



Reseña bibliográfica

Biofertilización y nanotecnología en la alfalfa (*Medicago sativa* L.) como alternativas para un cultivo sustentable

Carmen María Ramos-Ulate¹ 

Sandra Pérez-Álvarez^{1*} 

Sergio Guerrero-Morales¹ 

Abdon Palacios-Monarez¹ 

¹Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, Universidad Autónoma de Chihuahua, Km 2.5, carretera Delicias-Rosales, campus Delicias, CD. Delicias, Chihuahua, México, CP. 33000

*Autor para correspondencia: spalvarez@uach.mx

RESUMEN

La alfalfa es considerada el cultivo forrajero más empleado en el mundo, su principal uso es la alimentación del ganado, debido a su alto valor nutricional, específicamente en proteína y fibra digestible. Actualmente la tendencia en la agricultura es disminuir la aplicación de químicos y dentro de ellos están los fertilizantes que contaminan suelos y aguas, por lo que la adopción de nuevas tecnologías y otras no tan nuevas se está haciendo un buen hábito entre los agricultores. La nanotecnología en el sistema planta permite desarrollar nuevos fertilizantes para mejorar la productividad agrícola y la liberación de nutrientes minerales en nanoformas, lo que posee una gran variedad de beneficios, incluyendo el momento y la directa liberación de los nutrientes, además que sincroniza o específica la respuesta ambiental. Los biofertilizantes son componentes importantes del manejo integrado de nutrientes y desempeñan un papel clave en la productividad y la sostenibilidad del suelo. Al tiempo que protegen el medio ambiente, siendo una fuente rentable, ecológica y renovable de nutrientes vegetales para complementar los fertilizantes químicos en el sistema agrícola sostenible. La nanotecnología y la biofertilización permiten de forma práctica la reducción en la aplicación de químicos, contribuyendo a la sostenibilidad de la agricultura, por lo que este trabajo tiene como objetivo realizar una revisión de los resultados relevantes sobre biofertilización, el uso de

la nanotecnología y la evaluación de la composición nutricional de la alfalfa al cultivarse con la aplicación de biofertilizantes.

Palabras clave: agricultura, biofertilizantes, nanomateriales

Recibido: 19/06/2020

Aceptado: 15/12/2020

INTRODUCCIÓN

La demanda de alimentos en el mundo está aumentando de manera exponencial, más en los países en desarrollo donde las tierras y los recursos agrícolas apenas contribuyen a una producción eficiente de cultivos necesaria para satisfacer una demanda tan urgente de alimentos. Existe la necesidad de intensificar la producción agrícola de manera sostenible mediante el uso eficiente de los recursos considerando toda la diversidad bioquímica del agroecosistema y su potencial para mitigar los impactos adversos de la baja fertilidad del suelo, el estrés abiótico, los patógenos y las plagas ⁽¹⁾.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas y algunos de estos no están disponibles en el suelo, debido a muchos factores como, lixiviación, degradación por protólisis, hidrólisis y descomposición, por lo que se hace necesario, disminuir la pérdida de estos durante la fertilización e incrementar la producción de los cultivos mediante nuevas tecnologías ⁽²⁾. Una de estas tecnologías es la nanotecnología y nanomateriales (NMs), debido a que los nanofertilizantes podrían tener cualidades efectivas para los cultivos, como el poder liberar los nutrientes de acuerdo a la demanda, la liberación controlada de los fertilizantes químicos que regulan el crecimiento y el desarrollo de las plantas y mejoran la actividad de destino ⁽²⁾.

Otra de las tecnologías es la aplicación de la biofertilización. Los biofertilizantes, se utilizan para complementar los fertilizantes químicos principalmente para mantener la fertilidad del suelo. Estos fertilizantes son orgánicos, biodegradables, contienen microorganismos, proporcionan nutrientes, antibióticos, hormonas como auxinas, citoquininas, vitaminas que enriquecen la rizosfera de la raíz ⁽³⁾.

Las leguminosas contribuyen a la sostenibilidad de la agricultura: reducen los fertilizantes minerales, disminuyendo así la producción de N₂O y aumentan la fijación de N₂, renuevan y enriquecen la fertilidad del suelo, debido a sus sistemas de raíces profundas, descomponen rápidamente su biomasa de raíces y se acumulan en el suelo ⁽⁴⁾.

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) tiene la capacidad de acumular significativamente mayores cantidades de nitrógeno que otras leguminosas a través de su sistema de enraizamiento profundo y, además, fija el N₂ atmosférico entre un 40 al 80 % mediante la fijación biológica de este elemento ⁽⁵⁾.

Por todo lo informado este trabajo tiene como objetivo realizar una revisión de los resultados relevantes sobre biofertilización y el uso de la nanotecnología en el cultivo de la alfalfa, ilustrando cómo estas tecnologías pueden conllevar a la reducción en la aplicación de fertilizantes químicos.

La alfalfa, generalidades, usos y aplicaciones

La alfalfa es una leguminosa perenne, representativa de las regiones templadas y se utiliza principalmente como alimento para el ganado, considerándose universalmente uno de los forrajes de más alta calidad. Es un cultivo valioso porque dentro de las numerosas ventajas agronómicas y ambientales que tiene, se encuentran la preservación de la fertilidad del suelo y la biodiversidad, la protección contra la erosión del suelo, la mitigación de los impactos del cambio climático, la reducción de la contaminación por nitratos de las aguas subterráneas, la reducción del consumo de combustibles fósiles, la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero, entre otras ⁽⁶⁻⁹⁾.

Esta leguminosa (alfalfa) tiene un conjunto de características morfológicas y fisiológicas variables de importancia en la agricultura mundial y contribuye con su alto y estable rendimiento como hierba nutritiva ⁽¹⁰⁾. Su importancia económica se basa en el alto potencial de producción de biomasa, superior a 80 t ha⁻¹ verde y cerca de 20 t ha⁻¹ de materia seca ⁽¹¹⁾. Los forrajes de alfalfa se caracterizan por un alto contenido de proteína cruda ⁽¹²⁾, bien equilibrada con respecto al aminoácido. Se enriquece con vitaminas de vital importancia y varios microelementos esenciales para el crecimiento y el desarrollo normal de los animales. La alfalfa es el componente básico en el programa de alimentación para ganado lechero, así como para ganado vacuno, caballos, ovejas y otras clases de ganado ⁽¹³⁾.

La alfalfa también se ha vuelto interesante como fuente potencial de metabolitos secundarios, debido a que se considera una alternativa de fitoestrógenos útiles en la salud (ingrediente alimentario humano y suplementos), por lo que su crecimiento se ha generalizado en diferentes continentes, debido a su alta adaptabilidad a diferentes tipos

de suelos, de valores de pH y condiciones ambientales, así como la posibilidad de producción sostenible y ecológica ^(14,15).

En México ⁽¹⁶⁾, se han sembrado 385 992 ha de alfalfa verde, de estas se han cosechado 384,693 ha para una producción de 15 360 646 y un rendimiento de 39,930 t ha⁻¹. En este país el principal uso de la alfalfa es para alimentar el ganado lechero en regiones áridas, semiáridas y templadas. El cultivo se corta a intervalos medios para cosechar el mayor rendimiento de forraje al año por unidad de superficie, así como por su buen contenido de proteína cruda, digestibilidad y grado de aceptación por el ganado ^(17,18). Esta planta, como forraje puede utilizarse de diferentes formas, en fresco, henificado y ensilado en mezcla con una o varias gramíneas ^(19,20).

Biofertilización en la alfalfa

El desarrollo de un país es directamente proporcional a la cantidad de alimentos o nutrientes disponibles para la población. El aumento creciente de la población mundial crea una demanda cada vez mayor de alimentos y para suplirla, se utilizan fertilizantes que se definen como cualquier sustancia que se utiliza para aumentar la productividad del suelo, promoviendo su fertilidad al agregar nutrientes, lo que ayuda en el crecimiento de las plantas. Los fertilizantes que se componen de productos químicos crudos en forma sólida o líquida elaborados en fábricas dirigidas a los requerimientos nutricionales de las plantas se denominan, por definición, un fertilizante químico. El nitrógeno (N), el fósforo (P) y el potasio (K) llamados NPK, normalmente están presentes en estos fertilizantes químicos junto con otros nutrientes ⁽²¹⁾.

El uso excesivo de fertilizantes químicos ha generado diversos problemas en la naturaleza como, por ejemplo, la acidificación del agua; el daño de la capa de ozono; el efecto invernadero; utilizarlos por mucho tiempo pueden cambiar el pH del suelo, la eutrofización del agua donde el contenido nutricional en estos entornos aumenta, provocando la proliferación de algas y, en consecuencia, la reducción del oxígeno en el agua, lo que daña la vida marina ⁽²²⁾. Una solución actual para disminuir la utilización de estos fertilizantes en la agricultura es el uso de biofertilizantes ⁽²³⁾.

Los biofertilizantes, son inoculantes microbianos que contienen células vivas o latentes de cepas eficientes de microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfato y descomponedores de celulosa ⁽³⁾. Estos están destinados a aplicarlos fundamentalmente

en los suelos para mejorar su fertilidad y el crecimiento de las plantas, al aumentar el número y la actividad biológica de los microorganismos beneficiosos ⁽³⁾.

Algunas de las ventajas que tienen los biofertilizantes es que son rentables y ecológicos, mejoran gradualmente la calidad de los suelos. Los microorganismos contenidos en el biofertilizante promueven el suministro de nutrientes a las plantas y, por lo tanto, se asegura su desarrollo, crecimiento y regulación fisiológica. Sumado a esto el rendimiento del cultivo puede aumentar en un 10 a un 25 % y con su uso las plantas son menos propensas a las enfermedades del suelo. Dentro de las principales limitaciones que tienen los biofertilizantes se pueden señalar que actúan más lentamente que los fertilizantes químicos; son difíciles de almacenar debido a su alta sensibilidad a los cambios de temperatura y humedad; no pueden reemplazar otros fertilizantes por completo, y la escasez de cepas particulares o locales de microorganismos reduce su disponibilidad ⁽²⁴⁾.

Los tipos de biofertilizantes disponibles ⁽²²⁾ son:

- 1- Biofertilizante fijador de nitrógeno: *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*.
- 2- Biofertilizante solubilizador de fósforo: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*.
- 3- Biofertilizante movilizador de fósforo – Micorriza.
- 4- Biofertilizante promotores del crecimiento de las plantas: *Pseudomonas*, *Trichoderma*.

Los efectos de los biofertilizantes mencionados en cuanto a la fijación nitrógeno en el suelo, se realiza a través de los nódulos de la raíz del cultivo de leguminosas poniendo el N₂ a disposición de la planta. Otros microorganismos que pueden utilizarse como biofertilizantes son: *Azolla* que es un helecho heterogéneo con siete especies que son endosimbionte con *Anabaena azollae*, una cianobacteria fijadora de nitrógeno ⁽²⁵⁾ y las algas verde azules pueden fijar el nitrógeno en el entorno anaeróbico debido a una célula especializada llamada heterociste ⁽²⁶⁾.

Las bacterias solubilizadoras de fosfato producen ácidos orgánicos e inorgánicos como el ácido gulcónico y el ácido cetogulcónico que solubilizan el fósforo ⁽²⁷⁾. El ácido glucónico produce un grupo carboxilo e hidroxilo, este grupo funcionará como un quelante del Fe²⁺, Al³⁺ y Ca²⁺, lo que reducirá el pH del suelo. También es importante mencionar que existe una interacción positiva entre *Gluconacetobacter spp* y *Burkholderia spp* para aumentar la actividad de deshidrogenasa en el suelo. Los deshidrogenados están involucrados en el

proceso de oxidación del suelo y se utilizan como indicador de la actividad microbiana del mismo ⁽²⁸⁾.

En la alfalfa se han realizado algunos estudios utilizando el cultivo orgánico, lo que incluye el uso de biofertilizantes. La aplicación de inoculantes microbianos líquidos en semillas de leguminosas es una práctica agrícola sostenible que puede mejorar la absorción de nutrientes de las plantas y aumentar la productividad de los cultivos. Después de aplicarlos a las semillas de leguminosas los inoculantes deben proporcionar la supervivencia a largo plazo de rizobios en el producto final y para estudiar la supervivencia de *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* L3 Si, se examinaron diez formulaciones de medios diferentes de inoculantes microbianos (caldo de manitol de levadura con la adición de agar, alginato de sodio, cloruro de calcio, glicerol o cloruro férrico y combinaciones de los mismos). Para la supervivencia de L3 Si, durante un tiempo de almacenamiento de 150 días se aplicó la formulación del medio que contenía glicerol en combinación con agar o alginato de sodio, el cual se utilizó como inoculante líquido. Las semillas de alfalfa se pre-inocularon con cuatro formulaciones (caldo de levadura de manitol (YMB), YMB con agar (1 g L^{-1}), YMB con 1 o 5 g L^{-1} de alginato de sodio) durante tres meses. Las semillas pre-inoculadas y almacenadas durante un mes produjeron plantas de alfalfa exitosas. El contenido de nitrógeno en la alfalfa obtenido de semillas pre-inoculadas un mes antes de la siembra aumentó entre 3,72-4,19 % ⁽²⁹⁾.

La capacidad de 17 cepas de rizobacterias para mejorar la fisiología, la absorción de nutrientes, el crecimiento y el rendimiento de las plantas de alfalfa cultivadas en condiciones de agricultura desértica en Arabia Saudita fue estudiada por algunos autores ⁽³⁰⁾. Los 17 aislamientos de rizobacterias se confirmaron como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas mediante pruebas bioquímicas clásicas y utilizando análisis de secuencia de genes de ADNr 16S, las cepas se identificaron como *Bacillus*, *Acinetobacter* and *Enterobacter*. La inoculación de alfalfa con cualquiera de estas 17 cepas mejoró el contenido relativo de agua; clorofila a; clorofila b; contenido de carotenoides; contenido de N, P y K; altura de planta; relación hoja-tallo; masa fresca y seca. *Acinetobacter pittii* JD-14 fue más eficaz para aumentar la masa fresca y seca de la alfalfa en un 41 y 34 %, respectivamente, en comparación con las plantas de control no inoculadas. Sin embargo, todas las cepas mejoraron las características de los cultivos en comparación con las plantas de control, lo que indica que estas cepas de rizobacterias del desierto podrían usarse para desarrollar un biofertilizante ecológico para la alfalfa y posiblemente otras plantas de cultivo para mejorar la producción sostenible en regiones áridas.

Evaluación de la composición nutricional de la alfalfa (*M. sativa*) al cultivarse con la aplicación de biofertilizantes

Se utilizaron seis dosis de biofertilizantes de estiércol de ganado fermentado en un biodigestor (0, 25, 50, 100, 200 y 400 m³ ha⁻¹) y cinco repeticiones. Las características químicas del biofertilizante fueron: 0,300 g N (Nitrógeno) L⁻¹; 0,057 g P (Fosforo) L⁻¹; 0,188 g K (Potasio) L⁻¹; 0,105 g Ca (calcio) L⁻¹; 0,057 g Mg (magnesio) L⁻¹, 1 mg Mn (manganeso) L⁻¹; 1 mg Fe (hierro) L⁻¹, y 1 mg Zn (zinc) L⁻¹. Como resultado se obtuvo que la mejor absorción de N, K, Ca y Mg se produjo con la dosis de 400 m³ ha⁻¹. En el caso del N significó un 22 % más que en el control y fue lineal con el incremento de biomasa. Los niveles de los micronutrientes Cu, Mn y Zn no tuvieron diferencias significativas entre las dosis aplicadas, al igual que las concentraciones de proteína cruda ⁽³¹⁾.

Por otra parte, se estudió en condiciones de macetas y de campo el efecto de la cepa ENRRI A12 de *S. meliloti* y el estiércol de pollo (0, 2, 4, 6, 8 y 10 t ha⁻¹) en el cultivar de alfalfa (*M. sativa*) "Hegazi". En el experimento en maceta, la inoculación de *S. meliloti* y los niveles de estiércol de pollo aumentaron significativamente la altura de la planta, la masa fresca y seca de la raíz y el número de nódulos y su peso seco. En el experimento de campo, tanto *S. meliloti* como el estiércol de pollo aumentaron significativamente la densidad de las plantas, el rendimiento de forraje fresco y el contenido de proteínas, y disminuyeron significativamente el porcentaje de fibra cruda. El rendimiento de forraje fresco y el nivel de estiércol de pollo estuvieron altamente correlacionados ($r > 0,99$) ⁽³²⁾.

Nanotecnología en la alfalfa

La nanotecnología es una de las últimas innovaciones tecnológicas. El término "nanotecnología" fue acuñado por primera vez por Norio Taniguchi, profesor de la Universidad de Ciencias de Tokio, en 1974 ⁽³³⁾. Aunque el término "nanotecnología" se ha introducido durante mucho tiempo en múltiples disciplinas, la idea de que las nanopartículas (NPs) podrían ser de interés en el desarrollo agrícola es una innovación tecnológica reciente y todavía está en desarrollo progresivo ⁽³⁴⁾.

Las NPs son materiales orgánicos, inorgánicos o híbridos con al menos una de sus dimensiones que van de 1 a 100 nm (a nanoescala). Las NPs que existen en el mundo natural pueden producirse a partir de procesos de reacciones fotoquímicas, erupciones volcánicas, incendios forestales, erosión, plantas y animales o incluso por los microorganismos ⁽³⁵⁾. La producción de NPs derivadas de plantas y microorganismos se

ha convertido en una fuente biológica eficiente de NPs verdes que atraen una atención adicional de los científicos en los últimos tiempos debido a su naturaleza ecológica y la simplicidad del proceso de producción en comparación con las otras rutas ⁽³⁶⁾.

Las NPs, dependiendo de sus propiedades, interactúan con las plantas provocando diversos cambios morfológicos y fisiológicos. La eficiencia de las NPs está determinada por su composición química, tamaño, cubierta de la superficie, reactividad, y lo más importante, la dosis a la cual son efectivas ⁽³⁷⁾. Los investigadores señalan tanto efectos positivos, como negativos en el crecimiento y desarrollo de las plantas al utilizar NPs y el impacto de estas depende de la composición, concentración, tamaño y propiedades químicas y físicas, así como, la especie de planta ⁽³⁸⁾.

Para la explotación de la nanotecnología verde, una serie de especies de plantas y microorganismos, incluyendo bacterias, algas y hongos, se están utilizando actualmente para la síntesis de NPs. Por ejemplo, las especies de plantas *M. sativa* y *Sesbania* se utilizan para formular nanopartículas de oro. Del mismo modo, los nanomateriales inorgánicos, hechos de plata (Ag), níquel (Ni), cobalto (Co), zinc (Zn) y cobre (Cu), pueden sintetizarse dentro de plantas vivas, como *Brassicajuncea*, *M. sativa* y *Heleanthusannus* ⁽³⁶⁾.

Los nanofertilizantes sintetizados tienen un uso específico para regular la liberación de nutrientes en función de los requisitos de los cultivos, al tiempo que minimizan las pérdidas diferenciales. Por ejemplo, los fertilizantes de nitrógeno convencionales se caracterizan por grandes pérdidas en el suelo a través de la lixiviación, la evaporación o incluso la degradación de hasta un 50-70 %, lo que finalmente reduce la eficiencia de los fertilizantes y eleva el costo de producción ⁽³⁹⁾. Por otro lado, las nanoformulaciones de fertilizantes nitrogenados sincronizan la liberación de fertilizante-N con su demanda de absorción por parte de los cultivos. En consecuencia, las nanoformulaciones evitan pérdidas indeseables de nutrientes a través de la internalización directa por parte de los cultivos y, por lo tanto, evitan la interacción de nutrientes con el suelo, el agua, el aire y los microorganismos ⁽³⁶⁾.

La deficiencia de micronutrientes disminuye no solo la productividad de los cultivos, sino que también afecta la salud humana a través del consumo de alimentos con deficiencia de micronutrientes. Por ejemplo, la deficiencia de hierro causa anemia, deterioro del crecimiento, problemas de salud reproductiva e incluso disminución del rendimiento cognitivo y físico en humanos ⁽⁴⁰⁾. En este sentido, la utilización de micronutrientes nanoformulados para la liberación lenta o controlada de nutrientes estimularía el proceso

de absorción por las plantas, promovería el crecimiento y la productividad de los cultivos y contribuiría también a mantener la salud del suelo ⁽⁴¹⁾. Por ejemplo, en suelos con deficiencia de zinc, la aplicación de nano óxido de zinc a dosis bajas influye positivamente en el crecimiento y las respuestas fisiológicas, como el brote y el alargamiento de la raíz, el peso seco fresco y la fotosíntesis en muchas especies de plantas en comparación con el control ^(42,43).

Aplicaciones de la nanotecnología en el cultivo de la alfalfa

El boro (B) se encuentra entre los nutrientes que son necesarios para el crecimiento de las plantas y la producción de rendimiento y puede mejorar las propiedades nutricionales de los cultivos forrajeros. Sin embargo, a niveles más altos, puede ser tóxico y afectar negativamente el crecimiento de las plantas y la calidad del forraje. La concentración de B en las plantas se ve afectada por diferentes parámetros, como la fertilización con este mismo micronutriente, el suelo, el clima, las especies de plantas, etc. Por todo esto se estudiaron los efectos de diferentes tratamientos de B en la alfalfa en la concentración de B y en el contenido de pigmentos, incluidos clorofila, b, total y carotenoides. Los tratamientos experimentales fueron: 1) seis tipos de suelo (S1-S6); 2) fuentes de B, incluida la fertilización con boricacida (B1) y nano boro (B2) y 3) número de pulverizaciones (cero, uno, dos y tres veces). Los resultados indicaron que el tipo de suelo, la fuente de B y el número de fumigaciones afectaron significativamente ($P \leq 0,01$) la concentración del B en la alfalfa y el contenido de pigmentos. La pulverización tres veces aumentó significativamente la concentración de B ya que resultó en un aumento del 207,81 % en comparación con el tratamiento control e igualmente incrementó el contenido de pigmentos ($P \leq 0,05$) incluyendo clorofila, b, total y carotenoides en comparación con los otros tratamientos ⁽⁴⁴⁾.

Se realizó un estudio en invernadero para explorar el efecto de varias dosis de NPs de sulfato de potasio (K_2SO_4) sobre el crecimiento de alfalfa y la respuesta fisiológica bajo estrés salino. Se seleccionó un genotipo tolerante a la sal (Me-sa-Sirsa) y un genotipo sensible a la sal (Bulldog 505) en función de la germinación bajo sal y se plantaron en macetas que contenían 2 kg de arena. Los dos genotipos se sometieron a niveles de sal de 0 y 6 dS m^{-1} utilizando $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: NaCl (2:1) mezclado con solución de Hoagland. Se aplicaron tres tratamientos de K_2SO_4 NPs que consistían en 1/4, 1/8 y 1/10 del nivel de K en solución Hoagland de fuerza completa (235 mg L^{-1}). El mayor peso seco del brote,

rendimiento relativo, longitud de la raíz y peso seco de la raíz en ambos genotipos se obtuvo al utilizar K_2SO_4 NPs al nivel de 1/8. Las diferentes dosis de K_2SO_4 NPs afectaron significativamente la relación Na/K y las concentraciones de Ca, P, Cu, Mn y Zn en el tejido vegetal. La aplicación de K_2SO_4 NPs a una tasa de 1/8 mejoró la respuesta fisiológica de la planta al estrés salino al reducir la fuga de electrolitos, aumentar el contenido de catalasa y prolina y aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes. Estos resultados sugieren que la aplicación de KNP puede tener una mejor eficiencia que los fertilizantes de K convencionales para proporcionar una nutrición adecuada de las plantas y superar los efectos negativos del estrés salino en la alfalfa ⁽⁴⁵⁾.

La toxicidad de nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) en la germinación de semillas/alargamiento de raíces y la absorción de ZnONPs y Zn^{2+} en alfalfa (*M. sativa*), pepino (*Cucumis sativus* L.) y plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se investigó por ⁽⁴⁶⁾. Las semillas fueron tratadas con ZnONPs a 0-1 600 mg L⁻¹ así como a 0-250 mg L⁻¹ de Zn^{2+} con fines de comparación. Los resultados mostraron que a 1 600 mg L⁻¹ de ZnONPs, la germinación en pepino aumentó en un 10 % y la germinación de alfalfa y tomate se redujo en un 40 y 20 %, respectivamente. Con 250 mg de Zn^{2+} L⁻¹, sólo se redujo la germinación del tomate con respecto a los controles. El mayor contenido de Zn fue de 4 700 y 3 500 mg kg⁻¹ de peso seco (DW), para las plántulas de alfalfa germinadas en 1 600 mg L⁻¹ de ZnONPs y 250 mg L⁻¹ de Zn^{2+} , respectivamente.

La alfalfa en la nanotecnología se ha utilizado también para la obtención de NPs. Los científicos han encontrado una manera de cultivar y cosechar oro (Au) de las plantas de cultivo. Las NPs podrían ser cosechadas industrialmente. Por ejemplo, las plantas de alfalfa cultivadas en un ambiente rico en $AuCl_4$ mostraron absorción de oro metálico. Las AuNPs se pueden separar mecánicamente disolviendo el material orgánico (tejido vegetal) después de la cosecha ⁽⁴⁷⁾. Las plantas de alfalfa también pueden absorber Ag a partir de un medio sólido rico en este elemento con la posterior formación de Ag NPs ⁽⁴⁸⁾.

CONCLUSIONES

- El uso indiscriminado y desequilibrado de fertilizantes químicos, especialmente urea, junto con pesticidas químicos y la falta de abonos orgánicos conlleva a una reducción considerable en la salud del suelo, por lo que el uso de los biofertilizantes va en ascenso en diversos países y cultivos. El cultivo de comunidades microbianas

induce una alta productividad con inversiones insignificantes de energía y, por lo tanto, reduce significativamente los efectos sobre el medio ambiente.

- En la agricultura sostenible y la protección del medio ambiente contra la contaminación es fundamental, por lo que la aplicación de la nanotecnología asegura una mejor gestión y conservación de los insumos para la producción de alimentos agrícolas. Esta avanzada técnica representa un beneficio significativo para la productividad agrícola, ya que las nanopartículas son una plataforma eficiente para la transferencia de genes y biomoléculas a las plantas desde la ingeniería.

BIBLIOGRAFÍA

1. Timmusk S, Behers L, Muthoni J, Muraya A, Aronsson A-C. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in plant science*. 2017;8:49.
2. Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant science*. 2010;179(3):154-63.
3. Yadav KK, Sarkar S. Biofertilizers, impact on soil fertility and crop productivity under sustainable agriculture. *Environment and Ecology*. 2019;37(1):89-93.
4. Lüscher A, Mueller-Harvey I, Soussana J-F, Rees RM, Peyraud J-L. Potential of legume-based grassland–livestock systems in Europe: a review. *Grass and forage science*. 2014;69(2):206-28.
5. Jarvis SC. N flow and N efficiency in legumes based systems: a system overview. In: *Sward dynamics, N-flows and Forage Utilisation in Legume-Based Systems*. Proc. of the 2nd COST 852 Workshop, Grado, Italy. 2005. p. 10-2.
6. Annicchiarico P. Alfalfa forage yield and leaf/stem ratio: narrow-sense heritability, genetic correlation, and parent selection procedures. *Euphytica*. 2015;205(2):409-20.
7. Annicchiarico P, Barrett B, Brummer EC, Julier B, Marshall AH. Achievements and challenges in improving temperate perennial forage legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2015;34(1-3):327-80.
8. Vasileva V, Kostov O. Effect of mineral and organic fertilization on alfalfa forage and soil fertility. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2015;678-86.
9. Shi S, Nan L, Smith KF. The current status, problems, and prospects of alfalfa (*Medicago sativa* L.) breeding in China. *agronomy*. 2017;7(1):1-11.

10. Radović J. Genetička varijabilnost produktivnih svojstava i kvaliteta selekcionisane populacije lucerke *Medicago sativa* L.). Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Beograd; 2005.
11. Nešić Z, Tomić Z, Žujović M, Krnjaja V. Production characteristics of domestic alfalfa *Medicago sativa* L.) cultivars in agroecological conditions of Srem district. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 2005;21(5-6):169-74.
12. Marković J, Radović J, Lugić Z, Sokolović D. The effect of development stage on chemical composition of alfalfa leaf and stem. *Biotechnology in animal husbandry*. 2007;23(5-6-2):383-8.
13. Marković J, Ignjatović S, Radović J, Lugić Z. Uticaj faze razvića na sadržaj makro i mikroelemenata u lucerki i crvenoj detelini. *Zbornik Radova-A Periodical of Scientific Research on Field & Vegetable Crops*. 2007;44(1):401-6.
14. Saviranta NM, Anttonen MJ, von Wright A, Karjalainen RO. Red clover *Trifolium pratense* L.) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008;88(1):125-32.
15. Butkutė B, Lemežienė N, Dabkevičienė G, Jakštas V, Vilčinskas E, Janulis V. Source of variation of isoflavone concentrations in perennial clover species. *Pharmacognosy Magazine*. 2014;10(Suppl 1):181-8.
16. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Producción Agrícola [Internet]. gov.mx. 2020 [cited 25/01/2021]. Available from: <http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
17. McMahan LR, Majak W, McAllister TA, Hall JW, Jones GA, Popp JD, et al. Effect of sainfoin on in vitro digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. *Canadian Journal of Animal Science*. 1999;79(2):203-12.
18. Chocarro C, Lledo M, Fanlo R, Lloveras J. Effect of winter grazing on the protein content of alfalfa spring regrowth. In: *Quality in Lucerne and Medics for Animal Production. Proceedings of the XIV Eucarpia Medicago spp. Conference. Options Mediterranennes, Serie A*. 2001. p. 253-6.
19. Améndola MRD, Castillo GE, Martínez HPA. Pasturas y cultivos forrajeros. Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2005.
20. Hernández Garay A, Martínez Hernández PA, Zaragoza Esparza J, Vaquera Huerta H, Osnaya Gallardo F, Joaquín Torres BM, et al. Caracterización del rendimiento

- de forraje de una pradera de alfalfa-ovillo al variar la frecuencia e intensidad del pastoreo. *Revista fitotecnia mexicana*. 2012;35(3):259-66.
21. Youssef MMA, Eissa MFM. Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review. *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*. 2014;5(1):1-6.
 22. Jain G. Biofertilizers - A way to organic agriculture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2019;8(4S):49-52.
 23. Choudhury A, Kennedy IR. Nitrogen fertilizer losses from rice soils and control of environmental pollution problems. *Communications in soil science and plant analysis*. 2005;36(11-12):1625-39.
 24. Kumar R, Kumawat N, Sahu YK. Role of biofertilizers in agriculture. *Pop Kheti*. 2017;5(4):63-6.
 25. Bocchi S, Malgioglio A. Azolla-Anabaena as a biofertilizer for rice paddy fields in the Po Valley, a temperate rice area in Northern Italy. *International Journal of Agronomy*. 2010;2010:1-5.
 26. Fleming H, Haselkorn R. Differentiation in *Nostoc muscorum*: nitrogenase is synthesized in heterocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973;70(10):2727-31.
 27. Nahas E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1996;12(6):567-72.
 28. Stephen J, Shabanamol S, Rishad KS, Jisha MS. Growth enhancement of rice (*Oryza sativa*) by phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp.(MTCC 8368) and *Burkholderia* sp.(MTCC 8369) under greenhouse conditions. *3 Biotech*. 2015;5(5):831-7.
 29. Buntić AV, Stajković-Srbinović OS, Knežević MM, Kuzmanović ĐŽ, Rasulić NV, Delić DI. Development of liquid rhizobial inoculants and pre-inoculation of alfalfa seeds. *Archives of Biological Sciences*. 2019;71(2):379-87.
 30. Daur I, Saad MM, Eida AA, Ahmad S, Shah ZH, Ihsan MZ, et al. Boosting alfalfa (*Medicago sativa* L.) production with rhizobacteria from various plants in Saudi Arabia. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:477.
 31. Lemes RL, Soares Filho CV, Neto MG, Heinrichs R. Biofertilizer in the nutritional quality of alfalfa *Medicago sativa* L.). *Semina: Ciências Agrárias*. 2016;37(3):1441-50.

32. Elsheikh AEE, Elnesairy NN, Mahdi AA. Effect of Sinorhizobium inoculation and chicken manure on nodulation and forage yield of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) under irrigation in a semi-arid environment. University of Khartoum J. Agric. Sci. 2006;14(2):182-97.
33. Khan MR, Rizvi TF. Nanotechnology: scope and application in plant disease management. Plant Pathol J. 2014;13(3):214-31.
34. Gogos A, Knauer K, Bucheli TD. Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. Journal of agricultural and food chemistry. 2012;60(39):9781-92.
35. Dahoumane SA, Jeffryes C, Mechouet M, Agathos SN. Biosynthesis of inorganic nanoparticles: A fresh look at the control of shape, size and composition. Bioengineering. 2017;4(1):14.
36. Panpatte DG, Jhala YK, Shelat HN, Vyas RV. Nanoparticles: the next generation technology for sustainable agriculture. In: Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity. Springer; 2016. p. 289-300.
37. Khodakovskaya MV, De Silva K, Biris AS, Dervishi E, Villagarcia H. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS nano. 2012;6(3):2128-35.
38. Ma Y, Kuang L, He X, Bai W, Ding Y, Zhang Z, et al. Effects of rare earth oxide nanoparticles on root elongation of plants. Chemosphere. 2010;78(3):273-9.
39. Yang H, Xu M, Koide RT, Liu Q, Dai Y, Liu L, et al. Effects of ditch-buried straw return on water percolation, nitrogen leaching and crop yields in a rice–wheat rotation system. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2016;96(4):1141-9.
40. Monreal CM, DeRosa M, Mallubhotla SC, Bindraban PS, Dimkpa C. Nanotechnologies for increasing the crop use efficiency of fertilizer-micronutrients. Biology and fertility of soils. 2016;52(3):423-37.
41. Peteu SF, Oancea F, Siciua OA, Constantinescu F, Dinu S. Responsive polymers for crop protection. Polymers. 2010;2(3):229-51.
42. Ali S, Rizwan M, Noureen S, Anwar S, Ali B, Naveed M, et al. Combined use of biochar and zinc oxide nanoparticle foliar spray improved the plant growth and decreased the cadmium accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) plant. Environmental Science and Pollution Research. 2019;26(11):11288-99.

43. Asl KR, Hosseini B, Sharafi A, Palazon J. Influence of nano-zinc oxide on tropane alkaloid production, h6h gene transcription and antioxidant enzyme activity in *Hyoscyamus reticulatus* L. hairy roots. *Engineering in Life Sciences*. 2019;19(1):73-89.
44. Taherian M, Bostani A, Omid H. Boron and pigment content in alfalfa affected by nano fertilization under calcareous conditions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2019;53:136-43.
45. El-Sharkawy MS, El-Beshbeshy TR, Mahmoud EK, Abdelkader NI, Al-Shal RM, Missaoui AM. Response of alfalfa under salt stress to the application of potassium sulfate nanoparticles. *American Journal of Plant Sciences*. 2017;8(8):1751-73.
46. de la Rosa G, López-Moreno ML, de Haro D, Botez CE, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL. Effects of ZnO nanoparticles in alfalfa, tomato, and cucumber at the germination stage: root development and X-ray absorption spectroscopy studies. *Pure and Applied Chemistry*. 2013;85(12):2161-74.
47. Gardea-Torresdey JL, Parsons JG, Gomez E, Peralta-Videa J, Troiani HE, Santiago P, et al. Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano letters*. 2002;2(4):397-401.
48. Gardea-Torresdey JL, Gomez E, Peralta-Videa JR, Parsons JG, Troiani H, Jose-Yacaman M. Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*. 2003;19(4):1357-61.