Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología Agropecuaria ISSN: 2448-6620

BIOFORTIFICACIÓN RIZOBIANA DEL CHIPILÍN MEDIANTE CEPAS NATIVAS BAJO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO PARA MEJORAR SU CALIDAD NUTRICIONAL

Luis Alberto Manzano-Gómez[1,2], Reiner Rincón-Rosales[1]; Diana Rubí Oropeza-Tosca[3]; Francisco Alexander Rincón-Molina[1]; Valeria Mumenthey Zorrilla[1]; Stephanie Solís Zebadúa[1]; Erick Fabián Sarmiento Megchum[1]; Julio César Maldonado Gómez[1]; Clara Ivette Rincón-Molina[1]

[1]Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; [23]R Biotec SA de CV, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; [3]Instituto Tecnológico de Villahermosa, Villahermosa, Tabasco, México. Autor de correspondencia: d14270281@tuxtla.tecnm.mx

RESUMEN

Las plantas aromáticas son fundamentales en la cultura culinaria latinoamericana, y Crotalaria longirostrata (chipilín) es especialmente valorada por su contenido nutricional y su uso tradicional. El chipilín se conoce en náhuatl como “alimento con el que los enfermos recuperarán fuerzas”, y en tzotzil, otra lengua indígena mexicana, como “Tsi-ipilli”, que significa “Hierba de la fuerza”. Estos nombres resaltan su contenido en nutrientes esenciales y sus propiedades antioxidantes (Hernández-Reyes et al., 2024). Este arbusto leguminoso constituye una fuente importante de hierro, calcio, vitamina A y compuestos fenólicos (Peña-Valdivia et al., 2022). Este estudio evaluó los efectos de cepas rizobianas nativas sobre el crecimiento del chipilín y el contenido nutrimental de sus hojas. Se probaron seis tratamientos: T1, Sinorhizobium mexicanum ITTG-R7T en medio extracto de levadura-manitol más Ca^{2+}; T2, ITTG-R7T con extracto de levadura más Ca^{2+}; T3, Rhizobium sp. ACO-34A en medio extracto de levadura-manitol más Ca^{2+}; T4, ACO-34A con extracto de levadura más Ca^{2+}; T5, fertilizante químico (control positivo); y T6, sin inóculo ni fertilizante (control negativo). Después de 50 días, se midieron los rasgos morfométricos y las concentraciones de macro y micronutrientes en hojas mediante ICP-OES. El tratamiento T2 mejoró significativamente variables del rendimiento biológico, incluyendo longitud de planta, peso y diámetro del tallo. En contraste, T3 incrementó significativamente las concentraciones foliares de P, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, B y Ni ($p < 0.05$). La urea y el control sin inoculación mostraron el desempeño más bajo tanto en rendimiento como en contenido nutrimental. Los efectos de la inoculación dependieron de la cepa y del medio de cultivo utilizado para la preparación bacteriana. Estos resultados muestran que las cepas rizobianas nativas pueden mejorar el crecimiento y la calidad nutricional del chipilín, apoyando estrategias de biofortificación para cultivos culturalmente importantes y accesibles.

Palabras clave: *biofortificación; chipilín; rizobios nativos; probióticos vegetales; nutrición vegetal; Crotalaria longirostrata.*

INTRODUCCIÓN

Las plantas aromáticas y alimenticias tradicionales constituyen recursos estratégicos para la seguridad alimentaria, la conservación biocultural y la diversificación de dietas locales. Entre ellas, el chipilín (*Crotalaria longirostrata*) destaca por su uso en la gastronomía del sureste de México y Centroamérica, particularmente en tamales, sopas, tortillas y otros alimentos tradicionales. Además de su importancia cultural, esta leguminosa posee valor nutrimental por su contenido de minerales, compuestos fenólicos y otros metabolitos de interés alimentario, por lo que ha sido considerada una especie con potencial para contribuir a la nutrición de poblaciones locales (Peña-Valdivia et al., 2022; Mendez-López et al., 2023).

A pesar de su relevancia, los estudios enfocados en mejorar la calidad nutricional del chipilín mediante tecnologías sostenibles son limitados. En este contexto, la biofortificación microbiana surge como una alternativa para incrementar el contenido y la biodisponibilidad de nutrientes esenciales en tejidos comestibles, mediante la interacción planta-microorganismo (Bhardwaj et al., 2022; Dhiman et al., 2023). Las bacterias rizobianas, además de su papel en la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas, pueden promover el crecimiento vegetal mediante mecanismos como solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas, síntesis de sideróforos, colonización radical y mejora en la absorción de nutrientes (Purwaningsih et al., 2021; Timofeeva et al., 2023).

El presente trabajo evaluó el efecto de dos cepas rizobianas nativas, *Sinorhizobium mexicanum* ITTG-R7^{T} y *Rhizobium* sp. ACO-34A, sobre el crecimiento y la acumulación de macro y micronutrientes en plantas de chipilín. *S. mexicanum* ITTG-R7^{T} es una cepa nodulante aislada de *Acaciella angustissima* en México, mientras que *Rhizobium* sp. ACO-34A fue aislada de la rizósfera de *Agave americana* y ha mostrado potencial como bacteria promotora del crecimiento vegetal (Lloret et al., 2007; Rincón-Rosales et al., 2009; De La Torre-Ruiz et al., 2016). Asimismo, se analizó si el medio de cultivo utilizado para preparar el inoculante, con o sin fuente adicional de carbono, influye en la respuesta vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron las cepas nativas *Sinorhizobium mexicanum* ITTG-R7^{T}, aislada de nódulos de *Acaciella angustissima*, y *Rhizobium* sp. ACO-34A, aislada de la rizósfera de *Agave americana* (Lloret et al., 2007; De La Torre-Ruiz et al., 2016). Las cepas pertenecen a la colección del Laboratorio de Ecología Genómica y Agricultura Regenerativa del Tecnológico Nacional de México, campus Tuxtla Gutiérrez.

Las cepas fueron reactivadas en medio YEM-Ca^{2+} y posteriormente cultivadas en dos medios: YEM-Ca^{2+}, compuesto por extracto de levadura, manitol y calcio; y EXT-Ca^{2+}, compuesto por extracto de levadura y calcio, sin fuente adicional de carbono. El uso de estos medios permitió comparar el efecto de una formulación bacteriana enriquecida con fuente de carbono frente a una formulación sin carbono adicional sobre la respuesta morfométrica y nutrimental del cultivo.

El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar con seis tratamientos y diez repeticiones: T1, ITTG-$R7^T$ en YEM-Ca^{2+}; T2, ITTG-$R7^T$ en EXT-Ca^{2+}; T3, ACO-34A en YEM-Ca^{2+}; T4, ACO-34A en EXT-Ca^{2+}; T5, fertilización química con urea; y T6, control sin inoculación ni fertilización. Las semillas de chipilín fueron inoculadas y posteriormente establecidas en macetas bajo condiciones de invernadero. Se realizaron aplicaciones del inoculante al trasplante y 35 días después.

A los 50 días se evaluaron variables morfométricas como longitud de planta, longitud de raíz, longitud de hoja, diámetro de tallo, número de hojas, peso fresco total, peso aéreo, peso radical e índice SPAD, siguiendo criterios previamente utilizados para la evaluación de parámetros de crecimiento vegetal (Rincón-Molina et al., 2020). El contenido de nitrógeno se determinó mediante el método Dumas, mientras que P, K, Ca, Mg, S, Na, Fe, Zn, Mn, Cu, B, Ni y Mo se analizaron mediante digestión por microondas y espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente, de acuerdo con metodologías analíticas reportadas para la determinación de elementos en muestras vegetales y de suelo (Jung et al., 2003; Barzallo et al., 2021).

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Las comparaciones de medias se realizaron con la prueba de Tukey utilizando el paquete *agricolae* en RStudio (Mendiburu & Simon, 2015). Adicionalmente, se aplicó análisis de componentes principales y mapas de calor para explorar asociaciones entre tratamientos, variables de crecimiento y acumulación nutrimental, empleando herramientas de análisis multivariado en RStudio y el paquete *Factoextra* (RStudio Team, 2021; Rincón-Molina et al., 2022a).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inoculación con cepas rizobianas nativas modificó significativamente el crecimiento y el perfil nutrimental del chipilín. Los tratamientos R7+EXT-Ca^{2+} y ACO-34A+EXT-Ca^{2+} promovieron los mayores incrementos en longitud aérea de planta, con valores superiores a los controles químico y no inoculado. De manera similar, R7+EXT-Ca^{2+}, ACO-34A+EXT-Ca^{2+} y ACO-34A+YEM-Ca^{2+} aumentaron significativamente el peso total de planta y el diámetro de tallo, indicando un efecto positivo de las cepas sobre el rendimiento biológico.

En cuanto al contenido nutrimental, el tratamiento ACO-34A+YEM-Ca^{2+} destacó por incrementar significativamente las concentraciones foliares de P, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, B y Ni. Este resultado sugiere que la cepa ACO-34A, aun cuando no es una cepa nodulante clásica, puede inducir mecanismos alternativos de promoción vegetal y absorción nutrimental, probablemente asociados con colonización radical, producción de fitohormonas y mejora de la arquitectura de la raíz.

El análisis multivariado mostró una separación clara entre tratamientos biológicos y controles. Los inoculantes preparados en EXT-Ca^{2+} se asociaron principalmente con variables de crecimiento, como longitud total, peso de planta, diámetro de tallo y peso radical. En contraste, los inoculantes preparados en YEM-Ca^{2+} se relacionaron con una mayor acumulación de macro y micronutrientes en tejido foliar. Los controles, especialmente el tratamiento con urea, presentaron respuestas menos integrales, asociándose principalmente con algunos elementos específicos, pero no con una mejora generalizada del crecimiento y la calidad nutrimental.

CONCLUSIONES

La inoculación con *Sinorhizobium mexicanum* ITTG-$R7^T$ y *Rhizobium* sp. ACO-34A mejoró el crecimiento y la calidad nutricional del chipilín, lo que evidencia el potencial de las cepas rizobianas nativas como bioinsumos para cultivos alimentarios tradicionales. El medio de cultivo utilizado para preparar el inoculante influyó en la respuesta vegetal: los medios sin fuente adicional de carbono favorecieron principalmente el rendimiento biológico, mientras que los medios enriquecidos con carbono promovieron mayor acumulación de nutrientes en hojas.

Estos resultados demuestran que la biofortificación rizobiana puede ser una estrategia sostenible para incrementar el valor nutricional de cultivos culturalmente importantes y accesibles para la población. Asimismo, el desempeño de *Rhizobium* sp. ACO-34A sugiere que cepas no nodulantes también pueden desempeñar un papel relevante en la biofertilización de leguminosas mediante mecanismos independientes de la nodulación. Futuras investigaciones deberán evaluar estrategias de coinoculación y validación en campo para optimizar el uso de estos recursos genéticos bacterianos en sistemas agrícolas regionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barzallo, D., Vera, H., Gavin, C., & Lazo, R. (2021). Determinación simultánea de metales traza en muestras de suelo mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). *Ecuadorian Science Journal, 5*, 130–139. https://doi.org/10.46480/esj.5.4.176

Bhardwaj, A. K., Chejara, S., Malik, K., Kumar, R., Kumar, A., & Yadav, R. K. (2022). Agronomic biofortification of food crops: An emerging opportunity for global food and nutritional security. *Frontiers in Plant Science, 13*, 1055278. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1055278

Camarillo-Castillo, F., & Mangan, F. X. (2020). Biological nitrogen fixation in chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), a sustainable nitrogen source for commercial production. *Revista Chapingo Serie Horticultura, 26*, 125–141. https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2020.01.002

De La Torre-Ruiz, N., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Rincón-Molina, C. I., Rodríguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Gutiérrez-Miceli, F. A., Palomeque-Domínguez, H., & Rincón-Rosales, R. (2016). Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. *Brazilian Journal of Microbiology, 47*, 587–596. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.010

Dhiman, K., Sharma, D., Kumari, R., & Tomar, P. (2023). Biofortification of crops using microbes: A promising sustainable agriculture strategy. *Journal of Plant Nutrition, 46*, 2912–2935. https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2160755

Hernández-Reyes A, Guzmán-Albores JM, De León-Rodríguez A, Ruíz-Valdiviezo VM, Rodríguez-Ortiz LR, Barba-de la Rosa AP (2024) Toxicological and sedative effects of Chipilin (Crotalaria longirostrata) leaf extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. ACS Omega 9:18862–18871. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08290

Jung, S., Rickert, D. A., Deak, N. A., Aldin, E. D., Recknor, J., Johnson, L. A., & Murphy, P. A. (2003). Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 80*, 1169–1173. https://doi.org/10.1007/s11746-003-0837-3

Lloret, L., Ormeño-Orrillo, E., Rincón, R., Martínez-Romero, J., Rogel-Hernández, M. A., & Martínez-Romero, E. (2007). *Sinorhizobium mexicanum* sp. nov., a new species nodulating *Acacia angustissima* in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology, 30*, 280–290. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.12.002

Mendiburu, F. D., & Simon, R. (2015). Agricolae: Ten years of an open source statistical tool for experiments in breeding, agriculture and biology. *PeerJ PrePrints, 3*, e1404v1. https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1404v1

Mendez-López, A. Y., del Carmen Lagunes-Espinoza, L., González-Esquinca, A. R., Hernández-Nataren, E., & Ortiz-García, C. F. (2023). Phenological characterization of chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.) and relationship between the phenological stage and chemical composition of leaves. *South African Journal of Botany, 154*, 140–148. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.01.006

Peña-Valdivia, C., Salinas Morales, J., Vázquez Sánchez, M., Trejo, C., López Palacios, C., & Padilla Chacón, D. D. (2022). Componentes del rendimiento de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. en Guerrero, México. *Polibotánica, 1*, 101–121. https://doi.org/10.1007/s40415-023-00933-5

Purwaningsih, S., Agustiyani, D., & Antonius, S. (2021). Diversity, activity, and effectiveness of *Rhizobium* bacteria as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from Dieng, Central Java. *Iranian Journal of Microbiology, 13*, 130. https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5504

Rincón-Molina, C. I., Martínez-Romero, E., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Velázquez, E., Ruiz-Lau, N., Rogel-Hernández, M. A., Villalobos-Maldonado, J. J., & Rincón-Rosales, R. (2020). Plant growth-promoting potential of bacteria associated to pioneer plants from an active volcanic site of Chiapas, Mexico. *Applied Soil Ecology, 146*, 103390. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103390

Rincón-Molina, C. I., Martínez-Romero, E., Aguirre-Noyola, J. L., Manzano-Gómez, L. A., Zenteno-Rojas, A., Rogel, M. A., & Rincón-Rosales, R. (2022a). Bacterial community with plant growth-promoting potential associated to pioneer plants from an active Mexican volcanic complex. *Microorganisms, 10*, 1568. https://doi.org/10.3390/microorganisms10081568

Rincón-Rosales, R., Lloret, L., Ponce, E., & Martínez-Romero, E. (2009). Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov., which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. *FEMS Microbiology Ecology, 67*, 103–117. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00590.x

RStudio Team. (2021). *RStudio: Integrated Development Environment for R* (1.4.1717). RStudio, PBC. http://www.rstudio.com/

Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2023). Plant growth-promoting soil bacteria: Nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities. *Plants, 12*, 4074. https://doi.org/10.3390/plants12244074