribuida⁽⁸⁾ en comparación con las otras dos especies presentes (*M. albus* y *M. officinalis*). Se ha registrado en Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Distrito Federal, Oaxaca, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala, Veracruz, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Chiapas, Chihuahua, Coahuila y Colima⁽¹¹⁾.

Características botánicas

La especie *Melilotus indica* se caracteriza como una planta herbácea, anual o bianual, erecta muy ramificada de 30 a 50 cm de altura con raíz pivotante, con hojas compuestas, trifoliadas, muy similares a las de la tradicional alfalfa, margen ligeramente dentado; con tamaño variable de 1 a 2 cm de largo por 3 a 5 cm de ancho, ápice obtuso o redondeado y base atenuada. Presenta un tallo con estípulas lanceoladas. Inflorescencia dispuesta en racimos de 30 a 70 y flores pequeñas de 3 a 5 mm de largo con pedicelos muy cortos, con corola amarilla o blanca de 1-3 mm de largo, en racimos delgados (Figura 1), que parten de la axila de las hojas superiores y son más largos que éstas, con el estandarte más largo que los otros pétalos, y un grupo de 10 estambres distribuidos en 9 que forman haz y otro libre^(12,13).

Figura 1: Inflorescencia de dos especies de meliloto en color amarillo (*Melilotus indica*) y blanco (*M. albus*)



El fruto es una legumbre subglobosa, de unos 3 mm, apiculada, sin pubescencia, verde amarillento, con arrugas transversales, que contiene una o dos semillas lisas, amarillentas de 1.5 mm de diámetro y superficie globosa (Figura 2). Generalmente la floración ocurre en mayo y puede perdurar todo el verano. La planta posee un sabor ligeramente amargo; cuando se seca emite un intenso aroma a a cumarina⁽¹³⁾.

Figura 2: Frutos de melilotos verdes (a) y maduros (b)



En estado de plántula se caracteriza por presentar hipocótilo de 11 a 42 mm, verdoso, liso y cotiledones de lámina oblonga a elíptica de 4 a 8 mm de largo y 2 a 4 mm de ancho, sin pubescencia y sin epicótilo. Hojas alternas, la primera simple y la segunda compuesta (Figura 3).

Figura 3: Características morfo típicas de plantas de *Melilotus*. Hojas lanceoladas y tallo ramificado



Taxonomía de *Melilotus indicus*

La especie *Melilotus indicus* (L.) All. se ubica en la siguiente taxa: Clase: Equisetopsida; Subclase: Magnoliidae; Superorden: Rosanae; Orden: Fabales; Familia: Fabaceae; Género: *Melilotus* (L.) Mill; Especie: *indicus* [*Melilotus indicus* (L.) All.]. Otros sinónimos dados a la especie son: *Sertula indica* (L.) Kuntze y *Sertula melilotus* var. *indica* (L.) Lunell⁽⁸⁾.

Generalidades, impacto e importancia de *Melilotus indicus* sobre los cultivos

Las especies de *Melilotus* son no deseables, consideradas como malezas cuando crecen junto con el cultivo de cereales, de crecimiento anual, principalmente en ambientes silvestres de climas templados⁽¹⁴⁾, dado a la producción de cumarina que le confiere un aroma característico, y de allí la gran diversidad de nombres que se le da como alfalfilla o meliloto de flor pequeña, trébol menor, meliloto oloroso, trébol oloroso, coronilla real, trébol dulce amarillo, coronilla angosta de rey, carretón oloroso⁽¹⁵⁾. Además, se señala que esta especie puede considerársele como buena planta forrajera⁽¹⁶⁾, así como buena fuente vegetal para la producción e incorporación como abono verde. Se señala también que puede ser una buena opción para el mejoramiento y nitrogenación de suelos, ya que tiene la

capacidad para realizar asociaciones simbióticas de manera natural con microorganismos fijadores de nitrógeno.

Por la presencia de cumarina, que se transmite como un olor característico a los cereales o granos y que posteriormente se transmite a la harina durante la molienda, las plantas de *Melilotus* spp. se le incluye en el listado como maleza (Figura 4), la cual es indeseable encontrarla entre las semillas destinadas al consumo humano, y debido a esta razón se ha declarado como maleza en muchos países incluyendo México, donde es considerada como exótica⁽¹¹⁾.

Figura 4: Plantas de cultivo de alfalfilla y su asociación con el cultivo de maíz



Campo Experimental “El Bajío”. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Se ha reportado que el contenido de cumarina entre diferentes especies de *Melilotus* es variable, tanto entre variedades, ecotipos e individuos de la misma especie⁽¹⁷⁾. Esta presencia de cumarina varía también a lo largo del ciclo de crecimiento de la planta, donde se menciona que su presencia es máxima en hojas nuevas o yemas, o como respuesta a estrés por plagas y enfermedades (factores bióticos) así como por salinidad, alcalinidad, deficiencias nutricionales en el suelo, etc. (factores abióticos)⁽¹⁸⁾. Su relevancia también se debe a su capacidad que tiene para fijar nitrógeno atmosférico simbióticamente, lo que permite ser un almacén proteico, lo cual es otro factor importante que permite su elección como forraje; además, permite disminuir los costos de producción al disminuir el uso por el laboreo de aplicación y compra de fertilizantes, lo que conlleva a una mejora de las propiedades químicas del suelo.

Importancia biológica y ecológica de *Melilotus*

Las especies pertenecientes al género *Melilotus* recientemente han recibido particular atención debido a su uso ante la necesidad de una gama más amplia de especies de leguminosas adecuadas para suelos salinos^(19,20). Se han liberado cultivares que han mostrado potencial considerable tal como *Melilotus albus* cultivar Jota Medik⁽²¹⁾. El potencial de *M. siculus* (Turra) Vitman ex B. D. Jacks. (Sin *M. messanensis*) como especie forrajera también se ha sido descrito como cultivar^(22,23).

Como ya se mencionó, *Melilotus* spp. contribuye indirectamente al proceso de la nutrición de las plantas cultivadas al permitir la simbiosis o asociación con rizobacterias permitiendo ese aprovechamiento en gran medida por la fijación benéfica del nitrógeno atmosférico, además de promover una mayor solubilidad y conductividad de nutrientes⁽²⁴⁾. Esta fijación biológica de nitrógeno es dada por la conversión enzimática de nitrógeno gaseoso a amonio; que es una característica de todos los procariontes, y muy específicamente de los géneros de rizobacterias fijadoras libres de nitrógeno y asociadas a leguminosas⁽²⁵⁾, como lo es el grupo de las especies del género *Sinorhizobium* que se asocian en su mayoría a leguminosas⁽²⁶⁾.

La relación simbiótica formada por la especie vegetal *Medicago sativa* y la bacteria benéfica *Sinorhizobium meliloti*, es un modelo de referencia para conocer y explorar los mecanismos que interactúan en la expresión molecular, a través de los cuales se desarrolla la simbiosis entre leguminosas-rizobios, y cómo estos son regulados, permitiendo sentar las bases para abordar la manipulación y el mejoramiento de las simbiosis con propósitos prácticos en un sentido agroeconómico⁽²⁷⁾.

Relación de *Sinorhizobium* y *Melilotus*

Bajo condiciones naturales ocurre una relación simbiótica muy específica entre la especie del género *Sinorhizobium* que se caracteriza por formar nódulos en algunas leguminosas, estableciéndose dentro sus raíces donde proliferan, se diferencian y fijan nitrógeno⁽²⁸⁾. En este sentido una relación muy específica en simbiosis es dado entre plantas de *Melilotus* y el género *Sinorhizobium meliloti*^(26,29,30), tal y como se muestra en la Figura 5. Actualmente hay descripción escasa de plantas del tipo leguminosas asociadas a un mayor número de especies simbióticas al nitrógeno⁽²⁴⁾.

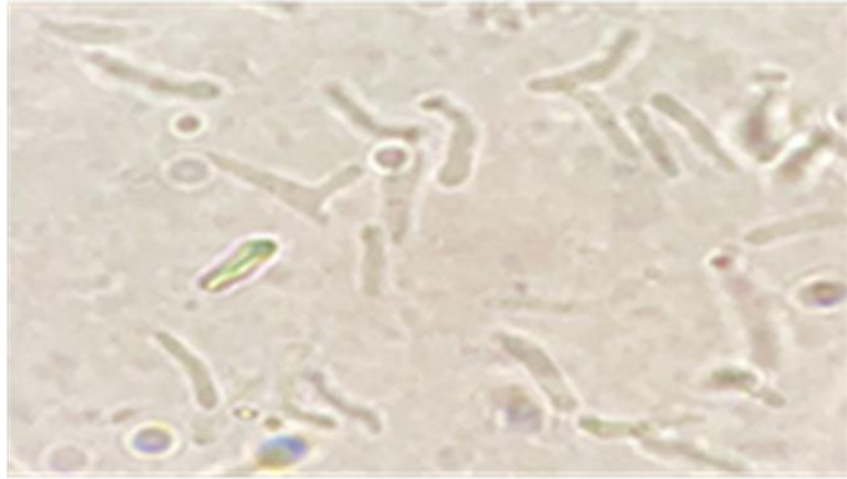
Figura 5: Plantas de melilotos con nódulos característicos de la bacteria *Sinorhizobium* bajo condiciones naturales creciendo como maleza silvestre



La asimilación N se lleva a cabo por un proceso enzimático donde ocurre un cambio de nitrógeno atmosférico a amonio. Este proceso es una característica primordial de las procariontes, y se encuentra distribuido en diferentes géneros de bacterias que tienen la misma capacidad para fijar N de forma natural⁽²⁵⁾. Generalmente una incorporación artificial de nitrógeno como fertilizante químico inhibe la formación de los nódulos y la fijación de nitrógeno atmosférico en plantas con presencia de nódulos. Se menciona que el proceso de fijación de nitrógeno es muy costoso energéticamente⁽³¹⁾. La fijación atmosférica de nitrógeno contribuye anualmente con unos 90 millones de toneladas para cultivos de leguminosas como la soya, el trébol rojo y los guisantes⁽³⁰⁾.

La interacción entre la planta y bacteria se inicia con la señalización o síntesis en las raíces y exudación de flavonoides, que son señales químicas de reconocimiento entre ambos organismos⁽³²⁾. Los compuestos de manera fenólica inician la expresión en las bacterias de los genes involucrados en el proceso nodulación, lo que le permite la síntesis y secreción de lipoquitas llamadas factores de nodulación^(32,33,34), que al interactuar en la raíz originan en la planta cambios morfológicos acorde al tipo de leguminosa⁽³⁵⁾. La bacteria una vez que invade las células de las raíces de la planta, proliferan y se diferencian como bacteroides (Figura 6), que son los responsables de la fijación de nitrógeno al interior de la célula; dichos bacteroides están englobados por una membrana peribacteroidea de origen vegetal, lo que constituyen un nuevo orgánulo llamado simbiosoma. La planta contribuye con hidratos de carbono al bacteroide para su metabolismo a través del floema y, el bacteroide por su parte aporta amonio a la planta en forma de diferentes aminoácidos^(36,37). Una verificación de la morfología celular permite observar los bacteroides existentes dentro de las células radiculares y característicos de esta bacteria. Esta forma de bacteroide es debido a la falta de una forma definida (Figura 6), ya que carecen de una pared celular, por lo tanto, son considerados amorfos⁽³⁸⁾.

Figura 6: Bacteroides de *Sinorhizobium meliloti* *in vivo* obtenidos de nódulos y observados al microscopio compuesto 100X.



Características de *Sinorhizobium meliloti*

Las características de esta bacteria son de forma bacilar, pertenecen al grupo de las Gram negativas, no forma esporas, es heterótrofa y aerobia. La bacteria *S. meliloti* es muy capaz de prosperar tanto en un medio complejo y competitivo como en la rizósfera, así como intracelularmente una vez instituida la asociación. Por su complejo y gran tamaño de genoma hace que este microorganismo sea de gran versatilidad, que le confiere una gran capacidad metabólica con ventajas para colonizar distintos nichos en la naturaleza⁽³⁹⁾. Generalmente, la célula bacteriana de *Sinorhizobium* tiene dimensiones entre 0.5-1.0 x 1.2-3.0 μm , con presencia de plásmidos grandes (megaplásmidos) muy común en estas especies, donde se localizan genes simbióticos en algunos casos⁽⁴⁰⁾. Su uso en sistemas agrícolas aportaría beneficios como: la disminución de costos de la producción al reducir el uso de los fertilizantes químicos, aumento de producción agrícola, además contribuye a la remediación de los suelos sobreexplotados, alcalinos o con bajo contenido de materia orgánica⁽⁴¹⁾.

Cuando se desea aislar *S. meliloti*, se deben coleccionar nódulos que generalmente son color rojizo, lo que indica que contiene leghemoglobina y presentes en las raíces secundarias de las plantas de alfalfa, lavarlos con agua y jabón, así como desinfectarlos con cloro y hacerles varios lavados con agua destilada esteril, para posteriormente macerar el nódulo en un tubo estéril y del líquido resultante sembrar al medio de cultivo a través de una asa bacteriológica. Para este propósito es frecuente usar el medio de crecimiento a base de Agar Manitol con Extracto de levadura-Rojo Congo e incubarse a 28 °C por dos días hasta observar el crecimiento rojo de las colonias típicas del género. Posteriormente, se purifica por estría en el mismo medio de cultivo hasta obtener colonias aisladas en el cultivo⁽²⁴⁾. La característica principal de las colonias de esta bacteria en agar manitol es del tipo mucoide

con una elevación y bordes lisos (Figura 7). Ciertas pruebas ayudan a identificar mejor a la bacteria como la prueba de tinción Gram que deber ser negativa (-), presencia de flagelos, producción de polisacárido (KOH) positiva, crecimiento en cloruro de sodio positivo, producción de indol positivo y crecimiento a pH ácido positivo⁽⁴²⁾.

Figura 7: Aislamiento por resiembra de rizobacterias de nódulos de alfalfa



- a) Siembra por estría del macerado de nódulos de melilotos y crecimiento de colonias típicas del género *Sinorhizobium* spp. en cultivo agar manitol. b) Rizobacteria purificada por estría simple.

Diversidad de rizobacterias simbióticas de nitrógeno

Como grupo las rizobacterias son muy diversas en cuanto a géneros, especies y de acuerdo a relaciones filogenéticas moleculares. Se señala que incluye seis géneros (*Allorhizobium*¹, *Azorhizobium*², *Bradyrhizobium*³, *Mesorhizobium*⁴, *Rhizobium*⁵ y *Sinorhizobium*⁶) cada uno con distintas especies, y especies vegetales objetivo, como se describe a continuación en el Cuadro 1^(43,44,45).

Cuadro 1: Bacterias fijadoras de nitrógeno y sus especies asociadas

Rhizobacterias			Rhizobacterias			
Género	Especie	Cultivo	Género	Especie	Cultivo	
<i>Allorhizobium</i>	<i>undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>hainanense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	
	<i>elkanii</i>	<i>Glycine max</i>		<i>hautiense</i>	<i>Vicia</i>	
	<i>liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>		<i>leguminosarum</i>	(chícharo)/ <i>Trifolium</i>	
	<i>yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>		<i>mongolense</i>	(trébol)	
			<i>tropici</i>	<i>Medicago ruthenica</i> / <i>phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> / <i>Leucaena</i> <i>Neptunia natans</i>		
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Loti</i>	<i>Lotus</i>	<i>Sinorhizobium</i>	<i>arboris</i>	<i>Acacia</i>	
	<i>amorphae</i>	<i>Amorpha</i>		<i>fredii</i>	<i>senegal</i> / <i>proprosis</i>	
	<i>cicero</i>	<i>fruticosa</i>		<i>kostiens</i>	<i>chilensis</i>	
	<i>huakuii</i>	<i>Cicer</i>		<i>medicae</i>	<i>Glycine</i>	
	<i>mediterraneum</i>	<i>arietinum</i>		<i>meliloti</i>	<i>max</i>	
	<i>plurifarium</i>	<i>Astragalus</i>		<i>C.</i>	<i>saheli</i>	<i>Acacia</i>
				<i>mediterranium</i>	<i>terangae</i>	<i>senegal</i> / <i>Prosopis</i>
	<i>Leucaena</i>		<i>xinjiangense</i>	<i>chilensis</i> <i>Medicago</i> spp <i>Medicago</i> <i>sativa</i> <i>sesbania</i> <i>Sesbania</i> / <i>Acacia</i> <i>Glicine</i> <i>max</i>		

Respuesta de melilotos a la nodulación

Bioensayos realizados bajo condiciones de invernadero para determinar la eficiencia de formación de nódulos, mostraron que al sembrar semilla de meliloto inoculada con *Sinorhizobium meliloti*, esta última indujo la formación de nódulos en su mayoría de forma cilíndrica y ramificada (Figura 8), características representativas de los nódulos simbióticos de *S. meliloti*⁽⁴⁰⁾. Se reporta que *Sinorhizobium meliloti* induce la formación de nódulos rosáceos en las plantas de *Melilotus* spp. generadas a través de semilla, tanto condiciones en macetas como de forma natural⁽⁴⁶⁾.

Figura 8: Raíces de plantas de meliloto con presencia de nódulos rosáceos lobulados de *Sinorhizobium meliloti*



Algunas características agroecológicas de plantas de melilotos

Las alfalfillas o melilotos pueden desarrollarse en suelos salitrosos⁽¹²⁾ pobres en materia orgánica, con pH alcalino en temperaturas desde de templadas a frías, donde se han observado que en algunos áreas de frío ocasional o irregular, soportan temperaturas de al menos 0 °C y logran crecer normalmente durante el invierno en temperaturas menores a los 15 °C, por lo que hace a esta planta de interés agrómico para la remediación de suelo durante las épocas de invierno. Es una maleza muy competente, logra desarrollarse favorablemente entre las plantas y fructificar antes o después de la formación de frutos de los cultivos, particularmente sobresale en los cultivos de ajo, cebolla, maíz, avena, sorgo y trigo (Figura 9).

Figura 9: Plantas de meliloto sobreviviendo a heladas del invierno que dañan otras malezas

Fijación de nitrógeno por *Melilotus* spp

En términos generales la mayoría de los rizobios que de manera simbiótica en los nódulos de las plantas de la familia Fabaceae, fijan el N_2 atmosférico en cantidades de hasta $200 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ de $N^{(47)}$, bajo condiciones específicas en cuanto a temperatura, pH, humedad, contenido de N-inorgánico, Fe, Co, Mo y P en el suelo. Entre los géneros más conocidos con esta función están: *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Azotobacter* y *Pseudomona*. Se reporta la fijación de N_2 por bacterias de vida libre en praderas asociadas de ballico (*Lolium perenne*) y *Melilotus albus* e inoculación con *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*) un contenido similar de N_2 , tanto en la pradera bajo corte como pastoreo⁽⁴⁸⁾. Así mismo señalan que la densidad de plantas modifica la cantidad de fijación, siendo mayor en corte, ya que el pastoreo reduce la persistencia de la leguminosa en la pradera. Estos autores reportan una actividad de la nitrogenasa entre 1.83 y $1.36 \text{ nmol de } C_2H_4 \text{ producidos planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Al Sherif⁽⁶⁾, señala que *M. indicus* es una especie con alto porcentaje de nodulación (68-95 %) y alta actividad nitrogenasa, en promedio $1.81 \text{ mmol } C_2H_4 \text{ planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y alto contenido de proteína (21-30 %); concluye que el alto porcentaje de nodulación y una actividad nitrogenada registrada en las plantas de *M. indicus* da a la especie importancia económica, ya que se puede utilizar para mejorar la fertilidad del suelo. El sistema simbiótico rizobio-leguminosa requiere que no haya limitantes minerales, ya sea por exceso o defecto. Altas concentraciones de nitratos inhiben el proceso de infección, el desarrollo de los nódulos y la expresión de la actividad de la nitrogenasa. A mayor presencia de N en el suelo, menores posibilidades hay para la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y, a la inversa, a menor presencia de N del suelo, hay más N de la FBN. La presencia de formas combinadas de nitrógeno limita la FBN. Los suelos fértiles con

moderada o alta disponibilidad de formas inorgánicas de N en el momento de la siembra, o importantes tasas de mineralización durante el ciclo del cultivo, afectan al establecimiento de la simbiosis, ya que retardan el inicio de la nodulación o inhiben el funcionamiento del sistema fijador.

Formas de incorporación de Nitrógeno

a) Incorporación como abono verde. El uso de abonos verdes es una práctica que contrarresta los efectos negativos del manejo de suelo inadecuado. Algunos autores⁽⁴⁹⁾ incorporaron melilotos por un periodo de cuatro años sucesivos, encontrando mejoras en el suelo, como es aumento de la materia orgánica (MO) que pasó de 0.32 a 0.69 %. Así mismo, Fontana *et al*⁽⁵⁰⁾ incorporaron como abono verde a plantas enteras o remanente de *Melilotus albus* combinado con centeno, siendo este último el testigo; después se determinó el contenido de nitratos, que se comportó como sigue: al año de incorporación los valores de NO₃ en ppm fueron 38.0, 39.0 y 44.0 para los tratamientos centeno, centeno + remanente de *Melilotus* y centeno + planta completa de *Melilotus*, respectivamente. Para el segundo año los valores de NO₃ fueron los siguientes 17.7, 26.0 y 47.4 ppm para la misma secuencia de tratamientos, respectivamente. Donde se observó que solo el tratamiento que incluye la planta de melilotos entera se lograron incrementos de NO₃ de forma consecutiva. Estos datos muestran que al finalizar el año dos, se encontró una diferencia de 30 ppm de NO₃ entre el tratamiento de incorporación con *Melilotus* y centeno.

b) Crecimiento y simbiosis con bacterias nitrificantes. Una particularidad común de los microorganismos implicados en la fijación biológica del nitrógeno, es la disposición de enzimas nitrogenasas, las cuales reducen el nitrógeno atmosférico a ion NH₄⁺, que es la forma asimilable. Esta actividad enzimática es muy susceptible a la concentración de oxígeno en el medio, por lo que, los microorganismos han adecuado los mecanismos de adaptación necesarios como la protección respiratoria, conformacional y la compartimentalización celular⁽⁵¹⁾. En estos procesos participa un grupo de familias de proteínas activadoras especializadas, que interactúan con ARN polimerasa (RNAP) que contiene el factor transcripción (sigma σ 54), llamadas proteínas de unión potenciadora (EBP), con la finalidad de activar la transcripción desde sitios ascendentes a través del Bucle de ADN. Estas proteínas interactúan con secuencias activadoras aguas arriba similares a las potenciadoras a través de un ADN C-terminal del dominio de unión y el dominio central conservado que pertenece a la familia AAA+, que acopla ATP hidrolizado hasta la activación de la transcripción por σ 54 -RNAP. La actividad de las EBP está altamente regulada en respuesta a señales ambientales a través de módulos reguladores amino-terminales y, en algunos casos, mediante interacciones con otras proteínas reguladoras^(52,53).

c) Mejoramiento de suelos. Fontana *et al*⁽⁵⁰⁾ encontraron efectos positivos, de la incorporación del abono verde de *M. albus* sobre la producción de forraje y PB del cultivo de centeno en ciclos de cultivo subsiguiente (dos años). Además, mencionan que quedó un remanente de nitratos en el suelo, por lo que infieren que la mayor fertilidad no se tradujo totalmente en producción.

Aspectos como forraje:

Es mencionado que tanto *M. albus* como *M. indicus* son plantas forrajeras utilizadas para la alimentación de animales por la abundante fuente de proteínas⁽⁵⁴⁾, aunque su utilización debería aplicar solo para animales mayores (ganado vacuno, equino, caprino y ovino), quienes la consumen como planta entera en forma mixta: (pastoreo y forraje), ya que es tóxica a especies menores, sobre todo la especie *M. indicus*⁽⁵⁵⁾. A pesar de que las especies de *Melilotus* tienen alto contenido de cumarinas y derivados de éste, algunos autores⁽⁵⁶⁾ reportan que dependiendo de la parte analizada, la cuantificación de la cumarina puede variar; por ejemplo, se cuantifica más en flores seguido de tallos y hojas en plantas antes del rebrote; así mismo observaron que después de varios ciclos fenológicos estos compuestos disminuyen tanto en hojas y tallos (después 2 y 4 ciclos, respectivamente). En este sentido, los melilotos son una fuente de proteína confiable y económica en rumiantes y no rumiantes, porque son independientes del nitrógeno del suelo. Además, los melilotos son una excelente fuente de minerales, y los consumos de melilotos son generalmente mayores que los de las gramíneas de igual digestibilidad⁽⁵⁵⁾.

Con la finalidad de conocer el comportamiento de densidad de plantación (DP) y efecto de la edad de corte (EC), investigadores⁽⁵⁶⁾ desarrollaron un trabajo donde reportan diferencias significativas para DP y EC respecto a la producción de *M. albus*. Ellos observaron un incremento mayor a 100 % cuando DP pasó de 500 a 1,500 semillas (de 333.34 a 736.62 plantas después de emergencia por m⁻², respectivamente); lo que representó una mayor producción de materia verde (MV) y seca (MS), con valores entre 1.66 a 2.29 kg m⁻² de MV y valores de 0.37 a 0.52 kg m⁻² de MS. La edad de corte (antes de brotación [A], brotación [B] y floración completa [C]) tuvo comportamientos similares a los DP; se observó a la MV con valores entre 1.11 y 3.06 kg m⁻² y, para MS valores entre 0.18 y 0.80 kg m⁻², sin embargo, se apreció una disminución del porcentaje de hojas conforme se incrementó la edad de corte (40 [A] a 19 % [C]); cabe mencionar que en un periodo de evaluación no se encontró diferencias entre años para estas variables. Respecto a las variables de proteína total (PT), grasa cruda (GC), fibra (F) y Cenizas (Cn) no hubo diferencias entre la DP ni en los años evaluados, pero sí se observó respecto a edad de cosecha, que para PT fue de 21.72, 17.08 y 14.81 en las etapas de A-B-C, para GC fue de 2.41, 2.08 y 1.71 en A-B-C, para F fue de 34.55, 40.27 y 42.82 para A-B-C, respectivamente.

Quero, *et al*⁽⁵⁷⁾ señalan que la caracterización agronómica de especies de amplia productividad forrajera con fines de desarrollo de cultivares y producción de semillas, sería una de las herramientas para mejorar la productividad y la adaptabilidad de las pasturas a los ambientes. Una de las mayores especies de importancia para ambientes restrictivos destaca *Melilotus albus* Medik, al poseer gran productividad, amplia variabilidad genética y de amplia adaptación ambiental⁽⁵⁸⁾.

Aspectos medicinales:

Desde tiempo inmemorial, las plantas medicinales son consumidas por el hombre en todo el mundo para tratar diversos padecimientos o trastornos en su salud o la de sus animales domésticos, en padecimientos agudos y como coadyuvantes en problemas crónicos, debido a que éstas elaboran cientos de sustancias de muy diferente tipo, y algunos con efectos negativos. En este sentido, la cumarina producida por las especies de *Melilotus* tienen efectos negativos por las hemorragias provocadas en terneros alimentados con esta planta; sin embargo, desde el punto de vista medicinal se identificó como anticoagulante, y los reportes refieren que el ganado padeció severos trastornos hemorrágicos al haber ingerido trébol dulce (sweet clover o *Melilotus albus*) almacenado en silos⁽⁵⁹⁾. Se menciona también⁽⁶⁰⁾ que *Melilotus* tienen potencial en el manejo de efectos secundarios en el manejo de los diabéticos, ya que *Melilotus officinalis* se puede utilizar en medicina herbaria; estudios previos han demostrado que es eficaz para reducir el envejecimiento de la piel, induce la microvascularización y tiene efectos antiinflamatorios^(61,62).

Con todo ello desde un punto de vista ecológico, agrícola y pecuario, los melilotos son un punto de oportunidad para el mejoramiento y reconversión de suelos sobre explotados o improductivos, producción de forraje y cambios sustantivos en la fertilidad del mismo, así como también para favorecer la diversidad especies microbianas en el medio ambiente y amplia utilidad en medicina.

Conclusiones

La alfalfilla o meliloto es una planta que logra crecer como maleza en una gran diversidad de cultivos, donde no es grata su presencia por el olor característico que la planta genera al desarrollarse y especialmente en gramíneas, que suelen ser usadas para producir harinas o pastas. Sin embargo sus características de crecimiento y desarrollo agroecológico la hacen ser una planta deseable para el mejoramiento o remediación de suelos pobres en materia orgánica, salinosos o alcalinos, en climas de temperaturas templadas hasta muy frías donde se detecta su asociación con bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno del tipo de *Sinorhizobium meliloti*, con la cual se asocia para lograr obtener nitrógeno, lo que resulta favorable para mejorar la calidad nutritiva del suelo donde crece.

Agradecimientos y conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Literatura citada:

1. Zamora NJF, Zapata HI, Villalvazo HA. Fijación biológica del nitrógeno en tres especies silvestres del género *Lupinus* (Leguminosae, Papilionoideae) en México. Act Bot Mex 2019;(126):e1543. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1543>.
2. Córdova-Sánchez S, Castelán-Estrada M, Salgado-García S, Palma-López JD, Vera-Núñez JA, Peña-Cabriales JJ, *et al.* Biological nitrogen fixation by three fabaceae (Leguminosae) in acid soil of Tabasco, México. Avances en Investigación Agropecuaria 2011;15(1):31-50.
3. Castro-Rincon E, Mojica-Rodríguez JE, Carulla-Fornaguera JE, Lascano-Aguilar CE. Abonos verdes de leguminosas: integración en sistemas agrícolas y ganaderas del trópico. Agron Mesoam 2018;29(3):711-729.
4. Salas ME. 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 posgrado]. Argentina: Instituto de Biotecnología y Biología Molecular; 2015. <https://doi.org/10.35537/10915/46558>.
5. Mondragón PJ, Vibrans H. Manual de malezas de México. CONABIO; 2009. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/melilotus-indica/fichas/ficha.htm>.
6. Al Sherif EA. *Melilotus indicus* (L.) All., a salt-tolerant wild leguminous herb with high potential for use as a forage crop in salt-affected soils. Flora: Morphol Distrib Funct Ecol Plants 2009;204(10):737-746.
7. Toll VJR. Los tréboles de olor como recurso forrajero. 1ª ed. Argentina: Universidad Nacional de Tucumán; 2018. ISBN 978-987-754-136-6.
8. Tropicos. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Consultado 28 Jun, 2023. <https://tropicos.org/name/13035799>. 2022.
9. López C, Odorizzi A, Basigalup DH, Arolfo V, Martínez MJ. El trébol de olor blanco y su uso en la provincia de Córdoba. 1ª ed. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA: 2016. ISBN 978-987-521-716-4.
10. Aboel-Atta AMI. Isozymes, RAPD and ISSR variation in *Melilotus indica* (L.) All. and *M. siculus* (Turra) BG Jacks. (Leguminosae). Acad J Plant Sci 2009;2(2):113-118.

11. Villaseñor JL, Espinosa GFJ. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. México, D.F. Fondo de Cultura Económica; 1998.
12. Mesa D. Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. Rev Cubana Cienc Agr 2003;(37):217-226.
13. Floraiberica. *Melilotus*. LXXXVIII. LEGUMINOSAE – TRIFOLIEAE. 2020. http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/07_39%20Melilotus.pdf. Consultada 28 Jun, 2023.
14. Wu F, Zhang D, Ma J, Luo K, Di H, Liu Z, Zhang J, Yanrong Wang Y. Analysis of genetic diversity and population structure in accessions of the genus *Melilotus*. Ind Crop Prod 2016;(85):84-92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.055>.
15. Zabala JM, Marinoni L, Ribero G, Sánchez R, Del Valle E. Rev Fave Secc Cienc Agrar 2016;15(1):14.
16. Martínez PJJ. *Melilotus indicus* (L.). Herbario nacional de México (MEXU) Plantas vasculares, UNAM; 2012. <https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:656408>.
17. Nair R, Whittall A, Hughes S, Craig A, Revell D, Miller S, *et al.* Variation in coumarin content of *Melilotus* species grown in South Australia. NZ J Agric Res 2010;53(3):201-213. <https://doi.org/10.1080/00288233.2010.495743>.
18. Flórez DDF. La alfalfa (*Medicago sativa*): origen, manejo y producción. Conexión Agropecuaria JDC 2015;5(1):27-43. <https://revista.jdc.edu.co/index.php/conexagro/article/view/520>.
19. Nichols PGH, Loi A, Nutt B, Evans PM, Craig AD, Pengelly BC *et al.* New annual and short-lived perennial pasture legumes for Australian agriculture 15 years of revolution. Field Crop Res 2007;104(1-3):10-23. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.03.016>.
20. Dear BS, Ewing MA. The search for new pasture plants to achieve more sustainable production systems in southern Australia. Aust J Exp Agric 2008;48(4):387-396. <https://doi.org/10.1071/EA07105>.
21. Evans PM, Kearney GA. *Melilotus albus* (Medik.) is productive and regenerates well on saline soils of neutral to alkaline reaction in the high rainfall zone of south-western Victoria. Aust J Exp Agric 2003;43(4):349–355. <https://doi.org/10.1071/EA02079>.
22. Nichols PGH, Craig AD, Rogers ME, Albertsen TO, Miller SM, McClements DR, *et al.* Production and persistence of annual pasture legumes at five saline sites in southern Australia. Aust J Exp Agric 2008;48(4):518-535. <https://doi.org/10.1071/EA07167>.

23. Rogers MJ, Colmer TD, Frost K, Henry D, Cornwall D, Hulm E, *et al.* Diversity in the genus *Melilotus* for tolerance to salinity and waterlogging. *Plant Soil* 2008;(304):89-101. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9523-y>.
24. Yañez AA. Recuperación de rizobacterias del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de San Andrés Tlalamac, Estado de México [tesis Licenciatura]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2017.
25. Young JPW, Haukka KE. Diversity and phylogeny of Rhizobia. *New Phytol* 1996;(136):87-94.
26. Aizawa S-I. 2014. *Sinorhizobium meliloti* — Nitrogen–fixer in the grassland. *The Flagellar World* 2014;(1):82-83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417234-0.00026-8>.
27. Lagares A. La simbiosis fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti* - alfalfa (*Medicago sativa*) caracterización del rol biológico del ARN pequeño sm8 en la vida libre y simbiótica de los rizobios [tesis doctorado]. Argentina: Universidad Nacional de La Plata; 2015. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/66185>.
28. Cerdeño GGA. Tolerancia a estrés hídrico y promoción del crecimiento en alfalfa (*Medicago sativa*) inoculada con bacterias de la rizósfera [tesis doctorado]. Chile: Universidad de Concepción; 2018. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/3363>.
29. Ormeño OE, Vinuesa P, Zúñiga-Dávila D, Martínez-Romero E. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Sys Appl Microbiol* 2006;29(3):253–262. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.09.002>.
30. De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, *et al.* 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 Evol Microbiol* 1994;44(4):715-733. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-715>.
31. Soto-Urzuza L, Baca BE. Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. *Rev Latinoam Microbiol* 2001;(43):37-49.
32. Spaink HP. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2000;(54):257-288. http://arquivo.ufv.br/dbv/pgfvg/BVE684/htms/pdfs_revisao/estresse/infectionfactors.pdf.

33. Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Prome JC. *et al.* Symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 1990;(344):781-784. <https://doi.org/10.1038/344781a0>.
34. Geurts R, Fedorova E, Bisseling T. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr Opin Plant Biol* 2005;8(4):346-352. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.013>.
35. Fernández-Luqueño F, Espinosa-Victoria D. Bioquímica, fisiología y morfología de la senescencia nodular: una revisión crítica. *Terra Latinoam* 2008;26(2):133-144.
36. Franche C, Lindstrom K, Elmerich C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plants Soil* 2009;(321):35-59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>.
37. Guzmán DD, Montero TJ. Interacción de bacterias y plantas en la fijación del nitrógeno. *RIIARn* 2021;8(2):87-101. <https://doi.org/10.53287/uyxf4027gf99eAguilar2004>.
38. Lodwig E, Poole P. Metabolism of *Rhizobium* Bacteroids. *Crit Rev Plant Sci* 2003;(22):37-78. <https://doi.org/10.1080/713610850>.
39. Amarelle LV. Elucidación de los sistemas de implicados en la captación y utilización de hemina como fuente de hierro nutricional en *Sinorhizobium meliloti* 1021. [tesis doctorado]. Uruguay: Universidad de la República; 2016. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/8853/1/uy2418174>.
40. Graham PH, Draeger KJ, Ferrey ML, Conroy MJ, Hammer BE, Martínez E, *et al.* Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can J Microbiol* 1994;(40):198-207. <https://doi.org/10.1139/m94-03>.
41. Batanony NHE, Castellano-Hinojosa A, Mamdouh A, Ashraf N, Bedmar EJ. Agronomical parameters of host and non-host legumes inoculated with *Melilotus indicus*-isolated rhizobial strains in desert unreclaimed soil. *Arch Microbiol* 2020;202(7):1929-1938. doi.10.1007/s00203-020-01907-x.
42. Kuykendall D, Young J, Martínez E, Kerr A, Sawada H. *Rhizobium* (Frank 1889), 338. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Editorial Springer US; 2005.
43. Delgado MJ, Casella S, Bedmar EJ. Denitrification in Rhizobia-legume symbiosis. *Biology of the nitrogen cycle* 2007;(1)83-91. <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50007-2>.

44. Moreno RA, García MV, Reyes CJL, Vásquez AJ, Cano RP. Plant growth promoting rhizobacterias: a biofertilization alternative for sustainable agriculture. *Rev Colombi Biotecnol* 2016;20(1):68-83.
45. Velasco-Jiménez A, Castellanos-Hernández O, Acevedo-Hernández G, Aarland RC, Rodríguez-Sahagún A. Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoam* 2020;38(2):333-45. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>.
46. Antonio Del AM. Aislamiento e identificación *Sinorhizobium meliloti* de nódulos de plantas de alfalfilla [tesis licenciatura]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2021. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/48036/K%2067227%20Antonio%20del%20%20c3%81ngel%20%20Maricela.pdf?sequence=6&isAllowed=y>.
47. Bolger TP, Pate JS, Unkovich MJ, Turner NC. Estimates of seasonal nitrogen fixation of annual subterranean clover-based pastures using the ^{15}N natural abundance technique. *Plant Soil* 1995;175:57-66. <https://doi.org/10.1007/BF02413010>.
48. Delgadillo MJ, Ferrera-Cerrato R, Galvis-Spínola A, Hernández-Garay A, Cobos-Peralta MA. Fijación biológica de nitrógeno en una pradera de trébol hubba/ballico de corte o de pastoreo. *Terra Latinoamericana* 2005;23(1):73-79.
49. Fontana LMC. Efectos de la alfalfa y del melilotus usados como forraje y abono verde, sobre la producción de pasturas y cultivos [tesis licenciatura]. Argentina: Universidad Nacional de Córdoba; 2014.
50. Fontana LMC, Juan NA, Ruiz MA, Babinec FJ. Utilización de trébol de olor blanco (*Melilotus albus* Medik.) como abono verde, efecto sobre las condiciones del suelo y la productividad del cultivo subsiguiente. *Semiárida* 2018;28(2):25-33. [http://dx.doi.org/10.19137/semiarida.2018\(02\).25-33](http://dx.doi.org/10.19137/semiarida.2018(02).25-33).
51. Mayz-Figueroa, J. Fijación biológica de nitrógeno. *Rev Científ UDO Agríc* 2004;4:1-20. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2221548>.
52. Bush M, Dixon R. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ^{54} -dependent transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012;76(3):497-529. doi: 10.1128/MMBR.00006-12.
53. Romero JL. Importancia del segundo mensajero c-di-GMP en la simbiosis rizobio-leguminosa [tesis doctorado]. España: Universidad de Granada; 2016.

-
54. Aguirre-Mendoza Z, Jaramillo-Diaz N, Quizhpe-Coronel W. Arvenses asociadas a cultivos y pastizales del Ecuador. Universidad Nacional de Loja. Ecuador. 2019. https://unl.edu.ec/sites/default/files/archivo/2019-12/ARVENSES%20ASOCIADOS%20A%20CULTIVOS%20Y%20PASTIZALES%20DEL%20ECUADOR_compressed.pdf.
55. Castañeda SR, Albán CJ, Gutiérrez PH, Cochachin GE, La Torre AMI. Plantas silvestres empleadas como alimento para animales en Pisha, Ancash. *Ecología Aplicada* 2014;13(2):153-168.
55. Sowa-Borowiec P, Jarecki W, Dzugan M. The effect of sowing density and different harvesting stage on yield and some forage quality characters of the white sweet clover (*Melilotus albus*). *Agriculture* 2022;12(5):575. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050575>.
57. Quero CAR, Enríquez QJF, Miranda JL. Evaluación de especies forrajeras en América Tropical, avances o status quo. *Interciencia* 2007;32(8):566-571.
58. Mosca J. Evaluación agronómica en caracteres reproductivos de una colección de *Melilotus albus* Medik en Pergamino, Buenos Aires [tesis licenciatura]. Argentina: Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires; 2019.
59. Waizel-Bucay J, Waizel-Haiat S, Revilla-Peñaloza F. Los productos herbolarios, la coagulación sanguínea y la cirugía otorrinolaringológica. *Otorrinolaringología* 2017;62(2):115-142.
60. Chorepsima S, Tentolouris K, Dimitroulis D, Tentolouris N. *Melilotus*: Contribution to wound healing in the diabetic foot. *J Herbal Med* 2013;3(3):81-86. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2013.04.005>.
61. Asres K, Eder U, Bucar F. Studies on the antiinflammatory activity of extracts and compounds from the leaves of *Melilotus elegans*. *Ethiopian Pharmaceutical J* 2000;18:15-24.
62. Pleșca-Manea L, Pârvu AE, Pârvu M, Taămaș M, Buia R, Puia M. Effects of *Melilotus officinalis* on acute inflammation. *Phytother Res* 2002;16(4):316-9. doi: 10.1002/ptr.875. PMID: 12112285.