



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Acumulación de materia seca y
fijación biológica de Nitrógeno en
diferentes especies del género
Lupinus cultivadas en suelos de
Zapopan, Jalisco**

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática
y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

Presenta

Isidro Zapata Hernández

Zapopan, Jalisco

03 de Julio de 2015



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Acumulación de materia seca y fijación biológica de Nitrógeno en diferentes especies del género *Lupinus* cultivadas en suelos de Zapopan, Jalisco

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de
Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

ISIDRO ZAPATA HERNÁNDEZ

CO-DIRECTOR INTERNO

Dr. JUAN FRANCISCO ZAMORA NATERA

CO-DIRECTOR EXTERNO

Dr. EDUARDO SALCEDO PÉREZ

ASESOR

DR. RAMÓN RODRÍGUEZ MACÍAS

Zapopan, Jalisco

03 de Julio de 2015



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

TITULO

Acumulación de materia seca y fijación biológica de nitrógeno en diferentes especies del género *Lupinus* cultivadas en suelos de Zapopan, Jalisco

Por

Isidro Zapata Hernández

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Aprobado por:

Dr. Juan Francisco Zamora Natera
Co-Director interno de Tesis e integrante del jurado

03-06-2015
Fecha

Dr. Eduardo Salcedo Pérez
Co-Director externo de Tesis e integrante del jurado

03 Junio 2015
Fecha

Dr. Ramón Rodríguez Macías
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

03-06-2015
Fecha

Dr. Pedro Macedonio García López
Sinodal e integrante del jurado

03/06/2015
Fecha

Dr. Diego Raymundo González Eguiarte
Sinodal e integrante del jurado

03/06/2015
Fecha

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Al Posgrado de Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas por la oportunidad brindada para mi formación académica.

Para el Dr. Juan Francisco Zamora Natera, por la dirección, apoyo y valiosos consejos para la realización del presente trabajo, además, por su tiempo y dedicación a lo largo de mi formación como estudiante de maestría.

Al Dr. Eduardo Salcedo Pérez por su apoyo durante el desarrollo de mi formación académica y personal, por sus atinadas sugerencias en la revisión de la presente tesis.

Al Dr. Ramón Rodríguez Macías por su valiosa asesoría, acertados comentarios durante mi formación y realización de esta tesis.

A los sinodales el Dr. Pedro Macedonio García López y al Dr. Diego Raymundo González Eguiarte.

A mis amigos de maestría y doctorado que me brindaron su amistad.

DEDICATORIAS

A Dios

A mis padres:

Isidro Zapata Ortiz

Leonarda Hernández Valtierra

A mis hermanos:

Eric

Reve

Cuquis

Al nene:

Memito (piloncillo)

A mi amor:

María Elena Zúñiga Anguiano

A mi tío:

Jose Trinidad Zapata Ortiz

INDICE GENERAL

	Pagina
INDICE DE CUADROS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRAC	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Taxonomía del género <i>Lupinus</i>	3
2.2 Centros de origen y distribución geográfica del género <i>Lupinus</i>	4
2.3 Domesticación del género <i>Lupinus</i>	7
2.4 Importancia del género <i>Lupinus</i>	8
2.5 Requerimientos del género <i>Lupinus</i>	10
2.6 Crecimiento de <i>Lupinus</i> en términos de acumulación de materia seca.....	10
2.7 Generalidades sobre Nitrógeno.....	12
2.7.1 Nitrógeno en el suelo.....	12
2.7.2 Absorción de nitrógeno por las plantas.....	14
2.7.3 El nitrógeno en la agricultura.....	14
2.8 Fijación de nitrógeno.....	15
2.8.1 Fijación biológica de nitrógeno (FBN) por microorganismos de vida libre.....	15
2.8.2 Fijación biológica de nitrógeno (FBN) en plantas no leguminosas.....	16
2.8.3 Fijación biológica de nitrógeno (FBN) en leguminosas.....	17
2.9 Historia y taxonomía del género <i>Rhizobium</i>	18
2.10 Interacción leguminosa- <i>Rhizobium</i>	19
2. 10.1 Estructura y forma de los nódulos.....	19
2.11 Proceso de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en leguminosas.....	20
2.11.1 Factores que afectan la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en leguminosas.....	22
2.12 Métodos para cuantificar la fijación biológica de nitrógeno (FBN).....	23
2.13 El género <i>Lupinus</i> en la fijación biológica de nitrógeno (FBN).....	24
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVO GENERAL	26

4.1. Objetivos específicos.....	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 Localización del sitio experimental.....	27
5.2 Material biológico.....	27
5.3 Características del suelo utilizado en la investigación.....	27
5.4 Establecimiento del experimento.....	28
5.4.1 Preparación del terreno y siembra de <i>Lupinus</i>	29
5.4.2 Diseño experimental y tratamientos.....	29
5.4.3 Riego.....	30
5.4.4 Control de malezas, plagas y enfermedades.....	31
5.5 Muestreos y medición de variables.....	31
5.5.1 Cuantificación de materia seca.....	32
5.5.2 Análisis de nitrógeno.....	33
5.5.3 Cuantificación de la fijación biológica del nitrógeno (FBN) por el método de la diferencia.....	33
5.6 Análisis estadísticos.....	34
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
6.1 Especies domesticadas de <i>Lupinus</i>	35
6.1.1 Materia seca en especies domesticadas.....	35
6.1.2 Contenido de nitrógeno en especies domesticadas.....	39
6.1.3 Fijación de nitrógeno atmosférico en especies domesticadas.....	43
6.1.4 Análisis de correlación y regresión en especies domesticadas.....	48
6.2 Especies silvestres de <i>Lupinus</i>	49
6.2.1 Materia seca en especies silvestres.....	50
6.2.2 Contenido de nitrógeno en especies silvestres.....	54
6.2.3 Fijación de nitrógeno atmosférico en especies silvestres.....	57
6.2.4 Análisis de correlación y regresión en especies silvestres.....	61
VII. CONCLUSIONES.....	63
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	64

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis inicial del suelo.....	28
Cuadro 2. Fechas de muestreos para cuantificar el contenido de materia seca en especies domesticadas y silvestres.....	32
Cuadro 3. Análisis de varianza que muestra la significancia de las variables estudiadas en las especies domesticadas.....	35
Cuadro 4. Contenido de nitrógeno total en las especies domesticadas con respecto a los días después de la siembra.	42
Cuadro 5. Análisis de varianza que muestra la significancia de las variables con respecto a la FBN en especies domesticadas.....	43
Cuadro 6. Análisis de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, contenido de nitrógeno y variables relacionadas con la fijación de nitrógeno en plantas domesticadas del género <i>Lupinus</i>	48
Cuadro 7. Análisis de varianza que muestra la significancia de variables estudiadas en las especies silvestres.	50
Cuadro 8. Contenido de nitrógeno total en las especies silvestres con respecto a los días después de la siembra.	56
Cuadro 9. Análisis de varianza que muestra la significancia de las variables con respecto a la FBN en especies silvestres.....	57
Cuadro 10. Análisis de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, contenido de nitrógeno y variables relacionadas con la fijación de nitrógeno en plantas silvestres del género <i>Lupinus</i>	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posibles centros de origen y diversificación del género <i>Lupinus</i>	5
Figura 2. Ciclo del nitrógeno.....	13
Figura 3. Esquema del complejo enzimático nitrogenasa actuando en el nódulo.	21
Figura 4. Croquis que muestra la distribución en campo de las especies domesticadas.	29
Figura 5. Croquis que muestra la distribución en campo de las especies silvestres.....	30
Figura 6. Temperatura mínima, máxima y promedio de la época de cultivo (Noviembre 2013-Abril 2014).	31
Figura 7. Dinámica de acumulación de materia seca en las especies de <i>Lupinus</i> domesticadas cosechadas a diferentes días después de la siembra y modelos que explican su comportamiento.	36
Figura 8. Peso de materia seca de hojas en especies domesticadas.....	37
Figura 9. Porcentaje de nitrógeno en tres especies domesticadas de <i>Lupinus</i> en diferentes fechas de muestreo.....	40
Figura 10. Eficiencia de la FBN en las especies domesticadas. NOF= nitrógeno obtenido de la fijación. NOS= Nitrógeno obtenido del suelo.	44
Figura 11. Cantidad de nitrógeno fijado por las especies domesticadas en estudio.....	46
Figura 12. Relación de la materia seca con el nitrógeno total acumulado en la materia seca (N TOTAL MS) y materia seca con la cantidad de nitrógeno fijado (NF) en especies domesticadas.....	49
Figura 13. Dinámica de acumulación de materia seca en las especies de <i>Lupinus</i> silvestres cosechadas a diferentes días después de la siembra y modelos que explican su comportamiento.	51
Figura 14. Peso de materia seca de hojas en especies silvestres.	53
Figura 15. Porcentaje de nitrógeno en tres especies silvestres de <i>Lupinus</i> en diferentes fechas de muestreo.....	55
Figura 16. Eficiencia de la FBN en las especies silvestres. NOF= nitrógeno obtenido de la fijación. NOS= Nitrógeno obtenido del suelo.	58
Figura 17. Cantidad de nitrógeno fijado por las especies silvestres en estudio.	59

Figura 18. Relación de la materia seca con el nitrógeno total acumulado en la materia seca (N TOTAL MS) y materia seca con la cantidad de nitrógeno fijado (NF) en especies silvestres. 62

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el potencial de adaptación en términos de acumulación de materia seca de seis especies del género *Lupinus* (tres especies domesticadas y tres especies silvestres) y evaluar por el método de la diferencia la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) de estas especies en suelos ácidos de la región agrícola de Zapopan Jalisco. Durante el ciclo Otoño- Invierno 2013-2014 se sembraron por separado en el Campo Agrícola Experimental del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (Universidad de Guadalajara) las especies domesticadas (*L. albus*, *L. mutabilis* y *L. angustifolius*) y las especies silvestres nativas de México (*L. exaltatus*, *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus*), bajo un diseño experimental de bloques al azar con tres repeticiones, también se sembró cebada como cultivo de referencia (especie no fijadora de N₂). Durante el crecimiento y desarrollo de las especies se colectaron plantas completas en seis diferentes fechas de muestreo, en función de los días después de la siembra (61, 76, 93, 108, 122 y 137 para especies domesticadas y 93, 108, 122, 137, 151 y 169 en especies silvestres). Las plantas se deshidrataron en estufa de aire forzado a 70°C por 48 horas, se registró el peso seco y se molieron para su posterior análisis. Se determinó el nitrógeno total por el método Micro Kjeldalh, posteriormente se utilizó el método de la diferencia para determinar el porcentaje de nitrógeno obtenido de la FBN y la cantidad de nitrógeno fijado. Los datos obtenidos por grupo de especies fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de promedios por medio de la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). En ambos grupos de especies (domesticadas y silvestres) se obtuvieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) por efecto de la especie y fechas de muestreo con respecto a la acumulación de materia seca, porcentaje de nitrógeno total y nitrógeno total acumulado en la materia seca, cantidad de nitrógeno obtenido de la fijación y porcentaje de nitrógeno derivado de la FBN. Entre las especies domesticadas *L. mutabilis* resultó ser la especie con mayor rendimiento de materia seca (20 223 kg ha⁻¹), mejor promedio de nitrógeno en la planta (2.60 %), mayor acumulación de nitrógeno en la materia seca (396.5 kg ha⁻¹), mejor porcentaje de nitrógeno derivado de la fijación (88 %) y mayor contenido de nitrógeno fijado (363.1 kg ha⁻¹), mientras que en el grupo de las especies silvestres, *L. exaltatus* fue la mejor representada con 21 605 kg ha⁻¹, 2.7 %, 363 kg ha⁻¹, 85 % y 185.7 kg ha⁻¹ respectivamente.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the potential for adaptation in terms of dry matter accumulation of six species of the genus *Lupinus* (three domesticated species and three wild species) and evaluated by the difference method Biological Nitrogen Fixation (BNF) of these species in acid soils of the agricultural region of Zapopan Jalisco. During the Autumn-Winter 2013-2014 cycle were planted separately in the field Agricultural Experimental (CUCBA, University of Guadalajara) domesticated species (*L. albus*, *L. mutabilis* and *L. angustifolius*) and species wild native of Mexico (*L. exaltatus*, *L. mexicanus* and *L. rotundiflorus*) under an experimental randomized block design with three replications, has also sowed barley as reference crop (not N₂-fixing species). During growth and development of the whole plants species were collected in six different sampling times, in terms of days after planting (61, 76, 93, 108, 122 and 137 for domesticated species and 93, 108, 122, 137, 151 and 169 wild species). The plants were dried in forced air oven at 70° C for 48 hours, the dry weight was recorded and ground for further analysis. Total nitrogen by Micro Kjeldalh method was determined, then the difference method was used to determine the percentage of nitrogen obtained of BNF and the amount of fixed nitrogen. The data obtained by species group were subjected to analysis of variance and comparison of means by Tukey test ($P \leq 0.05$). In both groups of species (domesticated and wild) significant differences ($P \leq 0.05$) were obtained as a result of the species and sampling dates in relation to the accumulation of dry matter, percentage of total nitrogen and total nitrogen accumulated in the dry matter, obtained amount of nitrogen fixation and nitrogen percentage FBN derivative. Among domesticated species *L. mutabilis* proved to be the species with the highest dry matter yield (20 223 kg ha⁻¹), the best average of nitrogen in the plant (2.60%), greater accumulation of nitrogen in the dry matter (396.5 kg ha⁻¹), better percentage of nitrogen derived from fixation (88%) and higher content of nitrogen fixed (363.1 kg ha⁻¹), while in the group of wild species, *L. exaltatus* was the best represented with 21 605 kg ha⁻¹, 2.7%, 363 kg ha⁻¹, 85% and 185.7 kg ha⁻¹ respectively.

I. INTRODUCCIÓN

A través de la historia el hombre ha estado preocupado por mejorar o mantener la fertilidad de los suelos agrícolas. Se ha demostrado que ciertos métodos y prácticas han contribuido al enriquecimiento nutricional y conservación de los suelos (Restrepo, 1992; Molina *et al.*, 2011). Estudios a largo plazo en Estados Unidos, Inglaterra y Latinoamérica indican que del 30 al 50 % del rendimiento de los cultivos es atribuible al uso de fertilizantes (Stewart *et al.*, 2005). Entre los fertilizantes más utilizados en la agricultura para incrementar los rendimientos se encuentra el nitrógeno, el cual es esencial para el crecimiento de las plantas, ya que forma parte de compuestos fundamentales como proteínas, ácidos nucleicos y clorofila (Baca *et al.*, 2000; Santi *et al.*, 2013). La agricultura moderna utiliza plantas con potenciales cada vez mayores, demandando una elevada fertilización nitrogenada, la cual puede ser superior al aporte de nitrógeno del suelo. Esto no solo ocasiona un considerable incremento en los costos de producción debido a los precios de los combustibles fósiles, sino que además conlleva un riesgo potencial de contaminación y eutrofización de las aguas dulces por lixiviación de nitratos del suelo (Aparicio *et al.*, 2000; Santi *et al.*, 2013). Afortunadamente, existen otras vías alternativas de aporte de nitrógeno al sistema, como la fijación biológica del nitrógeno (FBN). A través de este proceso determinadas especies vegetales en simbiosis con bacterias fijadoras principalmente del género *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* pueden obtener un importante suministro de nitrógeno a un costo generalmente reducido (Urzua, 2005). Entre las plantas capacitadas para realizar la FBN se encuentran las especies pertenecientes a la Familia Fabaceae=Leguminosae, como todos los vegetales, estas absorben nitrógeno mineral del suelo, pero además pueden obtener nitrógeno atmosférico (Twornlow, 2004). De acuerdo con Evans *et al.*, (1989) los lupinos como se conoce a las diferentes especies del género *Lupinus* son capaces de satisfacer sus necesidades de nitrógeno en más de un 80% mediante la FBN. Estas especies además de autoabastecerse de nitrógeno pueden aportar dicho elemento a un cultivo acompañante generalmente especies diferentes a las leguminosas, pueden dejar también nitrógeno disponible en el suelo para un cultivo subsiguiente en rotación, siempre que se incorporen los rastrojos o plantas como abono verde y se mineralice el nitrógeno en formas inorgánicas (López y Fuentes, 1986). En agro-ecosistemas de Europa y Sudamérica desde hace varios años se reconocen el papel que

desempeñan diferentes especies cultivadas del género *Lupinus* en la conservación de la fertilidad de suelos agrícolas debido a su capacidad fijadora de nitrógeno. (López y Fuentes, 1991). Las primeras estimaciones con respecto a la cantidad de nitrógeno que fijan estas especies fueron realizadas por (Islam, 1978), el cual reportó valores de 128 a 234 kg de nitrógeno fijado por ha⁻¹. Posteriormente Pálmason *et al.*, (1992) reportaron que *L. angustifolius* puede fijar 195 kg N ha⁻¹ a los 117 días después de la siembra. En un suelo del sur de Chile a los 80 días después de la siembra *L. angustifolius* y *L. albus* fijaron 197 y 282 kg de N ha⁻¹ respectivamente (Barrientos *et al.*, 2001). Desde hace años y aun recientemente estas especies también han sido objeto de estudio debido a su alta eficiencia en la movilización de fósforo en el suelo (Funayama *et al.*, 2014). Aunque en México no se conoce el cultivo de especies domesticadas, se ha reconocido el papel ecológico que desempeñan algunas especies silvestres en la recuperación de la fertilidad de suelos degradados o erosionados acelerando las etapas de la sucesión ecológica. Así por ejemplo *L. elegans* se ha utilizado en la restauración ecológica y programas agroforestales, debido a que crea un microambiente apropiado para el establecimiento de especies de coníferas al aumentar las concentraciones de nitrógeno del suelo (Aureoles y Lindig, 2007; Lindig *et al.*, 2007; Alvarado *et al.*, 2007; Lara *et al.*, 2009; Soto *et al.*, 2014). Estos beneficios, al igual que en las especies domesticadas son atribuidos a que mediante el proceso de fijación biológica las especies silvestres son capaces de autoabastecerse de nitrógeno y dejar altas cantidades de nitrógeno disponible en el suelo. Sin embargo, a diferencia de las especies domesticadas en las especies silvestres poco se ha estudiado la eficiencia de estas en la FBN en términos de cuantificar el nitrógeno fijado. Por lo anteriormente señalado y como una forma de proponer alternativas sustentables que contribuyan a disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados en suelos agrícolas o forestales de Zapopan Jalisco la presente investigación tiene como objetivo estimar la acumulación de materia seca y la cantidad de nitrógeno que pueden fijar diferentes especies de género *Lupinus*. Esto con el propósito final de valorar la importancia de incluir estas especies en los sistemas de producción agrícola o forestal, ya sea como cultivo en rotación, abono verde, cultivo de cobertura o para la recuperación de la fertilidad de áreas degradadas o erosionadas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Taxonomía del género *Lupinus*

El género *Lupinus* perteneciente a la familia Fabaceae, tribu Genisteae, comprende un grupo amplio de especies y es considerado uno de los más complejos desde el punto de vista taxonómico. El nombre genérico *Lupinus* es antiguo, tomado del latín *Lupus* que significa "lobo", ya que estas plantas eran asociadas a los bosques y lugares donde habitaban lobos (Gladstones, 1974). El nombre de *Lupinus* fue utilizado por Tournerfort en 1694, pero no fue hasta 1753 cuando el género *Lupinus* fue incluido por Linneo en su libro *Species Plantarum*, donde describió seis especies (Planchuelo, 1982). De las seis especies publicadas por Linneo en 1753, el número se ha incrementado hasta 1500-1700, pero el número de especies según estimaciones de Dunn (1984) y Planchuelo (1982) es de solo unas 500 a 600 especies.

La mayoría de las especies crecen en América desde Alaska hasta Argentina y solo 12 especies crecen en las tierras altas de África y la región del Mediterráneo. No se conocen especies nativas en Asia y Australia (Planchuelo, 1996). El género comprende un grupo dinámico de especies que ocupa hábitats desde el nivel del mar hasta la tundra alpina arriba de los 4000 m de elevación. La plasticidad para adaptarse a diferentes ambientes y la facilidad para experimentar cambios genéticos hace de la delimitación taxonómica de especies un trabajo difícil (Planchuelo-Ravelo, 1984).

De acuerdo a Kurlovich *et al.*, (2002a) el género *Lupinus* se ubica en la siguiente categoría sistemática:

División	Magnoliophyta (Angiospermae)
Subclase	Magnoliatae (Dicotyledonea)
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Tribu	Genisteae
Género	<i>Lupinus</i>

De acuerdo con Dunn (2001) este género comprende plantas herbáceas o arbustivas, anuales o perennes; tallos solitarios, cespitosos o abundantemente ramificados, de 5 cm a 3 m de alto; hojas alternas, estipuladas, algunas especies de hojas simples pero la mayoría con hojas palmadamente compuestas, con 4 a 17 folíolos; flores en racimos terminales pedunculados que normalmente sobresalen del follaje, racimos desde 3 a 5 cm o más largos, brácteas del racimo caducas o persistentes, de largo variable, flores con pedicelos de 2 a 12 mm de largo; cáliz fuertemente bilabiado, los labios enteros o dentados y entonces el superior bífido y el inferior tridentado; corolas zigomorfas, generalmente azules o azul moradas con una mancha blanca a amarilla en el centro del estandarte por encima del ángulo producido por su mitad exterior, ocasionalmente las flores son rosadas, rojas, blancas o amarillas; corolas glabras, excepto en la quilla, quillas glabras o ciliadas a lo largo de los bordes superiores, falcadas o bien el margen superior casi recto, ángulo del margen inferior de 80 a 120; estambres 10, monadelfos, anteras dimórficas, alternando las más largas con las más cortas; legumbre dehiscente, comprimida lateralmente, con diversos tipos de pubescencia, a menudo torulosa entre la semillas; óvulos 4 a 12; semillas de tamaño y color variable.

2.2 Centros de origen y distribución geográfica del género *Lupinus*

Aunque no ha sido posible aún definir una línea de evolución de un ancestro común, varios centros de origen y diversificación han sido postulados.

Plitmann y Heyn (1984) consideraron que el género se originó en Norteamérica, mientras que Dunn (1984) localizó el centro de origen en Sudamérica basado en la presencia de plantas con hojas simples, las cuales son consideradas por Planchuelo y Dunn (1984) como representantes primitivos del género.

Otra hipótesis sugirió tres centros de origen y diversificación separados geográficamente. Se propusieron tres centros de origen: (i) región del Mediterráneo y las tierras montañosas de África; (ii) región Andina de Bolivia, Chile y Perú en Sudamérica y (iii) Norteamérica incluyendo México (Figura 1). (Hondelmann, 1984; Planchuelo, 1996).



Figura 1. Posibles centros de origen y diversificación del género *Lupinus*.

Posteriormente Küss y Wink (1992) asumieron que el centro de origen estaba localizado en el Noreste de Brasil. Kurlovich y Repjev (1994) sugieren un simple centro primario originado en el periodo cretácico antes de la separación de los continentes que formaron Laurasia. Además sugirieron dos centros secundarios de desarrollo al mismo tiempo, uno en el Mediterráneo y otro en el norte del Continente Americano.

Recientemente una nueva teoría basada en análisis de relación de especies, mediante el uso de técnicas moleculares como PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y análisis de ADN ha sugerido que el género se originó en el Viejo Mundo y llegó al Nuevo Mundo por colonización independiente del Norte y Sudamérica (Küß y Wink, 1996). Las investigaciones anteriores y nuevos estudios taxonómicos a nivel mundial permitieron definir la distribución de las especies y establecer regiones y sub-regiones geográficas como a continuación se describen (Planchuelo, 1994).

I.- Región Norte y Centro América.

Esta región está dividida en dos sub-regiones con diferentes características ecológicas:

1.-Sub-región Sur-Este: Ocupa la Península de Florida y la estrecha franja costera del Norte de Carolina al Norte del Misisipi en el Golfo de México. Se caracteriza por cuatro especies de hojas simples introducidas por una dispersión de largo alcance del Sur-Este de Brasil.

2.- Sub-región Cadena Montañosa de Alaska a América Central: Se extiende desde la isla de Aleutania en Alaska, a través de las montañas rocallosas y región costera de Norte América hasta la Sierra Madre en México y América Central. No hay especies con hojas simples. Se ha encontrado una gran cantidad de plantas postradas y arbustivas.

II Región Sur-América

Esta región está dividida en dos sub-regiones con diferentes características ecológicas:

1.- Sub-región Atlántica: Comprende el este de Brasil, Uruguay, Paraguay, centro y este de Argentina. Hay un gran número de especies perennes de hojas simples y compuestas, y un pequeño grupo de especies anuales. Especies postradas y cespitosas no son muy comunes. Un grupo de 22 especies de hojas simples están representadas en el Centro y Sur-Este de Brasil.

2.-Sub-región Andina: Se extiende a lo largo de la vertiente de los Andes, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Nor-Poniente de Argentina a las planicies de la Patagonia en el extremo Sur. Se caracteriza por la ausencia de especies con hojas simples y la presencia de arbustos perennes, fistulosos, escasas especies postradas y especies anuales. De esta región es originario *L. mutabilis* el cual ha sido un importante cultivo alimenticio desarrollado por los Incas.

III Región Mediterráneo-África

Esta región está representada por 12 especies que crecen alrededor del área Mediterráneo y tierras altas de África. Siete especies son diferentes del resto por que presentan la superficie de la semilla rugosa. Tres de las especies domesticadas y cultivadas en varias partes del mundo se originaron en esta región (*L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*). La distribución de las especies en esta región es como se presenta a continuación.

1.-Sub-región Mediterránea de semillas lisas: Comprende cinco especies con semillas lisas del Sur-este de Europa, Norte de África e Islas Mediterráneas.

2.-Sub-región Mediterránea de semillas rugosas: Comprende siete especies de semillas rugosas con restringida distribución en las tierras altas de África, cercanas al este, Islas Mediterráneas y alrededor de las costas de la Península Ibérica.

Se estima que en México se distribuyen aproximadamente cerca de 100 especies de forma silvestre (Bermúdez *et al.*, 2000), la mayor cantidad de especies de *Lupinus* se encuentran en la región central de México, en el eje Neovolcánico, en la zona Neártica, en el cruce de la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental, en el estado de Jalisco se han reportado 15 especies distribuidas en diferentes zonas de la región Occidente de México (Ruíz *et al.*, 1999).

2.3 Domesticación del género *Lupinus*

Los lupinos tienen una antigua historia en la agricultura que se remonta a más de 4000 años (Kurlovich, 2002). Las primeras domesticaciones ocurrieron en la región del Mediterráneo y el continente Americano, pero el verdadero avance que hizo a los lupinos un cultivo en la agricultura moderna ocurrió en Europa y Australia. La historia de la domesticación de los lupinos puede ser descrita de la siguiente manera (kurlovich, 2002; Clements *et al.*, 2005):

- Antes de 2000 A.C: Primera domesticación de *L. albus* en la antigua Grecia y Egipto, produciendo granos para el consumo humano y animal, también para usos cosméticos y medicinales.
- 1000-800 A.C: *L. albus* es utilizado como abono verde en la antigua Roma y en otros países mediterráneos.
- 700-600 A.C: Primera domesticación del lupino andino (*L. mutabilis*) en el continente Americano.
- 1860: Domesticación de *L. luteus* y *L. angustifolius* para producción de abono verde en países Bálticos y después en Alemania.
- 1927-1928: Métodos para seleccionar lupinos mutantes con bajos contenidos de alcaloides desarrollados en Alemania.
- 1930-1970: Variedades de lupinos dulces con semillas permeables son desarrollados de *L. luteus*, *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis* en Alemania, Suecia y Rusia.
- 1980-1990: Completamente domesticado *L. cosentinii* y promoviendo la domesticación de otras especies potenciales de lupinos (*L. atlanticus*, *L. pilosus* y *L. polyphyllus*) en Australia y Rusia.

2.4 Importancia del género *Lupinus*

El lupino es considerado una de las leguminosas de mayor potencial para la alimentación animal y humana, debido a su alto valor proteico (30-50%), ácidos grasos benéficos y fibra, algunos ecotipos de *Lupinus* son comparados con la soya (Gladstones, 1980; León *et al.*, 2001; Vance, 2001). Sin embargo, los lupinos sintetizan y almacenan en sus tejidos sustancias antinutricionales o tóxicas (Muzquiz *et al.*, 1993), en particular, alcaloides quinolizidínicos (especialmente esparteína, lupinina, ácido lupínico y lupanina), los cuales

son tóxicos y confieren a la planta un sabor amargo. Aunque pueden acumularse en todos los órganos de la planta, las semillas se caracterizan por ser los principales sitios de almacenamiento, (Wink *et al.*, 1995). Por esta razón, desde los años 30 se han obtenido variedades sin alcaloides (dulces), de mucho mayor interés agronómico y alimenticio. En España y Portugal ha sido tradicionalmente desarrollado para consumo humano, al igual que en otros países de Europa del Este, Australia, Sudáfrica y Estados Unidos. (Castroviejo y Pascual, 1999).

En los sistemas de producción agrícola, los lupinos incluyen varias especies y numerosas variedades para su uso, debido a sus propiedades agronómicas para la rotación primordialmente con cereales, además se han empleado de forma extensa como abono verde, especialmente en zonas de baja productividad agrícola, gracias a su capacidad para desarrollarse en suelos pobres e incluso ácidos y en climas fríos y por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico a través de una particular simbiosis con bacterias fijadoras *Rhizobium-Lupinus*, transformándolo en formas orgánicas asimilables y además de tener bajo requerimiento nutricional. Así mismo del efecto positivo sobre la fertilidad, son capaces de resistir estrés provocado por nitratos, salinidad, herbicidas, sequías, acidez, etc. (de Felipe, 2007).

Presenta la habilidad para solubilizar y absorber fósforo y otros elementos del suelo gracias a su sistema radicular, debido a que presenta raíces pivotantes y profundas, existiendo grandes diferencias entre las distintas especies en lo que respecta a la longitud del mismo. Poseen raíces proteoides, que les ayudan a extender su sistema radicular, haciéndolo más eficiente en la absorción de nutrientes, siendo fundamental para los lupinos, ya que son una de las pocas leguminosas que no forman micorrizas, por lo que la planta puede cambiar su microambiente, modificar el pH de la rizosfera, debido a esto, es pionera en la recuperación de suelos erosionados, por lo que estas plantas desempeñan un papel ecológico importante, creando las condiciones favorables para el desarrollo de los organismos del suelo, así como el mejoramiento de las propiedades físicas y químicas del mismo (Garden y Parbery, 1983; Falkengren y Schottelndreier, 2004; Bahmanyar y Ranjbar, 2008).

2.5 Requerimientos del género *Lupinus*

Los lupinos dulces (alimenticios) se cultivan desde los trópicos hasta las zonas templadas y áridas en el mundo, Australia es el país donde el cultivo del lupino se ha desarrollado más aceleradamente en los últimos años, (Vallejos *et al.*, 2004).

Pueden crecer a temperaturas entre 0 a 28°C, prefieren suelos ligeramente ácidos, bien drenados y bien estructurados, sin embargo las especies silvestres crecen y se adaptan bien a los suelos pobres de baja fertilidad o de reciente formación, en cuanto a requerimientos de precipitación, varían dependiendo de la textura y tipo de suelo, se han reportado datos de algunas especies que crecen exitosamente en zonas de baja precipitación, todas estas características son propias de muchas áreas donde se desarrollan sistemas agrícolas de granos básicos, tanto en México como en otros países en desarrollo (Gross, 1982; López y Fuentes, 1986; Rodas *et al.*, 2001). En México crece en condiciones edafoclimáticas y de vegetación sumamente contrastantes; en áreas perturbadas, en bosques de pino, pino-encino, pastizales, orillas de caminos, campos de cultivo y regiones semiáridas entre 1,800 y 4,200 m. (Mc Vaugh, 1987; Kaye y Kuykendall, 2001).

2.6 Crecimiento de *Lupinus* en términos de acumulación de materia seca

Gardner *et al.*, (1985) definen el crecimiento como un incremento irreversible en el tamaño de las plantas el cual a menudo es acompañado por cambios en la forma. Otros autores indican que el crecimiento es un aumento constante en el tamaño de un organismo, acompañado de procesos como la morfogénesis y la diferenciación celular (Taiz y Zeiger 2006). Mohr (1995) define que el crecimiento de los diferentes órganos de las plantas, es un proceso fisiológico complejo, que depende directamente de la fotosíntesis, la respiración, la división celular, la elongación, la diferenciación, entre otros, y que además está influenciada por factores como temperatura, intensidad de luz, densidad de población, calidad de la semilla, disponibilidad de agua y de nutrientes. Un primer nivel de estudio, el crecimiento de las plantas, se centra en el aumento de materia seca en el tiempo (Goudriaan y Van Laar 1995). Medidas de altura de la planta, diámetro del tallo, masa fresca y masa seca, aumento

de volumen, diámetro a la altura del pecho, área foliar, son variables importantes que para analizar el crecimiento. Las medidas directas que se tienen en cuenta para el análisis de crecimiento de las plantas son la masa seca y el área foliar. La masa seca se obtiene por la diferencia entre masa fresca y masa seca, mientras que el área foliar es obtenida con la medida de la superficie de las hojas fotosintéticamente activas (Barrera *et al.*, 2010). Por diferentes motivos (forraje, abono verde, etc.) varias especies tanto silvestres como cultivadas han sido estudiadas para conocer su crecimiento en términos de acumulación de materia seca y en el género *Lupinus* no ha sido la excepción. Romero *et al.*, (1993) estudiaron la acumulación de materia seca en *L. albus* variedad Multulupa y *L. mutabilis* variedad Inti desde los 95 hasta los 152 días después de la siembra con rendimientos de materia seca que fluctuaron de 4.44 a 20.48 t ha⁻¹ y 3.91 hasta 12.5 t ha⁻¹ respectivamente. En otro estudio, Burt y Hill (1990) reportaron rendimiento de materia seca en *L. angustifolius* al inicio de la floración de 9 500 kg ha⁻¹. Barrientos *et al.*, (2001) en *L. albus* cv. Lolita y *L. angustifolius* cv. Gunguru previamente inoculados con una mezcla de cepas de *Bradyrhizobium* reportaron un rendimiento de materia seca de aproximadamente 2 000 kg ha⁻¹ en ambas especies a los 45 dds, 6 000 kg ha⁻¹ a los 80 dds, mientras que a los 160 dds el rendimiento de la materia seca estuvo por encima de los 7 000 kg ha⁻¹ en ambas especies. Vanek (2009) comparó la materia seca producida por *L. mutabilis* y otras leguminosas en época de floración para su posterior incorporación como abono verde en cuatro zonas altitudinales obteniendo rendimientos de materia seca de 2 007, 2 940, 9 489, 1 371 kg ha⁻¹ respectivamente.

Con respecto a las especies silvestres del género *Lupinus* existen pocos estudios en México orientados a cuantificar la acumulación de materia seca. Soto-Correa *et al.*, 2012 reportaron que la acumulación de materia seca en *L. elegans* en 10 meses después de la siembra y establecido a diferentes altitudes fluctuó de 50 a 300 g planta⁻¹. Por su parte Herrera *et al.*, (2010) indicaron que *L. exaltatus* y *L. rotundiflorus* en el estado de Jalisco se caracterizan por su capacidad para producir materia seca aún en épocas de sequía y bajas temperaturas. En otras especies silvestres no nativas de México Magnússon *et al.*, (2001) reportaron que *L. nootkatensis* es una especie que se desarrolla gradualmente a partir de plantas pequeñas en la fase vegetativa, posteriormente forma muchos tallos y una biomasa considerable con excelente potencial en suelos que no son productivos, produciendo materia seca entre 4 000

y 8 000 kg ha⁻¹, sin embargo, Björnsson y Dalmannsdóttir (2002) con la misma especie registraron en el ciclo 2000-2001 un contenido de materia seca que fluctuó de los 3 000 a los 10 000 kg ha⁻¹.

2.7 Generalidades sobre Nitrógeno

La productividad y dinámica de los ecosistemas terrestres está limitada a la disponibilidad de nutrientes. La importancia del estudio del nitrógeno se debe a que es uno de los elementos más importantes para la vida en nuestro planeta después del agua (Lehninger, 1978; Zahran, 2001). Es fundamental en el crecimiento de las plantas, además, es el elemento constituyente más abundante de varios compuestos esenciales que intervienen en el funcionamiento de múltiples organismos biológicos (Troncoso *et al.*, 2013), ejemplo de ello son las proteínas de las plantas, clorofila, aminoácidos, ácidos nucleicos (Baca *et al.*, 2000; Santi *et al.*, 2013).

El nitrógeno en forma natural, es uno de los elementos más extensamente distribuidos en la naturaleza, el mayor reservorio se encuentra en la atmósfera en forma de gas (N₂), con una abundancia del 78 % el cual es la fuente primaria principal de entrada para los ecosistemas, sin embargo metabólicamente no está disponible para su asimilación por las plantas debido a que la molécula de nitrógeno atmosférico presenta un triple enlace lo que la hace estable e inerte (Baca *et al.*, 2000; Valles *et al.*, 2003; Mays, 2004).

2.7.1 Nitrógeno en el suelo

Es un elemento que generalmente se encuentra en cantidades deficientes y es de los más dinámicos en el suelo, responde fácilmente a diferentes manejos ya que rápidamente es eliminado por procesos de nitrificación, desnitrificación, lixiviación y volatilización de amonio (figura 2) (Soule y Piper, 1994; Larcher, 1995; Acevedo *et al.*, 2011), es fácilmente soluble en el agua del suelo y es solo parcialmente retenido por las partículas de este, alimenta a los microorganismos y favorece así a la descomposición de la materia orgánica (Graetz, 2000).

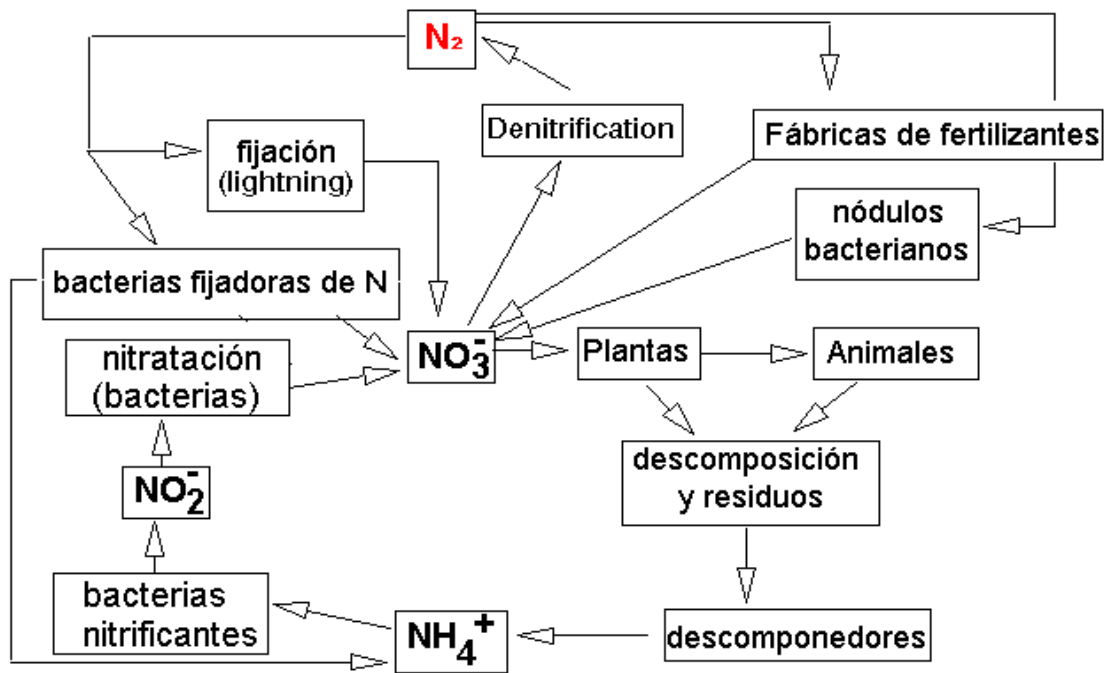


Figura 2. Ciclo del nitrógeno. Fuente: (Anonimo)

<http://www.biologia.edu.ar/plantas/cicloge.htm>.

En el suelo, el nitrógeno se encuentra en dos tipos; en forma orgánica (90%), forma parte de macromoléculas y polímeros, principalmente como proteínas (30-40%), amino azúcares (5-10%), purinas y/o pirimidinas (1-2 %) y en compuestos no identificables (50%). La forma inorgánica (10%), generalmente se encuentra en un 10% como amonio, nitratos y nitrógeno mineral (Fassbender, 1978). Para que la forma orgánica sea utilizable debe ser mineralizado por los microorganismos del suelo para que se libere en formas asimilables para las plantas. (Stewart, 1991).

A diferencia de otros nutrientes, el nitrógeno no puede ser reemplazado por la descomposición de las rocas o partículas del suelo, pudiendo incorporarse al suelo por una serie de fenómenos físicos tales como las radiaciones ionizantes, descargas eléctricas y precipitaciones (Dixon y Wheeler, 1993), Así pues, el nitrógeno biológicamente utilizable comprende solo una pequeña fracción del total presente en el suelo (Valles *et al.*, 2003).

2.7.2 Absorción de nitrógeno por las plantas

Las plantas para su nutrición necesitan nitrógeno como macronutriente y es el principal factor limitante para su desarrollo, solo pueden usar nitrógeno combinado, es decir, aquel que ya está asociado con otros elementos para formar iones tales como amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) y en pequeñas macromoléculas orgánicas de bajo peso molecular, el nitrato es la forma más accesible para el crecimiento de las plantas, esto depende de la especie así como a factores ambientales como la temperatura, pH y a la concentración del mismo en la solución del suelo, estos a su vez son intercambiables y no intercambiables fijados en partículas de arcillas. (Unkovich *et al.*, 1997; Schulze *et al.*, 1999; Olivares, 2004).

2.7.3 El nitrógeno en la agricultura

El nitrógeno disponible es el principal limitante en la productividad de los cultivos, que junto con el fósforo (P) determinan el crecimiento vegetal (Vitousek *et al.*, 1997), para incrementar la disponibilidad de nitrógeno y mejorar la productividad de los cultivos, la agricultura moderna a nivel mundial ha aumentado la demanda de nutrición nitrogenada, debido a que la cantidad de nitrógeno disponible en el suelo no satisface la necesidad de los cultivos, en virtud de la continua disminución del nitrógeno de los suelos agrícolas (Herridge y People, 1995; Peña *et al.*, 2002), por lo que el mayor aporte del nitrógeno en la agricultura se da a través del suplemento de fertilizantes químicos nitrogenados, por síntesis química y es incorporado en forma de nitratos, urea, sales de amonio, etc. (Black, 1975), siendo la aplicación de fertilizantes nitrogenados una práctica común en los sistemas agrícolas (Zahran, 2001). Sin embargo, el uso creciente de fertilizantes nitrogenados para conseguir un aumento de la productividad agrícola implica incrementos en los costos de producción y además conlleva un riesgo potencial de contaminación y eutrofización de las aguas por lixiviación de nitratos del suelo, ocasionando acumulación de compuestos nitrogenados tóxicos en el medio ambiente con el consiguiente daño para la salud humana. (Zahran, 2001; Peña *et al.*, 2002).

2.8 Fijación de nitrógeno

El proceso a través del cual el nitrógeno atmosférico es reducido hasta una forma utilizable para las plantas es conocido como fijación de nitrógeno. (Celaya y Castellanos, 2011). Existen varias formas de fijación de nitrógeno, en la cual, aporta este elemento a los ecosistemas, por lo que es posible obtener un importante suministro de nitrógeno, en la biosfera se estiman unos 275 millones de toneladas anuales, de los cuales 175 corresponden a la fijación biológica, 70 a la industrial y 30 a la espontánea (Rodríguez *et al.*, 1984; Aparicio *et al.*, 2000). La fijación biológica puede ser llevada a cabo por microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas y no sólo permite usar el nitrógeno atmosférico sino también revertir o reducir la degradación del suelo (Parsons, 2004; citado por Mays, 2004). Está dividida en dos tipos de fijación; asimbiótica y simbiótica, en las cuales se lleva a cabo por medio de un complejo enzimático conocido como nitrogenasa (Mays, 2004; Troncoso *et al.*, 2013). La fijación espontánea se deriva del agua de lluvia, conteniendo nitrógeno en forma aprovechable procedente de diferentes fuentes, puede contener óxidos de nitrógeno o nitratos sintetizados por las descargas eléctricas y por la reducción fotoquímica provocada por la radiación como productos de la contaminación del ambiente, causada por algunas plantas industriales. Puede también contener amonio o nitrógeno orgánico por contaminación con polvo atmosférico. La cantidad de nitrógeno incorporada al suelo a través del agua de lluvia se estima entre 1 y 50 kg ha⁻¹ (Alcántar y Trejo, 2007). La fijación industrial está estrechamente relacionada con la existencia de una demanda de fertilizantes nitrogenados para el aumento de los rendimientos de los cultivos (Rodríguez *et al.*, 1984). El proceso catalítico de fijación industrial fue inventado por los alemanes Fritz Haber y Karl Bosch en 1914, conocido como proceso Haber-Bosch, en donde los fertilizantes nitrogenados se fabrican a partir de amoníaco que se obtiene por fijación química del nitrógeno atmosférico con hidrógeno gaseoso. (Baca *et al.*, 2000).

2.8.1 Fijación biológica de nitrógeno (FBN) por microorganismos de vida libre

Este tipo de fijación aparece únicamente en bacterias, algas cianofíceas (algas azul-verdosas) y actinomicetos, entre los más de 60 géneros conocidos, los más representativos son:

Cyanobacteria, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus*, *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* (Cerón y Aristizábal, 2012), y se encuentran formas aerobias, facultativas, anaerobias, autótrofas y heterótrofas, con hábitats muy dispares, tanto terrestres como acuáticos, y con requerimientos ambientales de temperatura, aireación, humedad, pH, muy heterogéneos. Los microorganismos fijadores de vida libre, si bien importantes en número, tienen un escaso rendimiento fijador, debido a que consumen mucha energía en el proceso y los substratos necesarios para obtener tal energía son poco abundantes en la biosfera (Baca *et al.*, 2000; Olivares, 2004).

2.8.2 Fijación biológica de nitrógeno (FBN) en plantas no leguminosas

Las bacterias del género *Frankia* son actinobacterias filamentosas Gram positiva, que establecen simbiosis con un heterogéneo grupo de plantas angiospermas, conocidas como plantas actinorrizas. (Callaham *et al.*, 1978). Sus hifas se diferencian en esporangios, pero también pueden dar lugar a estructuras especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico, denominadas vesículas, cuya función es aislar a la nitrogenasa del oxígeno. El tipo de simbiosis *Frankia*-planta no leguminosa engloba a más de 200 especies de árboles y arbustos de crecimiento rápido, distribuidas en ocho familias: Coriariaceae Rosaceae Myricaceae Betulaceae Casuarinaceae Datisceae Elaeagnaceae y Rhamnaceae, adaptadas a suelos marginales, que habitan muy diversos ecosistemas y se adaptan a condiciones ambientalmente extremas. Su principal interés económico es maderero, en la recuperación de suelos degradados, en jardinería y ornamentación, careciendo de interés agrícola (Valdés, 2002). El beneficio que se puede derivar de su empleo nos viene dado a más largo plazo que en el caso de las leguminosas, obteniendo promedios de nitrógeno fijado que van de 60 a 250 Kg ha⁻¹ (Rodríguez *et al.*, 1984; Bautista y Valdés, 2008).

2.8.3 Fijación biológica de nitrógeno (FBN) en leguminosas

Una de las familias de plantas más reconocidas como fijadoras de nitrógeno son las fabáceas, comprende entre 670 y 750 géneros y entre 18 000 y 19 000 especies, son plantas herbáceas, arbóreas y arbustivas, tanto anuales o bianuales como perennes, distribuidas en tres subfamilias; Caesalpinioideae, en la que se incluyen numerosas especies tropicales, con un 23% de especies formadoras de nódulos, Mimosoideae, a la que pertenecen especies arbóreas, con un 90% de especies con nódulos, y Papilionoideae, la mayor subfamilia, con especies de elevada importancia agronómica, con un 97% de especies noduladas (Doyle y Luckow, 2003; Lewis *et al.*, 2003; Graham y Vance, 2003).

Esta familia tiene gran importancia en la alimentación humana y animal. Las leguminosas de grano han sido y aún lo son en muchos casos, la base de la alimentación humana desde hace miles de años, esto se debe a su gran distribución a nivel mundial, pero también al elevado contenido proteico presente en el grano de muchas especies de la familia, siendo por ello la principal fuente de proteínas para la mayor parte de herbívoros y omnívoros incluido el hombre, ya que contribuyen el 33% del nitrógeno de la dieta proteica, las semillas de leguminosas tienen un valor energético similar al de los cereales, pero su contenido en proteínas llega a ser hasta cuatro veces mayor (Jambrina, 1996; Vance *et al.*, 2000).

Las leguminosas como todos los vegetales absorben nitrógeno mineral del suelo pero además pueden obtener el nitrógeno atmosférico (Celaya y Castellanos, 2011), por medio de la simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*, esta relación otorga a las plantas que la desarrollan una gran capacidad colonizadora, permitiéndolas colonizar suelos pobres, en los que la mayoría de las especies vegetales no podrían establecerse. (Jambrina, 1996). Las estimaciones recientes indican que contribuyen en la actualidad con más de la mitad del nitrógeno fijado por sistemas biológicos (Twornlow, 2004; Urzua, 2005). Sin embargo, entre las especies de leguminosas la capacidad de fijación de nitrógeno varía de 40-450 kg ha⁻¹ por año (FAO, 1984).

2.9 Historia y taxonomía del género *Rhizobium*

El misterio de las leguminosas fue aclarado cuando Hellriegel y Wilfarth en 1888 probaron la fijación de nitrógeno en plantas noduladas, esto fue seguido por el aislamiento de la primera bacteria de los nódulos por Beijerinck ese mismo año. En 1932, Fred y colaboradores publicaron una monografía, donde revisaron y analizaron la información existente sobre la simbiosis. Para las décadas posteriores y hasta la actualidad los avances tecnológicos han permitido estudios más detallados y por lo tanto un mejor conocimiento y entendimiento de la simbiosis leguminosas-rizobia. (Mays, 2004). El primer nombre que se les dio a las bacterias de los nódulos de las raíces de las leguminosas fue *Phytomyxa*, propuesto por Schroeter en 1886, considerando la relación de estas bacterias con los hongos mucosos. En 1970, la Comisión Judicial del Comité Internacional de Nomenclatura Bacteriana, aprobó como nombre genérico *Rhizobium* Frank 1889. Esto se hizo en base a que el nombre *Rhizobium* enfatiza en la importancia agronómica de las bacterias de los nódulos de las raíces (rhiza: raíz, bius: vida, *Rhizobium*: vida en las raíces) y a su vez guarda tributo a la extensa literatura publicada con ese nombre (Mays, 1997). Actualmente, además de *Rhizobium*, existen otros géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno: *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Mesorhizobium* (Cerón y Aristizábal, 2012).

El género *Rhizobium* pertenece a la familia Rhizobiaceae, englobadas dentro del filo Proteobacteria, son organismos procariontes, está constituida por bacilos móviles del suelo Gram negativos, aerobios, con presencia de flagelos y sin endosporas (Larcher, 1995), los límites máximos para el crecimiento de rizobios están entre 32 a 47 °C, aunque la tolerancia varía entre especie y cepas. El pH óptimo para el crecimiento de rizobios está entre 6.0 y 7.0 y pocos rizobios crece bien con pH menor a 5.0 en suelos tropicales. (Hungria y Vargas, 2000). Este género se encuentra representado globalmente en agro-ecosistemas templados, tropicales, forestales y suelos cultivables, pueden ser activados al manejar los sistemas de producción con bajos insumos y principios agroecológicos (Jones, 1991; López *et al.*, 2010).

2.10 Interacción leguminosa-*Rhizobium*

El establecimiento de la simbiosis es un proceso complejo que está regulado por el simbiote vegetal (Kiers *et al.*, 2003). En la interacción simbiótica los rizobios reconocen específicamente la leguminosa huésped para que se establezca la simbiosis. Las plantas le proporcionan a las bacterias nutrientes como carbohidratos y el sistema de protección necesario para que la bacteria lleve a cabo el proceso de fijación de nitrógeno y las bacterias a su vez, vuelven accesible a la planta el nitrógeno atmosférico, convirtiéndolo en amonio, a través del desarrollo de un nuevo órgano llamado nódulo (Pérez y Calvo, 2005; Gasque, 2006)

Para que se establezca la relación simbiótica deben ocurrir las siguientes etapas (Mays, 1997; Perret *et al.*, 2000; González y Marketon, 2003; Gage, 2004):

- Multiplicación de las bacterias en la rizósfera
- Colonización de la rizósfera
- Adsorción de las bacterias a la raíz
- Ensartijamiento de los pelos radicales, ocurre en las raíces cuando la infección es vía pelos radicales y en algunas donde acontece vía unión raíces laterales-raíz principal
- Formación de los hilos o zonas intercelulares de infección
- Crecimiento del hilo de infección hacia las células corticales o invasión directa de las mismas
- Diferenciación tisular y desarrollo del nódulo

2. 10.1 Estructura y forma de los nódulos

La estructura y los tipos de nódulos son dependientes de la planta hospedera, así se presentan dos tipos:

Nódulos determinados: en los cuales la actividad meristématica cesa temprano en su formación y su aspecto final resulta del alargamiento de las células, este tipo de desarrollo

origina nódulos esféricos o globosos que pueden organizarse alrededor de la raíz para formar los denominados nódulos en collar (Hirsch, 1992; Mays, 1997).

Nódulos indeterminados: los cuales presentan un meristema persistente, que puede producir nódulos ramificados o coraloides, puesto que constantemente se añaden nuevas células a la parte distal del nódulo (Mays, 2004).

Los nódulos formados en la simbiosis *Lupinus-Rhizobium*, poseen características propias que los diferencian de los formados por otras leguminosas. Se trata de un subtipo especial y único dentro de los nódulos indeterminados (Bergersen, 1982), denominado nódulo lupinoide o en collar, carecen de meristemo terminal, presentan una localización basal-lateral, y comparten características tanto con los nódulos determinados (morfología esférica) como con los indeterminados (algunos aspectos de la distribución zonal). En los nódulos lupinoides el nitrógeno es transportado desde los nódulos hacia la parte aérea de la planta en forma de amidas, siendo un caso único dentro de las leguminosas de climas templados. (de Felipe, 2007; Fedorova *et al.*, 2007).

2.11 Proceso de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en leguminosas

Se ha demostrado que la FBN depende de un complejo enzimático conocido como nitrogenasa (Phillips, 1980; Sanchez, 1985), presente en los organismos fijadores, Este complejo presenta dos tipos de componentes: componente I, en esta parte se localiza el sitio de unión y reducción del sustrato teniendo como cofactor al hierro-molibdeno y el componente II cuyo papel es el de reducir al componente I (Phillips, 1980). La FBN es un proceso en el cual el N_2 debe ser primero reducido y luego fijado, es decir, combinado en una forma utilizable (NH_4^+), sin embargo el primer producto de la reacción es amoníaco (NH_3^-), pero es rápidamente protonado, formándose amonio (NH_4^+), de tal manera que el amonio es la especie predominante y la que forma parte en las reacciones de asimilación (Sprent y Sprent, 1990), posteriormente es metabolizado en las células nodulares a amidas o ureidos, que luego son exportados vía xilema al resto de la planta, donde son usados (figura 3) (Mays, 1997).

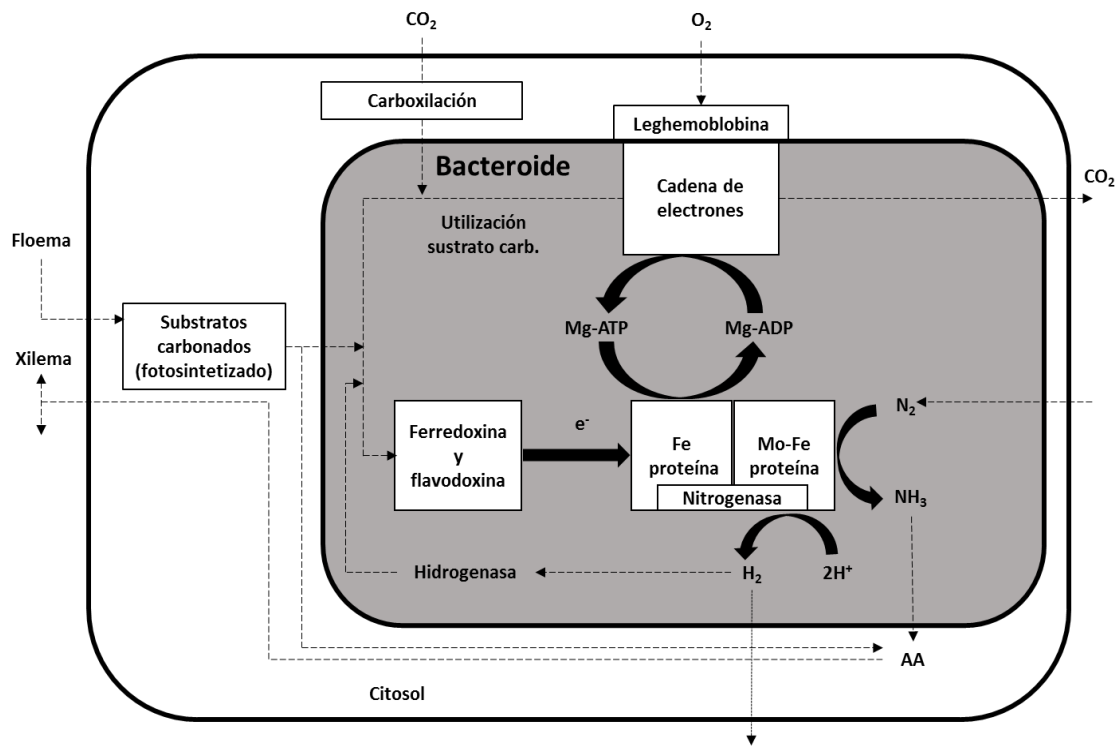


Figura 3. Esquema del complejo enzimático nitrogenasa actuando en el nódulo. Fuente: (Olivares, 2004).

La bacteria emplea compuestos carbonados oxidables suplidos por la planta para su metabolismo, desarrollo, síntesis de ATP y del poder reductor usados en la reacción de fijación catalizada por la nitrogenasa, esto depende de la utilización de azúcares para la obtención de energía y compuestos reducidos (Atkins, 1986; Halbleib y Ludden, 2000). Este proceso se puede generalizar con el consumo de 16 moléculas de ATP por N_2 reducido, según la ecuación: $N_2 + 16ATP + 8e^- + 8H^+ = 2NH_3 + 8H_2 + 16ADP + 16Pi$.

La actividad del complejo enzimático puede ser susceptible a las concentraciones de oxígeno (O_2) de la atmósfera circundante, de tal manera que los organismos, bien aislados o asociados han adoptado mecanismos que le permiten la protección, por ejemplo, alta tasa respiratoria, protección conformacional y la compartamentalización, que les permiten mantener bajas concentraciones de éste a fin de mantener la enzima funcionando (Hungria y Neves, 1987; Pereira *et al.*, 1989; Ureta y Nordlund, 2002; Lee *et al.*, 2004).

2.11.1 Factores que afectan la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en leguminosas

La FBN representa un ahorro importante de nitrógeno del suelo (Cicore *et al.*, 2005). Esta característica es muy ventajosa ya que con pequeñas cantidades de fertilizantes nitrogenados es posible obtener altos rendimientos, con el derivado impacto económico y ecológico (García *et al.*, 1996). Sin embargo, para que ocurra una eficiente fijación, las raíces deben interactuar en el suelo con cepas compatibles de *Rhizobium*, por lo que factores que afecten el crecimiento de las raíces o la actividad de la planta hospedera, como lo son condiciones del suelo y factores ambientales afectan la formación de nódulos, y por tanto, limitaciones en la simbiosis y en la FBN (Alexander, 1980; Hungria y Neves, 1987; Graham, 1990; García *et al.*, 2003).

Las altas temperaturas inhiben la FBN y la nodulación puede fallar si las temperaturas del suelo alcanzan 40 °C o más en los primeros cinco cm de profundidad, temperatura que mata a muchas bacterias reduciendo su población en el suelo. Las altas temperaturas también inhiben la formación de pelos radicales (Hungria y Vargas, 2000). Por otra parte, se ha reportado disminución en la FBN cuando el contenido de humedad del suelo es menor al 50% del agua útil (Serraj *et al.*, 1995), debido a que la tolerancia a la sequía es influenciada por la capacidad de las plantas para captar el agua del suelo, las leguminosas de raíces profundas lo extraen de mayores profundidades para mantener su potencial hídrico y evitar una reducción en el índice de FBN (Valles *et al.*, 2003). Desde el punto fisiológico, diversos estudios consideran que una de las principales limitantes del proceso de FBN es la disponibilidad de fotosintatos hacia los nódulos (Mahon, 1977; Hungria y Franco, 1988), debido a que consume de tres a cuatro veces más energía metabólica que la absorción y asimilación de nitrógeno mineral (Atkins, 1986). Durante algunos períodos de crecimiento activo de la planta, del 30 al 50% de los carbohidratos producidos en la fotosíntesis neta diaria son consumidos por las raíces noduladas. Con respecto al suelo las limitaciones por acidez son importantes, la supervivencia en un medio de pH bajo y cambios químicos en el suelo causados por acidez alta, como una alta proporción de aluminio y hierro-manganeso. En suelos ácidos disminuye la disponibilidad de fósforo, Molibdeno y hay deficiencia de Calcio, esto conlleva a que la acidez afecta las primeras etapas del proceso de infección para

la nodulación (Giller y Wilson, 1991). Por otro lado, la magnitud de dicho proceso disminuye cuando el cultivo es expuesto a ambientes con elevada disponibilidad de nitratos (NO_3^-) (Imsande, 1989), existiendo un efecto inhibitorio del nitrato sobre la FBN, ya que la FBN resulta más costosa en términos energéticos, por lo que la planta utiliza preferentemente el nitrógeno inorgánico del suelo, (Becana y Bedmar, 1991).

2.12 Métodos para cuantificar la fijación biológica de nitrógeno (FBN)

A pesar de la importancia de las leguminosas en la producción y en la economía del nitrógeno, en la medición de la FBN se han utilizado diferentes metodologías (Vicent, 1982; Campillo *et al.*, 2003), sin embargo, no se cuenta con un método adecuado y correcto para determinar dicho proceso, ya que no existe información precisa sobre la real capacidad de fijación, cada método tiene ventajas únicas y limitaciones, estos pueden depender de la disponibilidad y adecuada determinación de la FBN para cualquier especie de leguminosa cultivada bajo todas las posibles variantes de suelo y ambientes. Este conocimiento es indispensable para disponer de un método adecuado, para medir con precisión la cantidad de nitrógeno que las plantas obtienen por este proceso simbiótico y conseguir el objetivo central de lograr una eficiente FBN y ahorro de fertilizante nitrogenado en los ecosistemas (People *et al.*, 1995; Vera *et al.*, 2000; Campillo *et al.*, 2003). Los diferentes métodos para determinar la FBN son los siguientes:

I.-La técnica de reducción del acetileno (actividad enzimática) (Hardy *et al.*, 1968), ha probado ser útil para detectar sistemas de FBN, también tiene limitaciones debido a que mide la actividad de la enzima nitrogenasa de manera puntual y en un corto período de tiempo.

II.-Las técnicas isotópicas del ^{15}N se consideran como las únicas que ofrecen cuantificaciones globales de la FBN, que permiten distinguir la proporción de nitrógeno en la planta que procede del suelo, de un fertilizante o de la atmósfera, y entregan valores de FBN integrados para todo un ciclo de crecimiento de un sistema leguminosa-*Rhizobium* (Barea, 1991; Danso, 1995; Boddey *et al.*, 1996; García *et al.*, 2003).

III.-La técnica de diferencias en la acumulación de nitrógeno total o el rendimiento de materia seca es laboriosa, ya que cuantifica el porcentaje de nitrógeno en plantas fijadoras y no fijadoras (cultivos de referencia), sin embargo, se debe tener la precaución en la selección de la planta de referencia, ya que se asume que ambos tipos de plantas deben absorber cantidades similares del nitrógeno proveniente del suelo (Vicent, 1982; Hardason *et al.*, 1984; Resende *et al.*, 2003).

IV.-La técnica de ureidos se da debido a que existen importantes diferencias en las formas principales de nitrógeno transportadas en el xilema de leguminosas noduladas y no noduladas, es posible utilizar la abundancia de ureidos en la savia del xilema como medida indirecta de la proporción de nitrógeno de la planta derivado de la FBN. Este método es aplicable a las leguminosas de grano más importantes, pero no a muchas leguminosas forrajeras. (Peoples y Herridge, 1990; Giller y Wilson, 1991)

2.13 El género *Lupinus* en la fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Las especies del género *Lupinus* son las más activas en el proceso de FBN (Kurlovich *et al.*, 2002b). Kartuzova y Kurlovich (2002) comentan que Vavilov fue uno de los primeros investigadores internacionales que emprendió la necesidad de coleccionar, estudiar y preservar especies en las regiones agrícolas, con especial énfasis en las fabáceas en general y el género *Lupinus* en particular, considerándolo como una fuente de proteína y un medio de incrementar la fertilidad del suelo, ya que esto es un problema de alta prioridad en las ciencias biológicas y agrícolas para el desarrollo de una agricultura sostenible (Kurlovich *et al.*, 2002b).

Estas plantas además de autoabastecerse de nitrógeno pueden aportar nitrógeno a un cultivo acompañante de especies diferentes a las leguminosas, puede dejar también nitrógeno disponible en el suelo para el cultivo siguiente en rotación, siempre que se incorporen los rastrojos y se mineralice el nitrógeno en formas orgánicas (López y Fuentes, 1991; Glyan'ko *et al.*, 2008).

La cantidad de nitrógeno fijado depende de la bacteria, la planta hospedadora, las condiciones ambientales y las variedades de áreas geográficas en las que se encuentran. Algunas estimaciones indican que, del nitrógeno que deja el lupino al ser incorporado, alrededor del 27% se mineraliza anualmente y un 74% del nitrógeno mineralizado es absorbido por cada cultivo subsecuente. En el sudoeste de Australia se estima que de 33-46% del nitrógeno absorbido por el cultivo de trigo puede provenir de la mineralización de los residuos de lupino (Mera *et al.*, 1999).

Varios autores han estudiado la FBN durante los años 1983-1996 en *L. angustifolius* variedad Uniharvest y *L. nootkatensis*, los cuales fueron estimados por medio del método de la dilución ^{15}N en suelos de tipo Andosol en Islandia. El porcentaje del nitrógeno derivado de la atmosfera en *L. angustifolius* comprende del 93 al 99%, presentando un estimado de 185 a 212 kg ha⁻¹, mientras que en *L. nootkatensis* presenta 200 kg ha⁻¹ con un porcentaje del 89 al 98% (Pálmason *et al.*, 1992; Danso *et al.*, 1993; Pálmason *et al.*, 2002).

Jacobsen y Mujica (2006) han determinado que la inoculación es de mucha importancia en la producción de *L. mutabilis* cuando se siembra en suelos que no tienen cepas nativas de *Rhizobium lupini*, aumentando considerablemente el rendimiento de grano y materia seca, se ha determinado que esta especie fija simbióticamente de 163 a 220 kg ha⁻¹ de nitrógeno atmosférico.

Los aportes de nitrógeno a los agro-ecosistemas en *L. angustifolius* se han estimado entre 150 y 220 kg ha⁻¹ en suelos del sudoeste de Australia (Unkovich, *et al.*, 1994). Mientras que en otros ensayos se ha encontrado que una hectárea de lupino puede fijar en un año entre 145 y 316 kg de nitrógeno, con un promedio de 227 kg de ha⁻¹ (Nutman, 1976; Castillo, 1989; Larson *et al.*, 1989; Unkovich *et al.*, 1997), sin embargo, en una investigación realizada por Evans *et al.*, (2001) demostraron que entre 20 y 25 kg de nitrógeno son fijados por cada tonelada de materia seca producida. Esto contribuye a la mayor proteína de la semilla de lupino, así como proporcionar nitrógeno residual para los cultivos subsiguientes, en particular de cereales.

III. HIPÓTESIS

Las especies nativas del género *Lupinus* que crecen en el estado de Jalisco (*L. exaltatus*, *L. rotundiflorus* y *L. mexicanus*) son más eficientes que las especies domesticadas (*L. angustifolius*, *L. albus* y *L. mutabilis*) en la acumulación de materia seca y en la fijación biológica del nitrógeno (FBN) cuando se cultivan en suelos ácidos del municipio de Zapopan, Jalisco, México.

IV. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar el crecimiento en términos de acumulación de materia seca, así como estimar la FBN por el método de la diferencia en tres especies silvestres y tres especies domesticadas del género *Lupinus*, al ser sometidas a cultivo bajo las mismas condiciones de manejo, edáficas y climáticas.

4.1. Objetivos específicos

- Determinar y comparar la acumulación de materia seca durante las diferentes etapas de crecimiento en seis especies del género *Lupinus* (tres domesticadas y tres silvestres).
- Estimar la FBN en términos de la cantidad de nitrógeno fijado y cuantificar el porcentaje de nitrógeno derivado de la misma en cada una de las especies estudiadas por el método de la diferencia.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del sitio experimental

Se estableció un experimento bajo condiciones de riego durante el ciclo otoño invierno (2013-2014) en el campo agrícola experimental del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, en la localidad de las Agujas, Nextipac, municipio de Zapopan Jalisco. Las coordenadas geográficas del lugar son 20°43' latitud norte y 103°23' latitud oeste, se encuentra a una altitud de 1600 m. presenta clima semicálido semihúmedo. La temperatura media anual es de 20.5°C, mientras que sus máximas y mínimas promedio oscilan entre 32.1°C y 8.4°C respectivamente. La precipitación media anual es de 943 mm.

5.2 Material biológico

Las semillas de las especies nativas se obtuvieron de plantas que crecieron de forma silvestre en diferentes municipios del estado de Jalisco; en Lagos de moreno (*L. mexicanus*), en Chiquilistlán (*L. rotundiflorus*) y en Ciudad Guzmán (*L. exaltatus*), mientras que las especies domesticadas son de diferente procedencia; *L. angustifolius* variedad Haagena fue proporcionada por una compañía Alemana (Saatzucht Steinach), dedicada al mejoramiento genético, mientras que las semillas de *L. albus* variedad Butan fueron donadas por el Institute of Plant Genetic de Polonia y las semillas de *L. mutabilis* sin identidad genética o comercial fueron proporcionadas por investigadores del Colegio de postgraduados. Paralelamente a las especies en estudio se sembró cebada (*Hordeum vulgare*) en idénticas condiciones de manejo, como cultivo de referencia.

5.3 Características del suelo utilizado en la investigación

El suelo utilizado para establecer el experimento se clasifica como tipo Regosol (SEMADES, 2006), caracterizado por ser suelos de reciente formación, de textura arenosa, bajo contenido de materia orgánica y pH ácido (Ibarra *et al.*, 2009). En el Cuadro 1 se muestran algunas

propiedades física y químicas del suelo utilizado para el cultivo de las especies en estudio. Es necesario destacar que el suelo presenta el principal requisito para poder aplicar el método de la diferencia de nitrógeno total ya que posee bajo contenido de nitrógeno total (>0.25%).

Cuadro 1. Análisis inicial del suelo.

Determinación	Muestra
pH	5.04
Conductividad eléctrica dSm ⁻¹	0.47
% Materia orgánica	1.721
% Nitrógeno estimado	0.086
*Fósforo mg kg ⁻¹	68.525
Sodio (Na ⁺)	0.358
Potasio (K ⁺)	0.835
Calcio (Ca ⁺⁺)	1.365
Magnesio (Mg ⁺⁺)	0.180
% Arena	51.84
% Arcilla	20.88
% Limo	27.88
Textura	FRANCO ARENOSO

Método utilizado: NOM-021-RECNAT-2000, *Bray

5.4 Establecimiento del experimento

Antes de la siembra, las semillas de las especies silvestres utilizadas en el experimento se sometieron a un proceso de escarificación (inmersión en ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado 98 % durante 30 minutos) debido a que generalmente presentan latencia física. Durante el tiempo de inmersión en ácido se agitaron cada 10 minutos para su escarificación uniforme, posteriormente se lavaron con abundante agua corriente hasta quedar libres del ácido.

5.4.1 Preparación del terreno y siembra de *Lupinus*

Antes de realizar la siembra se realizó un barbecho y dos pasos de rastra. Se formaron surcos de 80 cm de separación. La siembra de todas las especies se realizó de forma manual el 08 de noviembre del 2013, colocando sobre el lomo de los surcos dos semillas por orificio a una distancia de 10 cm, de tal manera que se logró tener una densidad de plantación estimada de 120 000 plantas por ha⁻¹ en las especies de *Lupinus* y aproximadamente 300 000 plantas por ha⁻¹ de cebada.

5.4.2 Diseño experimental y tratamientos

La siembra de las especies de *Lupinus* se realizó en parcelas por separado para las especies domesticadas y para las especies silvestres; ambas bajo un diseño experimental de bloques al azar con arreglo factorial. El factor A correspondió a las especies (tres especies) y el factor B a los muestreos destructivos de plantas (seis muestreos). Se consideraron tres repeticiones para cada grupo de especies como se muestra en las figuras 4 y 5. Cada parcela individual estuvo constituida de cuatro surcos de 10 m de longitud. Los dos surcos centrales en cada parcela representaron la parcela útil.

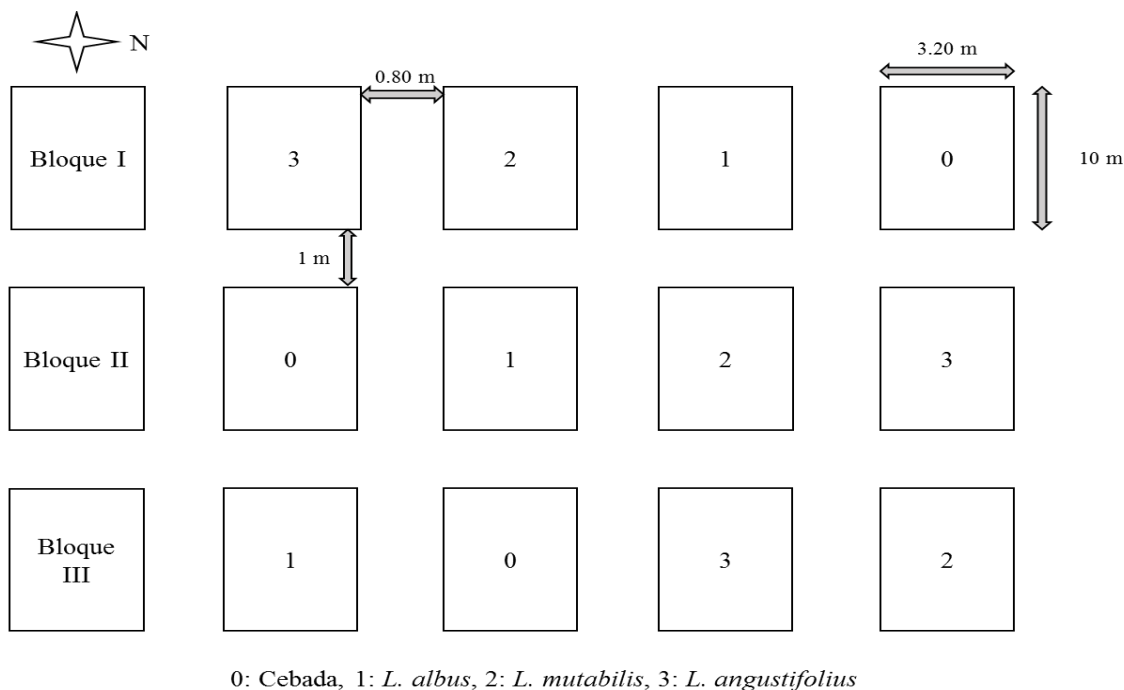
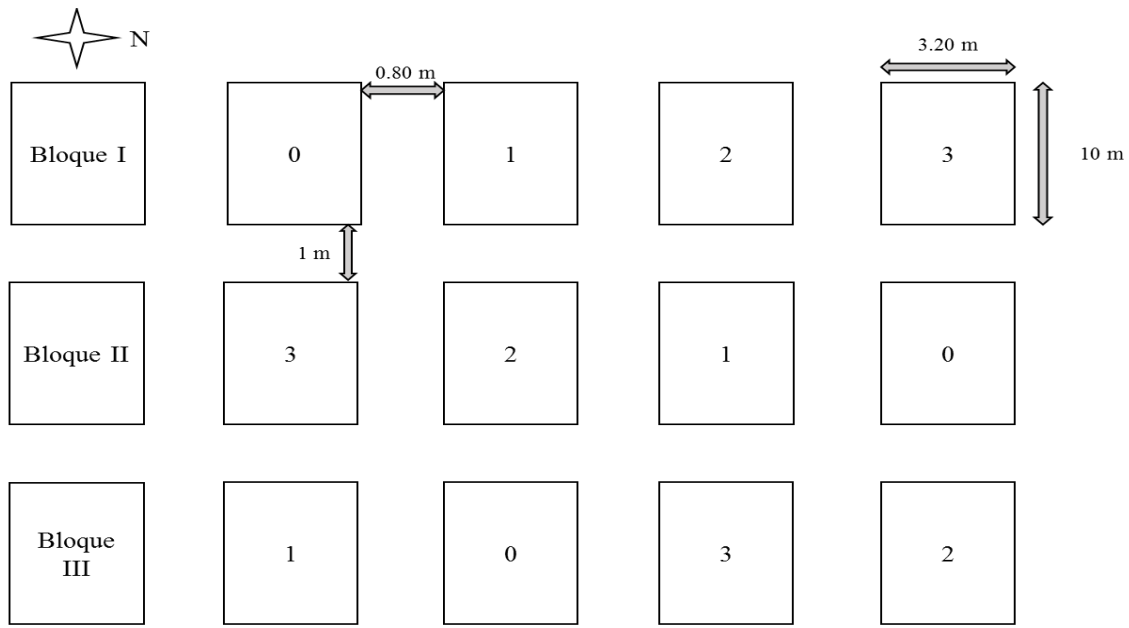


Figura 4. Croquis que muestra la distribución en campo de las especies domesticadas.



0: Cebada, 1: *L. exaltatus*, 2: *L. mexicanus*, 3: *L. rotundiflorus*

Figura 5. Croquis que muestra la distribución en campo de las especies silvestres.

5.4.3 Riego

Después de la siembra se realizó un riego por goteo mediante cintillas, las cuales tenían una distancia entre goteros de 20 cm. Posteriormente los riegos se realizaron a capacidad de campo, con una frecuencia de 15 días aproximadamente hasta la formación de vainas. Las temperaturas que se registraron durante el crecimiento y desarrollo de las especies en estudio se muestran en la figura 6.

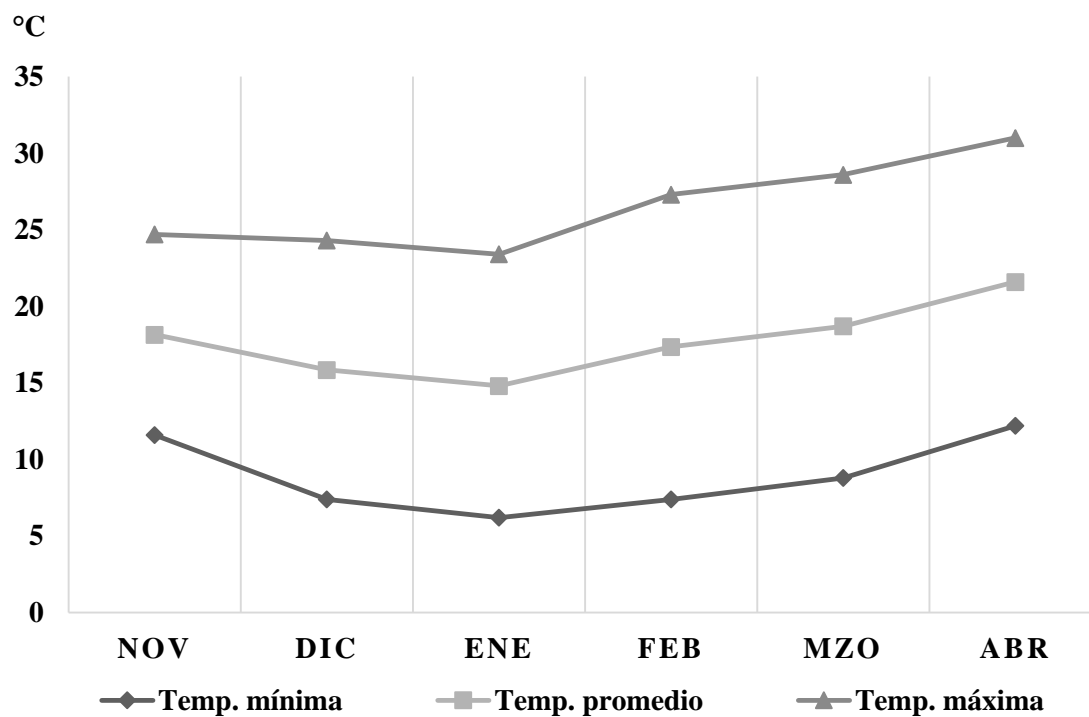


Figura 6. Temperatura mínima, máxima y promedio de la época de cultivo (Noviembre 2013-Abril 2014).

5.4.4 Control de malezas, plagas y enfermedades

La baja densidad de malezas que se presentaron durante el crecimiento del cultivo facilitó el control de estas en forma manual. Cabe señalar que las condiciones ambientales presentes durante el periodo de evaluación evitaron que se presentaran daños apreciables causados por plagas o enfermedades por lo que no fue necesaria la aplicación de pesticidas.

5.5 Muestreos y medición de variables

Los muestreos destructivos de las plantas para cada especie incluyendo la especie de referencia, fueron realizados aproximadamente cada 15 días independientemente de la etapa fenológica en la que se encontraban. Debido a que las especies silvestres generalmente fueron más lentas en su crecimiento que las especies domesticadas en términos de acumulación de materia seca, el primer muestreo inicio a los 61 días después de la siembra (dds) en las

especies domesticadas, mientras que en las especies silvestres el primer muestro se realizó a los 93 dds (cuadro 2). En cada muestreo se tomaron todas las plantas ubicadas en 40 cm del surco central. Las plantas se cortaron con tijeras a una altura de 3 cm sobre la superficie del suelo. Todos los muestreos se realizaron entre las 9 y 10 de la mañana.

Cuadro 2. Fechas de muestreos para cuantificar el contenido de materia seca en especies domesticadas y silvestres.

Especie domesticadas	61 dds	76 dds	93 dds	108 dds	122 dds	137 dds	151 dds	169 dds
<i>L. albus</i>	*	**	***	***	****	****		
<i>L. mutabilis</i>	*	**	**	***	***	****		
<i>L. angustifolius</i>	*	**	***	***	****	****		
Especies silvestres								
<i>L. exaltatus</i>			*	**	**	***	***	****
<i>L. mexicanus</i>			*	**	**	**	***	****
<i>L. rotundiflorus</i>			*	**	**	***	***	****
Cebada		X	X	X	X			

dds: días después de la siembra, * etapa vegetativa, **inicio de floración, *** floración y formación de vainas, **** vainas y semillas maduras. x: fechas de muestreo de la planta de referencia (cebada).

5.5.1 Cuantificación de materia seca

Las plantas colectadas (completas) fueron lavadas y escurridas sobre papel absorbente durante 30 minutos, después se colocaron en estufa de aire forzado a 70°C en el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología (CUCBA) hasta peso constante (alrededor de 48 horas). Después de registrar el peso seco (materia seca) de las plantas de cada especie se molieron utilizando un molino de la marca RETSCH GMBH modelo 5657 Haan del Departamento de Madera Celulosa y Papel (CUCEI) para su posterior análisis de nitrógeno. Adicionalmente en algunas plantas se separaron las hojas y se determinó el peso seco en cada muestreo.

5.5.2 Análisis de nitrógeno

El contenido de nitrógeno (%) se determinó por medio del método Micro-Kjeldhal en la materia seca de las plantas completas así como en una muestra de las semillas utilizadas en la siembra. Cabe señalar que el contenido de nitrógeno en las semillas se utilizó para estimar posteriormente el porcentaje de nitrógeno obtenido o derivado de la FBN, ya que constituye la principal fuente inicial de nitrógeno para la planta. Con los datos de materia seca por planta (g planta^{-1}) y porcentaje de nitrógeno (%) se calculó la cantidad de nitrógeno total por planta mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de N (g. planta}^{-1}\text{)} = [\text{materia seca (g. planta}^{-1}\text{)} \times \% \text{ N total en la planta}]/100$$

Con los valores anteriores se estimó el contenido total de nitrógeno en kg ha^{-1} considerando una densidad de 120 000 plantas ha^{-1} para las especies del género *Lupinus* y 300 000 plantas ha^{-1} en cebada.

5.5.3 Cuantificación de la fijación biológica del nitrógeno (FBN) por el método de la diferencia

El método está basado en las diferencias en el contenido total de nitrógeno de la leguminosa, así como de la planta de referencia que crece en el mismo suelo (Giller y Wilson, 1991). La substracción de nitrógeno en la planta de referencia de aquél en la planta fijadora dará un estimado del N_2 fijado. Se utilizó la fórmula propuesta por Martín *et al.*, (2007) para cuantificar la fijación biológica del nitrógeno (% de nitrógeno obtenido o derivado de la fijación de N_2) en las especies de *Lupinus* estudiadas:

$$\% \text{FBN} = \frac{(\text{contenido N fix} - \text{contenido N semilla fix}) - (\text{contenido N control} - \text{contenido N semilla control})}{(\text{contenido N fix} - \text{contenido N semilla fix})} \times 100$$

donde:

fix = planta fijadora (especies de *Lupinus*)

control = planta no fijadora (cebada)

Posteriormente el nitrógeno fijado se calculó de la siguiente manera:

(% de N obtenido de la FBN x contenido de N total en la materia seca) /100

Debido a que el ciclo de cultivo fue más prolongado en las especies del género *Lupinus* que en la planta de referencia solo fue posible realizar la estimación de la FBN en cuatro muestreos para las especies introducidas domesticadas y en tres muestreos para las especies silvestres.

5.6 Análisis estadísticos

Para cada grupo de especies (domesticadas y silvestres) las variables: contenido de materia seca (kg ha^{-1}), contenido de nitrógeno (%), nitrógeno total en la materia seca (kg ha^{-1}), porcentaje de nitrógeno obtenido o derivado de la FBN y cantidad de nitrógeno fijado (Kg ha^{-1}) fueron sometidos a un análisis de varianza multifactorial y a una comparación de promedios mediante la prueba Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurión XV.II. Así mismo se realizó un análisis de correlación y regresión para conocer la relación existente entre las variables estudiadas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que las especies silvestres se caracterizaron por presentar un crecimiento lento en comparación con las especies domesticadas, se consideró conveniente realizar la interpretación y discusión de los resultados por separado para las especies domesticadas y para especies silvestres.

6.1 Especies domesticadas de *Lupinus*

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre especies ($P \leq 0.05$) por efecto de la fecha de muestreo y la especie así como para la interacción (Especie x muestreo) para las variables materia seca (kg ha^{-1}), contenido de nitrógeno (%) y nitrógeno total (Kg ha^{-1}). En el cuadro 3 se presentan los valores de significancia, así como los coeficientes de variación.

Cuadro 3. Análisis de varianza que muestra la significancia de las variables estudiadas en las especies domesticadas.

Factor	Gl	MS kg ha^{-1}	% N	N total kg ha^{-1}
A:especie	2	895.77**	565.11**	1134.24**
B:muestreo	5	1301.39**	670.78**	916.65**
Interacción AB	10	125.52**	125.33**	94.61**
CV%		6.45	2.34	6.34

Los valores en este cuadro representan la F calculada en cada análisis de varianza. Gl: grados de libertad, MS: materia seca, % N: porcentaje de nitrógeno, N total: nitrógeno total acumulado en materia seca, CV: coeficiente de variación. ** Diferencia altamente significativa ($P \leq 0.05$).

6.1.1 Materia seca en especies domesticadas

La acumulación de materia seca en función de los días después de la siembra (dds) para las tres especies en estudio se muestra en la figura 7, también se puede observar las regresiones con los modelos que normalmente expresan la relación matemática entre la edad de la planta y la acumulación de materia seca. Lo anterior brinda información más precisa de la eficiencia

con que las plantas acumulan y traslocan fotosintetizados, que la sola medición de características agronómicas como número de tallos, altura, etc. (Pérez *et al.*, 2004).

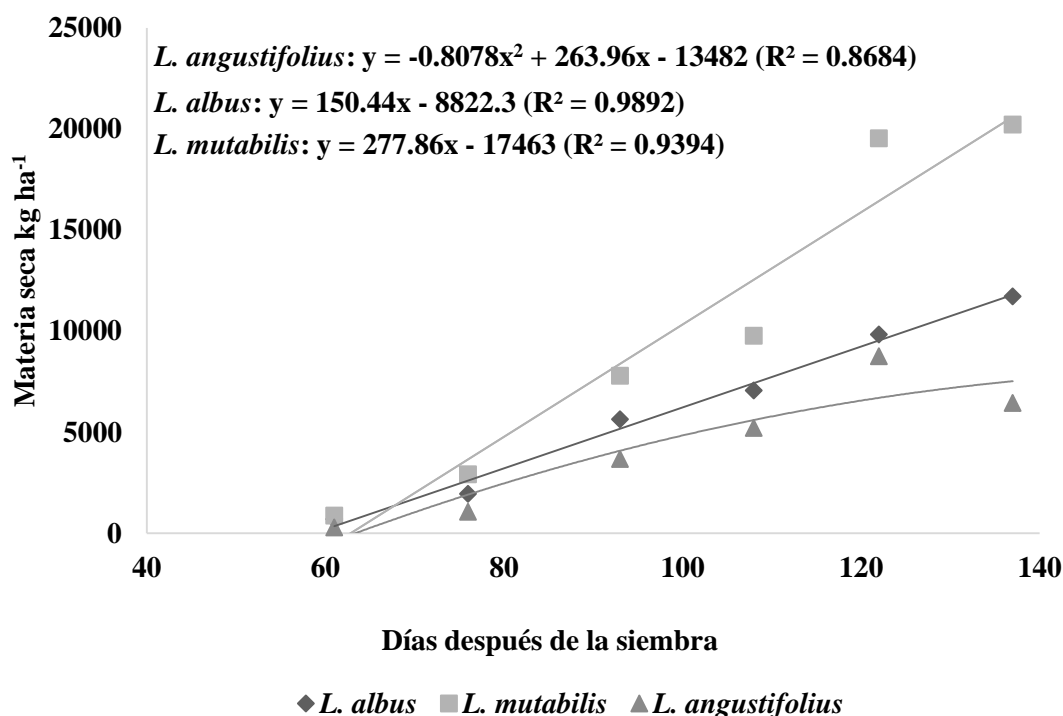


Figura 7. Dinámica de acumulación de materia seca en las especies de *Lupinus* domesticadas cosechadas a diferentes días después de la siembra y modelos que explican su comportamiento.

Desde el primer muestreo (61 dds) el contenido acumulado de materia seca se incrementó gradualmente hasta el último muestreo realizado (137 dds) en las especies pero con una menor magnitud en *L. angustifolius*. Después de los 76 días se observó una diferencia significativa en la acumulación de materia seca entre las especies estudiadas, sin embargo, *L. mutabilis* resultó ser la especie con mayor acumulación de materia seca en cada uno de los muestreos realizados. En el último muestreo realizado (137 dds) *L. mutabilis* registró la mayor acumulación de materia seca (20 223 kg ha⁻¹), seguido de *L. albus* con 11 710 kg ha⁻¹. *L. angustifolius* resultó ser la especie que acumuló menor contenido de materia seca, en el muestreo número cinco (122 dds) registró 8 760 kg ha⁻¹, sin embargo para el sexto muestreo se registró un ligero decremento o pérdida de materia seca (6 445 kg ha⁻¹), debido a que fue

la primera especie en alcanzar la madurez y por lo tanto la primera en iniciar la senescencia y abscisión de hojas sin actividad fotosintética. La mayor acumulación de materia seca en *L. mutabilis* que en el resto de las especies podría estar relacionada a una adecuada interacción entre el genotipo y el ambiente, ya que desde los primeros muestreos aunque no se midió el área foliar desplegó hojas para las funciones fotosintéticas con mayor crecimiento en términos de peso seco (Figura 8).

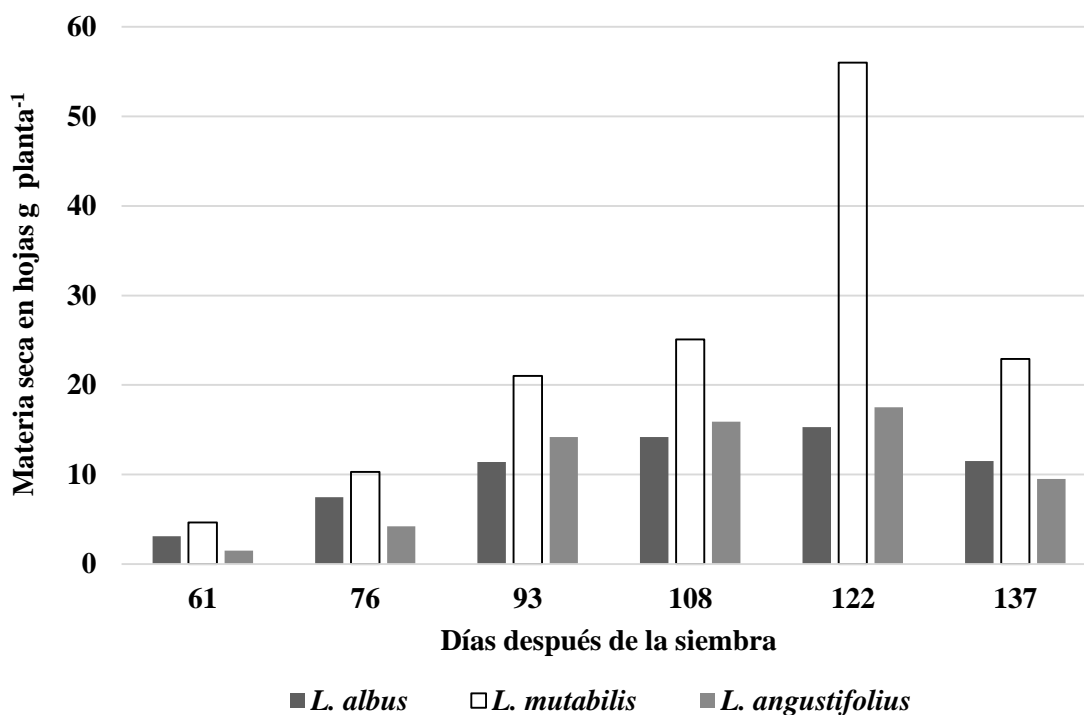


Figura 8. Peso de materia seca de hojas en especies domesticadas.

Un comportamiento inverso al encontrado en este estudio fue reportado en Chile con *L. mutabilis* y *L. albus* por Romero *et al.*, (1993) quienes registraron mayor acumulación de materia seca en *L. albus* que en *L. mutabilis* a los 137 días después de la siembra (9 880 vs 17 445 kg ha⁻¹). Cabe señalar que en Chile se realizaron cortes hasta los 152 días indicando esto que los genotipos utilizados en este estudio son de menor precocidad que los utilizados en Chile. En otro estudio, Burt y Hill (1990) reportaron rendimiento de materia seca en *L. angustifolius* al inicio de la floración de 9 500 kg ha⁻¹, los cuales son ligeramente superiores a los encontrados en este estudio con la misma especie y en la misma etapa de desarrollo.

Nambiar y Nethercott (1987) realizaron un estudio en el Sur de Australia en donde intercalaron *L. angustifolius* inoculado junto con *Pinus radiata* en un suelo de tipo Podsol durante seis años (1978-1983), y obtuvieron un producción promedio de materia seca que va desde 1 540 a 10 900 kg ha⁻¹, en etapa vegetativa y en maduración de la semilla, rendimientos que son ligeramente superiores a los encontrados en este estudio (8 760 kg ha⁻¹) a los 122 dds (etapa de fructificación). Por otro lado, Barrientos *et al.*, (2001) en *L. albus* cv. Lolita y *L. angustifolius* cv. Gungurru previamente inoculados reportaron un rendimiento de materia seca de aproximadamente 2 000 kg ha⁻¹ en ambas especies a los 45 dds, 6 000 kg ha⁻¹ a los 80 dds, mientras que a los 160 dds, el rendimiento de la materia seca estuvo por encima de los 7 000 kg ha⁻¹, estos valores son inferiores a los encontrados en esta investigación en las mismas especies en un periodo de 122 dds. Lora y Azero (2005) en Morochata Bolivia mostraron en un ensayo realizado en condiciones de campo con *L. mutabilis*, rendimientos de 5 236 y 6 314 kg ha⁻¹ en etapa de floración (126 dds), los cuales son inferiores a los rendimientos obtenidos en este estudio a los 122 dds con un valor de 19 532 kg ha⁻¹.

Vanek (2009) comparó la materia seca producida por *L. mutabilis* y otras leguminosas (haba, chicharo, alfalfa, trébol, entre otras) en época de floración para su posterior incorporación como abono verde en cuatro zonas altitudinales: 2600, 3100, 3650 y 3950 m., obteniendo rendimientos de materia seca de 2 007, 2 940, 9 489, 1 371 kg ha⁻¹ respectivamente, valores superiores a los presentados por las demás leguminosas. En varios estudios realizados en su gran mayoría en Australia, se reportó que los rendimientos de biomasa aérea de *L. angustifolius* puede variar desde 2 000 kg ha⁻¹ a más de 14 000 kg ha⁻¹ (Smith *et al.*, 1987; Evans *et al.*, 1989; Unkovich *et al.*, 1994). La variaciones que se observan en el contenido de materia seca registrada en este estudio y los valores encontrados con las mismas especies en otros países se pueden deber a diferentes factores como las condiciones ambientales (principalmente temperatura y precipitación), factores edáficos (pH y fertilidad del suelo, salinidad, disponibilidad de nutrientes etc.), así como factores relacionados con el manejo del cultivo (fechas de siembra, densidad de siembra, riego, fertilización, inoculación, control de plagas y enfermedades etc.), el genotipo y la duración del ciclo del cultivo (Vanek, 2009). Por otro lado, los distintos valores encontrados en la literatura en cuanto a producción de materia seca entre y dentro de especies del género *Lupinus* podría estar relacionado por un

lado a la variabilidad interespecífica e intraespecífica de las especies, así mismo, diferencias en el patrón de acumulación de biomasa y repartición de asimilados entre la parte aérea y la raíz podrían determinar un mayor o menor potencial adaptativo a determinadas condiciones de manejo. Finalmente nuestros resultados indican que el crecimiento de *L. mutabilis* en términos de acumulación de materia seca mostró una adecuada interacción con las condiciones ambientales durante las cuales se desarrolló el cultivo, señalándola como una especie potencialmente útil como abono verde.

6.1.2 Contenido de nitrógeno en especies domesticadas

En la figura 9 se muestra la concentración promedio de nitrógeno (%) en la materia seca de la parte aérea con relación a los muestreos realizados y especies en estudio. El menor porcentaje de nitrógeno promedio de las tres especies independientemente de los muestreos realizados se registró en *L. angustifolius* (2.04 %), con una variación en función de la fecha de muestreo de 1.41 a 3.5 %. El contenido de nitrógeno en *L. albus* y *L. mutabilis* como promedio de seis muestreos fue de 2.60 y 2.59 respectivamente sin diferencias significativas entre estas especies ($P \geq 0.05$) con un valor máximo en *L. albus* de 3.01 % a los 76 dds, y 3.10 % a los 93 dds en *L. mutabilis*. Lo anterior tiene relación con lo señalado por Vellasamy *et al.*, (1999) quienes reportaron que la concentración de nitrógeno en la parte aérea de las leguminosas por lo general es alta y en *L. angustifolius* se han registrado valores de hasta 4.68 % de nitrógeno en la parte aérea. Por otro lado en las semillas de las diferentes especies cultivadas se han reportado valores de 5 % hasta 6.5 % (Vellasamy *et al.*, 1999; Joernsgaard *et al.*, 2000).

En *L. albus* y *L. agustifolius* se observó un ligero incremento de nitrógeno del primero al segundo muestreo (61 a 76 dds), mientras que los siguientes muestreos se caracterizaron por un decremento en el porcentaje de nitrógeno, la misma tendencia ocurrió en *L. mutabilis*, la diferencia es que el decremento ocurrió después de los 93 dds, lo anterior podría estar relacionado con un crecimiento lento de *L. mutabilis* en las primeras etapas del desarrollo. Romero *et al.*, (1993) en Chile también observaron una tendencia a disminuir el contenido de nitrógeno en *L. mutabilis* y *L. albus* conforme se incrementó la edad de la planta (desde

95 hasta 152 dds), con un valor máximo de nitrógeno de 3.6 y 4.1 % respectivamente a los 117 dds, los cuales son ligeramente superiores a los registrados en este estudio en las mismas especies. Esta superioridad se debió probablemente a que en Chile las semillas de las especies de lupinos (*L. albus* y *L. mutabilis*) se inocularon y se fertilizaron al momento de la siembra, mientras que en este estudio no se inocularon las semillas ni se fertilizó después de la siembra. Otras investigaciones en especies no leguminosas también han reportado que el contenido de nitrógeno disminuye con la edad de la planta (Pérez *et al.*, 2004).

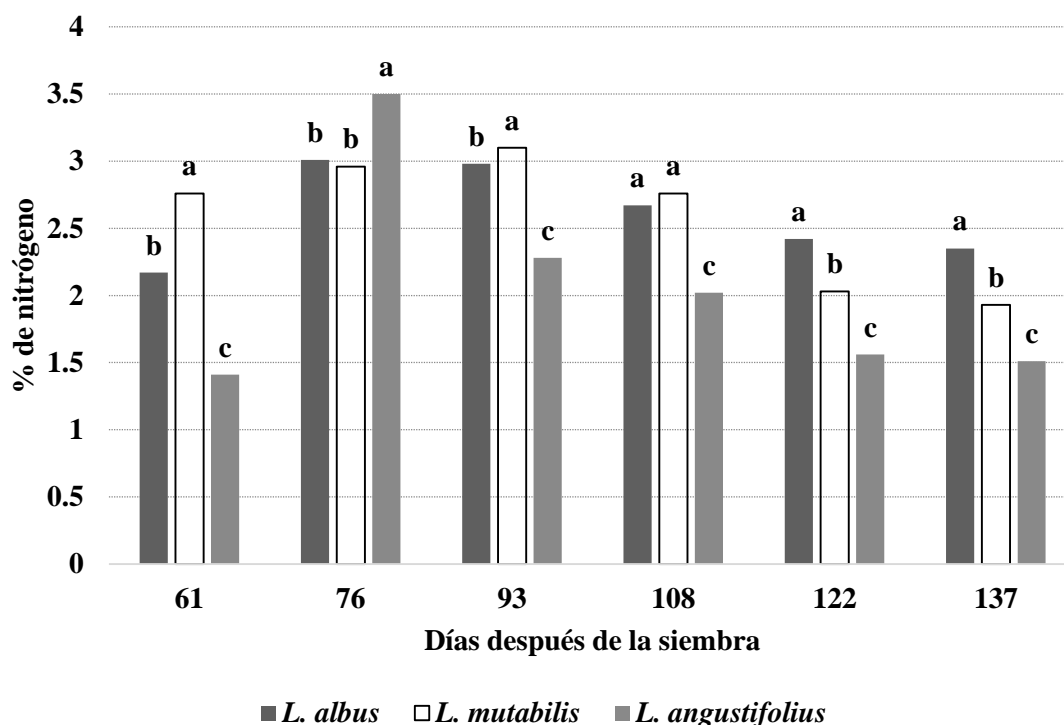


Figura 9. Porcentaje de nitrógeno en tres especies domesticadas de *Lupinus* en diferentes fechas de muestreo.

Vellasamy *et al.*, (1999) realizaron un estudio en Nueva Zelanda con tres especies de leguminosas en donde encontró a los 190 dds que *L. angustifolius* estuvo mejor representada en comparación con *Lens culinaris* y *Pisum sativum* adquiriendo 4.68, 3.47 y 3.10 % de nitrógeno respectivamente, siendo un porcentaje de nitrógeno también superior al que se registró en este estudio, ya que el valor máximo fue de 3.5 % a los 76 dds. Considerando que en este estudio no se inocularon las semillas y que posteriormente no se realizaron prácticas de fertilización al cultivo, el contenido de nitrógeno acumulado en la materia seca

independientemente de la fecha de muestreo es ligeramente inferior al que se ha reportado en otras especies cuando las semillas se inoculan y posteriormente se fertilizan. Así por ejemplo, en un estudio realizado por Schulze *et al.*, (2006) con *L. albus* a los 21 y 37 días después de ser inoculado (ddi) con *Bradyrhizobium lupini* y con fertilización a base de fósforo (+P) y sin fósforo (-P), reportaron a los 21 ddi 3.91 % de nitrógeno en +P y 3.98% en -P, mientras que a los 37 ddi se registraron valores de 3.22 % +P y 2.16 % -P. Sucojayo *et al.*, (1998) compararon *L. mutabilis* y *L. albus* a los 35 dds e inoculadas con cepas resistentes de *Bradyrhizobium lupini* de tres diferentes lugares de procedencia, obteniendo resultados promedio de nitrógeno total de 4.10, 3.87 y 3.68 % en *L. mutabilis* mientras que el testigo sin inocular obtuvo 2.68 % de nitrógeno. En *L. albus* los promedios presentaron resultados de 4.30, 4.21 y 3.99 % de nitrógeno, el testigo tuvo 2.90 % de nitrógeno, estos resultados están por encima de los encontrados en esta investigación, sin embargo, se demuestra que la inoculación con cepas altamente efectivas son las responsables de favorecer una mayor concentración de nitrógeno en las plantas. Aunque los valores de nitrógeno encontrados en este estudio son ligeramente inferiores a los encontrados por otros investigadores con las mismas especies, es posible señalar que las condiciones bajo las cuales crecieron y se desarrollaron las especies no fueron limitantes para la absorción del nitrógeno y que esto puede ser mejorado probablemente mediante la implementación de prácticas de inoculación y fertilización entre otras.

En el cuadro 4 se muestran los contenidos de nitrógeno en g planta⁻¹ y kg ha⁻¹ tanto en las especies en estudio como en la planta de referencia (cebada). En *L. albus* se observó una tendencia a incrementarse el contenido de nitrógeno total en la materia seca conforme se incrementó la edad de la planta (Desde los 61 hasta los 137 dds). En *L. mutabilis* y *L. angustifolius* esta tendencia solo se mantuvo hasta los 122 dds ya que en el siguiente muestreo (137 dds) se observó una ligera disminución en el contenido de nitrógeno total, sin embargo, este decremento de nitrógeno en la biomasa fue de mayor magnitud y significativo en *L. angustifolius*, probablemente debido a una translocación de nitrógeno de hojas y tallos en senescencia a la semilla. Estas variaciones están relacionadas con el porcentaje de nitrógeno y la producción de materia seca en las diferentes etapas de desarrollo de las especies en estudio. De acuerdo a lo anterior, Gataulina (1990) comenta que la tasa de acumulación de

nitrógeno no es igual durante todas las etapas de crecimiento, produciéndose la mayor acumulación durante la floración, formación y crecimiento de vaina, para disminuir durante el llenado de vaina, lo cual solo se pudo evidenciar en *L. angustifolius*. En *L. albus* no disminuyó el nitrógeno total en la materia seca durante la época de llenado de vainas debido probablemente a que en el último muestreo aún se encontraban hojas fotosintéticamente activas, lo cual fue similar a los resultados reportados por Merbach (1998). Por otro lado, Barrientos *et al.*, (2001) en tres fechas de muestreo (45, 80 y 160 dds) reportó valores de absorción de nitrógeno en *L. angustifolius* cv. Gungurru de 50, 217 y 151 kg ha⁻¹, mientras que *L. albus* cv. Lolita obtuvo una acumulación de 57, 296 y 214 kg ha⁻¹. Aunque los valores señalados anteriormente son diferentes a los obtenidos en esta investigación con las mismas especies, se observó una tendencia similar en relación a disminuir el contenido de nitrógeno total conforme se incrementa la edad de la planta.

Cuadro 4. Contenido de nitrógeno total en las especies domesticadas con respecto a los días después de la siembra.

Dds	cebada		<i>L. albus</i>		<i>L. mutabilis</i>		<i>L. angustifolius</i>	
	g p ⁻¹	kg ha ⁻¹	g p ⁻¹	kg ha ⁻¹	g p ⁻¹	kg ha ⁻¹	g p ⁻¹	kg ha ⁻¹
76	0.052	15.8	0.49	58.7 e	0.71	86.3 d	0.30	37.0 d
93	0.056	16.8	1.39	167.7 d	2.01	241.9 c	0.69	83.7 c
108	0.117	35.2	1.57	188.4 c	2.25	270.0 b	0.88	105.6 b
122	0.111	33.3	1.98	238.1 b	3.30	396.5 a	1.14	136.7 a
137	**	**	2.29	274.7 a	3.25	390.9 a	0.81	97.1 b

dds: Días después de la siembra. g p⁻¹: gramos por planta. ** No se realizó la determinación (plantas en senescencia). 120,000 plantas ha⁻¹ en las especies del género *Lupinus* y 300 000 plantas ha⁻¹ de cebada. Promedios con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P≤0.05).

Vanek (2009) evaluó *L. mutabilis* y *Vicia dasycarpa* en época de floración con bajos y altos contenidos de fósforo y arcillas en el suelo y sin fertilización, encontrando mayor absorción de nitrógeno en la biomasa de *L. mutabilis* con 108 y 137 kg ha⁻¹ respectivamente, mientras que *V. dasycarpa* logró obtener resultados de 46 y 50 kg ha⁻¹ respectivamente. Mientras que Casa (2014) observó que al inocular con ocho diferentes cepas de *Rhizobium* en *L. mutabilis* los contenidos de nitrógeno total en la biomasa fluctuaron de 0.50 a 0.66 g por planta⁻¹ en

etapa de floración, los cuales son ligeramente inferiores a los que se encontraron en este estudio con la misma especie y etapa de crecimiento (0.88 g planta⁻¹).

Smith *et al.*, (1987) en un ensayo realizado con *L. angustifolius* en Washington, USA, en dos sitios y durante dos años obtuvo rangos que oscilan entre 48 a 121 kg ha⁻¹ de nitrógeno total en la materia seca, sin embargo, Unkovich *et al.*, (1994) en Australia con la misma especie reportan valores superiores de hasta 372 kg ha⁻¹. En Alemania con *L. albus* se reportó un contenido de nitrógeno que fluctuó de 50 a 400 kg ha⁻¹ (Hartmann y Aldag, 1989). En Australia, Armstrong *et al.*, (1997) obtuvieron un rango entre 370 a 472 kg ha⁻¹. Aunque los valores de nitrógeno total en la biomasa de los genotipos de las especies en estudio pueden ser generalmente bajos en los primeros muestreos se encuentran dentro de los rangos que se han reportado en la literatura. Esta superioridad encontrada por otros investigadores podría estar relacionada a mejores condiciones de cultivo como inoculación de semilla y fertilización.

6.1.3 Fijación de nitrógeno atmosférico en especies domesticadas

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos por efecto de la fecha de muestreo, especie y por la interacción muestreo x especie para las variables relacionadas con la FBN (% de nitrógeno derivado de la fijación y cantidad de nitrógeno fijado) (cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza que muestra la significancia de las variables con respecto a la FBN en especies domesticadas.

Fuente	Gl	% FBN	N fijado Kg ha⁻¹
A:especie	2	566.46**	648.13**
B:muestreo	3	263.67**	421.90**
Interacción AB	6	10.08**	49.97**
CV%		1.73	7.01

Los valores en este cuadro representan la *F* calculada en cada análisis de varianza. Gl: grados de libertad, % FBN: porcentaje de nitrógeno obtenido de la fijación, N fijado: nitrógeno obtenido de la fijación, CV: coeficiente de variación. ** Diferencia altamente significativa (P≤0.05).

En la figura 10 se muestra la eficiencia en la fijación de nitrógeno atmosférico por las especies en estudio (% de Nitrógeno obtenido o derivado de la atmosfera). Desde el primer muestreo realizado se observó una adecuada eficiencia de *L. mutabilis* y *L. albus* en la FBN, observándose poca variación durante el crecimiento de las plantas (desde los 76 a los 122 dds). En *L. mutabilis* la variación del porcentaje de nitrógeno derivado de la atmosfera fue del 81 a 93 %, en *L. albus* fue del 73 al 89%, mientras que en *L. angustifolius* la variación fue de 42 a 79 %. Lo anterior pone de manifiesto que *L. angustifolius* es la especie menos eficiente para fijar nitrógeno atmosférico en las condiciones en las que se desarrolló esta investigación.

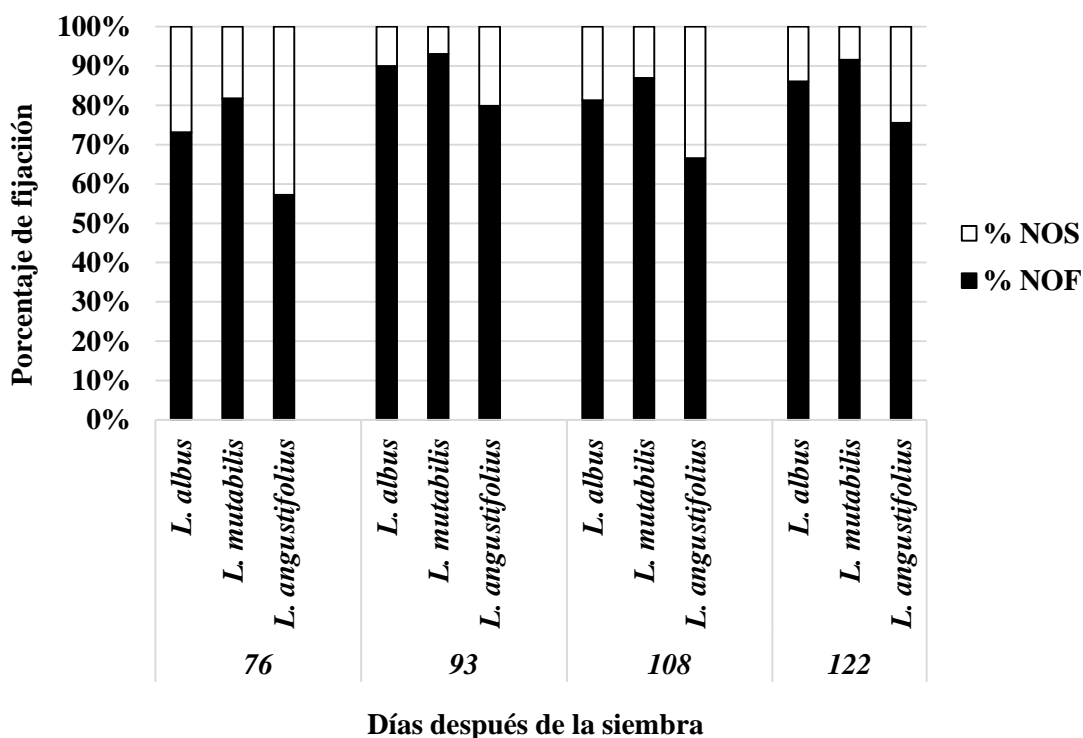


Figura 10. Eficiencia de la FBN en las especies domesticadas. NOF= nitrógeno obtenido de la fijación. NOS= Nitrógeno obtenido del suelo.

Valores similares a los encontrados en este estudio y en ocasiones inferiores han sido reportados en otros países con las mismas especies de este estudio, así por ejemplo Smith *et al.*, (1987) en un estudio realizado con *L. angustifolius* en Washington, USA, reportaron

eficiencias de fijación de 40 a 50 %, mientras que Unkovich *et al.*, (1994) reportan en Australia del 78 a 91 % de eficacia con *L. angustifolius*. Otros reportes con esta misma especie mostraron intervalos que fluctuaron entre 9 y 97 % de nitrógeno derivado de la fijación (Herridge y Doyle, 1988; Evans *et al.*, 1989; Pálmason *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992; Haynes *et al.*, 1993; Armstrong *et al.*, 1997).

Barrientos *et al.*, (2001) en tres fechas de muestreo (45, 80 y 160 dds) reportaron valores de eficiencia de la fijación de nitrógeno en *L. angustifolius* cv. Gungurru de 49, 90 y 80 % respectivamente, mientras que *L. albus* cv. Lolita obtuvo una acumulación de 69, 90 y 80 % respectivamente. Hartmann y Aldag (1989) en Alemania con *L. albus* reportaron valores de 44 a 92 %, sin embargo, en Australia Armstrong *et al.*, (1997) encontraron un rango entre 68 a 85 % de proporción de nitrógeno fijado. Aunque se han registrado valores con respecto a la cantidad de nitrógeno que puede fijar *L. mutabilis*, hay pocas investigaciones dirigidas a estimar el porcentaje nitrógeno que se obtiene mediante fijación. Vanek (2009) estimó en *L. mutabilis* mediante el método de ^{15}N un porcentaje de nitrógeno fijado de alrededor del 70 % del total de nitrógeno absorbido, el cual es un porcentaje inferior al obtenido en este estudio con la misma especie en todos los muestreos realizados. En este sentido puede considerarse que *L. mutabilis* en las condiciones edafoclimáticas de Zapopan puede obtener altas cantidades de nitrógeno para su crecimiento y desarrollo por medio de la fijación, lo cual se reflejó en la mayor producción de materia seca por planta y alto contenido de nitrógeno en la biomasa. Por otro lado, los bajos porcentajes de nitrógeno obtenidos de la fijación por *L. angustifolius* en este estudio así como la pobre acumulación de materia seca y los bajos valores de nitrógeno por planta ponen de manifiesto su menor eficiencia en la FBN bajo las condiciones en las que se desarrolló esta investigación.

En la figura 11 se muestran las cantidades de nitrógeno fijado por la especies en estudio con respecto a la edad de las plantas (muestreos), el cual es equivalente a los porcentajes de FBN mostrados anteriormente. La cantidad de nitrógeno fijado se incrementó en todas las especies conforme se prolongó la edad de la planta desde de los 76 a los 122 dds. En *L. mutabilis* se incrementó de 70.5 hasta 363.2 kg ha⁻¹, en *L. albus* de 42.9 a 204.8 kg ha⁻¹, mientras que *L. angustifolius* el incremento fue de 22 a 103 kg ha⁻¹. Los menores valores de nitrógeno fijado

en *L. angustifolius* y los más altos en *L. mutabilis* corresponden o son equivalentes a los porcentajes de FBN registrados anteriormente en estas especies.

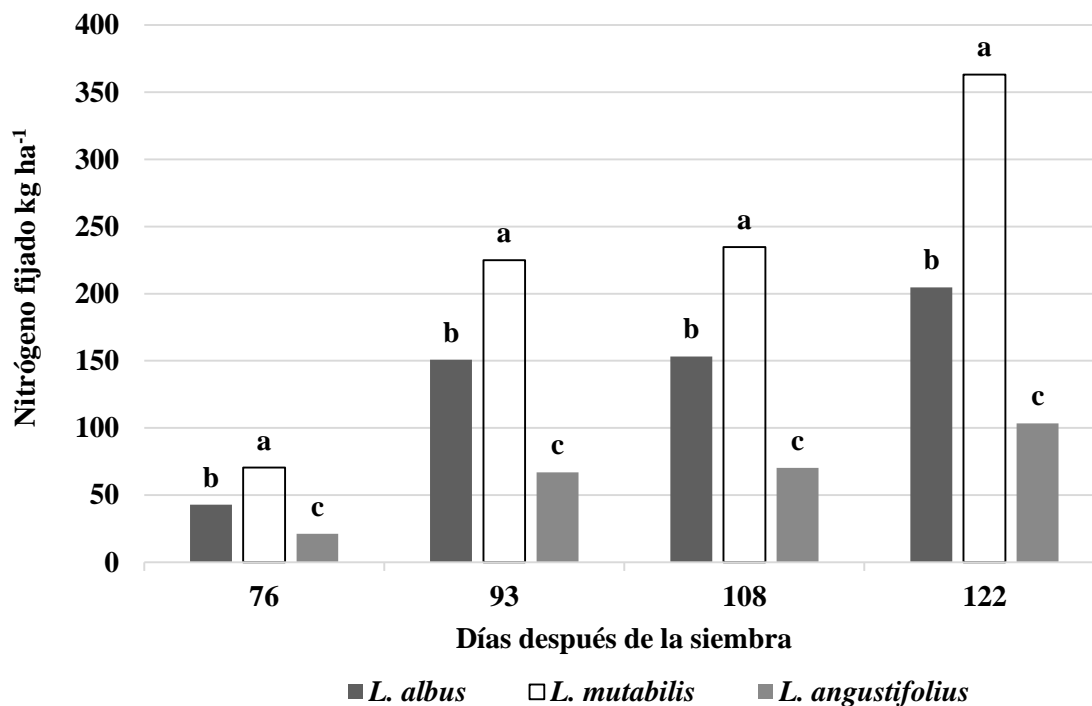


Figura 11. Cantidad de nitrógeno fijado por las especies domesticadas en estudio.

Resultados similares y en algunos casos muy variables se han registrado en otras partes de Europa y América con las mismas especies utilizadas en este estudio, pero generalmente sin señalar la edad o la etapa fenológica en la que se realizan los muestreos, así por ejemplo, Howieson *et al.*, (1998) reportaron promedios de fijación de nitrógeno en *L. angustifolius* y *L. albus* de aproximadamente 200 y 330 kg ha⁻¹ respectivamente. Por su parte, Pálmason *et al.*, (1992) con *L. angustifolius* cultivado en un suelo Andosol de Islandia y a temperaturas inferiores a los 10 °C reportaron valores de fijación de nitrógeno de 195 Kg ha⁻¹ a los 117 dds los cuales son muy superiores a los que se encontraron en este estudio con la misma especie a los 122 dds (101.5 Kg ha⁻¹). Unkovich *et al.*, (1994) en Australia también reportaron en *L. angustifolius* valores superiores a los de este estudio (de 181 a 327 kg ha⁻¹). Sin embargo, Smith *et al.*, (1987) en un ensayo realizado con *L. angustifolius* en Washington, USA, en dos sitios y durante dos años reportó valores de nitrógeno fijado que oscilaron entre 19 a 60 kg

ha⁻¹, los cuales son similares a los obtenidos en este estudio con la misma especie de los 76 a los 108 dds (de 26 a 70.3 kg N ha⁻¹).

En investigaciones realizadas en Alemania con *L. albus* se reportó un contenido de nitrógeno fijado que fluctuó de 190 a 360 kg ha⁻¹ (Hartmann y Aldag, 1989). Mientras tanto, en Australia, Armstrong *et al.*, (1997) con la misma especie, el nitrógeno fijado fluctuó de 268 a 400 kg ha⁻¹. Los valores más bajos reportados por estos autores son más o menos similares a los que se encontraron en este estudio en la última etapa de muestreo (202 kg ha⁻¹). En otro estudio realizado en Chile, Barrientos *et al.*, (2001) en tres fechas de muestreo (45, 80 y 160 dds) registró valores de fijación de nitrógeno en *L. angustifolius* cv. Gungurru de 25, 197 y 127 kg ha⁻¹, mientras que en *L. albus* cv. Lolita fijó 39, 282 y 186 kg ha⁻¹, los cuales no son muy superiores a los que se encontraron en este estudio, con excepción del muestreo que realizaron a los 80 días. Abarca (1982) en *L. mutabilis* a los 180 días después de la emergencia y previamente inoculado, estimó cantidades de nitrógeno atmosférico fijado simbióticamente entre 163 y 220 kg ha⁻¹ con diferentes métodos de estimación. Estos valores son inferiores a los encontrados en esta investigación a los 108 y 122 dds (234 y 361 kg ha⁻¹). Por otro lado, Bunch (1994) comentó que *L. mutabilis* sembrada tradicionalmente en los Andes como un grano de subsistencia, es capaz de fijar hasta 400 kg ha⁻¹ de nitrógeno, valor muy similar al que se encontró en este estudio a los 122 dds (363.2 kg ha⁻¹). Vanek (2009) reportó valores de fijación muy bajos en *L. mutabilis* (de 35 a 37 kg ha⁻¹) en suelos con alto contenido de nitrógeno, indicando que la mayor parte del nitrógeno en la planta provenía del suelo. Lo anterior pone de manifiesto que cuando hay suficiente nitrógeno orgánico en el suelo las plantas prefieren tomarlo del sustrato que de la atmósfera. Al respecto algunos autores como Becana y Bedmar (1991) señalan que para que ocurra eficientemente la fijación biológica es indispensable que el nitrógeno en suelo se encuentre en bajas concentraciones (<0.1 %). En este estudio *L. mutabilis* se caracterizó por ser la especie que fijó mayor cantidad de nitrógeno y la mayor cantidad de nitrógeno fijado se presentó entre los 93 y los 122 dds (de 225.1 a 363.2 kg ha⁻¹), lo anterior tiene relación con la mayor cantidad de materia seca que acumuló esta especie y el porcentaje de nitrógeno en la planta, tal y como se ha observado en otras especies (Barrientos *et al.*, 2001). De lo anterior se deduce nuevamente que bajo las condiciones de este estudio *L. mutabilis* es la especie con mayor potencial para incrementar

los contenidos de nitrógeno en el suelo al ser utilizada como abono verde en los sistemas agrícolas de Zapopan Jalisco.

6.1.4 Análisis de correlación y regresión en especies domesticadas

En el cuadro 6 se presenta el análisis de correlación que muestra el grado o nivel de asociación entre las variables estudiadas. Tal y como se ha reportado en otras investigaciones la producción de materia seca demostró estar positivamente relacionada con la acumulación de nitrógeno en la biomasa ($r^2= 0.96$) y con el contenido de nitrógeno derivado de la FBN ($r^2= 0.95$), también estas dos últimas variables presentaron una alta correlación entre ellas ($r^2= 0.99$), esto tiene relación a lo reportado por Evans *et al.*, (1989) y Casa (2014), quienes comentan que la acumulación de nitrógeno en la biomasa de lupinos es típicamente positiva la correlación con la producción de materia seca.

Cuadro 6. Análisis de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, contenido de nitrógeno y variables relacionadas con la fijación de nitrógeno en plantas domesticadas del género *Lupinus*.

Variables	MS kg ha ⁻¹	N MS kg ha ⁻¹	NF kg ha ⁻¹	% FBN	% N total
MS kg ha ⁻¹		0.9614	0.9578	0.5887	-0.2691
N MS kg ha ⁻¹			0.9969	0.6671	-0.0662
NF kg ha ⁻¹				0.6573	-0.0494
% NOF					0.4490
% N total					

MS: materia seca, N MS: nitrógeno total en la materia seca, NF: nitrógeno fijado, % FBN: porcentaje de nitrógeno obtenido de la fijación y % N: porcentaje de nitrógeno en la materia seca.

Bajo las condiciones de esta investigación y en función del número de muestreos realizados el análisis de regresión muestra una relación lineal entre la acumulación de materia seca y el nitrógeno total por unidad de superficie ($R^2 = 0.95$), así como con la cantidad de nitrógeno fijado ($R^2 = 0.97$) (figura 12). La relación lineal entre acumulación de materia seca y nitrógeno fijado también fue registrada en Chile con el trebol *Trifolium repens* al estimar la

FBN mediante el método de la diferencia (Radic y McAdam, 2012) Este comportamiento también fue reportado por León *et al.*, (2001) en Chile al evaluar el efecto de la inoculación sobre el crecimiento de *L. albus* y *L. angustifolius*.

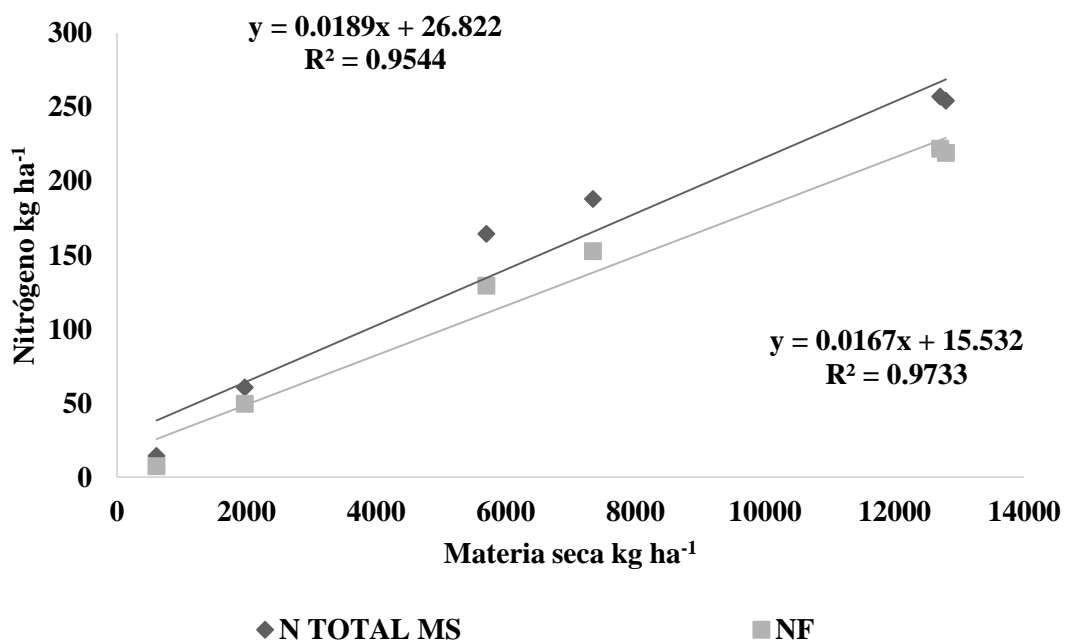


Figura 12. Relación de la materia seca con el nitrógeno total acumulado en la materia seca (N TOTAL MS) y materia seca con la cantidad de nitrógeno fijado (NF) en especies domesticadas.

6.2 Especies silvestres de *Lupinus*

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) por efecto de la fecha de muestreo y la especie así como para la interacción (especie x muestreo) para las variables materia seca (kg ha^{-1}), contenido de nitrógeno (%) y nitrógeno total (Kg ha^{-1}). En el cuadro 7 se presentan los valores de significancia, así como los coeficientes de variación.

Cuadro 7. Análisis de varianza que muestra la significancia de variables estudiadas en las especies silvestres.

Fuente	Gl	MS kg ha⁻¹	% N	N total kg ha⁻¹
A:especie	2	1275.52**	139.99**	1756.56**
B:muestreo	5	1142.92**	576.53**	629.34**
Interacción AB	10	120.07**	129.96**	113.14**
CV%		6.20	3.30	6.17

Los valores en este cuadro representan la *F* calculada en cada análisis de varianza. Gl: grados de libertad, MS: materia seca, % N: porcentaje de nitrógeno, N total: nitrógeno total acumulado en materia seca, CV: coeficiente de variación. ** Diferencia altamente significativa ($P \leq 0.05$).

6.2.1 Materia seca en especies silvestres

En la figura 13 se muestra la acumulación de materia seca de las tres especies silvestres con respecto a los días después de la siembra (dds), así como el modelo matemático que describe el crecimiento. Los valores de acumulación de materia seca con respecto a los muestreos realizados en *L. exaltatus* y *L. mexicanus* se ajustaron a modelos de regresión lineal, mientras que los valores de materia seca en *L. rotundiflorus* se ajustaron a un modelo no lineal. Debido al lento crecimiento de las especies silvestres en las etapas iniciales del crecimiento y por consecuencia una pobre acumulación de materia seca durante los dos primeros meses el análisis cuantitativo de la biomasa inició a los 93 dds. Aunque en el primer muestreo (93 dds) todas las especies mostraron una escasa acumulación de materia seca, esto fue más evidente en *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus*, lo cual coincide con lo observado también en *L. elegans* por Aureoles y Lindig (2007) quienes reportaron que esta especie silvestre a los dos meses de edad presentó una altura promedio 10 cm y escasa producción de materia seca. En general, el lento crecimiento de las especies silvestres en estudio podría estar relacionado con lo reportado por Villar *et al.*, (2004), quienes señalaron que las especies tolerantes al estrés tienen bajas tasas inherentes de crecimiento (incluso en condiciones favorables) pero una capacidad elevada de soportar el estrés. Bajo las condiciones de este estudio, el estrés al que pudieron estar sometidas estas especies, puede estar relacionado con las bajas temperaturas que se presentaron durante las etapas iniciales del crecimiento (figura 6).

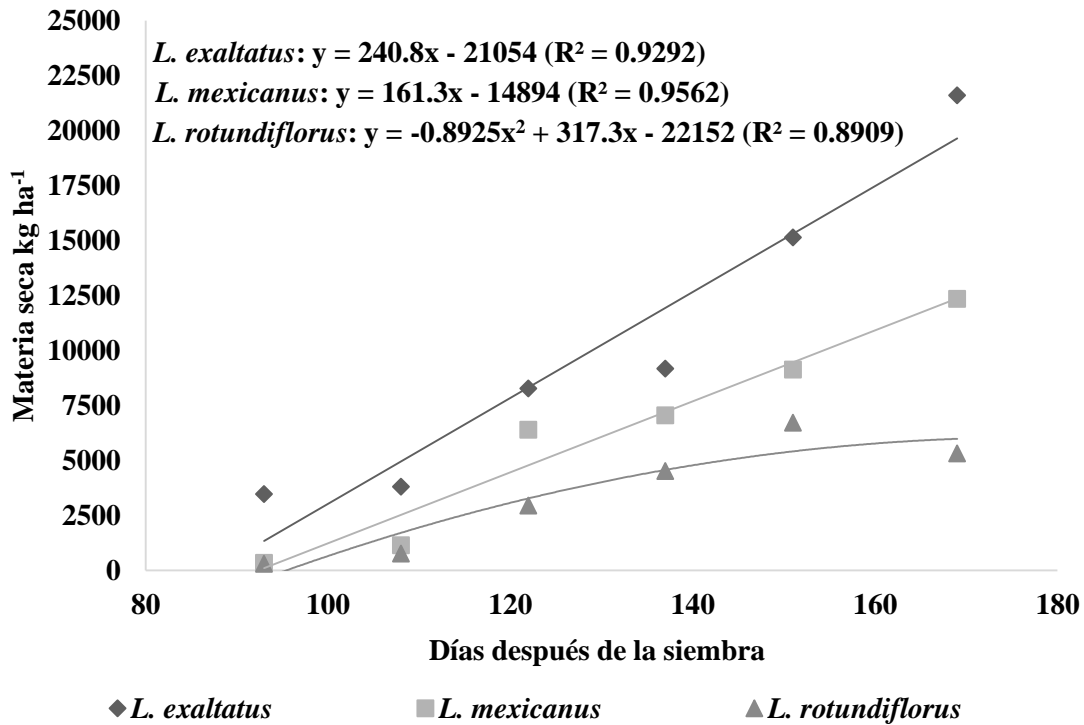


Figura 13. Dinámica de acumulación de materia seca en las especies de *Lupinus* silvestres cosechadas a diferentes días después de la siembra y modelos que explican su comportamiento.

Por otro lado, el lento crecimiento de las especies en estudio en las etapas iniciales del desarrollo apoyan la hipótesis de compromiso entre crecimiento y defensa, de forma que la energía que la planta dedica a sintetizar compuestos defensivos es a costa de un menor crecimiento y viceversa (Villar *et al.*, 2004). Al respecto es conocido que las especies silvestres del género *Lupinus* en las etapas tempranas del crecimiento sintetizan mayor contenido de compuestos químicos como alcaloides los cuales las protegen contra los herbívoros y agentes patógenos (Zamora *et al.*, 2009), lo que podría explicar también el lento crecimiento de las especies en estudio antes de la floración.

Desde los 93 a los 169 dds (último muestreo) se observó un incremento de la materia seca de las especies conforme aumentó la edad de las plantas con excepción de *L. rotundiflorus*, la cual en el último muestreo registró una pérdida de materia seca, debido a que las plantas se encontraban en un estado avanzado de madurez (hojas en senescencia y abscisión), lo que

indica una menor longitud de esta especie en su ciclo de crecimiento con respecto a las demás especies. Los valores de materia seca en el último muestreo fueron de 21 605, 12 352 y 5 320 kg ha⁻¹ para *L. exaltatus*, *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* respectivamente. La producción de materia seca en *L. exaltatus* es mayor en más de un 80 % con respecto a la que se registró en *L. rotundiflorus*. Estas diferencias entre las especies en términos de acumulación de materia seca tiene relación con lo reportado por Villar *et al.*, (2004), quienes señalaron que las distintas especies vegetales difieren notablemente en su capacidad de crecimiento cuando se cultivan en condiciones parecidas.

Por otro lado, también Villar *et al.*, (2004) señalan que una de las causas que determinan un mayor crecimiento en las diferentes especies es el área específica foliar (la relación entre área y peso foliar) que aunque en esta estudio no se midió esta variable si fue posible registrar una mayor cantidad o proporción de materia seca en las hojas de *L. exaltatus* que en las hojas de *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* en prácticamente todos los muestreos realizados (Figura 14), Por lo tanto, esto podría explicar el mejor crecimiento de *L. exaltatus* en términos de acumulación de materia seca. La mayor producción de materia seca en *L. exaltatus* también puede atribuirse a un follaje con un periodo de duración más prolongado, pues en el último muestreo realizado las hojas se encontraban aun fotosintéticamente activas.

Aunque anteriormente en México no se tenían estudios para cuantificar la materia seca en especies silvestres del género *Lupinus*, Herrera *et al.*, (2010) indicaron que *L. exaltatus* y *L. rotundiflorus* en el estado de Jalisco se caracterizan por su capacidad para producir materia seca aún en épocas de sequía y bajas temperaturas.

En otras especies silvestres, un estudio realizado en Islandia por Magnússon *et al.*, (2001) reportaron que *L. nootkatensis* es una especie que se desarrolla gradualmente a partir de plantas pequeñas en la fase vegetativa, posteriormente forma muchos tallos y una biomasa considerable con excelente potencial en suelos que no son productivos, produciendo materia seca entre 4 000 y 8 000 kg ha⁻¹, sin embargo, Björnsson y Dalmannsdóttir (2002) con la misma especie registraron en el ciclo 2000-2001 un contenido de materia seca que fluctuó de los 3 000 a los 10 000 kg ha⁻¹. Aunque en estos estudios realizados en Islandia no se comenta

la edad de las plantas la producción de biomasa es muy similar a la que se registró en *L. exaltatus* y *L. mexicanus* entre los 122 y 137 dds.

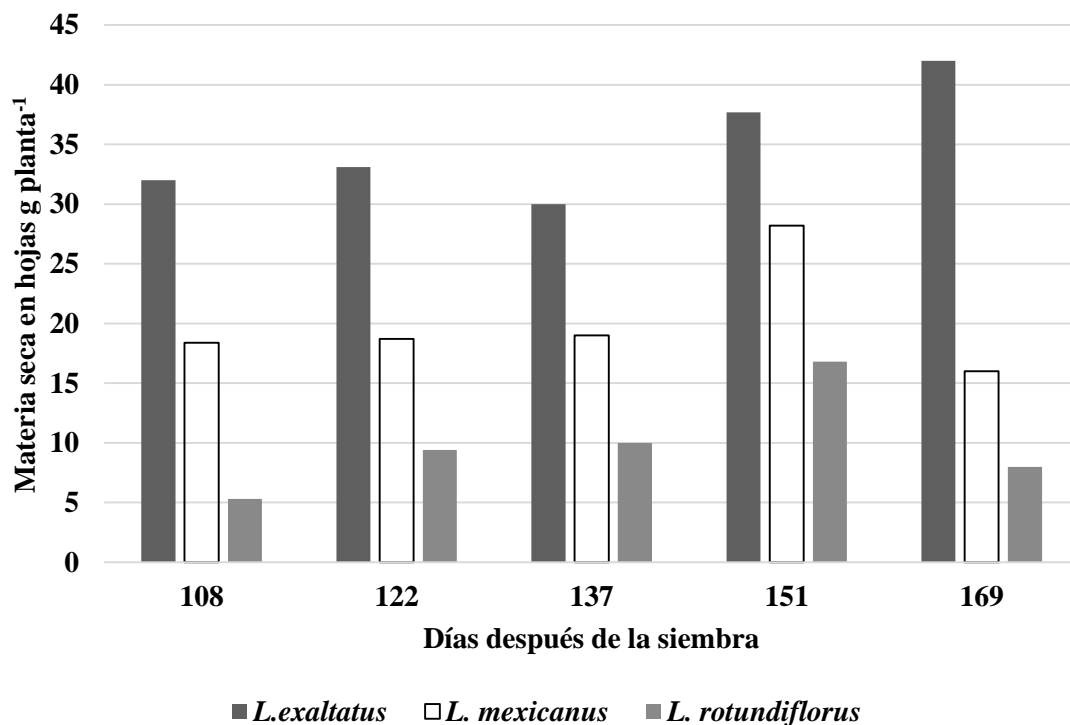


Figura 14. Peso de materia seca de hojas en especies silvestres.

Por otro lado, Goergen (2009) realizó un estudio en la Estepa semiárida del Noreste de la Sierra Nevada (EUA) para evaluar la producción de materia seca en diferentes especies silvestres entre las que se encontraba *L. argenteus*, a los tres meses de edad con una densidad de 10 plantas por m² registró en promedio 150 g m² de materia seca (equivalente a 1 500 kg ha⁻¹). En el presente estudio con una edad y densidad similar *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* presentaron menores valores de materia seca con 346.6 y 300 Kg ha⁻¹, sin embargo, la producción de materia seca en *L. exaltatus* fue muy superior a la de *L. argenteus* (3 482 vs 1 500 kg ha⁻¹). A pesar del lento crecimiento de las especies en estudio los resultados en términos de acumulación de materia seca indican que *L. exaltatus* es la especie con mayor potencial para ser utilizada como abono verde en los suelos agrícolas de Zapopan Jalisco.

6.2.2 Contenido de nitrógeno en especies silvestres

La variación en el contenido de nitrógeno con respecto a los muestreos realizados fue de 1.9 a 3.5 % en *L. exaltatus*, 1.3 a 3.3 % en *L. mexicanus* y de 1.1 a 4.0 % en *L. rotundiflorus*, mientras que el contenido de nitrógeno promedio de seis muestreos fue de 2.7, 2.3 y 2.6 % respectivamente (figura 15). El mayor contenido de nitrógeno en *L. exaltatus* y *L. mexicanus* (3.5 y 3.3 % respectivamente) se encontró en el primer muestreo (93 dds), posteriormente se observó una tendencia a disminuir hasta 1.9 % en *L. exaltatus* y 1.3 % en *L. mexicanus* conforme se incrementó la edad de la planta (169 dds). *L. rotundiflorus* que fue la especie en completar en menor tiempo su madurez fisiológica, fue hasta el segundo muestreo (108 dds) cuando acumuló el mayor porcentaje de nitrógeno con 4.0 %, pero en los siguientes muestreos mostró también una tendencia a disminuir el contenido de nitrógeno hasta 1.1 %. Probablemente la pobre acumulación de materia seca en *L. rotundiflorus* fue compensada con un mayor contenido de nitrógeno de los 108 a los 137 dds.

Los contenidos de nitrógeno encontrados en las especies de este estudio se encuentran dentro de los rangos reportados por Goergen (2009), quien señaló que en los tejidos de las especies del género *Lupinus* generalmente se pueden encontrar concentraciones que pueden variar del 2 al 8%. En los primeros estudios realizados en especies silvestres para conocer su concentración de nitrógeno, Sprent (1973) reportó un contenido de nitrógeno en el follaje de *L. arboreus* que varió de 2.41 a 4.6 % en muestreos realizados en plantas entre 1 y 5 semanas de edad. En un estudio más reciente en *L. argenteus*, Metzger *et al.*, (2006) reportaron concentraciones promedio del 3 % de nitrógeno, los cuales son inferiores a los que se encontraron en el presente estudio en *L. exaltatus* a los 93 y 108 dds con 3.7, 3.5 y 3.2 % ya que posteriormente el contenido de nitrógeno fue menor del 3%. Sin embargo, *L. rotundiflorus* en prácticamente todas las etapas de crecimiento mostró valores superiores al 3% con excepción de los últimos dos muestreos (151 y 169 dds). Por su parte *L. mexicanus* solamente en el primer muestreo (3.3 %) mostró un porcentaje de nitrógeno superior al 3%. Herrera *et al.*, (2010) en un estudio para determinar el potencial forrajero reportó valores de nitrógeno en *L. rotundiflorus* de 2.68 % al finalizar la floración e inicio de formación de vainas y en *L. exaltatus* en la etapa de crecimiento de vainas el contenido de nitrógeno fue

de 2.78 %. Estos valores se aproximan a los que se encontraron en este estudio en similares etapas de crecimiento (de los 122 a los 137 dds). La tendencia a disminuir el contenido de nitrógeno conforme se incrementa la edad de la planta indican que las especies en estudio tienen mejor potencial para ser utilizadas como abono verde entre la etapa de floración y crecimiento de vainas (a los 137 dds en *L. rotundiflorus* y *L. mexicanus*, mientras que en *L. exaltatus* por ser la especie más tardía puede ser utilizada hasta los 151 dds).

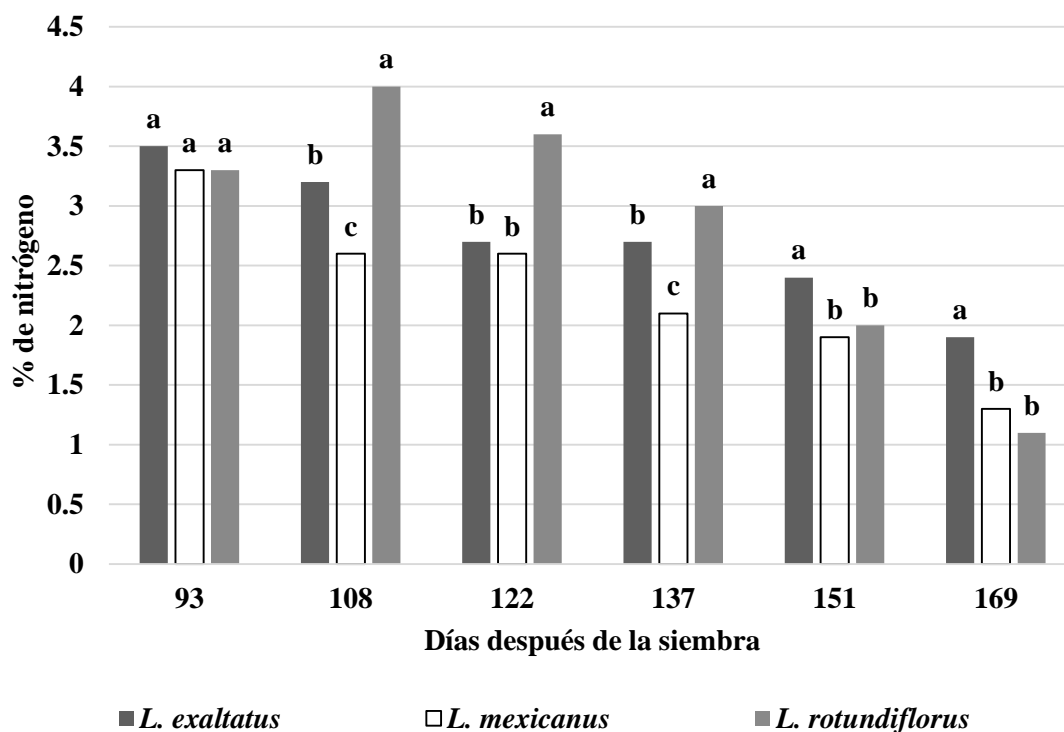


Figura 15. Porcentaje de nitrógeno en tres especies silvestres de *Lupinus* en diferentes fechas de muestreo.

El contenido de nitrógeno total absorbido en g planta^{-1} y en kg ha^{-1} de las tres especies silvestres así como en la planta de referencia se muestra en el cuadro 8. Después de los 122 dds ya no se registró la materia seca ni el contenido de nitrógeno en la cebada (planta de referencia) debido a que las plantas llegaron a la senescencia.

Cuadro 8. Contenido de nitrógeno total en las especies silvestres con respecto a los días después de la siembra.

Dds	cebada		<i>L. exaltatus</i>		<i>L. mexicanus</i>		<i>L. rotundiflorus</i>	
	g p ⁻¹	Kg ha ⁻¹	g p ⁻¹	kg ha ⁻¹	g p ⁻¹	kg ha ⁻¹	g p ⁻¹	kg ha ⁻¹
93	0.056	16.8	1.00	120.1 d	0.09	11.2 d	0.05	6.1 d
108	0.117	35.2	1.02	122.9 d	0.37	44.8 c	0.32	37.9 c
122	0.111	33.3	1.82	219.1 c	1.36	163.9 a	0.87	105.0 b
137	**	**	2.02	243.2 b	1.21	145.3 b	1.13	135.6 a
151	**	**	3.02	363.0 a	1.42	170.9 a	1.14	136.9 a

dds: Días después de la siembra. g p⁻¹: gramos por planta. ** No se realizó la determinación (plantas en senescencia). 120,000 plantas ha⁻¹ en las especies del género *Lupinus* y 300 000 plantas ha⁻¹ de cebada. Promedios con diferente letra en cada columna son estadísticamente diferentes (P≤0.05).

Se puede observar que desde el primero hasta el último muestreo se registró un mayor rendimiento de nitrógeno total en la biomasa de *L. exaltatus*, la cual se incrementó de 120.14 hasta 363 kg ha⁻¹ (de los 93 hasta los 151 dds). En *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* se registraron valores de 11.2 a 170.9 y de 6.1 a 136.9 kg ha⁻¹ respectivamente.

En un estudio realizado en Tabasco, México con el objetivo de determinar el potencial de fijación biológica de nitrógeno por las fabáceas *Cajanus cajan* L., *Canavalia ensiformis* L. y *Mucuna deerengiana* en rotación y asociación con maíz, Córdova *et al.*, (2001) reportaron rendimientos de nitrógeno total en promedio de 151.3 kg ha⁻¹ entre los 120 y 145 días después de la germinación, el cual es muy similar al rendimiento total de nitrógeno en *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* a los 137 dds (145.3 y 135.6 kg ha⁻¹), pero inferior al que se encontró en *L. exaltatus* (243.2 kg ha⁻¹).

Aunque el porcentaje promedio de nitrógeno no es muy diferente entre las especies estudiadas, el mayor rendimiento de nitrógeno total en la biomasa de *L. exaltatus* con respecto a las demás especies estudiadas está relacionado a una mayor acumulación de materia seca en prácticamente todas las fechas de muestreo.

6.2.3 Fijación de nitrógeno atmosférico en especies silvestres

El análisis de varianza (cuadro 9) mostró diferencias significativas entre los tratamientos en función de la fecha de muestreo, especie y la interacción muestreo x especie para las variables relacionadas con la FBN (% de nitrógeno derivado de la fijación y cantidad de nitrógeno fijado).

Cuadro 9. Análisis de varianza que muestra la significancia de las variables con respecto a la FBN en especies silvestres.

Fuente	Gl	% FBN	N fijado (Kg ha ⁻¹)
A:especie	2	2433.81**	380.13**
B:muestreo	2	1986.49**	410.66**
Interacción AB	4	444.86**	13.75**
CV%		1.76	6.21

Los valores en este cuadro representan la *F* calculada en cada análisis de varianza. Gl: grados de libertad, % FBN: porcentaje de nitrógeno obtenido de la fijación, N fijado: nitrógeno obtenido de la fijación, CV: coeficiente de variación. ** Diferencia altamente significativa ($P \leq 0.05$).

En la figura 16 se muestra la eficiencia de las especies en términos del porcentaje de nitrógeno obtenido de la atmosfera, así como el porcentaje del absorbido del suelo. De acuerdo a las condiciones de este experimento desde los 93 dds solamente *L. exaltatus* mostró habilidad para obtener nitrógeno de la atmósfera en cerca de un 85 %, mientras que *L. rotundiflorus* y *L. mexicanus* no mostraron capacidad para obtener nitrógeno atmosférico, lo anterior indica que el nitrógeno encontrado en los tejidos de estas especies lo obtuvieron del suelo y probablemente del nitrógeno almacenado en las semillas (Martín *et al.*, 2007). En el muestreo siguiente (108 dds) el porcentaje de nitrógeno obtenido de la atmósfera en *L. exaltatus* fue de 72 % pero sin diferencias significativas con respecto al muestreo anterior (93 dds). Aunque a los 108 dds ya se registraron porcentajes de nitrógeno obtenido de la atmosfera en *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* estos valores fueron inferiores al 25 y 10 % respectivamente. Lo anterior indica probablemente que el periodo para que inicie el proceso de la FBN en estas especies es más prolongado que en *L. exaltatus*.

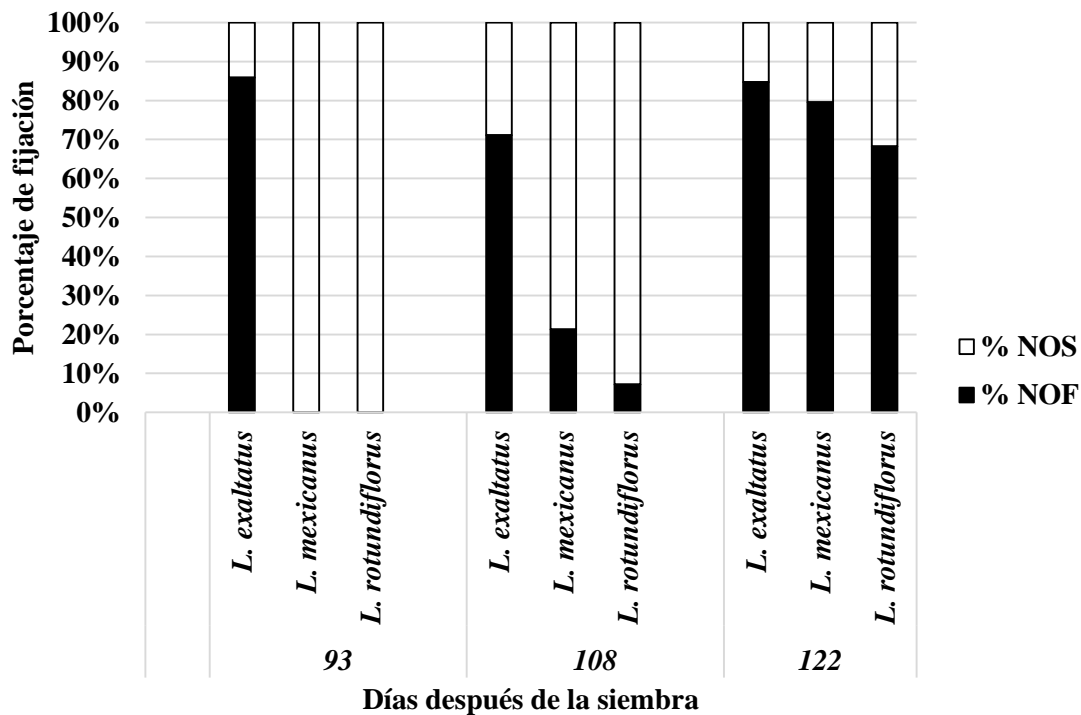


Figura 16. Eficiencia de la FBN en las especies silvestres. NOF= nitrógeno obtenido de la fijación. NOS= Nitrógeno obtenido del suelo.

En el último muestreo realizado (122 dds) se encontró que el nitrógeno obtenido o derivado de la atmósfera en *L. exaltatus* fue del 84 %, mientras que *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* obtuvieron 79.54 y 68.9 % respectivamente. De lo anterior se deduce nuevamente que la especie con menor eficiencia en la FBN en el suelo utilizado en este estudio es *L. rotundiflorus*, mientras que la especie más eficiente es *L. exaltatus*. Los valores de fijación obtenidos en este último muestreo indican que la planta de referencia utilizada en este estudio (cebada) fue adecuada, ya que Danso *et al.*, (1999) señaló que cuando se obtienen tasas de fijación menores al 30 % podrían estar relacionados con errores en la elección de la planta de referencia. Los valores registrados en este estudio a los 122 dds se encuentran dentro de los rangos reportados por otros investigadores al trabajar con otras especies silvestres del género *Lupinus*, así por ejemplo, Goergen (2009) encontró que *L. argenteus* presenta una eficiencia para obtener nitrógeno de la atmósfera del 52 al 99 %. Mayores tasas de fijación a las obtenidas en este estudio se han reportado en otras especies silvestres, por ejemplo, en *L. nootkatensis* se han reportado porcentajes de nitrógeno derivado de la atmósfera de 89 a 98

%, (Pálmason *et al.*, 1992; Danso *et al.*, 1993; Pálmason *et al.*, 2002). Sin embargo, otros investigadores han reportado valores inferiores a los de este estudio como en *L. arboreus* en la costa central de California, la cual presentó un rango de 60 a 70 % de nitrógeno derivado a partir de fuentes atmosféricas (Bentley y Johnson, 1991).

En la figura 17 se muestra la cantidad de nitrógeno fijado (kg ha^{-1}) por las especies silvestres del género *Lupinus* utilizadas en este estudio. Debido a que la planta de referencia (cebada) completo su ciclo biológico varios días antes que las especies silvestres en estudio, solamente fue posible estimar la cantidad de nitrógeno fijado los 93, 108 y 122 dds, obteniéndose valores de nitrógeno fijado de 84, 87 y 193 kg ha^{-1} en *L. exaltatus*. En *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* hasta los 122 dds se encontraron valores adecuados de nitrógeno fijado (128.6 y 79.8 kg ha^{-1} respectivamente), pero significativamente inferiores a los de *L. exaltatus*.

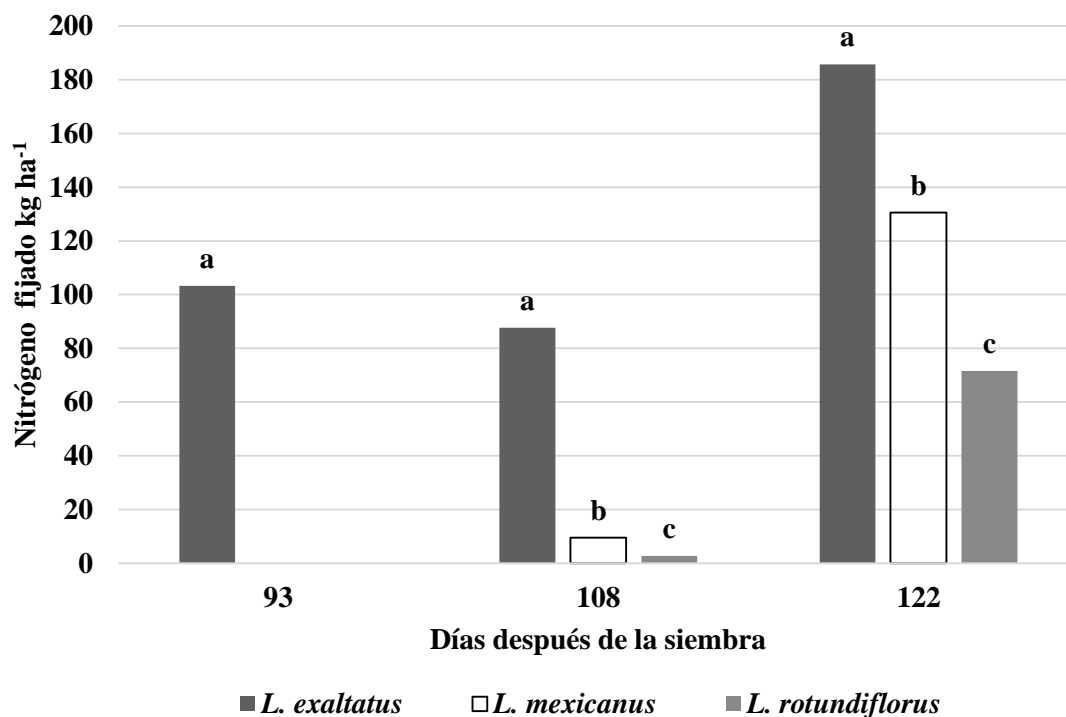


Figura 17. Cantidad de nitrógeno fijado por las especies silvestres en estudio.

Debido a que en el primer muestreo el contenido de nitrógeno total en la biomasa de cebada fue ligeramente mayor al contenido de nitrógeno total en la materia seca de *L. mexicanus* y

L. rotundiflorus no se registró nitrógeno fijado. Lo anterior indica que el nitrógeno acumulado en los tejidos de *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* en las etapas iniciales del crecimiento lo obtuvieron directamente de suelo y probablemente del nitrógeno almacenado en las semillas, ya que de acuerdo con Ayisi *et al.*, (1992) durante los primeros días después de la emergencia, así como en las etapas tempranas de crecimiento las plantas de lupinos son altamente dependientes del nitrógeno del suelo o del nitrógeno almacenado en los cotiledones, por lo que la fijación de nitrógeno no se presenta en ese periodo de tiempo. Lo anterior también tiene relación con lo señalado por Alderete (2008) quien reportó que a los 80 días de edad las especies silvestres *L. montanus* y *L. leptophyllus* aparentemente solo utilizan el nitrógeno disponible en el suelo para desarrollarse. Aunque existen antecedentes sobre la utilización de especies silvestres como abono verde (Sivila y Hervé, 2006; Molina *et al.*, 2011) existe poca información encaminada a cuantificar la cantidad de nitrógeno atmosférico que fijan estas especies.

Los primeros estudios realizados por Gadgil (1971) con especies silvestres indicaron que *L. arboreus* durante varios años puede fijar cantidades de nitrógeno de 185 kg ha⁻¹ aportando cantidades sustanciales de nitrógeno al suelo. Estos valores son muy similares a los encontrados en este estudio con *L. exaltatus* a los 122 dds (193.9 kg ha⁻¹), pero inferiores a los registrados en *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus*. En otro estudio, Baker *et al.*, (1986) durante el establecimiento de *Pinus radiata* en arenas costeras de Nueva Zelanda reportó que *L. arboreus* sin mencionar la etapa en la que se realizaron la evaluaciones mostró habilidad para fijar 80 kg ha⁻¹ de nitrógeno, los cuales son inferiores a los obtenidos con *L. exaltatus* y *L. mexicanus* a los 122 dds, pero similares a los de *L. rotundiflorus* (79.8 kg ha⁻¹). En años posteriores, varios autores estudiaron la FBN durante los años 1983-1996 en *L. nootkatensis*, por medio del método de la dilución ¹⁵N en suelos de tipo Andosol en Islandia, reportando un estimado de nitrógeno fijado de 200 kg ha⁻¹ (Pálmason *et al.*, 1992; Danso *et al.*, 1993; Pálmason *et al.*, 2002). Los cuales son nuevamente muy similares a los obtenidos en este estudio con *L. exaltatus* a los 122 dds (193.9 kg ha⁻¹) y superiores a los registrados en *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus*.

Aunque no existen reportes sobre bajas o nulas cantidades de nitrógeno fijado en especies del género *Lupinus* tal y como ocurrió en este estudio con *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* a los 93 dds, González (1982) reportó cantidades inapreciables o nulas de nitrógeno fijado en una pradera de raigrás inglés, dáctilo y trébol blanco debido al lento crecimiento vegetal por sequía en verano y frío en invierno. En tabasco también se reportan bajos valores de nitrógeno fijado en las fabáceas *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis* y *Mucuna deerengiana* con 1, 6 y 0 Kg ha⁻¹ entre los 120 y 145 días después de la germinación (Córdova *et al.*, 2001).

Nuestros resultados indican que *L. exaltatus* bajo las condiciones en las que se desarrolló esta investigación es la especie silvestre que mayor cantidad de nitrógeno puede aportar al suelo por medio de la FBN.

6.2.4 Análisis de correlación y regresión en especies silvestres

Al igual que en las especies domesticadas, la materia seca demostró estar positivamente correlacionada con la acumulación de nitrógeno en la biomasa ($r^2=0.93$) y con el contenido de nitrógeno derivado de la FBN ($r^2=0.93$), también estas dos últimas variables presentaron una alta correlación entre ellas estadísticamente significativa ($r^2=0.99$) (cuadro 10). Esto tiene relación con lo reportado por León *et al.*, (2001) en donde demuestran una alta asociación de la materia seca total con el contenido de nitrógeno total.

El análisis regresión mostró que hubo una relación lineal y significativa entre la acumulación de materia seca y las variables contenido de nitrógeno total en la biomasa y nitrógeno derivado de la fijación con valores con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.87$ y $R^2 = 0.88$ respectivamente (figura 18).

Cuadro 10. Análisis de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, contenido de nitrógeno y variables relacionadas con la fijación de nitrógeno en plantas silvestres del género *Lupinus*.

Variables	MS kg ha ⁻¹	N MS kg ha ⁻¹	NF kg ha ⁻¹	% FBN	% N total
MS kg ha ⁻¹		0.9351	0.9336	0.7209	-0.4972
N MS kg ha ⁻¹			0.9977	0.7915	-0.2443
NF kg ha ⁻¹				0.7636	-0.2467
% NOF					-0.2498
% N total					

MS: materia seca, N MS: total: nitrógeno total en la materia seca, NF: nitrógeno fijado, % FBN: porcentaje de nitrógeno obtenido de la fijación y % N: porcentaje de nitrógeno en la materia seca.

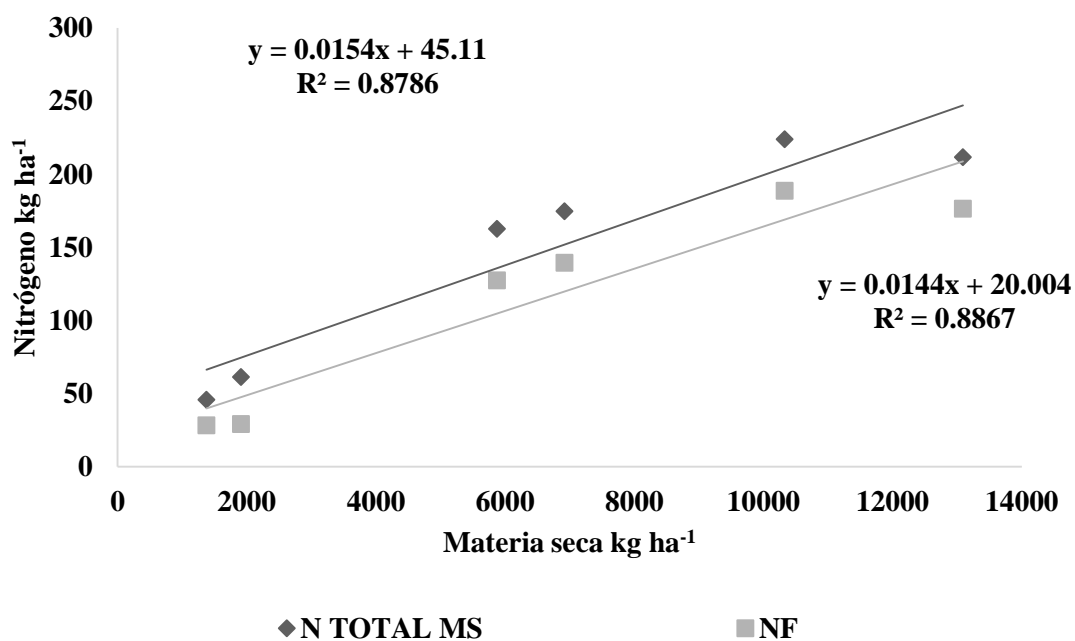


Figura 18. Relación de la materia seca con el nitrógeno total acumulado en la materia seca (N TOTAL MS) y materia seca con la cantidad de nitrógeno fijado (NF) en especies silvestres.

VII. CONCLUSIONES

- Con los resultados generados en esta investigación se puede concluir, que aunque se observaron diferencias en términos de acumulación de materia seca, las especies estudiadas mostraron una adecuada adaptación a las condiciones edafoclimáticas bajo las cuales se desarrolló el estudio.
- Todas las especies mostraron habilidad para llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno. Sin embargo, las especies domesticadas fueron las más eficientes en términos de la cantidad de nitrógeno fijado.
- Entre las especies domesticadas *L. mutabilis* y *L. albus* en el último muestreo registraron los porcentajes más altos de FBN con 92 y 85 % respectivamente, equivalentes a 363 y 204 kg ha⁻¹ de nitrógeno fijado.
- Entre las especies silvestres *L. exaltatus* mostró ser la más eficiente con un porcentaje de FBN en el último muestreo del 85 %, el cual fue equivalente a una cantidad de nitrógeno fijado de 186 kg ha⁻¹.
- Entre las especies silvestres solamente *L. exaltatus* resultó ser más eficiente en la FBN que la especie domesticada *L. angustifolius*.
- El método de la diferencia de nitrógeno resultó útil para tener una primera aproximación de las cantidades de nitrógeno que pueden fijar las especies del género *Lupinus* en la región.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abarca, G. J. (1982).** Estimación simbiótica del nitrógeno por el cultivo del tarwi (*L. mutabilis* Sweet) En A. Mujica, S. Jacobsen, R. Ortiz, A. Canahua, N. Galvez, & V. Apaza (Edits.), Investigaciones en Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Puno Peru: Universidad Nacional del Altiplano.
- Acevedo, D., Alvarez, M., Hernández, E., & Améndola, R. (2011).** Concentración de Nitrógeno en suelo por efecto de manejo orgánico y convencional. Terra Latinoamericana, 29, 325-332.
- Alcántar, G. G., & Trejo, T. L. (2007).** Nutrición de cultivos. México: Colegio de Postgraduados, Mundi-Prensa.
- Alderete, C. A. (2008).** Distribución altitudinal, tratamientos pregerminativos e influencia de *Lupinus* spp. (FABACEAE: PAPILIONOIDEAE) en la fertilidad de suelos forestales. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados. México. 120 p.
- Alexander, M. (1980).** Introducción a la Micrología del suelo. México: AGT.
- Alvarado-Sosa, A., Blanco-García, P., & Lindig-Cisneros, R. (2007).** Test of alternative nursery propagation conditions for *Lupinus elegans* Kunth plants, and effects on field survival. Revista Fitotecnia Mexicana, 30, 201-204.
- Aparicio, T. P., Arrese, I., & Becama, M. (2000).** Fijación de nitrógeno. En J. Azcon-Bietos, & M. Talón (Edits.), Fundamentos de Fisiología Vegetal. Barcelona: Mc Graw Hill.
- Armstrong, E. L., Heenan, D. P., & Pate, J. S. (1997).** Potential and realized nitrogen benefits of lupins field pea and chickpea to wheat production in south-eastern Australia. Australian Journal of Agricultural Research, 48, 39-47.
- Atkins, C. A. (1986).** The legume *Rhizobium* symbiosis: limitations to maximizing nitrogen fixation. Out Look on Agriculture, 129-134.
- Aureoles, C. E., & Lindig, C. R. (2007).** Estudios de nodulación y crecimiento de *Lupinus elegans* en arenales de origen volcánico. Ciencia Nicolaita, 47, 33-42.
- Ayisi, K., Putnam, D., Vance, C., & Graham, P. (1992).** Dinitrogen fixation, nitrogen and dry matter accumulation and nodulation in white lupin. Crop Science, 32, 1197-1202.

- Baca, E., Soto, U., & Pardo, R. (2000).** Fijación Biológica de Nitrógeno. Elementos, 38, 43-49.
- Bahmanyar, M. A., & Ranjbar, G. A. (2008).** The role of potassium in improving growth indices and increasing amount of grain nutrient elements of wheat cultivars. J. Applied Sci, 8, 1280-1285.
- Baker, T. G., Oliver G, R., & Hodgkiss, P. D. (1986).** Distribution and cycling of nutrients in *Pinus radiata* as affected by past lupin growth and fertiliser. Forest Ecology and Management, 17, 169-187.
- Barea, J. (1991).** Cuantificación de la fijación biológica de N mediante el uso de ^{15}N . En: O. J, & B. J (Edits.), Fijación y movilización biológica de nutrientes (Vol. II, págs. 105-124). Madrid, España: Raycar S.A.
- Barrera, J., Suárez, D., Melgarejo, L. M. (2010).** II. Análisis de crecimiento en plantas. En: Experimentos en fisiología vegetal. Melgarejo, L. M. (Ed). Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia. 25-39
- Barrientos, D. L., Montenegro, B. A., & Pino, N. I. (2001).** Evaluación de la fijación simbiótica de nitrógeno de *Lupinus albus* y *L. angustifolius* en un andisol vilcum del sur de Chile. Terra, 20, 39-44.
- Bautista, G. H., & Valdés, M. (2008).** *Frankia* y la simbiosis actinorrízica. Revista Latinoamericana de Microbiología, 50, 90-102.
- Becana, M., & Bedmar, E. J. (1991).** Metabolismo del nitrato y oxígeno en nódulos de leguminosas. En: J. Olivares, & J. Barea (Edits.), Fijación y movilización de nutrientes (Vol. VII, págs. 19-23). Madrid, España: Raycar S.A.
- Bentley, B. L., & Johnson, N. D. (1991).** Plants as food for herbivores: the roles of nitrogen fixation and carbon dioxide enrichment. In: Price PW, Lewinsohn TM, Fernandes GW, Benson WW (eds) Plant-animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions.
- Bergersen, F. J. (1982).** Anatomy and structure of nodules. In: Root nodule of legumes: structure and functions (págs. 23-50). Baldock, UK: Research Studies Press.
- Bermúdez, T. K., Robledo, Q. N., Martínez, H. J., Andreas, T., & Wink, M. (2000).** Biodiversity of the genus *Lupinus* in México. In: Lupin, an ancient crop for the new

millenium, E. van Santen, M. Wink, S. Weissmann y P. Roemer (eds.). Proceedings of the 9th International Lupin Conference, International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. 294-296

biologia.edu.ar. (s.f.). Recuperado el 06 de Enero de 2015, de <http://www.biologia.edu.ar/plantas/cicloge.htm>

Björnsson, H y Dalmannsdóttir, S (2002). Yield potential of the Nootka Lupin. In: E. Van Santen and G.D. Hill (eds). Wild and cultivated Lupins from the tropics to the poles. Proceedings of the 10th International Lupin Conference, Laugarvatn, Iceland, June 2002. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.

Black, C. A. (1975). Relación Suelo-Planta. Argentina: Hemisferio Sur.

Boddey, R. M., Müller, S. H., & Alves, B. J. (1996). Estimation of the contribution of biological N₂ fixation to two *Phaseolus vulgaris* genotypes using simulation of plant nitrogen uptake from ¹⁵N labelled soil. Fertilizer Research, 45, 169-185.

Bunch, R. (1994). El uso de abonos verdes por agricultores campesinos: lo que hemos aprendido hasta la fecha. Informe técnico No. 3, 2da edición.

Burt, E. S., & Hill, G. D. (1990). Yield and nutritive value of spring-sown sweet lupins (*Lupinus angustifolius*, cv. Uniharvest) for lambs. Grazed at four different stages of growth 2. Nutritive value. New Zealand Journal of Agriculture Research, 33, 359-365

Callaham, D., Deltredici, P., & Torrey, J. G. (1978). Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in Comptonia. Science, 199, 899-902.

Campillo, R. R., Urquiaga, S., Pino, I. N., & Montenegro, B. A. (2003). Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en las leguminosas forrajeras mediante la metodología del ¹⁵N. Agricultura técnica, 63(2), 169-179.

Casa, T. B. (2014). Evaluación de la fijación de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* spp. en invernadero, para arveja (*Pisum sativum*), chocho (*Lupinus mutabilis*), fréjol (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia faba*) y vicia (*Vicia* sp.), cutuglagua-pichincha. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Escuela de Ingeniería Agronómica. Quito-Ecuador.

Castillo, D. (1989). Inoculantes e Inoculación. En: V Seminario de Leguminosas de Grano (págs. 39-53). Temuco Chile: Series Carillanca INIA.

- Castroviejo, S., & Pascual, H. (1999).** Familia Leguminosae. En: S. Castroviejo (Ed.), Flora Ibérica plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- Celaya, H., & Castellanos, A. (2011).** Mineralización de Nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra*, 29, 343-356.
- Cerón, R. L., & Aristizábal, G. F. (2012).** Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 14(1), 285-295.c
- Cicore, P., Sainz, R. H., Echeverría, H., & Barbieri, P. (2005).** Materia seca nodular y nitrógeno acumulado en el cultivo de soja en función de la disponibilidad de agua y azufre, y del sistema de labranza. *Cl. Suelo*, 23(2), 205-210.
- Clements, J. C., Buirchell, B. J., Yang H., Smith, P. M. C., Sweetingham M. W., & Smith C. G. (2005).** Lupin. In: Singh, R. & jauhar, P. (eds). Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: volumen 1. Grain legumes. CRC Press
- Córdova, S. S., Castelán E. M., Salgado, G. S., Palma, L. J. D., Vera, N. J. A., Peña C. J. J., Lagunes, E. I. C., & Cárdena, N. R. (2011).** Fijación biológica de nitrógeno por tres fabáceas (Leguminosae) en suelos acidos de Tabasco, México. *Avances en investigación agropecuaria*, 15(1), 31-50
- Danso, S. K. (1995).** Assessment of biological nitrogen fixation. *Fert. Res*, 42, 33-41.
- Danso, S. K., Hardarson, G., & Zapata, F. (1999).** Conceptos erróneos y problemas prácticos en el uso de las técnicas de enriquecimiento del suelo con ¹⁵N para estimar la fijación de N₂. pp. 25-57. In: J.J. Peña Cabriales y F. Zapata. (eds.). Aumento de la fijación biológica del nitrógeno en el frijol común en América Latina. IMPROSA. Irapuato, Gto., México.
- Danso, S. K., Palmason, F., & Hardason, G. (1993).** Is nitrogen transferred between field crops? Examining the question through a sweet-blue lupin (*Lupinus angustifolius* L.) oats (*Avena sativa*) intercrop. *Soil Biology*, 25(8), 1135-1137.
- De Felipe, M. R. (2007).** Biotecnologías limpias en agricultura: Fijación Biológica de nitrógeno. Estructura-función de la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. En: Contaminación y salud (págs. 103-151). Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia.
- Dixon, R., & Wheeler, C. (1993).** Nitrogen fixation in plants. NY USA: Chapman & Hall.

- Doyle, J. J., & Luckow, M. A. (2003).** The rest of iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*, 131, 900-910.
- Dunn, D. B. (1984).** Cytotaxonomy and distribution of New World lupin species. *In: Proceedings of the Third International Lupin Conference, La Rochelle, Francia*, pp. 68-85.
- Dunn, D. B. (2001).** *Lupinus*. En G. Calderón, & J. Rzedowski (Edits.), *Flora Fanerogámica del Valle de México* (págs. 326-333). Pátzcuaro Michoacán, México: Instituto de Ecología.
- Evans, J., Mc Neill, A. M., Unkovich, M. J., Fettell, N. A., & Heenan, D. P. (2001).** Net nitrogen balances for cool-season grain legume crops and contributions to wheat nitrogen uptake: a review. *Aust J Exp Agric*, 41, 347-359.
- Evans, J., O'Connor, G. E., Turner, G. L., Coventry, D. R., Fetell, N., Mahoney, J., & Walscott, D. N. (1989).** N₂ fixation and its value to soil N increase in lupin, field pea and other legumes in south-eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 14, 791-805.
- Falkengren, G. U., & Schottelndreier, M. (2004).** Vascular plants as indicators of nitrogen enrichment in soils. *Plant Ecol*, 172, 51-62.
- FAO. (1984).** Legume inoculant and their use. Roma Italia: FAO.
- Fassbender, H. (1978).** Quimica de suelos. Ed. IICA. Costa Rica.
- Fedorova, E. E., de Felipe, M. R., Puevo, J. J., & Lucas, M. M. (2007).** Conformation of cytoskeletal elements during the division of infected *Lupinus albus* L. nodule cells. *J Exp Bot*, 58, 2225-2236.
- Funayama-Nogichi, S., Noguchi K. & Tereshima, I. (2014).** Comparison of the response to phosphorus deficiency in two lupin species, *Lupinus albus* and *L. angustifolius* with contrasting root morphology. *Plant, Cell and environment* 1-12.
- Gadgil, R. L. (1971).** The nutritional role of *Lupinus arboreus* in coastal sand dune forestry, 3. Nitrogen distribution in the ecosystem before tree planting. *Plant and Soil*, 35, 113-126.
- Gage, D. J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(2), 280-300.

- García, A., Dueñas, G., Hernández, G., Herrero, G., Nuviola, A., Méndez, N., & Zapata, F. (2003).** Efecto del encalado en la respuesta vegetal y fijación simbiótica del nitrógeno en frijol común. *Agronomía Mesoamericana*, 14(2), 207-214.
- García, A., Hernández, G., Nuviola, A., & Toscano, V. (1996).** Efecto del P sobre el rendimiento y extracción del NP de frijol cultivado en tres suelos. *Agronomía Mesoamericana*, 7(1), 99-102.
- Garden, W. K., & Parbery, D. G. (1983).** The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. I. Some characteristics of the soil/root interface. *Plant and Soil*, 68, 19-32.
- Gardner, F. P., Pearce, R. B., & Mitchell, R. L. (1985).** *Physiology of crop plants*. The Iowa State University Press, Ames, 327
- Gasque, L. (2006).** El nitrógeno, uno de los secretos de la vida. ¿Como ves? *Revista de Divulgación UNAM*, 64, 22-25.
- Gataulina, G. G. (1990).** Symbiotic and mineral nitrogen in lupin nutrition. In: In: Proceedings 6th International Lupin Conference. Dietrich Von Baer (ed). Noviembre 1990. Temuco Chile.406p.
- Giller, K. E., & Wilson, K. F. (1991).** *Nitrogen fixation in Tropical Cropping Systems*. Wallingford UK: CAB international.
- Gladstones, J. S. (1974).** The Mediterranean white lupin. *Dep. Agric. West Aust. Tech. Bull.* No. 26, 70-74.
- Gladstones, J. S. (1980).** Recent developments in understanding improvement and use of *Lupinus*. In: R. T. Summerfield, & A. H. Bunting (Ed.), *Advances in legume science*, Proceedings of the International Legume Conference. Royal Botanic Garden Kew.
- Glyan'ko, A. K., Vasil'eva, G. G., Mitanova, N. B., & Ishchenko, A. A. (2008).** The influence of mineral nitrogen on legume-*Rhizobium* symbiosis. *Biology Bulletin*, 36, 250-258.
- Goergen, E. M. (2009).** *The Role Of Symbiotic Nitrogen Fixation On Nitrogen Availability, Competition And Plant Invasion Into The Sagebrush Steppe*. Ph. D. thesis. University of Nevada, Reno. 185 pp.
- González, J. E., & Marketon, M. M. (2003).** Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4), 574-592.

- González, R. A. (1982).** Respuesta de la pradera mixta a la aplicación de nitrógeno. Fijación de nitrógeno. Pastos, 12(1), 107-118.
- Goudriaan, J., & Van Laar, H. H. (1995).** Modeling potential crop growth processes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 238
- Graetz, H. A. (2000).** Suelos y fertilización (Segunda ed.). México: Trillas.
- Graham, P. H. (1990).** Problemas de la nodulación y fijación de nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* L.: una reevaluación. Terra, 8, 71-82.
- Graham, P. H., & Vance, C. (2003).** Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. Plant Physiology, 131, 872-877.
- Gross, R. (1982).** El cultivo y la utilización del tarwui *Lupinus mutabilis* Sweet. Roma Italia: FAO: producción y protección vegetal 36. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Halbleib, C. M., & Ludden, P. W. (2000).** Regulation of Biological Nitrogen Fixation. J. Nutr., 130, 1081-1084.
- Hardason, G., Zapata, F., & Danso, S. K. (1984).** Field evaluation of symbiotic nitrogen fixation by rhizobial strains using ^{15}N methodology. Plant Soil, 82, 369-375.
- Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K., & Burns, R. C. (1968).** The $\text{C}_2\text{H}_2\text{-C}_2\text{H}_4$ assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol, 43, 1185-1207.
- Hartmann, C., & Aldag, R. (1989).** N_2 fixation and yield structure of White lupin (*Lupinus albus* L.) in comparison to *Vicia faba* L. and *Glycine max* (L.) Merr. on different sites. Journal of Agronomy and Crop Science, 1633, 210-211.
- Haynes, R. J., Martin, R. J., & Goh, K. M. (1993).** Nitrogen fixation, accumulation of soil nitrogen and nitrogen balance for some field-grown legume crops. Field Crops Research, 35, 85-92.
- Herrera-Velazco, J. M., Isaac-Virgen, M. L., Rodriguez-Macias, R., Zamora-Natera, J. F., Ruiz-López, M. A., & García-López, P. M. (2010).** Conservación del forraje de *Lupinus rotundiflorus* M. E. Jones y *Lupinus exaltatus* Zucc. mediante ensilaje. Interciencia, 35(8), 592-599.
- Herridge, D. F., & Doyle, A. D. (1988).** The narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) as a nitrogen-fixing rotation crop for cereal production. II estimates of fixation by field-grown crops. Australian Journal of Agricultural Research, 39, 1017-1028.

- Hirsch, A. M. (1992).** Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol*, 122, 211-237.
- Hondelmann, M. (1984).** The lupin, ancient and modern crop plant. *Theoretical Applied Genetic* 68, 1-9.
- Howieson, J. G., Fillery, I. R., Legocki, A. B., Sikorski, M. M., Stepkowski, T., Minchin, F. R., & Dilworth, M. J. (1998).** Nodulation, nitrogen fixation and nitrogen balance. En J. S. Gladstones, C. A. Atkins, & J. Hamblin (Edits.), *Lupins as crop plants: biology, production and utilization* (págs. 149-180). Oxon: CABI.
- Hungria, M., & Franco, A. (1988).** Nodule senescence in *Phaseolus vulgaris* L. *Trop. Agríc (Trinidad)*, 65, 341-346.
- Hungria, M., & Neves, M. C. (1987).** Cultivar and *Rhizobium* strain effect on nitrogen fixation and transpon in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, 103, 111-121.
- Hungria, M., & Vargas, M. A. (2000).** Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Res*, 65, 151-164.
- Ibarra, C. D., Ruiz, C. J. A., González, E. D. R., José Germán Flores, G. J. G., & Díaz, P. G. (2009).** Distribución espacial del pH de los suelos agrícolas de Zapopan, Jalisco, México. *Agricultura Técnica en México*, 35(3) 267-276.
- Imsande, J. (1989).** Rapid dinitrogen fixation during soybean pod fill enhances net photosynthetic output and seed yield: A new perspective. *Agron. J*, 81, 549-556.
- Islam, R. (1978).** The role of simbiotic nitrogen fixation in food legume production. *Proc. Food Legume Improvement and Development. Univ. Aleppo-Siria. ICARDA*. 2-7
- Jacobsen, S. E., & Mujica, A. (2006).** El tarwui (*Lupinus mutabilis* Sweet) y sus parientes silvestres. En R. Moraes, B. Ollgaard, L. P. Kvist, & F. Borchsenius (Edits.), *Bótanica Económica de los Andes Centrales* (págs. 458-482). La Paz: Universidad Mayor de San Andres.
- Jambrina, J. L. (1996).** El Altramuz. En: F. F. Jubete, & A. R. Monreal, *El cultivo de las leguminosas de grano en Castilla y León* (págs. 27-75). Valladolid: Junta de Castilla y León, Consejería de Agricultura y Ganadería.
- Joernsgaard, B., Christiansen, L., & Kuptsov, N. (2002).** Adaptation of lupins for Northern European Maritime Conditions. In: E. Van Santen and G.D. Hill (eds). *Wild and cultivated Lupins from the tropics to the poles. Proceedings of the 10th*

International Lupin Conference, Laugarvatn, Iceland, June 2002. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.

- Jones, D. G. (1991).** Symbiotic nitrogen fixation-exploitation an unchieved potential. *Ann Appl Biol*, 118, 249-259.
- Kartuzova, L., & Kurlovich, B. (2002).** Production of seed. En Kurlovich (Ed.), *Lupins Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding* (págs. 11-38). St. Petersburg: Pub. House.
- Kaye, T. N., & Kuykendall, K. (2001).** Effects of scarification cold stratification on germination of *Lupinus sulphureus* ssp. *Kincaidii*. *Seed Science Tecnology*, 29, 663-668.
- Kiers, E. T., Rousseau, R. A., West, S. A., & Denison R, F. (2003).** Host sanctions and the legume-*Rhizobium* mutualism. *Nature*, 425, 78-81.
- Kurlovich, B. S., & Repjev, S. (1994).** Legume Systematic Research in the N. I. Vavilov All- Russian Scientific Research Institute of Plant Industry (VIR). The bean bag 40, 4-6.
- Kurlovich, B. S., Stankevich, A. K., & Stepanova, S. I. (2002a).** The review of genus *Lupinus* L. In: Kurlovich, B. S (ed.). *Lupins: Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding*, St. Petesburg: Pub House.
- Kurlovich, B. S., Tikhonovich, I., Kartuzova, L., & Heinanem, J. (2002b).** Nitrogen Fixation. In: Kurlovich (Ed.), *Lupins Geography, Classification, Genetic Resources and Breeding* (págs. 269-287). St. Petersburg: Pub. House.
- Kurlovich, B. S. (2002).** The history of lupin domestication. In: Kurlovich, B. S. ed. *Lupins (Geography, classification, genetic resources and breeding)*. OY International North Express. St. Petersburg, Russia-Pellosniemi, Finland. 147-164. Pp
- Küss, E., & Wink, M. (1992).** Molekulare Methoden zur Analyse der Evolution der Gattung *Lupinus*. *Lupinen 1991-Forschung, Anbau und Werwertung*, pp 53-65.
- Küss, E., & Wink, M. (1996).** Molekulare phylogeny and phylogeography of the genus *Lupinus*. In: *Proceedings 7th International Lupin Conference*. Neves, J. M. y Beirao da Costa, L. (eds). Evora, Portugal, pp. 18-23.

- Lara-Cabrera, S. I., Alejandre-Melena, N., Medina-Sánchez, E. I., & Lindig-Cisneros, R. (2009).** Genetic diversity in populations of *Lupinus elegans* Kunth, implications for ecological restoration. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(2), 79-86.
- Larcher, W. (1995).** *Physiological Plant Ecology* (tercera ed.). Germany: Springer.
- Larson, K., Cassaman, K., & Phillips, D. (1989).** Yield, dinitrogen fixation, and aboveground nitrogen balance of irrigated white lupin in a mediterranean climate. *Agronomy Journal*, 81, 538-543.
- Lee, S., Flores, E. M., Contreras, Z. M., García, F. L., Escamilla, J. E., & Kennedy, C. (2004).** Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in gluconacetobacter diazotrophicus strains with mutations. *J. Bacteriol*, 186(16), 5384-5391.
- Lehninger, A. L. (1978).** *Biochemistry* (Segunda ed.). New York: Worth Publishers.
- León, O., Silva, P., & Acevedo, E. (2001).** Respuesta a la inoculación en dos especies de lupino (*Lupinus albus* L. y *Lupinus angustifolius* L.). Chile: Laboratorio de Relación Suelo-Agua-Planta. Facultad de Cs. Agronomicas. Universidad de Chile.
- Lewis, G. P., Schrire, B. D., Mackinder, B. A., & Lock, J. M. (2003).** *Legumes of the world*. Kew UK: Royal Botanic Gardens.
- Lindig-Cisneros, R., Blanco-García, A., Sáenz-Romero, C., Alvarado-Sosa, P., & Alejandre-Melena, N. N. (2007).** Restauración adaptable en la meseta Purépecha, Michoacán, México: hacia un modelo de estados de transiciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 80, 25-31.
- López, B. L., & Fuentes, M. (1991).** *El altramuz*. Cordoba España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- López, B., & Fuentes. (1986).** Lupin crop as an alternative source of protein. *Advances in Agronomy*, 40, 239-295.
- López, M., Martínez, V. R., Brossard, F. M., & Toro, M. (2010).** Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de cepas nativas de agroecosistemas venezolanos. *Agronomía Trop*, 60(4), 355-361.
- Lora, V. G., & Azero, A. M. (2005).** Evaluación comparativa de cuatro abonos verdes y estimación de su capacidad de fijación de carbono en dos comunidades del municipio Morochata-Bolivia. *Acta Nova*, 3(1), 44-55.

- Magnússon, B., Magnússon, S. H., & Sigurdson, B. D. (2001).** Vegetation succession in áreas colonized by the introduced Nootka lupin (*Lupinus nootkatensis*) in Iceland (in Icelan-dic). RALA report.
- Mahon, J. D. (1977).** Respiration and the energy requirements for nitrogen fixation in nodulated pea roots. *Plant Physiol*, 60, 817-821.
- Martín, G. M., Rivera, R. A., & Mujica, Y. (2007).** Estimación de la fijación biológica del nitrógeno de la *canavalia ensiformis* por el método de la diferencia de N total. *Cultivos Tropicales*, 28(4), 75-78
- Mays, F. J. (2004).** Fijación biológica del nitrógeno. *UDO Agrícola*, 1, 1-20.
- Mays, J. (1997).** Simbiosis Leguminosas/Rizobia. Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas. Venezuela: Instituto de Investigaciones Agropecuarias IAPUDO.
- Mc Vaugh, R. (1987).** Flora Novogaliciana. V. Leguminosae. A descriptive account of the vascular plants of Western México. University of Michigan Press: Ann Arbor, MI.
- Mera, K. M., Rouanet, M. J., Montenegro, B. A., & Pino, I. (1999).** Importacia de contar con una leguminosa en la rotación. Temuco Chile: Centro Regional de Investigación Carillanca.
- Merbach, W. (1998).** Symbiontische N₂-Fixierung und N-Umsatz bei Leguminosen. In: Merbach, & L. Wittenmayer (Edits.), *Beiträge aus der Hallenser Pflanzenernährungsforschung* (págs. 43-70). Universität Halle-Wittenberg.
- Metzger, K. L., Romme, W. H., & Turner M, G. (2006).** Foliar nitrogen patterns following stand-replacing fire in lodgepole pine (*Pinus contorta* var *latifolia*) forest of the Rocky Mountains USA. *Forest Ecology and Management*, 227, 22-30.
- Mohr, H. (1995).** *Plant physiology*. Berlin: Springer-Verlag. 629
- Molina, Y., Mora, A., Ramos, M., & Parra, L. (2011).** Evaluación de dos especies leguminosas como abono verde. *Revista Forestal Venezolana*, 55(2), 183-192.
- Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., & De La Cuadra, C. (1993).** Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas I: Alcaloides. *Inv. Agraria. Prod. Prot. Veg.*, 8, 351-361.
- Nambiar, E. K., & Nethercott, K. H. (1987).** Nutrient and water availability to and growth of Young radiata pine plantations intercropped with lupins. *New Forest*, 1, 117-134.

- Nutman, P. S. (1976).** Alternative sources of nitrogen for crops. *Journal of the Royal Agriculture Society of England*, 137, 86-94.
- Olivares, P. J. (2004).** Fijación biológica de Nitrógeno. Granada: Estación experimental del Zaidin, CSIC.
- Pálmason, F., Danso, S. K., & Hardason, G. (1992).** Nitrogen accumulation in sole and mixed stands of sweet-blue lupin (*Lupinus angustifolius* L.) ryegrass and oats. *Plant and Soil*, 142, 135-142.
- Pálmason, F., Gudmundsson, J., & Sverrisson, H. (2002).** Estimates of symbiotic nitrogen fixation in two lupin species in Iceland. In: E. Van Santen and G.D. Hill (eds). *Wild and cultivated Lupins from the tropics to the poles. Proceedings of the 10th International Lupin Conference*, Laugarvatn, Iceland. June 2002. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.
- Parsons, R. (2004).** Plant - Microbe Metabolism. Disponible en: www.personal.dundee.ac.uk/~rparsons/andfrank.htm.
- Peña, J. E., Villegas, M. A., & Sánchez, G. P. (2002).** Contenido de N P K y rendimiento de frambuesa roja (*Rubus idaeus* L.) "Autumn bliss" orgánica asociada con lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet.). *Peru. Biol*, 2, 83-93.
- Peoples, M. B., Herridge, D. F., & Ladha, J. K. (1995).** Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agriculture production? *Plant Soil*, 174, 3-28.
- Peoples, M. B., & Herridge, D. F. (1990).** Nitrogen fixation by legumes in tropical and subtropical agriculture. *Advances in Agron*, 44, 155-223.
- Pereira, P. A., Buiris, R. H., & Bliss, F. A. (1989).** ¹⁵N determined dinitrogen fixation potential of genetically diverse bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil*, 120, 171-179.
- Pérez, A. J. A., García, M. E., Enríquez, Q. J. F., Quero, C. A. R., Pérez, P. J., & Hernández, G. A., (2004).** Análisis de crecimiento, área foliar específica y concentración de nitrógeno en hojas de pasto "mulato" (*Brachiaria* híbrido, cv.) *Téc Pecu Méx*, 42(3), 447-458
- Pérez, F. M., & Calvo, M. (2005).** Uso de vegetación autóctona en restauración ambiental. In: *Congreso Internacional de Medio Ambiente en Extremadura*. 1-19.

- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(1), 180-201.
- Phillips, D. A. (1980).** Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Ann. Rev. Plant Physiol*, 31, 29-49.
- Planchuelo, A. M. (1982).** Literature review of the genus *Lupinus*. *Lupine Newsletter. International Lupine Association* 4, 37-39.
- Planchuelo, A. M. (1994).** Wild lupins distribution and its implications as germplasm resources. In: Neves-Martins J. M., Beirao da Costa M. L. (eds) *Advances in Lupin research. Proceedings of the 7th International Lupin Conference, 18–23 April 1994.* Technical University of Lisbon, Evora, Portugal, pp 65–69
- Planchuelo, A. M. (1996).** Relationship between South American and European species of *Lupinus* In: *Advances in Legumes of Economic Importance..* Pickersgill, B. y Lock, J. M. (eds.) Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 109-116.
- Planchuelo, A. M., & Dunn, D. (1984).** The simple leaved *Lupinus* of Argentina and relatives. *Annals Missouri Botanic Garden.* 71(1): 92-104.
- Planchuelo, R. A. (1984).** Taxonomic studies of *Lupinus* in South America. 3th International Lupin Conference, (págs. 39-53). La Rochelle, Francia.
- Plitmann, U., & Heyn. (1984).** Old World *Lupinus*. In: *Taxonomy, evolutionary relationship and links with New World species* (págs. 55-56).
- Radic, S., & McAdams, J. (2012).** Estimación de la fijación de nitrógeno en una vega de tierra del fuego por el método de la diferencia de nitrógeno. *Anales Instituto Patagonia*, 40(2), 95-102.
- Resende, A., Alves, B. J., Boddey, R. M., & Urquiaga, S. (2003).** Técnicas utilizadas na quantificacao da fixacao biológica de nitrógeno. Brasil: Seropedica: EMBRAPA Agrobiologia.
- Restrepo, J. (1992).** La búsqueda de sistemas alternativos. *Agroecología en Paraguay. Manejo de suelos, protección de cultivos y sistemas productivos campesinos.* Asunción Paraguay: Curso taller en Colonia Pirapey CECTEC.
- Rodas, C. A., Nuñez, E. R., Espinoza, H. V., & Alcantar, G. G. (2001).** Asociación lupino-maíz en la nutrición fosfatada en un Andosol. *Terra*, 19, 141-154.

- Rodriguez, C. B., Servillano, F. G., & Subramaniam, P. (1984).** La fijación del nitrógeno atmosférico. Una biotecnología en la producción agraria, Temas de divulgación. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología.
- Romero, O. Y., Hazard, S. T., Márquez, B. M. G., & Hiriart, L. M. (1993).** Evaluación agronómica de dos especies de lupino *Lupinus albus* y *Lupinus mutabilis* como alternativas de forraje suplementario en secano. Agricultura técnica, 53(4), 303-309.
- Ruíz, M. J., Ruíz, L. M., & Zamora, N. J. (1999).** The genus *Lupinus*: taxonomy and distribution in Jalisco, México. Canterbury New Zealand: In: Proceedings of the 9th International Lupin Conference. International Lupin Association. Canterbury new zealand 26-29.
- Sánchez, F. (1985).** Fijación simbiótica de nitrógeno: bioquímica, biología molecular y perspectivas de la ingeniería genética. En: Perspectivas de la biotecnología en México (págs. 413-433). México: Fondo Javier Barros Sierra.
- Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C. (2013).** Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Annals of Botany, 1-25
- Schulze, J., Beschow, H., & Merbach, W. (1999).** Nitrogen fixation in blue and white lupin during pod-filling. In: Proceedings of the 9th International Lupin Conference (págs. 246-248). Canterbury, New Zealand: International Lupin Association.
- Schulze, J., Temple, G. T., Beschow, H., & Vance, C. P. (2006).** Nitrogen fixation by White lupin under Phosphorus deficiency. Annals of Botany, 98, 731-740.
- Secretaría de Medio Ambiente para el Desarrollo Sustentable (SEMADES) (2006).** Ordenamiento ecológico territorial del estado de Jalisco. Última modificación, 27 de julio de 2006.
- Serraj, R., Fleurat, L. P., Jaillard, B., & Drevon, J. J. (1995).** Structural changes in the inner cortex cells of soybean roots nodules are induced by short term exposure to high salt or oxygen concentrations. Plant, Cell and Environment, 18, 455-462.
- Sivila, R., & Hervé, D. (2006).** Efecto de leguminosas nativas en terrenos en descanso sobre la microbiota del suelo durante un cultivo de papa (Altiplano central boliviano). Ecología en Bolivia, 41(3), 154-166.

- Smith, C. J., Chalk, P. M., Hamilton, S. D., & Hopmans, P. (1992).** Estimating N₂ fixation by field-grown lupins (*Lupinus angustifolius* L.) using soil and plant enrichment. *Biology and Fertility of Soils*, 13, 235-241.
- Smith, S. C., Bezdicek, D. F., Turco, R. F., & Cheng, H. H. (1987).** Seasonal N₂ fixation by cool-season pulses base on several ¹⁵N methods. *Plant and Soil*, 97, 3-13.
- Soto-Correa, J. C., Lindig-Cisneros, R., & Sáenz-Romero, C. (2014).** *Lupinus elegans* Kunth assisted migration in common garden field test. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(2), 107-116.
- Soto-Correa, J. C., Sáenz- Romero, C., Lindig-Cisneros, R., Sanchez-Vargas, N., & Cruz-de-León, J. (2012).** Variación genética entre procedencias de *Lupinus elegans* Kunth, Zonificación altitudinal y migración asistida. *Agrociencia*, 46(6):593-608
- Soule, J., & Piper, J. (1994).** *Farming in Nature's image*. USA: Island Press.
- Sprent, J. I. (1973).** Growth and nitrogen fixation in *Lupinus arboreus* as affected by shading and wáter supply. *New Phytol*, 72, 1005-1022.
- Sprent, J. I., & Sprent, P. (1990).** *Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects*. London: Chapman and Hall.
- Stewart, G. R. (1991).** The comparative ecophysiology of plant nitrogen metabolism. In: J. R. Porter, & D. W. Lawlor (Ed.), *Plant grown, Interactions with nutrition and Environment*, Society for experimental biology (págs. 81-91). Cambridge: Cambridge University Press.
- Stewart, W. M., Lawrence, H. L., & Steven, V. K. (2005).** Phosphorus as a natural resource. *Agronomy Monograph* (46). Madison, EUA: In *Phosphorus: Agriculture and the Enviromental*.
- Sucojayo, L., Espinoza, G., & Chincheros, J. (1998).** Determinación de la capacidad infectiva de cepas de *Bradyrhizobium lupini* resistentes a estreptomycin cultivadas en plantas de tarwi (*Lupinus mutabilis* y *Lupinus albus*) mediante pruebas de autenticación en solarío. *Biofarbo*, 6, 49-56.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006).** *Plant physiology*. 2da ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 764

- Troncoso, P. A., Pérez, C. A., Larrain, J., & Ardiles, V. (2013).** Desarrollo de la fijación simbiótica de nitrógeno en una cronosecuencia primaria en la Isla Santa Inés, Región Magallanes, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 86, 345-355.
- Twornlow, S. (2004).** Increasing the role of legumes in smallholder farming systems. In: R. Serraj (Ed.), *Symbiotic Nitrogen Fixation* (pág. 382). USA: Sci. Pub. Inc.
- Unkovich, M. J., Pate, J. S., & Sanford, P. (1997).** Nitrogen fixation by annual legumes in Australian Mediterranean agriculture. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48, 267-293.
- Unkovich, M., Pate, J., & Hamblin, J. (1994).** The nitrogen economy of broad acre lupin in Southwest Australia. *Austr. J. Agric. Res.*, 45, 149-164.
- Ureta, A., & Nordlund, S. (2002).** Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in gluconacetobacter diazotrophicus by a putative FeSII protein. *J. Bacteriol.*, 184(20), 5805-5809.
- Urzua, H. (2005).** Beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno en Chile. *Cien. Inv. Agr.*, 2, 133-150.
- Valdés, M. (2002).** La bacteria filamentosa *Frankia*. México D.F: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.
- Vallejos, E., Silva, P., & Acevedo, E. (2004).** Evaluación del rendimiento de nueve genotipos de lupino en la zona central. Laboratorio Suelo-Planta. Facultad de Ciencias Agronomicas. Universidad de Chile. Recuperado el 19 de septiembre de 2014, de <http://www.sap.uchile.cl>
- Valles, M. B., Cadisch, G., & Aluja, S. A. (2003).** Comparación de metodologías de isotopos para evaluar fijación de nitrógeno atmosférico y su destino en suelos y plantas. *Agrociencia*, 37, 117-128.
- Vance, C. P. (2001).** Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition, plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology*, 127, 390-397.
- Vance, C. P., Graham, P. H., & Allan, D. L. (2000).** Biological nitrogen fixation: phosphorus Ba critical future need? In: F. O. Pederosa, M. Hungria, M. G. Yates, & W. E. Newton (Edits.), *Nitrogen fixation from molecules to crop productivity* (págs. 509-518). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

- Vanek, S. (2009).** Adaptación y respuesta a la fertilización fosforada de especies leguminosas en el Norte de Potosí, Bolivia. *Revista de Agricultura*, 61(45), 15-22.
- Vellasamy, G., Hill, D. G., & McKenzie, A. B. (1999).** The advantage of lupins in crop rotations in New Zealand. In: *Lupin, an ancient crop for the new millenium*, E. van Santen, M. Wink, S. Weissmann y P. Roemer (eds.). Proceedings of the 9th International Lupin Conference, International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. p 187-192.
- Vera, J. A., Grageda, O. A., & Peña, J. J. (2000).** Metodologías para evaluar la fijación biológica de nitrógeno. En: *La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: el aporte de las técnicas isotópicas*. Acuerdo Regional para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe (ARCAL) (págs. 59-67). Irapuato: IMPRO SA de CV.
- Vicent, J. M. (1982).** Nitrogen fixation in legumes. Sidney Australia: Academic Press.
- Villar, R., Ruiz, R., Quero, J., Poorter, H., Valladares, F., & Marañón, T. (2004).** Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. En F. Valladares (Ed.), *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante* (págs. 191-227). Madrid: Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A.
- Vitousek, P. M., Aber, J., Howarth, W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W. & Tilman, G. D. (1997).** Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. *Ecol. Applic*, 7, 737-750.
- Wink, M., Meibner, C., & Witte, L. (1995).** Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*, 38, 139-153.
- Zahran, H. H. (2001).** Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 91, 143-153.
- Zamora-Natera, J. F., García –López, P., Ruíz-López M., Rodríguez-Macías, R., & Salcedo-Pérez, E. (2009).** Composición y concentración de alcaloides en *Lupinus exaltatus* Zucc. durante su crecimiento y desarrollo. *Interciencia*, 34(9), 672-676