



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGIA

EFFECTO NUTRICIONAL DE *Lupinus montanus* SOBRE *Zea mays* L. EMPLEANDO RIZOTRONOS

JUAN ESPINOSA GONZALEZ

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente, tesis titulada: **Efecto nutricional de *Lupinus montanus* sobre *Zea mays* L., empleando rizotronos.** Realizada por el alumno: Juan Espinosa Gonzalez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

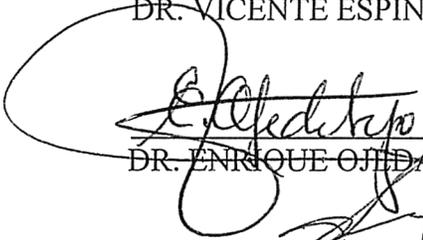
EDAFOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

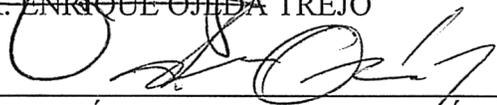
CONSEJERO

  
DR. VICENTE ESPINOSA HERNÁNDEZ

ASESOR

  
DR. ENRIQUE OJEDA TREJO

ASESOR

  
DR. JULIÁN DELGADILLO MARTÍNEZ

ASESOR

  
M.C. JUAN CELESTINO MOLINA MORENO

ASESOR

  
M.C. FRANCISCO LANDEROS SÁNCHEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2014

## **EFECTO NUTRICIONAL DE *Lupinus montanus* SOBRE *Zea mays* L. EMPLEANDO RIZOTRONOS.**

**Juan Espinosa Gonzalez, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2014**

El maíz es uno de los granos básicos más importantes en nuestra alimentación, generalmente su plantación se realiza en unicultivo, la producción de este grano se ve afectada por diversos problemas ambientales y sociales. Dentro de los ambientales, la fertilidad del suelo ha sido una limitante para la producción, y debido a esto el uso de fertilizantes se ha incrementado lo que provoca un daño en el equilibrio del suelo. Los nutrimentos responsables de un óptimo crecimiento en las plantas son el nitrógeno y el fósforo; el maíz es un cultivo con altos requerimientos de estos elementos. El problema radica en el fósforo que tiene alta reactividad en la matriz del suelo, por lo que es fijado en un tiempo muy corto, esto hace que las plantas no tengan disponibilidad de él. Este fenómeno se presenta con mayor fuerza en suelos derivados de cenizas volcánicas y en suelos con altos contenidos de calcio. El género *Lupinus* y específicamente *Lupinus albus* a través de sus raíces clusters o proteoides tienen la capacidad de solubilizar fracciones de fósforo cuando se encuentra en una condición limitada de este elemento. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de *Lupinus montanus* bajo condiciones de estrés de fósforo en asociación con maíz, utilizando un suelo arenoso con bandas de fosfato de calcio. El trabajo se realizó en cámaras de crecimiento, utilizando rizotronos, que nos permitieron observar el crecimiento y el comportamiento radical de ambas especies. El análisis de fósforo en el tejido vegetal, nos indica que la concentración de fósforo en maíz fue ligeramente mayor en asociación, que monocultivo. Con esto podemos concluir que *Lupinus montanus* es capaz de solubilizar fracciones de fósforo que deja disponibles para otros cultivos; así mismo se observó que no se desarrollaron las estructuras proteoides, lo que deja abierto el estudio para otras especies silvestres.

**Palabras clave:** Maíz, *Lupinus*, fósforo, rizotronos.

## **EFFECT OF NUTRITIONAL *Lupinus montanus* ON *Zea mays* L. USING RIZOTRONOS.**

**Juan Espinosa Gonzalez, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2014**

Corn is one of the most important in our food grains, usually planting is done in unicultivo, production of this grain is affected by various environmental and social problems. Among the environmental, soil fertility has been a limiting factor for production, and because of this the use of fertilizers has increased causing damage to the balance soil. Nutrients responsible for optimum plant growth include nitrogen and phosphorus; corn is a crop with high requirements of these elements. This phenomenon occurs more strongly in soils derived from volcanic ash and soils with high calcium. The genus *Lupinus*, and specifically *Lupinus albus* through their roots proteoids or clusters have the ability to solubilize phosphate fractions when in a limited condition of this element. The aim of this investigation was to evaluate the effect of *Lupinus montanus* low phosphorus stress conditions in association with corn, using a sandy soil with calcium phosphate bands. The work was conducted in growth chambers using rhizotrons, which allowed us to observe growth and radical behavior of both species. Analysis of phosphorus in plant tissue, indicates that the concentration of phosphorus in corn was slightly higher in association, monoculture. With this we can conclude that *Lupinus montanus* is able to solubilize phosphorus fractions leaving available for other crops; also observed that proteoids structures not developed, leaving open the study for other wildlife.

**Keywords:** Corn, *Lupinus*, phosphorus, rhizotrons.

## **DEDICATORIA**

Mi tesis la dedico:

A Dios por darme la oportunidad de vivir y demostrarme el camino correcto.

A mi familia por apoyarme, darme su cariño y amor.

A mi hija Valeria Espinosa, por estar presente en cada uno de mis pensamientos, motivo que me inspira a seguir luchando.

A ti Vicente, que has sido más que un padre, por todo ese cariño brindado, esto es fruto de lo que sembraste en algún momento de mi vida.

A mi pareja María Luisa González por compartir parte de su vida, mujer a la que amo y respeto con todo mi corazón.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillos, por aceptarme como estudiante de tan importante centro investigación.

Al Posgrado de Botánica que me permitió usar las cámaras de crecimiento.

Al laboratorio de Microbiología por facilitarme los materiales para el aislamiento e identificación de bacterias.

A mi consejo particular, integrado por: Dr. Vicente Espinosa Hernández, Dr. Enrique Ojeda Trejo, Dr. Julián Delgadillo Martínez, M.C. Juan Celestino Molina Moreno, M.C. Francisco Landeros Sánchez, por toda su paciencia y dedicación en el desarrollo de la presente tesis.

A María Luisa González por apoyarme en campo y en el laboratorio.

A mis grandes amigos de maestría, Josefina, Angélica y Cristian, personas importantes por el apoyo y aporte de sus conocimientos, que fueron de gran utilidad para terminar la tesis.

A la Dra. Alejandrina, por contribuir en mi educación académica, pero sobre todo por su amistad incondicional en todo momento.

Al departamento de carpintería, ellos fueron parte fundamental de este trabajo, encargados de construir los rizotrones.

A la familia González Ovando, por su apoyo en todo momento.

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1. Objetivos generales .....	3
2.2. Hipótesis .....	3
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
3.1. Asociación de cultivos.....	5
3.2. <i>Lupinus</i> .....	6
3.3. Fósforo.....	11
3.4. Raíces con estructuras especializadas: Raíces “clusters” .....	13
3.5. <i>Lupinus</i> y la importancia de bacterias fijadoras de nitrógeno .....	21
3.6. Nitrógeno fijado y respuestas a la inoculación .....	22
3.7. Maíz .....	25
3.8. El uso de rizotrófonos en estudios de plantas.....	30
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1. Sitio del experimento y material biológico.....	33
4.2. Diseño de rizotrones .....	35
4.3. Aislamiento de bacterias simbióticas fijadoras de N atmosférico.....	37
4.4. Producción del inóculo .....	38
4.5. Aislamiento de ADN (protocolo para aislar bacterias) (Doyle and Doyle, 1990). .....	39
Procedimientos analíticos para el análisis de plantas después de la cosecha (Raíz). .....	46
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>47</b>
5.1. Fósforo en parte aérea y radical de maíz en suelo arenoso.....	47
5.2. Nitrógeno en parte aérea y radical de maíz en suelo arenoso.....	52
5.3. Fósforo en parte aérea y radical de maíz en suelo andosol .....	55
5.4. Nitrógeno parte aérea y radical de maíz en suelo andosol .....	56
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>59</b>
<b>7. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>60</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>70</b>

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de ácidos grasos de <i>Lupinus</i> (Gross <i>et al.</i> , 1982). -----	9
Cuadro 2. Comparación de la composición de <i>Lupinus</i> y soya -----	9
Cuadro 3. <i>Lupinus albus</i> en suelo calcáreo (Modificado de Dinkelaker <i>et al.</i> , 1989). -----	17
Cuadro 4. Promedio del % de Nitrógeno derivado de la fijación biológica (FBN) de las principales leguminosas en experimentos y cultivos agrícolas -----	23
Cuadro 5. Fijación de nitrógeno de diferentes especies de <i>Lupinus</i> . -----	23
Cuadro 6. Etapas de crecimiento, agrupadas en cuatro grandes períodos. -----	28
Cuadro 7. Requerimientos y extracción en grano de nutrientes para producir una tonelada de grano de maíz. -----	29
Cuadro 8. Estudios realizados en rizotrones Fuente: Modificado de Guedea-Fernández <i>et al.</i> , 2001. -----	31
Cuadro 9. Características de la semilla de maíz utilizada. -----	34
Cuadro 10. Análisis en arena -----	34
Cuadro 11. Análisis en andosol -----	35
Cuadro 12. Medio de cultivo ELMARC (Ferrera, 1993) -----	38
Cuadro 13. Cuantificación de la carga de rizobios en el inóculo, como indicador de la calidad. -	41
Cuadro 14. Tratamiento de dos réplicas en arena -----	44
Cuadro 15. Tratamiento de una réplica en andosol -----	45
Cuadro 16. Procedimientos analíticos para el análisis de plantas -----	46
Cuadro 17. Rango de contenido de nutrientes en el tejido foliar de <i>Zea mays</i> (Jones, 1998). -----	48
Cuadro 18. Nodulación en plantas de <i>Lupinus</i> . -----	57

## INDICE FIGURAS

Figura 1. Especies representativas de <i>Lupinus</i> en México.....	7
Figura 2. Distribución de especies silvestres de <i>Lupinus</i> en el Eje neovolcánico. ....	7
Figura 3. a) y b). Raíces “clusters” .....	13
Figura 4. Raíces “clusters”.....	14
Figura 5. Morfología de raíces “clusters” . ....	15
Figura 6. Morfología de raíces “clusters”. a) <i>Hakea petiolaris</i> y b), c) <i>Hakea prostrata</i> (Shane <i>et al.</i> , 2003). ....	15
Figura 7. Sistema de raíces de <i>Lupinus albus</i> en cultivo hidropónico .....	16
Figura 8. Ácidos orgánicos secretados por la raíz durante los diferentes estados de crecimiento de <i>Lupinus albus</i> (Modificado de Neumann y Römheld, 1999).....	17
Figura 9. Respuesta de las plantas a la limitación de fósforo inorgánico .....	19
Figura 10. Absorción por células de la raíz de <i>P</i> unido a otros cationes. ....	20
Figura 11a. Microfografía de fluorescencia .....	21
Figura 11b. Primordio nodular de <i>Lupinus</i> .....	22
Figura 12. Nódulo indeterminado de <i>Lupinus albus</i> . ....	22
Figura 13. Desarrollo embrionario de la raíz primaria y de las raíces escutelares seminales (RES) en maíz. ....	26
Figura 14. Desarrollo del sistema radicular del maíz.....	27
Figura 15. Producción de maíz en la República Mexicana.....	30
Figura 16. a) Ubicación de <i>Lupinus montanus</i> , b) Planta en campo, c) Semillas. ....	33
Figura 17. Muestreo de suelo en zigzag.....	35
Figura 18. Diseño de Rizotron .....	36
Figura 19. a) Planta de <i>Lupinus uncinatus</i> (Alderete <i>et al.</i> , 2008).....	37
Figura 20. a) Bacterias de nódulos de <i>Lupinus uncinatus</i> . b-c) Nódulos en plantas de <i>Lupinus monatanus</i> , después de 35 de haber inoculado. ....	40
Figura 21. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia. ....	41
Figura 22. Diseño de pruebas germinativas en campo.....	42
Figura 23. Comportamiento de los tratamientos de escarificación .....	42
Figura 24. Diseño de experimento en arena.....	43
Figura 25. Rizotrones con ángulo de 30° con respecto a la vertical .....	45
Figura 26. Contabilización y medición de raíces con el programa Image-tool.....	46
Figura 27. Rizotrones con arena, asociación y monocultivo.....	47
Figura 28. Rizotrones con suelo arenoso, a) maíz en monocultivo, b) maíz en asociación con <i>Lupinus</i> . ....	48
Figura 29. Arquitectura radicular de <i>Lupinus montanus</i> y de la asociación maíz/ <i>Lupinus</i> . ....	50
Figura 30. Concentración de fósforo en parte aérea de maíz (arena).....	51
Figura 31. Concentración de fósforo en parte aérea de maíz (arena).....	51
Figura 32. Fósforo en raíz de maíz (arena). ....	52

Figura 33. a), b), c), d) formación de nódulos en raíces de <i>Lupinus albus</i> sin <i>P</i> (- <i>P</i> ) y con <i>P</i> (+ <i>P</i> ) a los 21 días; e), f) formación de nódulos en raíces de <i>Lupinus montanus</i> con <i>Burkholderia</i> a los 60 días bajo condiciones de estrés de <i>P</i> . g) sistema radical de <i>L. montanus</i> con N, a los 60 días. ....	53
Figura 34. Nitrógeno en parte aérea de maíz (arena). .....	54
Figura 35. a) Desarrollo del experimento en cámaras de crecimiento; b), c) vista frontal de la asociación entre maíz y <i>Lupinus</i> en un rizotrono, d,e) <i>Lupinus</i> inoculado con <i>Burkholderia</i> a los 60 días en un suelo de origen volcánico (andosol)......	55
Figura 36. Fósforo en parte aérea de maíz (andosol). .....	56
Figura 37. Nitrógeno en parte aérea de maíz (andosol). .....	58

## 1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con estimaciones de la CONAPO (2014) la población mexicana a mediados del año 2013 era de 118 millones de habitantes y continuará con una tasa de crecimiento de 1.13. Para el año 2020 se espera una población 127 millones de habitantes. Por tal razón, habrá una fuerte demanda de alimentos (maíz, frijol, trigo, etc.). En este sentido se necesita incrementar la producción de granos básicos, lo que provocara que la producción de fertilizantes mantenga una tendencia creciente debido al incremento de la agricultura.

En las estadísticas internacionales México figura en el lugar 36 con 0.4% de la producción mundial de fertilizantes. Se estima que de los 21.9 millones de hectáreas que se sembraron en México en el año agrícola 2008, se fertilizó el 59.5%, es decir, 13.04 millones de hectáreas. Diez entidades concentraron el 66,7% de la superficie fertilizada: Jalisco (11.1%), Sinaloa (10.4%), Michoacán (7.2%), Guanajuato (7.1%), Chihuahua (6.2%), Zacatecas (5.7%), Tamaulipas (5.5%), Oaxaca (5.0%), Estado de México (4.2%) y Sonora (4.2%). Las zonas Centro Occidente y Centro Sur aparecen como grandes consumidoras de fertilizantes de baja concentración, como consecuencia del cercano abastecimiento de este tipo de fertilizantes, mientras que el Noroeste se caracteriza por consumir, en alta proporción, productos nuevos como fertilizantes líquidos, aerosoles y otros de reciente introducción en el mercado (FIRA, 2009).

Uno de los productos que más se producen en el campo mexicano es el maíz, para producir una tonelada de este grano se utilizan significantes cantidades de fertilizantes que contienen nitrógeno y fósforo, elementos que son responsables de un buen crecimiento en la planta. A diferencia del nitrógeno, el fósforo es un elemento que rápidamente se fija en el suelo a formas menos solubles por reacciones con compuestos orgánicos e inorgánicos, por lo cual se restringe su movilidad y su disponibilidad para la planta (Fassbender, 1982). La fijación de fósforo es un fenómeno que limita la producción agrícola.

Ante esta problemática es de gran importancia proponer alternativas que nos orienten a reducir el consumo de fertilizantes, así como tener estrategias de producción de alimentos que sean amigables con el medio ambiente. En este sentido la práctica de asociar cultivos es una estrategia en la producción agrícola. La técnica se basa principalmente en el crecimiento de dos o mas especies sobre una unidad de terreno, en la cual ocurre una combinación total o parcial de sus

ciclos (Navas y Marín, 1995). Esta interacción puede tener efectos inhibidores o estimulantes, dentro de los grandes retos en este tipo de estrategias, es la de reducir al máximo el grado de competencia entre las especies involucradas y obtener el máximo de complementariedad.

Se ha demostrado que el uso de ciertas leguminosas en rotación con él maíz (*Zea mays* L.) en las regiones cálidas húmedas de México mejora significativamente su productividad. La estabilidad de este sistema se atribuye entre otras razones, al abundante aporte de materia orgánica y de nitrógeno fijado a través de la simbiosis bacteriana con la raíz de las leguminosas; a la mejor nutrición del maíz por la rápida colonización de sus raíces con las micorrizas y por la reducción en la incidencia y daños a las raíces por patógenos del suelo. Al parecer la rotación de leguminosas hace posible que el productor eleve y mantenga los altos rendimientos, logrando su permanencia en las mismas áreas de cultivo (García *et al.*, 1994).

Las combinaciones de maíz-leguminosas generalmente sobrepasan en rendimiento a los monocultivos de maíz; en otras palabras, se necesita de más superficie bajo monocultivo de maíz, para producir el mismo rendimiento que en una hectárea de policultivo (Mead y Willey, 1980; Vandermeer, 1989).

En México se han identificado cerca de 100 especies silvestres de *Lupinus*, la mayor concentración de estas especies se encuentran en la Sierra Madre Occidental y en el Eje Neovolcánico Transversal (Ruiz-López *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se evalúa *Lupinus* como especie leguminosa, candidata a ser asociada con maíz, por la razón fundamental de que tiene la habilidad de adaptarse a suelos con problemas de fijación de fósforo, movilizándolo el elemento por medio de sus raíces “clusters”.

Los trabajos realizados con asociación *Lupinus*-maíz, son pocos o nulos a nivel de sistema radical, siendo uno de los órganos con más importancia. En esta investigación se utilizaron rizotrones que son dispositivos con los cuales se pueden realizar estudios de la arquitectura de la raíz y del cómo se comportan bajo diferentes condiciones ambientales, en este caso se usaron con el objetivo de estudiar el comportamiento de la raíz en dos especies en asociación.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos generales

- a) Evaluar la concentración de fósforo en el tejido vegetal de maíz en monocultivo, y asociado con *Lupinus*, en un suelo arenoso que tienen bandas de fosfato de calcio, como fuente de fósforo.
- b) Evaluar la concentración de fósforo en el tejido vegetal de maíz en monocultivo, y asociado con *Lupinus* en un andosol.
- c) Evaluar el sistema radical de maíz en asociación con *Lupinus*.

### 2.2. Hipótesis

- a) Las raíces de *Lupinus montanus.*, son capaces de liberar el fósforo que se encuentra en el fosfato de calcio y lo dejarán disponible para maíz.
- b) Las raíces de *Lupinus montanus.*, son capaces de liberar el fósforo que se encuentra retenido en la matriz del suelo andosol y lo dejarán disponible para maíz
- c) El uso de rizotrones permite hacer evaluaciones del sistema radical, entonces se podrá contabilizar y medir la longitud de las raíces de maíz bajo dos sistemas de cultivo.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

En las últimas décadas, el campo mexicano ha enfrentado una situación de crisis económica, productiva, ambiental y social, lo cual plantea un escenario de abandono y atraso en el medio rural.

De las 194.8 millones de hectáreas que conforman el territorio nacional, el 22% son destinadas para la agricultura. En esta superficie se encuentra una gran heterogeneidad de sujetos, regiones, historias, procesos económicos y sociales que sustentan la estructura agraria y productiva del campo mexicano. Estos territorios se distinguen por tener una amplia diversidad de condiciones geográficas, donde han ocurrido procesos históricos de organización social, económica y política que a lo largo del tiempo han configurado un panorama desigual en las distintas regiones del México rural (Zamora, 2011).

De manera general el campo mexicano se enfrenta a diferentes factores que afectan o dificultan la producción de alimentos, algunos de ellos son: la mala calidad y el bajo rendimiento de la tierra (erosión y degradación de los suelos); sequías, inundaciones y huracanes como efecto del incremento de la temperatura del planeta (cambio climático); recursos de capital, tales como maquinaria, instalaciones, y animales de trabajo que son de acceso muy limitado para los pequeños agricultores y la introducción de especies genéticamente modificadas (Zamora, 2011).

En este estudio se propone una alternativa para mejorar el rendimiento del suelo, por lo que es importante mencionar los principios de la agricultura ecológica. Al contrario de la agricultura convencional esta trata de imitar a la naturaleza, se busca una nutrición lenta y constante al fomentar la nutrición vegetal indirecta (a través del suelo), y no a la nutrición directa (fertilizantes) que altera los procesos biológicos y el ecosistema en general (Kolmans y Vázquez, 1999).

Para la agricultura ecológica es muy importante el comportamiento de los nutrientes en el suelo en relación con los procesos biológicos de la planta (metabolismo-síntesis de proteínas) y su influencia en la susceptibilidad a plagas y enfermedades.

El empleo de fertilizantes solubles y pesticidas no constituye una forma de producción sostenible ya que, al no respetar los procesos secuenciales de la vida dañan la biología del suelo,

produciendo su muerte hasta como fuertes perturbaciones en todo el ecosistema de la unidad agropecuaria.

Cada especie de planta favorece el desarrollo de tipos específicos de vida, especies diferentes exudan sustancias diferentes que favorecen y reprimen determinadas poblaciones de organismos en el suelo. De ahí la importancia de las rotaciones y asociaciones (policultivos) para aumentar la fertilidad y equilibrio del suelo (Kolmans y Vázquez, 1999).

### **3.1. Asociación de cultivos**

Una de las principales razones por las cuales los agricultores a nivel mundial adoptan policultivos, es que frecuentemente se puede obtener un mayor rendimiento en comparación con el monocultivo. Este tipo de técnicas es especialmente importante en aquellos lugares donde los predios son pequeños debido a las condiciones socioeconómicas y donde la producción de los distintos cultivos está sujeta a la cantidad de tierra que se pueda limpiar, preparar y desmalezar en un tiempo limitado (Liebman, 1997).

Cada vez se hace más evidente que las ventajas de producción de los policultivos están a menudo asociadas con el uso de una mayor proporción de luz, agua y nutrientes disponibles (mayor captación de recursos). Estas formas de mejorar la utilización de los recursos se reflejan por tres fenómenos: complementación en el uso de ellos, la facilitación entre especies y cambios en la partición de recursos. En términos ecológicos, la complementación minimiza el traslape de nichos entre las especies asociadas y de tal forma disminuye al mínimo la competencia por recursos (Vandermeer, 1989).

Tipo de asociación de cultivos:

- 1) Cultivos intercalados: Es la siembra simultánea de dos o más cultivos en el mismo terreno, en surcos independientes, pero vecinos.
- 2) Cultivos mixtos: Consiste en sembrar dos o mas cultivos en el mismo terreno, sin organización de surcos.
- 3) Cultivo en franjas: Consiste en la siembra simultánea de dos o mas cultivos en el mismo terreno, pero en franjas amplias , que permite el manejo independiente de los cultivos.

- Ventajas de las asociaciones (Kolmans y Vázquez, 1999).

- a) Uso más eficiente del suelo.
- b) Mejor conservación del suelo.
- c) Regulación adecuada de malezas, plagas y enfermedades.
- d) Buena fijación de nitrógeno (en especial cuando se utilizan leguminosas).
- e) Óptimo aprovechamiento de la energía solar.
- f) Mayor producción de materia orgánica.
- g) Mejoramiento de la bioestructura del suelo.
- h) Máxima estimulación de la actividad del suelo.
- i) Buena movilización de las reservas de nutrientes en el suelo.
- j) Mejor regulación y retención de humedad.

En lo posible, deben asociarse cultivos que presenten características vegetativas y de desarrollo radicular diferentes para aprovechar los diferentes niveles en la superficie como dentro del suelo y así utilizar mejor la disponibilidad de nutrientes y la humedad en los diferentes estratos del suelo.

### **3.2. *Lupinus***

#### **Distribución**

El género incluye más de 600 especies descritas, pero solo hay cerca de 300 reconocidas (Eastwood *et al.*, 2008), 13 en el viejo mundo, originarias de la región mediterránea y Norte de África, diez de ellas son silvestres y tres domesticadas: *Lupinus albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*.

Los reportes para México señalan cifras cercanas a 110 especies, que crecen desde el nivel del mar, hasta los 4000 metros de altura, de Baja California hasta Chiapas, entre las especies más abundantes destacan: *L. montanus*, *L. campestris*, *L. elegans*, *L. hartwegii*, *L. mexicanus*, *L. polyphyllus*, *L. splendens*, *L. silvestris* y *L. stipulatus* (Bermúdez *et al.*, 1999) (Figura 1). El Eje Neovolcánico transversal es una área que presenta una gran diversidad, de las 111 especies que se reportan, 44 (39.6%) se encuentran en esta provincia, seguida de la Sierra Madre Occidental con 35.



a) *Lupinus montanus*, b) *Lupinus campestris*, c) *Lupinus elegans*

Figura 1. Especies representativas de *Lupinus* en México

En el Anexo 1 se presenta información las coordenadas de la ubicación de la especie. En la Figura 2 se presenta la distribución de estas especies.

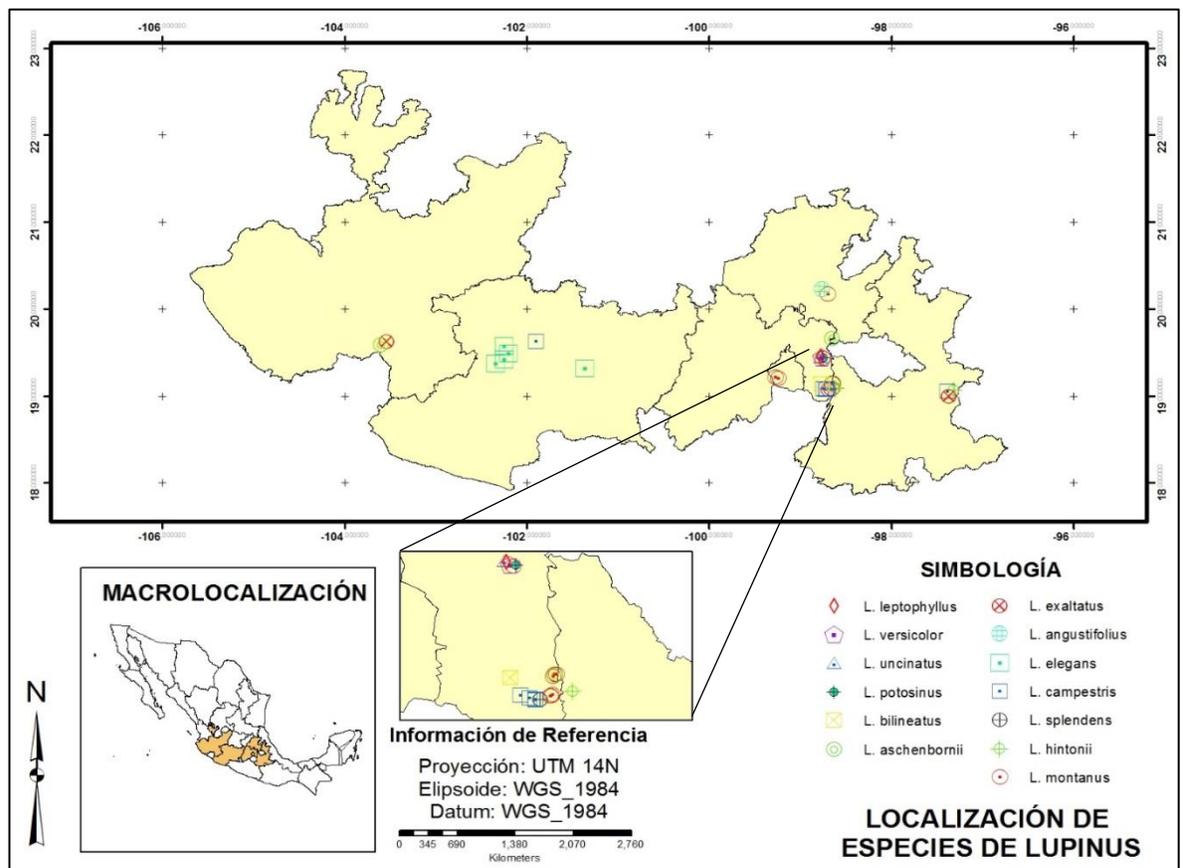


Figura 2. Distribución de especies silvestres de *Lupinus* en el Eje neovolcánico.

## **Descripción botánica**

Planta anual de tamaño variable de 0.4-2.5 m, dependiendo del genotipo y medio donde se cultive. El ciclo vegetativo varía entre 150 y 360 días, dependiendo del genotipo y si se toma en cuenta la maduración del eje central solo, o la de las demás ramas. Las diferentes fases fenológicas son: emergencia, primera hoja verdadera, formación del racimo en el tallo central, floración, envainado, maduración de vainas y madurez fisiológica. Tallos cilíndricos, leñosos, hojas palmeadas, digitadas. Inflorescencia racimosa con varios verticilos florales, cada uno de 5 flores, cuyos colores varían desde el azul, morado, celeste, rosado hasta el blanco. Androceo formado por 10 estambres dorsifijos y 5 basifijos; las flores en 50-70% no llegan a formar frutos, especialmente en ramas secundarias y terciarias, debido a la abscisión floral. Las semillas presentan latencia por inmadurez, ya que requieren una fase de postmaduración antes de germinar. Tiende a una forma oval, su longitud es aproximadamente de 3.7 a 5mm, el ancho es de 2.3 a 3.7 mm y el grosor es de 1.9 a 2.6mm, las variaciones en el tamaño dependen tanto de las condiciones de crecimiento como del ecotipo y la variedad; tegumento endurecido que representa el 10 por ciento de la semilla y contiene alcaloides. En especies silvestres de *Lupinus* la dispersión es espontánea por la dehiscencia, pudiendo incluso alcanzar varios metros. Cien semillas pesan entre 20 y 28 g. Raíz pivotante con eje principal grueso, alcanza hasta 3 m; las raíces secundarias ramificadas tienen nódulos simbióticos con bacterias del género *Rhizobium* (Gross, 1982; Rodríguez y Rojo, 1997; Tapia, 2000; Ortega *et al.*, 2010).

## **Valor nutritivo**

Las semillas son muy nutritivas. Las proteínas y aceites constituyen más de la mitad de su peso, estudios en más de 300 diferentes genotipos muestran que la proteína varía de 41-51% y el aceite de 14-24% (Cuadro 1) (Gross *et al.*, 1982).

Cuadro 1. Composición de ácidos grasos de *Lupinus* (Gross *et al.*, 1982).

Ácidos	%
Oleico (Omega 9)	40.4
Linoleico (Omega 6)	37.1
Linolénico (Omega 3)	2.9
Palmítico	13.4
Palmitoleico	0.2
Esteárico	5.7
Mirístico	0.6
Araquídico	0.2
Behénico	0.2
Erúsico	0.0
Cociente Polisat/Satur	2.0

Con base a un análisis bromatológico las semillas poseen en promedio 35.5% de proteína, 16.9% de aceites, 7.65% de fibra cruda, 4.41% de cenizas y 35.77% de carbohidratos (Jacobsen y Mujica, 2006). En el Cuadro 2 se presenta una comparación entre *Lupinus* y soya.

Cuadro 2. Comparación de la composición de *Lupinus* y soya (Jacobsen y Mujica, 2006).

Componente	<i>Lupinus</i>	Soya
Proteína	44.3	33.4
Grasa	16.5	16.4
Carbohidratos	28.2	35.5
Fibra	7.1	5.7
Ceniza	3.3	5.5
Humedad	7.7	9.2

### Latencia y propagación

Las semillas de *Lupinus* presentan latencia por lo que presentan una germinación baja o irregular que es atribuida principalmente a la impermeabilidad de las semillas al agua (Dehgan *et al.*, 2003; Jurado y Flores, 2005), por esta razón necesitan un proceso de escarificación que consiste en el

ablandamiento, a través de diversos métodos, de las capas externas, este proceso se puede lograr con métodos como la escarificación mecánica (Alexander y Sánchez, 2002). Acosta-Percastegui y Rodríguez-Trejo (2005) reportan mayores porcentajes de germinación para semillas de *Lupinus*, en temperaturas 20/15°C, con escarificación química (ácido sulfúrico) durante 15 min, tanto con luz (100%) como sin luz (98%).

Alderete *et al.* (2008) encontraron que tanto *L. montanus*, *L. versicolor* y *L. leptophyllus*, incrementan la germinación y la eficiencia germinativa con la escarificación mecánica, en el caso de *Lupinus montanus* se obtuvieron 70 % de germinación y 53.2 % eficiencia germinativa. De La Cruz-Landero (2010) encontró que *Lupinus montanus* tiene diferentes porcentajes de germinación en sustratos con diferentes propiedades químicas, pero sigue el mismo patrón con respecto a los tratamientos de escarificación.

El tamaño de las semillas de *Lupinus* silvestres es uno de los factores que pueden intervenir para su distribución a nivel de campo. Gómez-Romero y Linding-Cisneros (2009) encontraron que la profundidad de siembra óptima de *Lupinus elegans* es a los 2cm, especie que presenta gran potencial con fines de restauración.

Ante los bajos porcentajes de emergencia de plántulas en campo Alvarado-Sosa *et al.* (2007) propagaron plantas de *Lupinus* con fines de restauración y llegaron a las siguientes conclusiones: los contenedores de 310 a 380 cm<sup>3</sup>, con un régimen de fertilización semanal con una dosis de 24 mg por planta son adecuados para su crecimiento y la edad de la plántula para el trasplante en cual se logró la máxima supervivencia en campo fue de tres meses.

### 3.3. Fósforo

#### Importancia del fósforo en las plantas

El fósforo junto con el nitrógeno y el potasio forman el grupo de los nutrimentos vegetales llamados primarios. El *P* constituye un componente primario de los sistemas responsables de la capacitación, almacenamiento y transferencia de energía, y es componente básico en las estructuras de macromoléculas de interés, tales como ácidos nucleicos y fosfolípidos, por lo que se puede decir que su papel está generalizado en todos los procesos fisiológicos, en otras palabras, el fósforo no puede ser sustituido por ningún otro nutriente (Fernández, 2007).

El fósforo interviene en muchas de las reacciones que utilizan energía dentro de la célula ya que forma parte integral de las moléculas que acumulan energía como moléculas de monofosfato de adenosina (AMP), difosfato de adenosina (ADP) y el adenosin trifosfato (ATP), y una gran cantidad de compuestos organofosforados que son los responsables de la mayoría de los cambios de energía. Estos compuestos son importantes para la fotosíntesis, interconversión de carbohidratos y compuestos afines, glicólisis, metabolismos de aminoácidos, grasas y azufre, oxidaciones biológicas y muchos otros procesos (Tisdale *et al.*, 1985; Richardson, 2001).

Funciones en las plantas:

- Promueve e incrementa el desarrollo radical.
- Promueve la madures temprana de plantas (menor tiempo de llenado de grano).
- Promueve el alargamiento del tallo.
- Promueve la resistencia a enfermedades de la raíz y promueve la resistencia a heladas.
- Estimula la formación de las raíces fibrosas laterales, que incrementan el área superficial de las raíces y facilita la absorción de nutrimentos.
- Incrementa la calidad de ciertas frutas, forrajes, granos y hortalizas.

#### Fósforo en el suelo.

El porcentaje total de fósforo en la capa arable de los suelos agrícolas varia de 0.01% a 0.15% (aproximadamente de 200 a 3000 kg ha<sup>-1</sup>), con un promedio cercano a 0.06%. En suelos minerales de áreas templadas el porcentaje está entre 0.02 y 0.08% (200 a 800 ppm), con un

promedio de 0.05% (500 ppm). Las variaciones de fósforo total se deben a la variabilidad de las rocas parentales, al desarrollo y manejo de los suelos y a otras condiciones edafológicas y ecológicas. En un estudio realizado con suelos de América Central se encontró que en 80 suelos en que predominaban los fosfatos de calcio, el contenido de fósforo total fue de 889 ppm (0.09%) (Citado en Rodas *et al.*, 2001).

En el suelo existen varias formas químicas de fósforo, incluyendo el inorgánico (Pi) y el orgánico (Po). Estos componentes tienen múltiples fuentes de origen natural y antropogénico, los cuales difieren ampliamente en su comportamiento y destino, tanto en suelos naturales como agrícolas. La forma inorgánica se encuentra presente en combinaciones con hierro, aluminio, calcio, flúor y otros elementos, en compuestos insolubles o ligeramente solubles en agua. La fracción orgánica se encuentra en el humus. El Pi es deficiente en los suelos. Los ortofosfatos son las principales formas de absorción de las plantas y microorganismos del suelo.

Los contenidos de *P* en el suelo están sujetos a la influencia de muchos factores: temperatura, precipitación pluvial, acidez del suelo, actividad biológica y grado de desarrollo de los suelos (Citado en Rodas *et al.*, 2001).

### **3.3.3. Absorción de *P* por las plantas**

Las raíces absorben el fósforo principalmente en forma de ion ortofosfato primario ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) o como ortofosfato secundario ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) (Tisdale *et al.*, 1985).

La importancia del crecimiento y arquitectura de las raíces para una captura eficiente de fósforo, es bien documentada. Y en muchos de los casos, la respuesta de las plantas es específica para la deficiencia de este nutrimento. Algunas de las características que desarrollan las raíces para el consumo del fósforo son las siguientes:

- 1) Una rápida tasa de elongación de la raíz y alta biomasa de la raíz (Hill *et al.*, 2006).
- 2) Incremento de la ramificación de la raíz y cambio del ángulo de éstas, particularmente en suelos superficiales y regiones ricas en nutrientes (Lynch y Brown, 2001; Rubio *et al.*, 2003).
- 3) Estructuras dauciformes como las que se presentan en Cyperaceae (Shane *et al.*, 2006).

4) Raíces “proteoides” o raíces “clusters”, en Proteaceae y en algunas de la familia Fabaceae como *Lupinus* spp. (Dinkelaker *et al.*, 1995; Gardner *et al.*, 1983; Lambers *et al.*, 2006).

### 3.4. Raíces con estructuras especializadas: Raíces “clusters”

Son un tipo anormal de ramificación que origina densos conglomerados de raicillas, con abundantes pelos radicales, dispuestos en torno a un eje (Purnell, 1960).

Este tipo de raíces especializadas fisiológicamente sirve para maximizar la adquisición de fósforo inorgánico (Pi) en suelos con baja fertilidad, especialmente cuando el fósforo se encuentra en formas insolubles (Shane y Lambers, 2005).

Hay varios tipos de raíces “clusters” y se encuentran en especies monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los mejores ejemplos conocidos son las raíces proteiformes que son estructuras en forma de cilindros cepillosos (Purnell, 1960) (Figura. 3a y b). La morfología de las raíces cluster, involucra la formación de pelos radicales en un pequeño volumen que incrementa el área de superficie del sistema de raíces.

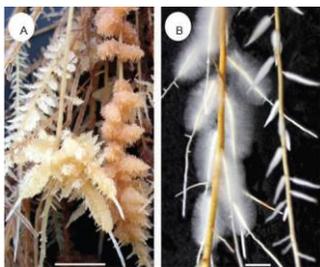


Figura 3. a) y b). Raíces “clusters” en forma de cilindros de cepillosos.

A continuación se presenta una serie de imágenes que muestran la morfología de las raíces con estructuras “clusters” en diferentes especies, la mayoría de éstas se encuentran en condiciones de bajo suministro de fósforo o en suelos con baja fertilidad (Figuras 4, 5 y 6).

En condiciones de bajo suministro de fósforo. a) *Embothrium coccineum* crecida en invernadero en la Universidad Austral de Chile, b) Plántulas *Embothrium coccineum* extraída del Parque Katalapi que muestran la abundancia de las raíces clusters, c) Flor roja de *Embothrium coccineum* que atrae a algunos insectos y pájaros, d) Plántulas *Lomatia ferruginea* crecidas en invernadero

en la Universidad Austral de Chile, Valdivia y e) raíces clusters de *Lomatia ferruginea*. a) y b) acidifican fuertemente la rizosfera (Zúñiga *et al.*, 2010) (Figura 4).

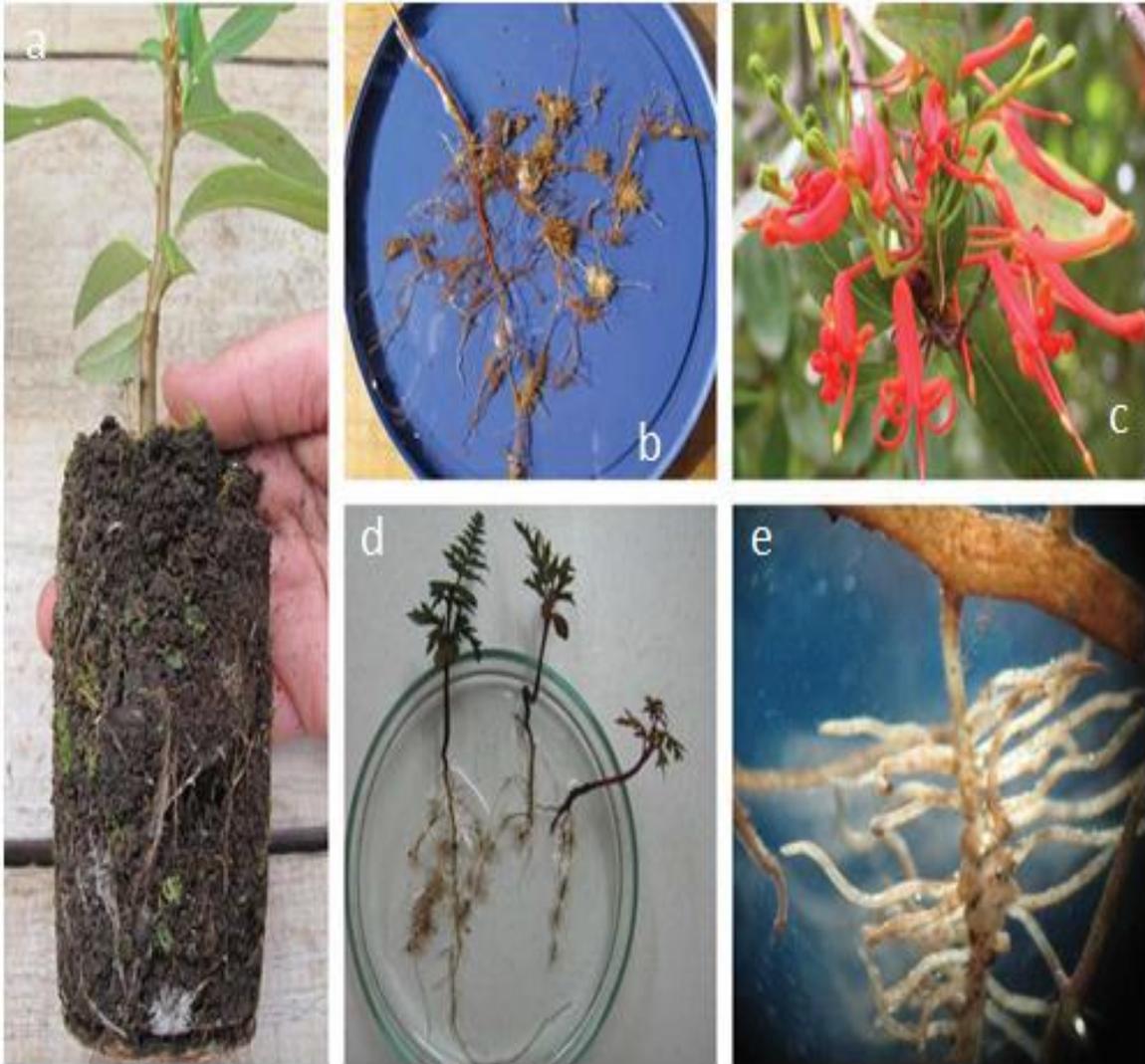


Figura 4. Raíces “clusters”.

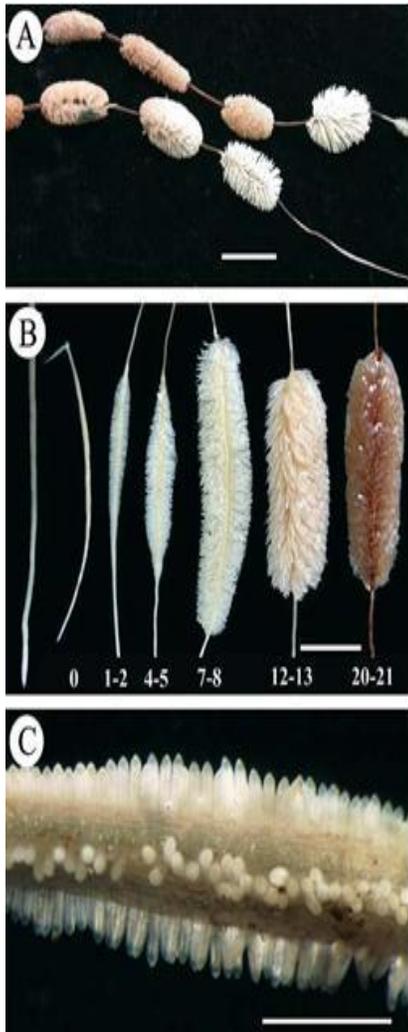


Figura 6. Morfología de raíces “clusters”. a) *Hakea petiolaris* y b), c) *Hakea prostrata* (Shane *et al.*, 2003).

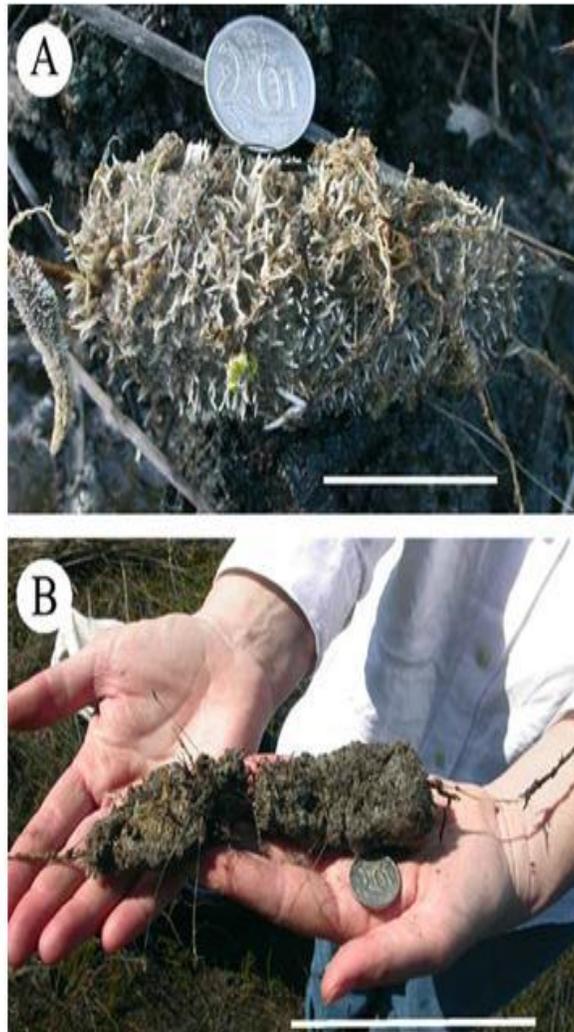


Figura 5. Morfología de raíces “clusters”.

En campo. *Hakea ceratophylla* crecida en el campo en invierno en el suroeste de Australia, a) se puede observar una gran cantidad de raíces pequeñas, teniendo la forma de árbol de navidad, b) las raíces se fijan bien al suelo y al separarlas sufren daño (Pate *et al.*, 2001).

En especies que se encuentran en ambientes con problemas de fósforo, no pueden producir una asociación con hongos micorrízicos, pero en cambio producen raíces “clusters”. Dentro de estas importantes especies se encuentran las del género *Lupinus*. Particularmente *Lupinus albus* ha sido

estudiada por sus raíces proteoides o “clusters”, los estudios están limitados a especies domesticadas, *Lupinus albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*.

#### 3.4.1. Especies de *Lupinus*, modelo de raíces “clusters”

La deficiencia de fósforo induce una amplia gama de genes en raíces “clusters” de *Lupinus albus*, los cuales incluyen genes involucrados en el metabolismo del carbono, metabolismo secundario, captación y translocación, metabolismo en las hormonas de las plantas y señales de transducción. Al comparar plantas con suficiente suministro de fósforo y deficiencia de éste, se pueden generar raíces “clusters” (Uhde-Stone *et al.*, 2003).

Las raíces “clusters” pueden ser caracterizadas por un incremento del área superficial de la raíz para incrementar el área de absorción de nutrientes, así como secretar fosfatasa, ácidos para hidrolizar las fracciones de fósforo en los suelos, liberación de fenoles que pueden tener propiedades antibióticas, y liberar grandes cantidades de citrato y malato para movilizar fósforo en los suelos (Neuman *et al.*, 2000). La excreción de citrato por las raíces “cluster” de *Lupinus albus* está asociado con la acidificación de la rizosfera (Figura 7 y Cuadro 3), capaz de disolver fosfato de calcio (Dinkelaker *et al.*, 1989).



Figura 7. Sistema de raíces de *Lupinus albus* en cultivo hidropónico por 28 días sin administración de fósforo. En el medio se utilizó purpura de bromocresol indicador de pH. pH 6.5-7= purpura, pH 4-5=amarillo, “raíces clusters” con habilidad de acidificar la rizosfera (Dinkelaker *et al.*, 1989).

Cuadro 3. *Lupinus albus* en suelo calcáreo (Modificado de Dinkelaker *et al.*, 1989).

	Volumen del suelo	Rizosfera del suelo (Raíces clusters)
pH	7.5	4.8
Citrato ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ suelo)	$1.1 \pm 0.2$	$47.7 \pm 7.2$
Fósforo ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ suelo)		
Extractable con $\text{H}_2\text{O}$	$178 \pm 28$	$61 \pm 7$
CAL	$904 \pm 80$	$581 \pm 76$
Olsen	$581 \pm 93$	$484 \pm 68$
Extractable con DTPA ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ suelo)		
Fe	$34 \pm 6$	$251 \pm 43$
Mn	$44 \pm 8$	$222 \pm 23$
Zn	$2.8 \pm 0.4$	$16.8 \pm 2.4$

*Lupinus albus* fue cultivado durante 35 días sin suministro de *P* (Figura 8), pudiéndose observar que las raíces “clusters” en un estado joven liberan en mayor proporción ácido málico, así mismo se presentó una mayor concentración de este ácido en el tejido de estas raíces. Por otro lado la secreción de ácido cítrico se presentó en mayor concentración en el estado maduro y una reducción considerable del ácido málico. En el estado maduro el pH se vio reducido en comparación a los otros dos estadios que fueron analizados (juvenil y senescente) (Neumann y Römheld, 1999).

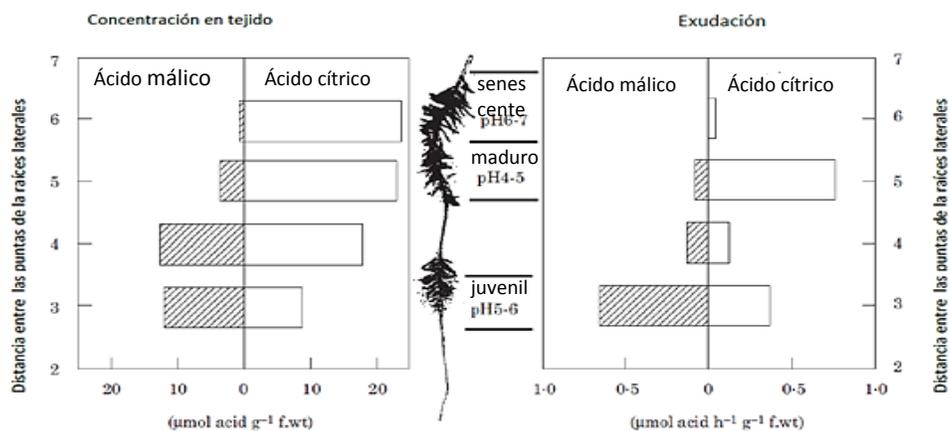


Figura 8. Ácidos orgánicos secretados por la raíz durante los diferentes estados de crecimiento de *Lupinus albus* (Modificado de Neumann y Römheld, 1999)

Peek *et al.* (2003) encontraron que *Lupinus albus* de 13 semanas liberó hasta 1g de ácido cítrico por planta en condiciones de deficiencia de fósforo. En otras investigaciones con respecto al *P* se encontró que la excreción de citrato aumento cuando la fuente de *P* era  $\text{FePO}_4$ , y se puso de manifiesto que las raíces “clusters” actúan de acuerdo a las diferentes fuentes de fósforo (Shu *et al.*, 2007).

Los cambios morfológicos de las raíces de *Lupinus albus* bajo deficiencia de fósforo, son para formar distintas estructuras de raíces “clusters” con ramificaciones discretas y raicillas determinadas, y en comparación con la soya esta formó una raíz más fibrosa; se incrementó el fósforo en un 25% en *P*. Por el contrario *Lupinus* no respondió al suministro de fósforo, pero observaron que el *P* aplicado redujo el desarrollo de las raíces “clusters” (Watt y Evans, 2003).

#### **3.4.2. Respuesta de las plantas para el consumo de *P*.**

Las plantas responden a una limitación de *P* inorgánico. Una baja disponibilidad externa de *P* externa disminuye el estado interno de *P* de la planta. Cuando la planta percibe un estado bajo de *P*, trata de regular este estado, la respuesta es diferente en cada especie, que incluye el aumento de la formación de pelos radicales, por ejemplo se desarrollan raíces “clusters”, que exudan carboxilatos, que tienen capacidad de absorción de fósforo. El fosfito actúa como un análogo del fosfato, y suprime la respuesta de inanición de *P* (Abel *et al.*, 2002) (Figura 9). El fosfito estimulante en la actividad de la enzima fenilalanina Amonio Liasa (PAL), que comanda la síntesis de metabolitos como ácidos carboxílicos.

Los aniones orgánicos son liberados dentro de la rizosfera en respuesta a varios tipos de estrés nutrimental que incluye a fósforo, hierro, deficiencia de micronutrientes y toxicidad de aluminio (Hooking, 2001; Nuruzzaman *et al.*, 2006).

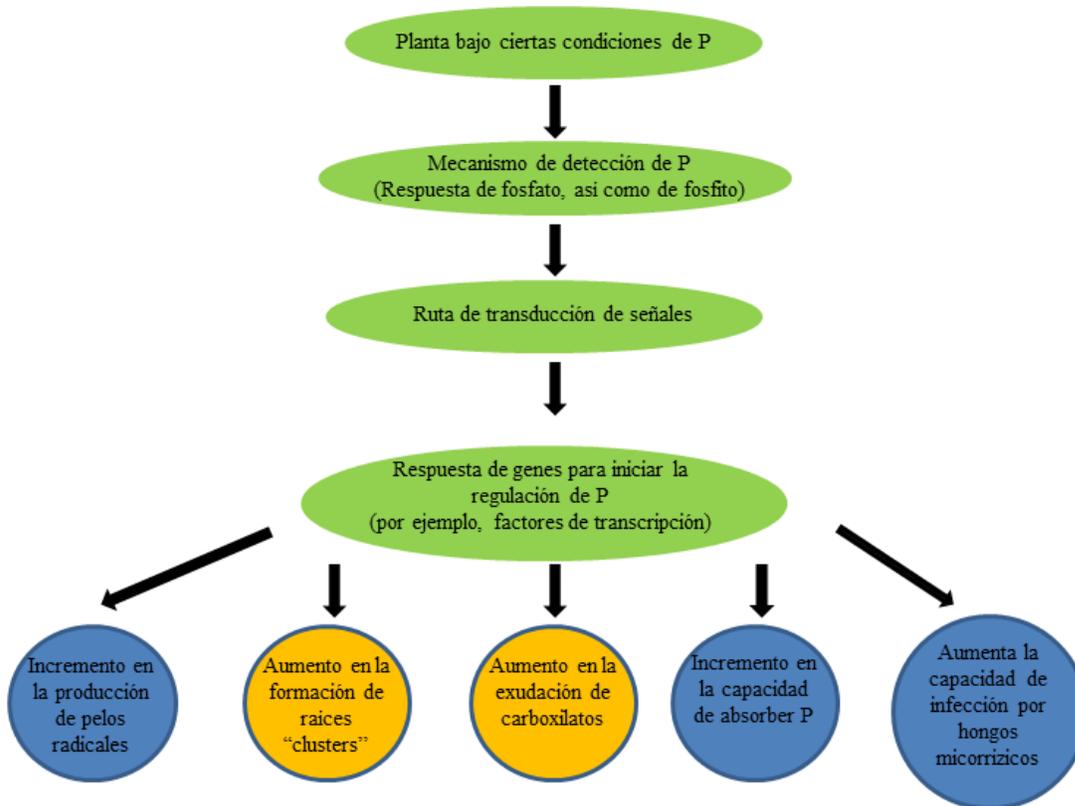


Figura 9. Respuesta de las plantas a la limitación de fósforo inorgánico

### 3.4.3. Efecto de carboxilatos (y otros exudados) sobre la movilización de *P* orgánico e inorgánico en el suelo.

Los carboxilatos son liberados por canal aniónico. Las rutas por las cuales los fosfatos son liberados es aún desconocida. Los carboxilatos movilizan tanto el *P* orgánico como el inorgánico. Los fosfatos hidrolizan el *P* orgánico una vez que éstos han sido movilizados por los carboxilatos, estos también pueden movilizar algunos de los cationes que se unen al *P*. Algunos de estos cationes (especialmente Fe) son movidos hacia la superficie de la raíz para ser consumidos. Otros se mueven hacia abajo del perfil del suelo, donde ellos pueden dar lugar a la formación de lateritas (suelos con alta cantidad de Fe) (Pate *et al.*, 2001) u otros precipitados (calcio y aluminio) (Verboom y Pate, 2006) (Figura 10).

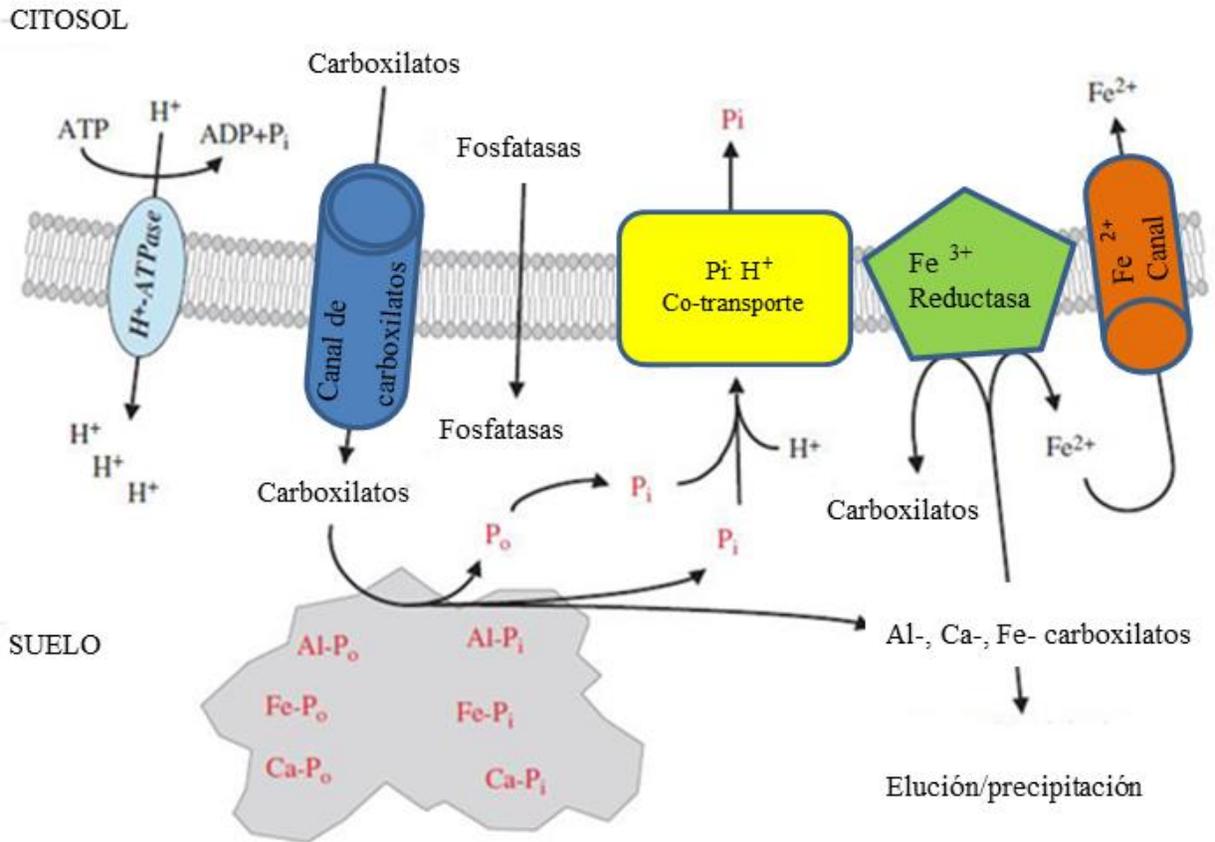


Figura 10. Absorción por células de la raíz de *P* unido a otros cationes.

Los cationes excretados junto con los carboxilatos mantienen las cargas balanceadas que pueden ser protones, llevando a una acidificación de la rizosfera (Hinsinger, 2001; Hinsinger *et al.*, 2003). Otros cationes como el K son igual de importantes (Zhu *et al.*, 2005).

El transporte de carboxilatos en la forma aniónica del citosol, genera una mayor acidificación de la rizosfera, es así como resulta la protonación (es la adición de un protón H<sup>+</sup>) de los carboxilatos en la rizosfera. De esta forma contribuye a la disminución del pH de la rizosfera (Hinsinger *et al.*, 2003).

### 3.5. *Lupinus* y la importancia de bacterias fijadoras de nitrógeno

#### Características de la simbiosis *Lupinus-Bradyrhizobium*

El género *Lupinus* establece simbiosis con el rizobio de crecimiento lento *Bradyrhizobium* sp., y *Mesorhizobium*. González-Sama *et al.* (2004) y De Felipe *et al.* (2006), realizaron una descripción de los procesos que se llevan a cabo en la simbiosis de *Lupinus-Bradyrhizobium*. Las raíces de *Lupinus* excretan sustancias de tipo flavonoide que atraen a *Bradyrhizobium* a la rizosfera, adhiriéndose a la superficie externa de los pelos radicales, después de la inoculación, las bacterias se encuentran inmersas en una masa mucilaginoso que son ricas en glicoproteínas. Los rizobios proliferan en la zona de contacto entre los pelos radicales y las células epidérmicas, donde se da la entrada de las bacterias a las células corticales de la raíz. La infección se realiza de manera localizada en una única célula que se encuentra debajo del pelo radical, la infección de la célula cortical se lleva a cabo por regiones de la pared celular que han sido alteradas estructuralmente. En la Figura 11a y b, se presentan dos microfografías que representan el proceso de inicio de infección en raíces de *Lupinus albus*, seis días después de la inoculación (infección por *Mesorhizobium loti*, marcado con la proteína fluorescente verde (González-Sama *et al.*, 2004).

En las primeras etapas el nódulo crece en todas las direcciones adquiriendo una forma esférica, muy parecido a los nódulos determinados; en los nódulos jóvenes el meristemo constituido por células infectadas y no infectadas, se localiza rodeando a la zona infectada. Para la maduración, la zona meristemática queda en la región basal lateral, y el nódulo continúa creciendo hasta rodear la raíz y en ese momento cesa su desarrollo. Los nódulos de *Lupinus* son de tipo indeterminado, presentando un meristemo activo, sin embargo no muestran las características especiales de los nódulos indeterminados típicos; se clasifican como un subtipo especial y único denominado nódulo lupinoide (Figura 12) (González-Sama *et al.*, 2004).

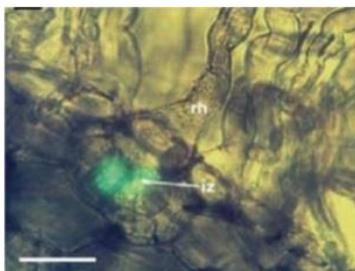


Figura 11a. Microfografía de fluorescencia; iz, zona de infección; rh, pelo radical. Barra 100µm.

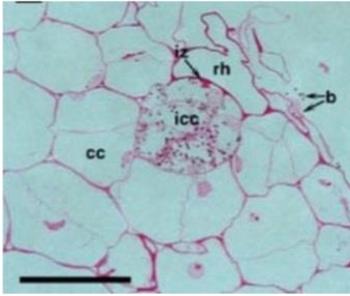


Figura 11b. Primordio nodular de *Lupinus* con células corticales y células infectadas (bacterias inmunomarcadas en negro) en división; b, bacterias; cc, células corticales; icc, célula cortical infectadas; zona de infección; rh, peloradical. Barra 20  $\mu$ m.

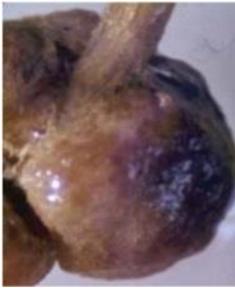


Figura 12. Nódulo indeterminado de *Lupinus albus*.

Los pelos radicales no presentan la deformación ni la curvatura que normalmente se presentan en las demás leguminosas; y tampoco se observan en ellos canales de infección. En la formación del primordio nodular la célula cortical infectada se divide repetidamente dando varias células hijas donde se distribuyen las bacterias, las células que no se encuentran infectadas se dividen simultáneamente; avanzada la formación del primordio nodular, se presentan dos zonas bien diferenciadas que son: zona central, contiene únicamente células infectadas en diferentes estadios de división, y la zona cortical con células no infectadas en división que darán lugar a la corteza del nódulo (González-Sama *et al.*, 2004).

### 3.6. Nitrógeno fijado y respuestas a la inoculación

Las especies del género *Lupinus* son leguminosas con gran adaptabilidad en ambientes donde otros cultivos no podrían hacerlo. Dentro de las características de la especie encontramos habilidad para desarrollarse con diferentes tipos de estrés abióticos, nitrato, salinidad, sequía y encharcamientos, etc. Las raíces tienen la capacidad de absorber metales como cadmio, plomo, zinc, mercurio y cromo por lo que también tienen características fitorremediadoras. Así estas

especies son importantes desde el punto de vista ecológico y agronómico, en especial por ser una de las plantas que fijan más nitrógeno (De la Cruz-Landero *et al.*, 2010).

Herridge *et al.*, (2008) realizaron una recopilación de información referente a leguminosas que eran potencialmente fijadoras de nitrógeno, y realizó una comparación entre ellas. En el Cuadro 4 se presentan las leguminosas que fueron evaluadas y los porcentajes obtenidos de N. La primera columna presenta información diversos experimentos, publicados en diversos artículos. En la segunda columna se concentró información de campo de más de 800 cultivos agrícolas de Europa, África, Asia, Sudamérica y Australia, la información puede presentar un grado de error, por las siguientes razones, genética de las plantas, el manejo agronómico, las condiciones ambientales, entre otros, sin embargo proporciona una idea global del comportamiento a nivel mundial de la fijación biológica de nitrógeno.

Cuadro 4. Promedio del % de Nitrógeno derivado de la fijación biológica (FBN) de las principales leguminosas en experimentos y cultivos agrícolas (Herridge *et al.*, 2008)

Leguminosa	Experimentos % N (FBN) promedio	Cultivos agrícolas % N (FBN) promedio
Frijol	40	36
Garbanzo, lenteja, chícharo, caupi, frijol, etc.	63	65
Soya, cacahuete	68	58
Haba y <i>Lupinus</i>	75	68

En el Cuadro 5 se presentan las cantidades totales de nitrógeno fijadas por diferentes especies de *Lupinus*, reportadas por diferentes autores.

Cuadro 5. Fijación de nitrógeno de diferentes especies de *Lupinus*.

Leguminosa	kg N ha <sup>-1</sup>	Fuente
<i>Lupinus angustifolius</i>	90-150	Anderson <i>et al.</i> , (1998)
<i>Lupinus angustifolius</i>	150	Howieson <i>et al.</i> , (1998)
<i>Lupinus albus</i>	250	Howieson <i>et al.</i> , (1998)
<i>Lupinus angustifolius</i>	151	Barrientos <i>et al.</i> , (2001)
<i>Lupinus albus</i>	214	Barrientos <i>et al.</i> , (2001)

### 3.6.1. Bacterias del género *Burkholderia*.

#### Hábitat

*Burkholderia* pertenece a la familia Burkholderiaceae, del orden Burkholderiales; es una bacteria que se encuentra comúnmente en el suelo, y a menudo se encuentra asociada a las raíces de las plantas e incluso pueden encontrarse en el interior como endófitos, ejemplo de ello son *B. unamae* (Caballero-Mellado *et al.*, 2007), *B. phytofirmans* (Sessitsch *et al.*, 2005), *B. tropica* (Reis *et al.*, 2004) y *B. Silvatlantica* (Perin *et al.*, 2006). Algunas especies han sido reportadas como patógenos en plantas como *B. caryophylli* y *B. plantarii*, la primera patógena en campos de clavel y la segunda causante de enfermedades en arroz (Ballard *et al.*, 1970; Palleroni, 1984).

Algunas de estas bacterias presentan gran versatilidad, tal es el caso de *B. cepacia* que puede encontrarse en el suelo, plantas y o infectando a pacientes que padecen fibrosis quística (Mahenthiralingam *et al.*, 2005).

En México se reporta a *B. vietnamiensis*, en rizosfera y rizoplano de plantas de maíz y café (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001).

#### Potencial biotecnológico

Las especies de *Burkholderias* se pueden involucrar en tres acciones principalmente: a) como antagonista de otros microorganismos realizando acciones de biocontrol, b) como promotores de crecimiento en plantas y c) como agentes degradantes de sustancias en biorremediación. Se ha encontrado que *B. cepacia* tiene actividad antagonista y sus metabolitos un efecto inhibitorio ante hongos fitopatogénos (Trujillo *et al.*, 2007). *B. vietnamiensis* tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas (Gillis *et al.*, 1995).

Hasta el siglo XXI se consideraba que la simbiosis con leguminosas era una habilidad exclusiva de los rizobios. Sin embargo, Moulin *et al.* (2001), descubrieron dos cepas de *Burkholderia* (*B. phymatum* y *B. tuberum*) en nódulos de *Machaerium lunatum* y *Aspalathus carnosa*. En el caso de *Mimosa* se ha encontrado que las especies de *Burkholderia* son mejores simbiosistas y más competitivas que otros rizobios (Bontemps *et al.*, 2010; Gyaneswar *et al.*, 2011). Chen *et al.* (2007) encontraron bacterias de *Burkholderia nodosa*, en nódulos de *Mimosa scabrella* (leguminosa leñosa de Brasil).

De las 60 especies clasificadas de *Burkholderia*, 9 son capaces de fijarlo *ex-planta*, esto a la presencia del gen *nifH*, que codifica la nitrogenasa reductasa, lo que se ha demostrado utilizando la técnica de reducción del acetileno a etileno, y por experimentos de dilución isotópica de  $^{15}\text{N}_2$  (Martínez-Aguilar *et al.*, 2008).

Se ha reportado que *B. cepacia* es capaz de promover la germinación en semillas de maíz al ser inoculadas con esta bacteria, así mismo se observó un mejor crecimiento radicular; y mostró una capacidad adecuada de solubilizar fosfatos de calcio, hierro y aluminio (Mora y Toro, 2007).

En *Lupinus* se han identificado bacterias de *Burkholderia* en raíces de *Lupinus albus*. La presencia de estas se incrementaban en raíces senescentes, siendo menor en raíces jóvenes (Weisskopf *et al.*, 2011).

Dada la importancia que tiene la leguminosa *Lupinus* en relación con otros cultivos, a continuación se describen las características de maíz.

### **3.7. Maíz**

El maíz es la forma domesticada de la gramínea silvestre conocida como teocintle. México se considera como centro de la diversidad de maíz con 59 razas (SAGARPA, 2009).

#### **Clasificación taxonómica**

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida

**Subclase:** Commelinidae

**Orden:** Cyperales

**Familia:** Gramíneas

**Género:** *Zea*

**Especie:** *Zea mays*

### 3.7.1. Descripción General

La planta de maíz proviene de la familia de las gramíneas, esta tiene un porte robusto, de fácil desarrollo y producción anual. Es de inflorescencia monoica, el tallo es erecto, de elevada longitud que incluso puede alcanzar hasta los 4 m de altura, no presenta ramificaciones, las hojas son largas, lanceoladas, alternas; se encuentran abrazadas al tallo, y por el haz presentan vellosidades, las hojas son afiladas y cortantes.

El maíz requiere bastante incidencia de luz solar. Para alcanzar la germinación en la semilla la temperatura debe oscilar entre 15 y 20°C. Es un cultivo exigente en agua (5 mm al día), las necesidades hídricas varían a lo largo de su crecimiento. Se adapta muy bien a todos los tipos de suelo, sin embargo prefiere suelos que tengan pH de 6 a 7 (Financiera rural, 2008).

### 3.7.2. Sistema radical

El desarrollo del sistema radical puede ser embrionario y post-embrionario. El primero ocurre por una serie de divisiones asimétricas en las células del cigoto dando lugar a la formación del suspensor y al embrión. Después de las divisiones antes indicadas aparece el eje embrionario formado por el meristemo apical foliar (MAF) y radicular en el coleóptilo. Finalmente, se desarrollan estructuras embrionarias tales como el primer primordio de la hoja, la raíz primaria (RP) y las raíces escutelares seminales (RES) (Figura 13) (Paliwal, 2001).

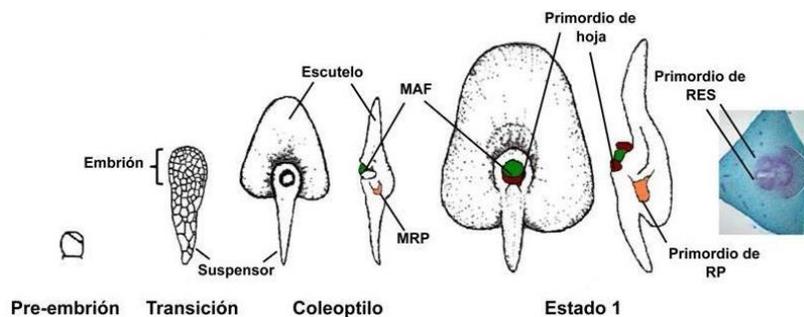


Figura 13. Desarrollo embrionario de la raíz primaria y de las raíces escutelares seminales (RES) en maíz.

Las RES son una parte importante para la captación inicial de agua, nutrientes y para el establecimiento de la plántula en el suelo. La raíz primaria aparece después de la germinación y se hace visible cuando rompe la coleorriza (CO), mientras que las RES emergen del nodo

escutelar (NE). Las raíces post-embriónicas se forman después de la germinación y continúan creciendo hasta formar un sistema radicular altamente ramificado en las plantas adultas. El sistema radicular post-embriónico está formado por raíces de corona o nodales (RC) y de raíces aéreas (RA) que surgen tardíamente en los nodos del tallo). Por otra parte, el desarrollo del sistema radicular post-embriónico se divide en dos etapas: Temprano y tardío. El primero se caracteriza por dos tipos de raíces: las raíces laterales que emergen de la raíz principal y las raíces escutelares seminales que se forman entre los seis a siete días de edad, de la plántula. Las raíces de corona aparecen en el primer nodo del coleóptilo (NC) (Figura 14) (Grzesiak, 2009).

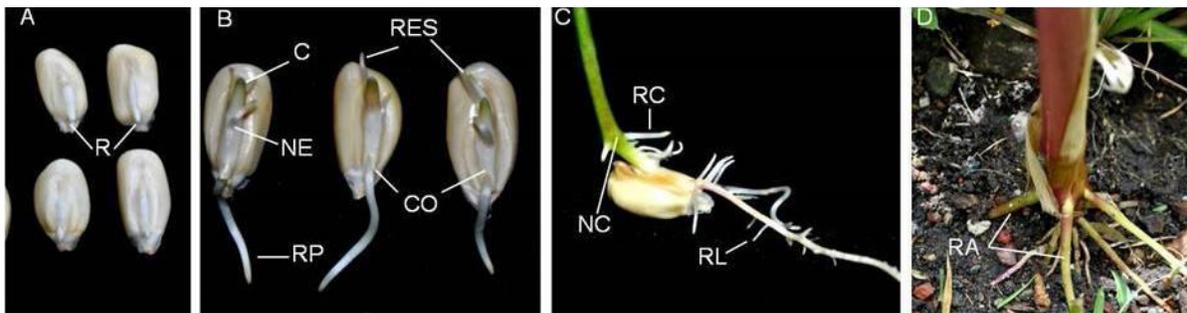


Figura 14. Desarrollo del sistema radicular del maíz. A) Germinación de semillas por 48 horas, se puede apreciar la salida de la radícula (R). A los tres días aproximadamente se puede observar la emergencia de la raíz primaria (RP) a través de la coleoriza (CO) y de las raíces escutelares seminales (RES) que se desarrollan a partir del nodo escutelar (NE). (C) A los 8 días de edad se observa la formación de las raíces de corona o nodales (RC) en el nodo del coleóptilo (NC) y de raíces laterales sobre la RP. (D) A las seis semanas de edad se aprecia la formación de las raíces aéreas (RA) en los nodos del tallo (Grzesiak, 2009).

### 3.7.3. Etapas de crecimiento del maíz

Para su estudio (Cuadro 6), el crecimiento se divide en dos etapas (Paliwal, 2001):

- Vegetativa (V)
- Reproductiva (R)

Cuadro 6. Etapas de crecimiento, agrupadas en cuatro grandes períodos.

Etapa	Días	Características
VE	5	El coleóptilo emerge de la superficie del suelo
V1	9	Es visible el cuello de la primera hoja
V2	12	Es visible el cuello de la segunda hoja
Vn		Es visible el cuello de la hoja número “n”. (“n” es igual al número definitivo de hojas que tiene la planta. “n” generalmente fluctúa entre 16 y 22, pero para la floración se habrán perdido las 4 a 5 hojas de más abajo.)
VT	55	Es completamente visible la última rama de la panícula.
R0	57	Antesis o floración masculina. El polen se comienza a arrojar.
R1	59	Son visibles los estigmas
R2	71	Etapas de ampolla. Los granos se llenan con un líquido claro y se puede ver el embrión.
R3	80	Etapas lechosas. Los granos se llenan con un líquido lechoso blanco.
R4	90	Etapas masosas. Los granos se llenan con una pasta blanca. El embrión tiene aproximadamente la mitad del ancho del grano.
R5	102	Etapas dentadas. La parte superior de los granos se llena con almidón sólido y, cuando el genotipo es dentado, los granos adquieren la forma dentada. En los tipos tanto cristalinos como dentados es visible una línea de “leche” cuando se observa el grano desde el costado.
R6	112	Madurez fisiológica. Una capa negra es visible en la base del grano. La humedad del grano es generalmente alrededor del 35%.

#### 3.7.4. Requerimientos nutricionales del maíz

Es de vital importancia que el cultivo de maíz logre un óptimo estado fisiológico en floración, lo cual permitirá tener altos rendimientos. El rendimiento de maíz está determinado principalmente por el número final de granos por unidad de superficie. Es así que la planta debe tener un buen abastecimiento de nutrimentos, especialmente a partir de que la planta los requiere en grandes cantidades, que es aproximadamente cuando hay de 5 a 6 hojas desarrolladas. En base a esto debemos tener conocimiento de los requerimientos de la planta y de la oferta del suelo para determinar las deficiencias que pueden disminuir los rendimientos del cultivo. Un cultivo de maíz de  $12 \text{ t/ha}^{-1}$  de rendimiento necesita absorber aproximadamente 264, 48 y 48 kg/ha de N, P y K, respectivamente (García, 2005).

En el Cuadro 7 se presentan algunos de los requerimientos nutricionales del maíz. Esto en base a una revisión de numerosos trabajos por García (2005), sin embargo esta información puede tener variabilidad de acuerdo con el ambiente y al manejo del cultivo.

Cuadro 7. Requerimientos y extracción en grano de nutrientes para producir una tonelada de grano de maíz.

Nutriente	Requerimiento kg/ton	Extracción kg/ton
Nitrógeno	22	14.5
Fósforo	4	3.0
Potasio	19	4.0
Calcio	3	0.2
Magnesio	3	0.8
Azufre	4	1.8
	g/ton	g/ton
Boro	20	5
Cloro	444	27
Cobre	13	4
Hierro	125	45
Manganeso	189	32
Molibdeno	1	1
Zinc	53	27

### 3.7.5. Importancia del maíz a nivel nacional

México es el centro de origen del maíz, sin embargo es el 4° productor a nivel global, detrás Estados Unidos, China y Brasil. México produce 2.7% del maíz en el mundo (23 millones de ton en 2010); en base al promedio por hectárea (3.2 ton), nos encontramos en el lugar 78 de 164 países que producen este grano en el mundo (el promedio mundial es de 5.2 ton/ha<sup>-1</sup>) (AgroDer, 2012).

La República Mexicana, puede dividirse en tres grandes zonas: Norte, Centro y Sur. Esto nos permite comparar los rendimientos agrícolas en cada zona. En la Figura 15a, se puede observar que la zona norte tiene la producción más alta cuando la producción está basada bajo riego, seguida de la zona centro y zona sur, 8.9>6.1>3.1 (ton/ha). En la Figura 15b, se puede apreciar que el rendimiento bajo temporal es mayor en la zona centro, seguido de la zona sur y finalmente la parte norte. Finalmente la Figura 15c, presentan valores de la suma de las condiciones de

producción (riego + temporal) con esto observamos que el norte se mantiene a la cabeza de la producción de maíz en todo el país (AgroDer, 2012).



Figura 15. Producción de maíz en la República Mexicana

- a) Rendimiento de maíz de riego, por región. b) Rendimiento de maíz bajo temporal, por región.  
c) Rendimiento de maíz, riego más temporal, por región (toneladas/hectárea).

### 3.8. El uso de rizotrófon en estudios de plantas

La raíz proporciona a la planta soporte físico, además de nutrientes y el agua que son tomadas del suelo. Tanto el desarrollo como el crecimiento de la raíz están bajo control de dos tipos de factores, los estímulos ambientales y los factores genéticos (López-Bucio *et al.*, 2003). Las raíces tienden a desarrollarse hacia donde hay agua y nutrientes. Así mismo, existen factores que pueden afectar el crecimiento y desarrollo del sistema radical (agua, temperatura, compactación en el suelo, disponibilidad de sustancias minerales, etc) (Fitter, 2002). Uno de los grandes problemas en los estudios de raíz es que la mayoría son destructivos, esto limita el conocimiento sobre fisiología, ecología y estructura arquitectónica. Al utilizar bolsas de plástico o macetas, se ignora o no se considera si esto genera un factor de confusión en los resultados de una investigación.

El rizotróon es un instrumento que sirve para realizar mediciones y observaciones del sistema radical de las plantas, a través de superficies transparentes (Cuadro 8). Este tipo de instrumentos son de gran utilidad en el estudio de árboles o de herbáceas. El estudio de las raíces puede involucrar diversos aspectos, como: nutrición mineral, efecto de estrés salino e hídrico en el crecimiento radical, factores edáficos (pH, fertilización, tipos de sustratos, drenaje, etc.), crecimiento radical de distintas especies, incidencia de plagas y/o enfermedades, distribución de biomasa, interacciones bióticas microorganismos-raíz (micorrizas, bacterias fijadoras de nitrógeno) (Guedea-Fernández *et al.*, 2001).

Cuadro 8. Estudios realizados en rizotrones Fuente: Modificado de Guedea-Fernández *et al.*, 2001.

Autor y año	Estudio realizado
Gilliespie y Pope, 1990.	Determinar la tasa y magnitud de acidificación de la rizósfera con base en el desarrollo de una planta fijadora de nitrógeno
Daneels, Vyvey, Vervalcke y Van Cotthem, 1992.	Observación de la influencia de las condiciones del suelo y fertilizantes sobre el crecimiento y morfología de raíces.
Mc.Crimmon y Karnok, 1992.	Determinación de los efectos del nitrógeno en forma de nitratos y amonio sobre las raíces (longitud, número y color).
Glenn y Welker, 1993.	Determinar la interacción del potencial de presión del suelo y la presencia de competidores sobre las raíces del durazno.
Reid, Sorensen y Petrie, 1993	Estudio de la demografía radicular fina en planta madura de Kiwi.
Andren, Hansson y Vegh, 1993.	Medición de humedad en el suelo, así como del número y longitud de raíces. Medición de iones de nitrógeno, fósforo y potasio.
Snapp y Shennan, 1994.	Investigación de los efectos de la salinidad y del ataque de <i>Phithophtora</i> en raíz sobre el crecimiento y senescencia del tomate.
Ball, Oosterhuis y Mauromoustakos, 1994.	Evaluación de la respuesta de crecimiento diferencial de raíces y brotes, en condición de déficit hídrico, para la obtención de un modelo de crecimiento vegetal para resistencia a la sequía.
Wilson, Gunn y Cherrett, 1994.	Efecto de dos pesticidas en las interacciones entre invertebrados del suelo, crecimiento de raíz y producción de pastizal.
Halter, Sands, Nambiar y Ashton, 1996.	Estudio sobre la fisiología de la raíz de 2 especies de eucaliptos con relación a temperaturas de suelo bajas y variaciones día-noche que influyen el alargamiento las raíces.
Smith, A. L, 1997.	Establecer el papel que juega el uso del "Rhizolab" en la investigación

---

	“ <i>in situ</i> ” como un intermediario entre un experimento de campo y laboratorio. Creación de un diseño para medir el transporte y degradación biológica de un suelo contaminado por queroseno.
Waipar, Di mena, Skipp, y Cole, 1997.	Empleo de un sistema de minirrizotrófon para medir directamente los efectos de 2 hongos patógenos de sobre raíces de <i>Lolium</i> y <i>Trifolium</i>
Authokelting, Fanelli y Appleton, 1998.	Harris, Se probaron tres distintos tipos de bioestimulantes como auxiliares, del establecimiento vegetal sobre crecimiento radicular y flujo de savia en árboles de maple rojo.
Wilson y Valenzuela, 1998.	Evaluación del sistema radical del cultivo de trigo mediante dos métodos de medición.
Diefenbach, y Matzner, 2000.	Estudios de campo de la estabilidad de los gradientes <i>in situ</i> de la concentración de cationes y de aniones en la solución del suelo alrededor de raíces del árbol.
Göttlein., <i>et al.</i> 1999.	Movilización de aluminio en la solución del suelo en la rizosfera de árboles que crecen en suelos ácidos.
Wang <i>et al.</i> , 2004.	Dinámica del fósforo en la rizosfera de 5 especies.
Climent <i>et al.</i> , 2004.	Arquitectura del sistema radical en dos procedencias de <i>Pinus canariensis</i>
Ontiveros-Cortes <i>et al.</i> , 2005.	Crecimiento de la raíz del frijol con diferentes velocidades de secado del suelo.
Sanz, J.I. 2007.	Utilización de rizotrones para el estudio de la dinámica del crecimiento de raíces de palma de aceite.

---

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Sitio del experimento y material biológico

El estudio se llevó a cabo en el Colegio de Postgraduados (CP), en las cámaras de crecimiento ubicadas en el edificio de Botánica.

La primera etapa inició con la colecta de semillas de *Lupinus*, en el Estado de México en las siguientes coordenadas 19°10'13.31" N, 98°43'3.73" W; 2497 msnm. Es *Lupinus montanus*, (identificada por el herbario de botánica que se encuentra en esta institución), Figura 16. En el Cuadro 9 se presentan las características de las semillas de maíz, (proporcionada por el Programa de Semillas del CP).

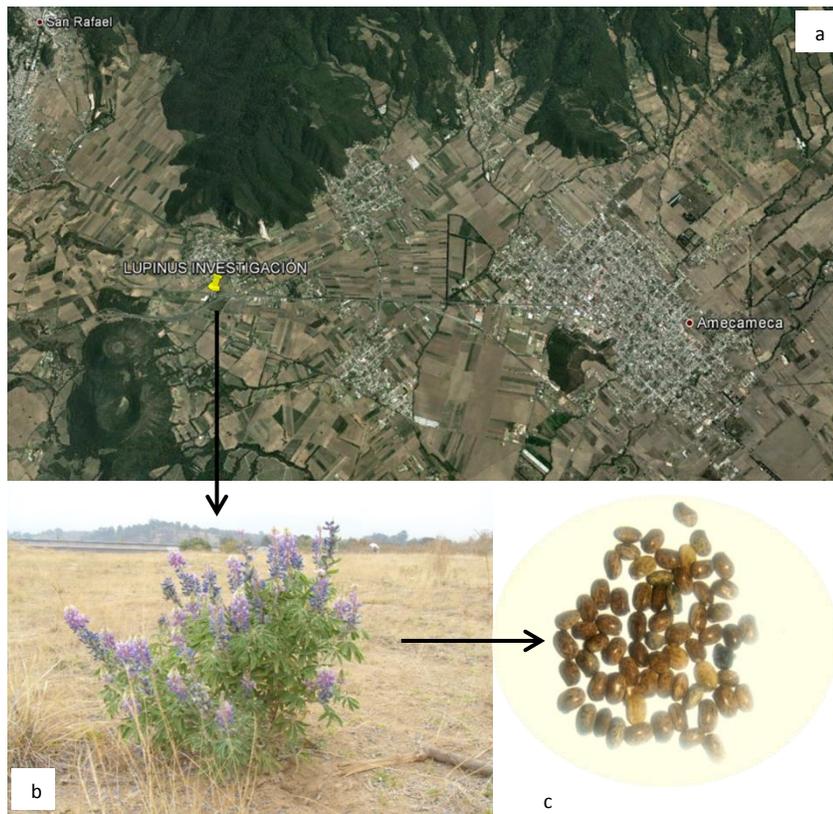


Figura 16. a) Ubicación de *Lupinus montanus*, b) Planta en campo, c) Semillas.

Cuadro 9. Características de la semilla de maíz utilizada.

Hibrido de maíz HS-2; Grano y forraje	
Categoría	Certificada
Lugar de producción	Texcoco, México.
Hibrido	Trilineal
Altura de la planta	2.70
Días a madurez fisiológica	150 días
Madurez a cosecha	180 días
Floración promedio	90 a 95 días
Adaptación	2000- 22400 msnm
Semilla tratada con insecticida, fungicida y colorante	Carboxin, Captán, Deltametrina, Rodamina

#### 4.1.1. Fuente de Fósforo

Fosfato de calcio dibásico y tribásico.

#### 4.1.2. Suelo

Se usaron dos tipos:

- ❖ Arena de río, se lavó 15 veces con la finalidad de eliminar suelo con cualquier tipo de nutriente, así mismo se esterilizó durante cuatro horas. Muestra compuesta de 20 muestras.

Cuadro 10. Análisis en arena

Parámetro	Técnica	
pH (relación 1:2)	7.6	Potenciómetro en el extracto de saturación
Fósforo (mg kg <sup>-1</sup> )	2.6	Olsen <i>et al.</i> , 1965
Nitrógeno total (%)	0.01	Micro-Kjeldahl

- ❖ Andosol, fue colectado en el Cerro del Tlálloc a la altitud de 2932 msnm; la ubicación geográfica 19°26'59.2'' N, 98°46'33.4'' W. Las muestras se tomaron a una profundidad de 0-30 cm, con una pala en 20 puntos diferentes dentro de un cuadrante en un diseño de zigzag, y se formaron 5 muestras compuestas (Figura 17), se llevaron al laboratorio de suelos de la Universidad Autónoma de Chapingo, fueron secadas durante 5 días a

temperatura ambiente y tamizaron con una malla de 2 mm para su análisis. En el Cuadro 11, se presentan algunas de sus características químicas.

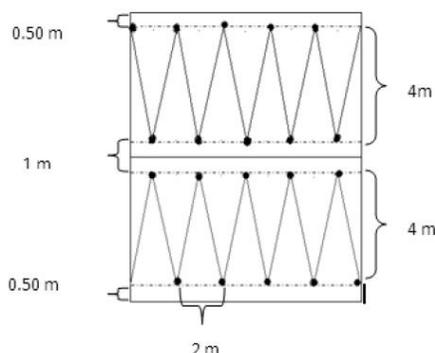


Figura 17. Muestreo de suelo en zigzag

Cuadro 11. Análisis en andosol

Parámetro		Técnica
pH (relación 2:1)	6.1	Potenciómetro en el extracto de saturación
Fósforo (mg kg <sup>-1</sup> )	13.5	Bray y Kurts, 1945
Nitrógeno (%)	0.30	Kjeldahl modificado.

#### 4.2. Diseño de rizotrones

El rizotron se construyó con madera y vidrios deslizables que nos permitieron hacer observaciones del sistema radical. Consta de dos compartimentos, cada uno de ellos tiene un ancho de 28 x 50 cm (A), divididos por una tabla de 3.5 cm de espesor (divisor central) (B). Se utilizó una tabla de 3 mm para el respaldo (D), y tres tiras de madera de 2 x 5 cm (C). Las paredes laterales 9 x 50 cm (grosor 7 mm) (D), la base y el divisor central tienen dos rieles, uno donde entra un vidrio de 3 mm, y otro para una tapa de madera de 5 mm para impedir el paso de luz. La base de 9 x 61 cm (grosor 7 mm), con perforaciones (7mm) cada 4 cm para drenar (E) (Figura 18). Se cubrió con tabletas de poliestireno (unicel) que es inerte propiciando un ambiente estéril. Para asegurar que no existirían filtraciones dentro del sistema, se impermeabilizó con parafina. Después de las adecuaciones el volumen del rizotron fue de  $1.2 \times 10^{-3} \text{ m}^3$ .

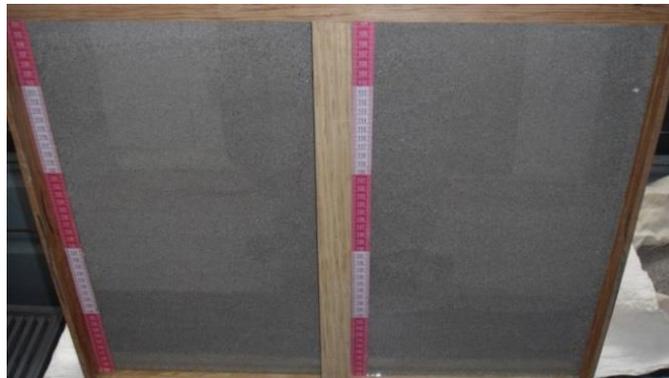
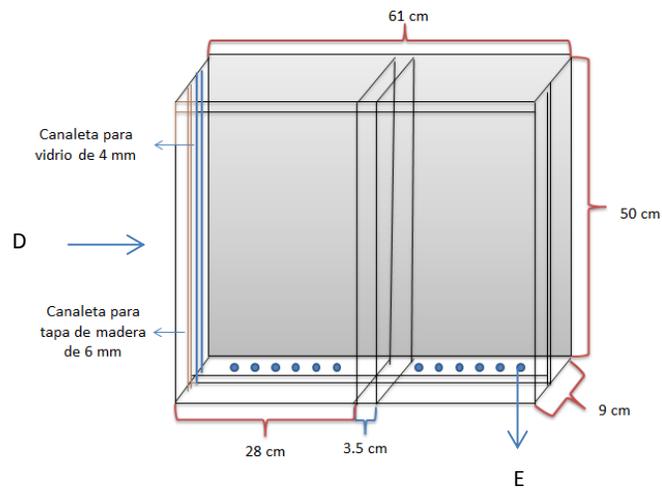
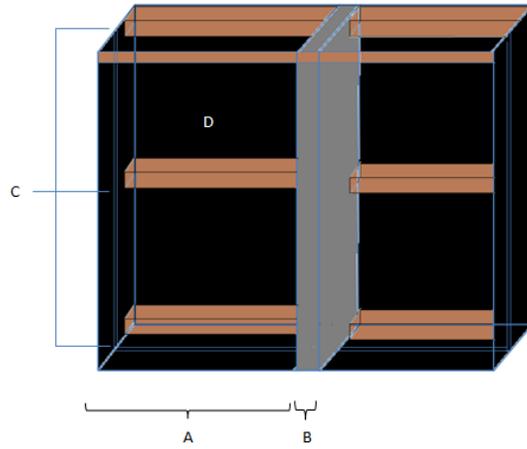


Figura 18. Diseño de Rizotron

### 4.3. Aislamiento de bacterias simbióticas fijadoras de N atmosférico.

A nivel de campo *Lupinus* tiene la capacidad de asociarse a bacterias del género *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium*, por esta razón se decidió aislar la bacteria de su ambiente natural e inocular las plantas de *Lupinus*. Para ello se colectaron plantas de *Lupinus* en la zona de San Pablo Ixayoc, Texcoco, Estado de México, a una altitud de 2932 msnm: coordenadas 19°26' 59.2" N, 98° 46' 33.4" W. La planta se extrajo con la raíz y se colocó en una hielera ya que las bacterias contenidas en los nódulos son susceptibles a cambios de temperatura y fueron transportadas a él laboratorio de Microbiología de Suelos. Los nódulos se retiraron de manera cuidadosa y se seleccionaron, los más grandes y de color rosado. Se dejó adherida una fracción de raíz, con la finalidad de no exponer el interior del nódulo. Se colocaron de 3 a 5 nódulos en gasas previamente cortadas (un área de aproximadamente de 5X5 cm). Para esterilizar los bultos que contenían los nódulos, se colocaron en alcohol por 30 segundos, seguido de un enjuague en agua destilada estéril por un minuto, se sumergieron en cloro por un minuto. Finalmente tres lavados con agua estéril por un minuto cada uno (Figura 19). Una vez esterilizados, se maceraron en tubos eppendorf para liberar los rizobios y se cultivó en el medio ELMARC (Cuadro 12), se incubó por 5 días a 25°C para el crecimiento. Para purificar se resembró en el mismo medio y nuevamente se incubó a 25°C.

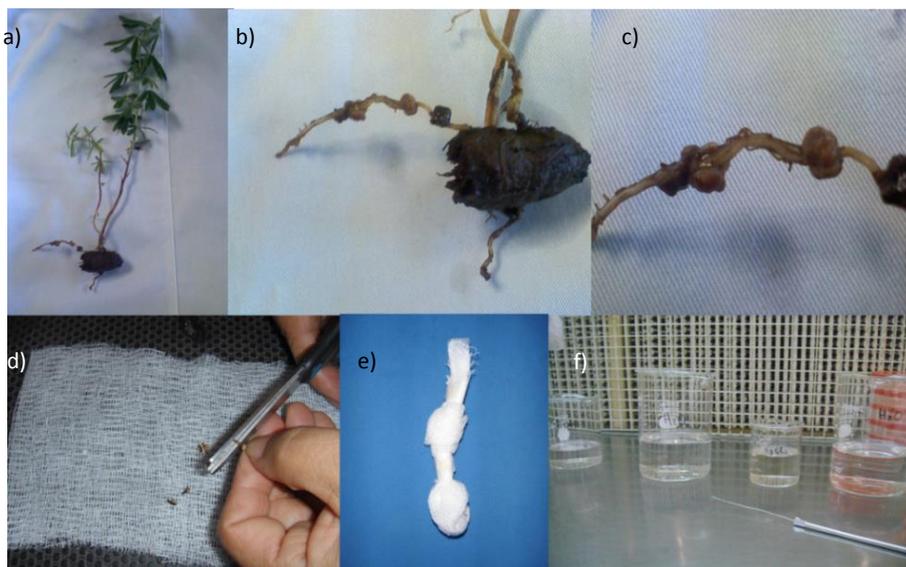


Figura 19. a) Planta de *Lupinus uncinatus* (Alderete *et al.*, 2008), b) y c) nódulos de *Lupinus*, d) aislamientos de los nódulos de la raíz, e) bulto de nódulos, f) clorox al 10% y agua destilada para esterilización.

Cuadro 12. Medio de cultivo ELMARC (Ferrera, 1993)

Reactivo	gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub>	0.18
NaCl	0.2
Manitol	9
Extracto de levadura	1.5
Agar	15
Rojo congo	10 ml/litro
H <sub>2</sub> O destilada	1L

#### 4.4. Producción del inóculo

Previo a la producción del inóculo se realizaron pruebas de infección de las cepas encontradas, en semillas de *Lupinus*. Para esto se utilizó vermiculita con arena 2:1, previamente esterilizada, después de 35 días se revisaron raíces para ver la formación de nódulos.

Cinco cepas fueron efectivas en producir nódulos. Se tomó una asada de la cepa y se inoculó en una botella con 20 mL de caldo extracto de levadura manitol. Una vez inoculadas, las botellas se pusieron en agitación a 180 rpm (revoluciones por minuto) y a una temperatura de 28 °C durante tres días para obtener una concentración de 10<sup>9</sup> bacterias por mL de medio.

Posteriormente se hicieron diluciones decimales seriales de 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-9</sup> (cada dilución se agitó con un agitador vortex); se sembraron las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-9</sup> en cantidades de 0.1 mL en cajas de petri con medio de cultivo ELMARC (extracto de levadura, manitol, agar y rojo congo), cada dilución fue inoculada por tres repeticiones. Finalmente, las muestras fueron incubadas durante 3 días a 28 °C, tiempo en los que se evaluaron los números de colonias presentes y así determinar la cantidad de rizobios que lleva el inoculante. Una vez pasado el tiempo de incubación se contaron las colonias presentes, para determinar la carga de rizobios, se aplicó la siguiente formula:

UFC (Unidades Formadoras de Colonias) = Número de colonias x Dilución x 20 mL de inóculo.

#### **4.5. Aislamiento de ADN (protocolo para aislar bacterias) (Doyle and Doyle, 1990).**

1. Precalentar el CTAB 2% (Tris-HCL 10 mM pH8.0; Na<sub>2</sub>EDTA 2 H<sub>2</sub>O 20 mM, pH 8.0; CTAB 2%; NaCl 1.4 M a 60° C.)
2. Etiquetar un tubo eppendorf de 2 mL
3. Agregar 1000 µl de CTAB 2% (en la campana) a los Tubo Eppendorf de 2 mL previamente etiquetados.
4. Moler las muestras en un mortero estéril y enfriado a -20°C hasta obtener un polvo fino. La muestra debe de mantenerse fría añadiendo nitrógeno líquido al mortero las veces que sea necesario.
5. Raspar con una espátula estéril el material molido y pasarlo al tubo Eppendorf con CTAB 2%.
6. Incubar los tubos a 80°C por 60 min. Mezclar a intervalos de 10 min, se puede utilizar vortex.
7. Centrifugar por 5 min a 10,000 rpm. En un Tubo Eppendorf de 1.5 nuevo previamente etiquetado se coloca el sobrenadante.
8. Adicionar 500µL de cloroformo-isoamílico (24:1). Mezclar 10 min los tubos por inversión a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 10,000 rpm 10 min. Sacar el sobrenadante y volver a lavar con 700µL de cloroformo-isoamílico (24:1). Mezclar 10 min los tubos por inversión.
10. Centrifugar a 10,000 rpm 10 mnt. En un Tubo Eppendorf de 1.5 nuevo, previamente etiquetado. Adicionar 600 µl de etanol 100% frio y colocarlo a -20°C antes de utilizarlo.
11. Sacar el sobrenadante y colocarlo en el tubo con etanol 100% previamente enfriado a -20°. Mezclar suavemente por inversión, al menos 7 veces. Incubar por al menos 2 h (sin agitación) a -20°C.
12. Centrifugar a 10,000 rpm por 30 min. Decantar evitando perder el pellet.
13. Resuspender el pellet en 400 µL de TE o agua HPLC e incubar a 37°C por 15 min.
14. Añadir 34 µL de NaOAc 3M y 1 mL de etanol a -20°C al 95%. Incubar a -20°C durante 1 hr. Centrifugar a 10000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
15. Lavar el pellet con 1ml de etanol al 70%. Centrifugar por 5 min y dejar secar.
16. Resuspender la pastilla en 100 µl de TE y almacenar a -20°C.

#### 4.5.1. Iniciadores utilizados para la amplificación de bacterias

Se amplificó el gen 16S rRNA con los iniciadores 8F y 1492R. La reacción de secuenciación se realizó con los iniciadores 514F y 1492R.

#### 4.5.2. Construcción del árbol filogenético

Para obtener las secuencias consenso se ensamblaron ambas hebras con el software Bioedit (Hall, 1999) las que se compararon con la opción BLASTNucleotide de la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Las secuencias consenso se alinearon con el programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011), se usó el método de Máxima Parsimonia para la construcción del árbol filogenético. Para determinar la confiabilidad de los nodos se analizó mediante el método Bootstrap con 1000 repeticiones (Felsestein, 1985).

#### 4.5.3. Bacterias formadoras de nódulos

En la Figura 20 se muestra la bacteria aislada de nódulos de *Lupinus uncinatus*, se obtuvieron 5 cepas, que resultaron positivas en la nodulación (Figura 21b, c).

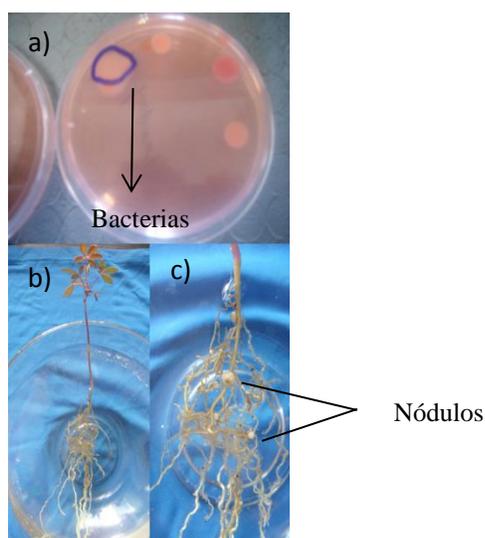


Figura 20. a) Bacterias de nódulos de *Lupinus uncinatus*. b-c) Nódulos en plantas de *Lupinus monatanus*, después de 35 de haber inoculado.

#### 4.5.4. Calidad del inoculante

Se determinó la calidad del inóculo de las diluciones sembradas, solo se cuantificaron las UFC encontradas en la dilución  $10^{-6}$ , ya que en las demás diluciones no era posible realizarse el

conteo. Las UFC cuantificadas en la dilución  $10^{-6}$ , se muestran en el Cuadro 13, el promedio de las tres UFC es de  $1.8 \times 10^9$ .

Cuadro 13. Cuantificación de la carga de rizobios en el inóculo, como indicador de la calidad.

Repetición	Número de colonias	Por la dilución	Volumen del inoculante	UFC <sup>§</sup>
1	65	$10^6$	25 ml	$1.625 \times 10^9$
2	72	$10^6$	25 ml	$1.8 \times 10^9$
3	84	$10^6$	25 ml	$2.1 \times 10^9$
Promedio de la carga de rizobios en el sustrato				$1.8 \times 10^9$

§UFC: Unidades formadoras de colonias. <sup>§</sup>UFC: (número de colonias) (dilución  $10^6$ ) (volumen del inoculante).

La concentración estándar exigida en los inoculantes es de  $10^9$  células viables de rizobios por g ó mL de soporte a la fecha de elaboración (Benintenden, 2010), por lo que el inoculante que se preparó en laboratorio cumplió con la carga bacteriana para infectar las plantas de *Lupinus*.

#### 4.5.5. Identificación filogenética de 5 aislamientos bacterianos

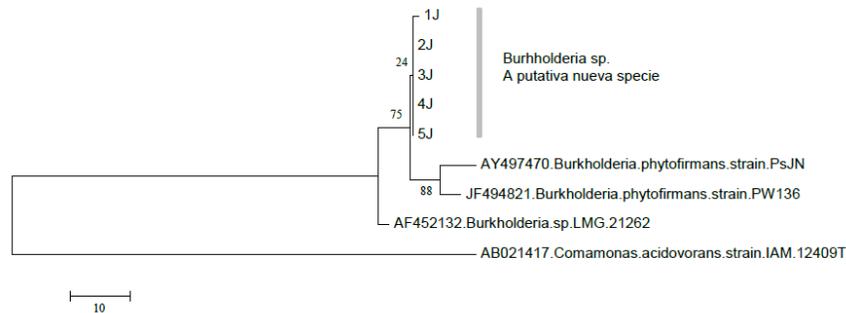


Figura 21. Árbol filogenético construido con el método de Máxima Parsimonia. Se compararon las secuencias obtenidas con las secuencias de referencia depositadas en Genbank.

#### 4.5.6. Escarificación y germinación en semillas de *Lupinus*

De 8000 semillas, se tomaron lotes de 363 para realizar pruebas germinativas, tratamientos de escarificación mecánica y ácido sulfúrico. El total de semillas usadas fue de 1815 en los 4 tratamientos y el testigo, como se muestra en la Figura 22. Las pruebas se realizaron en los campos experimentales del Colegio de Postgraduados.

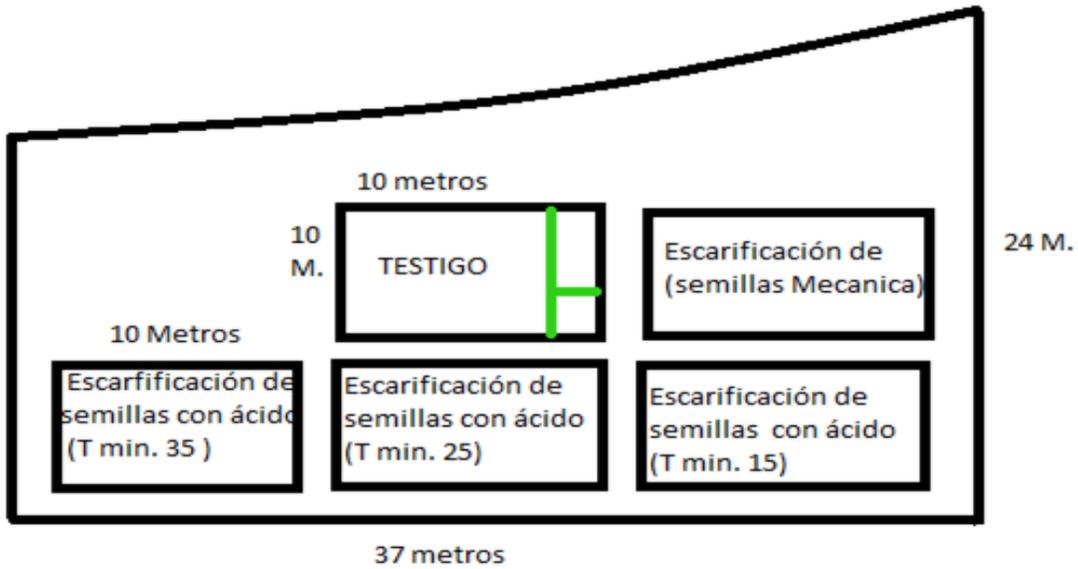


Figura 22. Diseño de pruebas germinativas en campo.

El mayor porcentaje se logró con el tratamiento de  $H_2SO_4$  (35 min) seguido de la escarificación mecánica (Figura 23).

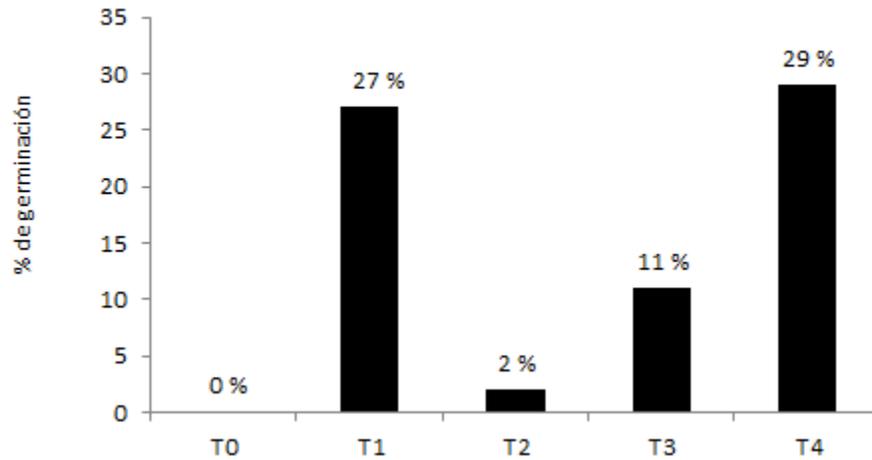


Figura 23. Comportamiento de los tratamientos de escarificación

T0= Testigo; T1= Escarificación mecánica; T2=  $H_2SO_4$  (15 min); T3=  $H_2SO_4$  (25 min); T4=  $H_2SO_4$  (35 min)

#### 4.5.7. Desarrollo del experimento en arena

Los rizotrones fueron llenados con arena de río a una altura de 40 cm, a esta distancia se colocaron bandas de fosfato de calcio (1 gr), las cuales se cubrieron nuevamente con arena a una altura de 48 cm, los 2 cm restantes fueron utilizados para efectuar el riego, Figura 24a.

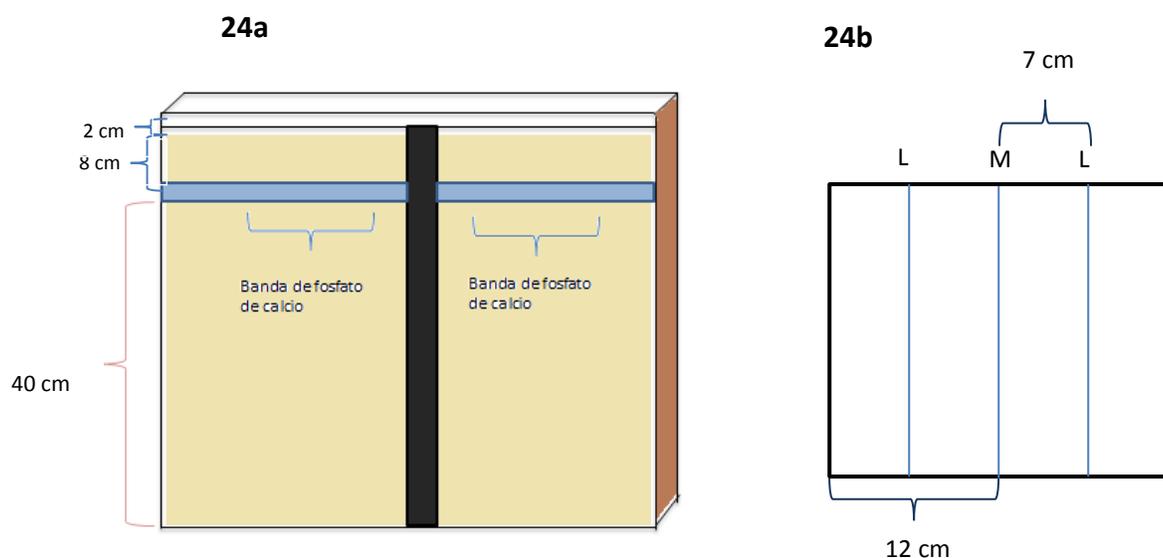


Figura 24. Diseño de experimento en arena

Se colocaron dos semillas de *Lupinus* por una de maíz, el arreglo espacial del sistema es similar al utilizado en campo donde se intercalan las especies. El maíz se colocó en el centro del compartimento a 12 cm del costado lateral y el *Lupinus* a 7 cm del maíz (Figura 24b), todo esto a una profundidad de 1 cm. Debido a los problemas de latencia que presenta la leguminosa se colocaron tres semillas en cada punto (escarificadas mecánicamente), después de germinadas se eligió una, a los 10 días se inoculó con 1 mL de la bacteria simbiótica. Debido a que *Lupinus* tiene un ciclo de crecimiento más largo, fue el primero en sembrarse; después de 30 días fueron sembradas las semillas de maíz. La razón por la cual se utilizaron dos fuentes de fosfato de calcio es por la fuerza de retención del elemento en cuestión; por estructura química en el fosfato de calcio tribásico retiene con mayor fuerza el fósforo, seguido del fosfato de calcio dibásico. Se realizaron tres fertilizaciones con las soluciones modificadas. En los tratamientos donde se inoculó, se aplicó la solución sin nitrógeno, y en los no inoculados se aplicó solución con nitrógeno. En el transcurso del experimento se realizaron tres fertilizaciones. El sustrato que fue utilizado es bastante poroso con alta capacidad de filtración, por lo que se implementó un sistema

de riego por goteo (venocllisis modificado: sistema de uso médico), de esta forma tanto el riego como la fertilización eran aprovechados al máximo por las plantas. Para generar que las raíces se pudieran observar claramente, los rizotronos se colocaron en un ángulo de 30° con respecto a la vertical (Figura 25), después del primer mes se observó que el ángulo no era suficiente, así que se colocó a 45°. El trabajo tiene un diseño de bloques completamente al azar, con cuatro repeticiones (Cuadro 14). En la cámara de crecimiento se utilizaron las siguientes temperaturas: 26 °C con luz durante 12 horas y 16 °C en oscuridad. Se midió la luz emitida por la cámara de crecimiento siendo  $500 \mu E s^{-1} m^{-2}$ .

Para llevar el control de crecimiento de raíces de *Lupinus* se utilizaron acetatos que se anexaron a los cristales de los rizotronos, en cada medición se utilizaron plumones indelebles de diferentes colores. En el caso de maíz el crecimiento se trazó sobre el vidrio esto nos permitió llevar un control exacto de ambas especies.

Cuadro 14. Tratamiento de dos réplicas en arena

Fuente de fósforo	Dosis (gr)	Sistema de cultivo	Solución nutritiva Steiner
Fosfato de calcio tribásico	1	M	A
Fosfato de calcio tribásico	1	M/L	B
Fosfato de calcio tribásico	1	M	A
Fosfato de calcio tribásico	1	M/L	B
Fosfato de calcio dibásico	1	M	A
Fosfato de calcio dibásico	1	M/L	B
Fosfato de calcio dibásico	1	M	A
Fosfato de calcio dibásico	1	M/L	B

M- (monocultivo) maíz; M/L- (asociación) maíz/*Lupinus*. A-Con nitrógeno; B-Sin nitrógeno.

#### Solución de Steiner modificada

Se prepararon dos soluciones nutritivas modificadas a) sin nitrógeno y fosfato de calcio, b) nitrógeno y fosfato de calcio, pH de la solución 5.8.

- a) ( $g L^{-1}$ ) 0.4929 Mg  $SO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0.172 Ca  $SO_4 \cdot 2 H_2O$ , 0.609  $K_2 SO_4$ , micronutrientes.

b) ( $\text{g L}^{-1}$ ) 0.944  $\text{Ca} (\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0.404  $\text{KNO}_3$ , 0.261  $\text{K}_2 \text{SO}_4$ , 0.492  $\text{Mg SO}_4$ , micronutrientes,

#### 4.5.8. Desarrollo del experimento en andosol.

En el segundo experimento se llevó a cabo el llenado de los rizotrones con suelo de tipo andosol, no se aplicaron las bandas de fosfato de calcio y no se utilizó ninguna solución de Steiner. En el Cuadro 15, se puede observar el diseño del experimento, completamente al azar con 4 repeticiones.

Cuadro 15. Tratamiento de una réplica en andosol

Suelo	Inoculado (ml)	Sistema de cultivo
Andosol	0	M
Andosol	1	M/L
Andosol	0	M/L

M- (Monocultivo) maíz; M/L- (Asociación) maíz/*Lupinus*.

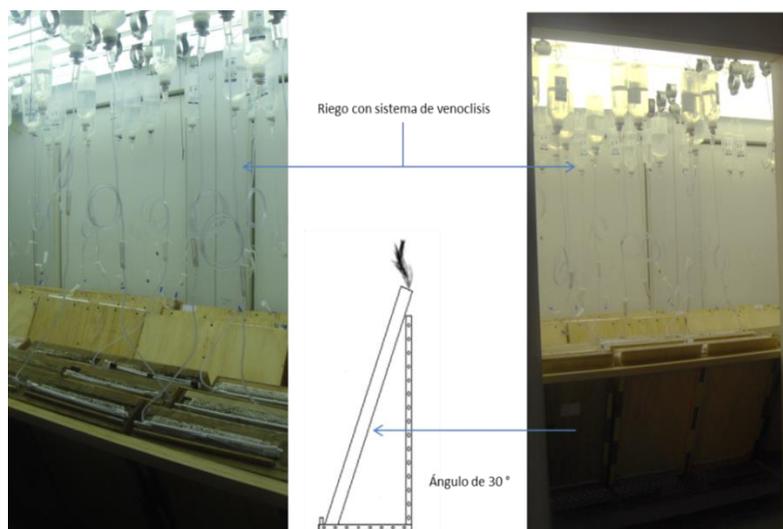


Figura 25. Rizotrones con ángulo de 30° con respecto a la vertical

El experimento tuvo una duración de dos meses y el maíz solo se cultivó durante el último mes. En la cosecha se extrajeron las plantas, se pesó la biomasa aérea y la biomasa radical por separado. En los tratamientos donde se inoculó se contabilizó el número de nódulos totales en las plantas de *Lupinus*. El material fue lavado y secado en estufa a temperatura constante de 70°C y nuevamente pesado. En el Cuadro 16, se presentan los análisis realizados al tejido vegetal.

Cuadro 16. Procedimientos analíticos para el análisis de plantas

Parámetro	Técnica utilizada
Nitrógeno	Semimicro-kjeldahl (Bremmer, 1965)
Fósforo	Fotocolorimetría por reducción con molibdovanadato (Bremmer, 1965)

Procedimientos analíticos para el análisis de plantas después de la cosecha (Raíz).

Para llevar a cabo la medición de las raíces se utilizó el programa Image-tool. Para ello se digitalizó cada imagen obtenidas de los cristales y acetatos. Las imágenes se importaron al programa, en el cual se contabilizó y midió la longitud de la raíces (Figura 26).

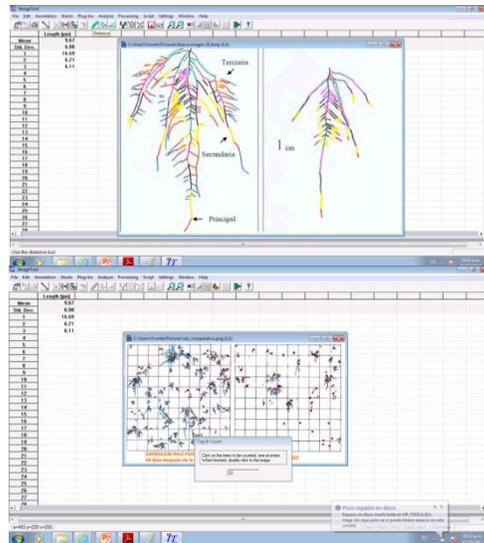


Figura 26. Contabilización y medición de raíces con el programa Image-tool.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SAS 9.0, se realizó un ANOVA y prueba de Tukey.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Fósforo en parte aérea y radical de maíz en suelo arenoso.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el análisis de varianza mostró que el porcentaje de  $P$  en la parte aérea existen diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ), siendo mayor en asociación que en monocultivo (Figura 30).



Figura 27. Rizotrones con arena, asociación y monocultivo

Los tratamientos 2 (T2), 4 (T4) y 8 (T8) se refieren a la asociación de maíz y *Lupinus*, estos tuvieron los porcentajes más altos en  $P$ , lo que indica que *Lupinus* libera el nutrimento que se encuentra retenido en el calcio y lo deja disponible para maíz (Anexo 2, Figura 31). Maíz obtuvo las mejores concentraciones de  $P$  en T2 (0.032), tratamiento donde se agregó la solución nutritiva con  $N$ , esto concuerda con el estudio realizado por Sas *et al.* (2002) menciona que con una buena nutrición de  $N$  y bajas cantidades  $P$ , generan un sistema de raíces que puede ser determinante en la solubilización de  $P$ . El T4 tiene relevancia ya que que en este tratamiento se inoculó a *Lupinus* con la bacteria y fue el segundo mejor tratamiento (0.030), como ya se mencionó *Burkholderia* es una bacteria que es capaz de hacer simbiosis con ciertas leguminosas, en este estudio pudimos observar que la bacteria es capaz de nodular a *Lupinus*. Para la concentración de  $P$  en raíz existen diferencias significativas (Anexo 3). El tratamiento T4 (0.027) y T7 (0.027) fueron los valores

más altos, T4 corresponde a la asociación, y T7 al monocultivo, seguidos de los tratamientos T3 (0.020) y T8 (0.018) (Figura 32).

De acuerdo con Jones (1998), los porcentajes obtenidos en tejido de maíz se encuentran por debajo de 0.15%, criterio que es considerado como deficiente (Cuadro 17). Ninguno de los tratamientos se acerca a este valor, las plantas estuvieron bajo condiciones de estrés de *P* y *N*, además de ser un suelo arenoso, en el Cuadro 10 se pueden observar algunas las características químicas. El fosfato de calcio tribásico, fue el compuesto que mejor se asimiló por las plantas de maíz (T2, T4), esto tiene gran importancia debido a que este compuesto tiene un alto grado de insolubilidad, esto nos indica que la leguminosa tiene habilidad de movilizar *P* que se encuentra retenido en el calcio y dejarlo disponible para maíz, a diferencia de lo que encontramos en monocultivo.

Cuadro 17. Rango de contenido de nutrientes en el tejido foliar de *Zea mays* (Jones, 1998).

Elemento	Deficiente	Bajo	Suficiente	Alto
Nitrógeno %	< 2.45	2.45-2.75	2.76-3.50	3.51-3.75
Fósforo %	< 0.15	0.16-0.24	0.25-0.40	0.41-0.50



Figura 28. Rizotrones con suelo arenoso, a) maíz en monocultivo, b) maíz en asociación con *Lupinus*.

Se ha reportado que *B. cepacia* tiene capacidad adecuada de solubilizar fosfatos de calcio, hierro y aluminio (Mora y Toro, 2007). En *Lupinus albus* se han identificado bacterias de Burkholderia, y la presencia de estas se incrementaban en raíces senescentes, siendo menor en raíces jóvenes (Weisskopf et al., 2011).

Algunas investigaciones concluyen que la asociación de Trigo con *Lupinus albus* mejora las concentraciones de *P* en su biomasa (Gardner y Boundy, 1983; Marschner *et al.*, 1987; Akthar, 2004; Rodas *et al.*, 2001).

En un estudio con *Lupinus albus*, Gardner y Boundy (1983) mencionan que el mecanismo probable por el que el *P* se mueve en la interface suelo/raíz, es por la excreción de iones citrato por las raíces de esta especie. Dinkelaker *et al.* (1989), estudiando la excreción de ácido cítrico y precipitación de calcio en la rizosfera de *Lupinus albus* en un suelo calcáreo, observaron que ante una deficiencia de *P*, se desarrollan raíces proteoides que son capaces de abatir el pH. Por medio de espectroscopia de rayos x, observaron abundantes precipitados blancos de citrato de calcio. El citrato en general y el ácido cítrico fueron altamente efectivos en disolver fosfato tricalcico y fosfatos de Fe y Al. Gerke *et al.* (1994), al estudiar la influencia de carboxilatos sobre la movilización de P, Al y Fe, encontraron que en la rizosfera de *Lupinus* había citrato y malato, la movilización de Al, Fe y P se atribuyó a intercambios ligados de *P* por citrato y la solubilización de Al y Fe como complejos de carboxilados. Ozawa *et al.* (1995), encontraron que plantas de *L. albus* en soluciones nutritivas deficientes de *P* se incrementaba la actividad de la fosfatasa ácida.

La mayoría de los estudios de asociación utilizan suelos de origen natural, no podemos perder de vista que un suelo de esta condición, está compuesto de una gran cantidad de bacterias y que muchas de ellas tienen capacidad de solubilizar y movilizar el *P*. Los géneros bacterianos que tienen esa capacidad corresponden a *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Yarrowia*, *Streptosporangium* y *Erwinia* (Paredes y Espinosa, 2009). La importancia de este trabajo radica en que la variable en la cual estamos interesados ha sido aislada de tal forma que no existe posibilidad alguna de atribuir la solubilización de *P* a bacterias o materia orgánica.

Las investigaciones realizadas a nivel de raíz han sido centradas en la liberación de *P*, donde las especies que se utilizan con mayor frecuencia son especies domesticadas como *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, y *L. luteus*. En México todas las especies que se han identificado son silvestres, de aquí que surja el interés para ver si estas especies son capaces de mejorar la producción de granos básicos.

El uso de rizotrones nos permitió observar el comportamiento del sistema radical de *Lupinus* en ambiente de estrés de *P*. Se observó que esta especie no desarrolla ninguna estructura proteoide (raíces “clusters”) como se reportan en especies domesticadas. En la Figura 29a, se puede observar la interacción de las raíces de *Lupinus* con maíz. En la Figura 29b, se tienen las raíces de *Lupinus* que corresponde al tratamiento (T2); la Figura 29c muestra el comportamiento de las raíces sometidas al tratamiento (T4). Después de analizar la arquitectura radicular se observa que no se presentan estructuras proteoides, ese comportamiento se presenta en todos los tratamientos de asociación (Anexo 3), En relación a esto, existe evidencia en *Lupinus angustifolius* (Egle *et al.*, 2003) y *Lupinus mutabilis* (Pearse *et al.*, 2006) no producen raíces especializadas “clusters” pero liberan grandes cantidades de carboxilatos. La estructura de esta especie es muy similar a la de frijol.

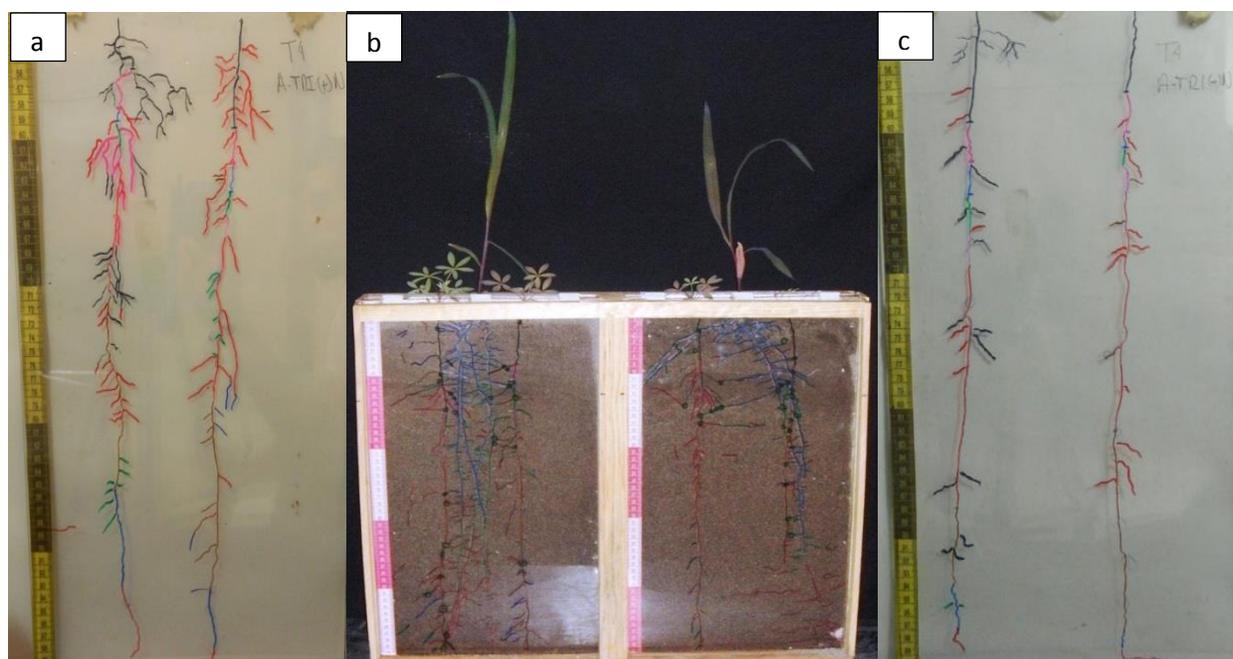
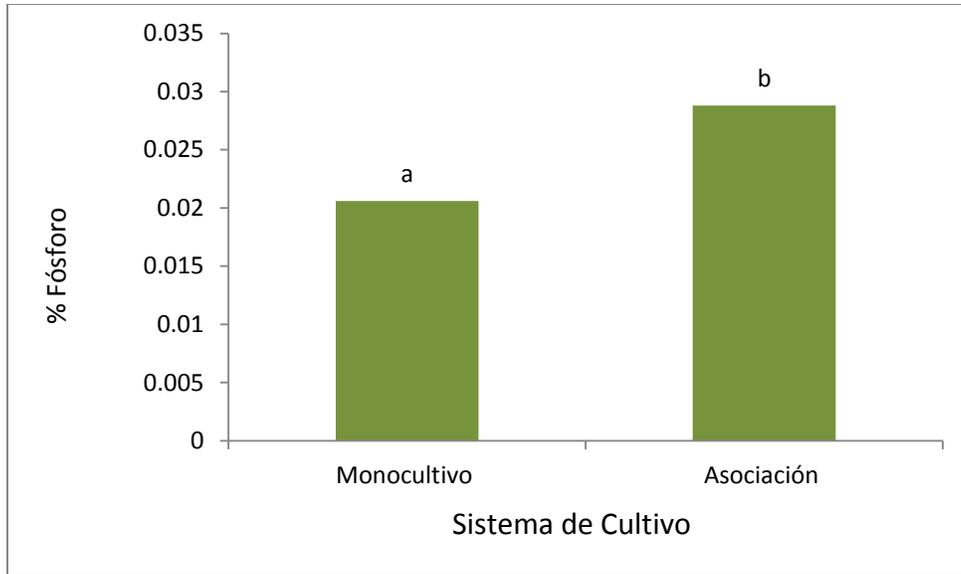
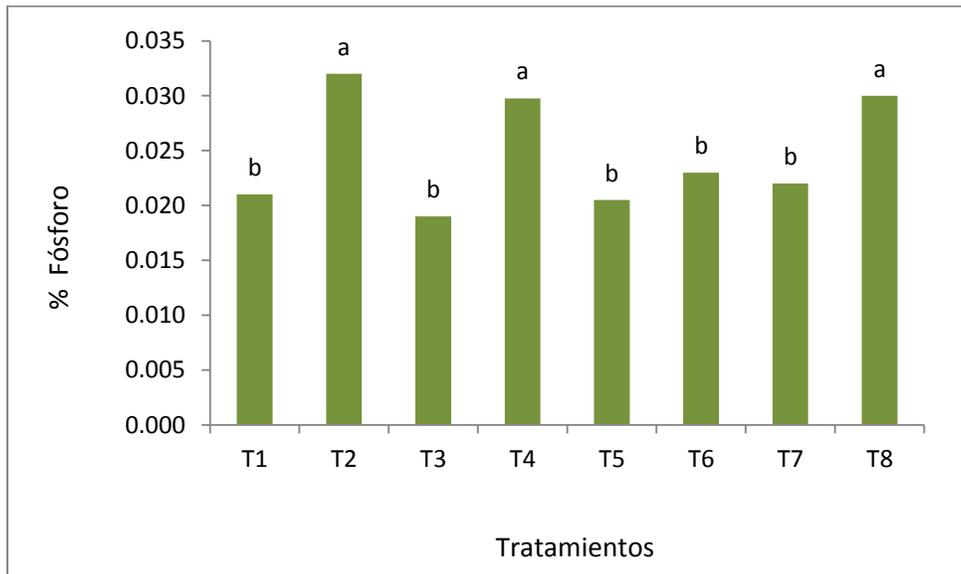


Figura 29. Arquitectura radicular de *Lupinus montanus* y de la asociación maíz/*Lupinus*.



\*Cifras seguidas de las mismas letras son iguales estadísticamente (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

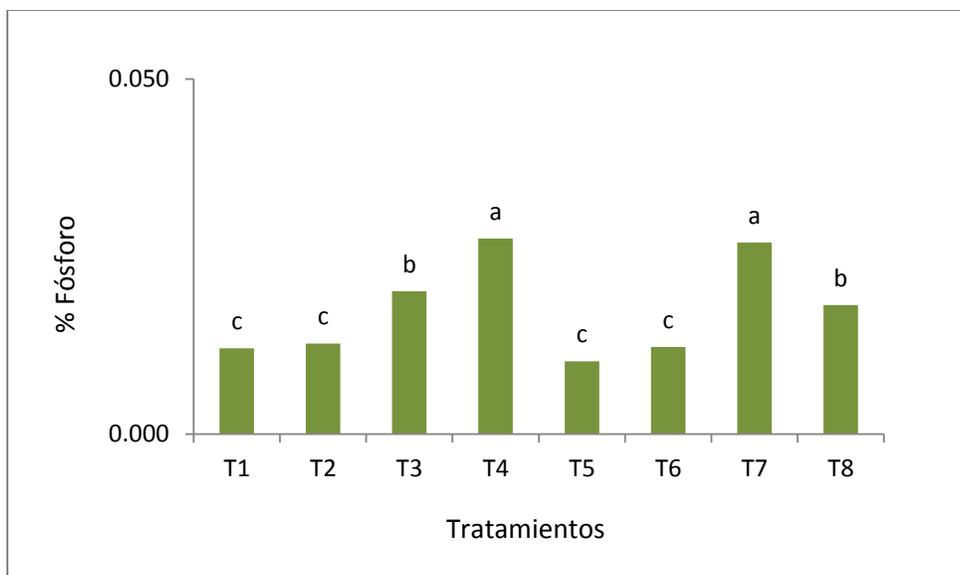
Figura 30. Concentración de fósforo en parte aérea de maíz (arena)



(**T1**) FA·SA·C1; (**T2**) FA·SA·C2; (**T3**) FA·SB·C1; (**T4**) FA·SB·C2; (**T5**) FB·SA·C1; (**T6**) FB·SA·C2; (**T7**) FB·SB·C1; (**T8**) FB·SB·C2. **FA**: Fosfato de calcio tribásico; **FB**: Fosfato de calcio dibásico. **SA**: Solución nutritiva Steiner (+) nitrógeno; **SB**: Solución nutritiva Steiner (-) nitrógeno. **C1**: Monocultivo; **C2**: Asociación.

\*Cifras seguidas de las mismas letras son iguales estadísticamente (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

Figura 31. Concentración de fósforo en parte aérea de maíz (arena).



(T1) FA·SA·C1; (T2) FA·SA·C2; (T3) FA·SB·C1; (T4) FA·SB·C2; (T5) FB·SA·C1; (T6) FB·SA·C2; (T7) FB·SB·C1; (T8) FB·SB·C2. FA: Fosfato de calcio tribásico; FB: Fosfato de calcio dibásico. SA: Solución nutritiva Steiner (+) nitrógeno; SB: Solución nutritiva Steiner (-) nitrógeno. C1: Monocultivo; C2: Asociación.

\*Cifras seguidas de las mismas letras son iguales estadísticamente (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

Figura 32. Fósforo en raíz de maíz (arena).

## 5.2. Nitrógeno en parte aérea y radical de maíz en suelo arenoso

El análisis de varianza mostró que para el porcentaje de  $N$ , no existen diferencias significativas (Figura 34) (Anexo 2). Un comportamiento similar se presenta en el porcentaje de  $N$  en raíz. La idea de inocular y agregar solución nutritiva con  $N$ , fue con el fin de observar si existían cambios morfológicos en el sistema radical de *Lupinus*, que se verían reflejados en la movilización de  $P$ , pero no se presentaron tales estructuras (Figura 33e, f y g). La nutrición de nitrógeno puede ser determinante en la formación de raíces proteoides en algunas especies silvestres. Sas *et al.* (2002) examinaron los efectos que tiene la nutrición de  $N$  en sus diferentes formas que son amonio, nitrato y fijación de nitrógeno, bajo deficiencias de  $P$ . El número de raíces proteoides aumentaron considerablemente cuando el suministro de  $P$  fue  $1\mu\text{M}$ , en comparación con  $50\mu\text{M}$ . Además, se encontró que bajo deficiencia de fósforo la mejor fuente de nitrógeno es  $\text{NH}_4^+$ , resultando gran número y biomasa de raíces proteoides. Ante deficiencias de  $P$  se produce malato deshidrogenasa, que participa en el ciclo del ácido cítrico y ante esta deficiencia la síntesis de malato puede mejorar la formación de nódulos, pero que un exceso de este puede inhibir la fijación de nitrógeno (Le-Roux *et al.*, 2007). Schulze *et al.* (2006), evaluaron la formación de

nódulos en raíces proteoides de *Lupinus* con bajas concentraciones de *P*. Observaron que a los 21 días (Figura 33a, b, c y d) el número de nódulos era mayor en el tratamiento sin *P*, pero a los 37 días incrementaban los nódulos en el tratamiento con (+) *P*. Con esto se abre un campo nuevo de investigación ya que los trabajos reportados han sido inoculados con *Bradyrhizobium* y en este trabajo se utilizó a *Burkholderia*.

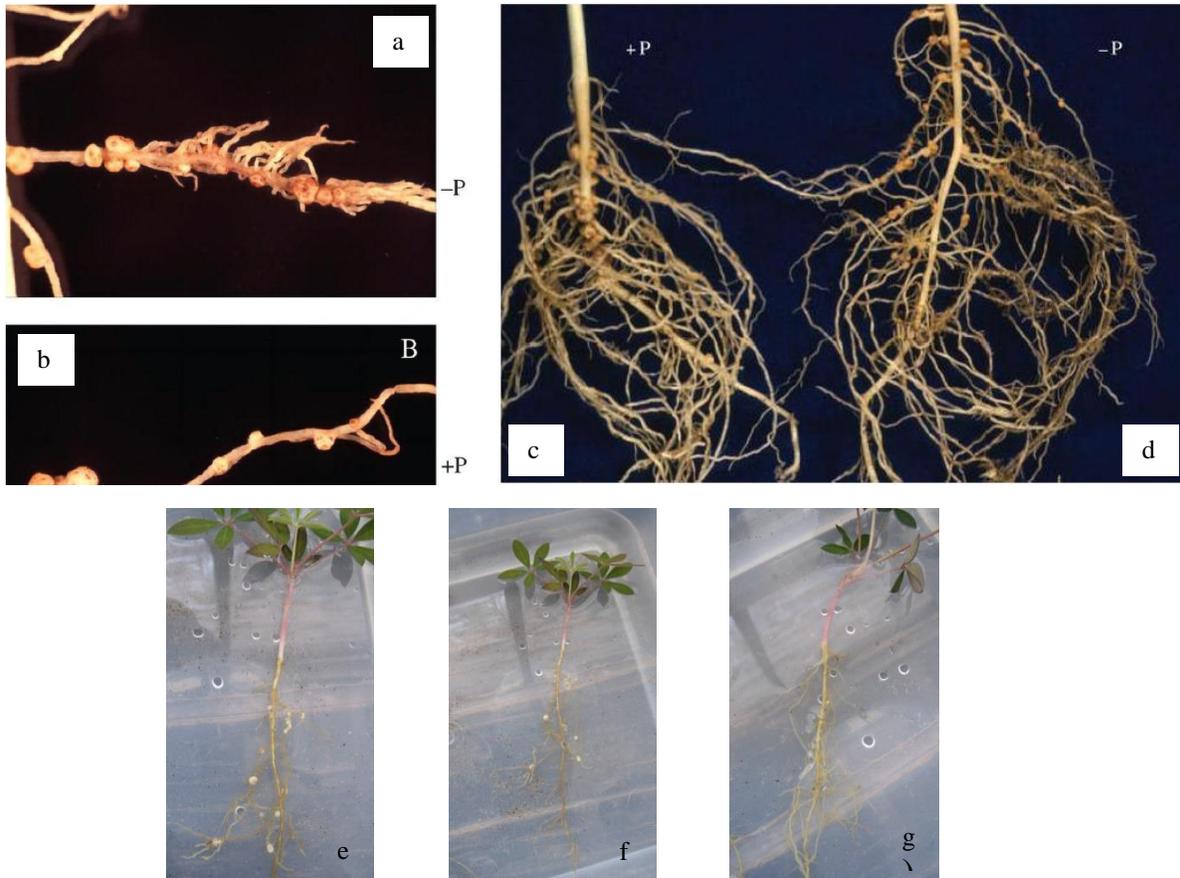
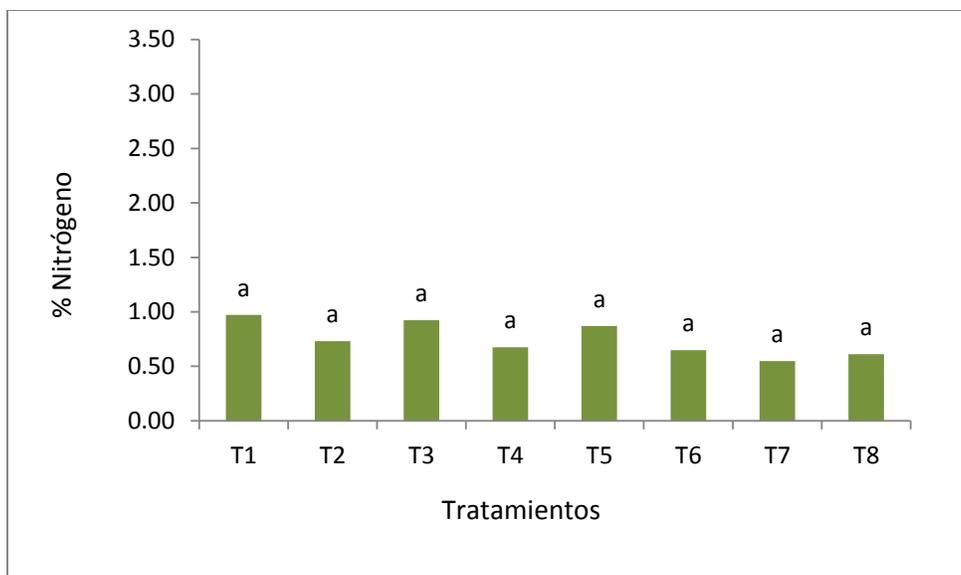


Figura 33. a), b), c), d) formación de nódulos en raíces de *Lupinus albus* sin *P* (-*P*) y con *P* (+*P*) a los 21 días; e), f) formación de nódulos en raíces de *Lupinus montanus* con *Burkholderia* a los 60 días bajo condiciones de estrés de *P*. g) sistema radical de *L. montanus* con N, a los 60 días.



(**T1**) FA·SA·C1; (**T2**) FA·SA·C2; (**T3**) FA·SB·C1; (**T4**) FA·SB·C2; (**T5**) FB·SA·C1; (**T6**) FB·SA·C2; (**T7**) FB·SB·C1; (**T8**) FB·SB·C2.

**FA:** Fosfato de calcio tribásico; **FB:** Fosfato de calcio dibásico. **SA:** Solución nutritiva Steiner (+) nitrógeno; **SB:** Solución nutritiva Steiner (-) nitrógeno. **C1:** Monocultivo; **C2:** Asociación.

\*Cifras seguidas de las mismas letras son iguales estadísticamente (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

Figura 34. Nitrógeno en parte aérea de maíz (arena).

### 5.3. Fósforo en parte aérea y radical de maíz en suelo andosol

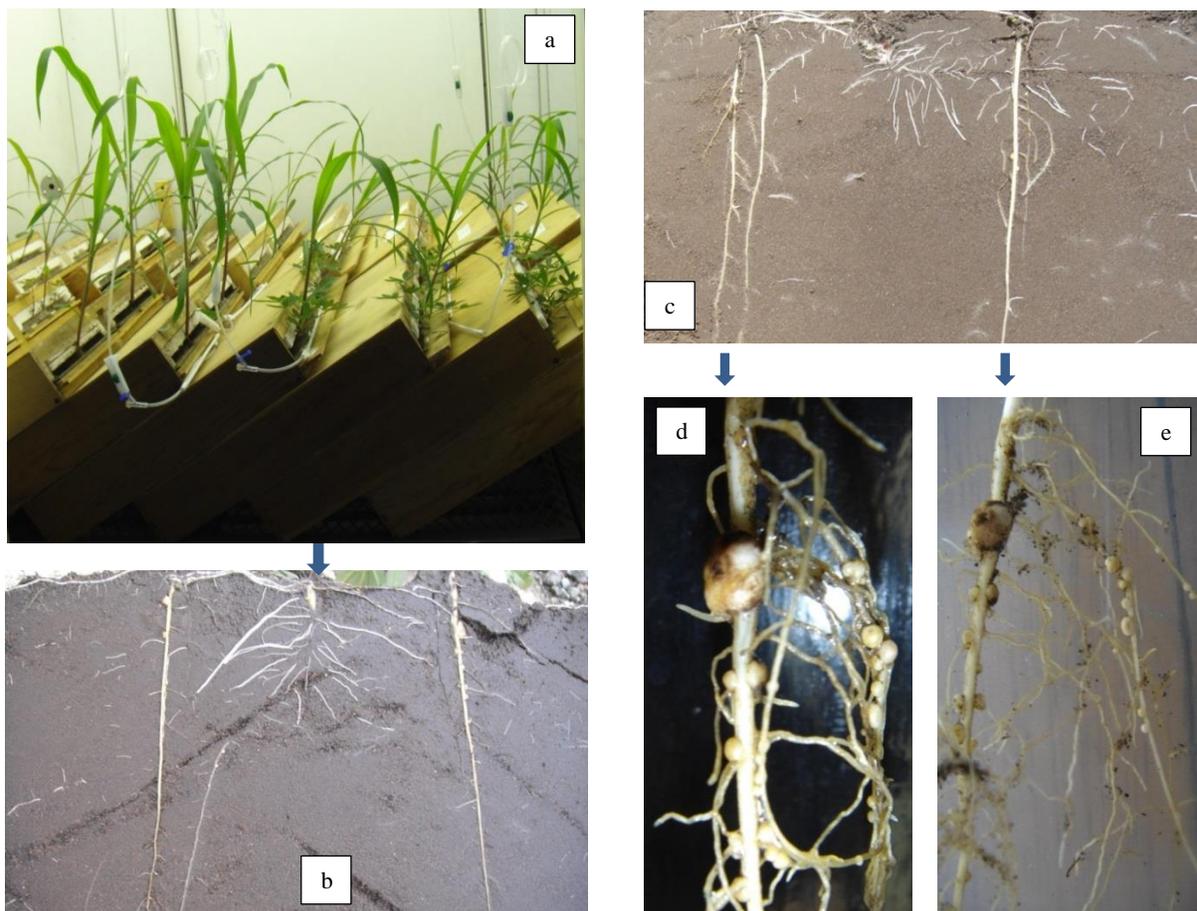
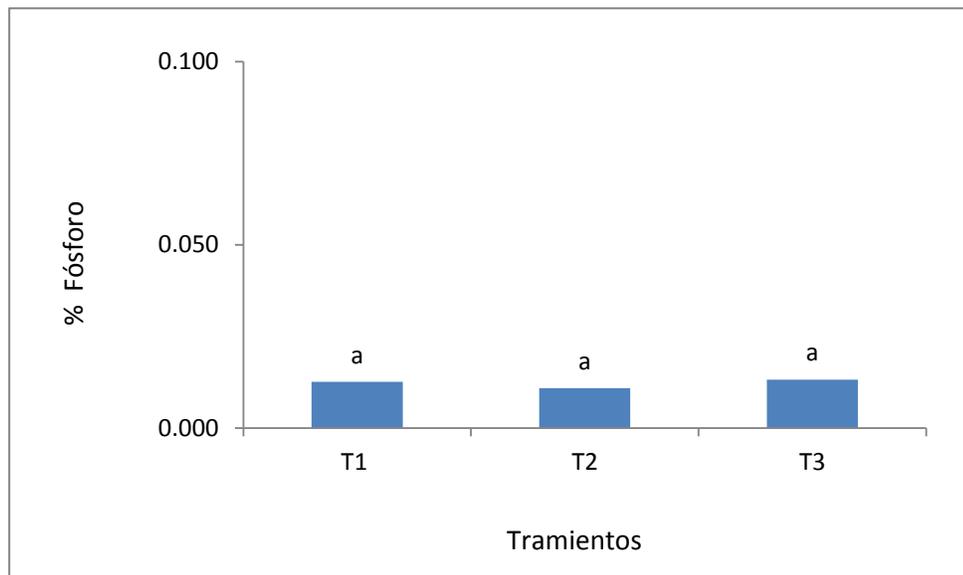


Figura 35. a) Desarrollo del experimento en cámaras de crecimiento; b), c) vista frontal de la asociación entre maíz y *Lupinus* en un rizotrono, d,e) *Lupinus* inoculado con *Burkholderia* a los 60 días en un suelo de origen volcánico (andosol).

El análisis estadístico para la concentración de *P* en parte aérea y sistema radical indican que no hay diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) (Anexo 3) (Figura 36). El valor más alto de *P* se encontró en T1(0.013) y T3 (0.013), estos valores están por debajo de los criterios establecidos por Jones (1998), donde valores menores a 0.15 se consideran como deficientes.

El suelo (andosol) utilizado en estos tratamientos no fue esterilizado y no se agregó ningún fertilizante, solo se utilizó el inoculo con *Burkholderia* (T2). La cantidad de *P* en el suelo fue de  $13.5 \text{ mg kg}^{-1}$  y de acuerdo con la Nom-21-SEMARNAT (2000) un valor  $< 15$  se considera como bajo; estas condiciones eran propicias para generar estrés en las plantas de *Lupinus*.

El uso de rizotrones permitió observar que efectivamente no se presentan las estructuras proteoides que se reportan para *Lupinus albus* y *angustifolius* (Figura 35b y c). Después de haber transcurrido 60 días de crecimiento y de estos 30 días en asociación con maíz, no se presenta un efecto benéfico de nutrición en maíz. En futuros estudios se tendrá que estudiar con más tiempo la interacción de estas especies, y encontrar el punto donde la leguminosa tenga la capacidad de solubilizar el *P* que se encuentra en la matriz del suelo y dejarlo disponible para maíz.



T1= monocultivo, T2= Asociación (+) bacteria, T3= Asociación (-) bacteria  
 \*Cifras seguidas de las mismas letras son iguales estadísticamente (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

Figura 36. Fósforo en parte aérea de maíz (andosol).

#### 5.4. Nitrógeno parte aérea y radical de maíz en suelo andosol

El análisis de varianza mostró que para el porcentaje de *N* en parte aérea y radical estadísticamente no existen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) (Anexo 3), el valor más alto se encontró en T1 (1.54) y T2 (1.50) (Figura 37); similar es el comportamiento presentado en la concentración en raíz, el valor más alto se presentó en T1 (0.79) (Anexo 3). Valores menores a 2.45 se consideran como deficientes (Jones, 1998).

De acuerdo con la Nom-21-SEMARNAT (2000) para suelos volcánicos, porcentajes <30 se consideran como bajos, el suelo utilizado contiene 30%. Los bajos porcentajes obtenidos en tejido vegetal y raíz de maíz, pueden estar relacionados con los porcentajes que se encuentran en el suelo.

El uso de rizotronos permitió realizar un conteo de los nódulos en la leguminosa entre T2 y T3 (tratamientos en asociación), el análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas, con la aplicación de la bacteria se aumentó la nodulación (Cuadro 18).

Cuadro 18. Nodulación en plantas de *Lupinus*.

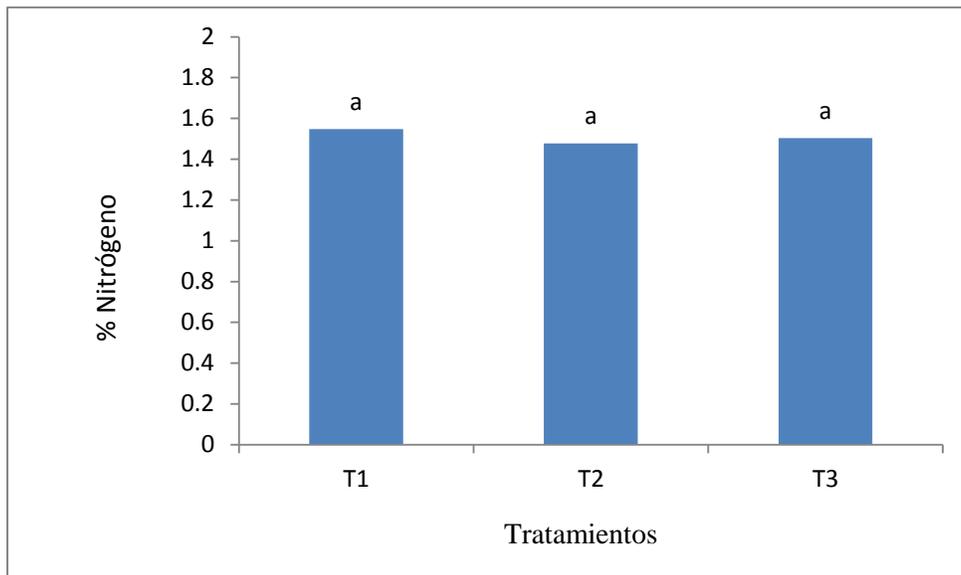
	<i>Lupinus</i>					
	(+)	Inóculo		(-)	Inóculo	
	Planta 1	Planta 2	$\Sigma$	Planta 1	Planta 2	$\Sigma$
R1	15	21	36	14	12	26
R2	15	18	33	12	15	37
R3	27	19	46	15	8	23
R4	22	15	37	16	9	25
			$\bar{x}=38$ a			$\bar{x}=25.25$ b

R= repetición.

\*Cifras seguidas de las mismas letras son iguales estadísticamente (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

Después de haber transcurrido 30 días de asociación no existe un efecto negativo o positivo en la asociación. El tiempo de asociación fue muy corto, lo ideal en este tipo de experimentos sería completar el ciclo de crecimiento de la gramínea, para determinar si efectivamente existe un beneficio nutrimental por parte de la leguminosa.

La finalidad de utilizar rizotronos en la asociación fue determinar la distribución del sistema radical, en el caso de maíz no se pudo analizar, debido a que mucho del sistema se plegó hacia la parte no visible (Anexo 5); el ángulo de inclinación del rizotron y el volumen de suelo pueden ser los factores que provoquen tal comportamiento, esta situación también se presentó en los rizotronos con arena. En el caso de *Lupinus* el uso de rizotron resultó más eficiente por el sistema radical que es muy similar al de fríjol, por que presenta una raíz principal y de estas salen las raíces secundarias y terciarias (Anexo 4) (Figura 35b y c).



T1= monocultivo, T2= Asociación (+) bacteria, T3= Asociación (-) bacteria.

\*Cifras seguidas de las mismas letras son iguales estadísticamente (Tukey,  $\alpha= 0.05$ )

Figura 37. Nitrógeno en parte aérea de maíz (andosol).

## 6. CONCLUSIONES

Después de analizar la información obtenida en la presente investigación se puede concluir lo siguiente:

1.- A través del experimento 1 (rizotrones con arena), se confirma que el uso de *Lupinus* sp. es una alternativa para la agricultura sustentable, ya que mejora la fertilidad de suelos deficientes de fósforo, con esto se aporta una opción para resolver el problema que se tiene en México sobre la soberanía alimentaria.

2.- La asociación de *Lupinus* y maíz en un suelo andosol, no tuvo efectos nutricionales, por lo que se recomienda ampliar el ciclo de interacción entre especies planteado en este trabajo.

3.- Como se observó durante la fase experimental el tipo y uso de rizotrones que se diseñaron para este trabajo solo se recomienda evaluar sistema radical en leguminosas, ya que para cultivos con sistema radical como en este caso maíz es complicado y poco confiable.

## 7. LITERATURA CITADA

**Abel, S., C. A. Ticconi, C. A. De la Torre. 2002.** Phosphate sensing in higher plants. *Physiologia Plantarum* 115: 1–8. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1150101.x

**Acosta-Percástegui, J. y D. A. Rodríguez–Trejo. 2005.** Factor affecting germination and pregerminative treatments of *Lupinus montanus* seeds. *Interciencia* 30: 576-579.

**Agroder. 2012.** Producción de maíz en México 2010: Comparativo regional de rendimientos de maíz. Consultado en: [http://www.agroder.com/Documentos/Publicaciones/Produccion de Maiz en Mexico-AgroDer\\_2012.pdf](http://www.agroder.com/Documentos/Publicaciones/Produccion de Maiz en Mexico-AgroDer_2012.pdf).

**Alderete-Chavez, A., V. Espinosa-Hernández, E. Ojeda-Trejo, M. Ehsan, J. Perez-Moreno, V. M. Cetina-Alcala, D.A. Rodrigues-Trejo y N. De la Cruz-Landero. 2008.** Natural Distribution and Principal Characteristics of *Lupinus* in the Oriental Face of Tlalóc Mountain in Sierra Nevada, México. *Journal of Biological Sciences* Vol. 8. Núm. 3: 604-609.

**Akhtar, M., V. Espinosa Hernández, R. Nuñez Escobar, A. Baeza. A. Mujeeb Qazi. 2004.** Asociación de *Lupinus silvestris*-Trigo y disponibilidad de fósforo en calcisoles. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, pp. 65-80.

**Alexander, J. y G. Sánchez. 2002.** Efecto del tratamiento de agua caliente e imbibición sobre la germinación de semillas *Leucaena leucocephala*. *Revista Científica* 2: 581-583.

**Alvarado-Sosa, P., A. Blanco-García and R. Linding-Cisneros. 2007.** Test of alternative nurserypropagation conditions for *Lupinus elegans* kunth plants, and effects and field survival. *Revista Fitoctecnia Mexicana. Sociedad Mexicana de Fitogenetica.* 2: 201- 204.

**Anderson, G., I. R. P. Fillery, P. J. Dolling and S. Asseng. 1998.** Nitrogen and water flows under pasture-wheat and lupin-wheat rotations in deep sands in Western Australia. Nitrogen Fixation in legumes, net mineralisation, and utilization of soil derived nitrogen. *Australian Journal of Agricultura Research* 49:329-344.

**Ballard. R. W., N. J. Palleroni, M. Doudoroff and R. Y. Stanier. 1970.** Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas cepacia*, *P. arginata*, *P. allicola* and *P. caryophilli*. *J. Gen. Microbiol* 60:199-214.

**Barbonetti, R., A. Contini, G. Zamilpa-Alvarez, G. Dávila Ortíz, C. Jiménez Martínez, K. Bermúdez Torres. 2011.** *Lupinus montanus*: chemical characterization of organs. Italo latinamerican congress of ethnomedicine.

**Barrientos, L., A. Montenegro, I. Pino. 2001.** Evaluacion de la fijación simbiótica de nitrógeno de *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius* en un andisol vilcun del sur de Chile. Terra 20:39-44.

**Benintenden, S. 2010.** Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la argentina: Concentración de rizobios y presencia de contaminantes. Revista Argentina de Micriobiología 42: 129-132.

**Bermúdez-Torres, K., N. Robledo-Quintos, J. Martínez-Herrera, A. Tei and M. Wink. 1999.** Biodiversity of genus *Lupinus* in Mexico. Lupin, an Ancient Crop for the New Millenium. Proceedings of the 9th International Lupin Conference, pp. 294-296.

**Bontemps, C., G. N. Elliot, M. F. Simon, F. B. Dos Reis Júnior, E. Gross, R. C. Lawton, N. E. Neto, M. de Fátima Loureiro, S. M. De Feria, J. I. Sprent, E. K. James, J. P. Young. 2010.** *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. Mol. Ecol. 19(1): 44-52.

**Bremer, J. M. 1965.** Total nitrogen. In: C. A. Black (ed). Methods of soil analysis. Part. 2. American Society of agronomy. Madison, Wisconsin. U.S.A. Agronomy. 9: 1149-1178.

**Caballero-Mellado, J., J. Onofre-Lemus, P. Estada- de los Santos y L. Martínez- Aguilera. 2007.** The Tomato Rhizospera, an Enviroment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of interest for agricultura and Bioremedation. Appl. Environ. Microbiol. 73 (16): 5308-5319.

**De Felipe-Antón, M. R., M. Fernandez-Pascual, M.M. Lucas-Sánchez, E. Fedorova, M.P. Golvano-Herrero, A. González-Sama, L. Guasch-Pereira, C. De Lorenzo-Carretero, N. De María-De las Heras, J.M. Pozuelo-Guanche, J. Pueyo-Dabad y A. Vivo-Rodríguez. 2006.** Factores estructurales, bioquímicos y moleculares de la simbiosis *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*)-*Lupinus*. Instituto de Recursos Naturales. Centro de Ciencias Medioambientales del C.S.I.C. Madrid. An. R. Acad. Nac. Farm. 3: 423-442.

**De la Cruz-Landero, N., V. Espinosa-Hernández, E. Guevara., M.A López-López., A. T. Santos., E. Ojeda-Trejo and A. Alderete-Chavez. 2010.** *Lupinus versicolor* response in soils contaminated heavy metals from a petroleum extraction field. Journal of Applied Sciences 10:694-698.

**Dehgan, B., G. Jeffrey, S. Norcini, M. Kabat and H.E. Pérez. 2003.** Effect seed scarification and gibberellic acid treatment and seedling emergence of sky-blue Lupine (*lupines diffuses*). Journal of Environmental Horticulture 21: 64-67.

**Dinkelaker, B., C. Hengeler, H. Marschner. 1995.** Distribution and function of proteoid and other root clusters. Bot. Acta 108:183–200.

**Dinkelaker, B., V. Römheld and H. Marschner. 1989.** Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white of lupin (*Lupinus albus* L.) Plant Cell Environment 12: 285-292.

**Eastwood, R.J., C.S. Drummond, M.T. Schifino-Wittmann and C.E. Hughes. 2008.** Diversity and evolutionary history of lupins-insights new phylogenies. “Lupins for Health and Wealth”. Proceedings of the 12th International Lupin Conference. pp. 346-354.

**Estrada-de los Santos, P., R. Bustillos-Cristales. y J. Caballero-Mellado. 2001.** Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide enviromental and geographic distribution. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2790-2798.

**Fassbender, H.W. 1982.** Química de suelos con énfasis en el suelo de ametica Latina. II CA. San Jose Costa Rica. 3er. Reimpresión. 398 p.

**Felsestein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

**Fernández. M.T. 2007.** Fósforo: amigo o enemigo. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar, vol. 41: 51-57.

**Ferrara, C. R. (1993).** Manual de agromicrobiología. Trillas. México. 142 p.

**Financiera Rural, 2009.** Monografía del maíz grano. Consultado en:

[http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADas%20Anteriores/Monograf%C3%ADaMa%C3%ADz\(mar2009\)LC.pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADas%20Anteriores/Monograf%C3%ADaMa%C3%ADz(mar2009)LC.pdf).

**FIRA. 2009.** El mercado de los fertilizantes en México: Situación actual y perspectivas. pp. 5-15.

**Fitter, A. 2002.** Characterisitcs and funtions of root systems. In: Waisel, Y., A. Eshel, U. Kafkafi. Plant Roots: The Hidden Half. 3rd Edition. New York, Marcel Dekker. 75p.

**García, E. R. 1994.** Agroecosistemas de productividad sostenida de maíz, en las regiones cálidohúmedas de México. In Thurston, H. D. (ed.). Los sistemas de siembra con cobertura. CATIE y CIIFAD. pp. 97-108.

**García. 2005.** Criterios para el manejo de la fertilización del cultivo de maíz. IPNI. 19 p.

**Gardner, W. K. and A. Boundy. 1983.** The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. IV. The effect of interplanting wheat and White lupin on the growth and mineral composition of the two species. Plant and soil 70: 391-402.

**Gerke, J., W. Romer, A. Jungk. 1994.** The excretion of citric and malic acid by proteoid roots of *Lupinus albus* effect on soil solution concentration of phosphate, Fe and Al in the proteoid rhizosphere in samples of an oxisol and luvisol. Z Pflanzen Bodenk 157: 289-294.

**Gillis, M., T. Van Van., R. Bardin, M. Goor, P. Hebbar, A. Willems, P. Segers, K. Kesters, T. Heulin and M.P. Fernández. 1995.** Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. For N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. Int. J. Syst. Bact. 45: 274-289.

**Gómez-Romero, M y R. Linding-Cisneros. 2009.** Emergencia de las plántulas de *Lupinus elegans* kunth y *Crotalaria pumila* ORT (Fabaceae) de semillas sembradas a diferentes profundidades. Biológicas 11:37-42.

**González-Sama, A., M.M. Lucas, M.R. De Felipe and J.J. Pueyo. 2004.** An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). New Phytol 163: 371-380.

**Gross, R. 1982.** El cultivo y la utilización del Tarwi *Lupinus Mutabilis* Sweet. Estudio FAO: Producción y Protección vegetal 36. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma, Italia. 236 p.

**Grzesiak, M.T. 2009.** Impact of soil compaction on root architecture, leaf water status, gas exchange and growth of maize and triticale seed lings. Plant Root. 3: 10-16.

**Guedea-Fernández, G., A. Arriaga-Frías, G. De la Cruz-Guzmán. 2001.** Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 7 (2): 115-121.

**Gyaneswhar, P., A. M. Hirsch, L. Moulin, W. M. Chen, G. N. Elliot, C. Bontemps, P. Estrada de los Santos, E. Gross, F. J. Bueno dos Reis, I. J. Sprent, P. W. Young, K. J. Euan. 2011.** Legume-

nodulating betaproteobacteria: diversity, host range and future prospects. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 1-43.

**Hall, T. A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.

**Herridge, D.F., M. B. Peoples and R. M. Boodey. 2008.** Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and soil* 311: 1-18.

**Hill, J. O., R. J. Simpson, A. D. Moore, D. F. Chapman. 2006.** Morphology and response of roots of pasture species to phosphorus and nitrogen nutrition. *Plant Soil* 286:7–19 doi: 10.1007/S11104-006-0014-3.

**Hinsinger, P. 2001.** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237: 173–195.

**Hinsinger, P., C. Plassard, C. X. Tang, B. Jaillard. 2003.** Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil* 248: 43–59 doi:10.1023/A:1022371130939

**Hocking, P. 2001.** Organic acids exuded from roots in phosphorus uptake and aluminium tolerance of plants in acid soils. *Adv Agron* 74: 63–97. <http://dx.doi.org/10.1080/01904160600767682>

**Howieson, J.G., I. F. Fillery, A. B. Legocki, M. M. Sikorski, T. Stepkowski, F. R. Minchin and M. J. Dilworth. 1998.** Nodulation, nitrogen fixation and nitrogen balance. Lupins as crop. *Plants, Biology, Production and utilization.* International, Wallingford, Oxon, Uk. pp. 149-180.

**Jacobsen, S.E., A. Mujica. 2006.** El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los andes centrales.* pp. 458-482.

**Jones, J. B. 1998.** Interpretation of plan analysis for several agronomic crops. In soil tetsing and plant analysis, Part II, Plant analysis. pp. 49-58.

**Jurado, E. and J. Flores. 2005.** Is seed dormancy under environmental control or bound to plant traits. *Journal of vegetation Science* 16: 559-564.

**Bermudez, T. K. 2013.** Especies mexicanas de *Lupinus*: Caracterización química y molecular.III Simposio de investigación del Parque Nacional Iztaccíhuatl Popocatépetl.

- Kolmans, E y D. Vásquez. 1999.** Manual de Agricultura Ecológica: Una introducción a los principios básicos y su aplicación. Segunda Edición. Grupo de agricultura Orgánica de ACTAF. pp. 20-38.
- Lambers, H., M. W. Shane, M. D. Cramer, S. J. Pearse, E. J. Veneklaas. 2006.** Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann Bot* 98: 693–713. doi: 10.1093/aob/mcl114
- Lara-Cabrera, S. I., N. Alejandro-Melena, E. I. Medina-Sánchez, R. Lindig-Cisneros. 2009.** Genetic diversity in populations of *Lupinus elegans* kunth, implications for ecological restoration. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30: 79-86.
- Le-Roux, M.R., S. Khan and A.J. Valentine. 2007.** Organic acid accumulation may inhibit N<sub>2</sub> fixation in phosphorus stressed lupin nodules. *Journal Compilation. New Phytologist* 177: 956-964.
- Liebman, M. 1997.** Sistemas de policultivos. pp. 133-141. En: *Agroecología: Bases científicas para una agricultura sustentable*. M. A. Altieri (ed). CLADES-Grupo Gestor Asociación Cubana de Agricultura Orgánica, ACAO, La Habana, Cuba.
- Lopez-Bucio, J., A. Cruz-Ramirez, L. Herrera-Estrella. 2003.** The role of nutrient availability in regulation root architecture. *6*: 280-287.
- Lynch, J. P., K. M. Brown. 2001.** Topsoil foraging—an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant Soil* 237:225–237 doi:10.1023/A:10133
- Mahenthalingam. E., T. Urban and J. Goldberg. 2005.** The multifactorious *Multireplicon Burkholderia cepacia* complex. *Nature. Rev. Feb. Vol. 3*: 144-156.
- Marschner, H., V. Romheld, I. Kakmak. 1987.** Root induced changes in nutrient availability in the rhizosphere. *J. Plant Nutr.* 10: 1175-1184.
- Martínez-Aguilar. L., R. Díaz, J. J. Peña-Cabriales, P. Estrada- de los Santos, M. F. Duun, J. Caballero-Mellado. 2008.** Multichromosomal genome structure, confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4574-4579.
- Martínez, J. M., D. A. Rodríguez-Trejo, E. Guizar-Nolazco, R. Bonilla-Beas. 2008.** Escarificación artificial y natural de la semilla de *Lupinus bilineatus* Benth. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14(2): 73-79.

**Mead, R., and Willey, R. W. 1980.** The concept a land equivalent ratio and advantages in yields from intercropping. *Exp. Agric.* 16: 217-228.

**Mora, E. y M. Toro. 2007.** Estimulación del crecimiento vegetal por *Burkholderia cepacia*, una cepa nativa de suelos ácidos de sabanas venezolanas. *Agronomía Trop.* 57(2): 123-128.

**Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus, C. Boivin-Masson. 2001.** Nodulation of legumes by members of the subclass of proteobacteria. *Nat.* 411: 948-950.

**Navas, P. B. y D. Marín. 1995.** Comportamiento ecofisiológico de la asociación canavalia-maíz con y sin aplicación de nitrógeno y con diferentes arreglos cronológicos. *Agronomía Trop.* 45(4): 609-635.

**Neumann, G., A. Massonneau, N. Langlade, B. Dinkelaker, C., Hengeler, V., Römheld and E. Martinoia. 2000.** Physiological aspects of cluster root function and development in the phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus*). *Annals of Botany* 85: 909-919.

**Neumann, G y Römheld. V. 1999.** Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211: 121-130.

**Nuruzzaman, M., H. Lambers, M. D. A. Bolland. 2006.** Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant Soil* 281:109–120.

**Ortega-David, E., A. Rodriguez, A. David, A. Zamora-Burbano. 2010.** Caracterización de las semillas de *Lupinus* (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica* 59: 111-118.

**Ozawa, K., M. Osaki, H. Matsul, M. Honma, and T. Tadano. 1995.** Purification and propierties of ácid phosphatase secreted from lupin roots under phosphoros deficiency conditions. *Soil Sciencie and plant Nutrition* 4: 31-43.

**Paliwal, L. L.,** El maiz en los tropicos. Disponible en:

<http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s04.htm>., consultado 13/02/2014.

**Palleroni. N. J., 1984.** Genus Pseudomonas Migula 1984, 237. In krieg, N. R. and J. G. Holt, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. Williams and Wilkens, Baltimore, USA, Md. 1: 141-199.

**Paredes-Mendoza, M., D. Espinosa-Victoria. 2009.** Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: Revisión Crítica. *Terra Latinoamericana* 28: 61-70.

**Pate, J. S., W. H. Verboom, P. D. Galloway. 2001.** Co-occurrence of Proteaceae, laterite and related oligotrophic soils: coincidental associations or causative inter-relationships? *Australian Journal of Botany* 49: 529–560.

**Peek, C.S., A.D. Robson and J. Kuo. 2003.** The formation, morphology and anatomy of cluster root of *Lupinus albus* L. as dependent on soil type and phosphorus supply. *Plant and Soil* Vol. 248. Núm. 1-2: 237-246.

**Perin, L., L. Martínez-Aguilar, P. Castro-González, P. Estrada- de los Santos, T. H. V. Cabellos-Avelar, V. M. Reis y J. Caballero-Mellado. 2006.** Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3103-3110.

**Pérez, P. M. 2013.** Morfometría, germinación y composición mineral de semillas de *Lupinus silvestres*. *Bioagro* 25 (2): 101-108. 2013.

**Porras-Saavedra, J., H. López-López, S. Soto-Simental, G. Dávila-Ortiz, A. D. Hernández-Fuentes, N. Güemes-Vera. 2008.** Evaluación química y digestibilidad in vitro de *Lupinus* ssp del Estado de Hidalgo (Mineral del Chico). V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Tuxtla Gutierrez, Chiapas. MÉXICO.

**Purnell, H.M. 1960.** "Studies of the family Proteaceae. Anatomy and morphology of the roots of some Victorian species", *Australian Journal of Botany* 8: 38-50.

**Richardson A.E. 2001.** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 28, 897-906.

**Rodas, C. A., R. Núñez Escobar, V. Espinosa Hernández, y G. Alcántar González. 2001.** Asociación *Lupinus-maíz* en la nutrición fosfatada en un andosol. *Terra.* 19: 141-154.

**Rodríguez, T., y Z. Rojo. 1997.** Estudio de la semilla del arbusto *Lupinus montanus* H:B:K. (leguminosae). *Revista de Chapingo. Ciencias Forestales* 1: 39-45.

**Rubio, G., H. Liao, X. L. Yan, J. Lynch. 2003.** Topsoil foraging and its role in plant competitiveness for phosphorus in common bean. *Crop Sci* 43:598–607.

**Ruiz-López, M.A., R. Rodríguez-Macías y S. Navarro-Pérez. 2006.** Evaluación químico- nutricional de *Lupinus exaltatus* zucc, del nevado de Colima, México, como fuente potencial de forraje. *Interciencia* 10: 758- 761.

**SAGARPA, 2008.** Agrobiodiversidad en México: el caso del maíz. Consultado en:

<http://www.inecc.gob.mx/descargas/dgipea/agrodiversidad.pdf>.

**Sas, L., Z. Rengel and C. Tang. 2002.** The effect of nitrogen nutrition on cluster root formation and proton extrusion by *Lupinus albus*. *Annals of Botanic* 89: 435- 442.

**Schulze, J., G. Temple, S.J. Temple, H. Beschow and C.P. Vance. 2006.** Nitrogen fixation by White lupin under phosphorus deficiency. *Annals of Botanic* 98: 731-740.

**Sessistch, A., T. Coenye, A. V. Sturz, P. Vandamme, E. A. Barka, J. F. Salles, J. D. Van Elsas, D. Faure, B. Reiter, B. R. Glick, G. Wang-Pruski and J. Nowak. 2005.** *Burkholderia phytofirmans* sp. Nov. A novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1187-1192.

**Shane, M. W and H. Lambers. 2005.** Cluster roots: a curiosity in context. *Plant and Soil* 274: 99–123.

**Shane, M. W., G. R. Cawthray, M. D. Cramer, J. Kuo, H. Lambers. 2006.** Specialized ‘dauciform’ roots of Cyperaceae are structurally distinct, but functionally analogous with ‘cluster’ roots. *Plant Cell Environ* 29:1989–1999.

**Shane, M. W., M. de Vos, S. de Roock, G. R. Cawthray, H. Lambers. 2003.** Effects of external phosphorus supply on internal phosphorus concentration and the initiation, growth and exudation of cluster roots in *Hakea prostrata* R.Br. *Plant and Soil* 248: 209–219.

**Shu, L., J. Shen, Z. Rengel, C. Tang, F. Zhang and G.R. Cawthray. 2007.** Formation of cluster roots and citrate exudation by *Lupinus albus* in response to localized application of different phosphorus sources. *Plant Science* 172: 1017- 1024.

**Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.

**Tapia, M. E. 2000.** Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Segunda Edición. pp. 78-80.

**Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994.** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

**Tisdale, S.L., W.L. Nelson, and J.D. Beaton. 1985.** Soil Fertility and Fertilizers. 4 ed. MacMillan Publishing Company Co. New York. 30 p.

**Trujillo, I., A. Díaz., A. Hernández y M. Heydrich. 2007.** Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contro hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. Rev. Protección Veg. 22:41-46.

**Uhde-Stone, C, S. J. Temple, C. P. Vance, D. L. Allan, K. E. Zinn. 2003.** Acclimation of white lupin to phosphorus deficiency involves enhanced expression of genes related to organic acid metabolism. Plant Soil 248:99–116

**Vandermeer, J. 1989.** The Ecology of Intercropping. Cambridge University Press. 273 p.

**Verboom, W. H., and J. S. Pate. 2006.** Bioengineering of soil profiles in semiarid ecosystems: the ‘phytotarium’ concept. A review. Plant and Soil 289: 71-102.

**Watt, M. and J.R. Evans. 2003.** Phosphorus acquisition from the soil by white lupin (*Lupinus albus* L.) roots. Soil Sci. Pl. Nutr. 45: 445-449.

**Weisskopf, L., S. Heller and L. Eberl. 2011.** Burkholderia species are major inhabitants of White Lupin clusters roots. Applied and environmental microbiology. Vol. 77, 21: 7715-7720.

**Zamora, C. 2011.** Crisis rural, Cambio Climático y Pobreza: Hacia la búsqueda de Alternativas para la definición de Políticas Públicas en México. Oxfam México, Primera Edición. pp. 9-11.

**Zamora-Natera, J. F. y T. Terrazas. 2012.** Anatomía foliar y del pecíolo de cuatro especies de Lupinus. Revista Mexicana de Biodiversidad. 83:687-697. DOI: 10.7550/rmb.27264.

**Zhu, Y., F. Yan, C. Zörb, S. Chubert. 2005.** A link between citrate and proton release by proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) grown under phosphorus-deficient conditions? Plant and Cell Physiology 46: 892–901.

**Zúñiga-Feest, A., M. Delgado, M. Alberdi. 2010.** The effect of phosphorus on growth and cluster-root formation in the Chilean Proteaceae: *Embothrium coccineum* (R. et J. Forst.). Plant and Soil 334: 113–121.

## **8. ANEXOS**

## Anexo 1. Distribución de *Lupinus* en el eje neovolcánico.

Espece	Altitud	Latitud N	Longitud W	Autor
<i>Lupinus</i> sp1	2815	19°26' 33.2"	98° 46' 10.9"	Alderete, 2008
<i>L. uncinatus</i>	2932-2994	19° 26' 59.2"	98° 46' 33.4"	
<i>L. leptophyllus</i>	2981-3029	19° 26' 43.8"	98° 46' 16.8"	
<i>L. versicolor</i>	3016-3257	19° 26' 21.8"	98° 45' 43"	
<i>Lupinus</i> sp2	3056	19° 26' 37.3"	98° 45' 46.2"	
<i>L. montanus</i>	3450-3556	19° 26' 06.5"	98° 45' 11.1"	
<i>L.potosinus</i>	3610-3640	19° 26' 19.9"	98° 44' 42.4"	
<i>L. campestris</i>	2866	19° 03'	97° 23'	Pérez, 2013.
<i>L. exaltatus</i>	3066	19° 00'	97° 22'	
<i>L. montanus</i>	3442	19° 04'	97° 19'	
<i>L. hintonii</i>	3424	19° 04'	97° 19'	
<i>L. bilineatus</i>	2470	19°08'	98° 46'	Martínez, 2008.
<i>L.montanus</i>	3581	19° 04' 58.7"	98° 39' 35.7"	Barbonetti, 2011.
<i>L. montanus</i>	3200	19° 12'	99° 14' 35"	Acosta- Percastegui, 2005.
		19° 12' 50"	99° 16' 20"	
<i>L. aschenbornii</i>	3300	19° 35' 20.4"	103°35'39.1"	Zamora-Natera y Terrazas, 2012.
<i>L. exaltatus</i>	1860	19° 37' 38.8"	103°32' 13.9"	
<i>L. montanus</i>	3300	19° 35' 20.4"	103° 35' 39.1"	
<i>L. reflexus</i>	3200	19° 35' 20.4"	103° 35' 39.1"	
<i>L. montanus</i>	2951	20° 10' 05"	98°41' 47"	Porras-Savedra, 2008.
<i>L. angustifolius</i>	2376	20° 13' 25"	98° 45' 31"	
<i>L. campestris</i>	2540	19° 37' 28"	101° 53' 44"	Gutiérrez, 2010.
<i>L. elegans</i>		19° 24' 60"	102° 14' 46"	Lara-Cabrera, 2009.
		19° 29' 6"	102° 11' 46"	
		19° 22' 13"	102° 20' 24"	
		19° 34' 4"	102° 14' 51"	
		19° 18' 59"	101° 21' 52"	

---

<i>L. campestris</i>	2600	19° 05' 09.6"	98° 44' 31.1"	Bermudez, 2013
	2781	19° 04' 41.0"	98° 42' 59.3"	
	2937	19° 04' 30.2"	98° 42' 02.2"	
	2960	19° 04' 18.1"	98° 42' 01.9"	
<i>L. hintonii</i>	2960	19° 04' 18.1"	98° 42' 01.9"	
<i>L. splendens</i>	3143	19° 04' 29.1"	98° 41' 13.9"	
<i>L. hintonii</i>	3287	19° 05' 37.5"	98° 35' 59.7"	
<i>L. montanus</i>	3581	19° 04' 58.7"	98° 39' 38.7"	
<i>L. bilineatus</i>	3581	19° 04' 58.7"	98° 39' 38.7"	
<i>L. montanus</i>	3625	19° 05' 07.3"	98° 39' 20.4"	
<i>L. montanus</i>	3889	19° 08' 26.8"	98° 38' 53.8"	
<i>L. aschenbornii</i>	3906	19° 39' 18.3"	98° 39' 02.1"	
<i>L. montanus</i>	3971	19° 08' 07"	98° 39' 03.8"	
<i>L. aschenbornii</i>	4102	19° 08' 18.9"	98° 38' 43.3"	
<i>L. montanus</i>	4147	19° 08' 28.6"	98° 38' 35.2"	

---

## Anexo 2. Fósforo y nitrógeno en maíz en suelo arenoso

Factor	Interacción de factores	% P	% P	% N	% N
		Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
		$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
FA		0.026 a	0.0182 a	0.8254 a	0.2080 a
FB	-----	0.024 b	0.0169 a	0.6697 b	0.1740 a
SA		0.024 a	0.0118 b	0.8057 a	0.1528 a
SB	-----	0.025 a	0.0233 a	0.6894 b	0.2293 a
C1		0.020 b	0.0174 a	0.8286 a	0.2046 a
C2	-----	0.028 a	0.0177 a	0.6665 b	0.1775 a
F·S	FA·SA	0.027 a	0.0126 b	0.8518 a	0.1422 a
	FA·SB	0.025 b	0.0238 a	0.7990 ab	0.2738 a
	FB·SA	0.022 b	0.0111 b	0.7596 ab	0.1633 a
	FB·SB	0.026 a	0.0227 a	0.5798 b	0.1847 a
F·C	FA·C1	0.020 c	0.0162 ab	0.9483 a	0.2300 a
	FA·C2	0.031 a	0.0202 a	0.7025 ab	0.1861 a
	FB·C1	0.020 c	0.0186 ab	0.7088 ab	0.1792 a
	FB·C2	0.026 b	0.0152 a	0.6303 b	0.1688 a
S·C	SA·C1	0.021 b	0.0111 b	0.9213 a	0.1478 a
	SA·C2	0.027 a	0.0126 b	0.6901 a	0.1577 a
	SB·C1	0.020 b	0.0237 a	0.7358 a	0.2613 a
	SB·C2	0.029 b	0.0228 a	0.6430 a	0.1972 a
F·S·C	(T1) FA·SA·C1	0.021 b	0.0122 c	0.9725 a	0.1280 a
	(T2) FA·SA·C2	0.032 a	0.0130 c	0.7313 a	0.1565 a
	(T3) FA·SB·C1	0.019 b	0.0202 b	0.9243 a	0.3320 a
	(T4) FA·SB·C2	0.030 a	0.0275 a	0.6738 a	0.2158 a
	(T5) FB·SA·C1	0.021 b	0.0100 c	0.8703 a	0.1678 a
	(T6) FB·SA·C2	0.023 b	0.0122 c	0.6190 a	0.1590 a
	(T7) FB·SB·C1	0.022 b	0.0272 a	0.5475 a	0.1908 a
	(T8) FB·SB·C2	0.030 a	0.0182 b	0.6123 a	0.1778 a

Cifras seguidas de las mismas letras son iguales estadísticamente (Tukey,  $\alpha=0.05$ )

**FA:** Fosfato de calcio tribásico; **FB:** Fosfato de calcio dibásico.

**SA:** Solución nutritiva Steiner (+) nitrógeno; **SB:** Solución nutritiva Steiner (-) nitrógeno.

### Analisis de varianza en suelo arenoso

	% P Tejido vegetal	% P Raíz	% N Tejido vegetal	% N Raíz
<b>Factor</b>				
F	*	NS	*	NS
S	NS	***	NS	NS
C	***	NS	NS	NS
F*S	**	NS	NS	NS
F*C	*	*	NS	NS
S*C	NS	NS	NS	NS
F*S*C	*	*	NS	NS

F= fuente de fósforo; S= solución nutritiva; C= sistema de cultivo; F\*S= interacción fuente de fósforo\*solución nutritiva; F\*C= interacción fuente de fósforo\*sistema de cultivo; S\*C= interacción solución nutritiva\*sistema de cultivo; F\*S\*C= interacción fuente de fósforo\*solución nutritiva\*sistema de cultivo.

\*\*\*,  $p \leq 0.001$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \* $p \leq 0.05$ ; NS  $p \geq 0.05$ .

### Anexo 3. Fósforo y nitrógeno en maíz en suelo andosol

Condición de cultivo	% P Parte aérea	% P Raíz	% N Parte aérea	% N Raíz
T1	0.13a	0.006a	1.54a	0.79a
T2	0.11a	0.006a	1.48a	0.77a
T3	0.13a	0.006a	1.50a	0.77a
	NS	NS	NS	NS

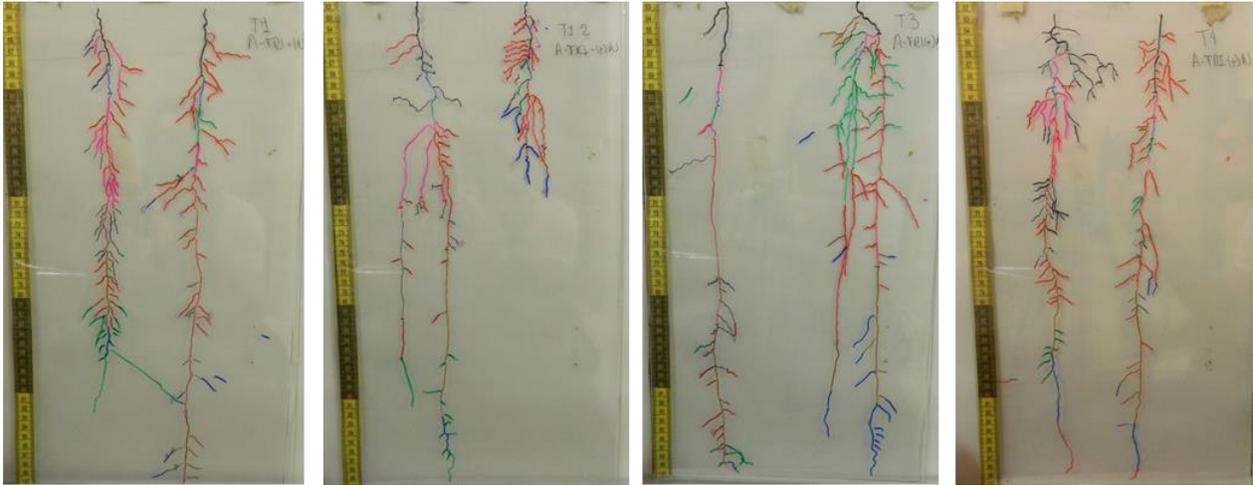
T1: monocultivo; T2: asociación (+) inóculo; T3: asociación meno (-) inóculo

Cifras seguidas de las mismas letras son iguales estadísticamente (Tukey,  $\alpha = 0.05$ )

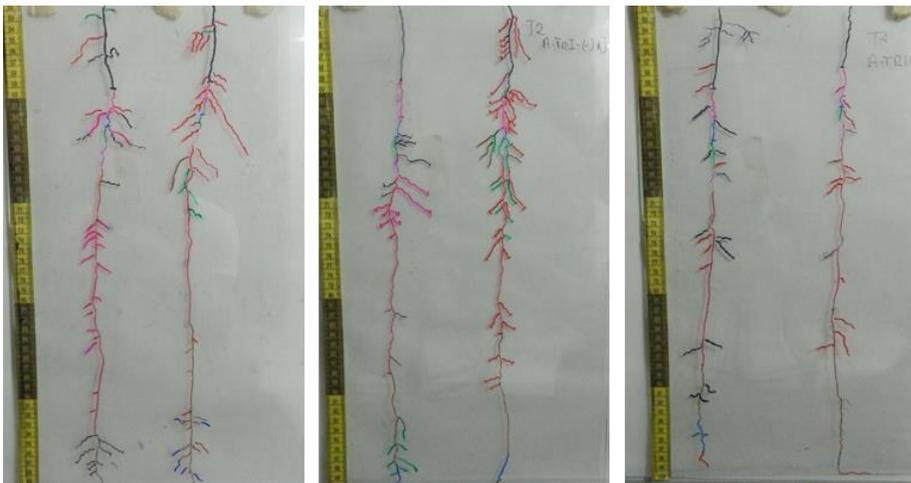
NS  $p \geq 0.05$ .

## Anexo 4. Arquitectura del sistema radical de *Lupinus* en asociación con maíz.

### Tratamiento 1



### Tratamiento 2



### Tratamiento 3

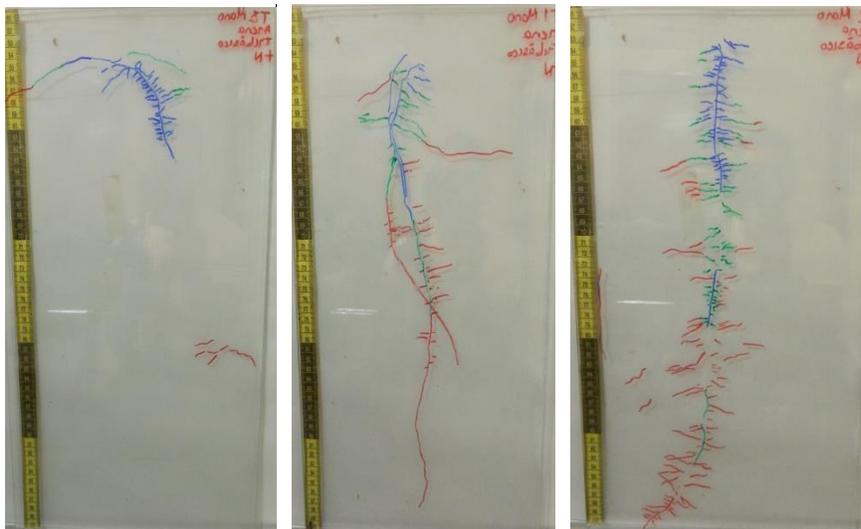


(T1)FA·SA·C2; (T2) FA·SB·C2; (T3) FB·SB·C2.

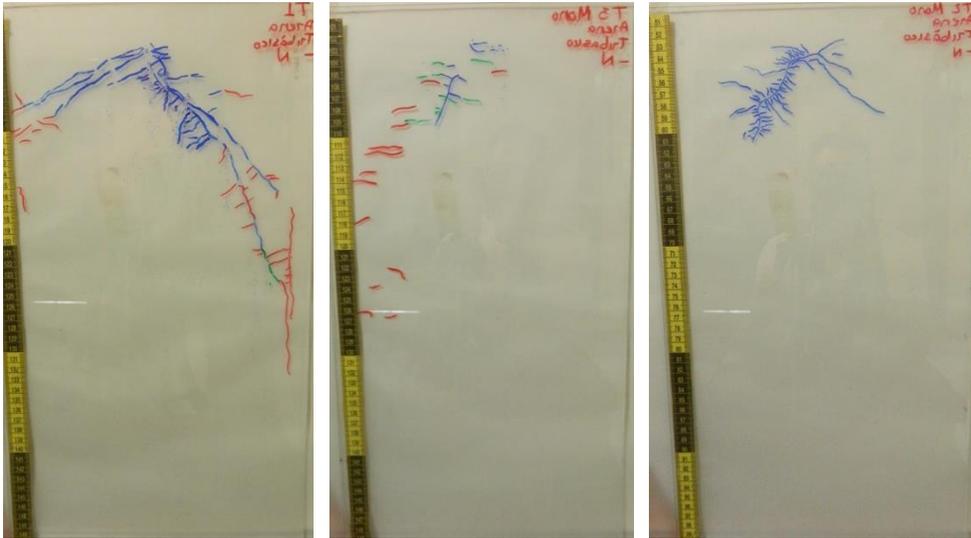
**FA:** Fosfato de calcio tribásico; **FB:** Fosfato de calcio dibásico. **SA:** Solución nutritiva Steiner (+) nitrógeno; **SB:** Solución nutritiva Steiner (-) nitrógeno. **C2:** Asociación.

### Anexo 5. Arquitectura del sistema radical de maíz en asociación con *Lupinus*.

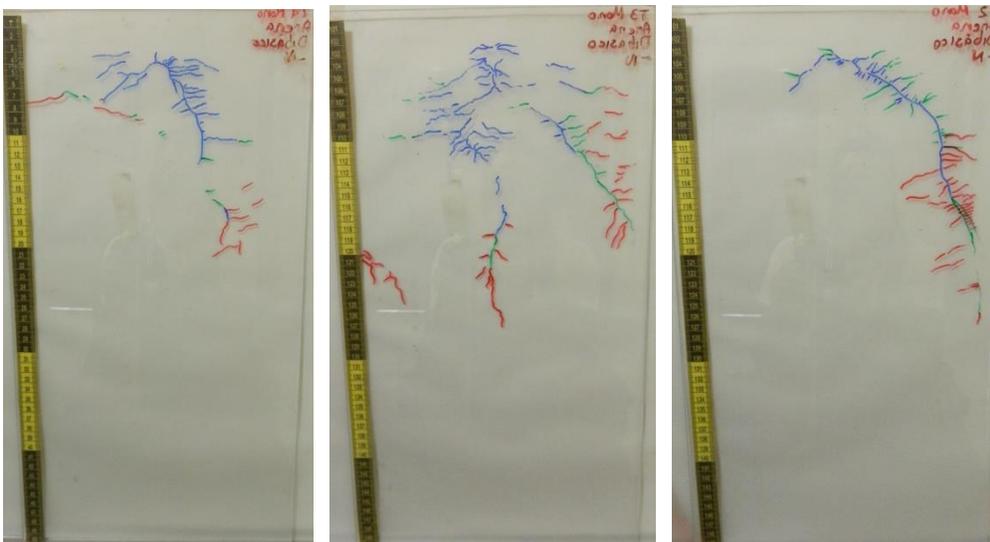
#### Tratamiento 1



## Tratamiento 2



## Tratamiento 3



(T1)FA-SA-C2; (T2) FA-SB-C2; (T3) FB-SB-C2.

**FA:** Fosfato de calcio tribásico; **FB:** Fosfato de calcio dibásico. **SA:** Solución nutritiva Steiner (+) nitrógeno; **SB:** Solución nutritiva Steiner (-) nitrógeno. **C2:** Asociación.