

**Características fenotípicas de *Ensifer meliloti*  
y *Ensifer medicae* (Rhizobiaceae) aislados de  
*Medicago sativa* L. (Fabaceae) en áreas agrícolas  
de Trujillo, Perú**

**Phenotypic characteristics of *Ensifer meliloti* y  
*Ensifer medicae* (Rhizobiaceae) isolated from  
*Medicago sativa* L. (Fabaceae) in agricultural areas  
of Trujillo, Perú**

***Saraí Toro Ipanaqué, María Calderón Jiménez &  
David Zavaleta Verde***

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias  
Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n –  
Ciudad Universitaria, Trujillo, PERÚ

ID ORCID

D. Zavaleta-Verde: <https://orcid.org/0000-0003-0382-8420>

M. Calderón: <https://orcid.org/0000-0002-2846-1736>

S. Toro: <https://orcid.org/0000-0003-3519-782X>

## Resumen

La fijación biológica del nitrógeno en suelo se debe en gran parte a bacterias que establecen relaciones simbióticas con leguminosas, siendo muy importante seleccionar e identificar aquellas con alta capacidad de adaptación ambiental propias de una determinada región; en ese sentido, esta investigación tuvo como objetivo determinar las características fenotípicas de *Ensifer meliloti* y *Ensifer medicae* (Rhizobiaceae) aislados de nódulos radiculares de *Medicago sativa* L. (Fabaceae) cultivada en áreas agrícolas de la Provincia de Trujillo en el Perú, para ello se recolectó nódulos radiculares de 60 plantas de *M. sativa* L. a partir de los cuales se aislaron en medio agar levadura manitol (YMA) con rojo de congo, 14 cultivos bacterianos, ocho de ellos fueron identificados fenotípicamente como *E. meliloti* y seis como *E. medicae*; todos crecieron en medio Luria Bertani (LB), toleraron 2% de NaCl, y utilizaron el L-triptófano, lo que permitió diferenciarlos de las especies del género *Rhizobium*. Por otro lado, la capacidad de utilizar el dulcitol, tolerancia a 3% de NaCl y resistencia frente al ácido nalidíxico permitió diferenciar ambas especies de *Ensifer*. Además, se encontró que todos los cultivos aislados evidenciaron cualitativamente producir ácido indol-3- acético (AIA).

**Palabras claves:** *Ensifer meliloti*, *Ensifer medicae*, *Medicago sativa* L., identificación fenotípica.

## Abstract

The biological fixation of nitrogen in soil is largely due to bacteria that establish symbiotic relationships with legumes, being very important to select and identify those with high environmental adaptation capacity typical of a certain region; in this sense, this research aimed to determine the phenotypic characteristics of *Ensifer meliloti* and *Ensifer medicae* (Rhizobiaceae) isolated from root nodules of *Medicago sativa* L. (Fabaceae) cultivated in agricultural areas of the Province of Trujillo in Perú, for which root nodules were collected from 60 plants of *M. sativa* L. from which 14 bacterial cultures were isolated on yeast mannitol agar (YMA) with Congo red, eight of them were phenotypically identified as *E. meliloti* and six as *E. medicae*; all grew in Luria Bertani (LB) medium, tolerated 2% NaCl, and used L-tryptophan, which allowed them to be differentiated from the species of the genus *Rhizobium*. On the other hand, the ability to use dulcitol, tolerance to 3% NaCl and resistance to nalidixic acid allowed to differentiate both *Ensifer* species. Furthermore, it was found that all isolated cultures showed qualitatively producing indole-3-acetic acid (IAA).

**Keywords:** *Ensifer meliloti*, *Ensifer medicae*, *Medicago sativa* L., identificación fenotípica.

**Citación:** Toro, S.; M. Calderón & D. Zavaleta-Verde. 2020. Características fenotípicas de *Ensifer meliloti* y *Ensifer medicae* (Rhizobiaceae) aislados de *Medicago sativa* L. (Fabaceae) en áreas agrícolas de Trujillo, Perú. *Arnaldoa* 27 (3): 741-750 2020. doi: <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.273.27305>

## Introducción

Existen diferentes géneros bacterianos en el suelo que fijan nitrógeno atmosférico y establecen una interacción simbiótica con leguminosas, formando nódulos en sus raíces (Ormeño-Orrillo et al., 2015). Los más estudiados son *Mesorhizobium* (Zgadzaj et al., 2016; De Meyer et al., 2015), *Bradyrhizobium* (Helene et al., 2015), y especies de la familia Rhizobiaceae tales como *Rhizobium* spp. (Alam et al., 2015) y *Ensifer* spp. (Li et al., 2016).

*Ensifer* spp. ha sido aislado de nódulos radiculares de diversas leguminosas, tales como *Sesbania* (Li et al., 2016), *Trigonella* (Eardly et al., 2017), *Glycine*, *Astragalus* (Yan et al., 2016) y especies de *Medicago* procedentes de distintas regiones bioclimáticas (Djedidi et al., 2011). En nódulos de *Medicago sativa* L., se han identificado *Ensifer meliloti* y *Ensifer medicae*, siendo *E. meliloti* el principal microsimbionte encontrado (Ramírez-Bahena et al., 2015).

Así mismo, algunos de estos géneros son considerados promotores del crecimiento vegetal, ya que no solo fijan nitrógeno atmosférico, sino que también pueden aumentar la biomasa de las plantas a través de la producción de sideróforos (Scagliola *et al.*, 2016), solubilización de fosfato inorgánico (Kuan *et al.*, 2016), actividad antagonista (Naureen *et al.*, 2017), actividad desaminasa (ACC) (Rangel *et al.*, 2017) y producción de fitohormonas (Olanrewaju *et al.*, 2017).

La producción de fitohormonas, principalmente del ácido indol-3-acético (IAA) (Paque & Weijers, 2016), es una de las características resaltantes del género *Ensifer*. En el estudio realizado por Kisiel & Kępczyńska (2016), evaluaron la capacidad *in vitro* de *E. meliloti* para producir IAA a partir de triptófano y demostraron un mejor crecimiento de *M. sativa* L. Además, se han diseñado cepas de esta especie bacteriana con el fin de sobre producir IAA y mejorar tanto el crecimiento como la expresión del gen *nifH* (Bianco *et al.*, 2014). Por otra parte, *E. meliloti* redujo los daños en *M. sativa* L. frente a condiciones de estrés por sequía (Defez *et al.*, 2017), deficiencia de hierro (Kallala *et al.*, 2018). Además, según Ramírez-Bahena *et al.* (2015), este microorganismo tolera la acidez, duplicando el número de nódulos radiculares por planta, siendo una característica muy importante para la agricultura de regiones con suelos ácidos. También, se ha estudiado la co-inoculación en condiciones de invernadero junto a bacterias del género *Delftia* que conllevó a resultados favorables para el crecimiento de *M. sativa* L. (Morel *et al.*, 2015).

*M. sativa* L., es una leguminosa perenne forrajera distribuida a nivel mundial y es una de las principales fuentes de alimento para el ganado. Se ha demostrado que los

rizobios presentes en esta planta pueden aumentar su valor nutricional (Jafari *et al.*, 2018), además, favorecer el establecimiento de nuevas comunidades bacterianas al ser intercaladas con otros cultivos, permitiendo aumentar el contenido de nitrógeno, potasio, fósforo y carbono (Zhang *et al.*, 2018). Por tales motivos, *M. sativa* L. es considerado como un alimento sostenible para la agricultura (Kulkarni *et al.*, 2018).

La identificación de especies nativas de *Ensifer* relacionadas simbióticamente con *M. sativa* L. permite la selección de cepas con potencial de uso en el área agrícola. Además, es importante destacar la capacidad de adaptación ambiental de las bacterias propias de una determinada región, ya que esto garantiza la subsistencia de la planta. En la provincia de Trujillo (Perú), no se han reportado estudios referentes al aislamiento de *Ensifer* spp. Por tal razón, la presente investigación tuvo por objetivo determinar las características fenotípicas de *E. meliloti* y *E. medicae* (Rhizobiaceae) aislados de nódulos radiculares de *M. sativa* L. (Fabaceae) cultivada en áreas agrícolas de la Provincia de Trujillo en el Perú; siendo esta la base de estudios posteriores, en donde se seleccionen a estas especies en base a su mayor promoción del crecimiento vegetal, para la formulación de inoculantes microbianos.

## Material y métodos

### Material biológico

Sistemas radiculares completos con nódulos activos, de 60 plantas de *Medicago sativa* L. recolectadas de áreas agrícolas de los distritos de Laredo (8°07'35,1"S, 78°56'52,4"W), Moche (8°08'33,2"S, 78°59'45,6"W) y Simbal (8°00'23,7"S, 78°49'33,5"W) de la provincia de Trujillo, Perú (Figura 1).

## Recolección y transporte de nódulos radiculares de las plantas

A través de un muestreo dirigido, se seleccionaron 20 plantas de *M. sativa* L., previamente identificadas taxonómicamente, las cuales estuvieron en estado de prefloración, tuvieron mayor follaje y no presentaron síntomas y/o signos de alguna enfermedad; de las cuales se extrajo los sistemas radiculares completos con presencia de nódulos activos. Se recolectaron los nódulos con parte de raíz o raicilla y fueron envueltos en papel de aluminio e introducidos en frascos con gel de sílice anhídrico para ser transportados (Koskey *et al.*, 2018).

## Aislamiento e identificación fenotípica de *Ensifer* spp.

Los nódulos recolectados fueron rehidratados (Somasegarán & Hoben, 1994), para ser luego desinfectados con etanol 70% (v/v) e hipoclorito de sodio al 1% (v/v) (Kang *et al.*, 2018).

Se seleccionó un nódulo activo y se procedió a triturarlo, en condiciones de asepsia, para luego ser cultivado mediante estriado en medio agar levadura manitol (YMA) con rojo de congo. Los cultivos fueron incubados en oscuridad a 28°C durante 7 días (Somasegarán & Hoben, 1994; Kang *et al.*, 2018).

Las colonias típicas (circulares, convexas, opacas, a veces translúcidas y mucilaginosas) de los cultivos que crecieron, fueron sembrados nuevamente en YMA con rojo de congo, se realizó la tinción Gram, para comprobar la pureza de las células Gram negativas. A los cultivos aislados se realizaron pruebas bioquímicas descritas en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey tales como; catalasa, oxidasa, glucosa, sacarosa,

ornitina, citrato, D-Arabinosa, L-Triptófano, dulcitol; así como también, características como movilidad, crecimiento en el medio Luria Bertani y en medio líquido levadura manitol (YMB) al 2% (Brenner *et al.*, 2005) y 3% de NaCl (Rome *et al.*, 1996). Además, se evaluó la resistencia antibiótica frente a ácido nalidíxico (Wang *et al.*, 2002).

También, se evaluó cualitativamente la producción *in vitro* de ácido indol-3-acético, para ello los cultivos bacterianos se inocularon en 5 mL de (YMB) suplementado con L-Triptófano (2,5 g.L<sup>-1</sup>) e incubados a 28°C durante 3 días. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos; luego 2 mL del sobrenadante se mezcló con 4 mL del reactivo de Salkowski y se incubó en oscuridad a 28°C durante 30 minutos (Kang *et al.*, 2018).

## Resultados y discusión

A partir de nódulos radiculares de 60 plantas de *Medicago sativa* L. (Fabaceae) recolectadas en áreas agrícolas de la provincia de Trujillo, Perú, se aisló 14 cultivos bacterianos pertenecientes al género *Ensifer*; de los cuales ocho fueron identificados como *Ensifer meliloti* y seis como *Ensifer medicae* (Rhizobiaceae), cuyas características fenotípicas diferenciales se describen en la Tabla 1.

De acuerdo a las características macro y micromorfológicas observadas, los cultivos bacterianos aislados a partir de nódulos de *M. sativa* L. pertenecieron al género *Ensifer*; su presencia en esta leguminosa es por la capacidad de establecer una interacción simbiótica y formar nódulos en su sistema radicular debido a la especificidad de los factores Nod secretados por las bacterias en respuesta a los flavonoides liberados por la planta (Peck *et al.*, 2006). Además,

lo observado concuerda con lo descrito en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey donde Brenner *et al.* (2005) especifican a este género como bacilos Gram negativos cortos, que sembrados en agar levadura manitol (YMA) con rojo de congo forman colonias circulares, convexas, opacas, a veces translúcidas, mucilaginosas, que no absorben el rojo de congo, característica distintiva de la familia *Rhizobiaceae* (Somasegarán & Hoben, 1994).

La diferenciación del género *Ensifer* con el género *Rhizobium* se pudo observar con el crecimiento de los cultivos bacterianos en el medio Luria Bertani (LB). *Rhizobium* no crece en este medio a excepción de *R. hainanense* y *R. tropici*, por ello la prueba de tolerancia al 2% NaCl (Brenner *et al.*, 2005) y la utilización de L-Triptófano (Peck *et al.*, 2006) permitió distinguir totalmente estas dos especies de *Rhizobium* del género *Ensifer* ya que *R. tropici* no crece a estas condiciones de salinidad y *R. hainanense* no es capaz de asimilar este compuesto.

La capacidad de utilización del dulcitol (Wang *et al.*, 2002) y la tolerancia al 3% de NaCl (Rome *et al.*, 1996) permitió diferenciar las especies de *Ensifer*. Así, en este estudio se aislaron las especies de *E. meliloti* y *E. medicae*; estos datos concuerdan con los hallazgos de Ramírez-Bahena *et al.* (2015) e Iglesias *et al.* (2007) en donde se encontró a ambas especies nodulando las raíces de *M. sativa* L.

Cabe mencionar que los cultivos Ep16-01, Em54-01, Em55-01 y Em60-01 fueron considerados como *E. medicae* a pesar de crecer en NaCl al 3% porque al igual que en lo investigado por Rome *et al.* (1996) esta especie puede ser variable bajo esta concentración de NaCl. Así mismo, se tuvo en cuenta la resistencia frente al ácido nalidíxico (Wang *et al.*, 2002) obteniéndose

que los cultivos Em54-01 y Em60-01 fueron sensibles frente a este antibiótico, a pesar de ser identificados como *E. medicae*.

Ramírez-Bahena *et al.* (2015) encontraron que la especie de *Ensifer* aislada en mayor cantidad a partir de los nódulos de *M. sativa* L. fue *E. meliloti*; esto concuerda con lo encontrado en esta investigación. Sin embargo, también hay estudios en donde se encontró únicamente a *E. meliloti* nodulando a *M. sativa* L. (Djedidi *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2019), lo cual puede explicarse por la especificidad que tienen los rizobios con las leguminosas. Además, se ha demostrado una mejor eficiencia de *E. meliloti* para nodular a *M. sativa* L., mientras que, *E. medicae* es más eficiente nodulando *M. truncatula* (Kazmierczak *et al.*, 2017).

Las especies del género *Ensifer* tienen la capacidad para adaptarse a diferentes condiciones bioclimáticas (Djedidi *et al.*, 2011), así como también promover el crecimiento vegetal a través de diversos mecanismos como es la producción de fitohormonas (Defez *et al.*, 2019). En esta investigación, la identificación de cultivos bacterianos aislados a partir de los nódulos de *M. sativa* L., da paso a la selección de especies con actividad promotora de crecimiento vegetal útil en el sector agrícola.

## Conclusiones

Las plantas de *Medicago sativa* (Fabaceae) cultivadas en áreas agrícolas de los distritos de Laredo, Moche y Simbal de la provincia de Trujillo, Perú presentaron bacterias con capacidad de nodulación, que correspondieron a *Ensifer meliloti* y *Ensifer medicae* (Rhizobiaceae) con características fenotípicas diferenciales a nivel de especie. Además, se evidenció el hecho que una misma especie de leguminosa, fue infectada por dos especies de *Ensifer*.

Esta investigación es el primer reporte de características morfológicas de simbioses de *M. sativa* cultivadas en el norte del Perú.

### Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a los responsables del laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo por su apoyo y facilidades para la realización de la presente investigación.

### Contribución de los autores

Todos los autores participaron en la redacción del manuscrito inicial, revisión bibliográfica, y en la revisión y aprobación del manuscrito final. S.T. y M.C. realizaron los muestreos de campo. S.T., M.C. & D.Z. realizaron los ensayos de laboratorio.

### Declaración de conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés alguno.

### Información de financiamiento

Este estudio fue financiado por los propios autores.

### Literatura citada

- Alam, F.; M. A. Bhuiyan; S. S. Alam; T. R. Waghmode; P. J. Kim & Y.B. Lee.** 2015. Effect of *Rhizobium* sp. BARIRGm901 inoculation on nodulation, nitrogen fixation and yield of soybean (*Glycine max*) genotypes in gray terrace soil. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 79(10): 1660-1668. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1044931>.
- Bianco, C.; B. Senatore; S. Arucci; G. Pieraccini & R. Defez.** 2014. Modulation of endogenous indole-3-acetic acid biosynthesis in bacteroids within *Medicago sativa* nodules. *Applied and environmental microbiology*, 80(14): 4286-4293. <https://doi.org/10.1128/AEM.00597-14>.
- Brenner, D. J.; N. R. Krieg & J. T. Staley.** 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2° Ed. Springer, 2 (Part C): 324-361.
- Defez, R.; A. Andreozzi; M. Dickinson; A. Charlton; L. Tadini; P. Pesaresi & C. Bianco.** 2017. Improved Drought Stress Response in Alfalfa Plants Nodulated by an IAA Over-producing *Rhizobium* Strain. *Frontiers in microbiology*, 8, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02466>.
- De Meyer, S. E.; H. Wee Tan; P. B. Heenan; M. Andrews & A. Willems.** 2015. *Mesorhizobium waimense* sp. nov. isolated from *Sophora longicarinata* root nodules and *Mesorhizobium cantuariense* sp. nov. isolated from *Sophora microphylla* root nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(10): 3419-3426. <https://doi.org/10.1099/ijssem.0.000430>.
- Djedidi, S.; T. Yokoyama; N. Ohkama-Ohtsu; C. P. Risal; C. Abdelly & H. Sekimoto.** 2011. Stress tolerance and symbiotic and phylogenetic features of root nodule bacteria associated with *Medicago* species in different bioclimatic regions of Tunisia. *Microbes and environments*, 26(1), 36-45. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me10138>.
- Eardly, B.; P. Elia; J. Brockwell; D. Golemboski & P. van Berkum.** 2017. Biogeography of a Novel *Ensifer meliloti* Clade Associated with the Australian Legume *Trigonella suavissima*. *Applied and environmental microbiology*, 83(10): 1-15. <https://doi.org/10.1128/AEM.03446-16>.
- Ferraz Helene, L. C.; J. R. Marçon Delamuta; A. R. Ribeiro; E. Ormeño-Orrillo; M. A. Rogel; E. Martínez-Romero & M. Hungria.** 2015. *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(12), 4441-4448. <https://doi.org/10.1099/ijssem.0.000591>
- Iglesias, O.; R. Rivas; P. García-Fraile; A. Abril; P. F. Mateos; E. Martínez-Molina & E. Velásquez.** 2007. Genetic characterization of fast-growing rhizobia able to nodulate *Prosopis alba* in North Spain. *FEMS Microbiol Lett*, 277(2): 210-216. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00968.x>.
- Jafari, M.; M. Yari; M. Ghabooli; M. Sepehri; E. Ghasemi & A. Jonker.** 2018. Inoculation and co-inoculation of "alfalfa" seedlings with root growth promoting microorganisms (*Piriformospora indica*, *Glomus intraradices* and *Sinorhizobium meliloti*) affect molecular structures, nutrient profiles and availability of hay for ruminants. *Animal nutrition*, 4(1), 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.008>.

- Kang, W.; L. Xu; Z. Jiang & S. Shi.** 2019. Genetic diversity and symbiotic efficiency difference of endophytic rhizobia of *Medicago sativa*. *Can J Microbiol*, 65(1): 68-83. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0158>.
- Kallala, N.; W. M'sehli; K. Jelali; Z. Kais & H. Mhadhbi.** 2018. Inoculation with Efficient Nitrogen Fixing and Indoleacetic Acid Producing Bacterial Microsymbiont Enhance Tolerance of the Model Legume *Medicago truncatula* to Iron Deficiency. *BioMed research international*, 2018, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2018/9134716>.
- Kisiel, A. & E. Kępczyńska.** 2016. *Medicago truncatula* Gaertn. as a model for understanding the mechanism of growth promotion by bacteria from rhizosphere and nodules of alfalfa. *Planta*, 243(5): 1169-1189. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2469-7>.
- Kuan, K. B.; R. Othman; K. Abdul Rahim & Z. H. Shamsuddin.** 2016. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. *PloS one*, 11(3): 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>.
- Kulkarni, K. P.; R. Tayade; S. Asekova; J. T. Song; J. G. Shannon & J. D. Lee.** 2018. Harnessing the Potential of Forage Legumes, "alfalfa", Soybean, and Cowpea for Sustainable Agriculture and Global Food Security. *Frontiers in plant science*, 9, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01314>.
- Li, Y.; J. Yan; B. Yu; E. T. Wang; X. Li; H. Yan; W. Liu & Z. Xie.** 2016. *Ensifer alkalisoli* sp. nov. isolated from root nodules of *Sesbania cannabina* grown in saline-alkaline soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(12): 5294-5300. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001510>.
- Morel, M. A.; C. Cagide; M. A. Minteguiaga; M. S. Dardanelli & S. Castro-Sowinski.** 2015. the pattern of secreted molecules during the co-inoculation of "alfalfa" plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: An Interaction That Improves Plant Yield. *Molecular plant-microbe interactions*, 28(2): 134-142. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-14-0229-R>.
- Naureen, Z.; N. U. Rehman; H. Hussain; J. Hussain; S. A. Gilani; S. K. Al Housni; F. Mabood; A. L. Khan; S. Farooq; G. Abbas & A. A. Harrasi.** 2017. Exploring the Potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for Plant Growth Promotion and Biocontrol Activities against Phytopathogenic Fungi. *Frontiers in microbiology*, 8, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01477>.
- Olanrewaju, O. S.; B. R. Glick & O. O. Babalola.** 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World journal of microbiology & biotechnology*, 33(11): 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>.
- Ormeño-Orrillo, E.; L. E. Servin-Garcidueñas; M. A. Rogel; V. González; H. Peralta; J. Mora; J. Martínez-Romero & E. Martínez-Romero.** 2015. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Systematic and applied microbiology*, 38(4): 287-291. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.002>.
- Paque, S. & D. Weijers.** 2016. Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. *BMC biology*, 14(1), 67-72. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0291-0>.
- Peck, M. C.; R. F. Fisher & S. R. Long.** 2006. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol*, 188(15): 5417-5427. <https://doi.org/10.1128/JB.00376-06>.
- Ramírez-Bahena, M. H.; M. Vargas; M. Martín; C. Tejedor; E. Velázquez & Á. Peix.** 2015. "Alfalfa" microsymbionts from different ITS and nodC lineages of *Ensifer meliloti* and *Ensifer medicae* symbiovar *meliloti* establish efficient symbiosis with "alfalfa" in Spanish acid soils. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(11): 4855-4865. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6347-6>.
- Rangel, W. M.; S. Thijs; J. Janssen; S. M. Oliveira Longatti; D. S. Bonaldi; P. R. Ribeiro; I. Jambon; N. Eevers; N. Weyens; J. Vangronsveld & F. M. Moreira.** 2017. Native rhizobia from Zn mining soil promote the growth of *Leucaena leucocephala* on contaminated soil. *International journal of phytoremediation*, 19(2): 142-156. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207600>.
- Rome, S.; M. P. Fernandez; B. Brunel; P. Normand & J. C. Cleyet-Marel.** 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int J Syst Bacteriol*, 46(4):972-80. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-972>.
- Scagliola, M.; Y. Pii; T. Mimmo; S. Cesco; P. Ricciuti & C. Creccchio.** 2016. Characterization of plant growth promoting traits of bacterial isolates from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) and "tomato" (*Solanum lycopersicon* L.) grown under Fe sufficiency and deficiency. *Plant physiology*

- and biochemistry, 107, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.002>.
- Somasegaran, P. & H. J. Hoben.** 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology. Springer, 7-29.
- Wang, E. T.; Z. Y. Tan; A. Willems; M. Fernández-López; B. Reinhold-Hurek & E. Martínez-Romero.** 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala* associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(5):1687-1693. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1687>.
- Yan, H.; J. Yan; X. H. Sui; E. T. Wang; W. X. Chen; X. X. Zhang & W. F. Chen.** 2016. *Ensifer glycinis* sp. nov., a rhizobial species associated with species of the genus *Glycine*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(8): 2910-2916. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001120>.
- Zgadaj, R.; R. Garrido-Oter; D. B. Jensen; A. Koprivova; P. Schulze-Lefert & S. Radutoiu.** 2016. Root nodule symbiosis in *Lotus japonicus* drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(49): 7996-8005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616564113>.
- Zhang, M. M.; N. Wang; Y. B. Hu & G. Y. Sun.** 2018. Changes in soil physicochemical properties and soil bacterial community in mulberry (*Morus alba* L.)/"alfalfa" (*Medicago sativa* L.) intercropping system. *Microbiology Open*, 7(2): 1-11. <https://doi.org/10.1002/mbo3.555>.



Fig. 1. Mapa de ubicación de las zonas de muestreo de los nódulos de *Medicago sativa* L. de la provincia de Trujillo para los aislamientos de las especies de *Ensifer*.

**Tabla 1.** Características fenotípicas diferenciales de cultivos de *Ensifer meliloti* y *Ensifer medicae* aislados a partir de nódulos de *Medicago sativa* L. en áreas agrícolas de Trujillo, Perú

	Características																
	Motilidad	Catalasa	Oxidasa	Utilización de diferentes carbohidratos							Tolerancia		Resistencia a Ac. nalidixico	Producción de IAA*			
				Glucosa	Sacarosa	Ornitina	Citrato	D-Arabinosa	L-Triptófano	Dulcitol	Crecimiento en Luria Bertani		2% NaCl	3% NaCl			
Cultivos identificados como <i>E. meliloti</i>																	
Ep16-02	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ec23-01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ec38-01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Em45-01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Em46-02	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Em56-01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Em57-01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Em58-01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cultivos identificados como <i>E. medicae</i>																	
Ep16-01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ec32-01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Em52-02	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Em54-01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Em55-01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Em60-01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

+, positivo; -, negativo

\*IAA: Ácido indol-3-acético