



Fijación Biológica de Nitrógeno en Maíz de la Raza Nativa Olotón y su aprovechamiento en México

Antonio Turrent Fernández • Aarón
Martínez Gutiérrez • José Luis Aguirre
Noyola • Orlando Catalán Barrera •
Esperanza Martínez Romero • Mónica
Rosenblueth • Ronald Ferrera-Cerrato •
Alejandro Alarcón • David Barkin



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Título de la obra:

Fijación biológica de nitrógeno en maíz de la raza nativa Olotón y su aprovechamiento en México

© 1a Edición, 2025

Edición original por:

INIFAP Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Autores:

Antonio Turrent Fernández¹

Aarón Martínez Gutiérrez²

José Luis Aguirre Noyola³

Orlando Catalán Barrera⁴

Esperanza Martínez Romero⁵

Mónica Rosenblueth⁵

Ronald Ferrera-Cerrato⁴

Alejandro Alarcón⁴

David Barkin⁶

Propiedad de:

INIFAP Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Av. Progreso Núm. 5, Col. Barrio de Santa Catarina, Del. Coyoacán, C.P. 04010, CDMX.

Diseño de interiores y portada:

Claudia Brenda Camacho López

ISBN: En trámite.

© Reservados todos los derechos. No se permite la reproducción, total o parcial de este libro ni el almacenamiento en un sistema informático, ni la transmisión de cualquier forma o cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia, registro u otros medios sin el permiso previo y por escrito de los titulares del copyright.

Impreso en México

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. Carretera Los Reyes-Textcoco km 13.5, Coatlinchán Mpio. Textcoco, Edo. de México. turrent.antonio@inifap.gob.mx, tel. 55 38718700 ext. 3853.

² Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO)/ Tecnológico Nacional de México (TecNM). Ex hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. C.P. 71233. aaron.mg@voaxaca.tecnm.mx

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Recursos Genéticos. Av. Boulevard de la Biodiversidad 400, Tepatitlán de Morelos 47600, Jalisco, México. aguirre.jose@inifap.gob.mx

⁴ Posgrado de Edafología. Colegio de Postgraduados. Carretera México-Textcoco km 36.5, Montecillo 56264, Textcoco, Estado de México. México. rferreracerrato@gmail.com; aalarconcp@gmail.com; orlandocatalan1@hotmail.com.

⁵ Universidad Autónoma de México, Centro de Ciencias Genómicas. Av. Universidad s/n, Col. Chamilpa, Cuernavaca 62210, Morelos, México. emartine@ccg.unam.mx.

⁶ Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud, Coyoacán 04960, CDMX, México, barkin@correo.xoc.uam.mx



Índice



5	Lista de cuadros
7	Lista de figuras
9	Prólogo
15	Agradecimientos
17	CAPÍTULO 1. Antecedentes
25	CAPÍTULO 2. Introducción
33	CAPÍTULO 3. Materiales y métodos
35	Hipótesis
35	Objetivo general
36	Objetivos específicos
36	Planteamiento experimental
36	1. Descripción varietal.
37	2. Estudio de la microbiota diazotrófica aislada del mucílago de raíces adventicias aéreas y de grupos microbianos funcionales asociados a la rizósfera del maíz Olotón.
40	3. Estudio de la interacción entre el carácter FBNMO y el uso de fertilizantes inorgánicos, estiércol y cal agrícola.
42	4. Estudiar la herencia del carácter FBNMO y su transferencia a otras variedades nativas y variedades mejoradas genéticamente.
43	5. Uso de bioinoculantes experimentales procedentes del mucílago de plantas de maíz cultivadas durante los ciclos PV 2022 y PV 2023 en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca.
47	6. Efecto de la Interacción edafoclimatológica sobre el carácter FBNMO.
48	7. Componente socioeconómico.
49	CAPÍTULO 4. Resultados
51	1. Descripción varietal.
58	2. Estudio de la microbiota diazotrófica aislada del mucílago de raíces adventicias aéreas y de grupos microbianos funcionales asociados a la rizósfera del maíz Olotón.
69	3. Interacción entre el carácter FBNMO y el uso de fertilizantes, estiércol y cal agrícola.
73	4. Estudio de la herencia del carácter FBNMO.
74	5. Uso de bioinoculantes en variedades de maíz nativo de Totontepec Villa de Morelos, y de la localidad San Bernardino Teotitlán de Flores Magón, en el ciclo PV 2024.
76	6. Interacción edafoclimatológica del carácter FBNMO.

•Índice•

77	7. Componente Socioeconómico.
78	8. Día de demostración de campo a productores y a técnicos.
81	CAPÍTULO 5. Discusión
91	CAPÍTULO 6. Conclusiones
95	CAPÍTULO 7. Tareas pendientes y recomendaciones
103	CAPÍTULO 8. Literatura consultada
111	Apéndice I
115	Apéndice II



Lista de Cuadros



- 41 Cuadro 1.** Evaluación de la respuesta del maíz nativo Olotón a la interacción entre el uso de estiércol, cal agrícola y fertilizantes Nitrogenado, Fosfórico y Potásico en la Sierra Mixe, Oaxaca en los años 2022 y 2023.
- 47 Cuadro 2.** Lista de tratamientos sobre bioinoculantes, variedad y fertilización con NPK conducido en dos localidades del Estado de Oaxaca en el ciclo PV 2024.
- 59 Cuadro 3.** Distribución de bacterias y genes asociados a la fijación biológica de nitrógeno en mucílago de las raíces aéreas de plantas de maíz Olotón cultivadas en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca
- 63 Cuadro 4.** Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 10 de las cepas del mucílago de maíz Olotón, aisladas de la parcela sin fertilización con nitrógeno.
- 63 Cuadro 5.** Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 10 de las cepas del mucílago de maíz Olotón, aisladas de la parcela con aplicación de 60 kg N ha⁻¹.
- 64 Cuadro 6.** Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 10 de las cepas del mucílago de maíz Olotón, aisladas de la parcela con aplicación de 120 kg N ha⁻¹.
- 66 Cuadro 7.** Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 11 cepas bacterianas de maíz Olotón blanco, aisladas de la parcela sin fertilización con nitrógeno.
- 66 Cuadro 8.** Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 10 de las cepas de maíz Olotón blanco, aisladas de la parcela con 60 kg N ha⁻¹.
- 67 Cuadro 9.** Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 10 de las cepas de maíz Olotón blanco, aisladas de la parcela con 120 kg N ha⁻¹.
- 67 Cuadro 10.** Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 15 cepas bacterianas de maíz Olotón amarillo, aisladas de la parcela sin fertilización con nitrógeno.
- 68 Cuadro 11.** Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 11 cepas bacterianas de maíz Olotón amarillo, aisladas de la parcela con 60 kg N ha⁻¹.
- 70 Cuadro 12.** Propiedades físicas y químicas de la capa arable del suelo (0 a 20 cm) en dos localidades experimentales en Totontepec Villa de Morelos, previo a la siembra.

•Lista de cuadros•

- 71 Cuadro 13.** Rendimientos promedio de tres repeticiones del maíz nativo de la raza Olotón a 20 tratamientos en dos localidades de Totontepec Oaxaca, en 2022.
- 72 Cuadro 14.** Análisis de varianza de dos experimentos con diseño de parcelas divididas conducidos en 2022.
- 74 Cuadro 15.** Algunas propiedades físicas, químicas y de fertilidad de la capa arable de los suelos en las localidades San Bernardino Teotitlán, Oax. y Totontepec Villa de Morelos Oax.
- 75 Cuadro 16.** Promedio de tres repeticiones de número total de nudos con raíces adventicias activas, en función de los tratamientos de bioinoculante y fertilización NPK en San Bernardino Teotitlán de Flores Magón y en Totontepec Villa de Morelos. Año 2024.



Lista de figuras



- 20** **Figura 1.** Ubicación de las regiones geopolíticas del estado de Oaxaca.
- 28** **Figura 2.** Raíces adventicias del maíz nativo Raza Olotón con exudación de mucílago.
- 38** **Figura 3.** Enfoques metodológicos empleados para la caracterización bacteriana presente en el mucílago de las raíces aéreas de plantas de maíz Olotón cultivadas en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca.
- 51** **Figura 4.** Plantas de maíz Olotón variedad blanca y amarilla con presencia de antocianinas en las primeras etapas fenológicas.
- 52** **Figura 5.** Altura de planta de maíz amarillo Olotón en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca.
- 53** **Figura 6.** Modelo de regresión para estimar presencia de mucigel en raíces adventicias de plantas de maíz Olotón.
- 54** **Figura 7.** Presencia de mucílago en raíces adventicias en plantas de maíz Olotón. a) inicia la presencia de exudado, b) mayor exudado radical, c) etapa de finalización de mucílago.
- 56** **Figura 8.** Características de la espiga y jilote de maíz Olotón.
- 56** **Figura 9.** Mazorcas de la raza Olotón variedad de grano amarillo y variedad de grano blanco.
- 57** **Figura 10.** Mazorcas y granos de las variedades de grano blanco y variedad de grano amarillo.
- 59** **Figura 11.** Composición de la microbiota del mucílago de las raíces aéreas de plantas de maíz Olotón cultivadas en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca.
- 60** **Figura 12.** Ensayos de antagonismo entre *Fusarium oxysporum* y cepas aisladas del mucílago de las raíces aéreas de plantas de maíz Olotón cultivadas en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca.

•Lista de figuras•

- 61** **Figura 13.** Cepa de *Fusarium* sp. productora de un pigmento morado aislado de raíces y semillas de maíz Olotón. A) 7 días y B) 21 días de crecimiento a 30°C.
- 62** **Figura 14.** Efecto promotor del crecimiento vegetal de cepas del mucílago del maíz Olotón en plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- 69** **Figura 15.** Prueba de efectividad biológica de la inoculación individual o en consorcio de bacterias aisladas de mucigel de raíces adventicias áreas de maíz Olotón, en la altura (A) y área foliar (B) de plantas de maíz Olotón, fertilizadas con solución nutritiva Long Ashton aplicada en tres dosis (0, 15 y 30%) con respecto a su formulación completa, después de 30 días de crecimiento en invernadero.
- 77** **Figura 16.** Desarrollo de raíces adventicias (A) en la UIEM ciclo PV 2021 y PV 2024, bajo riego y (B) raíces primarias y secundarias y exudación de mucigel en la localidad San Miguel Tianguizolco, municipio de Huejotzingo Puebla, 2021 bajo temporal.
- 79** **Figura 17.** Fotos alusivas al recorrido de campo en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca, con sistema MIAF-higo. Ladera con 30-40% de pendiente.
- 99** **Figura 18.** Retención de suelo en una ladera con 18% de pendiente en San Andrés Tuxtla, Veracruz durante 14 años de manejo con el sistema MIAF-chicozapote. Precipitación media anual de 1500 mm.
- 99** **Figura 19.** Parcela MIAF-chicozapote después de 14 años de su instalación en una localidad de San Andrés Tuxtla, Veracruz.



Prólogo



La agricultura es una de las actividades más antiguas, de la humanidad, surgió hace más de 12,000 años, con la observación en los grupos nómadas que las frutas y semillas comidas, al caer al suelo, daban origen a las plantas, granos y frutos que habían alimentado a los grupos en movimiento. De esa manera, los grupos humanos se asentaron cerca de los ríos, convirtiéndose en sedentarios; desde entonces, las semillas y su selección autóctona, la domesticación de plantas y animales, coadyuvaron al establecimiento en lugares, dejando la vida nómada.

Esta nueva forma de vida tuvo un profundo impacto en todos los aspectos de la sociedad humana. De esta manera había iniciado la agricultura, que avanzó en las diferentes culturas y pueblos originarios, con cultivos específicos, que fueron domesticados alrededor del mundo. Se dio énfasis en cada cultura a los cereales, gramíneas, leguminosas, oleaginosas, combinando un cereal, una leguminosa, a veces una oleaginosa, aplicando el mejoramiento intuitivo, de semillas en cada cultivo. La agricultura se centró en la producción de alimentos, cada vez a mayor escala, sin percatarse de los efectos ambientales y sociales que originaba.

La necesidad de elevar la producción y productividad de los cultivos, en especial el trigo, arroz, maíz, fue urgente ante la explosión demográfica y hambrunas severas en regiones como India, Pakistán, Afganistán, África, y en otras partes del mundo. En el caso del trigo, coincidió, con la afectación grave por tres tipos de roya (tallo, hoja y espiga), además de ser trigos de tallo muy alto que volcaba y propiciaba rendimientos bajos, de 750 kg por hectárea.

En México, la participación de excelentes técnicos mexicanos, fitopatólogos como Ignacio Narváez, José Rodríguez Vallejo y fitomejoradores, entre ellos Norman Borlaug, desde 1943, permitieron contar con trigos de porte intermedio, al cruzarse los trigos de porte alto, con un trigo japonés enano. Se logró incorporar la tolerancia a las tres royas. Esas aportaciones para bien de los productores y consumidores de trigo en el mundo fueron la base de la Revolución Verde, que se distinguió por el uso en exceso de fertilizantes, aplicación de agroquímicos, herbicidas, en la agricultura extensiva y empresarial, en monocultivo. Esto propició contaminación en suelos, ambiente, agua, en diversos países y un uso intensivo de agua de riego.

Millones y millones de hectáreas, fueron sembradas y cultivadas de esa manera, propiciando efectos y erosión genética del trigo, al sembrarse pocas variedades en millones de hectáreas. Si bien se incrementó la producción media lográndose de 3 a 8 toneladas por hectárea. La Revolución Verde (1943-1961), promovida y financiada por la Oficina de Agricultura de Estados Unidos y por la fundación Rockefeller, propició el uso de semillas mejoradas, fertilizantes, herbicidas, insecticidas y maquinaria. El uso de fertilizantes nitrogenados se incrementó considerablemente durante los últimos 60 años; la producción mundial de trigo, arroz y maíz se asoció con el aumento y consumo de fertilizante nitrogenado sintético.

El proceso para fabricación de fertilizantes nitrogenados sintéticos, a escala industrial, será cada vez mayor, para poder sostener una población mundial de más de 9.7 millones de habitantes hacia el año 2050. La excesiva fertilización de los cultivos con nitrógeno sintético, en la agricultura extensiva, contamina los cuerpos de agua, superficial y subterránea. Una alternativa sostenible que aporta nitrógeno es lo que ocurre en las leguminosas con la fijación biológica de nitrógeno atmosférico que ocurre de manera natural mediante la simbiosis de esas especies con bacterias diazotróficas. Representa una vía alternativa favorable, para aportar este fertilizante fundamental, a través de la simbiosis, entre bacterias y las plantas.

La fijación biológica de nitrógeno (FBN), es un aspecto que concentra interés, en su investigación, dadas sus ventajas, lo que ocurre en leguminosas, se extendió hacia la búsqueda de fijación biológica en cereales y otras especies. La alimentación mundial se concentra en los cultivos trigo, arroz y maíz; en los cuales se utilizan fertilizantes nitrogenados sintéticos. En caso de lograr la FBN, en cereales, dado su efecto potencial para reducir el consumo de energía fósil, se reducirían los problemas ecológicos asociados al uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos.

En la producción de cultivos de cereales, leguminosas, oleaginosas, entre otros, las semillas han sido seleccionadas por los pueblos originarios de manera milenaria. Ocurrió con el maíz, el frijol, la calabaza, el amaranto, la chía, en México, avanzando de manera dinámica a través del tiempo. En maíz se han descrito 64 razas, con características muy particulares, con selección autóctona de los grupos indígenas originarios. La base de estas razas y su definición fue la selección, siembra, cosecha, selección, intercambio de semillas, por miles de años. En el caso de la raza Olotón, que se desarrolló en la Región Mixe, Oaxaca, destaca su particular característica en las plantas con raíces adventicias, en las cuales hay presencia de mucigel, aspecto que es documentado en este libro, por su relación con la fijación biológica de nitrógeno (FBN).

En este libro se señala que, en 1979, Juan Arellí Bernal Alcántara (q.e.p.d.), estudió en su tesis de licenciatura los efectos de la fertilización NPK, encalado y uso de gallinaza sobre la producción de maíz nativo de la raza Olotón, variedad de color amarillo en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca, su tierra natal. Bernal Alcántara no reportó la presencia de raíces adventicias y mucilago. En 1990, Thomas Boone Hallberg, botánico norteamericano, acompañado por Gabor Bethlenfalvay, microbiólogo del Departamento de Agricultura de EE.UU., plantearon su sospecha de que esa variedad nativa podría tener la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en su sistema radicular adventicio.



En 1992, Hallberg y Bethlenfalvay, invitaron a Ronald Ferrera Cerrato, microbiólogo del Colegio de Postgraduados, a estudiar los maíces nativos de Totontepec. Ferrera Cerrato colectó muestras de las raíces adventicias y del mucílago que rodeaba y goteaba de esas raíces, así como del suelo de la rizosfera y las analizó en su laboratorio del Colegio de Postgraduados. Ferrera Cerrato y sus colaboradores, mostraron actividad en fijación biológica de nitrógeno atmosférico en maíz Olotón (FBNM).

En 2005, la transnacional Mars (Inc.) y la Universidad de California-Davis (UCD), en el municipio de Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca, colectaron muestras, por nueve años, con anuencia de autoridades municipales, condujeron una investigación en Totontepec y en California-Davis y Wisconsin-Madison (UWM).

Las Universidades de California-Davis, y de Wisconsin-Madison y la transnacional Mars (Inc.), intentaron patentar y proteger la propiedad intelectual del proceso de fijación biológica de nitrógeno en maíz Olotón (FBNMO) lo que no fue otorgado, por tratarse de variedades ya en uso común. El acceso a los recursos genéticos de Totontepec, por instituciones norteamericanas fue irregular e indebido.

El gobierno mexicano, signatario del Protocolo de Nagoya desde 2012, otorgó un certificado de cumplimiento a la parte receptora, a través de su Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). El Protocolo de Nagoya, autorizó la confidencialidad de los acuerdos entre las partes, que generó injusticias y suspicacias. David Barkin, coautor del presente libro reaccionó a la publicación del artículo de 2018 en la revista Plos Biology, ya que se omitió la mención al trabajo pionero de Ronald Ferrera Cerrato, también coautor de este libro y de su equipo de colaboradores del Colegio de Postgraduados.

Como se menciona en este libro los negociadores norteamericanos de acuerdo con la parte negociadora de México cambiaron el acuerdo de las ganancias, reduciendo la participación comunitaria del 50 al 1 por ciento. El municipio de Totontepec, recibirá el 1%, o menos, porque la parte norteamericana, señala que el material genético obtenido de Totontepec ahora es provisto por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y el National Germplasm System del gobierno de los Estados Unidos de Norteamérica. Estas transferencias son de materiales colectados varias décadas antes, en la región Mixe.

Se definió que el municipio de Totontepec, sería el receptor de cualquier beneficio derivado del convenio inicial, por la transferencia de los recursos genéticos de maíz que fija nitrógeno, sin considerar otros municipios de la Región Mixe de Oaxaca y de otros estados de México, que seleccionan en la fijación y posterior amplificación del carácter FBN en maíz y son, por tanto, coautores y copropietarios del carácter.

En este libro se señala que el grupo estatal “Espacio Estatal en Defensa del Maíz Nativo de Oaxaca” señala que, no se puede patentar la propiedad comunal, y que la semilla nativa Olotón y el carácter FBNMO, habrían de ser compartidos con los pueblos del mundo de manera gratuita. En efecto, las variedades de Olotón no podrían patentarse en México, independientemente de lo que señala “Espacio Estatal en Defensa del Maíz”, ya que México está adherido al Acta 78, de la Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV) que especifica que las variedades vegetales, se protegen de manera “*sui*



generis”, no se patentan. Por ello Mars Inc, intentó patentar variedades de Olotón en EE.UU. Este país, se adhirió al Acta 91 de UPOV; ahí hubiese procedido el patentamiento de variedades de Olotón, pero se requiere presentar información del Método de Obtención, para acreditar el proceso de mejoramiento (descripción detallada y en orden cronológico); Proceso a utilizar para la conservación de la identidad de la variedad, lo anterior, seguramente no pudo acreditarse.

La intención de compartir la semilla nativa, con los pueblos del mundo, como lo señala el “Espacio Estatal en Defensa del Maíz Nativo de Oaxaca” es de hecho, lo que hace CIMMYT y el US National Germplasm System.

El proyecto titulado “Defensa de la Propiedad intelectual social del carácter Fijación Biológica de Nitrógeno en maíz de la raza nativa Olotón y su aprovechamiento en la soberanía y seguridad alimentaria de México”, fue presentado por cinco instituciones nacionales: el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, el Colegio de Postgraduados, el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco y el Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Después de lograrse la aprobación del proyecto, se unió a este grupo por invitación, la Universidad Autónoma Comunal de Oaxaca.

El grupo del Colegio de Postgraduados descubrió el carácter Fijación Biológica de Nitrógeno en Maíz Olotón (FBNMO), que ocurre principalmente en las raíces adventicias, en la raza nativa de maíz Olotón en el municipio de Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca. También tiene el mérito de haber reportado que hay funciones adicionales a la simbiosis entre la planta de maíz y la microbiota diazotrófica —con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico— que aporta nitrógeno a la planta.

La defensa de la propiedad intelectual social del carácter Fijación Biológica de Nitrógeno del maíz nativo de la raza Olotón (FBNMO), principal objetivo del proyecto consideró: la descripción varietal del maíz nativo de la raza Olotón en Totontepec, Oax., su inscripción en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV), para la comunidad Mixe, como alternativas defensivas a favor de las comunidades de la región Mixe, El “Grupo Estatal para la Defensa de los maíces Nativos de Oaxaca”, sostiene que el proceso de descripción varietal de un maíz nativo equivale a dar un paso hacia patentar esa propiedad comunal; otros grupos sociales, tienen una postura diferente, como ocurre en el Grupo Vicente Guerrero de Tlaxcala, en la Región Mazahua, Estado de México y otras variedades nativas, en proceso de registro ante el CNVV, así como la solicitud de Títulos de Obtentor. En México no se patentan las variedades vegetales, lo que ocurre así, en el Acta 78, de UPOV. Por otro lado, lo que hace CIMMYT al entregar muestras de Olotón, a quien lo solicita, incluyendo a Mars, es consistente con esta posición, de manera que nadie podría ser limitado a contar con las colectas de los maíces Olotón, que están en el banco de germoplasma, desde hace varias décadas.

El equipo del proyecto decidió publicar en una revista científica la información obtenida de la descripción varietal dando el debido reconocimiento a los Pueblos Originarios, como obtentores de las variedades nativas de maíz de la raza Olotón, que posee el carácter FBNMO amplificado. La descripción varietal de las variedades Olotón amarillo y Olotón blanco, se llevó a cabo, siguiendo las sugerencias de la Guía técnica, cumpliendo con las recomendaciones.



En este libro se presentan avances muy destacados en el estudio de la diversidad bacteriana asociada al maíz Olotón de Oaxaca. Entre las bacterias encontradas que se presentan en este libro, destacan las fijadoras de nitrógeno que son las que le confieren al maíz Olotón su característica más distintiva, su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. El uso de estas bacterias como inoculantes puede contribuir para incrementar el rendimiento y salud de los cultivos agrícolas de interés en México. Las anteriores aportaciones son relevantes y producto del equipo de excelencia de destacados investigadores de este proyecto.

El Código genético original de Olotón, debe ser descrito en México y detallado como protección de su uso para la soberanía alimentaria. Lo anterior, debería considerarse en proyectos futuros, para defender a las variedades Olotón, como aportación milenaria de los pueblos originarios, para bien de la humanidad.

Como se menciona en el libro, la transferencia del carácter original a productores de maíz de otras regiones del país sería gratuita, si los productores mismos lo transfirieran mediante cruzamiento con sus maíces nativos, o bien, si la investigación pública desarrollara variedades mejoradas de polinización libre con ese carácter original. La misma gratuidad funcionaría para los productores de otros países cuyas sus regiones edáficas y climáticas, fueran similares a las de la Sierra Mixe.

Como una alternativa defensiva de la propiedad intelectual social del maíz nativo, se realizó la descripción varietal de dos variedades nativas de la raza Olotón en Totontepec durante dos años. La finalidad original fue registrarla en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV), de la SADER, como evidencia de su pertenencia social a la región Mixe. Sin embargo, una vez conocido que el gobierno mexicano había otorgado en 2015 el Certificado de Cumplimiento con Validez Internacional, se concluyó que está rebasado el reconocimiento al carácter social de la propiedad intelectual del maíz nativo que ostenta el carácter FBNMO.

La polinización cruzada en las variedades nativas de Olotón, propician que cada semilla tenga diferente padre y hasta diferente microbiota. Las bacterias presentes en el mucílago, podrían ser residentes endófitos de las raíces aéreas y salir al mucílago cuando éste se libera. Esto debería ser estudiado. También podría analizarse las bacterias endófitas, que pueden provenir de la semilla o del suelo.

La dinámica y la abundancia de estas bacterias, en las etapas de la planta, desde las primeras raíces aéreas hasta el llenado del grano, son importantes de ser analizadas.

Con base en la constitución genética de las variedades de polinización libre de Olotón, la biodiversidad que incluye a muchos otros caracteres. Se podrían seleccionar variedades y subpoblaciones con el carácter FBNMO. Estas variedades se esperaría que tuviesen requerimientos de frecuente precipitación durante el desarrollo del cultivo.

El aprovechamiento del carácter FBNMO para sustituir total o parcialmente el uso de fertilizante sintético, limitado a las regiones húmedas de clima templado similar al de la Sierra Mixe en México y en el resto del mundo, podría extenderse a otras regiones a través de mejoramiento genético convencional.



Como se señala en el libro, sería necesario auxiliarse con análisis moleculares para conocer con detalle las características, del carácter FBNMO. Este conocimiento podrá ser necesario para la defensa contra reclamos futuros de los consorcios transnacionales que desarrollen patentes y reclamen el pago de regalías. También sería importante poner a disposición de los pequeños agricultores la semilla de maíz Olotón, en intercambio de semilla, en programas con acompañamiento, para lograr coincidencia de floraciones y cruzamientos con otros maíces nativos según el mejoramiento genético autóctono, selección de progenies con el carácter FBNMO y a la vez las características morfológicas y organolépticas para su autoconsumo cultural.

En el libro también se sugiere que sería importante establecer un programa público de mejoramiento genético con el objetivo de desarrollar variedades modernas de polinización libre o híbridos que expresen el carácter FBNMO y además reúnan características agronómicas más manejables y adaptadas a la intensificación para ampliar sus rendimientos.

Las anteriores sugerencias de líneas de investigación, en FBNMO, podrían ser revisadas por la Secretaria de Ciencias (SECIHTI) en complemento con la Secretaria de Agricultura (SADER), para definir, cuales de ellas podrían ser apoyadas con la intención de avanzar y en un futuro aspirar a ofrecer resultados para los productores de autoconsumo, tradicionales e incluso agricultura comercial, México podría ofrecer a sus productores de maíz en México y otras regiones, las innovaciones tecnológicas, que posicionarían al país como potencia científica.

Como se señala en el libro, el uso de bioinoculantes es prometedor como posible complemento de la microbiota requerida para la manifestación del carácter FBNMO, siempre y cuando el código genético de ese carácter cuantitativo esté presente en el maíz. Tal es el caso del bioinoculante desarrollado en el actual proyecto a partir de microbiota especializada obtenida del mucílago de las variedades nativas de la Sierra Mixe, particularmente de Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca.

En este prólogo, agradecemos al excelente equipo de investigadores, de calidad excepcional, que representan una masa crítica sobresaliente, con cinco investigadores eméritos, varios Niveles III, II y I, a quienes reconocemos la oportunidad de tenerlos cerca, es un alto honor, que apreciamos mucho, presentar el libro, que sin duda es una lista de logros relevantes, aportaciones, sugerencias de líneas de investigación, que sin duda conviene que sean revisadas para su implementación, para bien de la ciencia, fundamentales, que permitirán después de 45 años, del trabajo del Ing. Juan Areli Bernal Alcántara y del Dr. Ronald Ferrera Cerrato, ofrecer alternativas en la fijación de nitrógeno en maíz, con proyección para la agricultura de pequeños, medianos y agricultura extensiva, con sostenibilidad para México y la agricultura mundial.

Alejandro Espinosa Calderón¹, Margarita Tadeo Robledo²

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. Carretera Los Reyes-Texcoco km 13.5, Coatlinchán Mpio. Texcoco, Edo. de México. espinoale@yahoo.com.mx, 55 34931861

² Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Carretera Cuautitlán-Teoloyucán, Km 2.5. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. CP. 54714. tadeorobledo@yahoo.com



Agradecimientos



Muy sinceros agradecimientos al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (ahora Secretaria de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación) por su apoyo económico, así como en la supervisión, guía y el más amplio apoyo al equipo científico del proyecto para superar los imprevistos durante su conducción.

También nuestro agradecimiento a las cinco instituciones colaboradoras del proyecto por su decidido apoyo al equipo de sus respectivos investigadores que lo ejecutaron.

Agradecimientos muy especiales al Dr. Luis Jorge Rodríguez del Bosque, Director general del INIFAP y responsable legal del proyecto y a la C.P. María Isabel Lagunes Bernal, Directora Administrativa del CIRCE-INIFAP y responsable administrativa el proyecto, por su apoyo oportuno y sensible en la solución institucional oportuna para atender los problemas típicos de un proyecto multiinstitucional en progreso.

También un especial reconocimiento a los investigadores Dra. Rocío Albino Garduño y al Dr. Horacio Santiago Mejía, Profesores Investigadores de la Universidad Intercultural del Estado de México; y al M.C. Ernesto Hernández Romero, Profesor Investigador del Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Ellos colaboraron entusiasta y profesionalmente en la conducción de las siembras exploratorias de maíz de la raza Olotón en los estados de México y Puebla.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Yordán Romero, al M.C. Julio Martínez Romero y al Dr. Marco A. Rogel por su participación en la ejecución del proyecto dentro del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM.

Muy agradecidos con nuestros colegas y profesores del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca por su colaboración como asesor de tesis de licenciatura y de posgrado como parte de la formación de recursos humanos del proyecto. Dr. Yuri Villegas Aparicio, Dr. Gerardo Rodríguez Ortiz y Dr. José C. Carrillo Rodríguez.

•Agradecimientos•

A los productores cooperantes de la comunidad de Totontepec Villa de Morelos, que facilitaron en todo momento sus parcelas para la exploración de campo y establecimiento de las parcelas experimentales de maíz nativo raza Olotón y la incorporación de la tecnología MIAF. Sr. Carlos Cortés y Sr. Roberto Núñez.

Un especial reconocimiento a la M.C. Arely Concepción Ramírez Aragón por su participación en la descripción varietal durante su proceso de formación en la Maestría en Ciencias en Productividad en Agroecosistemas en el Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca.

Un agradecimiento sincero a los estudiantes y tesistas de licenciatura y de posgrado del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca por su invaluable participación en las actividades de campo y de laboratorio. M.C Vianey Elizabeth Tomás Morales, Marco Antonio Ramírez Torres, Alan Ahmed Ortiz Muñoz, Ing. Luis Francisco González Pérez, Ing. Yürguen Omar Martínez Pacheco, José Manuel López Peláez, Abelardo Javier Bautista Canseco, Guillermo Eduardo Poblete Hernández y Ing. Silvestre Cruz Martínez.



Capítulo 1

Antecedentes



Illustration of maize in the 1566 edition of the herbal of Dodonaeus



Antecedentes



A partir del año 1960 y hasta principios de los años 2000 aumentó cuatro veces la producción mundial de trigo, arroz y maíz que, a la vez, se asoció con el aumento de nueve veces el consumo de fertilizante nitrogenado sintético (Smil, 2001). Ambos aumentos fueron posibles gracias a la adopción del proceso Haber-Bosch para producir NH_3 a escala industrial a partir de gas nitrógeno N_2 , abundante en la atmósfera (78% de su composición). El compuesto NH_3 es un insumo básico para la fabricación de los fertilizantes nitrogenados sintéticos. El mismo autor estima que, dadas las prácticas agrícolas actuales, el consumo anual de nitrógeno sintético será dos a tres veces mayor que en la actualidad, para sostener una población mundial del orden de 9.7 millardos de habitantes hacia el año 2050 (FAO, 2008).

El proceso Haber-Bosch requiere grandes cantidades de energía fósil, para alcanzar y sostener la temperatura requerida de 450°C y una alta presión atmosférica. Se estima que este proceso industrial consume entre el 1 y 2% de la energía fósil mundial, con su correspondiente efecto sobre el cambio climático. Además, la fertilización de los cultivos con nitrógeno sintético, hasta ahora relativamente barato ha conducido a su uso en exceso particularmente en la agricultura industrial, que es causa muy principal de la eutrofización (hipoxia) de cuerpos de agua superficiales y la contaminación de las aguas subterráneas.

El gas N_2 es inerte y como tal, a pesar de su abundancia en la atmósfera y de ser el elemento esencial más requerido por las plantas, sólo puede ser asimilado por la microbiota diazotrófica (bacterias y arqueas) que posee la capacidad de realizar biológicamente el mismo proceso de Haber-Bosch. La fijación biológica de nitrógeno atmosférico consume la misma cantidad de energía que el proceso Haber-Bosch, pero usa como fuente a la energía solar —a través de la planta en simbiosis— y ocurre a temperaturas y presión atmosférica ambientales. El nitrógeno fijado biológicamente, no produce las externalidades ecológicas del nitrógeno sintético.

En los artículos publicados por Van Deynze *et al.* (2018) y Ladha *et al.* (2022) se puede consultar una excelente y muy completa descripción de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y la evolución de su investigación en plantas leguminosas, hasta la búsqueda de fijación biológica en cereales y otras especies no leguminosas.

Dado que la alimentación mundial depende grandemente de los tres cereales básicos trigo, arroz y maíz y que en casi todos estos cultivos se utilizan fertilizantes nitrogenados sin-

téticos, la búsqueda de la FBN para satisfacer los requerimientos de Nitrógeno de estos cereales se ha convertido en el “Cáliz Sagrado de la Agricultura” (“Holy Grail of Agriculture” en el idioma inglés) de la investigación de esta época, dado su efecto potencial para reducir el consumo de energía fósil y el de fertilizante nitrogenado sintético, además de mitigar los problemas ecológicos asociados a ellos. A esto se aúna la codicia de las grandes corporaciones transnacionales por la apropiación de la FBN en maíz y para lucrar con su comercialización a escala mundial.

En el año 1979, Juan Arellí Bernal Alcántara (q.e.p.d.) condujo experimentación de campo para evaluar los efectos de la fertilización NPK, encalado y uso de gallinaza sobre la producción de maíz nativo de la raza Olotón, variedad de color amarillo en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca, su tierra natal (**Figura 1**). Este trabajo fue requisito para su graduación como Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia (Bernal Alcántara, 1982). Encontró que a pesar de ser suelos ricos en materia orgánica (5.2%) y pH del orden de 5 se logró aumentar el rendimiento de maíz desde 1.34 t/ha sin el uso de fertilizante, hasta 5 t/ha con la aplicación del tratamiento anormalmente reducido de 60-40-0 (N-P₂O₅-K₂O). Con el uso adicional de gallinaza (5 ton/ha) se alcanzó el rendimiento de 6 t/ha. Sin embargo, Bernal Alcántara no ofreció explicación de la amplia respuesta a tan baja dosis de fertilizante NPK. Tampoco reportó en su tesis la presencia de mucílago en las raíces adventicias, aunque existían en abundancia. En 1990, invitó a su conocido Thomas Boone Hallberg, botánico norteamericano residente en Oaxaca, a visitar las siembras de maíz nativo de la región. Hallberg se hizo acompañar de Gabor Bethlenfalvay, microbiólogo del Departamento de Agricultura de EEUU. Hallberg y Bethlenfalvay plantearon su sospecha de que



Figura 1. Regiones geopolíticas del estado de Oaxaca. Ubicación de las localidades Totontepec Villa de Morelos y San Bernardino Teotitlán de Flores Magón.



la variedad nativa podría tener la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en su sistema radicular adventicio. En 1992, Hallberg, acompañado por Bethlenfalvay invitó a un equipo de investigadores nacionales, entre ellos a Ronald Ferrera Cerrato, microbiólogo del Colegio de Postgraduados, a visitar los maíces nativos de Totontepec. Ferrera Cerrato colectó muestras de las raíces adventicias y del mucílago que rodeaba y goteaba de esas raíces, así como del suelo de la rizósfera y las analizó en su laboratorio del Colegio de Postgraduados.

Ferrera Cerrato y sus colaboradores identificaron especies de bacterias en el mucílago y en la rizósfera que mostraron actividad en fijación biológica de nitrógeno en maíz (FBNM). Las especies de bacterias identificadas en el mucílago que recubre las raíces adventicias corresponden principalmente a los géneros *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Xanthobacter*, *Azospirillum*, y *Derxia*. En la rizósfera identificaron a los mismos géneros que en el mucílago y además especies de los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Beijerinckia*. También detectaron actividades de antibiosis contra hongos patógenos como *Fusarium* y otros. Además, se detectó en el mucílago una especie de *Azospirillum*, que se asoció simultáneamente a los efectos de fijación biológica de nitrógeno, antibiosis contra hongos fitopatógenos y solubilización de fósforo inorgánico. En la rizósfera, encontraron especies de los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter* con los mismos tres efectos adicionales a la FBNM (Vega-Segovia y Ferrera Cerrato, 1993; González Ramírez, 1994).

Con este conocimiento, Hallberg y el agrónomo norteamericano Howard Yana Shapiro, empleado de la transnacional Mars (Inc.) y profesor asociado de la Universidad de California-Davis (UCD), gestionaron ante ambas instancias el financiamiento de una exploración de campo al municipio de Totontepec Villa de Morelos, Oax., la que se realizó en el año de 2005. La exploración continuó durante nueve años con la anuencia de las autoridades municipales. Colectaron muestras de plantas y de suelos y condujeron investigación tanto en terrenos de Totontepec como en las universidades norteamericanas de California-Davis y de Wisconsin-Madison (UWM). Cabe mencionar que no se informó al Gobierno Federal de México de esta actividad, bajo el argumento ecléctico de que la Constitución Política Mexicana considera a las comunidades indígenas como autónomas. Si bien tal es cierto, la Constitución establece en su Artículo 27, que los recursos naturales del territorio nacional son propiedad de la Nación, lo que hace ilegal al proceso de extracción de sus recursos genéticos sin un acuerdo explícito al nivel federal.

En el excelente artículo publicado por Kloppenburg *et al.* (2024) se hace un análisis muy completo del proceso desde las actividades de Hallsberg, Bethlenfalvay y Shapiro en Totontepec hasta la actualidad en que las Universidades de California-Davis, y de Wisconsin-Madison y la transnacional Mars (Inc.). En ellas se investiga para patentar y por lo tanto poseer, el proceso de fijación biológica de nitrógeno en maíz Olotón (FBNMO). Muy probablemente, otras instituciones y corporaciones transnacionales ahora participan en la misma carrera. En el artículo citado, también se analizan, de acuerdo con el protocolo de Nagoya, tanto los derechos del Estado propietario de los recursos genéticos como los de la entidad que los colecta y hace desarrollos comerciales. Los autores del artículo citado analizan desde el punto de vista de lo que es un acuerdo justo entre las partes según el Protocolo de Nagoya, hasta lo que es simple y llanamente biopiratería.



A continuación, se hace una apretada consideración de aspectos de lo puntualizado por los autores de ese artículo, así como comentarios de los autores del presente libro.

El acceso a los recursos genéticos de Totontepec por las instituciones norteamericanas fue precedido por un Acuerdo de Transferencia de Materiales (Material Transfer Agreement, en el idioma inglés) entre el presidente Municipal de Totontepec y autoridades de la Universidad de California-Davis. De esta manera, las instituciones extranjeras dispusieron de esos recursos genéticos durante nueve años antes de que, en 2015, lo negociaran finalmente con el gobierno mexicano, propietario de recurso genético y signatario del Protocolo de Nagoya desde 2012. Según este protocolo, el Gobierno de México es la autoridad que juzga si el beneficio que habrá de lograrse en el futuro es justo y equitativo entre las partes. Sólo así, el Estado otorgará un certificado de cumplimiento a la parte receptora con validez internacional. En efecto, el gobierno mexicano otorgó, a través de su Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), ese Certificado. Con éste, México validó la transferencia de recursos genéticos del maíz que posee el carácter de fijación biológica de nitrógeno en maíz Olotón (FBNMO) a las entidades norteamericanas involucradas.

El Protocolo de Nagoya autoriza el carácter confidencial de los acuerdos entre las partes. Se argumenta que, este carácter de confidencialidad fue incluido en el Protocolo para proteger a la parte que hace el desarrollo experimental contra la copia fraudulenta del conocimiento desarrollado. Sin embargo, esa confidencialidad también permite ocultar injusticias, como se verá más adelante. Los autores del artículo arriba citado informan que, en el año 2017, la Universidad de Wisconsin-Madison (UWM) no renovó el contrato en el que participaba por invitación de Mars (Inc.) y de la UCD. Desde entonces, la UWM ha proseguido su investigación del mismo tema, de manera independiente.

Es procedente reconocer que el trabajo de investigación que desarrollan esas entidades norteamericanas sobre los recursos genéticos transferidos no puede ser catalogado formalmente como de biopiratería, dado que México es signatario del Protocolo de Nagoya y que otorgó a BioN2, subsidiaria de Mars (Inc.) el Certificado de Cumplimiento con validez internacional. Sin embargo, hay varias observaciones de los autores del artículo citado y otras más, que podrían ser motivo de controversia en el futuro. En el artículo de Kloppenburg *et al.* (2024) se señala la falta de equidad y de justeza en el proceso de transferencia al extranjero de los recursos genéticos de la raza nativa de maíz que fija nitrógeno atmosférico. Se aprecia la visión colonialista de la parte negociadora norteamericana al ocultar en el acuerdo con las autoridades municipales de Totontepec, los principios adoptados desde 1992 en la Convención sobre la Biodiversidad celebrada en Cartagena, Colombia, particularmente, sobre el “consentimiento previamente informado” (Previously informed Consent, en el idioma inglés) de la buscada transferencia de recursos genéticos. También hacen resaltar que en el acuerdo Totontepec-UCD quedó abierta la posibilidad de que, si el resultado de la investigación de UCD condujera a patentar algún desarrollo con fines comerciales, los ingresos netos se compartirían a partes iguales entre Totontepec y UCD.

Los autores del artículo arriba citado hacen notar que el Gobierno de México carecía y carece de la reglamentación específica que normara la negociación sobre transferencia de recursos genéticos a alguna entidad universitaria extranjera o a corporaciones extranjeras.



Por lo tanto, los actores de la negociación por parte del Gobierno de México operaron en ausencia de una visión completa, informada y responsable.

Resulta desventajoso para México que, la definición adoptada en el contrato entre el Gobierno de México y BioN2 en 2015 sobre recursos genéticos, incluya no sólo a la semilla de maíz nativo raza Olotón. También incluye todas las partes de la planta, el mucílago, los microorganismos asociados, el suelo de la rizósfera, los ácidos nucleicos y los compuestos bioquímicos y moleculares. Pero, además también incluye al conocimiento tradicional que acompaña a la tecnología desarrollada por los pueblos originarios. Los negociadores norteamericanos lograron todo esto del Gobierno de México, y además, que se cambiara el acuerdo 50%/50% de las ganancias logrado por las autoridades municipales de Totontepec 10 años atrás, por 1%/99% que concedieron los representantes a nivel federal del Gobierno de México. Así que, por cualquier desarrollo comercial que logre en el futuro la subsidiaria de Mars (Inc.) el municipio de Totontepec recibirá el 1%. Pero tal vez ni eso, porque ahora la parte norteamericana confirmando su postura colonialista indica que, el material genético obtenido de Totontepec está siendo desplazado o complementado por recursos genéticos que les provee el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y el U.S. National Germplasm System. Esos materiales fueron colectados hace varias décadas, incluyendo a la región Mixe donde se asienta Totontepec. Esas colectas se realizaron antes de que surgieran los convenios que defienden los intereses de los productores que fijaron en sus materiales genéticos caracteres de gran utilidad en el presente.

Vale destacar que el material que es suministrado por el CIMMYT y el US National Germplasm System es sólo la semilla; no incluye a la microbiota diazotrófica del suelo ni especifican las partes de la planta para lo que es extensivo el sistema que lo hace libremente accesible, ni los conocimientos desarrollados por los pueblos originales sobre la tecnología tradicional. Todo ese caudal sólo fue obtenido de Totontepec durante 9 años. Aun así, los cuantiosos recursos legales con que cuentan las corporaciones transnacionales tendrán herramientas para defender cualquier intento desde México por corregir la injusticia cometida en contra de los Pueblos Originarios. Esto es colonialismo puro, que persigue saquear el conocimiento de los Pueblos Originarios, autores de la fijación y amplificación del carácter Fijación Biológica del Maíz Olotón (FBNMO) a partir del teocintle, como se detectó en Totontepec, Oaxaca.

Los representantes del Gobierno de México aparentemente descartaron como factor de juicio a la situación de facto de que, la parte norteamericana había dispuesto tal vez ilegalmente, de los recursos genéticos durante 9 años previos al acuerdo. Los actores por parte del Gobierno de México no lo ponderaron adecuadamente al elaborar su juicio que precedió a la expedición del Certificado de Cumplimiento con validez internacional.

Los actores de la parte del Gobierno de México también erraron al aceptar que solamente el municipio de Totontepec sería el receptor de cualquier beneficio derivado de la transferencia de los recursos genéticos de maíz que fija nitrógeno. Totontepec es sólo el sitio donde se hizo el descubrimiento de la FBNMO amplificada en maíz, pero otros municipios de la Región Mixe de Oaxaca y de otros estados de México, también participaron históricamente en la fijación y posterior amplificación del carácter FBNMO y son, por lo tanto,



coautores y copropietarios del carácter. De hecho, apuntan los autores del documento que arriba se cita que, el grupo estatal “Espacio Estatal en Defensa del Maíz Nativo de Oaxaca” sostiene, no sin razón, que NO SE PUEDE PATENTAR LA PROPIEDAD COMUNAL y que la semilla nativa y el carácter FBNMO habrían de ser compartidos con los pueblos del mundo de manera gratuita.

Habían transcurrido seis años desde que el Gobierno de México concedió en 2015 el Certificado con validez internacional de cumplimiento según el Protocolo de Nagoya, hasta que en 2021 el grupo de autores del actual proyecto del que se reporta, diseñó y obtuvo su aprobación ante CONAHCYT. Lo anterior, debido al carácter confidencial del contrato celebrado entre el Gobierno de México y BioN2, filial del corporativo Mars (Inc.), el Gobierno de México cumpliendo el compromiso de confidencialidad mantuvo en reserva el Certificado de Cumplimiento celebrado. Sólo hasta el año 2024 en que se publicó el artículo de Kloppenburg *et al.* y gracias a una fuente anónima, esos autores examinaron y dieron a conocer detalles de los dos contratos celebrados entre el Gobierno de México y la filial de Mars (Inc.) que condujeron al otorgamiento del esperado Certificado de Cumplimiento. El conocimiento tardío de la aprobación del Gobierno de México a la transferencia de los recursos genéticos del maíz nativo de la raza Olotón y algunos desacuerdos dentro del grupo institucional del proyecto fueron motivo de cambios en el proyecto original, sin comprometer en lo posible los objetivos originalmente establecidos.

David Barkin, coautor del presente libro reaccionó a la publicación del artículo de Van Deynze *et al.* (2018) en la revista Plos Biology (ver **Apéndice I**), en el que se omitía la mención al trabajo pionero de Ronald Ferrera Cerrato, también coautor de este libro y de su equipo de colaboradores del Colegio de Postgraduados. El grupo de Ferrera Cerrato presentó su hallazgo en dos tesis de estudiantes de postgrado y en un reporte interno institucional que se mencionan arriba en este libro. Este grupo ha de ser reconocido como el que demostró la actividad de fijación de nitrógeno en las raíces adventicias del maíz, hasta entonces desconocida, así como otras funciones de la simbiosis, tales como antibiosis contra *Fusarium*, la producción de estimuladores de crecimiento de la planta y la disolución de fósforo inorgánico.

Como se discute en los antecedentes de este documento, el desarrollo de la investigación que condujo a la publicación arriba citada, involucró la extracción del material genético de maíz del municipio de Totontepec Villa de Morelos apoyado en una legalidad endeble al ser basada en un acuerdo al nivel de municipio en 2005. La Constitución Mexicana específica en su Artículo 27 que los recursos naturales comprendidos dentro del territorio nacional pertenecen a la Nación Mexicana. Aunque el gobierno mexicano otorgó el Certificado de Cumplimiento en el año 2015 como se anota previamente, su vigencia tendría que ser retroactiva para que fuera legal la extracción de recursos genéticos de maíz nativo que comenzó 9 años atrás.

De este antecedente derivó la solicitud de apoyo al CONAHCYT por parte de los autores de este documento para aportar conocimiento en defensa de la propiedad intelectual del carácter fijación biológica de nitrógeno en maíz y para el aprovechamiento del carácter en la seguridad y soberanía alimentaria de México.



Capítulo 2

Introducción



Illustration of maize in the 1566 edition of the herbal of Dodonaeus



Introducción



El Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología, a través de su Programa de Soberanía Alimentaria aprobó el proyecto titulado *“Defensa de la Propiedad intelectual social del carácter Fijación Biológica de Nitrógeno en maíz de la raza nativa Olotón y su aprovechamiento en la soberanía y seguridad alimentarias de México”*. Este proyecto fue presentado por cinco instituciones nacionales: el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, el Colegio de Postgraduados, el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco y el Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Después de lograrse la aprobación del proyecto, se unió a este grupo por invitación, la Universidad Autónoma Comunal de Oaxaca. El CONAHCYT asignó \$4'865,283.00 (MN) al proyecto, con duración del 30 de agosto de 2021 al 30 de noviembre de 2024.

Allen Van Deynze *et al.* (2018) publicaron en la revista Plos Biology un artículo en el que analizan lo aprendido del proceso de investigación en germoplasma de maíz nativo de la raza Olotón obtenido en la Sierra Mixe de Oaxaca. En este artículo evaluaron que ese maíz nativo es capaz de fijar nitrógeno atmosférico para satisfacer entre el 29% y el 82% del requerimiento total de su ciclo de cultivo. Muy probablemente, la publicación de este artículo fue la señal que desencadenó la carrera internacional para patentar el carácter y derivar las pingües ganancias que ofrece ese descubrimiento. Los autores de ese artículo omitieron mencionar que el trabajo pionero del grupo liderado por Ronald Ferrera Cerrato del Colegio de Postgraduados fue la base sobre la que derivó la exploración del grupo financiado por Mars (Inc.) y de ahí, la investigación que condujo la publicación del artículo. Esta omisión dio origen al intercambio de cartas de protesta entre un grupo de investigadores de México y la revista Plos Biology que publicó el mencionado artículo. Cabe destacar que la mencionada revista declinó la solicitud de retirar el artículo de la circulación, y cuyos antecedentes se presentan en el **Apéndice I** de este libro.

El grupo del Colegio de Postgraduados tiene el mérito del descubrimiento del carácter FBNMO en su versión amplificada que ocurre principalmente en las raíces adventicias, en la raza nativa de maíz Olotón en el municipio de Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca (Vega-Segovia y Ferrera-Cerrato, 1993). También tiene el mérito de haber reportado que hay funciones adicionales a la simbiosis entre la planta de maíz y la microbiota diazotrófica —con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico— que rinde nitrógeno a la planta. Esas funciones adicionales que actúan en el mucílago que recubre las raíces adventicias son: 1) actividad de antibiosis contra hongos patógenos como *Fusarium* y probablemente contra

otra microbiota oportunista, 2) síntesis de promotores del crecimiento del maíz, y 3) capacidad en la disolución del fósforo mineral.

Típicamente, el desarrollo de las raíces adventicias bajo condiciones de alta humedad atmosférica inicia desde el primer nudo superficial de la planta en la etapa V10 y procede gradualmente hacia los nudos superiores. Se sigue el orden de desarrollo de raíces adventicias en la circunferencia del nudo, el crecimiento longitudinal con exudación de mucílago por un período corto de una a tres semanas antes de cesar esa exudación (Figura 2A). Mientras esto ocurre, el siguiente nudo superior habrá iniciado el mismo proceso de desarrollo y de exudación de mucílago y así, hasta alcanzar gradualmente el último nudo que puede ser del 8° al 10° en condiciones benignas. Puede ocurrir, como se observa en la Figura 2B, que las raíces adventicias del primero o segundo nudo aéreo desarrollen raíces adventicias secundarias y que también exuden mucílago. El proceso de desarrollo de las raíces adventicias puede detenerse bajo condiciones de baja humedad atmosférica.



Figura 2. Raíces adventicias del maíz nativo Raza Olotón con exudación de mucílago (A), reactor en que se realiza la fijación biológica de nitrógeno, y raíces adventicias secundarias (B). Raíces colectadas de Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca.

El trabajo reportado por Van Deynze *et al.* (2018) demostró que, el nitrógeno fijado en el mucílago de las raíces adventicias es efectivamente aprovechado por la planta de maíz, y cuantificó la fracción aportada al requerimiento total de la planta, como atrás se cita. También mostró la composición de las fuentes de energía que la planta aporta a la microbiota diazotrófica en el mucílago, así como la baja concentración de oxígeno del mucílago (microaerobiosis) que, es requisito abiótico para que se lleve a cabo el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico, y que es mediado por la enzima nitrogenasa.

Como se menciona en la sección de antecedentes, fue hasta la publicación del artículo de Kloppenburg *et al.* (2024) que se conoció que el gobierno mexicano había otorgado el Certificado de Cumplimiento de validez Internacional a BioN2 subsidiaria de Mars (Inc.) desde el año 2015, con lo que validaba la transferencia de los recursos genéticos del maíz nativo de la raza Olotón. Así lo dicta el Protocolo de Nagoya, del que México es signatario desde el



año 2012. Este hecho anulaba una razón de ser del proyecto presentado al CONAHCYT, ya que formalmente, no sería un caso de biopiratería. Sin embargo, quedan otras razones que mencionamos en la sección de antecedentes de este documento, por las que el proyecto aprobado por CONAHCYT habría de continuar, si bien, con algunos ajustes conceptuales; entre éstos, la posibilidad de usar de manera gratuita el código genético original del maíz Olotón —se entiende como código genético del carácter FBNMO al conjunto de alelos específicos (probablemente centenares de ellos) del genotipo del maíz Olotón que permiten a la planta jugar su parte en la simbiosis con la microbiota diazotrófica—. La planta de maíz aporta caracteres morfológicos como raíces adventicias con mucílago con condiciones de microaerobiosis y fuentes de energía para la actividad de la microbiota diazotrófica y probablemente, otras funciones como antibiosis y síntesis de estimuladores del crecimiento que son componentes básicos de la FBNMO. Este código genético no podría ser patentado sin modificación significativa, por existir como tal en la naturaleza. Si alguien pretendiera patentarlo tendría que realizar cambios profundos a ese código de tal forma que mejoraran su funcionamiento y lo hicieran comercializable a escala mundial. Uno de esos cambios podría ser el de superar la dependencia del carácter a las condiciones climáticas que prevalecen en la región Mixe alta. Por estas razones, el código genético original debe ser descrito en México y detallado como protección de su uso para la soberanía alimentaria. Este objetivo, sin embargo, no forma parte del actual proyecto en descripción.

Por lo tanto, se entiende que el código genético original del maíz Olotón para el carácter FBNMO puede ser usado libremente sin que hubiera que pagar regalías a quienes logran patentar versiones significativamente mejoradas de ese código. Esta posibilidad de usar el código genético original del carácter FBNMO libremente es consistente con la posición del “Grupo Estatal en Defensa del Maíz Nativo de Oaxaca” en el sentido de que, por ser propiedad comunal, no podría ser patentado. Por lo tanto, la transferencia del carácter original a productores de maíz de otras regiones del país que contaran con edafoclimatología similar a la de Totontepec, sería gratuita si los productores mismos lo transfirieran mediante cruzamiento con sus maíces nativos, o bien, si la investigación pública desarrollara variedades mejoradas de polinización libre con ese carácter original. La misma gratuidad funcionaría para los productores de otros países cuyas regiones edáficas y climáticas fueran similares a las de la Sierra Mixe.

Como parte del objetivo original de defensa de la propiedad intelectual social del maíz nativo que detenta el carácter FBNMO, se realizó la descripción varietal de dos variedades nativas de la raza Olotón en Totontepec durante dos años. La finalidad original fue la de registrarla en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales de la SADER, como evidencia de su pertenencia social a la región Mixe. Sin embargo, una vez conocido que el gobierno mexicano había otorgado en 2015 el Certificado de Cumplimiento con Validez Internacional, el grupo de investigadores del proyecto decidió publicar esa descripción varietal en una revista científica, dando el reconocimiento al carácter social de la propiedad intelectual del maíz nativo que ostenta el carácter FBNMO.

Se evaluó en campo la interacción entre el carácter FBNMO y las fertilizaciones con Nitrógeno, Fósforo, Potasio, el encalado agrícola y el uso de estiércol vacuno en dos localidades y dos años. Se usó un diseño factorial 2^4 con los factores estiércol vacuno, cal agrícola, N como urea y Fósforo como superfosfato triple. Se encontró que el efecto principal de N en



el diseño 2⁴ empleado fue positivo e igual a 0.93 t/ha en el rendimiento global de grano, como promedio de dos localidades en el año 2022. Este incremento se interpreta como una deficiencia de nitrógeno temprana en la planta por un bajo contenido de ese nutriente en el suelo mientras se activa el mecanismo de fijación de nitrógeno, o bien, que complementa una insuficiente aportación de nitrógeno atmosférico fijado dado el requerimiento total de la planta. También se evaluó la interacción entre el carácter FBNMO y la edafoclimatología, conduciendo pruebas exploratorias en las que se observó el comportamiento de ese carácter en lugares distantes de la Sierra Mixe con climas menos lluviosos y suelos morfológica y químicamente diferentes. En ellos se sembró el maíz nativo de la raza Olotón obtenido de productores cooperantes de Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca.

Los investigadores microbiólogos colaboradores del proyecto del Colegio de Postgraduados y del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM recolectaron muestras de las raíces adventicias y de sus mucílagos, así como de la rizósfera en cuatro localidades experimentales durante dos años, así como muestras de cultivo de maíz de productores vecinos que dieron su consentimiento. En los muestreos se dio atención especial a los tratamientos experimentales con las dosis de 0, 60 y 120 kg de N/ha.

A su vez, se procesaron muestras de variedades de grano blanco y amarillo. Se amplificó y secuenció la región V3-V4 del 16S ribosomal (16S rRNA-based metagenomics) de cinco plantas por variedad para conocer los grupos bacterianos que conforman la microbiota. El ADN se mezcló por variedad y se secuenció directamente (Shotgun metagenomics) para identificar los genes asociados a la fijación de nitrógeno y ensamblar genomas de las bacterias más abundantes. Adicionalmente, se analizó el suelo de las parcelas donde crecen estos maíces.

Los análisis de 16S ribosomal mostraron que las comunidades bacterianas son más parecidas entre mucílagos de la misma variedad; sin embargo, existen familias bacterianas que son dominantes en todas las muestras. Estas familias fueron Pseudomonadaceae, Oxalobacteriaceae, Rhizobiaceae, Sphingomonadaceae, Comamonadaceae, Azospirillaceae, Paenibacillaceae y Caulobacteriaceae. Se observó una mayor diversidad de grupos bacterianos en el suelo en comparación con el mucílago, sugiriendo que solo ciertas bacterias pueden consumir las fuentes de carbono provistas por las raíces adventicias y colonizar el mucílago. Las familias Comamonadaceae y Sphingomonadaceae también aparecieron en el suelo, por lo que este último podría ser su origen.

Pseudomonas y *Azospirillum* fueron los géneros más abundantes en las parcelas del maíz blanco y amarillo cultivadas por el grupo de Agronomía de este proyecto, en tanto que *Herbaspirillum* y *Rahnella* fueron predominantes en el maíz blanco cultivado por otros agricultores locales.

Se preparó un bioinoculante con seis especies de bacterias sobresalientes de entre más de 200 cepas aisladas del mucílago de dos variedades que poseen del carácter FBNMO en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca. Se encontró que una variedad nativa del productor colaborador de la raza Olotillo —diferente de la raza Olotón— en una localidad que dista unos 300 km de Totontepec intensificó el carácter FBNMO cuando fue bioinoculada. Esta



variedad no ha mostrado significativamente ese carácter de desarrollo de raíces adventicias durante los años en que ha sido manejada por el productor colaborador. En cambio, la variedad Olotón llevada de Totontepec lo exhibió con y sin bioinoculante en la misma localidad.

Durante los años 2022, 2023 y 2024 se hicieron siembras exploratorias de maíz nativo de la raza Olotón en tres localidades de regiones con altitudes entre 2000 a 2600 msnm, edafoclimáticamente diferentes y distantes de la Sierra Mixe, con y sin riego. La semilla original fue obtenida en el ciclo PV 2021 en Totontepec, Oaxaca. Se observó que la condición de alta humedad atmosférica durante el período V10 hasta VR1 fue necesaria y suficiente para que el maíz Olotón desarrollara raíces adventicias con mucílago, con y sin la presencia de riego. Los períodos de baja humedad atmosférica suspendieron la actividad de mucílago y desarrollo de raíces adventicias. Cabe señalar que estas plantas en estas siembras, no fueron bioinoculadas. La implicación es que el maíz de la raza Olotón fue capaz de reclutar del suelo la microbiota requerida para expresar el carácter FBNMO, y sólo fue limitada por la disponibilidad de alta humedad atmosférica.





Capítulo 3

Materiales y Métodos



Illustration of maize in the 1566 edition of the herbal of Dodonaeus



Materiales y Métodos



Hipótesis

“La microbiota funcional de la simbiosis con la planta de maíz Olotón en la fijación de nitrógeno atmosférico involucra un número indeterminado de especies de bacterias que funcionan en consorcio y que también involucran por lo menos a: (1) genes activos en antibiosis contra hongos y microbiota oportunista, (2) la producción reguladores de crecimiento y (3) la solubilización de fósforo inorgánico.

El código genético del maíz Olotón para la simbiosis es heredable y transferible a otras variedades nativas y modernas de maíz. El carácter Fijación Biológica de Nitrógeno del Maíz Olotón (FBNMO) interacciona con el uso de fertilizantes y mejoradores del suelo”.

Los supuestos del proyecto son:

- 1) El carácter FBNMO resulta de la simbiosis entre el maíz Olotón y bacterias diazotróficas que requieren condiciones microaeróbicas y el aporte de energía de la planta, así como de un mucílago exudado en sus raíces adventicias y condiciones atmosféricas de alta humedad en las etapas V10 a VR1.*
- 2) La parte de la simbiosis que juega el maíz es en sí un carácter de tipo cuantitativo que depende de muchos genes con alelos específicos que regulan rasgos morfológicos, así como fisiológicos que la planta aporta a la simbiosis. Los genotipos de maíz que no responden a la acción de la microbiota diazotrófica carecen de la combinación adecuada de aquellos alelos.*
- 3) La microbiota bacteriana asociada a ese carácter es reclutada del suelo y complementada con la microbiota acompañante interna de la semilla.*

Objetivo general

Lograr el reconocimiento nacional e internacional de la propiedad intelectual social Mixe del carácter fijación biológica de nitrógeno de la raza nativa de maíz Olotón de México y profundizar en el conocimiento sobre el carácter de fijación biológica de nitrógeno en maíz de la raza Olotón de la sierra Mixe, en las direcciones de la caracterización de la simbiosis

entre el fenotipo de maíz Olotón y la microbiota nativa responsable de la fijación de nitrógeno atmosférico y la interacción del carácter con fertilizantes sintéticos, estiércol de res, encalado y la edafoclimatología.

Objetivos específicos

- 1) Hacer la descripción varietal de la variedad nativa poseedora del carácter FBNMO y registrarla en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales, para lograr el título de obtentor social a favor de los productores de maíz de la Sierra Mixe.
- 2) Profundizar el estudio de la microbiota diazotrófica que acompaña al maíz nativo Olotón en simbiosis en las raíces adventicias y en el mucílago que lo recubre, así como en la rizósfera.
- 3) Estudiar la interacción entre el carácter FBNMO y la fertilización con NPK, estiércol vacuno y encalado.
- 4) Estudiar la herencia del carácter FBNMO y transferirlo a variedades nativas y modernas dentro de los límites edafoclimáticos del país similares a la Sierra Mixe.
- 5) Estudiar en campo, el efecto de la inoculación del maíz con bioinoculantes obtenidos del mucílago de las raíces adventicias en los años 2022 y 2023.
- 6) Estudiar de manera introductoria la interacción entre el carácter FBNMO y la edafoclimatología.
- 7) Conocer el nivel y el tipo de “saberes” de los productores Mixes con respecto al carácter FBNMO y su relación con los factores edafoclimáticos y antropológicos.
- 8) Llevar a cabo un día de demostración de campo a productores y a técnicos.

Planteamiento experimental

1. Descripción varietal.

Para la descripción varietal se instalaron dos parcelas con productores cooperantes en los ciclos agrícolas PV 2022 y PV 2023. Lo anterior se debió a la reglamentación para el registro de las variedades en el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) se requieren dos ciclos agrícolas. Se sembraron dos variedades de maíz Olotón, una blanca y la segunda amarilla. La siembra de maíz amarillo se realizó el 15 de abril de 2023. Cada parcela constó de 20 surcos de 10 m de longitud. Se les aplicó el tratamiento 34-34-34 de N, P₂O₅ y K₂O –como fertilizante triple 17– en la siembra. En cada mata se depositaron 4 semillas y posteriormente se realizó el aclareo, dejando únicamente 3 plantas. El deshierbe se realizó de manera manual, además del aclareo. En las etapas vegetativas V4-V6 (mes de mayo) se realizó la fertilización nitrogenada con 60 unidades de N en forma de urea. El arrimado de tierra se realizó inmediatamente posterior a la aplicación de fertilizantes.

Entre los 110 a 130 días se tomaron datos de 80 plantas (40 plantas de maíz blanco y 40 plantas de maíz amarillo) al azar, para la descripción varietal en plantas de maíz. Las variables se evaluaron de acuerdo con los formatos oficiales del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS-CP, 2010) y el formato de Descripción varietal para el



cultivo de maíz según la guía técnica de la Unión Internacional para las Obtenciones Vegetales (UPOV). Se registraron caracteres cualitativos (QL), cuantitativos (QN) y pseudocualitativos (PQ), para obtener expresiones agro-morfológicas propias de la variedad vegetal que permiten su identificación. En este documento únicamente se presentarán las variables más sobresalientes de la raza Olotón de las sesenta y nueve variables recomendadas por el SNICS.

A la descripción reglamentaria se añadió la descripción correspondiente a las raíces adventicias con actividad temporal en la producción de mucílago, en nudos consecutivos de abajo hacia arriba, su período de actividad, así como las características edafoclimáticas en las que ocurre la fijación de nitrógeno atmosférico en las raíces adventicias. Para modelar la probabilidad de presencia de mucílago en las raíces adventicias se realizó una prueba de distribución binomial normal y posteriormente mediante regresión lineal se empleó el modelo exponencial negativo propuesto por Schumacher (1939).

$$y = B_0 e^{-B_1(1/x)}$$

y= variable dependiente

x= variable independiente

e= exponencial negativa

B₀, B₁ = Parámetros de la regresión

2. Estudio de la microbiota diazotrófica aislada del mucílago de raíces adventicias aéreas y de grupos microbianos funcionales asociados a la rizósfera de maíz Olotón.

¿Cómo estudiar a los microbios benéficos asociados al maíz Olotón?

Resulta particularmente atractivo identificar las bacterias del mucílago porque es allí donde principalmente se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno. En maíces que no producen mucílago se ha reportado que también puede haber fijación de nitrógeno en las raíces del suelo. Por esto se aislaron y cultivaron tanto microorganismos del mucílago de raíces aéreas como de la rizósfera; además, no se restringió el análisis a bacterias y se incluyó también a los hongos. En general, se ha considerado que las bacterias asociadas a plantas son cultivables en el laboratorio, pero hay casos notables de pérdida de la capacidad para crecer en medios de cultivo sintéticos, esto se ha visto en las bacterias del género *Rhizobium* que forman nódulos en leguminosas templadas. En los nódulos de trébol o de la alfalfa, por ejemplo, las bacterias sufren un proceso de diferenciación terminal y se convierten en bacteroides. En ese estado se vuelven incapaces de crecer en medios de cultivo debido al daño que sufren en sus membranas por los péptidos antimicrobianos producidos por las plantas lo que afecta en su posterior crecimiento (Van de Velde *et al.*, 2010). En plantas de arroz y pastos Kallar, la bacteria fijadora de nitrógeno de vida libre, *Azoarcus*, también sufre cambios que la dejan sin capacidad de poder ser cultivada posteriormente en medios de cultivo sintético (Hurek *et al.*, 2002), y de lo que aún no se ha descrito cual pudiera ser la causa. En cavidades de los helechos acuáticos del género *Azolla*, donde se lleva a cabo la



fijación de nitrógeno, las cianobacterias *Anabaena azollae* también se vuelven no cultivables (Parente *et al.*, 2017). Con base en lo anterior, y para obtener un mejor recuento de las bacterias asociadas al maíz Olotón, se utilizaron los dos enfoques posibles para el inventario microbiano, uno dependiente y otro independiente de cultivo (Figura 3).



Figura 3. Enfoques metodológicos empleados para la caracterización bacteriana presente en el mucílago de las raíces aéreas de plantas de maíz Olotón cultivadas en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca.

Un recurso utilizado para obtener en cultivo una adecuada representación de las bacterias, refiere al uso de diversos medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono o nitrógeno y con diferentes niveles de oxígeno o de pH. Esta estrategia se siguió en este proyecto. El contar con cultivos bacterianos permite probar los efectos de estos en las plantas y hasta en animales. Además, los cultivos permiten realizar análisis funcionales de las bacterias y entender los posibles mecanismos que participan en la promoción del crecimiento vegetal como son la producción de hormonas vegetales, la síntesis de vitaminas, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y hasta la inhibición de patógenos.

Por otro lado, los enfoques independientes de cultivo han revolucionado a la microbiología, revelando una diversidad microbiana insospechada y a los protagonistas reales involucrados en distintos procesos biológicos. Estas estrategias parten de la obtención de ácidos nucleicos o proteínas totales directamente de la muestra, es decir, se recupera información de todos los microorganismos presentes y en ocasiones hasta del propio hospedero (Pérez-Cobas *et al.*, 2020). Para el maíz Olotón se empleó una técnica independiente de cultivo a base de ADN denominada metagenómica, que permitió conocer las especies bacterianas y también ensamblar los genomas de algunas de ellas y así conocer quienes tienen el potencial de fijar el nitrógeno del aire.



Colecta de muestras

Se tomaron muestras de plantas de maíz Olotón (variedad blanca y amarilla) en el mes de septiembre del 2022 y del 2023 en Totontepec en la Sierra Mixe de Oaxaca, México. Las parcelas analizadas correspondieron a aquellas que tenían solo la aplicación de fertilización nitrogenada: 0, 60 y 120 kg N ha⁻¹. Las raíces adventicias con mucílago (tercer nudo) se cortaron y colocaron en tubos estériles, y se preservaron en un recipiente con hielo hasta su procesamiento en laboratorio. Por su parte, el suelo de la rizósfera se recolectó directamente de las mismas plantas donde se recolectaron las muestras de mucílago, y se mantuvo en refrigeración hasta su procesamiento.

Con las muestras recolectadas del maíz Olotón, se prosiguió a los análisis microbianos correspondientes, que fueron conducidos en los laboratorios de los grupos de investigación del Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (CCG-UNAM), y del Colegio de Postgraduados (COLPOS).

Enfoque dependiente del cultivo: Aislamiento de las bacterias y detección de mecanismos de promoción de crecimiento vegetal

Para aislar a las bacterias fijadoras de nitrógeno del mucílago del maíz Olotón se utilizaron medios de cultivo semisólidos y sin nitrógeno en frascos (Baldani *et al.*, 2014). Se les agregó además los azúcares más abundantes que componen al mucílago como galactosa, fucosa, manosa, arabinosa, xilosa y el ácido glucorónico.

Esta estrategia ha sido comúnmente utilizada para el cultivo de fijadores de nitrógeno, pero es necesario resaltar que no es un medio estrictamente selectivo ya que bacterias que no son fijadoras de nitrógeno pueden crecer también, por lo que es necesario corroborar la fijación de nitrógeno mediante el ensayo de reducción de acetileno en cromatógrafo de gases. El acetileno es un gas que puede ser transformado a etileno por la nitrogenasa y esto nos indica que está activa.

El crecimiento de falsos positivos en los frascos puede deberse a las trazas de nitrógeno que se encuentran en el medio o al nitrógeno fijado y excretado por otras bacterias. Este último caso sería de interés pues permitiría identificar bacterias que no sólo fijen nitrógeno, sino que lo excreten también, lo cual es muy raro. Para obtener este tipo de fijadores se ha tenido que recurrir en otros laboratorios, a la modificación genética de bacterias que puedan excretar nitrógeno fijado y así beneficiar a las plantas. Las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas y otras que no lo fueron se identificaron a través del análisis del gen ARNr 16S. Se detectaron mecanismos de promoción de crecimiento vegetal *in vitro* como la solubilización de fosfatos y producción de auxinas (indoles).

Ensayos de antagonismo

En placas con medio de PY, se realizaron ensayos de antagonismo entre aislados de los mucílagos y los hongos *Fusarium oxysporum*, *F. incarnatum* y *F. subglutinans* que causan



la pérdida de campos enteros de maíz. En el centro de las cajas se colocaron esporas del hongo y a su alrededor colonias de la bacteria, pasada una semana de incubación a 30°C se revisó el crecimiento de ambos. Si las cepas lograban inhibir el hongo, este presentaba un crecimiento menor en comparación con un control sin bacteria.

Enfoque independiente del cultivo

Para el enfoque independiente de cultivo se obtuvo el ADN directamente de los mucílagos mediante el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) y las enzimas lisozima y proteinasa K (Sigma Aldrich). Se realizó dos tipos de análisis basados en secuenciación de nueva generación usando la tecnología de Illumina. Uno de ellos, conocido como análisis de amplicones del gen ARNr 16S, se vale de la síntesis por PCR de ese marcador molecular para conocer la identidad de las bacterias y en qué proporción se encuentran en una muestra. En el segundo enfoque se realizó la secuenciación completa del material genético total del mucílago. Esta estrategia cae en la categoría de metagenoma y es el tipo de estudios que permite describir el microbioma (conjunto de todos los genomas de una comunidad o ambiente), y entender de qué manera los microbios conviven con su hospedero. En especial se ha usado en los estudios de microbioma de humanos revelando nuevas funciones insospechadas de las bacterias en la salud y desarrollo (Kim *et al.*, 2024). Para poder analizar la gran cantidad de datos generados fue necesario usar herramientas informáticas y alto poder de cómputo con el fin de clasificar, ensamblar y anotar cada una de las secuencias.

3. Estudio de la interacción entre el carácter FBNMO y el uso de fertilizantes inorgánicos, estiércol y cal agrícola.

Se condujo un experimento en dos localidades del municipio de Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca para evaluar la respuesta de la variedad nativa de maíz de la raza Olotón a la interacción entre los fertilizantes N, P y K más la adición de estiércol vacuno y encalado. Estos experimentos fueron cosechados en el mes de enero de 2023, debido al largo ciclo de crecimiento de la variedad. El experimento consistió en un diseño factorial 2⁴ con las dosis de 0 y 60 kg/ha de N en forma de urea, 0 y 80 kg/ha de P₂O₅, 0 y 3 t/ha de estiércol vacuno seco y, 0 y 2 t/ha de cal agrícola. El fertilizante fosfórico, la cal agrícola y el estiércol vacuno se aplicaron en la siembra, el fertilizante nitrogenado fue aplicado en forma de urea durante el estadio V4 del cultivo (Hanway, 1966) —antes de la aparición de las raíces adventicias y la actividad del mucílago en la fijación de nitrógeno atmosférico que ocurre o se incrementa, a partir de la etapa V10—. Se usó el diseño de Parcelas Divididas en el que los factores Estiércol y Encalado se asignaron a las Parcelas Grandes y los fertilizantes N y P se asignaron a las Parcelas Chicas. El fertilizante potásico se mantuvo constante al nivel de 50 kg/ha en el Diseño 2⁴. También se incluyeron 4 tratamientos adicionales que exploraron la fertilización con potasio y las intensificaciones de los factores experimentales. En el **Cuadro 1** se enlistan los tratamientos que se mencionaron previamente.

Se ubicaron dos parcelas de productores cooperantes representando una, los terrenos planos, y la segunda a los terrenos de ladera. Para la preparación del suelo, se realizó el barbecho con apoyo de una yunta y herramientas menores. El diseño experimental fue de Parcelas Divididas como se muestra en el **Cuadro 1**. Las Parcelas Grandes estuvieron



Cuadro 1. Evaluación de la respuesta del maíz nativo Olotón a la interacción entre el uso de estiércol, cal agrícola y fertilizantes Nitrogenado, Fosfórico y Potásico en la Sierra Mixe, Oaxaca en los años 2022 y 2023.

Parcela Grande	Parcela Chica	Estiércol [§] t/ha	Cal [†] t/ha	N [‡] kg/ha	P ₂ O ₅ [¡] kg/ha	K ₂ O ^º kg/ha
1	1	0	0	0	0	0
1	2	0	0	0	80	0
1	3	0	0	60	0	0
1	4	0	0	60	80	0
2	1	0	2	0	0	0
2	2	0	2	0	80	0
2	3	0	2	60	0	0
2	4	0	2	60	80	0
3	1	3	0	0	0	0
3	2	3	0	0	80	0
3	3	3	0	60	0	0
3	4	3	0	60	80	0
4	1	3	2	0	0	0
4	2	3	2	0	80	0
4	3	3	2	60	0	0
4	4	3	2	60	80	0
Adicional	1	3	2	60	80	50
Adicional	2	3	2	60	80	100
Adicional	3	3	2	180	240	50
Adicional	4	6	4	180	240	50

[§]Estiércol seco, [†]Cal dolomítica, [‡]Urea con 46% N, [¡]Superfosfato triple con 46% de P₂O₅, ^ºCloruro de potasio con 60% K₂O

integradas por los factores encalado y uso de estiércol en un diseño factorial 2²; ambos se aplicaron en banda en el fondo del surco inmediatamente antes de la siembra y cubiertos superficialmente con suelo.

Las Parcelas Chicas estuvieron asignadas a un diseño factorial 2² con los factores Nitrógeno y Fósforo. El Fósforo fue aplicado inmediatamente antes de la siembra y el Nitrógeno en la etapa de desarrollo del maíz V4. Estas parcelas chicas fueron de 6 surcos de 6 m de longitud. El experimento tuvo 3 repeticiones. Se cultivó una población de la raza Olotón de color blanco en una localidad, y una de color amarillo en la segunda localidad. Las semillas de estas variedades nativas fueron aportadas por los productores colaboradores en el municipio de Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca, ciclo Primavera-Verano (PV) 2022. Ambas poblaciones de maíz nativas poseen el carácter FBNMO.



Se colectaron muestras de suelo de capa arable en recorrido en zig-zag y combinando el material de suelo en una muestra compuesta que fue procesada para el análisis de sus propiedades físicas, químicas, y de fertilidad. El análisis fue realizado por encargo, en el laboratorio Fertilidad de Suelos S.A. de C.V. ubicado en Poniente 6 núm. 200, Ciudad Industrial Celaya, Gto. CP 38010, www.fertilab.com.mx.

En el año 2023 fue necesario ajustar los tratamientos por dos motivos: 1) la decisión de incluir árboles frutales entre repeticiones, de acuerdo con el sistema Milpa Intercalada en Árboles Frutales (MIAF), con el fin de controlar la erosión en ladera y la posibilidad de incrementar el ingreso neto familiar, y 2) no fue factible conseguir estiércol de vacuno en la región, además de sustituir las dosis 0 y 60 kg de N/ha por 40 y 80 kg/ha en función de lo observado en el año anterior. En una de las localidades se sustituyó el estiércol vacuno por vermicomposta con las mismas dosis, quedando el diseño de tratamientos como el año anterior (**Cuadro 1**), excepto por el cambio ya mencionado en los niveles de nitrógeno. En la segunda localidad se sustituyó el factor estiércol vacuno o vermicomposta por el factor dosis de K_2O , debido a la indisponibilidad de ambos materiales orgánicos.

4. Estudiar la herencia del carácter FBNMO y su transferencia a otras variedades nativas y variedades mejoradas genéticamente.

En el ciclo PV 2022 se condujeron experimentos de campo en parcelas de productores para estudiar la herencia del carácter FBNMO e iniciar cruzamientos con otras razas y variedades modernas para iniciar el proceso de transferencia de ese carácter, siempre acompañándolos con la caracterización de la microbiota asociada. En poblaciones de maíz de la raza Olotón con la finalidad de estimar los parámetros genéticos, tipos de acción génica, heredabilidad del carácter de fijación biológica de nitrógeno y producción de mucílago en raíces adventicias, se utilizó el diseño genético dialélico 2 de Griffing (Martínez, 1998), que incluye a los progenitores y sus cruas directas. Se exploró la variabilidad genética de la raza Olotón que produce el mucílago, así como otras poblaciones que no lo producen, más variedades mejoradas modernas con adaptación a la localidad de Totontepec, también se incluyeron poblaciones de otras razas de maíz sin el carácter de FBNMO, y poblaciones Olotón de otros estados (Chiapas y Guerrero) sin el carácter de FBNMO, con la finalidad de determinar si el carácter es trasmisible. Con la información de la evaluación del dialélico se podrá identificar qué progenitor produce mayor cantidad de raíces adventicias y mucílago, si este carácter se incrementó en alguno de los cruzamientos y si se puede fijar en otro tipo de germoplasma. También la evaluación del dialélico debe hacerse en al menos tres localidades, para conocer si la expresión del carácter es restringida por la interacción genotipo-ambiente o bien, si se expresa en ambientes distintos y si se pueden incorporar otros germoplasmas nativos o bien, mejorados.

Actividades

E1. Planeación del dialélico

- Monitoreo y colecta de poblaciones de maíz nativo de la raza Olotón que presentan el carácter de FBNMO



- Colecta de poblaciones de maíz nativo de la raza Olotón que NO presentan el carácter de FBNMO (Oaxaca, Chiapas y Guerrero)
- Selección de variedades mejoradas modernas de Valles Altos para incluir en cruzas dialélicas
- Ubicación de terrenos, productores, y personal de apoyo para la conducción de lotes de polinizaciones controladas en 2022
- Capacitación a técnicos y personal interesado en realizar las actividades relacionadas con el diseño genético a implementar

E2. Obtención de cruzas dialélicas

- Establecimiento de parcelas para polinizaciones controladas
- Polinizaciones controladas para formar las cruzas dialélicas
- Manejo agronómico del cultivo
- Cosecha, beneficio y almacenamiento de la semilla obtenida del experimento dialélico
- Preparación de experimentos para 2023

E3. Evaluación de las cruzas dialélicas

- Establecimiento del experimento dialélico en tres localidades
- Manejo agronómico de los experimentos
- Recopilación de datos morfológicos y fenológicos en los experimentos
- Acompañamiento al equipo de microbiología para realizar muestreos y detectar actividad de FBNMO en los experimentos

E4. Análisis de información

- Análisis de la información del dialélico
- Estimación de parámetros genéticos
- Difusión de información
- Informe parcial

5. Uso de bioinoculantes experimentales procedentes del mucílago de plantas de maíz cultivadas durante los ciclos PV 2022 y PV 2023 en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca.

Desde hace más de 100 años se venden inoculantes que contienen bacterias fijadoras de nitrógeno, en especial aquellas que forman nódulos en la leguminosa soya. La soya es nativa de China y con su introducción a EEUU hacia finales del siglo XIX surgió la necesidad de inocular rizobios debido a que en EEUU no existían las bacterias con capacidad de formar nódulos en la soya. En Brasil ocurrió la misma historia, lo que impulsó el desarrollo y la venta de inoculantes. Lo que más destaca es que en Brasil hay un buen control de la calidad de los inoculantes (Santos *et al.*, 2019). Es de resaltar que en los sitios donde las bacterias fijadoras son nativas junto con la leguminosa, no hay una respuesta clara a la inoculación



(Santos *et al.*, 2019) ya que se ha observado que las bacterias inoculadas son desplazadas por las bacterias nativas del suelo. Sin embargo, la inoculación con cepas seleccionadas puede dar respuesta positiva en el crecimiento de las plantas (Pastor-Bueis *et al.*, 2019).

Recientemente se ha reconocido que los inoculantes que contienen más de una cepa o una especie bacteriana son mejores promotores del crecimiento de plantas (Alzate Zuluaga *et al.*, 2024). Por tal motivo se decidió formular un inoculante con múltiples especies. ¿Cómo seleccionar estas especies? Entre las bacterias cultivadas del mucílago del maíz Olotón se identificaron bacterias que se usan exitosamente como inoculantes y se escogió *Azospirillum*, *Methylobacterium* (actualmente designado *Methylorubrum*), *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Raoultella* y *Rahnella*. A continuación, se presentan algunas de sus características.

Azospirillum se aisló de plantas de maíz en Brasil en 1974 como *Spirillum lipoferum* (Beijerinck) y claramente destacó por su gran capacidad para reducir acetileno en vida libre en ensayos en medios semisólidos (Dobereiner y Day, 1976). Sin embargo, su contribución se atribuye a su alta producción de hormonas vegetales principalmente auxinas (Zimmer y Bothe, 1988; Fukami *et al.*, 2018). *Azospirillum* promueve la proliferación de raíces de manera considerable (Tien *et al.*, 1979). Por su gran capacidad para producir auxinas se estudiaron las bases genéticas y se descubrió que existen tres diferentes vías biosintéticas en *Azospirillum* (Van de Broek y Vanderleyden, 1995), además se han generado variantes de *Azospirillum* con una capacidad aumentada para producir auxinas (Spaepen *et al.*, 2008) de las cuales se requiere inocular una menor cantidad de bacterias en campo. La inoculación de *Azospirillum* ha probado dar incrementos en rendimiento en cereales y se reportó una evaluación de los efectos positivos de su inoculación en diversos trabajos realizados en un periodo de 20 o 30 años (Okon y Labandera-Gonzalez 1994; Cassán *et al.*, 2020). Los incrementos en rendimiento en cereales son en promedio del 10%, un incremento parecido al 11% que se observó en soya en co-inoculación con *Azospirillum* (Hungria *et al.*, 2013). En el laboratorio en un ensayo de expresión genética de un consorcio bacteriano artificial se encontraron expresados los genes de nitrogenasa de *Azospirillum* y además, reducción de acetileno por *Azospirillum* en plántulas de un maíz nativo (Gómez-Godínez *et al.*, 2019). Distintas especies de *Azospirillum* se han obtenido de plantas de maíz (Gandhimaniyan *et al.*, 2020; Shilpa *et al.*, 2022).

Las metilobacterias se encuentran muy comúnmente en hojas como epífitas y endófitas (Corpe y Rheem, 1989). Estas bacterias de coloración rosa se conocen desde 1976 (Patt *et al.*, 1976) y recientemente algunas de estas se han reclasificado como *Methylorubrum* (Green y Ardley 2018). La característica más sobresaliente es que se alimentan del metanol producido como compuesto secundario en la síntesis de la pared celular de plantas. Los genes que codifican a las enzimas responsables de la degradación de metanol y de otros compuestos de un carbono se han estudiado (Lau *et al.*, 2013; Vorholt *et al.*, 2000). También es notable que las metilobacterias producen diversas citoquininas (a partir de tRNAs) y en un tiempo se consideró la hipótesis que las citoquininas de plantas eran de origen bacteriano (Holland, 1997). Además, las metilobacterias producen auxinas principalmente el ácido indol acético (Alessa, 2021) y vitamina B12 (Dudko *et al.*, 2023). Estas bacterias son promotoras del crecimiento en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, también en *Medicago truncatula* y en muchas otras plantas. Tal vez sus efectos más claros son en los musgos y se supone que es una simbiosis ancestral (Kutschera 2007). En caña de azúcar pueden estimular el



número de internodos, la elongación de las hojas y el rendimiento, y los efectos dependen en parte del sitio de inoculación. Con una inoculación en múltiples sitios de las plantas se obtuvieron los mejores resultados en caña de azúcar (Madhaiyan *et al.*, 2005). No se ha explorado si existe especificidad por plantas, pero se reconoce que distintas plantas y sus metabolitos ejercen una selección sobre las metilobacterias (Knief *et al.*, 2010). Además, se ha descrito una variedad amplia de especies de metilobacterias en relación con la especie de planta. Por otro lado, se propuso que el re-aislamiento continuo de cepas de metilobacterias de cultivos en campo puede redituarse en conseguir simbiontes más competitivos, es decir, se propone que sean las plantas las que seleccionen a los mejores simbiontes. Se elaboró una propuesta semejante para la selección de mejores cepas de nódulos (Martínez *et al.*, 2016). Cabe señalar que se venden productos comerciales con metilobacterias como inoculantes, principalmente para soya.

Pseudomonas puede producir incrementos en el crecimiento de plantas y es capaz de antagonizar patógenos (Singh *et al.*, 2022). Estas bacterias pueden producir auxinas, sideróforos y una diversidad grande de metabolitos secundarios que varían con la especie y hasta de cepa a cepa. También destaca su habilidad para solubilizar el fósforo del suelo a través de la liberación de ácidos orgánicos y fosfatasa (Kalayu, 2019). *Pseudomonas fluorescens* alcanzó gran popularidad por su capacidad de inhibir hongos (Ganeshan y Manoj 2005) y otras *Pseudomonas* también tienen esta capacidad (Harrison *et al.*, 1991; Agarwal *et al.*, 2018). En un caso, la nodulación de plantas leguminosas disminuyó por *Pseudomonas* sp. al inhibir al rizobio y pudieran también inhibir a otras bacterias.

El género *Janthinobacterium* ha generado reciente interés como promotor de crecimiento vegetal, y debido a su capacidad antifúngica (Haack *et al.*, 2016), puede inhibir el crecimiento del oomiceto *Pythium ultimum* y del hongo *Rhizoctonia oryzae*. Cuando *Janthinobacterium* es inoculado en suelo protege a las plantas del desarrollo de las enfermedades producidas por estos fitopatógenos (Yin *et al.*, 2021).

El género *Raoultella* es ubicuo en el suelo y es común encontrarlo asociado a los tejidos de las plantas. Muchas de sus especies estaban clasificadas inicialmente como *Klebsiella*, con quien comparte la capacidad de producir exopolisacáridos y de fijar nitrógeno en vida libre (Drancourt *et al.*, 2001). Se ha sugerido que ambos géneros sean nuevamente unificados debido a la alta similitud a nivel genómico y metabólico que se presenta entre ellos (Ma *et al.*, 2021). *Raoultella* también puede fijar nitrógeno asociado a plantas, como se ha demostrado en caña, en donde es capaz de revertir los síntomas de deficiencia nutrimental en condiciones libres de nitrógeno (Luo *et al.*, 2016). Algunas cepas de *Raoultella* solubilizan fosfatos y producen ácido indol acético (Xu *et al.*, 2019).

Algunas especies de *Rahnella* se han aislado de raíz, tallo y hojas de maíz (Montañez *et al.*, 2012), y se han encontrado asociadas a pinos (Li *et al.*, 2013), incluso en los insectos descortezadores que se alimentan de pinos (*Dendroctonus*) se ha reportado a *Rahnella* como simbionte dominante de los intestinos (Pineda-Mendoza *et al.*, 2022). Estas especies son fijadoras de nitrógeno, pero suelen destacar más por su elevada capacidad para capturar hierro mediante sideróforos de tipo catecolato e hidroxamato, específicamente enterobactina y rizobactina (Kong *et al.*, 2022). La inoculación con *Rahnella aquatilis* en planta ha llevado a un incremento en la absorción de hierro (Kong *et al.*, 2020). Además, algunas cepas



producen la enzima ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) desaminasa, enzima clave en la reducción del estrés de plantas de maíz creciendo en salinidad (Peng *et al.*, 2019).

Pruebas de efectividad biológica de las bacterias del maíz Olotón

Un primer acercamiento en la evaluación de la actividad promotora del crecimiento vegetal de estas seis cepas, individual y en combinaciones, se realizó con plantas *Arabidopsis thaliana* en condiciones *in vitro* y en maíz Olotón creciendo en macetas con sustrato. *Arabidopsis thaliana* se ha utilizado para evaluar los efectos de bacterias debido a su rápido ciclo de vida y a su tamaño muy pequeño que permite mantener muchas plántulas en caja Petri con agar y un medio definido al que se le adiciona una fuente de nitrógeno y de carbono (Desbrosses *et al.*, 2009). Bajo estas condiciones no es posible evaluar la capacidad bacteriana para fijar nitrógeno, pero si se puede reconocer los efectos de hormonas o de otras sustancias promotoras del crecimiento de hojas, tallos o raíces. Para ello, las semillas de *A. thaliana* Col-0 se desinfectaron superficialmente y luego se germinaron en placas con medio Murashige Skoog (MS) 0.2X p.H 5.7. En placas magenta, las plántulas se colocaron en la parte superior y unos 5 cm abajo, se inocularon con una suspensión (D.O. 600nm, 0.6) de la cepa a evaluar. En estos ensayos las plantas en interacción con la bacteria se mantuvieron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo (16h:8h, luz:oscuridad) y temperatura controlada (24°C). Pasado 10 días se comparó el desarrollo de la planta y de sus raíces con el tratamiento de la planta sin inocular.

Para evaluar el efecto promotor del crecimiento vegetal de estas bacterias en el maíz Olotón, se diseñó un bioinoculante para su aplicación en campo. En el laboratorio, cada cepa se cultivó en placas con medio PY por 48-72h a 30°C. Se colectó la biomasa y se prepararon suspensiones individuales en $MgSO_4$ (10mM) a una concentración promedio de 5.6×10^9 células bacterianas/mL. Las suspensiones se mezclaron en partes iguales y se diluyeron en agua purificada. Un paso importante para mejorar el efecto del inoculante es asegurar que las bacterias se impregnen en las semillas. Se usó grenetina hidratada como agente adherente, que ha mostrado resultados satisfactorios para unir bacterias y hongos a los granos de maíz (Márquez-Licona *et al.*, 2018). Cada kilogramo de semillas se sumergió en un litro de bioinoculante y se dejó reposar por una noche a temperatura ambiente. Las semillas se recuperaron y se dejaron secar hasta su siembra.

Los experimentos en campo se condujeron en dos localidades. La primera fue en San Bernardino Teotitlán de Flores en La Cañada, Oax. y el segundo en Totontepec Villa de Morelos, Oax. Ambas localidades están distantes unos 300 km entre sí en línea recta (favor de consultar la **Figura 1**). En la localidad San Bernardino se usó la variedad nativa del productor cooperante, que es de la raza Olotillo y la variedad nativa de Totontepec, de la raza Olotón. En la localidad de Totontepec se comparó maíz nativo de la raza Olotón variedad blanca y variedad amarilla, ambas locales aportadas por los productores cooperantes. En ambos experimentos se empleó un diseño factorial 2^3 en parcelas divididas. Las cuatro parcelas grandes se destinaron a las variedades nativas con y sin el bioinoculante; las parcelas chicas se asignaron a dos niveles de fertilizante nitrogenado sintético (urea), 0 y 60 kg N/ha, manteniendo constantes las dosis de P_2O_5 (80 kg/ha) y de K_2O (50 kg/ ha) (**Cuadro 2**).



Se colectaron muestras de suelo de capa arable en recorrido en zig-zag y combinando el material de suelo en una muestra compuesta que fue procesada para el análisis de sus propiedades físicas, químicas, y de fertilidad por localidad. Este análisis fue realizado por encargo, en el laboratorio Fertilidad de Suelos S.A. de C.V. ubicado en Poniente 6 núm. 200, Ciudad Industrial Celaya, Gto. CP 38010, www.fertilab.com.mx.

Cuadro 2. Lista de tratamientos sobre bioinoculantes, variedad y fertilización con NPK conducido en dos localidades del Estado de Oaxaca en el ciclo PV 2024.

Número	TPG [‡]	TPCh	Variedad [§]		Inoculante	N-P ₂ O ₅ -K ₂ O
			San Bernardino	Totontepec		
1	1	1	OA	OA	SIN	0-80-50
2	1	2	OA	OA	SIN	60-80-50
3	1	3	OA	OA	CON	0-80-50
4	1	4	OA	OA	CON	60-80-50
5	2	1	L	OB	SIN	0-80-50
6	2	2	L	OB	SIN	60-80-50
7	2	3	L	OB	CON	0-80-50
8	2	4	L	OB	CON	60-80-50
Tratamientos adicionales						
A1			OA	OA	CON	60-0-0
A2			OA	OA	CON	120-80-50
A3			L	OB	CON	60-0-0
A4			L	OB	CON	120-80-50

§OA es variedad Olotón Amarillo traído de Totontepec Villa Morelos, Oax., L es la variedad del agricultor de San Bernardino Teotitlán, Oax., OB es variedad Olotón de color blanco, traído de Totontepec Villa de Morelos. ‡TPG significa Tratamiento de Parcela Grande; TPCh significa Tratamiento de Parcela Chica.

6. Efecto de la Interacción edafoclimatológica sobre el carácter FBNMO.

Durante los ciclos de cultivo PV 2022, PV 2023 y PV 2024 se cultivó la variedad de maíz amarillo cosechada en el ciclo PV 2021 en Totontepec, Oaxaca en tres localidades alejadas de la Sierra Mixe. El objetivo fue observar su comportamiento en condiciones edáficas y climáticas diferentes a Totontepec Villa de Morelos Oax. Las localidades fueron 1) Campo Experimental Valle de México bajo riego, en el municipio de Texcoco con precipitación media anual de 686 mm, en un suelo del orden Luvisol; 2) Universidad Intercultural del Es-



tado de México bajo el sistema de punta de riego, con precipitación promedio de 850 mm anuales, en un suelo del orden Vertisol; 3) la localidad San Miguel Tianguizolco, municipio de Huejotzingo, Puebla en un Regosol bajo temporal con humedad residual y precipitación anual promedio de 1270 mm. Las tres localidades se ubicaron en altitudes entre 2000 y 2600 msnm. La semilla original fue proporcionada por un productor colaborador de Totontepec y cosechada y sembrada anualmente en cada localidad. El ciclo muy tardío de la variedad nativa Olotón ubicó su floración después de la temporada de floración de los maíces locales, por lo que desarrolló sin interacción genética entre razas de maíz. La densidad de población fue de 37,500 plantas/ha con matas de 3 plantas distanciadas 1 m entre sí, en surcos de 90 cm. No se aplicaron fertilizantes sintéticos.

Se colectó muestras de raíces adventicias y mucílago para evaluar las especies de bacterias presentes, en comparación con las colectadas en Totontepec en los mismos maíces de la raza Olotón.

7. Componente socioeconómico.

Los investigadores de la UACO y la UAM-X plantearon un trabajo de formación en prácticas investigativas, así como de asistencia técnica para incrementar la producción de esta raza de maíz. Asimismo, se planteó realizar actividades para fortalecer los programas en el Centro Universitario Comunal de Tlahuitoltepec y de involucrar los miembros de las comunidades en la Sierra Mixe en la defensa de este importante patrimonio biocultural. A la vez, se esperaba su colaboración social con los especialistas que realizarán trabajos de laboratorio y exploración genética, y de experimentación agronómica.

En la colaboración de la UAM-X con la UACO, parte sustantiva de este proyecto es la sistematización de los conocimientos culturalmente construidos e históricamente mantenidos, que tienen los sabedores en torno a la producción del maíz en general y del Olotón en particular. La participación de la UACO, que cuenta con el reconocimiento comunal, mediante la presencia de sus investigadores, estudiantes y comuneros, permitirá recuperar en idioma Ayuujk, saberes de los especialistas propios, a la vez que se realiza el proceso de producción del maíz Olotón en parcelas de productores cooperantes en Santa María Tlahuitoltepec, en el que participarán, estudiantes, comuneros e investigadores de la UACO. La información recuperada de los sabedores posteriormente sería traducida al idioma español. Como lo ha hecho desde los inicios del proyecto, la UAM-X seguirá apoyando estos esfuerzos, aportando materiales académicos y procesos metodológicos para fortalecer el trabajo institucional de la UACO.

En colaboración con las autoridades municipales y de las Agencias Locales en la región, se planteó convocar asambleas y reuniones para la difusión del proceso, abriendo canales para la participación de la población en las actividades, asegurando una amplia difusión de los resultados y su importancia. Asimismo, se buscarán mecanismos para canalizar algunos de los beneficios económicos resultando de las investigaciones para contribuir al bienestar en la región.



Capítulo 4

Resultados



Illustration of maize in the 1566 edition of the herbal of Dodonaeus



Resultados



1. Descripción varietal.

A continuación, se presentan las características más sobresalientes de dos variedades de maíz Olotón de acuerdo con el catálogo del SNICS. El 100% de las plantas para ambas variedades presentan en su primera hoja coloración de vaina por antocianinas muy fuerte, y las hojas muy alargadas de 5.5 cm y muy anchas de 1.7 cm. En esta raza de maíz es común observar fuerte coloración por antocianinas en las vainas y en las hojas en las etapas iniciales de las plantas (hasta V3), que es código genético particular de la planta (Figura 4).



Figura 4. Plantas de maíz Olotón variedad blanca y amarilla con presencia de antocianinas en las primeras etapas fenológicas.

Las características fenotípicas de hojas que se registraron en la antesis son muy parecidas en las dos variedades; la forma de la hoja justo arriba de la mazorca superior varía de curva a ligeramente curva para ambos materiales. El ángulo entre la hoja y el tallo justo en la mazorca superior es curvo, mientras que los ángulos formados entre la nervadura central y el eje del tallo de la hoja superior e inferior de la mazorca principal se mantienen en ángulo recto con margen laminar ligeramente ondulados. La coloración de la lámina en la hoja de la mazorca principal es verde oscuro. Lo anterior significa que la expresión de estas variables en la raza Olotón, no es afectada de manera diferencial en ambientes contrastantes o manejo agronómico particular (Ángeles-Gaspar *et al.*, 2010; Cervantes Ortiz *et al.*, 2014) y se puede inferir que estas características están gobernadas por la misma raza de maíz.

El maíz amarillo no presentó plantas con arrugas longitudinales en la hoja, y el maíz de color blanco 70% de las plantas presentan esta característica en las hojas. Para coloración de la vaina en la hoja de la mazorca y en las tres primeras hojas de la base del tallo, se observó en promedio, que el 85% de las plantas son de coloración morada, es decir con alto porcentaje de antocianinas en las vainas de las hojas. La coloración de la aurícula en la hoja de la mazorca principal el 100% de las plantas fue verde pálido. A diferencia de la presencia de pubescencia sobre el margen de la vaina de la hoja de la mazorca principal fue muy abundante en maíz amarillo e intermedia para maíz blanco. La diferencia significativa entre las variables y la variación entre los caracteres, indica la existencia de diversidad y posible introgresión en las variedades evaluadas (Ángeles-Gaspar *et al.*, 2010). Otra característica muy visible en las plantas de maíz raza Olotón es que llegan hasta la etapa vegetativa V18, es decir 18 hojas verdaderas o completamente expandidas.

Respecto al tallo de las plantas presentan las siguientes características: los maíces blancos el 60.4% de las plantas presentaron zigzagado ligero y en el resto de las plantas, esta característica fue ausente al igual que todas las plantas de maíz de grano amarillo. No se observó el desarrollo de macollos (ahijamiento) en las dos variedades. No hubo diferencia en las variables de entrenudos superiores e inferiores de las plantas, la altura de mazorca que comprende desde la superficie del suelo hasta el nudo de inserción de la mazorca principal y altura de la planta. Los entrenudos presentaron niveles muy largos de 16.60 y 21.07 cm, respectivamente. Lo anterior se debe a la altura promedio que alcanzan las plantas de hasta 3.5 m y altura de inserción de la mazorca superior de 2.2 m (Figura 5). El promedio de altura de plantas de maíz Olotón (amarillo y blanco) supera la máxima categoría considerada por el SNICS (2010) y la UPOV como plantas muy largas; por lo tanto, para una descripción más precisa, sería conveniente considerar alguna adecuación del manual de descriptores debido



Figura 5. Altura de planta de maíz amarillo raza Olotón en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca. A la izquierda la M.C. Arely Ramírez Aragón con un estadal de 5 metros de altura y a la derecha el Dr. Aarón Martínez con un estadal de 4 metros de altura.



a que ambas variedades evaluadas son plantas muy altas y de ciclo largo a diferencia de otros maíces nativos que se reportan en México que son menores de 3 m de altura.

Por lo anterior, queda por realizar trabajos de mejoramiento genético de las plantas a través de cruzamiento o selección para reducir la altura de inserción de la mazorca y la altura de plantas que permita amortiguar los problemas de relacionada con el acame, como es el caso del maíz Olotón que es de ciclo largo y alcanza alturas superiores a 3.5 m. La relación de inserción de la mazorca/altura de planta puede disminuir el centro de gravedad de la planta, que provoca problemas de acame (Li *et al.*, 2007).

La coloración de antocianinas en raíces adventicias es fuerte y muy fuerte para el maíz de grano blanco y amarillo, respectivamente, aunque existe un número considerable de plantas que son tenues. Las raíces adventicias están asociadas con la presencia o ausencia de mucílago en las plantas. En la **figura 6**, se muestra que cuando el número de plantas observadas es igual a 15 se interpreta como que la probabilidad de que las plantas manifiestan presencia de mucigel en las raíces adventicias en etapa V10 y V12 (71 a 95 días posteriores a la siembra) es menor de 50%.

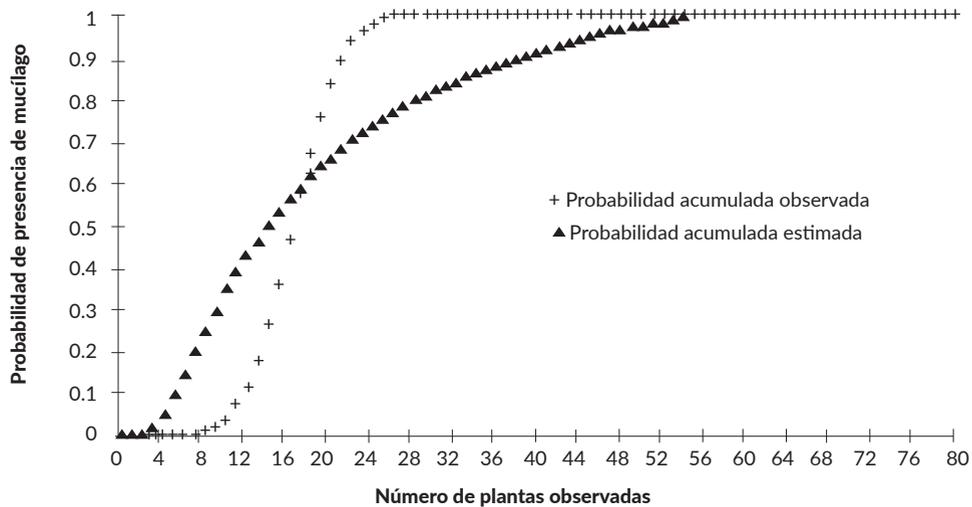


Figura 6. Modelo de regresión para estimar presencia de mucigel en raíces adventicias de plantas de maíz Olotón.

Este modelo de regresión representa la presencia de mucílagos en las plantas observadas y alcanzan su punto máximo de acumulación durante las etapas V12 a V15 (95 a 119 días posteriores a la siembra) en que existe una probabilidad de más del 50% de las plantas (55 de 80) presenten mucigel en sus raíces adventicias. Este exudado cubre parte de la raíz en el inicio (**Figura 7a**); mientras transcurren algunos días emerge con mayor contenido de mucílago hasta cubrir completamente la raíz adventicia o exceder el largo de 3-4 cm aproximadamente el mucigel (**Figura 7b**); sin embargo, posterior en la etapa de antesis (VT)



es menor la probabilidad de encontrar plantas con mucílago al menos en el cuarto y tercer nudo, las raíces se marchitan y dejan de producir mucílago. Sin embargo, las raíces adventicias secundarias (pelos radicales) producen pequeñas cantidades de mucílago menor a 1cm desde la base al ápice de la raíz (Figura 7c) y pueden llegar a producir hasta 0.5 mL de mucílago (Pankievicz *et al.*, 2022).

Para el número de 54 plantas observadas, la probabilidad es mayor del 50% en que todas las plantas presenten mucigel en sus raíces adventicias desde la etapa V12 a V15 (95 a 119 días posteriores a la siembra) este exudado cubre parte de la raíz en el inicio (Figura 7a); mientras transcurren algunos días emerge con mayor contenido de mucílago hasta cubrir completamente la raíz adventicia o exceder el largo de 3-4 cm aproximadamente el mucigel (Figura 7b); sin embargo, posterior a la etapa de antesis (VT) es menor la probabilidad de encontrar plantas con mucílago al menos en el cuarto y tercer nudo, las raíces se marchitan y dejan de producir mucílago. Sin embargo, las raíces adventicias secundarias (pelos radicales) producen pequeñas cantidades de mucílago (menor a 1 cm) desde la base al ápice de la raíz (Figura 7c) y pueden llegar a producir hasta 0.5 mL de mucílago (Pankievicz *et al.*, 2022).



Figura 7. Presencia de mucílago en raíces adventicias en plantas de maíz Olotón. a) inicia la presencia de exudado, b) mayor exudado radical, c) etapa de finalización de mucílago.

Pankievicz y colaboradores (2022), describen que las raíces adventicias más jóvenes producen más mucílago y tienen la capacidad de secretar de 1.5-2.0 mL de mucigel; además, mencionan que existe una correlación de la raíz con el grosor de ésta; entre mayor es el diámetro mayor producción de mucigel habrá. Otros autores, recientemente describieron la presencia de mucílago no solo en raíces adventicias, sino también, aunque en menor cantidad, en raíces subterráneas (Nazari *et al.*, 2020); mientras que Galloway *et al.* (2020) encontraron mucílago en pelos radiculares de las raíces adventicias en maíz de la Sierra Mixe de Oaxaca.



Existe un periodo de aproximadamente 48 días en que hay presencia de exudado radical en plantas de maíz Olotón, se registraron en promedio hasta cinco nudos con raíces adventicias. El periodo de presencia del mucílago coincide con una etapa de humedad en los meses de julio y octubre, y con mayor precipitación en el mes de julio y principios de septiembre; en este periodo se registró en promedio 250-300 mm de lluvia; con temperaturas máximas de 22.8°C y mínimas de 15.4°C en la localidad de Totontepec Villa de Morelos.

En cuanto a la floración de las plantas existe una amplia variación entre el maíz amarillo y blanco, en promedio la floración masculina fluctúa entre 105 a 135 días y cuando el 50% de las plantas se encuentran liberando polen en el tercio medio del eje principal de la espiga, ocurre de 120 a 125 días y la floración femenina ocurre entre 110-140 días y cuando el 50% de las plantas muestran estigmas de más de 1 cm de longitud, 125 a 130 días después de la siembra. La CONABIO (2022) reporta para maíz Olotón la floración masculina entre 95 a 115 días. Torres-Morales (2022) reporta para maíz Olotón 140 días a floración masculina y 146 días a floración femenina, lo que sobrepasa a los días en que se presentó en Totontepec Villa de Morelos, aunque coincide en que pertenece al grupo de maduración tardía de zona templada de Oaxaca y Chiapas (Barrera-Guzmán *et al.*, 2020). Un factor determinante para una buena producción es la adecuada polinización, sin embargo, en estas variedades de maíz se observó que en ocasiones no existe una buena sincronización entre floración masculina y femenina, es decir, las plantas emiten los jilotes después de que las espigas ya no presentan anteras y polen, entonces éstas son polinizadas o no, por plantas vecinas, razón por lo que se le atribuye la gran variabilidad genética. Lo anterior ocasiona en gran medida la presencia de plantas jorras (estériles) en las parcelas.

No hubo diferencias entre las variables de espiga en las poblaciones de maíz Olotón, en promedio, las características fenotípicas cualitativas sobresalientes en los maíces fue el cubrimiento de la hoja bandera de la espiga en un 90% ausente; la presencia de antocianinas (90%) en base de las glumas en una tonalidad muy fuerte. En las glumas excluyendo la base alrededor del 70% de las plantas presenta una intensidad fuerte de antocianinas, para las demás plantas se presentó variación de entre débil y fuerte. Para la coloración de antocianinas en anteras se observó gran variación, que va desde la ausencia (13%), débil (18.8%), medio (27.5%), fuerte (23.2%) y muy fuerte (17.5%) en las anteras frescas del tercio medio del eje principal de la espiga. En el tercio medio del eje principal de las espigas se observó que el total de las plantas evaluadas el 71% presentan alta densidad de espiguillas, y el 29% de las plantas mostró una densidad media de espiguillas (Figura 8). La forma definida por el ángulo de la espiga en el 50% de plantas descritas fue compacta de entre 21° y 40°, con posición de ramas laterales ligeramente curvas, con un número intermedio de ramas laterales primarias de 7 a 10 ramas. Ambas poblaciones presentan panoja de longitudes largas mayor a 40 cm y longitud del eje principal por encima de la rama más alta mayor a 27 cm, pedúnculos cortos entre 5-12 cm (90% de las plantas), ramas laterales con longitudes mayores entre 10 a 12 cm de largo.

Del jilote principal, la coloración por antocianinas en los estigmas (Figura 8), en promedio de las dos variedades, el 82% de las plantas mostró una intensidad de coloración fuerte, y el 18% con variación entre muy fuerte, intermedia y tenue. La coloración de la base del estigma es amarilla en 61% de las plantas de maíz blanco, mientras que el 39% corresponde a color rosa. En maíz amarillo el 85.42% son de coloración amarilla y el resto de color rosa.





Figura 8. Características de la espiga y jilote de maíz Olotón.

En la raza Olotón se observó la acumulación de antocianinas prácticamente en la planta completa, independientemente del genotipo.

En variables de mazorca, en el pedúnculo de la mazorca, distancia comprendida desde el nudo de inserción en el tallo, hasta la base de la mazorca (cm), en promedio de las dos variedades se observó que el 73.14% de las plantas tuvieron longitudes cortas que varían de 5.5 a 13.8 cm, mientras que el 18.74% son muy cortas, 6.32% medias, 1.35% largas, y 0.45% muy largas. La mayoría de las plantas presentan mazorca cortas, medias y largas, en términos porcentuales en promedio las dos variedades el 23.5% presentan longitudes de 10.4 a 15 cm, el 59.4% miden entre 15.1 a 20 cm, el 17.4% de 20.2 a 25 cm, que comprende desde la base al ápice de la mazorca. El diámetro central de las mazorcas mostró diferencia significativa. Se



Figura 9. Mazorcas de la raza Olotón variedad de grano amarillo y variedad de grano blanco.



destaca el maíz blanco con 76% de las mazorcas con diámetro medio de 41 a 50 mm de grosor, y en el maíz amarillo únicamente el 55% presentaron esta característica y con mazorcas más delgadas en un 38% que miden entre 31 a 40 mm en el tercio medio de las mazorcas. Para ambas poblaciones, el 66.14% de las plantas presentaron mazorcas cónicas-cilíndricas, el 10.16% cónicas y el 23.70% fueron cilíndricas.

Características del grano. La disposición de hileras de granos en la mazorca, en promedio el 51.24% fue recta, el 33.86% en espiral y el 14.90 de tipo irregular, aunque hay que destacar que una de las características peculiares de esta raza es por presentar una base ligeramente abultada por lo que generalmente se observa que la disposición de hileras en la base la distribución es irregular y conforme avanza al tercio medio y tercio superior de la mazorca las hileras se acomodan de forma regular, recta o en espiral, según corresponda. El número de hileras de granos en las dos variedades es muy escaso, en promedio el 80% de las mazorcas presentan de 8 a 10 hileras y únicamente el 20% presentan 12 hileras de granos por mazorca. Tanto para maíz amarillo y blanco el 70% de las mazorcas tienen de 21 a 30 granos en sus hileras, un 30% presentan de 31 a 38 granos en las hileras, por lo tanto, se encuentran en la categoría de granos por hileras intermedios y numerosos de acuerdo con el UPOV.

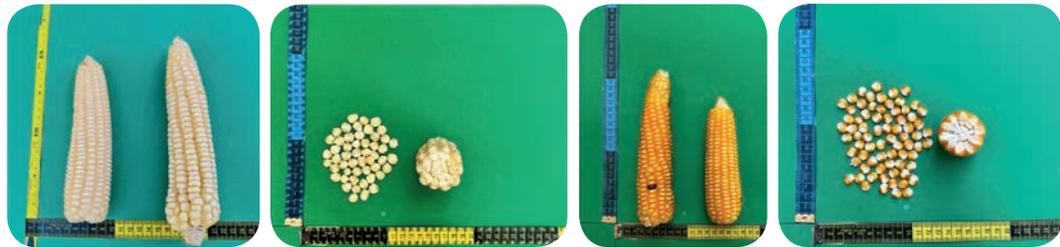


Figura 10. Mazorcas y granos de las variedades de grano blanco y variedad de grano amarillo.

El tipo de grano en el tercio central de la mazorca, en maíz amarillo el 67% es de tipo cristalino, 33% es de tipo semicristalino, a diferencia del maíz grano blanco, el 57% son de tipo semicristalino y el resto corresponde a cristalino. El color del grano en el tercio central de la mazorca en maíz blanco el 95% fue de blanco cremoso y el resto presentó coloración amarillo claro, lo cual indica posibles cruzamientos entre las variedades nativas. En el maíz amarillo la coloración del grano fue de amarillo-naranja (oscuro) en un 50.23% de las mazorcas, el 14.03%, 30.7%, 4.53% de color amarillo claro, amarillo medio y naranja, respectivamente. Existe una fuerte variación en la coloración dorsal del grano amarillo, el 51.13% presentan coloración amarillo-oscuro, el 30.32% en amarillo-medio, el 13.57% amarillo-claro, 3.17% naranja y el 1.81% rojo-naranja. Respecto al maíz blanco, presenta una coloración blanco cremoso en un 95% de las mazorcas, el resto presenta entre amarillo-claro y amarillo-naranja. En color del endospermo en maíz blanco el 95.5% presenta la misma coloración y el 4.5% son de color amarillo, mientras que el maíz amarillo el 67.87% son de color naranja, el 21.72% amarillo y 10.41% presenta coloración blanca. Finalmente, la corona del pericarpio es aleatoria; en promedio, el 74% de las variedades son de forma hendida y el 26% convexa. Sin coloración por antocianinas en las glumas de los olotes en las dos variedades.



Estos agrupamientos descritos, demuestran la extensa variación fenotípica (Aguilar-Castillo y Carballo-Carballo, 2006) de la raza Olotón y probablemente se debe al flujo genético entre los materiales nativos presentes en el polígono, la recombinación constante y la amplificación de algunas características fenotípicas de la raza (Johannessen *et al.*, 1970), la intervención de los agricultores y la presión del ambiente (Hernández, 1972), y diversos factores internos y externos del sistema. La variación morfológica observada es atribuible a la evolución de las poblaciones nativas y a la selección de semillas de parte de los productores, que generalmente está asociada con el color de grano, ciclo biológico y rendimiento (Barrera-Guzmán *et al.*, 2020; Gil *et al.*, 2004).

2. Estudio de la microbiota diazotrófica aislada del mucílago de raíces adventicias aéreas y de grupos microbianos funcionales asociados a la rizósfera de maíz Olotón.

A continuación, presentamos los resultados del análisis microbiológico del maíz Olotón, derivado de los dos enfoques metodológicos usados en este proyecto. Encontramos que los dos enfoques son complementarios y permiten describir una muy amplia diversidad de microorganismos entre los que destacan los promotores de crecimiento vegetal.

Enfoque Independiente del cultivo en medio sintético

Los resultados del estudio de amplicones de genes ARNr 16S revelaron cuales bacterias se encontraban presentes en la mayoría de las muestras de mucílagos (>75%) independientemente si provenían de maíz blanco o amarillo. A este grupo de bacterias se le denominó “microbiota núcleo” y estuvo compuesto por *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Sphingomonas*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus*, *Bdellovibrio* y miembros de la familia *Rhizobiaceae*. Más adelante, se validó este hallazgo usando las secuencias ensambladas de los metagenomas, incluso otros géneros bacterianos como *Duganella*, *Massilia*, *Rahnella*, *Delftia*, *Agrobacterium* y *Klebsiella* se identificaron predominantemente en los mucílagos (Figura 11). Se observó que los mucílagos de maíces creciendo en las parcelas del agricultor local presentaron mayor abundancia de *Herbaspirillum*, pero menor proporción de *Azospirillum* y *Sphingomonas* en comparación con las otras variedades.

Con el enfoque metagenómico se logró identificar los genes de la nitrogenasa, la cual lleva a cabo la reacción bioquímica para la fijación de nitrógeno. Se detectaron genes para diferentes tipos de nitrogenasas. También se pudo identificar a qué especies de bacterias pertenecen esos genes, con lo que se determinaron las bacterias fijadoras de nitrógeno que residen dentro del mucílago, algunas aparentemente en mayor abundancia, como por ejemplo *Azospirillum*, *Phytobacter*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Klebsiella* y *Kosakonia* (Cuadro 3). Muchas de estas se encontraron únicamente asociadas al maíz y no en el suelo donde cultivaron las plantas, lo que refleja que un grupo selecto de bacterias puede vivir y multiplicarse dentro del mucílago.



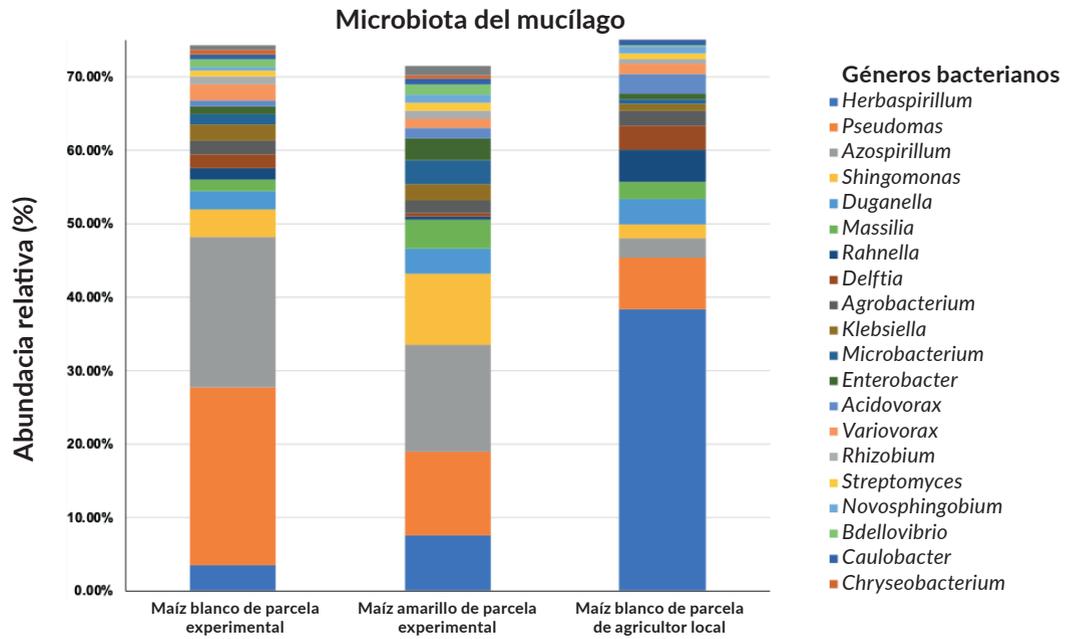


Figura 11. Composición de la microbiota del mucílago de las raíces aéreas de plantas de maíz Olotón cultivadas en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca. Se muestran los géneros bacterianos más abundantes y recurrentes entre muestras.

Cuadro 3. Distribución de bacterias y genes asociados a la fijación biológica de nitrógeno en mucílago de las raíces aéreas de plantas de maíz Olotón cultivadas en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca

Origen del mucílago	Bacterias fijadoras de nitrógeno	Genes detectados
Maíz blanco de parcela experimental	<i>Azospirillum</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp. <i>Rahnella</i> sp. <i>Variovorax</i> sp. <i>Methylophilus</i> sp. <i>Metakosakonia</i> sp. <i>Ruminiclostridium</i> sp. <i>Raoultella</i> sp. <i>Pelosinus</i> sp.	<i>anfG</i> , <i>anfK</i> , <i>nifD</i> , <i>nifH</i> , <i>nifK</i> , <i>nifW</i> , <i>vnfA</i>
Maíz amarillo de parcela experimental	<i>Paenibacillus</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp. <i>Azospirillum</i> sp. <i>Pseudacidovorax</i> sp. <i>Pelosinus</i> sp. <i>Anaerocolumna</i> sp. <i>Negativicutes</i> sp.	<i>anfD</i> , <i>anfG</i> , <i>anfK</i> , <i>nifD</i> , <i>nifH</i> , <i>nifK</i> , <i>nifW</i> , <i>vnfA</i> , <i>vnfD</i> , <i>vnfG</i>



Maíz blanco de parcela de agricultor local	<i>Metakosakonia</i> sp. <i>Azospirillum</i> sp. <i>Kosakonia</i> sp. <i>Curvibacter</i> sp. <i>Rahnella</i> sp. <i>Paenibacillus</i> sp. <i>Raoultella</i> sp.	<i>anfG</i> , <i>anfK</i> , <i>nifD</i> , <i>nifH</i> , <i>nifK</i> , <i>nifW</i> , <i>vnfA</i> , <i>vnfD</i>
--	---	--

Los resultados y los de otros grupos de investigación, dan evidencia muy sólida de la abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno en el mucílago del Olotón. Se validó experimentalmente, con ensayos de reducción de acetileno, la fijación de nitrógeno de *Raoultella*, *Phytobacter*, *Klebsiella*, *Kosakonia*, *Azospirillum*, *Rahnella* y *Enterobacter*. Usando las secuencias de los genes de las familias *nif*, *anf* y *vnf* fueron los marcadores moleculares usados para la identificación de los diazótrofos.

Las bacterias asociadas al maíz Olotón podrían no solo fijar nitrógeno sino también estimular la emergencia de raíces aéreas gracias a la producción de fitohormonas o hasta conferir defensa contra patógenos. En las secuencias de metagenomas se identificaron bacterias con genes para la biosíntesis de hormonas vegetales. Entre ellos, genes para la producción de auxinas como el ácido indol acético, que es responsable de la producción y desarrollo de las raíces, y de ácido giberélico, que es un inductor de la germinación de semillas y de la formación de flores y frutos. Algunas bacterias con estos genes fueron *Azospirillum* y *Herbaspirillum*. Es interesante que siendo el mucílago rico en azúcares y agua no presentó crecimiento de hongos. Esto podría explicarse porque se encontraron bacterias con genes para la producción de metabolitos antifúngicos como en el caso de *Pseudomonas* y *Enterococcus*. Diversas cepas aisladas, incluyendo *Pseudomonas*, *Enterococcus* y *Paraburkholderia*, limitaron el crecimiento de los hongos evaluados (Figura 12).

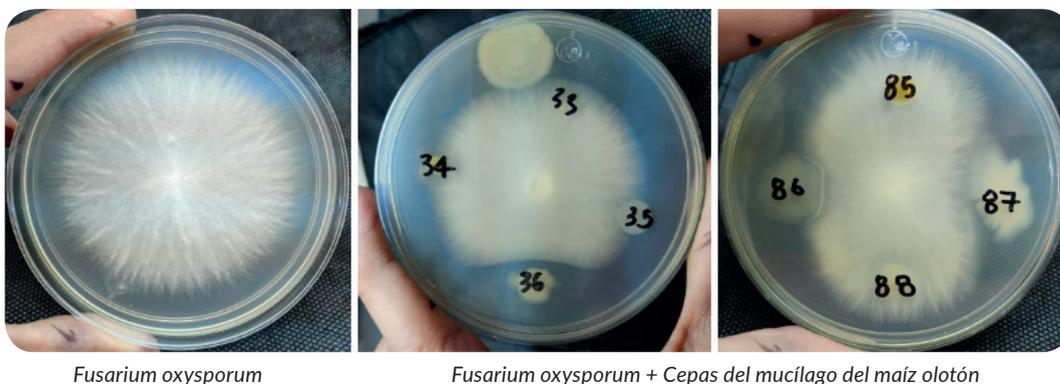


Figura 12. Ensayos de antagonismo entre *Fusarium oxysporum* y cepas aisladas del mucílago de las raíces aéreas de plantas de maíz Olotón cultivadas en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca.



Si bien en el mucílago no hubo presencia de hongos, en semillas de maíz Olotón sí se les encontró frecuentemente como endófitos. En especial una cepa de *Fusarium* productora de un pigmento morado y con la capacidad de promover el crecimiento vegetal de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Figura 13). Un caso similar ha sido reportado con el endófito *F. oxysporum* FO12, el cual no tiene un comportamiento patógeno, al contrario, es un hábil colonizador de raíz y estimulante del crecimiento de algodón, pepino, pimiento, girasol y trigo (Sevillano-Caño *et al.*, 2024). Sin embargo, se ha reportado que cepas de *Fusarium* pueden ser promotoras de crecimiento cuando las plantas son jóvenes, pero cuando alcancen estadios maduros, el hongo adquiere compartimento como patógeno. Poco se conoce sobre los genes o estímulos que determinan que un hongo se comporte como amigo o enemigo de las plantas, lo que sí es claro es que las relaciones con sus hospederos pueden ser tan específicas como las que tienen las bacterias. Analizando los genomas de hongos patógenos y su contraparte simbiótica se logrará avanzar en el entendimiento de estas asociaciones.

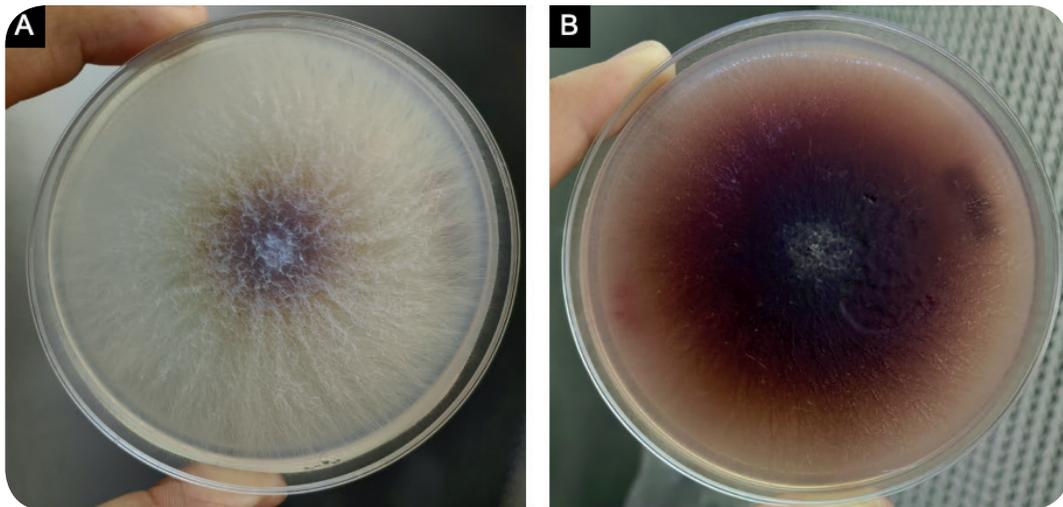


Figura 13. Cepa de *Fusarium* sp. productora de un pigmento morado aislado de raíces y semillas de maíz Olotón. A) 7 días y B) 21 días de crecimiento a 30°C.

En cuanto a los ensayos para la selección de cepas para preparar el inoculante (*Azospirillum*, *Methylorubrum*, *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Rahnella* y *Raoultella*) observamos que la mayoría fueron promotoras del crecimiento en *Arabidopsis* luego de 2 semanas de interacción (Figura 14). Los efectos positivos inducidos en las raíces de las plantas sugieren que un mecanismo de promoción vegetal asociado a la producción de auxinas está involucrado. Todas estas evidencias nos dieron la pauta para llevar esta evaluación a los cultivos del maíz Olotón en campo.



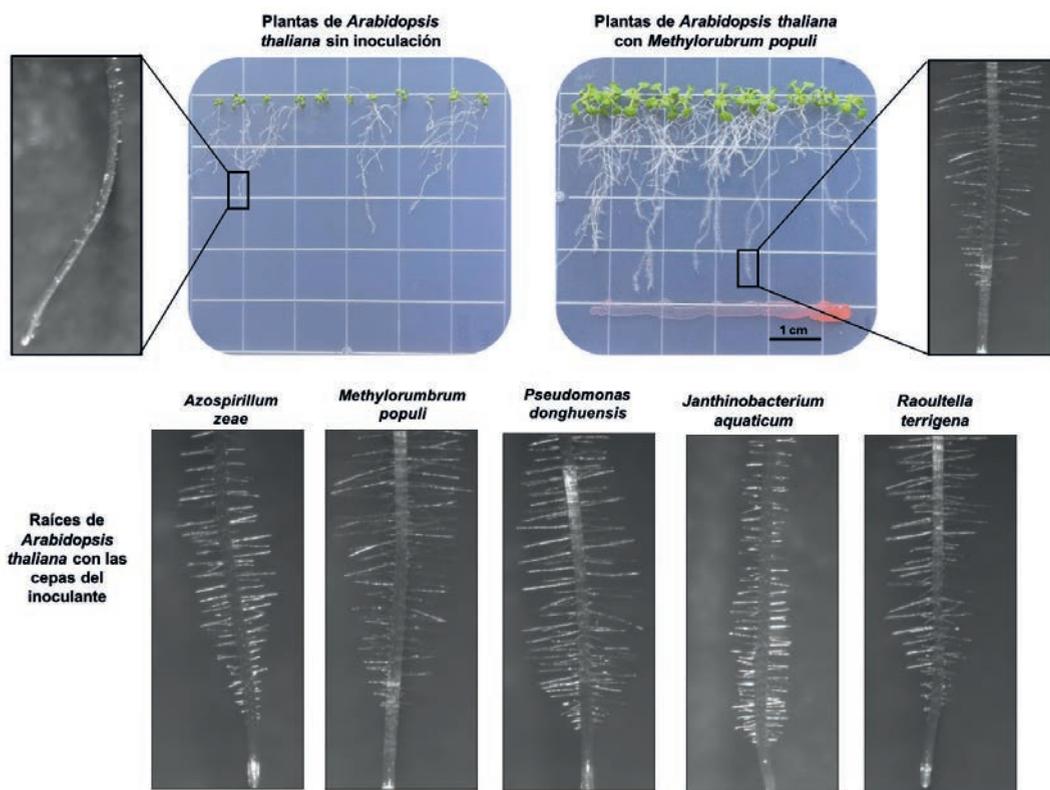


Figura 14. Efecto promotor del crecimiento vegetal de cepas del mucílago del maíz Olotón en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Se observa un incremento de la producción de raíces secundarias en presencia de las cepas bacterianas, en comparación con una planta sin inocular.

Enfoque dependiente del medio de cultivo sintético

Poblaciones bacterianas cuantificadas del mucigel

En general, los resultados de la cuantificación de bacterias en los cuatro medios selectivos de grupos bacterianos en el mucigel, fueron mayores en las muestras recolectadas de las parcelas con la aplicación de 60 o 120 kg N ha⁻¹, en comparación con la parcela sin la aplicación de fertilizante nitrogenado, tanto en maíz blanco como en maíz amarillo. Cabe resaltar que, en el mucigel de ambos tipos de maíz, no se presentó crecimiento fúngico ni en el medio específico (PDA) para hongos ni en algún otro medio de cultivo.

Identificación y pruebas bioquímicas de cepas bacterianas aisladas de mucigel

De los aislamientos bacterianos obtenidos del mucigel, se purificaron 156 cepas de las cuales 59 correspondieron a la parcela sin fertilización nitrogenada (**Cuadro 4**); de éstas 10 cepas mostraron 2 o 3 actividades bioquímicas relacionadas con la producción de ácido



indolacético, la fijación de nitrógeno atmosférico, y la solubilización de fosfatos. Por otra parte, 51 cepas fueron obtenidas de la parcela con 60 kg N ha⁻¹ (Cuadro 5), de estas cepas 10 de ellas mostraron actividad positiva a dos o tres de las actividades bioquímicas mencionadas. Finalmente, 46 cepas se aislaron de la parcela con aplicación de 120 kg N ha⁻¹ (Cuadro 6), y 10 de ellas, tuvieron actividad positiva a dos o tres de las actividades bioquímicas mencionadas. En los cuadros mencionados también se aprecian los nombres científicos de la mayoría de las cepas bacterias que se analizaron molecularmente para ello.

Cuadro 4. Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 10 de las cepas del mucílago de maíz Olotón, aisladas de la parcela sin fertilización con nitrógeno.

Clave	Especie	Medio de aislamiento	Producción de Indoles (AIA)	Fijación de nitrógeno	Solubilización de Fosfatos
3 OMA	<i>Klebsiella pasteurii</i>	Agar nutritivo	+++	++	-
15 OMA	<i>Pseudomonas palleroniana</i>	Agar nutritivo	+	+	+
17 OMA	<i>Pseudomonas asplenii</i>	Agar nutritivo	+	+	+
20 OMN	<i>Pseudomonas vanderleydeniana</i>	NFB	+++	+	-
30 OMN	<i>Agrobacterium vitis</i>	NFB	+++	+	-
32 OMN	<i>Rahnella aquatillis</i>	NFB	++	+	+
43 OMR	<i>Pseudomonas kribbensis</i>	Rennie	+	+	+
45 OMR	<i>Pseudomonas palleroniana</i>	Rennie	+	+	+
47 OMR	<i>Sphingomonas trueperi</i>	Rennie	++	-	-
59 OMAZ	<i>Pseudomonas eucalypticola</i>	<i>Azotobacter</i>	+++	-	+

Cuadro 5. Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 10 de las cepas del mucílago de maíz Olotón, aisladas de la parcela con aplicación de 60 kg N ha⁻¹.

Clave	Especie	Medio de aislamiento	Producción de Indoles (AIA)	Fijación de nitrógeno	Solubilización de Fosfatos
60 OMA	<i>Raoultella terrigena</i>	Agar nutritivo	++	+	-



66 OMA	<i>Acidovorax wautersii</i>	Agar nutritivo	+	+	+
74 OMN	No identificada	NFB	+++	+	-
82 OMR	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rennie	+	+	+
84 OMR	<i>Agrobacterium vitis</i>	Rennie	+++	+	-
87 OMD	<i>Sphingomonas trueperi</i>	<i>Derxia</i>	++	+	-
88 OMD	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Derxia</i>	+++	+	-
94 OMD	<i>Klebsiella grimontii</i>	<i>Derxia</i>	++	+	-
103 OMB	No identificada	<i>Beijerinckia</i>	+++	+	-
10 OMAZ	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Azotobacter</i>	+	+	+

Cuadro 6. Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 10 de las cepas del mucilago de maíz Olotón, aisladas de la parcela con aplicación de 120 kg N ha⁻¹.

Clave	Especie	Medio de aislamiento	Producción de Indoles (AIA)	Fijación de nitrógeno	Solubilización de Fosfatos
111 OMA	<i>Pseudomonas koreensis</i>	Agar nutritivo	+++	+	
115 OMA	<i>Rahnella aquatillis</i>	Agar nutritivo	+++	+	
118 OMA	<i>Rahnella aquatillis</i>	Agar nutritivo	+	+	+
133 OMR	<i>Rahnella aquatillis</i>	Rennie	+	+	+
136 OMR	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rennie	+++	++	
137 OMR	<i>Rahnella aquatillis</i>	Rennie	+++	+	
139 OMD	<i>Sphingomonas trueperi</i>	<i>Derxia</i>	+	++	+
142 OMD	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>Derxia</i>	+++	+	
155 OMAZ	<i>Rahnella aquatillis</i>	<i>Azotobacter</i>	+++	+	+
156 OMAZ	<i>Pseudomonas vanderleydeniana</i>	<i>Azotobacter</i>	+	+	+



Poblaciones bacterianas de la rizosfera

La población de microorganismos de la rizosfera de maíz Olotón, mostró variaciones con base en el grupo microbiano determinado en ambos tipos de maíz. Para el maíz blanco, las poblaciones de bacterias totales y de bacterias de medios específicos para bacterias que crecen en ausencia de nitrógeno en los medios de cultivo, fueron similares en las parcelas sin aplicación de fertilización nitrogenada y con la aplicación de 60 kg N ha⁻¹. Por el contrario, las poblaciones bacterianas en todos los medios de cultivo fueron significativamente menores en la parcela con 120 kg N ha⁻¹, con respecto a las parcelas mencionadas.

Cabe mencionar que en la rizosfera de maíz Olotón blanco, se logró el aislamiento de cepas de hongos filamentosos, y la mayor población se registró en la parcela con 60 kg N ha⁻¹, seguido de la parcela con aplicación de 120 kg N ha⁻¹; se destaca que la población de hongos en la parcela sin aplicación de N, fue significativamente menor a las parcelas mencionadas. De la parcela sin nitrógeno se identificaron cepas de *Trichoderma hamatum*, *Cunninghamella elegans* y *Penicillium sacculum*, principalmente), en tanto que de la parcela con 60 kg N ha⁻¹ se identificaron las cepas de *Talaromyces amestolkiae*, *Trichoderma koningiopsis*, *Clonostachys rogersoniana*, y *Talaromyces oumae-annae*.

Para el caso del maíz amarillo, considerando que no se obtuvo muestra de la parcela con 120 kg N ha⁻¹, se observó que la población de bacterias totales y de bacterias cuantificadas en el medio Rennie sin aplicación de nitrógeno, fue mayor en la parcela con 60 kg N ha⁻¹ con respecto a la parcela sin nitrógeno. En los medios específicos NFB, *Beijerenckia*, *Derxia* y *Azotobacter*, las poblaciones bacterianas fueron estadísticamente similares en ambas parcelas. En el caso de hongos filamentosos su población fue estimulada en la parcela con aplicación de 60 kg N ha⁻¹ con respecto a la parcela sin fertilización nitrogenada.

Identificación y pruebas bioquímicas de bacterias aisladas de la rizósfera

De los aislamientos realizados de la rizósfera de maíz olotón blanco, se purificaron un total de 134 cepas; 59 correspondieron a parcelas sin fertilización y 10 cepas mostraron actividad positiva a dos o tres pruebas bioquímicas (**Cuadro 7**). A partir de la parcela con 60 kg N ha⁻¹, se aislaron 75 cepas y 10 de ellas mostraron actividad positiva a dos o tres de las pruebas bioquímicas (**Cuadro 8**). Finalmente, 55 cepas se aislaron de parcelas con 120 kg N ha⁻¹, de las que 9 cepas tuvieron actividad positiva en dos o tres pruebas bioquímicas (**Cuadro 9**).

En el caso de las cepas aisladas de la rizósfera de maíz Olotón amarillo, se purificaron 113 cepas, de las cuales 48 correspondieron a la parcela sin fertilización nitrogenada (**Cuadro 10**), de éstas, 15 cepas tuvieron reacción positiva en dos o tres pruebas bioquímicas. En el caso de la parcela con 60 kg N ha⁻¹, se purificaron 65 cepas, de las cuales 11 mostraron actividad en dos o tres pruebas bioquímicas (**Cuadro 11**).



Cuadro 7. Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 11 cepas bacterianas de maíz Olotón blanco, aisladas de la parcela sin fertilización con nitrógeno.

Clave	Especie	Medio de cultivo	Producción de Indoles (AIA)	Fijación de nitrógeno	Solubilización de Fosfatos
14 ORBN	<i>Priestia megaterium</i>	NFB	++	+	
17 ORBN	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	NFB	++++	+	
27 ORBR	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i>	Rennie	++	+++	
28 ORBR	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	Rennie	++	++	
30 ORBR	<i>Paraburkholderia hospita</i>	Rennie	+++	+	
33 ORBR	<i>Leifsonia virtsii</i>	Rennie	+	-	+
40 ORBD	<i>Telluria mixta</i>	<i>Derxia</i>	+	++	
45 ORBB	<i>Paraburkholderia aromaticivorans</i>	<i>Beijerinckia</i>	++	+	
48 ORBB	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Beijerinckia</i>	+++	+	
53 ORBAZ	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Azotobacter</i>	+++	+	
59 ORBAZ	<i>Alcaligenes faecalis</i>	PDA			

Cuadro 8. Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 10 cepas de maíz Olotón blanco, aisladas de la parcela con 60 kg N ha⁻¹.

Clave	Especie	Medio de aislamiento	Producción de Indoles (AIA)	Fijación de nitrógeno	Solubilización de Fosfatos
60 ORBA	<i>Burkholderia ambifaria</i>	Agar nutritivo	-	+	+++
66 ORBA	<i>Burkholderia ambifaria</i>	Agar nutritivo	++	++	+
73 ORBA	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	Agar nutritivo	++++	++	+
79 ORBN	<i>Collimonas arenae</i>	NFB	-	+	++
86 ORBN	<i>Burkholderia ambifaria</i>	NFB	-	+	+++
93 ORBN	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i>	NFB	++++		
105 ORBD	<i>Cupriavidus basilensis</i>	<i>Derxia</i>	-	++	



106 ORBD	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Derxia</i>	+	+	++
107 ORBD	---	<i>Derxia</i>	+	++	
108 ORBD	<i>Collimonas arenae</i>	<i>Derxia</i>	+	++	

Cuadro 9. Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 10 de las cepas de maíz Olotón blanco, aisladas de la parcela con 120 kg N ha⁻¹.

Clave	Medio de aislamiento	Producción de Indoles (AIA)	Fijación de nitrógeno	Solubilización de Fosfatos
3 ORPLA	Agar nutritivo	++++	++	
6 ORPLN	NFB	++++	+	
7 ORPLN	NFB	+++	++	
26 ORPLR	Rennie	+		+
30 ORPLR	Rennie	++++	+	
37 ORPLD	<i>Derxia</i>	++		+
42 ORPLB	<i>Beijerinckia</i>	++++	++	
43 ORPLB	<i>Beijerinckia</i>	++++	++	
44 ORPLB	<i>Beijerinckia</i>	++++	++	

Cuadro 10. Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 15 cepas bacterianas de maíz Olotón amarillo, aisladas de la parcela sin fertilización con nitrógeno.

Clave	Medio de aislamiento	Producción de Indoles (AIA)	Fijación de nitrógeno	Solubilización de Fosfatos
1ORAA	Agar nutritivo	++	+	
3 ORAA	Agar nutritivo	++	-	+
5 ORAA	Agar nutritivo	+	+	
15 ORAN	NFB	++++	+++	+
20 ORAR	Rennie	+++	+	+
21 ORAR	Rennie	+++	-	
23 ORAR	Rennie	++	+	+
25 ORAR	Rennie	++	++++	
27 ORAD	<i>Derxia</i>	++	+++	+
28 ORAD	<i>Derxia</i>	++	-	
29 ORAD	<i>Derxia</i>	+	+++	+
30 ORAD	<i>Derxia</i>	+++	-	



39 ORAAZ	<i>Azotobacter</i>	+++	+++	+
40 ORAAZ	<i>Azotobacter</i>	++	+++	+
41 ORAAZ	<i>Azotobacter</i>	-	+++	

Cuadro 11. Actividad positiva a tres pruebas bioquímicas e identificación de 11 bacterias aisladas de maíz Olotón amarillo, de la parcela con 60 kg N ha⁻¹.

Clave	Medio de aislamiento	Producción de Indoles (AIA)	Fijación de nitrógeno	Solubilización de Fosfatos
54 ORAA	Agar nutritivo	++++	+	
57 ORAA	Agar nutritivo	++++	++	
62 ORAN	NFB	++++	++	
68 ORAN	NFB	++	+	++
71 ORAN	NFB	++++	+	+
73 ORAR	Rennie	+	+	++
77 ORAR	Rennie	++	++	+
87 ORAD	<i>Derxia</i>	++	+	+
97 ORAB	<i>Beijerinckia</i>	++++	+	
100 ORAB	<i>Beijerinckia</i>	+	+	++
103 ORAAZ	<i>Azotobacter</i>	+	-	+

Evaluación de la efectividad biológica de bacterias aisladas del mucílago en plantas de maíz Olotón en condiciones de invernadero

La inoculación bacteriana de forma individual o combinada, mejoró el crecimiento de las plantas, y este efecto fue diferencial con base en la aplicación de la solución nutritiva Long Ashton, al 15 o al 30% (Figura 15A-B). En los tratamientos sin aplicación de solución nutritiva, la inoculación bacteriana produjo mayor altura; mientras que el área foliar mostró mayor respuesta con la inoculación individual de *Rhanella aquatilis*, y del consorcio 2 (conformado por *Methylobacterium* sp. y *Herbaspirillum* sp.). Al aplicar la solución nutritiva al 15%, todos los tratamientos inoculados con las bacterias mostraron mayor altura y área foliar, sobresaliendo las bacterias aplicadas de manera individual; en tanto que los tres consorcios bacterianos resultaron en efectos similares entre sí, pero mayores al tratamiento testigo. En contraste, al aplicar la solución nutritiva al 30%, las plantas inoculadas con tres bacterias individuales, y con el consorcio 2, mostraron mayor altura en comparación con el tratamiento testigo; en lo que respecta al área foliar, la inoculación individual de *Sphingomonas trueperi* o del consorcio 2, produjo mayor área foliar en las plantas de maíz Olotón.



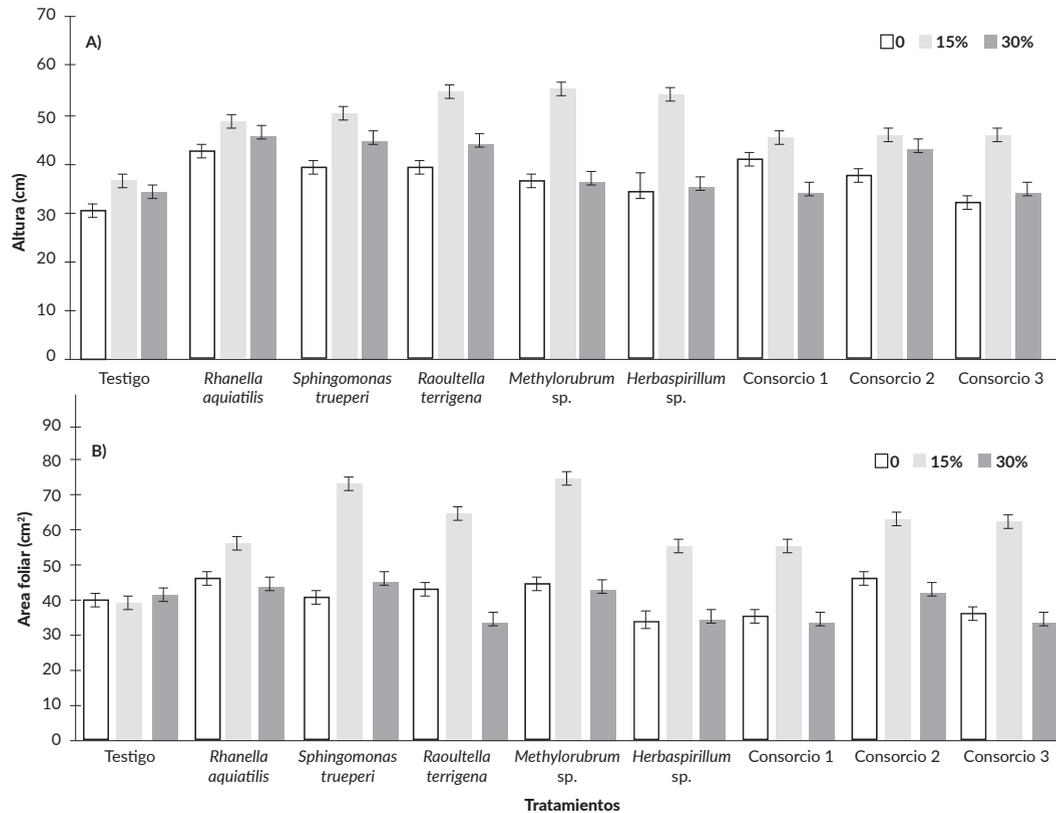


Figura 15. Prueba de efectividad biológica de la inoculación individual o en consorcio de bacterias aisladas de mucigel de raíces adventicias áreas de maíz Olotón, en la altura (A) y área foliar (B) de plantas de maíz Olotón, fertilizadas con solución nutritiva Long Ashton aplicada en tres dosis (0, 15 y 30%) con respecto a su formulación completa, después de 30 días de crecimiento en invernadero. Medias + error estándar. n= 9. Cepas obtenidas por COLPOS: *Rhanelia aquatilis*, *Sphingomonas trueperi* y *Raoultella terrigena*; Cepas obtenidas por CCG-UNAM: *Methylorubrum sp.* y *Herbaspirillum sp.*; Consortio 1 corresponden a las cepas obtenidas por COLPOS; Consortio 2 corresponden a las cepas obtenidas por CCG-UNAM; Consortio 3 corresponde a la combinación de las cepas del COLPOS y del CCG-UNAM.

3. Interacción entre el carácter FBNMO y el uso de fertilizantes, estiércol y cal agrícola.

Este trabajo experimental se condujo en el municipio de Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca. Las propiedades físicas y químicas de los suelos de las localidades experimentales se muestran en el **Cuadro 12**.



Cuadro 12. Propiedades físicas y químicas de la capa arable del suelo (0 a 20 cm) en dos localidades experimentales en Totontepec Villa de Morelos, previo a la siembra.

Propiedades [§]	Topografía plana [‡] pendiente <4%	Topografía de ladera ^{§§}	Unidad
Clase textural	Franco	Franco	
Densidad Aparente	0.89	0.89	g/cm ³
pH	5.56	5.00	En agua
Materia orgánica	8.02 (muy alto)	8.63 (muy alto)	%
N-NO ₃	9.33 (mod. bajo)	14.1 (medio)	ppm
Fósforo-Bray [†]	29.8 (medio)	31.0 (mod. alto)	ppm
Potasio asimilable	83.5 (muy bajo)	72.6 (muy bajo)	ppm
Azufre asimilable	4.22 (bajo)	2.81 (muy bajo)	ppm
Ca ⁺⁺	0.60 (muy bajo)	0.30 (muy bajo)	meq/100g
Mg ⁺⁺	0.17 (mod. bajo)	0.13 (bajo)	meq/100g
K ⁺	0.21 (alto)	0.19 (alto)	meq/100g
Al ⁺⁺⁺	1.29 (alto)	1.58 (muy alto)	meq/100g
H ⁺	0	0	meq/100g
CIC	2.33 (muy bajo)	2.27 (muy bajo)	meq/100g
SB	44.69	30.38	%
Sal	55.4 (alto)	69.6 (muy alto)	%

[§] CIC es capacidad de intercambio de cationes, SB es porcentaje de saturación de bases; SAI es porcentaje de saturación de aluminio. [†]Método de Bray 1 (Bray y Kurtz, 1945).

[‡] Entre paréntesis la calificación de acuerdo al laboratorio www.fertilab.com.mx

^{§§} Pendiente entre 30% y 40%.

La clase textural es franca en ambos casos. Se aprecia, de acuerdo con los resultados de análisis de laboratorio realizados por encargo en el Laboratorio de Fertilidad de Suelos S.A. de C.V. (www.fertilab.com.mx) que son suelos ácidos, con altos contenidos de materia orgánica, alto contenido de Aluminio intercambiable y bajos contenidos de bases intercambiables. También sobresale la extremadamente baja CIC, lo que no sería esperable en un suelo de textura franca con contenido de 5 a 8% de materia orgánica.

En el **Cuadro 13** se muestran los rendimientos promedio de dos localidades de Totontepec, Oaxaca en respuesta a los tratamientos para evaluar la interacción de fertilizantes y mejoradores del suelo en el maíz nativo fijador de nitrógeno. El diseño experimental en ambos casos fue de Parcelas Divididas con 3 repeticiones. Las parcelas grandes fueron asignadas a los factores estiércol vacuno seco y cal agrícola, en tanto que las parcelas chicas fueron asignadas a los factores Nitrógeno y Fósforo. Las aplicaciones de estiércol, de cal y de fósforo se hicieron en la siembra, mientras que el fertilizante nitrogenado se aplicó en la etapa V4 (etapa juvenil), que es anterior a la aparición visible de raíces adventicias en el



primer nudo (V10). Los 16 primeros tratamientos corresponden al diseño factorial 2⁴ y los tratamientos 17 a 20 son adicionales para explorar la respuesta a la intensificación de los mismos factores y la fertilización con potasio.

Cuadro 13. Rendimientos promedio de tres repeticiones del maíz nativo de la raza Olotón a 20 tratamientos en dos localidades de Totontepec Oaxaca, en 2022.

Tratamientos	Estiércol	Cal	Nitrógeno	Dosis [§]	Potasio	Rendimiento en terreno [†]	
				Fósforo		Plano	Ladera
1	0	0	0	0	0	2.20	2.49
2	0	0	0	80	0	2.60	3.31
3	0	0	60	0	0	3.53	3.66
4	0	0	60	80	0	3.20	3.88
5	3	0	0	0	0	3.17	3.45
6	3	0	0	80	0	3.87	3.42
7	3	0	60	0	0	3.94	4.03
8	3	0	60	80	0	3.65	4.09
9	0	2	0	0	0	2.54	2.98
10	0	2	0	80	0	2.76	3.44
11	0	2	60	0	0	4.32	4.49
12	0	2	60	80	0	3.80	4.19
13	3	2	0	0	0	2.79	3.19
14	3	2	0	80	0	3.34	3.76
15	3	2	60	0	0	4.35	4.50
16	3	2	60	80	0	4.36	4.09
Tratamientos adicionales							
17	3	2	60	80	50	4.09	4.07
18	3	2	60	80	100	3.89	4.24
19	3	2	180	240	50	4.59	5.48
20	6	4	180	240	50	4.98	5.01

[§]Estiércol vacuno seco en t/ha, Cal Agrícola en t/ha, Nitrógeno en kg de N/ha en forma de urea, Fósforo en kg de P₂O₅ como superfosfato de Calcio triple, Potasio en kg de K₂O/ha como Cloruro de Potasio.

[†]Rendimiento de grano con 14% de humedad en t/ha; Ladera con pendiente variable de 30-40%.

En el **Cuadro 14** se presentan los análisis combinados de varianza de dos experimentos conducidos en dos localidades de Totontepec Oaxaca, en el año 2022.

Los coeficientes de determinación y coeficientes de variación de ambos experimentos son respectivamente iguales a 91 por ciento y 8.93 por ciento en la localidad con terreno plano



Cuadro 14. Análisis de varianza de dos experimentos con diseño de parcelas divididas conducidos en 2022.

Localidad 1, terreno plano					
Factor [§]	GL	Sumas de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Significancia estadística [†]
TG	3	5.221973	1.740658	48.4	**
R	2	0.934579	0.467250	26.0	**
Error a	6	0.215621	0.035937		
Tch	3	13.404340	4.468113	48.5	
TG*Tch	9	2.751002	0.305667	3.3	**
Error b	24	2.213133	0.092214		
Localidad 2, terreno en ladera					
TG	3	2.079417	0.693139	17.36	**
R	2	0.077887	0.038944	0.52	NS
Error a	6	0.239496	0.039916		
Tch	3	10.238183	3.412728	45.51	**
TG*Tch	9	1.356467	0.150719	2.01	NS
Error b	24	1.799550	0.074981		

[§]TG es tratamientos de parcela grande; R repeticiones; TCh tratamientos de parcela chica.

[†]Significancia estadística: ** es significativo al 1%, * es significativo al 5%, NS es no significativo.

y de 89 por ciento y 7.43 por ciento en el terreno de ladera. Tales resultados indican una muy buena precisión del procedimiento experimental.

Se ajustó un modelo de regresión a los resultados del diseño 24 con 96 observaciones al nivel de localidad y parcela, que se presenta a continuación:

$$Y = 2.23188 + 0.07437*r_1 - 0.04312*r_2 + 0.43792*I_1 + 0.07278*E + 0.45792*C + 0.01974*N + 0.00573*P - 0.05944*E*C + 0.00264*E*N - 0.00284*C*N - 0.0001367*N*P - 0.15500*I_1*C. \quad \text{----- (1)}$$

En la ecuación (1) los rendimientos de grano Y se expresan en t/ha (con 14% de humedad), las variables r_1 y r_2 (variables auxiliares para repeticiones) fueron forzadas a entrar al modelo para excluirlas del cálculo de las desviaciones de regresión. La variable I_1 es variable auxiliar que asume los valores de 0 para el terreno plano y de 1 para la ladera, con el fin de evaluar el efecto de localidad y topografía; las variables E, C, N y P se definen en el **Cuadro 12** así como sus unidades en t/ha y kg/ha. Se aplicó el procedimiento de regresión Stepwise con probabilidades de 0.3 de entrar al modelo y 0.05 de permanecer. Todas las variables



experimentales son significativas al 5% de probabilidades de error tipo I, excepto por las variables de repetición r_1 y r_2 forzadas a entrar al modelo.

La ordenada al origen de la ecuación (1) de 2.23 t/ha estima el rendimiento de la localidad con terreno plano sin aplicación de los factores estudiados, es decir, es el rendimiento del tratamiento testigo en esa localidad. Para su desarrollo, el cultivo dispuso sólo del Nitrógeno del suelo y del Nitrógeno que fijó de la atmósfera mediante su simbiosis con la microbiota. Ese mismo tratamiento testigo de la localidad en ladera es superior en 0.44 t/ha (término $+0.43792*I_1$). El término $+0.0194*N$, por no haber interacción I_1*N , sugiere que cada kg de N aplicado como Urea en ambas localidades se asoció con el aumento de 19 kg/ha de grano. Esto equivale a 60 kg de N por el coeficiente 0.0194 que es igual a 1.16 tonelada de grano por hectárea. Este resultado sugiere que, en su fase juvenil mientras se activa la simbiosis de la planta con la microbiota, el cultivo depende sólo del Nitrógeno disponible del suelo, o bien, que esa aplicación de fertilizante complementa el aporte total de Nitrógeno por parte de la simbiosis entre el maíz y la microbiota fijadora del Nitrógeno atmosférico.

El resto de los términos de la ecuación (1) sugiere que dadas las características de los suelos estudiados que se aprecian en el **Cuadro 9**, la adaptación de la raza nativa de maíz Olotón que fija Nitrógeno atmosférico a la edafoclimatología, debe ser complementada con mejoradores de la nutrición para alcanzar su rendimiento potencial. Sin embargo, en lo que corresponde a Fósforo, el efecto de la aplicación de 80 kg de P_2O_5 /ha fue positivo sobre el rendimiento, igual a 0.458 t/ha, pero a la vez con una interacción negativa con la aplicación de nitrógeno por un valor de -0.656 t/ha en el rendimiento. Tal respuesta sugiere que no hace falta fertilizar con fósforo y que esto podría deberse al efecto del consorcio de bacterias presentes en la simbiosis con la planta y su capacidad de solubilizar fósforo inorgánico, demostrada en los estudios de laboratorio.

Los rendimientos asociados a los tratamientos números 17 a 20 del **Cuadro 10** sugieren que la variedad nativa de maíz Olotón no requiere de fertilizante potásico en ambas localidades y que la intensificación de las aplicaciones de estiércol vacuno, cal agrícola (que incluye Calcio y Magnesio), de Nitrógeno y de Fósforo se asocian con un rendimiento promedio de ambas localidades del orden de 5 t/ha, mientras que en el espacio explorado en el experimento 24 el rendimiento promedio de dos localidades es del orden de 4 t/ha en el año 2022.

4. Estudio de la herencia del carácter FBNMO.

Infelizmente, no fue posible hacer la mayor parte de los cruzamientos planeados en el ciclo PV 2022, que se realizaron sólo en Totontepec. Esto se debió a que el comportamiento de los materiales genéticos introducidos fue agrónomicamente desadaptado con dos rasgos sobresalientes: 1) adelantaron su floración femenina más de lo esperado por lo que no fue posible lograr la coincidencia de sus floraciones con la del maíz nativo Olotón y, 2) daños causados por jabalíes y tejones habitantes de áreas boscosas cercanas, que dañaron en primer lugar a las plantas de porte bajo y desadaptadas, librándose del daño las plantas del maíz nativo debido a su vigor, caña gruesa y mayor altura de mazorca.



5. Uso de bioinoculantes en variedades de maíz nativo de Totontepec y de la localidad San Bernardino Teotitlán, en el ciclo PV 2024.

En la etapa vegetativa inicial (V5) se marcó con un listón a 25 plantas al azar de cada una de las parcelas chicas en ambas localidades. Estas plantas serían evaluadas en cuanto a la futura emisión de nudos con raíces adventicias, y el número de aquellas plantas que expresaron el carácter FBNMO.

La hipótesis en cotejo de estos experimentos fue que *“la bioinoculación y la fertilización con Nitrógeno en Totontepec y en San Bernardino no tendrían efecto adicional sobre la expresión del carácter FBNMO en ambas localidades”*.

En el **Cuadro 15** se muestran algunas propiedades físicas y químicas de los suelos de ambas localidades. Al comparar estas propiedades con las de dos localidades experimentales en Totontepec en el año 2022 se aprecia que son igualmente suelos ácidos con textura franca o franca arcillosa, altos a muy altos en materia orgánica, con contenidos medio de nitrógeno nítrico, bajos a muy bajos en fósforo, potasio y azufre asimilables. También la Capacidad de Intercambio de Cationes fue anormalmente baja dadas las clases texturales y los altos contenidos de materia orgánica.

Cuadro 15. Algunas propiedades físicas, químicas y de fertilidad de la capa arable de los suelos en las localidades San Bernardino Teotitlán, Oax., y Totontepec Villa de Morelos Oax.

Propiedades [§]	San Bernardino	Totontepec	Unidad
Clase textural	Franco arcilloso	Franco	
Densidad Aparente	1.17	0.78	g/cm ³
pH	5.61	5.28	En agua
Materia orgánica	5.03 (muy alto)	14.8 (muy alto)	%
N-NO ₃	19.6 (medio)	18.5 (medio)	ppm
Fósforo-Bray	2.6 (muy bajo)	2.12 (muy bajo)	ppm
Potasio asimilable	230 (medio)	85.1 (muy bajo)	ppm
Azufre asimilable	0.10 (muy bajo)	0.10 (muy bajo)	ppm
Ca ⁺⁺	3.81 (medio)	1.29 (bajo)	meq/100g
Mg ⁺⁺	0.97 (mod. alto)	0.33 (mod. bajo)	meq/100g
K ⁺	0.59 (muy alto)	0.22 (mod. alto)	meq/100g
Al ⁺⁺⁺	0.05 (muy bajo)	2.16 (alto)	meq/100g
H ⁺	0	0	meq/100g
CIC	5.45 (bajo)	4.05 (muy bajo)	meq/100g
SB	99.05 (muy alta)	46.7 (alto)	%
SAI	0.92 (muy bajo)	53.3 (muy alto)	%

[§]CIC es capacidad de intercambio de cationes, SB es porcentaje de saturación de bases; SAI es porcentaje de saturación de aluminio. [†]Método de Bray 1 (Bray y Kurtz, 1945).



En el **Cuadro 16** se presentan los números totales de nudos activos (con raíces adventicias exudantes de mucílago) en 25 plantas marcadas *a priori*, que mostraron actividad en el carácter FBNMO.

Una manera de entender los valores de la columna nudos activos en el **Cuadro 16** es que se refiere al total de nudos activos o que fueron activos con raíces adventicias exudantes de mucílago en 25 plantas al azar, marcadas antes de la aparición de los nudos. El total de nudos activos en 25 plantas que tuvieran en promedio 8 nudos activos según lo observado por Van Deynze *et al.* (2018) —estos autores observaron hasta 10 nudos activos en plantas individuales en maíces nativos de la raza Olotón en Totontepec— sería de 200 nudos (8 x 25=200 nudos activos). El ámbito de valores observados en San Bernardino en 2024 —en promedio de tres repeticiones— varió desde 16 hasta 123 nudos activos totales en 25 plantas ubicadas al azar. Ha de citarse que, tratándose de poblaciones nativas de la raza Olotón de polinización libre, sería de esperarse variabilidad entre plantas individuales en cuanto a la presencia de nudos activos, que podrían ostentar desde 0 hasta más de 10. En la localidad Totontepec el ámbito de nudos promedio de tres repeticiones fue 50 a 152.5.

Cuadro 16. Promedio de tres repeticiones de número total de nudos con raíces adventicias activas, en función de los tratamientos de bioinoculante y fertilización NPK en San Bernardino Teotitlán de Flores Magón y en Totontepec Villa de Morelos. Año 2024.

Tratamiento	Inoculante	N-P ₂ O ₅ - K ₂ O kg/ha	San Bernardino		Totontepec	
			Variedad [§]	Nudos Activos [‡]	Variedad	Nudos Activos [‡]
1	SIN	0-80-50	OA	73	OA	50
2	SIN	60-80-50	OA	76	OA	82.5
3	CON	0-80-50	OA	123	OA	82.5
4	CON	60-80-50	OA	119	OA	150
5	SIN	0-80-50	L	16	OB	52.5
6	SIN	60-80-50	L	20	OB	100
7	CON	0-80-50	L	36	OB	82.5
8	CON	60-80-50	L	70	OB	135
Tratamientos adicionales						
A1	CON	60-0-0	OA	92	OA	125
A2	CON	120-80-50	OA	115	OA	152.5
A3	CON	60-0-0	L	52	OB	125
A4	CON	120-80-50	L	48	OB	152.5
Promedios			70		107.5	

[§]OA significa variedad Olotón amarillo; L significa variedad local; OB significa variedad Olotón blanco. [‡] Nudos activos o que fueron activos significa número total de nudos con raíces adventicias con exudación de mucílago en las 25 plantas marcadas al azar *a priori* en cada parcela chica. Promedios de 3 repeticiones.



No se realizaron los análisis de varianza de la respuesta del número de nudos activos a los tratamientos de parcela grande y de parcela chica. La interpretación se hizo tentativamente a partir de las medias de 3 repeticiones.

En la localidad San Bernardino, el promedio de 6 tratamientos (tratamientos 5, 6, 7, 8, A3 y A4) del maíz nativo local (de la raza Olotillo) fue de 40.3 nudos totales en 25 plantas, mientras que en el maíz nativo Olotón amarillo introducido de Totontepec (tratamientos 1, 2, 3, 4, A1 y A2) el promedio fue 99.7 nudos, casi 2.5 veces mayor. Esta comparación entre variedades es ortogonal para los demás factores experimentales. La comparación del efecto de bioinoculante promediado sobre sin y con la aplicación de nitrógeno en la variedad local fue diferente por un factor de 2.94 veces a favor del uso de bioinoculante (promedio de tratamientos 5 y 6 sin inoculante comparado con el promedio de los tratamientos 7 y 8, con inoculante). En el caso de la variedad Olotón el factor fue de 1.66 veces a favor del uso de bioinoculante (tratamientos 1 y 2 vs 3 y 4). La comparación entre el uso o no de 60 kg de N/ha en presencia de 80 kg de P_2O_5 y de 50 Kg de K_2O /ha, sin y con bioinoculación fue de un factor de 1.73 a favor del uso de N en la variedad nativa local en tanto que el factor fue de casi 1 en el maíz nativo Olotón (tratamientos 1 y 3 vs 2 y 4), esto es, que no hubo efecto. En cuanto al uso de fósforo y potasio en presencia de nitrógeno con bioinoculante en ambos maíces, Local y Olotón amarillo (tratamientos 4 y 8 vs A1 y A3) fue de 1.35 a favor de la fertilización con fósforo y potasio. En el caso de la variedad nativa Olotón (tratamientos 4 vs A1) el factor fue 1.29 a favor del uso de fósforo y potasio.

En la localidad Totontepec se compararon dos maíces de la raza Olotón, uno con grano amarillo y el otro de color blanco. Los resultados se presentan en el **Cuadro 16**. El promedio de 6 tratamientos (tratamientos 5, 6, 7, 8, A3 y A4) del maíz Olotón blanco fue 107.9 nudos activos en 25 plantas, mientras que en el Olotón amarillo (tratamientos 1, 2, 3, 4, A1 y A2) fue 107.1 nudos activos en 25 plantas. No hay diferencia entre ambas variedades nativas de Olotón en Totontepec. En cuanto al uso de bioinoculante el promedio de los tratamientos sin bioinoculante fue de 71.25 nudos activos y 112.5 nudos activos con bioinoculante, el factor es 1.58 a favor del uso de bioinoculante. La comparación entre el uso o no de 60 kg de N/ha en presencia de 80 kg de P_2O_5 y de 50 Kg de K_2O /ha, sin y con bioinoculación fue de 66.87 nudos activos sin aplicación de N y 116.87 nudos activos en respuesta a la aplicación de 60 kg de N/ha; el factor es 1.75 a favor del uso de N. En cuanto al uso de Fósforo y Potasio en presencia de Nitrógeno en ambas variedades nativas de Olotón en presencia de bioinoculante (tratamientos 4 y 8) fue 142.5 nudos activos mientras que sin fósforo ni potasio (tratamientos A1 y A3) hubo en promedio 125 nudos activos. El factor fue 1.14 a favor de la fertilización con fósforo y potasio.

6. Interacción edafoclimatología del carácter FBNMO.

Las observaciones sobre las siembras realizadas en tres localidades en los años 2021 a 2024 mostraron que la variedad nativa del maíz Olotón se adaptó muy bien agrónomicamente en todas, incluyendo la resistencia a las enfermedades foliares endémicas. En cambio, la expresión del carácter FBNMO mostró alta sensibilidad a la disponibilidad de humedad atmosférica particularmente, a la humedad relativa durante el período V10 a VR1 de la planta (Hanway, 1966). Solamente en el ciclo PV 2024 hubo suficiente humedad atmosférica en la



localidad Campo Experimental Valle de México (municipio de Texcoco, precipitación promedio anual de 686 mm), en tanto que en la localidad Universidad Intercultural del Estado de México (precipitación promedio anual de 850 mm) hubo manifestación del carácter en los años 2021 y 2024 (**Figura 16B**). Ambas localidades se manejaron con riego, por lo que la humedad del suelo no fue un factor limitativo del desarrollo del cultivo o la manifestación del carácter. Se observó también que en la mayoría de las plantas que exhibieron el carácter FBNMO (raíces adventicias con mucílago) se alcanzó sólo hasta el cuarto nudo, mientras que en la localidad Totontepec Oaxaca con precipitación igual a 1500 mm esa actividad típicamente se alcanza hasta entre el 8° y el 10° nudo. En la localidad San Miguel Tianguizolco (municipio de Huejotzingo, Pue., con precipitación media anual de 1270 mm) hubo suficiente humedad atmosférica en el ciclo PV 2021 para la manifestación del carácter FBNMO, si bien con la restricción de alcanzar sólo hasta el 4° nudo (**Figura 16A**). En todos los casos, la manifestación del carácter mostró una apreciable variabilidad entre plantas, habiendo individuos que no expresaron el carácter, hasta los que se activaron las raíces adventicias y la exudación de mucílago hasta los 4 nudos inferiores.

Desafortunadamente, no se repitieron las siembras en esta localidad en los tres años siguientes.



Figura 16. Desarrollo de raíces adventicias (A) en la UIEM ciclo PV 2021 y PV 2024, bajo riego y (B) raíces primarias y secundarias y exudación de mucílago en la localidad San Miguel Tianguizolco, municipio de Huejotzingo Puebla, 2021 bajo temporal.

7. Componente Socioeconómico.

Debido a malentendidos entre los objetivos del proyecto y la Universidad Autónoma Comunal de Oaxaca (UACO), principalmente en cuanto su parte operativa, el Rector de la Universidad decidió dimitir del proyecto según carta que se anexa en el **Apéndice II** de este documento. También se presenta la respuesta del responsable técnico del proyecto a ese documento. Desafortunadamente, la Rectoría de la UACO interpretó que los objetivos y la operación del proyecto eran consistentes con una postura colonialista no declarada, de imponer los conocimientos de la ciencia occidental al conocimiento de los Pueblos Originarios. En la respuesta a ese comunicado el responsable técnico del proyecto argumentó



infructuosamente que el objetivo del proyecto era complementar ambos tipos de conocimientos en defensa de la biopiratería ya en proceso y en la búsqueda de la soberanía y seguridad alimentarias de México.

Desafortunadamente, no hubo respuesta de parte de la Rectoría de la UACO, lo que privó y debilitó al proyecto en cuanto a su objetivo de incluir al conocimiento de los Pueblos Originales en la defensa de la propiedad intelectual social del carácter FBNMO.

8. Día de demostración de campo a productores y a técnicos.

Evento demostrativo con productores de Totontepec Villa de Morelos, Mixe, Oaxaca. Se llevó a cabo un evento demostrativo con productores y técnicos en la comunidad de Totontepec Villa de Morelos, Mixe, Oaxaca, el 29 de octubre de 2023.

En el evento estuvieron presentes el Dr. Antonio Turrent Fernández, Dr. José Luis Aguirre Noyola, y Dr. Aarón Martínez Gutiérrez. La asistencia total fue de 33 personas entre hombres y mujeres productoras. Estuvieron presentes representantes del comisariado de bienes comunales entre ellos el consejo de vigilancia (**Cuadro 17**).

Cuadro 17. Resumen de asistencias de productores, técnicos y estudiantes en el evento demostrativo, en Totontepec Villa de Morelos 2023.

Participación de productores, técnicos y estudiantes					
Productores	Técnicos	Estudiantes	Mujeres	Hombres	Total
28	2	3	13	20	33

Primeramente, el Dr. Aarón Martínez Gutiérrez explicó la importancia de la descripción varietal como alternativa para la protección defensiva de las variedades de maíz nativo Olotón y el por qué es necesario el reconocimiento internacional de la propiedad intelectual del carácter FBNMO del Pueblo Mixe. El Dr. José Luis Aguirre, presentó el papel de los microorganismos del mucigel y su interacción con la planta. Finalmente, el Dr. Turrent presentó los resultados agronómicos del ciclo anterior y explicó las bondades del sistema milpa intercalado con árboles frutales. Después de aproximadamente 40 minutos de pláticas, se abrió la sesión de preguntas y observaciones de parte de los asistentes. Aquí fue necesario batallar con que la audiencia es bilingüe porque su idioma original es el Ayuujk, con casos de poca fluidez en español. Hubo que ser muy claro y emplear términos que pudieran ser entendidos. En términos generales, la discusión fue enriquecedora porque nos da la pauta para orientar los mecanismos de protección del carácter de fijación biológica de nitrógeno.

En resumen, los asistentes al día de campo demandaron que el propietario del carácter fijación de N habría de ser solo el pueblo Mixe de Totontepec, y no de la región Mixe, por el simple hecho de que en Totontepec fue donde realizaron las investigaciones por las uni-



versidades extranjeras. Sin embargo, se les explicó que en Totontepec es sólo el sitio donde se hizo el descubrimiento de la FBN amplificada en maíz, pero otros municipios de Oaxaca y de otros estados de México, también participaron históricamente en la domesticación y la amplificación del carácter FBN en maíz, por lo tanto, deberían ser copropietarios del carácter. También se les explicó del por qué se tenía que registrar la variedad en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales y el número de firmas necesarias para su registro, como un mecanismo de protección defensiva y evitar que sea patentado en otros países adheridos en el Acta 91 de UPOV. Los integrantes del comisariado de bienes comunales sugirieron al final, que se revisaría la propuesta en una asamblea comunitaria para determinar si aceptaban firmar o no para el registro de las variedades nativas. Por lo tanto, esta estrategia de registrar la variedad se complicó porque no hay unanimidad en México de quién es el propietario del carácter.

Cuando el Dr. Turrent les explicó las ventajas que tendría el sistema MIAF como una tecnología adicional a lo que es el maíz fijador de nitrógeno, la siembra de árboles frutales para proteger la erosión del suelo por la pendiente más bien escarpada, ellos argumentan que un productor tendría que estar en la parcela más de 20 años lo cual parece improbable, porque las tierras son de uso común es decir le pertenece a la comunidad como propiedad comunal, lo que significa que los comuneros tienen su parcela pero no hay asignaciones de propiedad individual. Sin embargo, ellos comentaron que es algo que pueden platicar y resolver entre los comuneros para adoptar la tecnología con fines de mejorar sus prácticas agrícolas y producción. Aunque también se aclaró que en la comunidad ya existen propiedades privadas y estos productores se mostraron interesados en establecer el sistema MIAF en sus parcelas ya sea de manera particular o con apoyo gubernamental. Al final se realizó un recorrido en las parcelas y se les explicó a los asistentes del manejo agronómico empleado en el cultivo de maíz y en los árboles frutales. Se anexan algunas fotos del día de demostración de campo.



Figura 17. Fotos alusivas al recorrido de campo en Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca, con sistema MIAF-higo. Ladera con 30-40% de pendiente.





Capítulo 5

Discusión



Illustration of maize in the 1566 edition of the herbal of Dodonaeus



Discusión



La defensa de la propiedad intelectual social del carácter Fijación Biológica de Nitrógeno del maíz nativo de la raza Olotón (FBNMO), principal objetivo del proyecto que se discute incluyó 1) la descripción varietal del maíz nativo de la raza Olotón en Totontepec, Oaxaca, 2) su inscripción en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales en el país y, 3) el logro del título de Obtentor Social para la comunidad Mixe. Con este reconocimiento más los saberes de los Pueblos Originales Mixes, que habrían de estudiarse en el proyecto, se esperaba dar un paso toral que serviría posteriormente como argumento a favor del reconocimiento internacional de la propiedad intelectual del carácter FBNMO del Pueblo Mixe.

No fue posible seguir esa ruta debido a varios factores previamente desconocidos o inesperados para el equipo científico que diseñó el proyecto: 1) Existe el “Grupo Estatal para la Defensa de los maíces Nativos de Oaxaca” (Kloppenburger *et al.*, 2022). Este grupo sostiene que “no se puede patentar la propiedad comunal” y que la semilla nativa y el carácter FBNMO habrían de ser compartidos con los pueblos del mundo de manera gratuita —esta posición es consistente con los objetivos del proyecto—. También aquel grupo sostiene que el proceso de descripción varietal de un maíz nativo equivale a dar un paso hacia patentar esa propiedad comunal; 2) El gobierno Mexicano otorgó formalmente en el año 2015 el “Certificado de Cumplimiento con validez Internacional”, de acuerdo con el Protocolo de Nagoya, del que México es signatario desde 2012. Este certificado permite que los desarrollos científicos que conduzcan a la obtención de patentes rendirían ganancias que habrían de compartirse en la proporción de 1 a 99 (1 para el municipio de Totontepec y 99 para Mars (Inc); y 3) la dimisión de la Universidad Comunal Autónoma de Oaxaca no pudo ser sustituida por otra institución, por lo que no se realizaron los estudios del conocimiento de los Pueblos Nativos referentes al carácter FBNM y la tecnología y aspectos culturales de los Pueblos Originales. Por lo anterior, el equipo del proyecto decidió publicar en una revista científica la información obtenida de la descripción varietal dando el debido reconocimiento a los Pueblos Originales como obtentores de la variedad nativa de maíz de la raza Olotón que posee el carácter FBNMO amplificado. Esta información quedará disponible en apoyo de alguna iniciativa posterior del gobierno de México sobre la propiedad intelectual del carácter.

Según se describe en el capítulo de Antecedentes de este documento, el grupo de la Universidad de California Davis ya intentó patentar en los E.E.U.U el código genético del maíz que fija nitrógeno. Este intento fue rechazado por la razón de que ese carácter ya existe

como tal en la naturaleza. Sería necesario introducir cambios significativos a ese código para lograr una patente. Aun cuando hubiera éxito en lograrlo eventualmente el código genético original puede ser utilizado gratuitamente por productores y por programas de gobierno. Empero, en tal caso habría que limitar su aplicación a condiciones edafoclimáticas similares a las de la Sierra Mixe.

Se ha evaluado que el maíz Olotón ostenta el carácter FBNMO y que fija entre el 29% y el 82% del requerimiento total de nitrógeno de la planta en el mucílago exudado por sus raíces adventicias en el período entre V10 y VR1 —etapa de 10 hojas plenamente desarrolladas hasta la etapa R1 (grano perla de agua)— si bien sujeto a una abundante disponibilidad de humedad atmosférica en ese período. La variabilidad en la intensidad de fijación de Nitrógeno probablemente se deba a que se trata de poblaciones de polinización libre en las que la intención del Mejoramiento Genético Autóctono a que han estado sujetas estas poblaciones persigue la intensificación de múltiples caracteres que incluyen al carácter FBNMO.

Es relevante la variabilidad observada en características morfológicas y fenológicas al nivel individual entre las 80 plantas marcadas *a priori* para la descripción varietal de las variedades Olotón amarillo y Olotón blanco. Son variedades de polinización libre y sujetas a prácticas de mejoramiento genético autóctono según describe (Hernández X., 1987, 1993). Entre estas prácticas están: 1) la selección de semilla en el almacén de la cosecha por parte de la mujer, 2) el intercambio de semilla dentro de la comunidad (simpátricas) e introducción de semillas de lugares distantes (alopátricas), en ambos casos mezclándolas con la semilla propia y sembrándolas para propiciar su cruzamiento.

Discutiremos en conjunto los resultados de la descripción varietal, la experimentación sobre las interacciones entre el carácter FBNMO y la fertilización del suelo, el uso de bioinoculantes nativos y el comportamiento observado del maíz Olotón en condiciones edafoclimáticas distintas a las de la región Mixe. Esto, en referencia a la simbiosis entre la microbiota y la planta de maíz.

Desde la domesticación del maíz a partir del zacate nativo Teocintle, los materiales genéticos de maíz fueron desarrollados por los pueblos originales durante varios miles de años, siendo el autoconsumo el objetivo general por lo que, además de adaptación agronómica al nicho ecológico particular de cultivo, se buscó también calidad organoléptica —color, olor, sabor, textura, calidad nutracéutica— acorde a su consumo cultural. Hay consenso científico de que la biodiversidad del Teocintle, especie silvestre adaptada a gran parte de Mesoamérica es la fuente muy principal de la biodiversidad del maíz nativo actual, mediante su compatibilidad genética, la acción humana y la movilidad de ésta en la geografía de Mesoamérica. Este origen de la biodiversidad incluye al carácter fijación biológica de nitrógeno, carácter evolutivo que también llegó al maíz con la domesticación del Teocintle.

Muy probablemente la simbiosis entre el maíz nativo y la microbiota diazotrófica y otra microbiota también presente en la simbiosis —que aporta funciones adicionales como antibiosis al hongo del género *Fusarium* y a la microbiota oportunista, producción de reguladores del crecimiento y solubilización de fósforo mineral— es un proceso coevolutivo de ambos simbioses.



Como simbiote del carácter FBNMO el maíz realiza un conjunto de funciones necesarias para su operación que, incluyen por lo menos: 1) la de secreción en la raíz de compuestos específicos destinados a reclutar la microbiota del suelo específica para el carácter FBNMO, probablemente involucrando señales químicas compartidas con la microbiota por reclutar; 2) su transporte hasta el reactor donde se realizará la fijación de nitrógeno atmosférico; este reactor es el mucílago exudado por el sistema de raíces adventicias del maíz, aunque también lo es en el mucílago exudado en las raíces en la rizósfera del suelo; 3) producir raíces adventicias a partir de la etapa V10 desde el nudo inferior del tallo de manera progresiva hacia el ápice de la planta hasta alcanzar el décimo nudo o alguno superior. En la circunferencia de cada nudo se desarrollan las raíces adventicias que, al desarrollar exudan mucílago de manera temporal. Cuando la actividad de exudación está en progreso, el siguiente nudo hacia arriba inicia su desarrollo y sustituye al nudo anterior cuando éste cesa su exudación de mucílago. Este proceso continúa hasta cesar en la etapa VT o VR1; 4) producir y exudar un mucílago que contiene un conjunto de carbohidratos principalmente arabinosa, fucosa y galactosa que proporcionan la energía necesaria para la fijación de nitrógeno atmosférico (Van Deynze *et al.*, 2018) y que contiene una baja concentración de oxígeno, condición necesaria para la acción de la enzima nitrogenasa; 5) el nitrógeno fijado en el reactor ha de ser transportado a los órganos que lo requieren; 6) seguramente hay otras funciones involucradas en el carácter FBNMO que habrán de ser entendidas en el futuro próximo.

Todas estas funciones del simbiote maíz habrán de ser necesariamente reguladas por un conjunto de genes al que aquí nos referiremos como el código genético del carácter FBNMO. Este conjunto de genes y de sus alelos —probablemente con más de un alelo en una fracción importante de los genes— estructuran un carácter cuantitativo, probablemente integrado por varios centenares de genes y sus alelos óptimos para la expresión máxima del carácter. La biodiversidad que caracteriza a las razas nativas mientras éstas se manejan bajo polinización libre, probablemente con multi-objetivos, incluye desde el código genético en el que los alelos presentes son los óptimos para la fijación de Nitrógeno atmosférico hasta variantes que no los reúnen. Esta diversidad podría ayudar a explicar la variación observada desde individuos que fijan el 29% del requerimiento de Nitrógeno de la planta de maíz hasta los que fijan el 82% de ese requerimiento, como lo observaron Van Deynze y sus colaboradores (Van Deynze *et al.*, 2018). Muy probablemente se podrá seleccionar por técnicas de mejoramiento genético mendeliano, subpoblaciones que reúnan individuos con la más alta frecuencia de nudos con raíces adventicias que exuden el mucílago necesario para la expresión del carácter FBNMO.

Respuesta a fertilizante nitrogenado (Urea)

La clara respuesta a la aplicación de 60kg de N/ha en el experimento conducido en el año 2022 [Cuadro 12, ecuación (1)] y confirmada en el experimento conducido en 2024 (Cuadro 17) podría deberse a un contenido limitante de nitrógeno del suelo mientras el cultivo depende solo de ese nitrógeno en la etapa previa a la activación del mecanismo de fijación de nitrógeno atmosférico (antes de la etapa V10). Los contenidos de nitratos del terreno plano ($N-NO_3$) y de ladera son respectivamente moderadamente bajo y medio (Cuadro 12). Otro factor que se asociaría a esa respuesta sería la heterogeneidad de la población



respecto a la expresión del carácter FBNMO que va desde una fracción de la población con baja o nula capacidad hasta otras fracciones de alta a muy alta capacidad de fijación de nitrógeno. La respuesta al fertilizante nitrogenado se manifestó tanto en el rendimiento de grano (año 2022) y probablemente en el experimento conducido en el año 2024 —este experimento no había sido cosechado a la fecha de entrada a edición de este libro— como en el número de nudos activos con raíces adventicias activas que exudan mucílago (**Cuadro 16**) en ambas localidades San Bernardino y Totontepec. Probablemente, una deficiencia de nitrógeno en la época en que el cultivo depende sólo del nitrógeno del suelo interacciona con la manifestación total del carácter FBNMO.

Respuesta a los fertilizantes fósforo y potasio y al uso de estiércol y cal agrícola en el año 2022

Las respuestas en términos del rendimiento a las aplicaciones de fósforo, potasio, estiércol de res y cal agrícola fueron moderadas. El contenido de Fósforo-Bray de la capa arable del suelo en la localidad con suelo plano es medio y en la localidad en ladera es moderadamente alto (**Cuadro 12**). Bajo el supuesto de una calibración válida de los métodos el contenido de fósforo asimilable (Fósforo-Bray), la respuesta moderada al fertilizante fosfórico en términos de rendimiento sería esperable en ambos casos (**Cuadros 13 y 14**). En cambio, en ambas localidades los valores de potasio asimilable (muy bajo) y potasio intercambiable (alto) están en conflicto entre sí. Según los requerimientos de encalado de ambas localidades (datos no incluidos), en ambos casos se requiere la aplicación de 6 t/ha para alcanzar la neutralidad. Se probaron 2 y 4 t/ha en los tratamientos. La aplicación de estiércol de 3 t/ha interaccionó positivamente con la fertilización de 60 kg de N/ha (Ecuación 1).

Respuesta a la bioinoculación

La respuesta a la bioinoculación fue muy clara en términos del número de nudos activos en las 25 plantas evaluadas de cada parcela en ambas localidades (**Cuadro 16**). La variedad nativa Olotón amarillo respondió a la bioinoculación incrementando el número de nudos activos en ambas localidades y a la vez, la variedad nativa Olotón blanco que sólo se sembró en Totontepec mostró la misma respuesta. La variedad local nativa sólo sembrada en San Bernardino también respondió a la bioinoculación, aunque con menores números de nudos activos. Aparentemente, en todos los casos, el reclutamiento de microbiota diazotrófica del suelo fue insuficiente para la expresión del carácter FBNMO, dada la aparente variabilidad en sus códigos genéticos. Se podría aventurar la conjetura de que la variedad nativa de San Bernardino (raza Olotillo) tendría el código genético del carácter FBNMO más incompleto en cuanto a alelos óptimos, que la variedad introducida de maíz Olotón, y que aún ésta es incompleta en la fracción de alelos óptimos como expresión de la biodiversidad de las variedades de polinización libre. En la localidad Totontepec, ambas variedades nativas Olotón amarillo y Olotón blanco respondieron positivamente a la bioinoculación y a la aplicación de NPK (tratamiento 60-80-50 vs 0-80-50).



Respuesta a la interacción del carácter FBNMO y la edafoclimatología

Resultó sobresaliente la resistencia o tolerancia de la variedad nativa Olotón a las enfermedades endémicas en edafoclimatologías diferentes a la zona Mixe de Oaxaca. Esto facilita que los cruzamientos con otros materiales genéticos de maíz nativos o no, puedan realizarse exitosamente fuera del agronicho de la Sierra Mixe. Tal facilitará la transferencia del carácter FBNMO a materiales genéticos de otras razas y de variedades mejoradas modernas. La escasa manifestación del carácter FBNM observada fuera de la región Mixe se asoció con la baja disponibilidad de humedad atmosférica.

Lo aprendido sobre la microbiota simbiote

Es sorprendente el que los microbios asociados participan en gran medida en la determinación de la salud y el crecimiento de las plantas y estos microbios también son parte del patrimonio nacional al ser especies bien adaptadas y a veces únicas en las asociaciones con las plantas. Aquí se aislaron e identificaron las bacterias asociadas al maíz Olotón, que es extraordinario por su capacidad para promover la fijación de nitrógeno, lo que permite probar bacterias en sus efectos con plantas y frente a patógenos. Sin embargo, es requisito antes de usar bacterias como inoculantes, confirmar que estas mismas no sean patógenos ni de plantas ni de animales. Así, *Burkholderia*, micobacterias, acinetobacterias, algunas *Pseudomonas* en especial *P. aeruginosa*, han sido vetadas para su uso en agricultura, aunque mostraban capacidades muy buenas como promotoras del crecimiento vegetal (Tariq *et al.*, 2022). Para evaluar qué tan seguras son las plantas es necesario hacer pruebas fenotípicas y genotípicas.

Entre las bacterias fijadoras de nitrógeno se encuentra *Klebsiella variicola*, especie que se describió en el laboratorio de CCG-UNAM y que debe su nombre a que se ha obtenido de sitios diversos, tanto de plantas como de pacientes clínicos (Rosenblueth *et al.*, 2004). Se aisló originalmente como endófito de tallos de plátano y se ha obtenido de maíz, otras plantas, de insectos y de heces de animales (Chelius y Triplett 2000; Martínez-Romero *et al.*, 2021; Montes Grajales *et al.*, 2019). En general, las cepas hospitalarias poseen más genes que confieren resistencia a antibióticos y de virulencia que los que se encuentran en las *K. variicola* de plantas (Martínez-Romero *et al.*, 2018). La cepa *K. variicola* es de rápido crecimiento y puede ser modificada genéticamente, por lo que el grupo de Jean Michel Ané en la Universidad de Wisconsin la ha utilizado para obtener mutantes que excretan más amonio y promuevan el crecimiento del maíz (comunicación personal). Anteriormente, una cepa de *K. variicola* (mal clasificada como *K. pneumoniae*) que se obtuvo de un maíz de México con alta eficiencia para la utilización del nitrógeno, se aplicó en campos de cultivo en EEUU con resultados favorables (Triplett *et al.*, 2008); sin embargo, no recomendamos su uso porque, aunque originalmente se obtuvo de plantas y en teoría tendría pocos genes de virulencia, en realidad no se conocen todos los genes de virulencia y tal vez sí podrían ser patógenas.



La fijación de nitrógeno es un proceso muy caro energéticamente y hay una hipótesis de la “Reina Negra” que argumenta que a las bacterias no les conviene ser fijadoras de nitrógeno porque tienen desventajas ante la comunidad microbiana por los recursos que invierten en la fijación de nitrógeno. La hipótesis de la Reina Negra discute que se necesita alguna especie fijadora para mantener a la comunidad. Llama la atención que el mucílago del maíz que fija nitrógeno atmosférico esté enriquecido de fijadoras de nitrógeno, ¿Cómo justificar esta redundancia funcional? Tal vez la respuesta se sitúa en la defensa, la cual debe ser variada para contender contra distintos patógenos, esto queda por explorar. En los mucílagos de raíces aéreas de la dama rosa (*Heterotis rotundifolia*) hay evidencia de la actividad protectora de los microbios residentes frente a la invasión por hongos fitopatógenos (Pang *et al.*, 2023).

Una pregunta muy importante con repercusiones biotecnológicas es si hay respuesta a la inoculación (adición intencionada) de bacterias fijadoras de nitrógeno para incrementar el crecimiento del maíz Olotón y la productividad agrícola. Se escogió junto con investigadores del Colegio de Postgraduados, un conjunto de bacterias fijadoras de nitrógeno y promotoras de crecimiento para su empleo como inoculante. Se realizaron ensayos de inoculación de semilla de maíz Olotón al momento de la siembra en campos en Oaxaca y los resultados preliminares indicaron que sí hubo efecto positivo en las dos variedades nativas cotejadas en la localidad de San Bernardino (Ver **Cuadro 16**) y de Totontepec. Empero, la magnitud de la respuesta fue significativamente diferente en las variedades nativas en cotejo.

Queda por analizar si las bacterias inoculadas se encuentran en el mucílago o si los efectos son a distancia, causados por las bacterias en las raíces en tierra. Para la inoculación del maíz Olotón, ¿sería conveniente preservar las proporciones del número de bacterias que se encuentran en el mucílago? También surge la pregunta del por qué hay diversas fijadoras de nitrógeno en una sola muestra. Distintas formulaciones de inoculantes harán de ser probadas en laboratorio en plantas de maíz Olotón, tanto inoculando la raíz como el mucílago, en cámaras de cultivo con humidificadores que permitan mantener los altos niveles de humedad que requiere la planta. De esta manera producir el mucílago y así contar con condiciones controladas para evaluar los efectos individuales de las bacterias del mucílago.

Cabe destacar que los estudios de las bacterias asociadas a plantas fueron pioneros en el conocimiento de su identidad y sus funciones, y revelaron desde hace más de 100 años el papel fundamental que juegan las bacterias en el desarrollo y salud de las plantas. Pero es claro que todavía la investigación sobre fijación de nitrógeno tiene un amplio campo y retos para continuar contribuyendo a la producción agrícola.

De manera complementaria y con fines futuros de manejo biotecnológico de las cepas bacterianas cultivables, se logró obtener y caracterizar un germoplasma bacteriano a partir del mucílago y de la rizosfera del maíz Olotón. Estas bacterias poseen características fisiológicas complementarias (fijación biológica del nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfatos y producción de índoles totales) que podrían repercutir en la nutrición y en el crecimiento de este tipo de maíz.



Las implicaciones de estas bacterias con base en sus características para favorecer la asimilación y el aprovechamiento del nitrógeno y fósforo por las plantas, influyen además en sus capacidades para inducir el crecimiento vegetativo de las plantas de maíz (Sondang *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2015). En lo general, de las 156 bacterias identificadas a partir del mucílago, 93 poseían la capacidad de poder fijar nitrógeno atmosférico, 23 de solubilizar fósforo inorgánico, y 143 de producir compuestos del tipo de los índoles (auxinas) que tienen efectos como fitohormonas; en tanto que, de las 302 bacterias cultivables identificadas a partir de la rizosfera, ya sea de maíz blanco o amarillo, se detectaron 124 bacterias con potencial de fijar nitrógeno atmosférico, 29 para solubilizar fósforo, y 179 para producir índoles.

Los resultados obtenidos en este proyecto indican que el carácter de la fijación de nitrógeno no es un fenómeno aislado del código genético del simbiote maíz, y que requiere de la complementariedad de actividades fisiológicas que tienen las diversas bacterias cultivables y no cultivables, de las cuales se han mencionado solo algunos ejemplos, y que acompañan tanto al mucílago como a la rizosfera del maíz Olotón.

Varios aspectos se destacan en relación con la efectividad biológica de las bacterias aisladas del mucílago, en el crecimiento temprano de plántulas de maíz Olotón en condiciones controladas. Se denota que 4 bacterias inoculadas individualmente, estimularon el crecimiento en altura (*Raoultella terrigena*, *Methylobacterium* sp. y *Herbaspirillum* sp.) y en área foliar (*Sphingomonas truperi* y *Herbaspirillum* sp.); sin embargo, la aplicación de estas bacterias como consorcios artificiales mostraron menor efectividad en el crecimiento vegetal con respecto a su inoculación individual, aunque su efecto fue significativamente mayor que en aquellas plantas sin la inoculación de bacterias aun con la aplicación de dos dosis de nitrógeno, 0 y 60 kg de N/ha.

Desde el punto de vista ecológico relacionado con su función y con su efecto benéfico, se aprecia un fenómeno de competencia interespecífica entre las bacterias seleccionadas para integrar el consorcio (inóculo). Tal competencia implicó una regulación interespecífica (Okabe *et al.*, 2025), lo cual es un fenómeno natural entre las cepas bacterianas (Martínez *et al.*, 2021). Estos aspectos o criterios son importantes de valorar al momento de seleccionar cepas bacterianas que serán dirigidas para el manejo biotecnológico en la elaboración de inóculos para su aplicación en la agricultura (Rivera-Hernández *et al.*, 2024). En este caso, los consorcios que son utilizados como inoculantes, siguen demostrando mayor efectividad biológica con respecto a plantas no inoculadas, al poseer diversas actividades fisiológicas complementarias que repercuten en el crecimiento y desarrollo vegetal, lo cual deberá ser validado considerando el manejo agronómico que se aplica al cultivo del maíz.





Capítulo 6

Conclusiones



Illustration of maize in the 1566 edition of the herbal of Dodonaeus



Conclusiones



La expresión del carácter Fijación Biológica amplificada en la raza de Maíz Olotón por lo menos, es producto de la simbiosis entre el maíz de la raza Olotón y microbiota diazotrófica específica en consorcio con microbiota ubicada en el mismo mucílago-reactor que le añade por lo menos funciones de antibiosis, de regulación de crecimiento y solubilización de fósforo del suelo. El Código genético del simbiote maíz regula varias funciones necesarias para la fijación y asimilación por la planta del nitrógeno atmosférico. Estas funciones incluyen a) el reclutamiento de microbiota específica del suelo y de la semilla por lo menos, b) el desarrollo de raíces adventicias que exudan un mucílago microaeróbico (bajo en oxígeno) que contiene polisacáridos como fuente de la energía requerida para la reducción del nitrógeno inerte a su forma asimilable NH_3 , c) el transporte de formas asimilables de nitrógeno a los órganos de la planta que las requieren, y d) otras funciones aún por identificar.

El Código genético del carácter FBNMO es aparentemente un carácter cuantitativo multigénico en el que una fracción de sus genes tiene más de un alelo, generando la biodiversidad que se observa en la raza nativa de maíz. Los resultados del experimento de bioinoculación en San Bernardino (**Cuadro 16**) sugieren que, si bien las dos variedades nativas de maíz (local y Olotón amarillo) respondieron de manera positiva en el número de nudos activos a la bioinoculación, la respuesta involucra a un número menor de nódulos activos en la variedad local (raza Olotillo), como si su Código Genético estuviera más incompleto de alelos óptimos que el de la raza Olotón, a pesar de que éste fue cultivado en la edafoclimatología habitual para la variedad local. El experimento sobre bioinoculación conducido en Totontepec involucró a dos variedades nativas locales Olotón amarillo y Olotón blanco. También, ambas variedades presentaron respuestas positivas en el número de nudos activos a la bioinoculación y a la fertilización, sugiriendo que ambos factores bioinoculación y fertilización de arranque con nitrógeno, pueden ser consistentemente requeridos en parte de la región Mixe y otras con edafoclimatología similar.

Los análisis microbiológicos, dependientes e independientes del cultivo en laboratorio demostraron que existen bacterias que habitan el mucílago de la mayoría de los maíces cultivados en Totontepec Villa de Morelos. Estas bacterias fueron *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Sphingomonas*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus*, *Bdellovibrio* y algunos rizobios. Los mucílagos presentaron una diversidad bacteriana menor a la de los suelos, sugiriendo la selección de microorganismos por parte de la planta. El origen de las bacterias necesita ser explorado con mayor profundidad, aunque encontramos algunas bacterias del mucílago en el suelo y en las semillas.

Múltiples funciones de promoción del crecimiento vegetal fueron detectadas en la microbiota del mucílago. Se demostró que la fijación biológica de nitrógeno puede ser llevada a cabo por *Raoultella*, *Phytobacter*, *Klebsiella*, *Kosakonia*, *Azospirillum*, *Rahnella* y *Enterobacter*, mientras que el antagonismo contra fitopatógenos se encontró asociado principalmente a *Pseudomonas*. En cuanto a la producción de fitohormonas, *Azospirillum* y *Herbaspirillum* fueron portadoras de genes para su producción. Esto fue comprobado con ensayos en *Arabidopsis thaliana*, que mostraron aumento en el desarrollo radicular en presencia de estas bacterias.

Se aislaron 156 especies de bacterias cultivables identificadas a partir del mucílago, 93 de ellas poseían la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, 23 de solubilizar fósforo inorgánico, y 143 de producir compuestos del tipo de las auxinas. De las 302 especies de bacterias cultivables identificadas a partir de la rizosfera, ya sea de maíz blanco o amarillo, se detectaron 124 con potencial de fijar nitrógeno atmosférico, 29 para solubilizar fósforo, y 179 para producir indoles.

Con respecto a su efectividad biológica, 4 bacterias inoculadas individualmente, estimularon el crecimiento en altura (*Raoultella terrigena*, *Methylobacterium* sp. y *Herbaspirillum* sp.) y en área foliar (*Sphingomonas truperi* y *Herbaspirillum* sp.). Estas bacterias como consorcios artificiales mostraron menor efectividad en el crecimiento vegetal con respecto a su inoculación individual, aunque su efecto fue significativamente mayor que las plantas testigo, aun con la aplicación de dos dosis de nitrógeno.

Los resultados indican que el carácter de la fijación de nitrógeno no es un fenómeno aislado, y que requiere de la complementariedad de actividades fisiológicas que tienen las diversas bacterias cultivables y no cultivables, tanto del mucigel como de la rizosfera del maíz Olotón.

Desde el punto de vista ecológico y funcionalidad se apreció un fenómeno de competencia o regulación interespecífica entre las bacterias seleccionadas para integrar el consorcio (inóculo). La competencia entre bacterias que se presenta en ese fenómeno, es importante en la selección de cepas bacterianas dirigidas para su manejo biotecnológico en la elaboración de inóculos para su aplicación en la agricultura.

Los consorcios mostraron mayor efectividad biológica con respecto a plantas no inoculadas, al poseer diversas actividades fisiológicas complementarias que repercuten en el crecimiento y desarrollo vegetal, lo cual requieren de validación agronómica en el cultivo del maíz.



Capítulo 7

Tareas pendientes y recomendaciones



Illustration of maize in the 1566 edition of the herbal of Dodonaeus



Tareas pendientes y recomendaciones



Prácticas agronómicas

La simbiosis original entre el maíz de la raza Olotón y bacterias diazotróficas amplificada por los Pueblos Originales de México, puede alcanzar entre el 29% y el 82% del requerimiento de Nitrógeno de la planta de maíz, según fue medido en Totontepec, Oaxaca (Van Deynze *et al.*, 2018). El ámbito de valores es esperable dado el carácter de polinización libre y dado el objetivo de los Pueblos Originales de la conservación de la biodiversidad que incluye a muchos otros caracteres. Seguramente que se podría seleccionar subpoblaciones con los valores altos del carácter FBNMO. La manifestación plena de ese carácter Fijación biológica de nitrógeno en el maíz Olotón (FBNMO) tiene actualmente como requerimiento *sine que non* una frecuente precipitación en la etapa V10 a VR1 del desarrollo del cultivo. Hay evidencias indirectas y directas de que el código genético pleno original del maíz de la raza Olotón —probablemente integrado por centenares de alelos con herencia cuantitativa— asociado al carácter FBNMO es heredable entre razas nativas de maíz y seguramente que lo es también en los maíces mejorados modernos.

Según se menciona previamente, el código genético original que ya existe como tal no es patentable, como tampoco lo son otros caracteres como el Gene Opaco 2 y muchos otros ejemplos que ya existen en la naturaleza y que fueron fijados por los Pueblos Originarios en el maíz. Por lo tanto, su uso para mejorar la seguridad y soberanía alimentaria debe ser gratuito. Sin embargo, en la actualidad, el aprovechamiento del carácter FBNMO para sustituir total o parcialmente el uso de fertilizante sintético está limitado a las regiones húmedas de clima templado similar al de la Sierra Mixe en México y en el resto del mundo.

Un primer paso para establecer un programa en que se aproveche de manera gratuita el carácter tanto en México como en el resto del mundo tiene por lo menos dos componentes: 1) identificar aquellas regiones que cumplan con el requisito climatológico. Muy probablemente las hay en México en porciones de varios Estados: Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Puebla y San Luís Potosí, que han de ser identificadas, así como las superficies de estas regiones dedicadas al cultivo de maíz. También las hay en muchas regiones del resto del mundo, por lo que su utilidad para reducir total o parcialmente el uso de fertilizante nitrogenado sintético en maíz cultivado en esas regiones es muy significativa; 2) También es necesario hacer la secuenciación molecular para conocer con detalle las características moleculares del código genético original del carácter FBNMO. Este conocimiento podrá ser necesario como

arma de defensa contra reclamos futuros de los consorcios transnacionales que desarrollen patentes y reclamen el pago de regalías.

Un segundo paso a corto plazo sería poner a disposición de los pequeños agricultores la semilla de maíz Olotón, en un programa de intercambio de semilla como ya se ha hecho previamente en programas de gobierno. Habría que advertir a los productores sobre la larga longitud de ciclo del maíz Olotón y su gran porte y vigor, para lograr coincidencia de floraciones. Ellos lo cruzarían con sus maíces nativos según el mejoramiento genético autóctono y seleccionarían las progenies que expresaran el carácter FBNMO y a la vez las características morfológicas y organolépticas para su autoconsumo cultural.

Otro camino con las mismas restricciones climatológicas sería establecer un programa público de mejoramiento genético con el objetivo de desarrollar variedades modernas de polinización libre o híbridos que expresen el carácter FBNMO y además reúnan características agronómicas más manejables y adaptadas a la intensificación para ampliar sus rendimientos. El programa habría de comenzar con la colecta de variedades nativas de la raza Olotón en la Sierra Mixe, para integrar una población de amplia base genética en cuanto al código genético del carácter FBNMO. Seguiría un proceso de selección masal de varios ciclos para seleccionar subpoblaciones que muestren en campo el mayor número de nudos activos exudantes de mucílago (cinco nudos por planta por lo menos). Este proceso habría de realizarse en Totontepec para asegurarse que la edafoclimatología no limite la expresión del carácter FBNMO. El producto de este proceso de selección podría entregarse en intercambio de semillas con productores para que ellos realicen la transferencia del carácter. También esta(s) población(es) podrían ser usadas como donantes del carácter de fijación de nitrógeno en su cruzamiento con materiales genéticos mejorados tanto híbridos como variedades de polinización libre. En todos los casos, la siembra del material genético habrá de acompañarse de una baja fertilización de arranque (60 kg de N/ha) en la etapa V4 y de bioinoculación previa a la siembra. El bioinoculante incluye 6 géneros de bacterias *Azospirillum*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Rhanella* y *Raoultella*. Estas bacterias actúan en consorcio para activar las funciones: 1) fijación biológica de nitrógeno, 2) estimulación del crecimiento, 3) antibiosis contra *Fusarium* y otra microbiota oportunista, 4) solubilización de fósforo inorgánico.

Las áreas sembradas con maíz en regiones de México que pueden tener una climatología similar a la de la Sierra Mixe son predominantemente de ladera y están expuestas a la erosión hídrica, si no son protegidas por prácticas anti-erosivas adecuadas. El INIFAP y el Colegio de Postgraduados han colaborado desde hace más de 40 años para desarrollar un sistema tecnológico multiobjetivo conocido como Milpa Intercalada en Árboles Frutales (MIAF) para la agricultura en pequeño que: 1) incremente de manera significativa el ingreso familiar con respecto al monocultivo de maíz, 2) proteja el suelo contra la erosión, 3) mantenga biodiversidad, particularmente la de los materiales genéticos de maíz, frijol, calabaza, domesticados en Mesoamérica, 4) incremente la infiltración del agua de lluvia y 5) incremente la captura de Carbón atmosférico (Cortés *et al.*, 2012). Este sistema tecnológico fue instalado en una parcela de Totontepec, que aparece en la **Figura 17** en su primer año 2023 de instalación.

En las **Figuras 18 y 19** se muestra el efecto del uso del sistema MIAF-chicozapote en una ladera de 18% de pendiente de una localidad en San Andrés Tuxtla, Veracruz, después



de 14 años de haberse instalado. Se aprecia el desarrollo de los árboles de chicozapote distanciados 1 m entre sí en contorno, sobre los que se apoya cada año un camellón de rastrojo de maíz que funciona como filtro de escurrimientos del agua de lluvia. El suelo del orden Vertisol fue roturado anualmente y cultivado con maíz entre hileras de árboles plantados en contorno. Las hileras de árboles se distanciaron 15 m entre sí, ubicándose 12 surcos entre ellas. En este espacio se cultiva anualmente la secuencia maíz-frijol en relevo bajo temporal. Como se ve en la misma **Figura 19**, se retuvo 1332 t/ha de suelo durante 14 años, que en ausencia de la protección contra la erosión habrían sido perdidos, reduciendo la productividad de la ladera y azolvando los cuerpos de agua superficiales aguas abajo. Las laderas de las sierras que se roturan sin protección contra la erosión tendrán una vida útil significativamente inferior a la actualidad debido a que el cambio climático ya en proceso, se asocia con lluvias torrenciales de mayor poder erosivo.

Al cabo de 14 años de MIAF...



Figura 18. Retención de suelo en una ladera con 18% de pendiente en San Andrés Tuxtla, Veracruz durante 14 años de manejo con el sistema MIAF-chicozapote. Precipitación media anual de 1500 mm.



Figura 19. Parcela MIAF-chicozapote después de 14 años de su instalación en una localidad de San Andrés Tuxtla, Veracruz.



Un tercer camino para aprovechar el carácter FBNMO es el de buscar romper la dependencia de la manifestación de este carácter a la alta frecuencia de lluvias en la etapa del cultivo desde V10 a VR1. Éste es el camino que siguen los consorcios transnacionales con el objetivo patentar el carácter de FBNMO que prosperará en una gran fracción de los 330 millones de hectáreas cultivadas con maíz en el mundo. Este carácter sí sería patentable. La investigación aplicada estratégica requerida será a plazo largo, cara en términos de concentración de recursos financieros, humanos altamente especializados y con alto riesgo de fracaso. Aunque México cuenta con esos recursos, tal vez hay otras prioridades para el campo, como lo es el desarrollo de tecnologías de producción de alimentos para enfrentar el cambio climático.

Prácticas para el manejo de la microbiota simbiótica

En este trabajo se encontró que el perfil de las bacterias del suelo es muy diferente al perfil en el mucílago. Algunas bacterias del mucílago fueron encontradas en baja cantidad en el suelo y en el mucílago, por lo que podrían provenir del suelo. ¿Podrían venir de las semillas? Un análisis previo reveló que cada semilla de un mismo olate de un maíz nativo contiene distintas bacterias en número variable (Rosenblueth *et al.*, 2010). También de maíces nativos de semillas esterilizadas superficialmente y cultivados en vermiculita estéril se obtuvieron metilobacterias y rizobios cuyo origen más probable era de las semillas (Rosenblueth *et al.*, 2010). Aquí se obtuvieron resultados semejantes, ya que, a partir de raíces de plantas de maíz cultivadas en sustratos estériles, se aislaron cepas de *Klebsiella michiganensis* fijadoras de nitrógeno que también se han encontrado en el mucílago. La polinización cruzada es muy común en los maíces nativos lo que contribuiría a que cada semilla tenga diferente padre y hasta diferente microbiota. Por otro lado, las bacterias del mucílago podrían ser residentes endófitos de las raíces aéreas y salir al mucílago cuando éste se libera. Esta es una posibilidad por explorar. De hecho, se han obtenido bacterias endófitas de las raíces aéreas. Aunque hay que considerar que las bacterias endófitas a su vez pueden provenir de la semilla o del suelo. Quizás la abundancia de estas bacterias cambie a medida que la planta crece, desde la aparición de las primeras raíces aéreas hasta el llenado del grano. Las respuestas a estas interrogantes nos permitirán entender, con una mayor profundidad, la dinámica, distribución y heredabilidad de la microbiota asociada a los diferentes compartimentos asociados al maíz Olotón. Esto sería fundamental para incrementar y manipular la fijación biológica de nitrógeno del maíz Olotón, e incluso transmitir estas actividades microbianas a otras variedades productoras de mucílago.

El potencial microbiano que se aloja en el mucílago del maíz Olotón es muy amplio (Vega-Segovia y Ferrera-Cerrato, 1993), al mismo tiempo su diversidad funcional permitirá en un futuro encontrar y seleccionar diferentes cepas con capacidades fisiológicas diferentes a las reportadas en esta investigación, y que demostrarán que los datos acumulados hasta el momento sean considerados como limitados. Dadas las características descritas, se infiere que la investigación debe ser ampliada al estudio de los beneficios que aportan las bacterias en los aspectos bioquímicos y nutricionales del maíz Olotón.

Con respecto a los microorganismos alojados en la rizosfera, se sabe que esta zona de la planta comparte algunos microorganismos existentes en el mucílago, y que juegan un papel



importante en la promoción del crecimiento vegetal y en especial en el beneficio sobre el mejoramiento del carácter de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, y en algunas otras características relacionadas con la propia sanidad de la planta y en la resistencia hacia hongos (Gonzalez-Ramírez, 1994) y otros microorganismos fitopatógenos.

Las bacterias aisladas en este estudio permiten vislumbrar su potencial biotecnológico dirigido a la agroalimentación. No obstante, esto representa un compromiso de la microbiología agrícola. Para ello, las bacterias seleccionadas con base en sus características fisiológicas y efectos benéficos que producen deben ser sujetas a procesos de fermentaciones que permitan, por un lado, optimizar la producción de propágulos reproductivos y más importantemente, mantener las características por las cuales las cepas fueron seleccionadas. Esto conllevará también a la validación de los productos inoculantes (formulaciones) que se busca producir y aplicar en condiciones de campo, y considerando la optimización de las prácticas agronómicas (fertilizaciones, uso de materia orgánica, enclados y aplicación de plaguicidas, etc.), que se utilizan en el cultivo del maíz, y otras especies de importancia agroalimentaria.

Por lo anterior, a manera de recomendaciones, se debe continuar con el estudio de la microbiología en general, que cohabita en el maíz Olotón, y considerando el estudio integral donde se analice la población microbiana de la caulosfera (tallos), filosfera (hojas), por ejemplo, con fines de enriquecer el conocimiento sobre el origen de las bacterias que se han detectado tanto en el mucílago como en la rizosfera. Lo anterior permitirá conocer los eventos de sucesiones microbianas que se generan durante la fenología del maíz y sus implicaciones en la nutrición y sanidad.

Con relación al germoplasma que representa el maíz con sus más de 60 razas, es necesario valorar aquellas razas que tienen potencial para desarrollarse y producir ante los eventos que influyen en el calentamiento global y en el cambio climático, esto para que sean fuente de mejoramiento tradicional que conlleve a la generación de nuevas variedades de maíz que se adapten a estas condiciones. Para ello, la conservación del germoplasma del maíz nativo es un aspecto crítico y necesario en México, así como el conocimiento de su microbioma integral y dirigido aquellos grupos microbianos viables con potencial para usarlos en el sector agroalimentario (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2024). Por lo anterior, se podría evitar la problemática que representa la biopiratería de materiales vegetales de importancia alimentaria del país.





Capítulo 8

Literatura
consultada



Illustration of maize in the 1566 edition of the herbal of Dodonaeus



Literatura consultada



- Agaras, B. C., Iriarte, A., & Valverde, C. F. (2018). Genomic insights into the broad antifungal activity, plant-probiotic properties, and their regulation, in *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6. *Plos one*, 13(3), e0194088.
- Aguilar-Castillo, J. A., & Carballo-Carballo. (2006). Diversidad fenotípica y variantes distintivas de la raza jala de maíz. *Agricultura Técnica en México*, 32(1), 57-66.
- Aguirre-Noyola, J. L., Rosenblueth, M., Santiago-Martínez, M. G., & Martínez-Romero, E. (2021). Transcriptomic responses of *Rhizobium phaseoli* to root exudates reflect its capacity to colonize maize and common bean in an intercropping system. *Frontiers in Microbiology*, 12, 740818.
- Alaux, P.L. Mison, C. Senés-Guerrero, C. Moreau, V. Manssens, G. Foucart, G. y Declerck, S. (2021). Diversity and species composition of arbuscular mycorrhizal fungi across maize fields in the southern part of Belgium. *Mycorrhiza*, 31, 265-272.
- Alessa, O., Ogura, Y., Fujitani, Y., Takami, H., Hayashi, T., Sahin, N., & Tani, A. (2021). Comprehensive comparative genomics and phenotyping of *Methylobacterium* species. *Frontiers in microbiology*, 12, 740610.
- Ángeles-Gaspar, E., Ortiz-Torres, E., López, P. A., & López-Romero, G. (2010). Caracterización y rendimiento de poblaciones de maíz nativas de Molcaxac, Puebla. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(4), 287-296.
- Alzate Zuluaga, M. Y., Fattorini, R., Cesco, S., & Pii, Y. (2024). Plant-microbe interactions in the rhizosphere for smarter and more sustainable crop fertilization: the case of PGPR-based biofertilizers. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1440978.
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., & Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and soil*, 384, 413-431.
- Barrera-Guzmán, L., Legaria-Solano, J. P., & Ortega-Paczka, R. (2020). Diversidad genética en poblaciones de razas mexicanas de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 43(1), 121-125. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.1.121>.
- Beatty P, Good A. Future Prospects for Cereals That Fix Nitrogen. *Science*. 2011; 333(6041):416-7. <https://doi.org/10.1126/science.1209467> PMID: 21778391.
- Bernal Alcántara, J.A. 1982. Efecto del Nitrógeno, Fósforo, la Densidad de Frijol y el Encalado del suelo en el rendimiento de la asociación maíz-Frijol en Totontepec, Oaxaca. Tesis de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, sin publicar. Chapingo, México. Pp93.
- Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nievas, S., de Carlan, C. L. N., ... & Mora, V. (2020). Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*, 56, 461-479.
- Corpe, W. A., & Rheem, S. (1989). Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiology Ecology*, 5(4), 243-249.
- Cervantes-Ortiz, F., Gasca-Ortiz, M.T., Andrio-Enríquez, A., Mendoza-Elos, M., Guevara-Acevedo, L. P., Vázquez-Moreno, F. y Rodríguez-Herrera, S. (2014). Densidad de población y correlaciones fenotípicas en caracteres y rendimiento de maíz. *Ciencia y Tecnol. Agrop. México* 2: 9-16.
- Chelius, M. K., & Triplett, E. W. (2000). Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Applied and environmental microbiology*, 66(2), 783-787.
- Christiansen-Weniger, C., Groneman, A. F., & Van Veen, J. A. (1992). Associative N₂ fixation and root exudation of organic acids from wheat cultivars of different aluminum tolerance. *Plant and Soil*, 139, 167-174.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). (2022). Biodiversidad mexicana. [https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas/grupo-Maduracion T](https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas/grupo-Maduracion_T).
- Corrales, L.C. Antolinez-Romero, D.M. Bohórquez-Macías, J.A. y Corredor-Vargas, A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55-81.

- Cortés Flores J.I., J.P. Torres Z., A. Turrent F, E. Hernández R., A. Ramos S. y L. Jiménez S. 2012. Manual actualizado para el establecimiento y manejo del sistema milpa intercalada con árboles frutales (MIAF) en laderas. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Puebla.
- Din, I. Khan, H. Khan, N.A., K Cervantes-Ortiz, F., Gasca-Ortiz, M. T. , Andrio-Enríquez, A., Mendoza-Elos, M., Guevara-Acevedo, L. P., Vázquez-Moreno, F. y Rodríguez-Herrera, S. (2014). Densidad de población y correlaciones fenotípicas en caracteres y rendimiento de maíz. *Ciencia y Tecnol. Agrop. México* 2: 9-16.
- Gil, M. A.; López, P. A.; Muñoz O., A. y López S., H. 2004. Variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) en el estado de Puebla, México: diversidad y utilización. In: Manejo de la diversidad de los cultivos en los agrosistemas tradicionales. Chávez-Servía, J. L., Tuxil y D. I. Jarvis (eds.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali Colombia. p. 18-25.
- Dobereiner, J., and J. M. Day. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. (1976): 518-538.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., & Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 925-932.
- Dudko, D., Holtmann, D., & Buchhaupt, M. (2023). Methylophilic bacteria with cobalamin-dependent mutases in primary metabolism as potential strains for vitamin B12 production. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 116(3), 207-220.
- Fall, A.F. Nakabonge, G. Ssekandi, J. Founoune-Mboup, H. Badji, A. Balde, I. y Ndiaye, M. (2022). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with maize in the eastern part of Uganda. *Biology and Life Sciences Forum*, (15)1, pp:12. MDPI. 10.3390/IECD2022-12351.
- Fan, B., Carvalhais, L. C., Becker, A., Fedoseyenko, D., von Wirén, N., & Borriss, R. (2012). Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *Bmc Microbiology*, 12, 1-13.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2018. The future of food and agriculture-Alternative pathways to 2050. License: CC BY-NCSA3.0IGO. <http://www.fao.org/3/i8429en/i8429en.pdf>.
- Fasusi, O. A. Amoo, A. E. y Babalola, O. O. (2021). Propagation and characterization of viable arbuscular mycorrhizal fungal spores within maize plant (*Zea mays* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(14), 5834-5841. ISSN: 1018-7081.
- Ferrera-Cerrato, R., A. Alarcón, G. Rivera-Hernández. 2024. 2024. Microbiología del maíz. (Editores, Compiladores) Biblioteca Básica de Agricultura (bba). Editorial Colegio de Postgraduados. ISBN 978-607-715-484-6. 291 p.
- Franco-Ramírez, A. Pérez-Moreno, J. Sánchez-Viveros, G. Cerdán-Cabrera, C.R. Almaraz-Suárez, J.J. Cetina-Alcalá, V.M. y Alarcón, A. (2021). Mobilization and transfer of nine macro-and micronutrients to *Pinus greggii* seedlings via arbuscular mycorrhizal fungi. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 92: e923238 (1-13 páginas). doi:10.22201/ib.20078706e.2021.92.3238.
- Fukami, J., Cerezini, P., & Hungria, M. (2018). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *Amb Express*, 8(1), 73.
- Gandhimaniyan, K., Balamurugan, V., Ambedkar, G., Sabaridasan, A., Subramanian, M., & Anandababu, S. (2020). Studies on the isolation and characterization of *Azospirillum* sp. in rhizosphere soil of maize. *Journal of Basic Microbiology*, 5, 55-117.
- Ganeshan, G., & Manoj Kumar, A. (2005). *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *Journal of Plant Interactions*, 1(3), 123-134.
- Gil, M. A.; López, P. A.; Muñoz O., A. y López S., H. 2004. Variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) en el estado de Puebla, México: diversidad y utilización. In: Manejo de la diversidad de los cultivos en los agrosistemas tradicionales. Chávez-Servía, J. L., Tuxil y D. I. Jarvis (eds.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali Colombia. p. 18-25.
- Gómez-Godínez, L.J., Fernandez-Valverde, S.L., Romero, J.C.M. and Martínez-Romero, E., 2019. Metatranscriptomics and nitrogen fixation from the rhizoplane of maize plantlets inoculated with a group of PGPRs. *Systematic and Applied Microbiology*, 42(4), pp.517-525.
- González Ramírez L.P. 1994. Caracterización de microorganismos de mucigel de raíces adventicias y suelo rizosférico de maíz Olotón de la Región Mixe, Oax. Tesis de Licenciatura Químico Biólogo sin publicar. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. 98 pag.
- Green, P. N., & Ardley, J. K. (2018). Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: a proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(9), 2727-2748.
- Haack, F. S., Poehlein, A., Kröger, C., Voigt, C. A., Piepenbring, M., Bode, H. B., ... & Streit, W. R. (2016). Molecular keys to the *Janthinobacterium* and *Duganella* spp. interaction with the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1668.



- Harrison, L., Teplow, D. B., Rinaldi, M., & Strobel, G. (1991). Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity. *Microbiology*, 137(12), 2857-2865.
- Halloway, A. F., Akhtar, J., Marcus, S. E., Fletcher, N., Field, K., & Knox, P. (2020). Cereal root exudates contain highly structurally complex polysaccharides with soil-binding properties. *Plant Journal*, 103(5), 1666-1678. <https://doi.org/10.1111/tpj.14852>.
- Hanway, J.J. 1966. How a corn plant develops. Special Report 38. Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Service. Ames, Iowa, USA. 17p.
- Hernández X., E. 1972. Exploración etnobotánica en maíz. *Fitotecnia Latinoamericana* 8:46-51.
- Hil, A. (2021). Inoculation of nitrogen fixing bacteria in conjugation with integrated nitrogen sources induced changes in phenology, growth, nitrogen assimilation and productivity of wheat crop. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 20(7), 459-466.
- Holland, Mark A. (1997): Occam's razor applied to hormonology (Are cytokinins produced by plants?). *Plant Physiology* 115.3 865.
- Hungria, M., Nogueira, M. A., & Araujo, R. S. (2013). Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and fertility of soils*, 49, 791-801.
- Hurek, T., Handley, L. L., Reinhold-Hurek, B., & Piché, Y. (2002). *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(3), 233-242
- Johannessen, C. L.; Wilson, M. R. and Davenport, W. A. 1970. The domestication of maize: process or event?. *Geogr. Rev.* 60:393-413.
- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019(1), 4917256.
- Kim, N., Ma, J., Kim, W., Kim, J., Belenky, P., & Lee, I. (2024). Genome-resolved metagenomics: a game changer for microbiome medicine. *Experimental & Molecular Medicine*, 56(7), 1501-1512.
- Kloppenborg J., Calderon Cl., and Ané J.M.. 2024. The Nagoya Protocol and nitrogen-fixing maize. Close encounters between Indigenous Oaxacan and the men from Mars (Inc.). *Elementa: Science of the Anthropocene* 12(1) pp 1-21. DOI:<https://doi.org/10.1525/elementa/2023.00115>.
- Knief, C., Ramette, A., Frances, L., Alonso-Blanco, C., & Vorholt, J. A. (2010). Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. *The ISME journal*, 4(6), 719-728.
- Kong, W. L., Wang, W. Y., Zuo, S. H., & Wu, X. Q. (2022). Genome sequencing of *Rahnella victoriana* JZ-GX1 provides new insights into molecular and genetic mechanisms of plant growth promotion. *Frontiers in microbiology*, 13, 828990.
- Kong, W. L., Wu, X. Q., & Zhao, Y. J. (2020). Effects of *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 on treat chlorosis induced by iron deficiency in *Cinnamomum camphora*. *Journal of plant growth regulation*, 39, 877-887.
- Kutschera, U. (2007). Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts: a hypothesis. *Plant signaling & behavior*, 2(2), 74-78.
- Ladha, J.K., M.B. Peoples, P.M. Reddy, J.C. Biswas, A. Bennet, M.L. Jat and T.J. Krupnic. (2022). Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems. *Field Crops Research* 34pp. Elsevier. www.elsevier.com/locate/fcr.
- Lau, E., Fisher, M. C., Steudler, P. A., & Cavanaugh, C. M. (2013). The methanol dehydrogenase gene, *mxhF*, as a functional and phylogenetic marker for proteobacterial methanotrophs in natural environments. *PLoS One*, 8(2), e56993.
- Li, G. E., Wu, X. Q., Ye, J. R., Hou, L., Zhou, A. D., & Zhao, L. (2013). Isolation and identification of phytate-degrading rhizobacteria with activity of improving growth of poplar and Masson pine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 2181-2193.
- Li, Y., Dong, Y., Niu, S., & Cui, D. (2007). The genetic relationship among plant-height traits found using multiple-trait QTL mapping of a dent corn and popcorn cross. *Genome*, 50(4), 357-364. <https://doi.org/10.1139/G07-018>.
- Lima, A.C.P. Medici, L.O. da Silva-Ballesteiro, D.A.G. y de Assis-Lima, E. (2020). Root growth in tomato seedlings in response to bacterial inoculation *Serratia* sp. *Research, Society and Development*, 9(7), e89973634-e89973634.
- Lipková, N., Cinkockí, R., Maková, J., Medo, J., & Javoreková, S. (2021). Characterization of endophytic bacteria of the genus *Bacillus* and their influence on the growth of maize (*Zea mays*) in vivo. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(5), e3602.
- López-Guerrero, M. G., Ormeño-Orrillo, E., Acosta, J. L., Mendoza-Vargas, A., Rogel, M. A., Ramírez, M. A., ... & Martínez-Romero, E. (2012). Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. *Plasmid*, 68(3), 149-158
- Luo, T., Ou-Yang, X. Q., Yang, L. T., Li, Y. R., Song, X. P., Zhang, G. M., ... & An, Q. (2016). *Raoultella* sp. strain L03 fixes N₂ in association with micropropagated sugarcane plants. *Journal of basic microbiology*, 56(8), 934-940.



- Ma, Y., Wu, X., Li, S., Tang, L., Chen, M., & An, Q. (2021). Proposal for reunification of the genus *Raoultella* with the genus *Klebsiella* and reclassification of *Raoultella electrica* as *Klebsiella electrica* comb. nov. *Research in Microbiology*, 172(6), 103851.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, H. S., Hari, K., Sundaram, S. P., & Sa, T. M. (2005). Pink-pigmented facultative methylophilic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 41, 350-358.
- Magallon-Servín, P., Antoun, H., Taktek, S., Bashan, Y. y de-Bashan, L. (2020). The maize mycorrhizosphere as a source for isolation of arbuscular mycorrhizae-compatible phosphate rock-solubilizing bacteria. *Plant and Soil*, 451, 169-186. doi:10.1007/s11104-019-04226-3.
- Márquez-Licona, G., Leyva-Mir, S. G., De León, C., Hernández-Vargas, M., Téliz-Ortiz, D., Kolařík, M., & Castillo-González, F. (2018). Artificial inoculation of maize seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. zeae. *Maydica*, 63(1), 1-8.
- Martínez, A.C., Aguilar, M.G., & Ballena, G.D.C. (2021). Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento vegetal con bacterias simbióticas y asimbióticas eficientes en la fijación biológica del nitrógeno, en el cultivo de moringa (*Moringa oleifera*), en invernadero. *Caxamarca*, 20(2), 1-6.
- Martínez, J., Negrete-Yankelevich, S., Godínez, L. G., Reyes, J., Esposti, M. D., & Martínez Romero, E. (2016). Short-term evolution of rhizobial strains toward sustainability in agriculture. *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability*, 277-292.
- Martínez-Romero, E., Aguirre-Noyola, J. L., Bustamante-Brito, R., González-Román, P., Hernández-Oaxaca, D., Higuera-Alvear, V., ... & Servín-Garcidueñas, L. E. (2021). We and herbivores eat endophytes. *Microbial Biotechnology*, 14(4), 1282-1299.
- Martínez-Romero, E., Rodríguez-Medina, N., Beltrán-Rojel, M., Toribio-Jiménez, J., & Garza-Ramos, U. (2018). *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* with capacity to adapt to clinical and plant settings. *Salud publica de Mexico*, 60(1), 29-40.
- Meng, F., Dungait, J. A., Zhang, X., He, M., Guo, Y., & Wu, W. (2013). Investigation of photosynthate-C allocation 27 days after 13 C-pulse labeling of *Zea mays* L. at different growth stages. *Plant and Soil*, 373, 755-764.
- Montañez, A., Blanco, A. R., Barlocco, C., Beracochea, M., & Scardi, M. (2012). Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Applied Soil Ecology*, 58, 21-28.
- Montañez A, Abreu C, Gill P, Hardarson G, and Sicardi B. 2009. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by N-15 isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. *Biology & Fertility of soils*. (43):253-63. <https://doi.org/10.1007/s00374-008--0322-2>.
- Nazari, M., Riebeling, S., Banfield, C. C., Akale, A., Crosta, M., Mason-Jones, K., Dippold, M. A., & Mutez, A. A. (2020). Mucilage polysaccharide composition and exudation in maize from contrasting climatic regions. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.587610>.
- Nottingham, A. T., Hicks, L. C., Ccahuana, A. J., Salinas, N., Bååth, E., & Meir, P. (2018). Nutrient limitations to bacterial and fungal growth during cellulose decomposition in tropical forest soils. *Biology and fertility of Soils*, 54, 219-228.
- Okabe, S., Kamizono A, Kawasaki S., Kobayash K, Oshiki M. (2025) Interspecific competition and adaption of anammox bacteria at different salinities: Experimental validation of the Monod growthmodel with salinity inhibition. *Water Research* 271:122883. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.122883>.
- Okon, Y., & Labandera-Gonzalez, C.A. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(12), 1591-1601.
- Pang, Z., Mao, X., Zhou, S., Yu, S., Liu, G., Lu, C., ... & Xu, P. (2023). Microbiota-mediated nitrogen fixation and microhabitat homeostasis in aerial root-mucilage. *Microbiome*, 11(1), 85.
- Pankievicz, V. C. S., Delaux, P. M., Infante, V., Hirsch, H. H., Rajasekar, S., Zamora, P., ... & Ané, J. M. (2022). Nitrogen fixation and mucilage production on maize aerial roots is controlled by aerial root development and border cell functions. *Frontiers in plant science*, 13, 977056.
- Parente, T., Fernandes, I., Pereira, A., & Vasconcelos, V. (2017). Culture of the cyanobiont *Anabaena azollae* Strassburger: Is it possible. *Austin Biol*, 2(1), 1023.
- Pastor-Bueis, R., Sánchez-Cañizares, C., James, E.K. and González-Andrés, F., 2019. Formulation of a highly effective inoculant for common bean based on an autochthonous elite strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, and genomic-based insights into its agronomic performance. *Frontiers in Microbiology*, 10, p.2724.
- Patt TE, Cole GC, Hanson RS. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylophilic bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 1976; 26:226-229.
- Peng, J., Wu, D., Liang, Y., Li, L., & Guo, Y. (2019). Disruption of *acdS* gene reduces plant growth promotion activity and maize saline stress resistance by *Rahnella aquatilis* HX2. *Journal of basic microbiology*, 59(4), 402-411.
- Pineda-Mendoza, R. M., Zúñiga, G., López, M. F., Hidalgo-Lara, M. E., Santiago-Hernández, A., López-López, A., & Cano-Ramírez, C. (2022). *Rahnella* sp., a dominant symbiont of the core gut bacteriome of *Dendroctonus*



- species, has metabolic capacity to degrade xylan by bifunctional xylanase-ferulic acid esterase. *Frontiers in Microbiology*, 13, 911269.
- Pskowski, M. 2019. July 16. Indigenous maize: Who owns the rights of Mexico's Wonder Plant? *Yale Environment* 360. Available at <https://e360.yale.edu/features/indigenous-maize-who-owns-the-rights-to-mexicos-wonder-plant>.
- Ratzke, C., Denk, J., & Gore, J. (2018). Ecological suicide in microbes. *Nature ecology & evolution*, 2(5), 867-872.
- Rios-Galicia, B., Villagómez-Garfias, C., De la Vega-Camarillo, E., Guerra-Camacho, J. E., Medina-Jaritz, N., Artega-Garibay, R. I., & Hernández-Rodríguez, C. (2021). The Mexican giant maize of Jala landrace harbour plant-growth-promoting rhizospheric and endophytic bacteria. *3 Biotech*, 11(10), 447
- Rivera-Hernández, G., Tijerina-Castro G.D., Cortés-Pérez S., Ferrera-Cerrato R., y Alarcón, A. 2024. Evaluation of functional plant growth-promoting activities of culturable rhizobacteria associated to tunicate maize (*Zea mays* var. *tunicata* A. St. Hil), a Mexican exotic landrace grown in traditional agroecosystems. *Frontiers in Microbiology* 15:1478807. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1478807>.
- Rivero, J. Gamir, J. Aroca, R. Pozo, M.J. y Flors, V. (2015). Metabolic transition in mycorrhizal tomato roots. *Frontiers in Microbiology*, 6, 598. doi:10.3389/fmicb.2015.00598.
- Rivera-Hernández, G., Tijerina-Castro, G. D., Cortés-Pérez, S., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2024). Evaluation of functional plant growth-promoting activities of culturable rhizobacteria associated to tunicate maize (*Zea mays* var. *tunicata* A. St. Hil), a Mexican exotic landrace grown in traditional agroecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1478807.
- Rosenblueth, M., López-López, A., Martínez, J., Rogel, M. A., Toledo, I., & Martínez-Romero, E. (2010, August). Seed bacterial endophytes: common genera, seed-to-seed variability and their possible role in plants. In XX-VIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on 938 (pp. 39-48).
- Rosenblueth, M., Martínez, L., Silva, J., & Martínez-Romero, E. (2004). *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 27-35.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(8), 827-837.
- Rosenblueth, M., Ormeño-Orrillo, E., López-López, A., Rogel, M. A., Reyes-Hernández, B. J., Martínez-Romero, J. C., & Martínez-Romero, E. (2018). Nitrogen fixation in cereals. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1794.
- Sánchez-Navarrete, E.T. Castañeda-Antonio, M.D. Baez, A. y Morales-García, Y.E. (2021). Rizobacterias para el mejoramiento del cultivo de maíz (*Zea mays* L.). Una tecnología prometedor para la producción de maíces criollos. doi:10.5281/zenodo.5501662.
- Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *Amb Express*, 9(1), 205.
- Sevillano-Caño, J., Núñez-Cano, J., Prieto, P., Trapero, A., Sánchez-Rodríguez, A. R., & Agustí-Brisach, C. (2024). The endophytic role and growth-promoting ability of the nonpathogenic strain *Fusarium oxysporum* FO12 in herbaceous hosts. *Scientia Horticulturae*, 332, 113220.
- Schumacher, F.X. 1939. A new growth curve and its applications to timber yield studies. *J.For.* 37:819-820
- Shilpa, H., Navi, V., Santhosh, G. P., & Hegde, G. M. (2022). Isolation, identification of *Azospirillum* and its inoculation effects on maize (*Zea mays* L.). *Journal of Farm Sciences*, 35(03), 370-380.
- Singh, N.P. Singh, R.K. Meena, V.S. y Meena, R.K. (2015). Can we use maize (*Zea mays* L.) rhizobacteria as plant growth promoter. *Vegetos*, 28(1), 86-99.
- Singh, P., Singh, R. K., Zhou, Y., Wang, J., Jiang, Y., Shen, N., ... & Jiang, M. (2022). Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: a review. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 220-238.
- Siddique, S., Naveed, M., Yaseen, M., & Shahbaz, M. (2022). Exploring potential of seed endophytic bacteria for enhancing drought stress resilience in maize (*Zea mays* L.). *Sustainability*, 14(2), 673.
- Smil, V., 2001. *Enriching the Earth. Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food Production.* The Massachusetts Inst. Tech. Press Cambridge, Massachusetts, Cambridge MA, pp1-338
- SNICS, Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (2010) Manual gráfico para la descripción varietal de maíz (*Zea mays* L.). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS), Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México, pp. 49-59.
- Sondang, Y. Anty, K. y Siregar, R. (2019). Identification of endophytic and rhizosphere bacteria in maize (*Zea mays* L.) in Limapuluh Kota Region, West Sumatra, Indonesia. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 347, No. 1, p. 012002). IOP Publishing. doi:10.1088/1755-1315/347/1/012002.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., & Vanderleyden, J. (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and soil*, 312, 15-23.



- Tang, A. Haruna, A.O. Majid, N.M.A. y Jalloh, M.B. (2020). Effects of selected functional bacteria on maize growth and nutrient use efficiency. *Microorganisms*, 8(6), 854. doi:10.3390/microorganisms8060854.
- Thanh, D.T.N. y Diep, C.N. (2014). Isolation and identification of rhizospheric bacteria in Acrisols of maize (*Zea mays* L.) in the eastern of South Vietnam. *American Journal of Life Sciences*, 2(2), 82-89 doi:10.11648/j.ajls.20140202.1.
- Tariq, M., Jameel, F., Ijaz, U., Abdullah, M., & Rashid, K. (2022). Biofertilizer microorganisms accompanying pathogenic attributes: a potential threat. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(1), 77-90.
- Tien, T. M., Gaskins, M. H., & Hubbell, D. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5), 1016-1024.
- Torres-Morales, B., Rocandío-Rodríguez, M., Santacruz-Varela, A., Leobigildo Córdova-Téllez, Coutiño-Estrada, B., & López-Sánchez, H. (2022). Diversidad morfológica y agronómica de siete razas de maíz del estado de Chiapas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(14), 687-699. <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v13i4.2956>.
- Tortosa, G. Fernández-González, A.J. Lasa, A.V. Aranda, E. Torralbo, F. González-Murua, C. y Bedmar, E.J. (2021). Involvement of the metabolically active bacteria in the organic matter degradation during olive mill waste composting. *Science of The Total Environment*, 789, 147975.
- Triplett, E. W., Kaeppler, S. M., & Chelius, M. K. (2008). *Klebsiella pneumoniae* inoculants for enhancing plant growth (No. 7,393,678). Univ. of Wisconsin, Madison, WI (United States).
- Triplett EW. Diazotrophic endophytes: Progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. *Plant and Soil*. 1996; 186(1):29-38. <https://doi.org/10.1007/bf00035052>.
- Tugizimana, F. Mhlongo, M.I. Piater, L.A. y Dubery, I.A. (2018). Metabolomics in plant priming research: the way forward. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1759. doi:10.3390/ijms19061759.
- Van de Broek, A., & Vanderleyden, J. (1995). Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Critical reviews in plant sciences*, 14(5), 445-466.
- Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., et al. (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* 327, 1122-1126. doi:10.1126/science.118405.
- Van Deynze A, Zamora P, Delaux P-M, Heitmann C, Jayaraman D, Rajasekar S, et al. (2018) Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota. *PLoS Biol* 16(8): e2006352. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006352>.
- Vega-Segovia M.H. y R. Ferrera-Cerrato. 1993. Microorganismos del mucigel, rizoplano y rizósfera de maíz Olotón de la región Mixe, Oaxaca. En: J Pérez Moreno y R. Ferrera Cerrato (Eds). *Avances de investigación, Sección de Microbiología del Suelo*. Montecillo, México: Colegio de Postgraduados, Programa de Edafología, Instituto de Recursos Naturales: pp 41-50.
- Vorholt JAMarx CJ, Lidstrom ME, Thauer RK. 2000. Novel formaldehyde-activating enzyme in *Methylobacterium extorquens* AM1 required for growth on methanol. *J Bacteriol* 182.
- Wang, X. Wang, M. Zhang, J. Kong, Z. Wang, X. Liu, D. y Shen, Q. (2021). Contributions of the biochemical factors and bacterial community to the humification process of in situ large-scale aerobic composting. *Bioresource Technology*, 323, 124599.
- Wani, Z. A., & Hakeem, K. R. (2022). Endophytes: An Overview. *Endophyte Biology*, 1-19.
- Yin, C., Casa Vargas, J. M., Schlatter, D. C., Hagerty, C. H., Hulbert, S. H., & Paulitz, T. C. (2021). Rhizosphere community selection reveals bacteria associated with reduced root disease. *Microbiome*, 9, 1-18.
- Yurgel, S.N., & Kahn, M.L. (2004). Dicarboxylate transport by rhizobia. *FEMS microbiology reviews*, 28(4), 489-501.
- Zhang, L. Xu, M. Liu, Y. Zhang, F. Hodge, A. y Feng, G. (2016). Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytologist*, 210(3), 1022-1032. doi.org/10.1111/nph.13838.
- Zimmer, W., & Bothe, H. (1988). The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. *Plant and Soil*, 110, 239-247.



Apéndice I

PLOS Reader Comments



Illustration of maize in the 1566 edition of the herbal of Dodonaeus



Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota

Allen Van Deynze · Pablo Zamora · Pierre-Marco Delaux · Cristóbal Heilmann · T. Dhileepkumar Jayaraman, Shanmugam Rajasekar, Danielle Graham, Junko Maeda, Donald Gibson, Kevin D. Schwartz, Alison M. Berry, Srijak Bhatnagar, Guillaume Jospin, Aaron Darling, Richard Jeannotte, Javier Lopez, Bart C. Weimer, Jonathan A. Eisen, Howard-Yana Shapiro, Jean-Michel Ané, Alan B. Bennett

Published: August 7, 2018 • <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006352>

Reader Comments

[Post a new comment](#) on this article

The Nature of Scientific Research

Posted by DavidBarkin on 16 Nov 2018 at 20:00 GMT

We are writing to note our concerns about the publication of this article that purports to provide original scientific information about a variety of maize cultivated in the highlands of Mexico. We are a group of senior researchers in diverse fields of the natural, agronomic, and social sciences in Mexico who have carefully examined all the evidence that we have been able to assemble and come to the conclusion that this publication reports a process that involves a serious transgression of the norms of scientific enquiry. The article in question reports the findings of a ten-year long research program that appears to be a violation of the human rights of the many communities currently cultivating the maize varieties in question and a profound disrespect for the centuries of autochthonous genetic improvement in which the ancestors of these communities engaged. Ultimately, it is an example of the practice of biopiracy that has become an all too common practice by well-financed scientific research communities from the North who are collecting biological materials of great cultural and economic value to further their own professional and economic projects.

Some of the elements that lead us to make this strong judgement are:

- 1) It is clear that the authors did not conduct due diligence about the varieties of "maíz olotón", the corn seed which they were studying.
- a) There are at least two publications that were publically available before they even began their research: in 1993 and 1994 these characteristics were reported. (cf. Vega-Segovia, M.L., R. Ferrera-Cerrato, 1993. Microorganismos del mucigel, rizoplano y rizosfera de maíz "Olotón", pp. 41-50, In. Pérez Moreno, J., y R. Ferrera-Cerrato. Avances de Investigación. Área de Microbiología de Suelo, Programa de Edafología, Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados. 194 p.; and González, R.L.P. 1994. Caracterización de microorganismos de mucigel de raíces adventicias y suelo rizosférico de maíz Olotón de la región Mixte, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.)
- b) It seems significant that the team did not even learn the local name of the varieties that they collected in the "isolated community in the Sierra Mixte region". Of particular note is that one of the authors, Dr. Howard-Yana Shapiro, is the Chief Agriticultural Officer of Mars, Inc., and had noticed this trait in the 1980s, according to the news release of the University of California, Davis. No information was provided as to who his local informants were and whether they were properly compensated or informed of the role they were playing in an international scientific and commercial endeavor.



- c) Was any research funded at the Technical University of the Valley of Oaxaca (ITVO) to strengthen its ability to do research in this area or collaborate with the North American interlopers?
- d) We wonder whether the "municipal authority" or the village members themselves were informed of the publication and, more relevantly, whether there was any discussion of the global scientific and economic significance of this variety (landrace), as discussed in the same press release and in an article published in the USA Today network of publications.
- e) We contacted the appropriate Mexican government authorities and found that the group applied for a research permit in 2015. Thus, the work was ongoing for almost a decade because any application was made and the group has not complied with the requirement in this permit to report back every semester on the results of this research.
- 3) Were the researchers aware of the ethical and financial implications of this "unexplained" collection of seeds, as well as the strong local objections to this activity when the communities are properly informed of its significance? A similar activity, undertaken by anthropologists based at the University of Georgia in patenting of Mexican varieties of corn and a contract by San Diego based Diversa Corporation for bioprospecting activities in Mexico. (See also, footnote 1, above.)
- 4) The research project reported on in PLOS-Biology proceeded for almost a decade, according to the materials at our disposition. We have not been able to identify any effort by the authors, their institutions, or their funders to create a research capacity at the ITVO or any other scientific or academic institution in Mexico. They incorporated one junior researcher from a local University, who received a fellowship from the University of California Mexus Program, but apparently made no additional efforts to collaborate locally or support his Institute.

We are posting this comment because of our concern about the far reaching political, social, economic and cultural implications of a team organized within the United States of America extracting biological materials and conducting field work without a meaningful attempt to inform the affected peoples of its significance. The perfunctory mention of the "tremendous cooperation" of the Agricultural and Environmental Secretariats is further testimony to the lack of understanding of the significance of this project by the Mexicans with whom the researchers came into contact; we were able to confirm that this cooperation was strictly within the limits of bureaucratic procedures.

The farmers engaged in developing and protecting these varieties over the centuries are struggling to conserve and enrich their cultures while also trying to maintain their quality of life and protect their environment. Public policy has discriminated against them for decades, if not centuries, and now they are confronted by an onslaught of highly trained scientists appropriating this material and this knowledge without the least inkling of or concern for its relationship to their culture and future well-being. We could go further to suggest that this example clearly illustrates the very heart of the problem of bio-piracy and resource expropriation, characteristic of this new epoch of conquest through the use of science and technology.

Elena Álvarez-Bullaya, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City
 David Barkin, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City
 Alejandro Espinoza, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas, Pecuarias, Mexico City
 Ronaldo Ferrera-Cerrato, Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Mexico
 Yolanda Massieu, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City
 Antonio Turrent, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas, y Pecuarias, Mexico City

No competing interests declared.

[report a concern](#) [respond to this posting](#)



Apéndice II



Illustration of maize in the 1566 edition of the herbal of Dodonaeus



UNIVERSIDAD AUTONOMA COMUNAL DE OAXACA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA COMUNAL DE OAXACA
COORDINACIÓN ACADÉMICA UACO/NÚM./ 2022/148
Dimisión UACO Proyecto Maíz Olotón
Página 2

No se trata de discrepancias que puedan resolverse en el diálogo, -lo que se intentó- el problema que ha estado presente en cada momento y acción del Proyecto, es reconocer como única y legítima forma de conocimiento la occidental y a partir de esta creencia construir la noción de los propios saberes y prácticas como superiores a cualquier otro y con ello, la legitimidad para colocarse por sobre todos los demás, en todo sentido.

La política de subalternización colonial como lógica de razonamiento y pensamiento desde la cual la población de los pueblos originarios es invisibilizada y negada en cuanto a su capacidad de construir sentidos y significados referidos a su realidad material y existencial, es decir, conocimiento, no es un problema de ignorancia, o de diferencias culturales, es un problema socio-político.

Por la Universidad Autónoma Comunal de Oaxaca,

Atentamente,


LICENCIO JAIME MARTÍNEZ LUNA
RECTOR


MTR. RIGOBERTO VAGUEZ GARCIA
COORDINADOR ACADÉMICO



cc: Dr. David Barkin


uaco.academico@gmail.com

Coordinación Académica; Teléfono: 951.1288256; Correo electrónico: uaco.academico@gmail.com

UNIVERSIDAD AUTONOMA COMUNAL DE OAXACA



El reto radica en volver vivencial la práctica académica y, viceversa, en hacer académica una práctica vivencial, ya que la visión colonial occidental, ha impedido conocer a profundidad las perspectivas y potencialidades del razonamiento propio y originario. DICTAMEN DE LEY DE LA UACO

DEPENDENCIA: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA COMUNAL DE OAXACA
ÁREA: COORDINACIÓN ACADÉMICA
NÚMERO: UACO/NÚM./ 2022/148
ASUNTO: Dimisión UACO Proyecto Maíz Olotón

Guelatao de Juárez, Oaxaca, 2 de octubre 2022

Dr. Antonio Turrent Fernández
Responsable Técnico
Proyecto:

PROTECCIÓN DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL SOCIAL DEL CARÁCTER FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO DEL MAÍZ OLOTÓN Y APROVECHAMIENTO EN LA SEGURIDAD Y SOBERANÍA ALIMENTARIAS DE MÉXICO.
INIFAP

Por este medio la Universidad Autónoma Comunal de Oaxaca (UACO), expresa su dimisión sustentada¹, del proyecto denominado *Protección de la propiedad intelectual social del carácter fijación biológica de nitrógeno del maíz Olotón y aprovechamiento en la seguridad y soberanía alimentarias de México.*²

La UACO desde la Coordinación Académica, decidió sumarse a este proyecto por los términos en que se planteaba. La articulación de las dimensiones socio-cultural y la técnico-científica al interior del mismo, hizo que pareciera factible para una institución como la nuestra, que no rechaza los saberes occidentales, si no analiza su pertinencia y posibilidades de vinculación con los que se producen en los pueblos originarios, día a día, desde hace cientos de años y que han hecho y hacen viable su existencia en un mundo muchas veces hostil.

En el transcurso de los meses, nos dimos cuenta que el proyecto, de acuerdo a los enunciados contenidos en algunos de sus documentos no parecía ir por las vías esperadas. En el Anexo 1 se han registrado de manera sistemática momentos, situaciones e información que afectaron negativamente las posibilidades reales de trabajar conjuntamente.

¹ Ver Anexo 1
² Este es el título del proyecto que aparece en la última versión del Convenio Específico de Colaboración entre el INIFAP y la UACO, difiere, en una palabra, sustantiva, del nombre que aparece en la carta invitación: comunal ha sido cambiado por social.


uaco.academico@gmail.com

Coordinación Académica; Teléfono: 951.1288256; Correo electrónico: uaco.academico@gmail.com





SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FILIACION BIOLÓGICA DE MAÍZ

Hoja 1 de 3

CAMPO EXPERIMENTAL VALLE DE MÉXICO
Coatlínchán, Texcoco, Estado de México a 15 de noviembre de 2022

C. Licenciado Jaime Martínez Luna
Rector Universidad Autónoma Comunal de Oaxaca

Lamento, aunque respeto, la decisión de la Universidad Autónoma Comunal de Oaxaca de su dimisión al proyecto "Protección de la propiedad intelectual social del carácter Filiación Biológica de Nitrógeno del maíz Olotón y aprovechamiento en la seguridad y soberanía alimentarias de México" (proyecto número 317032). Sin embargo, dadas las implicaciones de esa decisión, creo justificado ofrecer explicaciones sobre los argumentos que se exponen en su comunicado, así como el sustento de esa decisión que detalla en su Anexo No. 1.

Comparto y celebro la preocupación por la búsqueda de balance entre el conocimiento científico y los saberes de los pueblos originarios, como eje rector del quehacer de la UACO. Aunque no se menciona en su carta, hay dos dimensiones en la aplicación de ese principio que abandera la UACO en torno al proyecto en proceso. Una es la defensa de la propiedad intelectual del carácter Filiación Biológica de Nitrógeno en Maíz (FBNM) frente al despojo por intereses multinacionales. Este carácter es producto de los saberes de los pueblos originarios, quienes son sus legítimos propietarios. Al aceptar la UACO participar en el proyecto, también aceptó su objetivo central. La segunda dimensión tiene que ver con la operación del proyecto bajo condiciones anómalas que, en mi opinión se interpreta injustificadamente en la UACO como imposición de la ciencia occidental sobre los saberes de los pueblos originarios.

Es cierto que la operación del proyecto tuvo desviaciones del planteamiento original, con las que el equipo de la UACO no estuvo de acuerdo. Sin embargo, sostengo que, tales desviaciones se derivaron de anomalías en los procesos administrativos de todas las instituciones participantes incluyendo al Conacyt y no como reflejo de imposición de la Ciencia Occidental sobre los saberes de los pueblos originarios. Más bien, se actuó en reconocimiento de las fechas del ciclo de cultivo del maíz, que son parte de los saberes de los pueblos originarios.

La operación del proyecto durante 2021 y 2022 experimentó conflictos entre: 1) las instrucciones del Conacyt para concretar el apoyo financiero de proyectos, 2) los tiempos requeridos para elaborar los documentos institucionales demandados, 3) fechas del ciclo de cultivo del maíz y 4) la decisión de concentrar el trabajo de investigación agronómica en el Municipio de Totontepec Villa de Morelos. Después de 6 meses de ejecución del proyecto en el año 2022 (abril-noviembre) no ha sido posible lograr las firmas de los cinco Convenios

Km 13.5 Carretera Los Reyes - Texcoco, Col. Coatlínchán, Texcoco, Estado de México, CP. 86250.
Tel. (55) 3071 8700 www.gob.mx/inifap





SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FILIACION BIOLÓGICA DE MAÍZ

Hoja 2 de 3

CAMPO EXPERIMENTAL VALLE DE MÉXICO
Coatlínchán, Texcoco, Estado de México a 15 de noviembre de 2022

Internacionales, mismas que son requeridas por el Conacyt para autorizar al INIFAP a dispensar los fondos del proyecto para el año 2022 a las instituciones colaboradoras. En previsión a este problema y concediendo prioridad al trabajo agronómico de campo dentro del ciclo de cultivo del maíz y para no perder el ciclo agrícola 2022, el INIFAP decidió prestar recursos propios, reembolsables al regularizarse la situación del proyecto. Con esta aportación, se sembraron y se están conduciendo 3 experimentos de campo más 2 parcelas para la descripción varietal de las variedades nativas de maíz, raza Olotón en el Municipio de Totontepec Villa de Morelos, Oaxaca. No hubo suficiente entendimiento entre los miembros del equipo, para concretar la selección de productores colaboradores, que habrían de ser nombrados en asamblea y de acuerdo con las autoridades locales. Esto se debió en parte, a la falta de recursos financieros y a la presión del inicio del ciclo de cultivo del maíz. Esto se puede corregir en los próximos 2 años del proyecto.

Se logró mediante trámites en Conacyt, cambiar el formato para que los fondos de 2022 fueran aplicados al proyecto, aún sin los Convenios internacionales firmados. A partir de la aprobación del Conacyt en agosto 2022, los fondos de las instituciones pudieron ser liberados directamente del INIFAP a los miembros del equipo mediante requisiciones, facturas y recibos simples, todos a nombre del INIFAP. Los investigadores del CCG-UNAM y el COLPOS ya han ejercido una parte de lo presupuestado. Aunque estaban disponibles los fondos, no ha habido peticiones desde la UACO. En defensa de la concentración del trabajo agronómico solo en Totontepec como parte de la Sierra Mixe, argumentaría que tal decisión fue tomada desde el diseño del proyecto y aceptada por Conacyt en esos términos. La UACO fue invitada a participar cuando el proyecto ya estaba aprobado, habiendo aceptado participar en esos términos.

Tengo para mí, que no ha habido imposición de la Ciencia Occidental sobre los saberes de los pueblos originarios, dado que el objetivo central del proyecto es proteger al carácter de filiación Biológica de Nitrógeno en maíz de la biopiratería. Esto requiere trabajo experimental de campo con productores con la técnica definida por los saberes de los pueblos originarios y por la metodología científica.

Km 13.5 Carretera Los Reyes - Texcoco, Col. Coatlínchán, Texcoco, Estado de México, CP. 86250.
Tel. (55) 3071 8700 www.gob.mx/inifap





AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

inifap
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Hoja 3 de 3

La puerta está abierta para el caso de que, la UACO reconsiderara su dimisión del proyecto.

ATENTAMENTE

Dr. Antonio Turrent Fernández
Responsable Técnico del proyecto.

Ccp. Biol. Liliana Ximena López Cruz. Secretaria Técnica del Programa Presupuestal F003 y Directora de Programas Nacionales Estratégicos.

Ccp. Dr. Luis Ángel Rodríguez del Bosque, responsable legal del proyecto.

Ccp. CP María Isabel Lagunés Bernal, responsable administrativa del proyecto.

Ccp. Dr David Barkin. Profesor Distinguido UAM Unidad Xochimilco.

Km 13.5 Carretera Los Reyes - Texcoco, Col. Coatlichán, Texcoco, Estado de México, CP. 56250.
Tel. (55) 3871 8700 www.gob.mx/inifap



2022 Ricardo Flores
Año de Maíz
RECORDED BY LA REVOLUCIÓN AGROPECUARIA



Titulo de la obra:

Fijación biológica de nitrógeno en maíz de la raza nativa Olotón
y su aprovechamiento en México

Se terminó de imprimir en:
Impreso Santiago, SA de CV
Trigo 80B, Colonia Granjas Esmeralda,
Alcaldía Iztapalapa, CDMX, C.P. 09810
www.impresosantiago.com.mx

Tiro total: 100 Ejemplares