





**Acta Botanica
Mexicana**

Fijación biológica del nitrógeno en tres especies silvestres del género *Lupinus* (Leguminosae, Papilionoideae) en México

Biological nitrogen fixation in three wild species of the genus *Lupinus* (Leguminosae, Papilionoideae) in Mexico

Juan Francisco Zamora Natera^{1,2} , Isidro Zapata Hernández¹ , Alejandra Villalvazo Hernández¹ 

Resumen:

Antecedentes y Objetivos: La fijación biológica del nitrógeno (FBN) en leguminosas nativas de México ha sido poco estudiada; particularmente en especies del género *Lupinus* no se tiene información al respecto. En este sentido, el objetivo de esta investigación fue cuantificar la acumulación de biomasa y nitrógeno (N) en tres lupinos silvestres del estado de Jalisco, México (*Lupinus exaltatus*, *L. rotundiflorus* y *L. mexicanus*), así como evaluar la FBN en términos de cantidad de N fijado (kg ha^{-1}) y proporción de N derivado de la atmósfera (% N_{da}).

Métodos: Las especies en estudio al igual que la cebada, una especie conocida como no fijadora de N y usada de referencia, fueron cultivadas en suelos agrícolas de Zapopan, Jalisco, en el periodo otoño-invierno de 2015-2016. Durante el crecimiento de las especies en estudio se realizaron muestreos destructivos a los 93, 108 y 122 días después de la siembra (Dds). En cada muestreo se cuantificó el número de nódulos por planta, contenido de materia seca (Ms) y % de N. Con estos valores se estimó mediante el método de la diferencia de N, la proporción de N derivado de la atmósfera (% N_{da}) y cantidad de N fijado (kg ha^{-1}).

Resultados clave: A los 93, 108 y 122 Dds, *L. exaltatus* fijó 87.4, 86.9 y 187 kg de N ha^{-1} lo cual fue equivalente a 71.0, 70.9 y 83.8% de N_{da}, respectivamente. Las especies *L. rotundiflorus* y *L. mexicanus* solamente mostraron valores significativos de N fijado hasta los 122 Dds.

Conclusiones: Bajo las condiciones de este estudio se puede concluir que *L. exaltatus* se caracterizó por ser la especie más eficiente en la fijación de N atmosférico, debido a una favorable simbiosis entre las raíces y las bacterias nativas del suelo fijadoras de N atmosférico.

Palabras clave: Leguminosas, materia seca, nódulos, N atmosférico, *Rhizobium*.

Abstract:

Background and Aims: The biological fixation of nitrogen (BFN) in legumes native to Mexico has been little studied; particularly in species of the genus *Lupinus* there is no information about this. Therefore, the objective of this investigation was to evaluate the BFN in three wild lupins from the state of Jalisco, Mexico (*Lupinus exaltatus*, *L. rotundiflorus* and *L. mexicanus*) in terms of the amount of N fixed (kg ha^{-1}) and the N proportion derived from the atmosphere (% N_{da}).

Methods: The species under study as well as barley, a non-fixing species of N used as reference, were planted in agricultural soils in Zapopan, Jalisco, in the 2015-2016 autumn-winter season. During the growth of the species under study, destructive sampling was carried out at 93, 108 and 122 days after sowing (Das). In each sample the number of nodules per plant, dry matter content (Dm) and % N were quantified. With these values, the proportion of N derived from the atmosphere (% N_{da}) and amount of N fixed (kg ha^{-1}) were estimated using the total N difference method.

Key results: At 93, 108 and 122 Das *L. exaltatus* fixed 87.4, 86.9 and 187 kg of N ha^{-1} ; these values were equivalent to 71.0, 70.9 and 83.8% of N_{da}, respectively. The species *L. rotundiflorus* and *L. mexicanus* only showed significant values of N fixed until 122 Das.

Conclusions: Under the conditions of this study it can be concluded that *L. exaltatus* was the most efficient species in the fixation of atmospheric N, due to a favorable symbiosis between the roots and the soil-fixing native bacteria of atmospheric N.

Key words: atmospheric N, dry matter, legumes, nodules, *Rhizobium*.

1 Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Departamento de Botánica y Zoología, Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, 45200 Nextipac, Zapopan, Jalisco, México.

2 Autor para la correspondencia: jfzamoranatera@gmail.com

Recibido: 8 de abril de 2019.

Revisado: 3 de mayo de 2019.

Aceptado por Marie-Stéphanie Samain: 30 de mayo de 2019.

Publicado Primero en línea: 09 de julio de 2019.

Publicado: Acta Botanica Mexicana 126 (2019).

Citar como:

Zamora Natera, J. F., I. Zapata Hernández y A. Villalvazo Hernández. 2019. Fijación biológica del nitrógeno en tres especies silvestres del género *Lupinus* (Leguminosae, Papilionoideae) en México. Acta Botanica Mexicana 126: e1543. DOI: 10.21829/abm126.2019.1543



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-NonCommercial (CC BY-NC 4.0 Internacional).

e-ISSN: 2448-7589

Introducción

El género *Lupinus* L. (Leguminosae, Papilionoideae) cuenta con aproximadamente 267 especies (Drummond et al., 2012); la mayoría crecen en América y solo 13 de ellas en tierras altas de África y la cuenca del Mediterráneo. De acuerdo con Atchison et al. (2016) y Kurlovich (2002), desde 2000 años A.C. algunas especies fueron domesticadas para consumo humano y/o animal de forma independiente, tanto en la cuenca del mediterráneo (*L. albus* L., *L. angustifolius* L. y *L. luteus* L.), como en la región de los Andes de América del Sur (*L. mutabilis* Sweet). La importancia de estas especies se basa en el alto contenido de proteínas en sus semillas (Sujak et al., 2006), así como en su capacidad para obtener nitrógeno atmosférico (N_2) por medio del proceso denominado fijación biológica del nitrógeno (FBN). De acuerdo con Weisany et al. (2013) el proceso de FBN que ocurre mediante la asociación simbiótica entre raíces y bacterias nativas del suelo (familia Rhizobiaceae) permite que estas bacterias tomen N del aire y lo transformen en amonio (NH_4^+).

Esta simbiosis ocurre mediante la formación de órganos radiculares especializados denominados nódulos, los cuales son colonizados por las bacterias fijadoras de N (Masson-Boivin y Sachs, 2018). En México no se cultivan especies del género *Lupinus*; sin embargo, se tienen aproximadamente 110 especies nativas distribuidas en varios estados (Bermúdez et al., 2000). Especies como *Lupinus montanus* Kunth en el Estado de México, así como *L. elegans* Kunth y *L. spp.* en Michoacán, fueron utilizadas en programas forestales, ensayos de rehabilitación de suelos y abono verde, respectivamente (Lemus et al., 1986; Lindig-Cisneros et al., 2007; Ramírez-Contreras y Rodríguez-Trejo, 2009). Aunque estos investigadores no realizaron mediciones sobre la cantidad de N que pueden fijar y aportar al suelo, los resultados obtenidos en estos estudios son atribuidos al papel que desempeñan estas plantas en la FBN.

Se han desarrollado diferentes técnicas para cuantificar la FBN: incremento de la producción de materia seca, método de la diferencia de N total, nodulación, solutos en el xilema, actividad enzimática y uso del ^{15}N (Hardason y Danso, 1993). De acuerdo con Radic y McAdam (2012), la técnica de las diferencias del N es una medición confiable para evaluar la fijación. Carlsson y Huss-Danell (2003) señalan

que el principio de esta técnica asume que la cantidad de N fijado es igual a la diferencia entre el N total de una planta fijadora y un cultivo de referencia (especie no fijadora de N), sembradas ambas especies en las mismas condiciones. En este sentido, la elección de la planta control o no fijadora de N es de importancia y entre las especies que se han utilizado como cultivo de referencia se encuentran las gramíneas *Lolium perenne* L., *Dactylis glomerata* L., *Panicum maximum* Jacq., *Triticum aestivum* L. y *Zea mays* L., entre otras (Boller y Nösberger, 1994; Schulz et al., 1999; Radic y McAdam, 2012; Martín et al., 2017). Aunque la técnica de la dilución isotópica de ^{15}N generalmente es considerada la más confiable para hacer este tipo de investigaciones, de acuerdo con Cueto-Wong et al. (2013), son pocos los estudios que utilizan fertilizantes marcados con ^{15}N , debido a sus altos costos y al de los análisis de las muestras que los contienen.

La información sobre la cantidad de N que fijan las especies cultivadas del género *Lupinus* es amplia, se han estimado valores de 0 a 463 kg N fijado ha^{-1} , dependiendo de la especie y condiciones edafo-climáticas de los sitios donde se han realizado los experimentos (Schulz et al., 1999; Unkovich et al., 2010); sin embargo, en especies silvestres a nivel mundial estos estudios son escasos. De acuerdo con lo anterior y considerando que en México no se han realizado estudios para cuantificar la fijación de N atmosférico (N_2) en especies nativas del género *Lupinus*, se realizó una investigación con el objetivo de estimar por el método de la diferencia la cantidad de N fijado ($kg\ ha^{-1}$) y proporción de N derivado de la atmósfera (% N_{dda}) en *Lupinus exaltatus* Zucc., *Lupinus rotundiflorus* M.E. Jones y *Lupinus mexicanus* Cerv. ex Lag. en suelos de Zapopan, Jalisco.

Materiales y Métodos

Localización del sitio experimental

Se estableció un experimento de noviembre de 2015 a marzo de 2016 en terrenos del campo agrícola experimental del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, el cual se encuentra en la localidad de las Agujas, Nextipac, municipio Zapopan, Jalisco, México. Las coordenadas geográficas del lugar son 20°43' latitud norte y 103°23' latitud oeste; tiene una altitud de 1600 m. La mayor parte del municipio

Zapopan (85.4%) se caracteriza por su clima semicálido semihúmedo con una precipitación media anual de 943 mm (INEGI, 2001). La temperatura media anual es de 20.5 °C, mientras que su máxima y mínima promedio oscilan entre 32.1 y 8.4 °C respectivamente (Ruiz et al., 2003).

El suelo del terreno donde se estableció el experimento es clasificado como Regosol, de acuerdo con los análisis físicos y químicos realizados en el laboratorio de análisis de suelos del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), presenta 51.9% de arena, 20.8% de arcilla, 27.8% de Limo, pH de 5.0, materia orgánica 1.7%, N 0.08%, P 68.52 mg kg⁻¹. El contenido de los cationes Ca, Mg, K y Na fue de 1.36, 0.18, 0.83 y 0.35 cmol kg⁻¹, respectivamente. Durante la época de evaluación solo se registraron datos de temperatura, ya que la precipitación no es común durante esta época.

Material vegetal

Las semillas o germoplasma de *Lupinus exaltatus*, *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* utilizadas en el experimento se recolectaron en los primeros meses del año 2015 en poblaciones silvestres localizadas en el estado de Jalisco (México), en las localidades Ciudad Guzmán (20°15'N, 103°32'O), Lagos de Moreno (21°20'N, 101°54'O) y Chiquilistlán (20°03'N, 103°51'O), respectivamente (Fig. 1). La identificación ta-

xonómica de las plantas se realizó mediante la revisión de bibliografía especializada de flora (McVaugh, 1987) y a través de cotejos con las colecciones del herbario IBUG (números curatoriales 184176, 204527, 37505, 34446, 56754 y 97977).

Establecimiento del experimento en campo

Antes de la siembra, las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (2%) y se sometieron a un proceso de escarificación (inmersión en ácido sulfúrico concentrado 98% durante 30 minutos), debido a que generalmente las semillas de las especies nativas del género *Lupinus* presentan una testa endurecida (Medina-Sánchez y Lindig-Cisneros, 2005). Después del tratamiento de escarificación y previa preparación convencional del terreno (barbecho, rastreo y surcado), éste se dividió en tres bloques y cuatro parcelas por bloque de 5 m de ancho × 6 m de longitud (área total por parcela de 30 m²). Las semillas de las tres especies de *Lupinus* se sembraron el 6 de noviembre de 2015 en forma manual a una profundidad de 3 cm, con una distancia de 15 cm entre plantas y una distancia de 80 cm entre surcos.

Con el propósito de cuantificar la FBN por el método de la diferencia de N también se sembró cebada en forma aleatoria entre las especies del género *Lupinus* (Hardarson

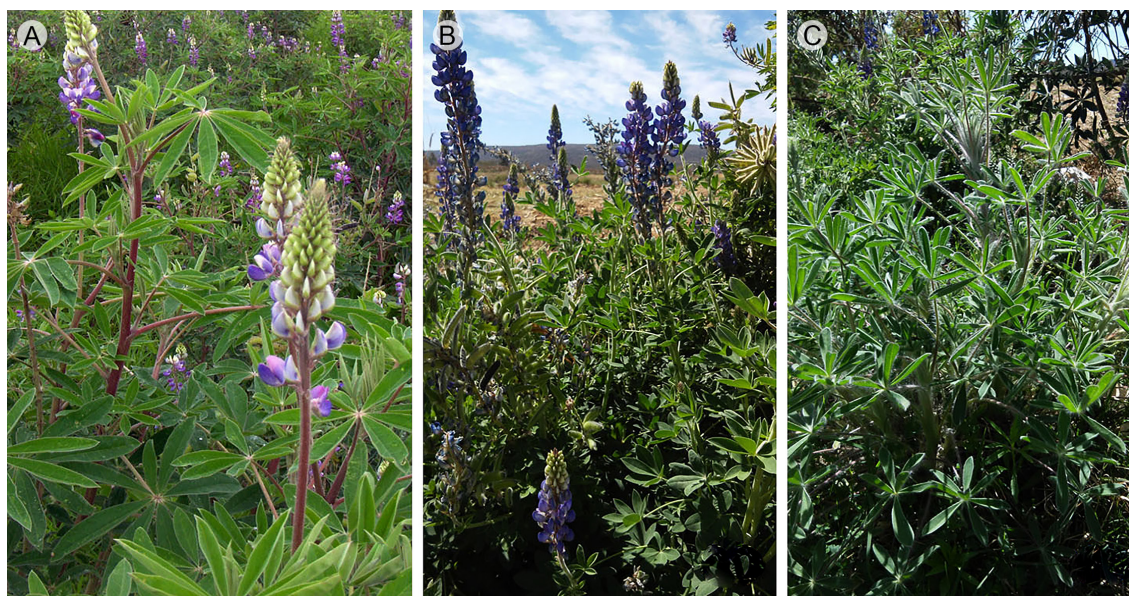


Figura 1: A. vista general de *Lupinus exaltatus* Zucc.; B. *L. rotundiflorus* M.E. Jones; C. *L. mexicanus* Cerv. ex Lag., en los sitios de colecta.

y Danso, 1993; Schulz et al., 1999; Martín et al., 2007; Radic y McAdam, 2012). Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con arreglo factorial de 3×3 , tres especies, tres muestreos destructivos (93, 108 y 122 días después de la siembra) y tres repeticiones. La densidad de plantación estimada para las especies del género *Lupinus* fue de aproximadamente 120,000 plantas por ha y 300,000 plantas por ha para la cebada.

Manejo del cultivo

Inmediatamente después de la siembra se realizó un riego por goteo a capacidad de campo mediante cintillas, las cuales tenían una distancia entre goteros de 20 cm. Posteriormente los riegos se realizaron con una frecuencia de 15 días aproximadamente hasta iniciar la formación de vainas. El suelo no fue fertilizado y la baja densidad de malezas que se presentaron durante el crecimiento del cultivo facilitó el control de éstas en forma manual. Cabe señalar que en el periodo de evaluación no se aplicaron pesticidas, debido a que los daños causados por plagas o enfermedades fueron inapreciables.

Muestreos destructivos y cuantificación de materia seca

En cada muestreo se seleccionaron todas las plantas ubicadas en 0.8 m lineales de los surcos centrales, las cuales se cortaron con tijeras de podar a una altura de 3 cm sobre la superficie del suelo. Las plantas colectadas se lavaron y se colocaron en estufa de aire forzado (Novatech, modelo 0200, Tlaquepaque, México) a 70 °C en el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zootología (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara (UdG) hasta peso constante. Después de registrar el peso seco, las plantas completas se molieron utilizando un molino (RETSCH GMBH, modelo 5657, Haan, Alemania) del Departamento de Madera Celulosa y Papel del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI) de la UdG para su posterior análisis de nitrógeno. Además, en cada cosecha se extrajo cuidadosamente el sistema radical con el propósito de contar los nódulos por planta.

Análisis de nitrógeno

El contenido de N (%) en la materia seca de las plantas completas incluyendo la cebada se determinó por medio del método Kjeldahl (Bremner y Keeney, 1965). También se analizó el contenido de N en las semillas de cebada y semillas de las diferentes especies de *Lupinus* utilizadas en la siembra. Cabe señalar que el contenido de N en las semillas se utilizó para estimar posteriormente el porcentaje de nitrógeno obtenido o derivado de la FBN, ya que durante la germinación y establecimiento de plántula constituye la principal fuente inicial de N.

Estimación del % N_{dda} y cuantificación de N fijado

Se calculó el contenido de N por planta a partir de los datos de la materia seca (g planta⁻¹) y la correspondiente concentración de N (%) mediante las siguientes fórmulas propuestas por Martín et al. (2007) y Radic y McAdam (2012).

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

Posteriormente se estimó la proporción o porcentaje de N derivado de la atmósfera (% N_{dda}) en las especies de *Lupinus* estudiadas utilizando la fórmula en la parte inferior de esta página.

Donde:

Contenido N fix=Nitrógeno en la planta fijadora (*Lupinus*)

Contenido N control=Nitrógeno en la planta control (cebada)

Contenido N semilla fix=Nitrógeno en semillas de planta fijadora (*Lupinus*)

Contenido N semilla control=Nitrógeno en semillas de planta control (cebada)

Finalmente el nitrógeno fijado se estimó de la manera siguiente:

$$\text{Cantidad de N fijado} = \text{N en la leguminosa} \times (\% \text{ N}_{\text{dda}} / 100)$$

$$\% \text{N}_{\text{dda}} = \frac{(\text{Contenido N fix} - \text{Contenido N semilla fix}) - (\text{Contenido N control} - \text{Contenido N semilla control})}{(\text{Contenido N fix} - \text{Contenido N semilla fix})} \times 100$$

Análisis estadísticos

Las variables número de nódulos, contenido de Ms (kg ha^{-1}), contenido de N (%), porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera y cantidad de N fijado (kg ha^{-1}) fueron sometidos a un análisis de varianza de acuerdo con el diseño experimental utilizado y con una comparación de promedios mediante la prueba Tukey (0.05), utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurión XVII (Statgraphics, 2014).

Resultados

Las variables analizadas mostraron diferencias significativas por efecto de las especies y fecha de muestreo ($p < 0.05$); sin embargo, la interacción especies \times fecha de muestreo no fue significativa. En el Cuadro 1 se presenta el crecimiento de las tres especies de *Lupinus* y planta control (cebada) en términos de acumulación promedio de Ms y concentración de N, así como el contenido de N que presentaban las semillas en el momento de la siembra. Antes de los 93 Dds se observó una lenta acumulación de Ms en todas las espe-

cies con excepción de *L. exaltatus*. Posteriormente la cantidad de Ms se incrementó conforme las plantas alcanzaban la madurez; sin embargo, estos incrementos no fueron de la misma magnitud en todas las especies. En la Figura 2 se muestran las temperaturas promedio que se registraron en Zapopan, Jalisco, durante el desarrollo del experimento. En cada muestreo realizado la producción promedio de Ms tiende a ser más alta en *L. exaltatus*, mientras que la producción más baja de Ms se registró en *L. rotundiflorus* (Cuadro 1). Después de realizar el último muestreo, *L. exaltatus* acumuló 8274 kg ha^{-1} , mientras que *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* acumularon 6404 y 2950 kg ha^{-1} , respectivamente.

En la especie utilizada como referencia, la concentración de N varió de 1.08 a 1.25%. Sin embargo, en las diferentes especies de *Lupinus*, la concentración de N fluctuó de 2.5 a 4% dependiendo de la edad de las plantas (Dds). En *L. exaltatus* y *L. mexicanus* se observó una tendencia a disminuir la concentración de N conforme se incrementó la edad de las plantas. Con respecto al número promedio de nódulos por planta, también se observó un incremen-

Cuadro 1: Acumulación de materia seca y contenido de N en tres especies del género *Lupinus* L. durante el crecimiento. Promedios seguidos por la misma letra dentro de cada columna indican que no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). Dds=Días después de la siembra.

Especies/Dds	Materia seca (g planta ⁻¹)	Materia seca (kg ha ⁻¹)	N en Materia seca (%)	N en semillas (%)
<i>L. exaltatus</i> Zucc.				
93	29.2 b	3482 b	3.5 a	5.97
108	31.8 b	3816 b	3.2 a	
122	68.9 a	8274 a	2.7 b	
<i>L. rotundiflorus</i> M.E Jones				
93	2.50 c	300 c	3.3 b	6.29
108	7.93 b	952 b	4.0 a	
122	23.37 a	2950 a	3.6 b	
<i>L. mexicanus</i> Cerv. ex Lag.				
93	2.8 c	345 c	3.3 a	5.13
108	14.1 b	1702 b	2.6 b	
122	49.4 a	6404 a	2.5 b	
Cebada				
93	5.2	1560	1.08	1.74
108	9.4	2820	1.25	
122	8.9	2670	1.25	

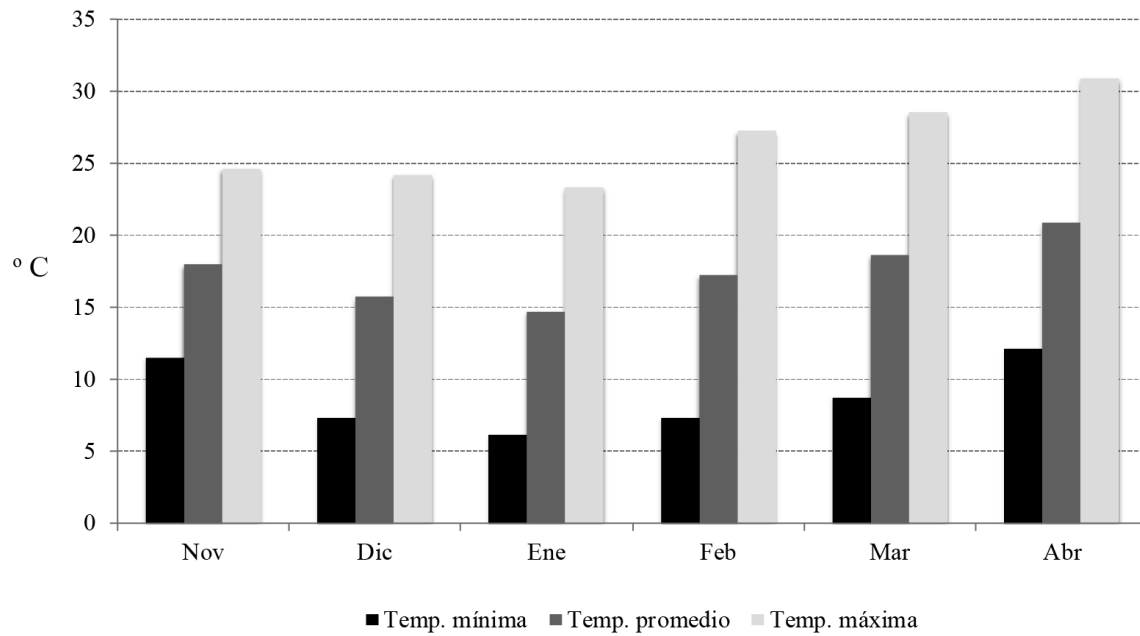


Figura 2: Temperaturas máximas, mínimas y promedio registradas durante el crecimiento de *Lupinus exaltatus* Zucc., *L. rotundiflorus* M.E. Jones y *L. mexicanus* Cerv. ex Lag. Datos obtenidos de la estación meteorológica localizada en la base aérea militar n° 5 de Zapopan, Jalisco, México.

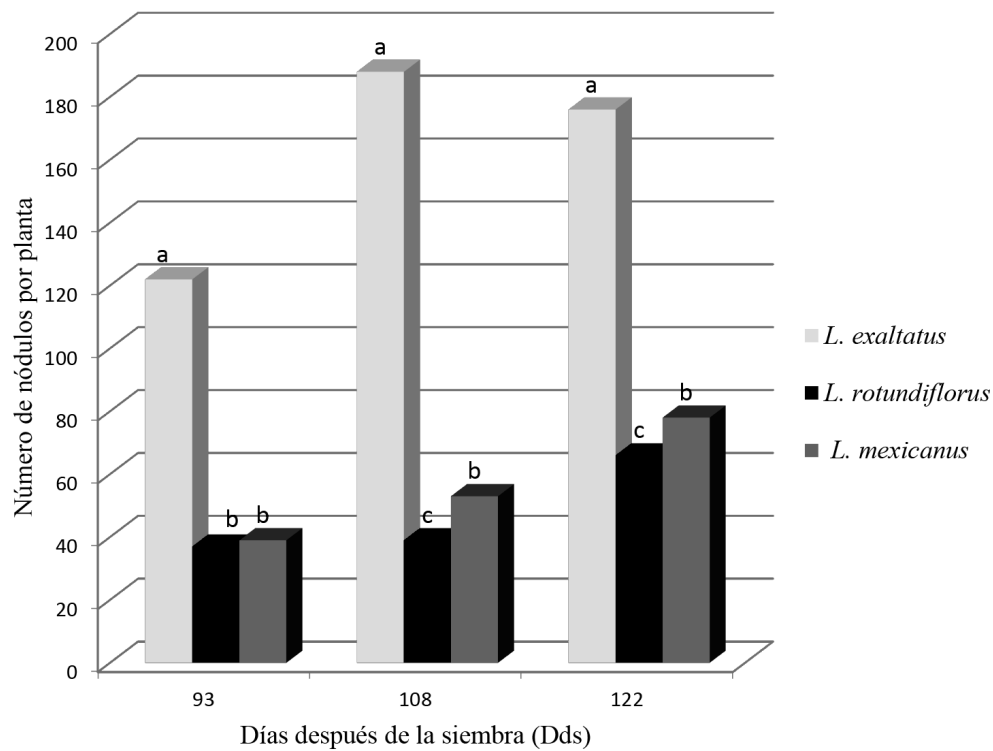


Figura 3: Número de nódulos durante el crecimiento de tres especies silvestres del género *Lupinus* L. en suelos de Zapopan, Jalisco, México.

Cuadro 2: Porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (Ndda) y N fijado en *Lupinus exaltatus* Zucc., *L. mexicanus* Cerv. ex Lag. y *L. rotundiflorus* M.E. Jones sembrados en suelos de Zapopan, Jalisco, México. Promedios seguidos por la misma letra dentro de cada columna indica que no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Especie/Dds	Contenido de N (g planta ⁻¹)	Contenido N total (kg ha ⁻¹)	Fijación Biológica del nitrógeno	
			Ndda (%)	N fijado (kg ha ⁻¹)
<i>L. exaltatus</i> Zucc.				
93	1.02	122.6	71.0 b	87.4 b
108	1.01	122.1	70.9 b	86.9 b
122	1.86	223.2	83.8 a	187.0 a
<i>L. rotundiflorus</i> M.E. Jones				
93	0.08	9.91	0.0 c	0.0 c
108	0.31	37.2	2.85 b	2.01 b
122	0.84	100.8	64.54 a	65.6 b
<i>L. mexicanus</i> Cerv. ex Lag.				
93	0.09	10.8	0.0 c	0.0 c
108	0.36	43.2	7.18 b	2.75 b
122	1.23	148.2	76.4 a	113.62 a
Cebada				
93	0.04	12.80	-	-
108	0.11	35.20	-	-
122	0.11	35.20	-	-

to significativo de éstos conforme las plantas alcanzaban la madurez (Fig. 3). Nuevamente, *L. exaltatus* se caracterizó por presentar en cada uno de los muestreos realizados el mayor número de nódulos. La cantidad de N fijado y % Ndda mostraron diferencias significativas por efecto de las especies y periodos de muestreo (Dds). En el Cuadro 2 se muestran los valores promedio N fijado y % Ndda por especie y muestreo, los cuales fluctuaron de 0 a 187.0 kg N ha⁻¹ y de 0 a 83.8% respectivamente. A los 93 Dds la cantidad promedio de N fijado en *L. exaltatus* fue de 87.4 kg ha⁻¹ equivalente a 71% de Ndda, mientras que en *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus*, la fijación de N fue inapreciable o nula, lo cual puede estar relacionado a una menor nodulación (Fig. 3) y en consecuencia una pobre acumulación de Ms en estas especies en comparación a *L. exaltatus* (Cuadro 1).

A los 108 Dds, en *L. mexicanus* y *L. exaltatus* se observó un balance positivo respecto a la FBN, pero con baja cantidad N fijado y baja proporción de Ndda (Cuadro 2). Sin embargo, en *L. exaltatus*, la cantidad de N fijado y el porcentaje de

Ndda fueron significativamente similares a los que se registraron en el muestreo anterior (87.4 kg ha⁻¹ y 71% vs 86.9 kg ha⁻¹ y 70.9% respectivamente). En el último muestreo realizado (122 Dds) se registraron los porcentajes más altos de Ndda y cantidad N fijado, con valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre las especies estudiadas. Los % de Ndda fueron más altos en *L. exaltatus* y *L. mexicanus* que en *L. rotundiflorus* con 83.8, 76.4 y 64.5%, lo cual corresponde a una cantidad de N fijado de 187, 113.62 y 65.6 kg ha⁻¹, respectivamente.

Discusión

Únicamente *L. exaltatus* registró un rendimiento de Ms acumulada superior o igual al que se ha registrado en otras especies domesticadas o silvestres del género *Lupinus* (Kittessa, 1992; Romero, 1993; Björnsson, 2007; Prusiński, 2014; Zamora et al., 2017). La mayor acumulación de Ms en *L. exaltatus* indica probablemente una mejor adaptación a los suelos ácidos, arenosos e infértiles de Zapopan, Jalisco, así como a una adecuada adaptación a las condiciones de

temperatura registradas durante el estudio, ya que el agua no fue un factor limitante. Los valores de N encontrados en la materia seca de las tres especies en estudio se encuentran dentro de los rangos que se han reportado en otras especies del género *Lupinus*, tanto domesticadas como silvestres (Kitessa, 1992; Björnsson, 2007; McNeill y Fillery, 2008; Prusiński, 2014).

La declinación del N en *L. exaltatus* y *L. mexicanus* conforme se incrementó la edad de las plantas es un comportamiento que ha sido reportado en varias especies no leguminosas y leguminosas, incluyendo especies cultivadas del género *Lupinus* como *L. luteus*, *L. albus* y *L. mutabilis* (Romero et al., 1993; Plénet y Lemaire, 1999; Barbazán et al., 2002; Pérez et al., 2004; Prusiński, 2014). Sin embargo, el tiempo en que da inicio el descenso de la concentración de N en función del estado de madurez ha sido variable en diferentes especies estudiadas (Gastal y Lemaire, 2002; Prusiński, 2014).

La nula fijación de N en las primeras etapas del crecimiento, particularmente en *L. rotundiflorus* y *L. mexicanus* es una característica que también fue registrada en *Lupinus albus* y *L. mutabilis* (Schulz et al., 1999), así como en otras especies de leguminosas utilizando el mismo método que se aplicó en esta investigación (Sanginga et al., 1996; Unkovich y Pate, 2000). Lo anterior indica que el N total acumulado en los tejidos de *L. rotundiflorus* y *L. mexicanus* durante los 93 Dds fue menor al que se registró en la especie de referencia (cebada). Por lo tanto, es posible señalar que el bajo contenido de N total acumulado en estas especies durante las etapas iniciales del crecimiento fue obtenido directamente del suelo y probablemente de la remobilización del nitrógeno almacenado como reserva en los cotiledones de las semillas utilizadas en la siembra. Lo anterior fue también reportado por Ayisi et al. (1992) al evaluar la fijación de N atmosférico en otras especies de *Lupinus* cultivadas. Los porcentajes de Ndda obtenidos en el último muestreo (122 Dds) son similares a los que se registraron en las primeras investigaciones realizadas en especies del género *Lupinus*. Por ejemplo en Australia, Unkovich et al. (1997) reportaron en *L. angustifolius* un valor de 77% de Ndda, mientras que en Islandia, Pálmason et al. (1992), mediante técnicas que involucran ^{15}N , mencionaron en *L. angustifolius* un porcentaje de Ndda de 90% a los 177 Dds, el cual es superior a los

valores de % Ndda obtenidos con las especies del presente estudio. Posteriormente en Chile, Barrientos et al. (2002), en *L. angustifolius* y *L. albus* a los 160 Dds registraron en promedio 80% de Ndda, similar al que se registró en este estudio con *L. exaltatus* (83%). Con respecto a las especies silvestres, los porcentajes de Ndda obtenidos en este estudio son inferiores a los reportados por Pálmason et al. (2002) en *L. nootkatensis* Donn ex Sims, ya que el % Ndda varió durante cinco años de 97.6 a 99.6%. Sin embargo, los valores de N fijado ($80\text{--}90\text{ kg ha}^{-1}$) fueron muy similares o inferiores a los obtenidos en esta investigación con *L. exaltatus* y *L. mexicanus* en función de la fecha de muestreo. El mismo patrón se registró en *L. arboreus* Sims, ya que Baker et al. (1986), aunque no cuantificaron el % de Ndda, reportaron una cantidad de N fijado de 80 kg ha^{-1} anualmente.

Las variaciones observadas entre los resultados obtenidos en este estudio y los resultados de otras investigaciones con respecto al % Ndda y cantidad de nitrógeno fijado pueden ser explicadas en términos de diferencias con respecto a la especie estudiada, fecha de muestreo, condiciones climáticas y edáficas durante la investigación, así como la metodología utilizada para cuantificar la fijación de N atmosférico y especie de referencia utilizada (Herridge, 1982; Duthion et al., 1987; Evans et al., 1989; Larson et al., 1989; Pálmason et al., 1992; Barrientos et al., 2002). Es probable que los altos valores de materia seca y N fijado en *L. exaltatus* en comparación con *L. mexicanus* y *L. rotundiflorus* estén relacionados a una eficiente simbiosis entre las raíces de esta especie y bacterias nativas del suelo fijadoras de N atmosférico, ya que de las tres especies en estudio, *L. exaltatus* fue la que mostró mayor número de nódulos bacterianos en la raíces desde las primeras etapas del crecimiento.

Los resultados obtenidos en la presente investigación representan las primeras estimaciones sobre la proporción de N en la planta que proviene de la atmósfera y cantidad de N que fijan algunas especies silvestres del género *Lupinus* en México. Aunque algunos autores consideran que el método de la diferencia no es el más confiable para estudiar la FBN (Unkovich y Pate, 2000), en estudios con diferentes leguminosas donde se han comparado la técnica de la dilución isotópica de ^{15}N y el método de la diferencia de N, no se han encontrado diferencias significativas en la

cantidad de N fijado (Khol et al., 1980; Martín et al., 2017). Por cada tonelada de Ms producida en el último muestreo se estimó que las especies en estudio fijaron aproximadamente 20 kg de N ha⁻¹, lo cual coincide con lo reportado por Unkovich et al. (2010), quienes, mediante modelos lineales para relacionar la producción de Ms con la cantidad de nitrógeno fijado en varias especies de leguminosas (forrajeras y de grano), reportaron valores de 18.7 a 24.3 kg N fijado por tonelada de materia seca cosechada. Lo anterior indica la importancia que pueden tener en un futuro las especies estudiadas como fuente de N para otros cultivos después de su incorporación al suelo en etapa de floración como abono verde.

Conclusiones

Las tres especies en estudio mostraron habilidad para acumular materia seca y fijar N atmosférico en las condiciones en las que se desarrolló el experimento. La especie con mayor potencial de adaptación a estas condiciones en términos de mayor número de nódulos por planta, mayor acumulación de Ms y mayor cantidad de N fijado fue *L. exaltatus*. La técnica utilizada en este estudio es confiable para obtener las primeras estimaciones sobre la cantidad de N que potencialmente pueden obtener de la atmósfera y fijar diferentes especies del género *Lupinus*.

Contribución de autores

JFZ planeó y dirigió el estudio, AVH colaboró con la medición de variables y análisis de nitrógeno en el laboratorio e IZH realizó el análisis e interpretación de los resultados. JFZ escribió el manuscrito con la colaboración de IZH.

Financiamiento

Este estudio fue apoyado por el Programa de Apoyo a la Mejora en las Condiciones de Producción de los Miembros del Sistema Nacional de Investigadores y del Sistema Nacional de Creadores de Arte (PRO-SNI) 2015 y 2016 de la Universidad de Guadalajara.

Agradecimientos

Los autores agradecen a José Sánchez Martínez por facilitar el terreno agrícola e instalar el sistema de riego donde se llevó a cabo el experimento.

Literatura citada

- Atchison, G. W., B. Nevado, R. J. Eastwood, N. Contreras-Ortiz, C. Reynel, S. Madriñán, D. A. Filatov y C. E. Hughes. 2016. Lost crops of the Incas: Origins of domestication of the Andean pulse crop tarwi, *Lupinus mutabilis*. *American Journal of Botany* 103(9): 1592-1606. DOI: <https://dx.doi.org/10.3732/ajb.1600171>
- Ayisi, K. K., D. H. Putnam, C. P. Vance y P. H. Graham. 1992. Dinitrogen fixation, nitrogen and dry matter accumulation, and nodulation in white lupine. *Crop Science* 32(5): 1197-1202. DOI: <https://dx.doi.org/10.2135/cropsci1992.0011183X003200050028x>
- Baker, T. G., G. R. Oliver y P. D. Hodgkiss. 1986. Distribution and cycling of nutrients in *Pinus radiata* as affected by past lupin growth and fertiliser. *Forest Ecology and Management* 17(2-3): 169-187. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/0378-1127\(86\)90110-6](https://dx.doi.org/10.1016/0378-1127(86)90110-6)
- Barbazán, M., M. Ferrando y J. P. Zamalvide. 2002. Acumulación de materia seca y nitrógeno en gramíneas anuales invernales usadas como cobertura vegetal en viñedos. *Agrociencia* 6(1): 10-19.
- Barrientos, L., A. Montenegro e I. Pino. 2002. Evaluación de la fijación simbiótica de nitrógeno de *Lupinus albus* y *L. angustifolius* en un Andisol Vilcun del sur de Chile. *Terra Latinoamericana* 20(1): 39-44.
- Bermúdez, T. K., Q. N. Robledo, H. J. Martínez, T. Andreas y M. Wink. 2000. Biodiversity of the genus *Lupinus* in Mexico. In: Van Santen, E., M. Wink, S. Weissmann y P. Römer (eds.). *Proceedings 9th International Lupin Conference*. International Lupin Association. Klink/Müriz, Germany. Pp. 294-296.
- Björnsson, H. 2007. Fertilization of Nootka lupin (*Lupinus nootkensis*) for biomass production and carbon sequestration. *Icelandic Agricultural Sciences* 20: 81-92.
- Boller, B. C. y J. Nösberger. 1994. Differences in nitrogen fixation among field-grown red clover strains at different levels of ¹⁵N fertilization. *Euphytica* 78(3): 67-174.
- Bremner, J. y D. Keeney 1965. Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Analytica Chimica Acta* 32: 485-495.
- Carlsson, G. y K. Huss-Danell. 2003. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant and Soil* 253(2): 353-372.
- Cueto-Wong, J. A., D. G. Reta-Sánchez, U. Figueroa-Viramontes, H. M. Quiroga-Garza, A. Ramos-Rodríguez y J. J. Peña-Ca-

- briales. 2013. Recuperación de nitrógeno aplicado en forma fraccionada en maíz forrajero utilizando ^{15}N . *Ingeniería Agrícola y Biosistemas* 5(1): 11-16.
- Drummond, C. S., R. J. Eastwood, S. T. S. Miotto y C. E. Hughes. 2012. Multiple continental radiations and correlates of diversification in *Lupinus* (Leguminosae): Testing for key innovation with in complete taxon sampling. *Systematic Biology* 61(3): 443-460. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/sysbio/syr126>.
- Duthion, C., N. Amarger, A. Mariotti, V. Durey, J. J. Giraud, J. Gonthier, P. Mathey y G. Sommer. 1987. Accumulation potentielle de matière sèche et d'azote chez le lupin blanc de printemps (*Lupinus albus* L.). *Agronomie* 7(8): 585-593.
- Evans, J., G. E. O'Connor, G. L. Turner, D. R. Coventry, N. Fettell, J. Mahoney, E. L. Armstrong y D. N. Walscott. 1989. N_2 fixation and its value to soil N increase in lupin, field pea and other legumes in south-eastern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 40(4): 791-805. DOI: <https://dx.doi.org/10.1071/AR9890791>
- Gastal, F. y G. Lemaire. 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany* 53(370): 789-799. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/jexbot/53.370.789>
- Hardason, G. y S. K. A. Danso. 1993. Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil* 152(1): 19-23.
- Herridge, D. F. 1982. Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. *Plant Physiology* 70(1): 1-6.
- INEGI. 2001. Modelo digital de elevación escala 1: 50,000. In: INEGI (ed.). Modelos digitales de elevación, disco compacto. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes, México.
- Kitessa, S. M. 1992. The nutritional value of Russell lupin (*Lupinus polyphyllus* x *Lupinus arboreus*) for sheep. M. Agr. Sci thesis. Lincoln University. Christchurch, New Zealand. 143 pp.
- Kohl, D. H., G. Shearer y J. E. Harper. 1980. Estimates of N_2 fixation based on differences in the natural abundance of ^{15}N in nodulating and nonnodulating isolines of soybeans. *Plant Physiology* 66(1): 61-65.
- 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. Pp. 147-164.
- Larson, K. J., K. G. Cassman y D. A. Phillips. 1989. Yield, dinitrogen fixation and aboveground nitrogen balance of irrigated white lupin in a Mediterranean climate. *Agronomy Journal* 81(3): 536-543. DOI: <https://dx.doi.org/10.2134/agronj1989.00021962008100030029x>
- Lemus, L. O., E. E. Herrera y C. T. Jiménez. 1986. La tsirangeramani (*Lupinus* spp.) en la Meseta Purépecha. Dirección General de Culturas Populares-Serie Contribuciones. Uruapan, México. 42 pp.
- Lindig-Cisneros, R., A. Blanco-García, C. Sáenz-Romero, P. Alvarado-Sosa y N. Alejandro-Melena. 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.
- Martín, G. M., R. A. Rivera y Y. Mujica. 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.
- Martín, G. M., Y. A. Tamayo, I. F. Hernández, M. N. Varela y E. A. da Silva. 2017. Cuantificación de la fijación biológica de nitrógeno en *Canavalia ensiformis* crecida en un suelo pardo mullido carbonatado mediante los métodos de abundancia natural de ^{15}N y diferencia de N total. *Cultivos Tropicales* 38(1): 122-130.
- Masson-Boivin, C. y J. L. Sachs. 2018. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia-the roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology* 44: 7-15. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.001>
- McNeill, A. M. e I. R. P. Fillery. 2008. Field measurement of lupin belowground nitrogen accumulation and recovery in the subsequent cereal-soil system in a semi-arid mediterranean-type climate. *Plant Soil* 302: 297-316. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s11104-007-9487-y>
- McVaugh, R. 1987. *Lupinus*, Vol. V. Leguminosae. In: McVaugh, R. (ed.). *Flora Novogaliciana: A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico*. The University of Michigan Press. Ann Arbor, USA. Pp. 580-599.
- Medina-Sánchez, E. y R. Lindig-Cisneros. 2005. Effect of scarification and growing media on seed germination of *Lupinus elegans* H.B.K. *Seed Science and Technology* 33(1): 237-241. DOI: <https://dx.doi.org/10.15258/sst.2005.33.1.24>
- Pálmason, F., J. Gudmundsson y H. Sverrisson. 2002. Estimates of symbiotic nitrogen fixation in two lupin species in Iceland.

- In: Van Santen, E. y G. D. Hill (eds.). Proceedings 10th International Lupin Conference. International Lupin Association. Laugarvatn, Iceland. Pp. 118-120.
- Pálmason, F., S. K. A. Danso y G. Hardason. 1992. Nitrogen accumulation in sole and mixed stands of sweet-blue lupin (*Lupinus angustifolius* L.) ryegrass and oats. *Plant and Soil* 142: 135-142.
- Pérez, A. J. A., M. E. García, Q. J. F. Enríquez, C. A. R. Quero, P. J. Pérez y G. A. Hernández. 2004. Análisis de crecimiento, área foliar específica y concentración de nitrógeno en hojas de pasto "Mulato" (*Brachiaria híbrido* cv.). *Técnica Pecuaria Mexicana* 42(3): 447-458.
- Plénet, D. y G. Lemaire. 1999. Relationships between dynamics of N uptake and dry matter accumulation in maize crops. Determination of critical N concentration. *Plant and Soil* 216(1-2): 65-82.
- Prusiński, J. 2014. Dynamics and distribution of dry matter and total nitrogen in yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) plants. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 17(2): 1-11.
- Radic, S. y J. McAdam. 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 (Chile)* 40(2): 95-102.
- Ramírez-Contreras, A. y D. A. Rodríguez-Trejo. 2009. Plantas nodriza en la reforestación con *Pinus hartwegii* Lindl. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 15(1): 43-48.
- Romero, R. V., S. T. Hazard, B. M. Márquez y L. M. Hiriart. 1993. Evaluación agronómica de dos especies de lupino *Lupinus albus* y *Lupinus mutabilis* como alternativas de forraje suplementario en secano. *Agricultura Técnica* 53: 303-309.
- Ruiz, C. J. A., A. I. J. González, C. J. Anguiano, V. I. Vizcaíno, C. D. Ibarra, G. J. Alcalá, V. S. Espinosa y L. H. E. Flores. 2003. Estadísticas climatológicas básicas para el estado de Jalisco (período 1961- 2000)-(Libro Técnico Núm. 1). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Centro de Investigación Regional Pacífico Centro-Campo Experimental Centro de Jalisco. Conexión Gráfica. Guadalajara, México. 281 pp.
- Sanginga, N., L. E. Wirkom, J. A. Okogun, I. O. Akobundu, R. J. Carsky y G. Tian. 1996. Nodulation and estimation of symbiotic nitrogen fixation by herbaceous and shrub legumes in Guinea savanna in Nigeria. *Biology and Fertility of Soils* 23(4): 441-448.
- Schulz, S., J. D. H. Keatinge y J. G. Wells. 1999. Productivity and residual effects of legumes in rice-based cropping systems in a warm-temperate environment. I. Legume biomass production and N fixation. *Field Crops Research* 61(1): 23-35. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0378-4290\(98\)00146-4](https://dx.doi.org/10.1016/S0378-4290(98)00146-4)
- Statgraphics, C. 2014. Statgraphics Centurion XVII. User Manual. Version, 17 (8.0). Herndon, USA.
- Sujak, A., A. Kotlarz y W. Strobel. 2006. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food Chemistry* 98(4): 711-719. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.036>
- Unkovich, M. J. y J. S. Pate. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research* 65(2-3): 211-228. DOI: [https://dx.doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00088-X](https://dx.doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00088-X)
- Unkovich, M. J., J. Baldock y M. B. Peoples. 2010. Prospects and problems of simple linear models for estimating symbiotic N₂ fixation by crop and pasture legumes. *Plant and Soil* 329(1-2): 75-89. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0136-5>
- Unkovich, M. J., J. S. Pate y P. Sanford. 1997. Nitrogen fixation by annual legumes in Australian Mediterranean agriculture. *Australian Journal Agricultural Research* 48: 267-293.
- Weisany, W., Y. Raei y K. H. Allahverdipoor. 2013. Role of Some of Mineral Nutrients in Biological Nitrogen Fixation. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences* 2(4): 77-84.
- Zamora, N. J. F., O. C. del Rio, H. I. Zapata, R. R. Macías y L. P. M. García. 2017. Preliminary estimation of forage yield and feeding value of *Lupinus angustifolius* varieties cultivated in Jalisco, México, during the cool season. *Legume Research* 40(6): 1060-1065. DOI: <https://dx.doi.org/10.18805/Ir.v0iOF.9111>