



APORTES DE LAS TÉCNICAS ISOTÓPICAS DE ^{15}N A LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN MÉXICO

CONTRIBUTIONS OF ^{15}N ISOTOPIC TECHNIQUES TO BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN MEXICO

José Antonio Vera-Núñez¹, Claudia Geraldine León-Ramírez², Eulogio de la Cruz-Torres³ y Oscar Arath Grageda-Cabrera^{4*}

¹Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Irapuato, Guanajuato, México. ²Cinvestav-IPN, Departamento de Ingeniería Genética, Irapuato, Guanajuato, México. ³Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Departamento de Biología, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México. ⁴Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío, Celaya, Guanajuato, México.

*Autor de correspondencia (grageda.oscar@inifap.gob.mx)

RESUMEN

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso esencial en la agricultura, ya que permite que ciertos microorganismos conviertan el nitrógeno atmosférico (N_2) en formas asimilables por las plantas. Este mecanismo es clave para reducir la dependencia de fertilizantes nitrogenados sintéticos, cuya producción y uso contribuyen significativamente a la contaminación del aire y el agua. Las técnicas isotópicas basadas en ^{15}N han sido fundamentales para evaluar con precisión la contribución del N derivado de la atmósfera (Nd_a) en diferentes sistemas agrícolas. Estas metodologías han permitido estimar la eficiencia de la FBN en diversas especies vegetales, así como identificar factores que influyen en este proceso, como el tipo de cultivo, la biodiversidad microbiana, las condiciones ambientales y las prácticas de manejo agrícola. En México, el estudio de la FBN ha sido relevante para optimizar la producción de cultivos estratégicos, como el frijol, permitiendo estimar con precisión la cantidad de N_2 biológicamente fijado y comprender los efectos de factores ambientales sobre este proceso. Además, estas técnicas han sido fundamentales para evaluar el comportamiento de cepas de *Rhizobium* y otros microorganismos diazotróficos en distintas condiciones. El estudio y evaluación de microorganismos fijadores de N ha generado bases científicas para el desarrollo de biofertilizantes, como estrategia para mejorar la productividad agrícola en México y el mundo. La experiencia generada en México en este campo destaca el potencial de estas metodologías para promover una agricultura más eficiente y sostenible. Este trabajo analiza y sintetiza la contribución de las técnicas isotópicas de ^{15}N en la evaluación de la FBN en México, con énfasis en los avances metodológicos y su aplicación en cultivos estratégicos y microorganismos fijadores.

Palabras clave: Biofertilizantes, diazótrofos, eficiencia, *Rhizobium*.

SUMMARY

Biological nitrogen fixation (BNF) is an essential process in agriculture, as it allows certain microorganisms to convert atmospheric nitrogen (N) into forms that plants can assimilate. This mechanism is key to reducing dependence on synthetic nitrogen fertilizers, whose production and use contribute significantly to air and water pollution. Isotopic techniques based on ^{15}N have been fundamental for accurately assessing the contribution of nitrogen derived from the atmosphere (Nd_a) in different agricultural systems. These methodologies have made it possible to estimate the efficiency of BNF in various plant species, as well as to identify factors that influence this process, such as crop type, microbial biodiversity, environmental conditions,

and agricultural management practices. In Mexico, the study of BNF has been important for optimizing the production of strategic crops such as beans, allowing for the precise estimation of the amount of biologically fixed N and an understanding of the effects of environmental factors on this process. Furthermore, these techniques have been essential for evaluating the behavior of *Rhizobium* strains and other nitrogen-fixing microorganisms under different conditions. The study and evaluation of N-fixing microorganisms have provided a scientific basis for the development of biofertilizers as a strategy to improve agricultural productivity in Mexico and around the world. The experience gained in Mexico in this field highlights the potential of these methodologies to promote more efficient and sustainable agriculture. This paper analyzes and synthesizes the contribution of ^{15}N isotopic techniques to the evaluation of biological nitrogen fixation (BNF) in Mexico, with an emphasis on methodological advances and their application to strategic crops and nitrogen-fixing microorganisms.

Index words: Biofertilizers, diazotrophs, efficiency, *Rhizobium*.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la baja disponibilidad de N representa el principal factor limitante de los cultivos en los sistemas agrícolas modernos. Aproximadamente, el 50 % de la población humana depende de alimentos producidos mediante fertilizantes N sintéticos a través del proceso Haber-Bosch, el cual convierte el N_2 en amonio (NH_4^+) (Penuelas *et al.*, 2023). Los fertilizantes N coadyuvan a la producción y seguridad alimentaria global pero también contribuyen a la contaminación del aire y del agua, así como al cambio climático. En la rizósfera de los cultivos, los microorganismos desempeñan funciones esenciales en el crecimiento y la sanidad de las plantas, influenciadas por el carbono excretado y la disponibilidad de nutrientes limitantes en el suelo, como el fósforo; ambos factores restringen la colonización microbiana (Yunpeng *et al.*, 2024). Las rizobacterias benéficas tienen el potencial de ser desarrolladas como biofertilizantes o bioinoculantes, para sostener el desarrollo agrícola a

través de diversos mecanismos, destacando, desde el enfoque nutrimental, la fijación biológica del N (FBN) y la solubilización de nutrimentos (Fanai *et al.*, 2024; Grageda-Cabrera *et al.*, 2012). La FBN en cultivos de leguminosas y no leguminosas es un servicio ecosistémico que mejora la disponibilidad de N del suelo y reduce la necesidad de fertilizantes N sintéticos (Koch y Sessitsch, 2024). Complementariamente, los avances metodológicos e instrumentales de las técnicas isotópicas de ^{15}N , uno de los dos isótopos estables del nitrógeno (^{14}N : 99.634 % y ^{15}N : 0.366 % de abundancia natural) (Coplen *et al.*, 2002) han sido fundamentales para evaluar la eficiencia en el uso de fertilizantes N (Grageda-Cabrera *et al.*, 2018) y la cantidad de N derivado de la atmósfera (Ndda) fijado por los cultivos, permitiendo analizar el impacto de factores como las especies vegetales, el clima y la fertilización nitrogenada en los sistemas agrícolas (Grageda-Cabrera *et al.*, 2011; Grageda-Cabrera *et al.*, 2003; Vera-Núñez *et al.*, 1999).

La FBN cuantificada mediante técnicas isotópicas de ^{15}N ha permitido estimar que la proporción de Ndda en leguminosas varía entre 5 y 99 %, con un promedio del 68 %. Comparativamente, las leguminosas forrajeras presentan valores elevados de FBN, con promedios de hasta 75 % de Ndda, mientras que las leguminosas de grano muestran mayor variabilidad, con rangos de 38 a 85 %, dependiendo de la especie y de las condiciones climáticas (Ghafoor *et al.*, 2024; Peña-Cabriaes y Grageda-Cabrera, 1997). Cálculos globales han estimado que la FBN aporta aproximadamente 300 Tg N año⁻¹ a la biosfera (Fowler *et al.*, 2015). En conjunto, estos antecedentes evidencian la alta variabilidad del Ndda y la complejidad del proceso de FBN, determinado por factores como las características de la especie vegetal, las condiciones ecológicas y la competencia en los sistemas de cultivo. Estos descubrimientos enfatizan el potencial de la FBN para la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, al mejorar la disponibilidad de N y reducir la dependencia de fertilizantes N sintéticos y, en particular, la susceptibilidad a los desafíos del cambio climático, como la sequía y su interacción con la fertilización N complementaria para no inhibir el proceso de FBN. En México, la aplicación de estas metodologías ha permitido analizar esta variabilidad en condiciones ambientales contrastantes, especialmente en cultivos de leguminosas, donde se ha evaluado la influencia de factores como el estrés hídrico, la fertilidad del suelo y la interacción planta-microorganismo sobre la eficiencia de la FBN. En este contexto, el presente trabajo examina los aportes realizados en México en el estudio de la FBN mediante técnicas isotópicas de ^{15}N , diferenciándolos del marco conceptual y metodológico establecido a nivel internacional, a partir de trabajos publicados desde la década de 1980 hasta la actualidad.

Ecología de *Rhizobium* y su estudio en México

A partir de los trabajos de investigación sobre la FBN en pastos tropicales *Paspalum notatum* con *Azotobacter paspali* desarrollados por Döbereiner (1966), Döbereiner y Campelo (1971) y Döbereiner *et al.* (1972) y con base a la propuesta de Hardy y Holsten (1973) sobre la FBN "no-simbiótica", Peña-Cabriaes y Döbereiner (1974) demostraron el efecto negativo del nitrato y amonio sobre la actividad de la enzima nitrogenasa durante la reducción del N_2 a amonio en *Azotobacter* y *Beijerinckia*. Dichos hallazgos marcaron el inicio de los estudios sobre la ecología de la FBN en frijol mediada por la nodulación de *Rhizobium*. En este contexto, la supervivencia de *Rhizobium* en suelos sometidos a desecación depende de la dinámica hídrica del suelo. En *Rhizobium japonicum* se observó que la disminución del contenido de humedad del suelo redujo progresivamente la viabilidad bacteriana, evidenciando la influencia del estrés hídrico sobre la supervivencia de este microorganismo (Peña-Cabriaes y Alexander, 1979). Los *Rhizobium* que proliferaron en el suelo mostraron una supervivencia mayor en comparación con aquellos que crecieron en medio de cultivo y posteriormente se agregaron al suelo. Las cepas de *R. japonicum* y *R. phaseoli* crecieron en presencia de semillas en germinación y raíces en desarrollo de caupí, frijol, soya, trébol rojo, avena, trigo y maíz. El tamaño de la población de los *Rhizobium* varió entre las especies de plantas y las leguminosas no fueron más estimulantes en comparación con los cereales (Peña-Cabriaes y Alexander, 1983). Poblaciones pequeñas de *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. japonicum* y *Rhizobium* nodulante de caupí no crecieron en un suelo franco limoso, pero las poblaciones de los cuatro *Rhizobium* aumentaron al agregar 0.5 ó 1.0 % manitol, mientras que las poblaciones de *R. meliloti* y *R. phaseoli* disminuyeron notablemente después de dos días. La adición al suelo de residuos de hojas de maíz no estimuló a *R. japonicum* o *R. lupini*, pero generó una disminución en la abundancia de *R. meliloti* y *R. trifolii* en comparación con la adición de residuos de alfalfa, que generaron una reducción en las poblaciones de *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. japonicum* y el *Rhizobium* nodulante de caupí. Pero, si el suelo es enmendado con estreptomycin, eritromycin, actidiona y nistatina, antibióticos a los que estos *Rhizobium* eran resistentes, las cuatro cepas proliferaron y el crecimiento de las cepas con antibióticos fue mayor al agregar 0.1 % manitol (Peña-Cabriaes y Alexander, 1983).

La fijación biológica de nitrógeno en frijol

En México, el frijol se cultiva en una amplia diversidad de ambientes edáficos y agroecológicos, lo que ha favorecido una elevada diversidad de cepas nativas de *Rhizobium* asociadas a este cultivo. Se han reportado poblaciones

de hasta 10^5 células g^{-1} de suelo, con predominio de cepas inefectivas, lo que refleja la complejidad de las comunidades microbianas en condiciones naturales. Castellanos *et al.* (1995) demostraron que la efectividad de la inoculación en términos de rendimiento, solamente en el 11 % de los experimentos analizados, superó al testigo sin N ($P < 0.05$). En condiciones de riego en sitios con bajo N disponible en el suelo, la inoculación satisfizo la demanda de N en el 50 % de las localidades, en comparación con los tratamientos fertilizados con N; en temporal, el éxito de la inoculación fue 36 %.

Los trabajos realizados para seleccionar genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) nativos de alta capacidad de FBN demostraron una alta variabilidad en la proporción (5-58 %) de Ndda. Entre los materiales evaluados destacaron Criollo Huejutla, Criollo Negro Querétaro y Wisconsin 21-58, que acumularon un rango de Ndda de 7-108 kg N ha^{-1} (Hardarson *et al.*, 1999); las variedades Bayocel y Flor de Mayo RMC acumularon 147 y 135 kg N ha^{-1} , respectivamente. Las tasas de FBN en las diferentes etapas de crecimiento aumentaron a medida que las plantas se desarrollaron y alcanzaron un máximo durante la etapa reproductiva, tanto en condiciones de campo como de invernadero (Peña-Cabriaes *et al.*, 1993).

Fijación biológica de nitrógeno y estrés hídrico en frijol

El estrés por sequía es uno de los factores más limitantes en la productividad del frijol, especialmente durante la fase reproductiva del cultivo. En condiciones óptimas de humedad, el cultivar Bayocel logró fijar 85 kg Ndda ha^{-1} , mientras que Flor de Mayo Bajío acumuló 33 kg Ndda ha^{-1} . No obstante, cuando el estrés hídrico ocurrió durante la etapa reproductiva, la FBN se redujo significativamente, alcanzando solo 9 kg Ndda ha^{-1} en Bayocel y 6 kg Ndda ha^{-1} en Flor de Mayo Bajío. El impacto del déficit hídrico fue más pronunciado en la FBN que en el rendimiento de grano. La nodulación se redujo en un 43 % y no mostró recuperación tras el riego, lo que indica un daño irreversible en la simbiosis *Rhizobium*-planta. Además, en condiciones de sequía, la FBN se redujo a una sexta parte respecto al control, mientras que el rendimiento de grano disminuyó solo en un 50 %. Esta diferencia sugiere que el frijol puede mantener parcialmente la producción de biomasa y grano, incluso con una notable reducción en la FBN. Esta capacidad podría atribuirse a la utilización de N disponible en el suelo, a la removilización de N almacenado previamente en los tejidos vegetales o a un ajuste fisiológico que prioriza la asignación de recursos al llenado de grano en condiciones limitantes.

Estos resultados indican que el estrés hídrico afecta de manera diferencial a los cultivares y que la etapa

reproductiva es especialmente vulnerable a esta limitación. La selección de genotipos con mayor tolerancia a la sequía y una FBN más eficiente en condiciones adversas es clave para mejorar la sostenibilidad del cultivo de frijol en regiones propensas a déficits hídricos (Castellanos *et al.*, 1996).

Agronómicamente, la duración del período vegetativo, la producción de materia seca y la cantidad de nitrógeno acumulado hasta la etapa reproductiva R3 mostraron una correlación significativa con la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en frijol. Asimismo, en suelos con bajo N disponible, las variables rendimiento, materia seca final y extracción total de N estuvieron altamente asociadas con la eficiencia de la FBN (Castellanos *et al.*, 1998). En condiciones de temporal, para evaluar la FBN a través de la técnica isotópica de ^{15}N en frijol común, así como la diversidad de aislamientos de *Rhizobium* obtenidos de nódulos de los genotipos de frijol mediante resistencia intrínseca a antibióticos (IAR), Flor de Mayo-M-38, Negro Querétaro y N-3-117 no mostraron variación en FBN y los valores de Ndda oscilaron entre 19 y 26 %. La variabilidad en la eficiencia de la FBN entre los aislamientos nativos fue alta, con diferencias en la capacidad competitiva y en la ocupación nodular entre genotipos de frijol (Vásquez-Arroyo *et al.*, 1998). La técnica del gen 16S rRNA mostró que la mayoría de los aislados pertenecen a la especie *R. etli* y el análisis de IAR mostró una alta diversidad entre los aislados. Tanto *R. etli* como *R. tropici* forman nódulos con capacidad de FBN en frijol común y con la hipótesis que cepas de *R. etli*, con genes adicionales de citrato sintasa provenientes de *R. etli*, pueden expresar una mejor economía de carbono y mayor capacidad de nodulación, como se demostró en el frijol Negro Jamapa. Al evaluar construcciones de citrato sintasa sobre la nodulación en cultivares de frijol seleccionados por su alta capacidad de FBN se observa que la nodulación depende de la interacción entre la cepa de *Rhizobium* y el cultivar de frijol; sin embargo, la diferencia en la nodulación no se reflejó en la biomasa de la planta (Martínez-Romero *et al.*, 1998).

Con el objetivo de encontrar mecanismos para el escape a la sequía se seleccionaron cepas nativas de *Rhizobium* y se determinó el contenido de trehalosa. Al respecto, la cantidad de trehalosa varió con el cultivar en el intervalo 0.20-1.63 mg g^{-1} peso seco de nódulo. La concentración de trehalosa en los nódulos se redujo entre dos y seis veces en comparación con las plantas control no estresadas. Después de la reinfección cruzada axénica se registraron aumentos de hasta 48 veces en el contenido de trehalosa en los nódulos durante el estrés por sequía. También, en respuesta al estrés por sequía en estos nódulos se obtuvo un alto contenido relativo de agua en las hojas y fueron los más resistentes (Farías-Rodríguez *et al.*, 1998). Por otro

lado, Jiménez-Zacarías *et al.* (2004) midieron la actividad nitrogenasa y la acumulación de trehalosa en frijol nodulado expuestos a la sequía. Las plantas fueron inoculadas con la cepa efectiva *Rhizobium* sp. NGR234 (Fix⁺), con su derivado inefectivo NGRQfixF (Fix⁻) o con cepas nativas de *Rhizobium* con alta producción de trehalosa. El contenido de trehalosa aumentó significativamente mientras la actividad de reducción de acetileno (ARA) disminuyó en los nódulos de plantas expuestas a la sequía. Sin embargo, la ARA disminuyó a un ritmo más lento en los nódulos con alto nivel de trehalosa. La mayor acumulación de trehalosa se observó en los nódulos de plantas infectadas con cepas nativas de *Rhizobium*, alcanzando 16 mg g⁻¹ de peso seco. Estas plantas también presentaron el mayor contenido relativo de agua (65 %), en contraste con aquellas infectadas con la cepa NGRUfixF, cuyo contenido relativo de agua fue significativamente menor (56 %). Estos resultados sugieren que la trehalosa acumulada en los nódulos desempeña un papel protector sobre la actividad de reducción de acetileno (ARA) bacteriana en condiciones de sequía y que, tanto la acumulación de trehalosa como la fijación biológica de nitrógeno (FBN), contribuyen a mejorar la tolerancia del frijol al estrés hídrico (Jiménez-Zacarías *et al.*, 2004).

Recientemente, para entender mejor el papel del gen CRK12 (quinasas similares a receptores ricos en cisteína) y RLK (quinasas similares a receptores importantes para la resistencia a los patógenos) en la interacción simbiótica *P. vulgaris*-*Rhizobium*, se caracterizó funcionalmente a CRK12 sobreexpresándolo (CRK12-OE) y silenciándolo (CRK12-RNAi) en un sistema de raíces pilosas de *P. vulgaris*. La expresión constitutiva de CRK12 condujo a un aumento en la longitud de los pelos radicales y la expresión de los genes reguladores de los pelos radiculares, mientras que el silenciamiento del gen tuvo el efecto opuesto. Durante la simbiosis, CRK12-RNAi resultó en una reducción significativa en el número de nódulos, mientras que las raíces CRK12-OE mostraron un notable incremento, tanto en los hilos de infección por *Rhizobium* como en la formación de nódulos. Las secciones transversales de los nódulos revelaron que los nódulos silenciados tenían muy pocas células infectadas, mientras que los nódulos CRK12-OE tenían células infectadas agrandadas, cuyo número había aumentado en comparación con los controles. El CRK12-RNAi afectó negativamente la FBN, mientras que los nódulos CRK12-OE fijaron 1.5 veces más N₂ que los controles. Además, la senescencia de los nódulos se prolongó en las raíces con sobreexpresión de CRK12. Estos resultados sugieren que CRK12, un RLK de membrana, es un regulador de la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* (Lecona *et al.*, 2023). Estos resultados representan la base para desarrollar una

estrategia para entender y mejorar la fijación biológica de N₂ en el frijol común en condiciones limitantes de humedad en el suelo.

La fijación biológica de nitrógeno en leguminosas tropicales asociadas a maíz

El uso de leguminosas en sistemas agrícolas del trópico húmedo representa una alternativa viable para enriquecer suelos considerados infértiles o marginales, mediante la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Diversos estudios han evaluado la capacidad de distintas especies leguminosas para fijar N₂ y su potencial para mejorar la fertilidad del suelo y la productividad agrícola. Vera-Núñez *et al.* (2007) evaluaron la FBN en leguminosas herbáceas cultivadas en simbiosis, en condiciones de suelos ácidos enmendados con fósforo mediante la técnica de dilución isotópica de ^{15}N . Los resultados indicaron que la aplicación de 80 kg P₂O₅ ha⁻¹ promovió significativamente la nodulación y la acumulación de biomasa. En particular, *Cajanus cajan* y *Canavalia ensiformis* destacaron por su buen desempeño, registrando 758 y 500 mg de peso seco de nódulos por planta, respectivamente, con una producción de 49 y 56 nódulos por planta en la etapa de floración. Además, estas especies lograron fijar 170 y 366 kg N ha⁻¹ ciclo⁻¹, respectivamente, mostrando su potencial como cultivos de cobertura o abonos verdes.

Por su parte, Peña-Cabriales *et al.* (2012) reportaron que *Mucuna deeringiana* mostró el mayor rendimiento en producción de biomasa fresca (17.50 t ha⁻¹) y seca (5.47 t ha⁻¹), además de la mayor contribución de N derivado de la atmósfera (522.11 kg N₂ ha⁻¹), superando a *Cajanus cajan*, *Phaseolus lunatus* y *Sesbania emerus*. En un estudio complementario, Córdova-Sánchez *et al.* (2011) evaluaron la FBN y la eficiencia de absorción de N en cultivos de maíz asociados o en rotación con *C. cajan*, *C. ensiformis* y *M. deeringiana*. Los resultados indicaron que, en ambas modalidades, *C. cajan* produjo entre 66 y 121 nódulos por planta, *C. ensiformis* entre 38 y 80 y *M. deeringiana* entre 45 y 78. La acumulación de biomasa seca fue de 5.78, 7.04 y 5.28 t ha⁻¹, respectivamente.

En términos de FBN, la asociación de leguminosas con maíz resultó en un aporte significativamente mayor de N₂ (135 kg N ha⁻¹) en comparación con los sistemas en rotación, que apenas alcanzaron 2 kg N ha⁻¹. Sin embargo, este incremento en la FBN no se tradujo en un aumento proporcional del rendimiento de grano, el cual varió entre 580 y 642 kg ha⁻¹. Estos resultados destacan que, si bien las leguminosas tropicales pueden ser una fuente relevante de N en suelos ácidos, su impacto en la productividad del maíz está condicionado por diversos factores. Entre ellos,

la eficiencia en la absorción del N₂, la competencia por recursos y las condiciones ambientales desfavorables juegan un papel determinante, indicando la necesidad de un manejo agronómico adecuado para maximizar los beneficios de esta interacción.

Caracterización molecular y funcional de diazótrofos asociados a plantas

La implementación de la técnica isotópica de ¹⁵N₂, complementada con otros indicadores de la FBN, como la actividad de reducción de acetileno (ARA) y herramientas de biología molecular, ha sido clave para identificar y caracterizar sistemas microbianos involucrados en la fijación de N₂. Valdés *et al.* (2005) emplearon secuencias parciales del gen 16S para describir un nuevo grupo de actinomicetos no simbióticos con actividad ARA positiva, los cuales fueron aislados de raíces superficialmente esterilizadas de *Casuarina equisetifolia* en México. El análisis de restricción de ARNr amplificado confirmó que estos actinomicetos eran distintos de *Frankia*, un hallazgo que fue posteriormente corroborado mediante análisis filogenético del gen ARNr 16S en dos aislados mexicanos. Además, la baja homología ADN-ADN observada reforzó la evidencia de que estos actinomicetos pertenecen a un grupo diferente de *Frankia*. Los aislados mexicanos demostraron potencial diazotrófico no solo por su capacidad de crecer en medios libres de nitrógeno y su actividad ARA, sino también por los resultados del análisis de asimilación del isótopo ¹⁵N₂ y la amplificación por PCR del gen *nifH*. Este último descubrimiento fue clave para confirmar su capacidad fijadora de N₂.

El análisis comparativo de las secuencias del gen *nifH* reveló que los aislados estudiados presentan una estrecha relación filogenética con el gen *nifH* de *Frankia*, con una similitud que oscila entre el 84 % y el 98 %, dependiendo del grupo de especificidad del hospedero. Este resultado sugiere que, aunque filogenéticamente relacionados, estos aislados pertenecen a un grupo microbiano distinto. Posteriormente, el análisis de las secuencias completas del ARNr 16S confirmó que las dos cepas evaluadas corresponden a actinomicetos no pertenecientes al género *Frankia*, consolidando así la identificación de este nuevo grupo microbiano fijador de N₂.

Por otro lado, Martínez-Aguilar *et al.* (2008) emplearon electroforesis en gel de campo pulsado y experimentos de hibridación del ARNr 16S para caracterizar nuevas especies de *Burkholderia* asociadas a plantas. Estos estudios revelaron que estas especies presentan estructuras genómicas multicromosómicas y genomas de gran tamaño, que varían entre 6.46 y 8.73 Mb, una característica distintiva dentro del género. El análisis filogenético del

gen *nifH*, empleado para establecer relaciones evolutivas entre diazótrofos, mostró que estas nuevas especies de *Burkholderia* forman grupos compactos claramente diferenciados de otros microorganismos fijadores de N₂. Adicionalmente, los ensayos de asimilación del isótopo ¹⁵N₂ confirmaron que estas cepas poseen una capacidad diazotrófica inequívoca, lo que evidencia su potencial para fijar N₂ en asociación con plantas. Estos resultados amplían el conocimiento sobre la diversidad microbiana capaz de realizar FBN y su posible aplicación en sistemas agrícolas sostenibles.

Ruíz-Herrera *et al.* (2015) observaron que el hongo patógeno del maíz *Ustilago maydis* creció en medios libres de N a una velocidad similar a la observada en medios que contenían nitrato y amonio, lo que sugirió que *U. maydis* era capaz de fijar N₂ atmosférico. Debido a que solo los organismos procariotes tienen la capacidad de reducir el N₂, consideraron la posibilidad de que *U. maydis* estuviera asociada con una bacteria intracelular. Para demostrar lo anterior se analizó la presencia de la enzima nitrogenasa en el hongo mediante la técnica de ARA y la capacidad de fijar N₂ mediante el uso del isótopo ¹⁵N₂. La presencia de una bacteria intracelular fijadora de N₂ se analizó mediante la amplificación de los genes bacterianos 16S rRNA y *nifH* por PCR y mediante observaciones microscópicas. La ARA y la incorporación del isótopo ¹⁵N₂ a las células demostraron que *U. maydis* fija N₂. Los experimentos de microscopía óptica y electrónica y de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) revelaron la presencia de bacterias intracelulares relacionadas con *Bacillus pumilus*, como se evidenció por la secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR. Con las observaciones de Ruíz-Herrera *et al.* (2015), Pérez-Rodríguez *et al.* (2020) mencionan que no está claro si otras cepas *U. maydis* aisladas de la naturaleza también albergan bacterias endosimbióticas y si éstas fijan N₂ para su huésped. Ellos aislaron cepas de *U. maydis* de maíz infectado naturalmente y todas las cepas aisladas albergaban bacterias intracelulares, según se determinó mediante la amplificación por PCR del gen 16S rRNA y algunas de ellas mostraron capacidad para fijar N₂. La naturaleza endosimbiótica de estas bacterias se confirmó mediante tratamientos exhaustivos con CuSO₄, seguidos de incubaciones seriadas con antibióticos. A pesar de estos procedimientos, la amplificación del gen bacteriano previamente identificado persistió en los hongos tratados. El resultado respalda la hipótesis de que la endosimbiosis entre *U. maydis* y bacterias es un fenómeno característico y generalizado en esta especie.

CONCLUSIONES

La FBN evaluada mediante técnicas isotópicas de ¹⁵N constituye una herramienta fundamental para comprender,

cuantificar y mejorar el aporte natural de N en los sistemas agrícolas mexicanos. Estos avances han permitido estimar con precisión la contribución del N_{dda} en diferentes especies y ambientes agroecológicos, así como identificar factores ambientales, genéticos y de manejo que influyen en su eficiencia.

En frijol se ha identificado alta variabilidad genética en su capacidad para fijar N₂, así como una influencia significativa del estrés hídrico y de la diversidad microbiana en la eficiencia de este proceso simbiótico. En leguminosas tropicales asociadas a maíz, el uso de cultivos de cobertura o abonos verdes destaca para la rehabilitación de suelos marginales, considerando que el éxito depende de la adecuada selección de especies, el manejo agronómico y las condiciones del entorno. La identificación de nuevos diazotófos, incluidos actinomicetos no pertenecientes al género *Frankia*, especies de *Burkholderia* y bacterias endosimbióticas asociadas a hongos fitopatógenos, amplía el conocimiento de la FBN al incorporar rutas simbióticas y no simbióticas antes no documentadas, con implicaciones en el diseño de biofertilizantes específicos y eficientes.

El uso de técnicas isotópicas de ^{15}N es clave para apoyar estrategias de manejo sostenible que reduzcan la dependencia de fertilizantes N sintéticos, disminuyan la contaminación ambiental y enfrenten los desafíos del cambio climático en la agricultura mexicana. La experiencia mexicana en el uso de estas técnicas ha contribuido al conocimiento y aplicación de la FBN en sistemas agrícolas. La promoción de proyectos interdisciplinarios y el aprovechamiento de tecnologías disponibles pueden contribuir a este objetivo, atendiendo prioridades como la reducción de la contaminación, la mejora de la fertilidad del suelo y el uso eficiente de recursos.

BIBLIOGRAFÍA

- Castellanos J. Z., J. J. Peña-Cabriaes and J. A. Acosta-Gallegos (1996) ^{15}N -determined dinitrogen fixation capacity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars under water stress. *Journal of Agricultural Science* 126:327-333, <https://doi.org/10.1017/S0021859600074888>
- Castellanos J. Z., J. J. Peña-Cabriaes e I. Rojas-Martínez (1995) Análisis retrospectivo del uso de inoculantes con cepas élite en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Turrialba* 45:89-99.
- Castellanos J. Z., J. J. Peña-Cabriaes, V. Badillo, A. Aguilar Santelises, J. A. Acosta Gallegos y A. Rodríguez Guillén (1998) Características agronómicas del frijol asociadas a la capacidad de fijación de N₂ en el centro de México. *TERRA Latinoamericana* 16:351-357.
- Coplen T. B., J. K. Böhlke, P. De Bièvre, T. Ding, N. E. Holden, J. A. Hopple and Y. K. Xiao (2002) Isotope-abundance variations of selected elements (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 74:1987-2017, <https://doi.org/10.1351/pac200274101987>
- Córdova-Sánchez S., M. Castelán-Estrada, S. Salgado-García, J. D. Palma-López, J. A. Vera-Núñez, J. J. Peña-Cabriaes, L. C. Lagunes-Espinoza y R. Cárdenas-Navarro (2011) Fijación biológica de nitrógeno por tres fabáceas (Leguminosae) en suelos ácidos de Tabasco, México. *Avances en Investigación Agropecuaria* 15:31-50.
- Döbereiner J. (1966) *Azotobacter paspali* sp. Nov. uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de Paspalum. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 1:357-365.
- Döbereiner J. y A. B. Campelo (1971) Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soils. *Plant and Soil* Special volume:457-470, <https://doi.org/10.1007/bf02661871>
- Döbereiner J., J. M. Day and P. J. Dart (1972) Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association. *Journal of General Microbiology* 1:103-116.
- Fanai A., B. Bohi, F. Lalremruati, N. Lalhriatpui, L. Lalrokimi, R. Lalmuanpuui, P. Kumar Singh and Zothanpuia (2024) Plant growth promoting bacteria (PGPB)-induced plant adaptations to stresses: an updated review. *PeerJ* 12:e17882, <https://doi.org/10.7717/peerj.17882>
- Fariás-Rodríguez R., R. B. Mellor, C. Arias and J. J. Peña-Cabriaes (1998) The accumulation of trehalose in nodules of several common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiologia Plantarum* 102:353-359, <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1020303.x>
- Fowler D., C. E. Steadman, D. Stevenson, M. Coyle, R. M. Rees, U. M. Skiba, ... and J. N. Galloway (2015) Effects of global change during the 21st century on the nitrogen cycle. *Atmospheric Chemistry and Physics* 15:13849-13893, <https://doi.org/10.5194/acp-15-13849-2015>
- Ghafoor A. Z., H. H. Javed, H. Karim, M. Studnicki, I. Ali, H. Yue, P. Xiao, M. A. Asghar, C. Brock and Y. Wu (2024) Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture development under climate change—New insights from a meta-analysis. *Journal of Agronomy and Crop Science* 210:e12754, <https://doi.org/10.1111/jac.12754>
- Grageda-Cabrera O. A., A. Díaz-Franco, J. J. Peña-Cabriaes y J. A. Vera-Núñez (2012) Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 3:1261-1274.
- Grageda-Cabrera O. A., S. S. González-Figueroa, J. A. Vera-Núñez, J. F. Aguirre-Medina y J. J. Peña-Cabriaes (2018) Efecto de los biofertilizantes sobre la asimilación de nitrógeno por el cultivo de trigo. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 9:281-289, <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1071>
- Grageda-Cabrera O. A., J. A. Vera-Núñez, J. L. Aguilar-Acuña, L. Macías-Rodríguez, G. A. Aguado-Santacruz and J. J. Peña-Cabriaes (2011) Fertilizer dynamics in different tillage and crop rotation systems in a Vertisol in Central Mexico. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 89:125-134, <https://doi.org/10.1007/s10705-010-9382-4>
- Grageda-Cabrera O. A., J. A. Vera-Núñez, J. Z. Castellanos y J. J. Peña-Cabriaes (2003) Comparación de métodos para estimar la fijación de N₂ en frijol en condiciones de campo. *TERRA Latinoamericana* 21:65-71.
- Hardarson G., F. A. Bliss, M. R. Cigales-Rivero, R. A. Henson, J. A. Kipe-Nolt, L. Longeri, ... y S. M. Tsai (1999) Variación genotípica en la fijación biológica de nitrógeno en el frijol común. En: Aumento de la fijación biológica de nitrógeno en el frijol común en América Latina. J. J. Peña-Cabriaes y F. Zapata (eds.). Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y Acuerdo Regional de Cooperación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe (ARCAL). IMPROSA. Irapuato, Guanajuato, México. pp: 67-78.
- Hardy R. W. F. and R. D. Holsten (1973) Global nitrogen cycling: Pools, evolution, transformations, transfers, quantitations and research needs. En: *The Aquatic Environment: Microbial Transformations and Water Management*. L. J. Guarraia and R. K. Ballentine (eds.). U.S. Government Printing Office. Washington, D.C., USA. pp:87-137.
- Jiménez-Zacarías J. J., J. Altamirano-Hernández and J. J. Peña-Cabriaes (2004) Nitrogenase activity and trehalose content of nodules of drought-stressed common beans infected with effective (FixC) and ineffective (FixK) rhizobia. *Soil Biology & Biochemistry* 36:1975-1981, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.05.016>
- Koch H. and A. Sessitsch (2024) The microbial-driven nitrogen cycle and its relevance for plant nutrition. *Journal of Experimental Botany* 75:5547-5556, <https://doi.org/10.1093/jxb/erae274>

- Lecona A. M., K. Nanjareddy, M. Lara and M. K. Arthikala (2023) CRK12: A key player in regulating the *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium tropici* symbiotic interaction. *International Journal of Molecular Sciences* 24:11720, <https://doi.org/10.3390/ijms241411720>
- Martínez-Aguilar L., R. Díaz, J. J. Peña-Cabriaes, P. Estrada-de los Santos, M. F. Dunn and J. Caballero-Mellado (2008) Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. *Applied and Environmental Microbiology* 74:4574-4579, <https://doi.org/10.1128/aem.00201-08>
- Martínez-Romero E., I. Hernández-Lucas, J. J. Peña-Cabriaes and J. Z. Castellanos (1998) Symbiotic performance of some modified *Rhizobium etli* strains in assays with *Phaseolus vulgaris* beans that have a high capacity to fix N₂. En: *Molecular Microbial Ecology of the Soil*. G. Hardarson and W. J. Broughton (eds.). Developments in Plant and Soil Sciences 83. Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp:107-116, https://doi.org/10.1007/978-94-017-2321-3_8
- Peña-Cabriaes J. J. and M. Alexander (1983) Growth of *Rhizobium* in unamended soil. *Soil Science Society of America Journal* 47:81-84, <https://doi.org/10.2136/sssaj1983.03615995004700010016x>
- Peña-Cabriaes J. J. and M. Alexander (1983) Growth of *Rhizobium* in soil amended with organic matter. *Soil Science Society of America Journal* 47:241-245, <https://doi.org/10.2136/sssaj1983.03615995004700020013x>
- Peña-Cabriaes J. J. y J. Döbereiner (1974) Efecto del nitrato y amonio en la actividad de la nitrogenasa de bacterias tropicales fijadoras de nitrógeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 16:33-44.
- Peña-Cabriaes J. J. and M. Alexander (1979) Survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. *Soil Science Society of America Journal* 43:962-966, <https://doi.org/10.2136/sssaj1979.03615995004300050030x>
- Peña-Cabriaes J. J. y O. A. Grageda-Cabrera (1997) Dinámica del nitrógeno en el ecosistema agrícola. En: *La Microbiología en México*. J. Ruiz-Herrera (ed.). Instituto Politécnico Nacional (IPN). México. pp:345-366.
- Peña-Cabriaes J. J., O. A. Grageda-Cabrera, V. Kola and G. Hardarson (1993) Time course of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* 152:115-121, <https://doi.org/10.1007/BF00016340>
- Peña-Cabriaes J. J., S. Salgado-García and C. Lobbit-Phillipe (2012) Maize in association and rotation with Fabaceae in acid soil of the Savanna of Huimanguillo, Tabasco, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15:665-677.
- Penuelas J., F. Coello and J. A. Sardans (2023) A better use of fertilizers is needed for global food security and environmental sustainability. *Agriculture & Food Security* 12:5, <https://doi.org/10.1186/s40066-023-00409-5>
- Pérez-Rodríguez F., J. M. González-Prieto, J. A. Vera-Núñez, R. Ruiz-Medrano, J. J. Peña-Cabriaes and J. Ruiz-Herrera (2020) Wide distribution of the *Ustilago maydis*-bacterium endosymbiosis in naturally infected maize plants. *Plant Signaling & Behavior* 16: 1855016, <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1855016>
- Ruiz-Herrera J., C. León-Ramírez, J. A. Vera-Núñez, A. Sánchez-Arreguín, R. Ruiz-Medrano, H. Salgado-Lugo, L. Sanchez-Segura and J. J. Peña-Cabriaes (2015) A novel intracellular nitrogen-fixing symbiosis made by *Ustilago maydis* and *Bacillus* spp. *New Phytologist* 207:769-777, <https://doi.org/10.1111/nph.13359>
- Valdés M., N. O. Pérez, P. Estrada-de Los Santos, J. Caballero-Mellado, J. J. Peña-Cabriaes, P. Normand and A. M. Hirsch (2005) Non-Frankia actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Applied and environmental microbiology* 71:460-466, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.460-466.2005>
- Vásquez-Arroyo J., A. Sessitsch, E. Martínez and J. J. Peña-Cabriaes (1998) Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* 204:147-154, <https://doi.org/10.1023/A:1004399531966>
- Vera-Núñez J. A., J. P. Infante-Santiago, V. Velasco-Velasco, S. Salgado-García, D. J. Palma-López, O. A. Grageda-Cabrera, R. Cárdenas-Navarro and J. J. Peña-Cabriaes (2007) Influence of P fertilization on biological nitrogen fixation in herbaceous legumes grown in acid savannah soils from the Tabasco state, Mexico. *Journal of Sustainable Agriculture* 31:27-42, https://doi.org/10.1300/J064v31n03_04
- Vera-Núñez J. A., O. A. Grageda-Cabrera y J. J. Peña-Cabriaes (1999) Metodologías para evaluar la fijación biológica de nitrógeno. Pp. 59-67. In: *La fijación biológica de nitrógeno en América Latina*. Arreglos Regionales de Cooperación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe (ARCAL). Peña-Cabriaes, J. J. (ed.). IMPROSA. Irapuato, Guanajuato, México.
- Yunpeng L., X. Zhihui, C. Lin, X. Weibing, S. Xia, C. Yu, S. Xinli, W. Zhengqi, R. Yi, S. Qirong and Z. Ruifu (2024) Root colonization by beneficial rhizobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 48:1-20, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad066>

