



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
CHAPINGO

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES

**PROTOCOLOS DE MICROPROPAGACIÓN *in vitro*
DE *Lupinus montanus* HBK**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS
FORESTALES

PRESENTA

GABRIEL RAMÍREZ GONZÁLEZ



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Chapingo, México; Febrero de 2013



PROTOCOLOS DE MICROPROPAGACIÓN *in vitro* DE *Lupinus montanus*

HBK

Tesis realizada por Gabriel Ramírez González bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el
grado de:

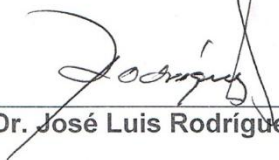
MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

DIRECTOR



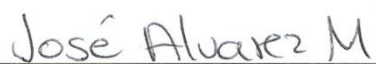
Dr. Jesús Guadalupe Arreola Ávila

CODIRECTOR



Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR



Dr. José Guadalupe Álvarez Moctezuma

Chapingo, México; Febrero de 2013

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

*“Agradezco al Creador, cualquiera que sea su nombre y manifestación,
pues la vida misma es complacencia de su esplendor”*

(Iky Khaan)

A mi hermosa y amada madre, que me ha enseñado a través del ejemplo, todo aquello que no se enseña en ninguna clase del colegio: amor, bondad y humildad.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O, a quien admiro y respeto. Le agradezco por haberme brindado su tiempo y conocimiento, pero sobretodo, por su amistad, confianza y calidez humana, actitudes que distinguen al simple profesor, del verdadero maestro. Muchas gracias Maestro.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo otorgado a través de la beca de Maestría, para la realización de este trabajo de investigación.

A todos y cada uno de mis amigos, a los que siguen a mi lado, a los que fueron pasajeros; a todos, les agradezco por compartir el tiempo que solo va, que no regresa más que recuerdos. A la vida misma, que me ha colocado en este camino de madurez y crecimiento, en donde he aprendido que el saber, no debiera ser una ventaja sobre los demás sino una herramienta para ayudar a progresar.

Gabriel Ramírez G.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de la presente tesis nació el 2 de octubre de 1979 en el estado de Oaxaca. Realizó sus estudios de educación básica en el Estado de México. En 1995 ingresa al Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Oriente, para cursar sus estudios de bachillerato. En el año 2001 ingresa a la Universidad Nacional Autónoma de México, de donde egresa en el año 2006, con el título de Licenciado en Biología.

En 2007 colabora temporalmente en el Centro de Reproducción Animal Jesús Estudillo (Vida Silvestre A.C.).

En 2008 forma parte del equipo de Técnicos Facilitadores de la Agencia de Desarrollo y Seguridad Alimentaria AGESADER A.C. Al mismo tiempo, realiza proyectos de forma independiente en el área de planeación de áreas verdes y programas de educación ambiental para el municipio de La Paz, Estado de México.

En agosto del 2010 ingresa a la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo para iniciar estudios de Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales. En 2011 realiza un diplomado internacional de Evaluación e Impacto Ambiental en el Instituto Potosino de Ciencia y Tecnología en San Luis Potosí.

PROTOCOLOS DE MICROPROPAGACIÓN *in vitro* DE *Lupinus montanus*

HBK

MICROPROPAGATION PROTOCOLS *in vitro* OF *Lupinus montanus* HBK

Gabriel Ramírez González¹ y Jesús Guadalupe Arreola Ávila²

RESUMEN GENERAL

Lupinus montanus HBK, es una planta herbácea perteneciente al género *Lupinus*; caracterizado por contener alcaloides que pueden ser aprovechados en la industria agroquímica, además de que en recientes investigaciones se ha demostrado a nivel experimental sus posibles aplicaciones farmacológicas.

En el presente trabajo de investigación se presentan los protocolos ensayados y los resultados obtenidos en dos trabajos experimentales: la evaluación de las condiciones para la micropropagación *in vitro* de *Lupinus montanus* HBK, por la vía de la organogénesis directa y la inducción de formación de callos vía embriogénesis somática; ambos ensayos a partir de explantes de epicótilo, cotiledón e hipocótilo de plántulas obtenidas mediante germinación *in vitro*.

Palabras clave:

Auxina, Callos, Morfogénesis, Organogénesis

¹Tesista

²Director..

GENERAL ABSTRACT

Lupinus montanus HBK, is a herbaceous plant belonging to the genus *Lupinus*; typically contains alkaloids that can be exploited in the agrochemical industry, along with recent research that has been experimentally demonstrated potential pharmacological applications.

In the present research protocols are tested and results of two experimental studies: assessment of the conditions for *in vitro* micropropagation of *Lupinus montanus* HBK, by way of direct organogenesis and induction of callus formation via somatic embryogenesis, from both trials epicotyl explants, cotyledon and hypocotyl of seedlings obtained by germination *in vitro*.

Keywords:

Auxin, Callus, Morphogenesis, Organogenesis

CONTENIDO

	PÁG
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS	iii
DATOS BIOGRÁFICOS	iv
RESUMEN Y ABSTRACT GENERAL.....	v
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVOS	2
LITERATURA CITADA	3
<u>CAPÍTULO I</u> . RESPUESTAS MORFOGÉNICAS DE TRES EXPLANTES DE <i>Lupinus montanus</i> HBK CULTIVADOS <i>in vitro</i>	4
<u>CAPÍTULO II</u> . CALLOGENESIS EN <i>Lupinus montanus</i> HBK A PARTIR DE EXPLANTES CULTIVADOS <i>in vitro</i>	22
DISCUSIÓN GENERAL	38
CONCLUSIONES GENERALES.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Porcentajes de necrosamiento Explante/Tratamiento (n=12).....	10
Figura 2. Porcentajes promedio del tipo de respuesta por explante (N=150)....	14
Figura 3. Formación de callo (>50 %) a partir de explantes de cotiledón C). Para explantes de hipocótilo (A) y epicótilo (B), esta cifra fue cercana al 10%.....	15
Figura 4. Formación de brotes en epicótilo (A) e hipocótilo (B), brote de hipocótilo (C) y epicótilo (D) en la cuarta semana.....	16
Figura 5. Interacción entre factor tratamiento vs factor explante.....	17

CAPÍTULO II

Figura 1. Formación de callos bajo ambas condiciones de incubación fotoperíodo. A) Medio sin reguladores; B) Combinación 2,4-D: BA; C) Combinación 2,4-D: Kinetina; Formación de callos bajo ambas condiciones de oscuridad permanente. D) Medio sin reguladores; E) Combinación 2,4-D: BA; F) Combinación 2,4-D: Kinetina.....	28
Figura 2. Color y estructura de callos. A) Callo formado a partir de explante de hipocótilo bajo condiciones de luz/oscuridad. B) Callo formado a partir de explante de hipocótilo en condiciones de oscuridad permanente.....	30
Figura 3. Gráficas de efectos principales sobre la biomasa de callo. A) Efecto del explante. B) Efecto del medio de cultivo.....	31
Figura 4. Gráficas de Interacción. A) Interacción explante vs incubación. B) Interacción medio de cultivo vs incubación.....	32

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I

Cuadro 1. Antioxidantes utilizados para cada uno de los tratamientos.....7

Cuadro 2. Reguladores de Crecimiento Vegeta (RCV) utilizados en cada uno de los tratamientos.....8

Cuadro 3. Resultados de la comparación de tratamientos.....11

CAPÍTULO II

Cuadro 1. Medios de cultivo para la inducción de formación de callo.....25

INTRODUCCIÓN GENERAL

En México se tienen registros de la presencia de 111 especies del género *Lupinus*, distribuidas a lo largo de las cadenas montañosas, desde Baja California Norte hasta Chiapas. La mayor diversidad de estas especies se encuentra en la zona central de la república, específicamente, a través del Eje Neo-volcánico Transversal (Bermúdez, Robledo, Martínez, Andreas & Wink, 2000). Las plantas de este género se caracterizan principalmente por los elevados niveles de alcaloides presentes en hojas y tallos, así como su alto contenido proteico en semillas. Ambas características han sido aprovechadas a nivel experimental, para demostrar el potencial industrial que tienen las plantas. Dichas aplicaciones van desde las agroquímicas: insecticidas (Bermúdez Martínez, Figueroa, Legal, y Wink, 2009); alimenticias: aislados proteínicos (Lee, *et al.*, 2006); hasta las médicas: antimicrobianos e hipoglucemiantes (Dove, *et al.*, 2011).

No obstante, el eficiente aprovechamiento biotecnológico de plantas tales como *Lupinus montanus* podría verse limitado debido entre otras causas, a la heterogeneidad de las plantas producidas a partir de semilla, convirtiéndose de esta forma en un factor limitante para el aprovechamiento de determinados productos metabólicos, o compuestos requeridos por la industria. En consecuencia, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo analizar las condiciones básicas del cultivo *in vitro* de *Lupinus montanus* tanto por vía de organogénesis como en embriogénesis.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la respuesta organogénica y embriogénica de explantes de epicótilo, cotiledón e hipocótilo cultivados *in vitro*.

Objetivos particulares

- Obtener un protocolo de micropropagación a partir de explantes de *Lupinus montanus* HBK vía organogénesis.
- Obtener un protocolo de inducción a formación de callos a partir de explantes de *Lupinus montanus* HBK vía callogénesis.

LITERATURA CITADA

Bermudez, T. K., Robledo, Q. N., Martínez, H. J., Andreas, J., & Wink, M. (2000). Biodiversity of the genus *Lupinus* in Mexico. En Vansanten, E., Wink M., Weissmann, S., & Romer, P. (2000) *Lupin, an Ancient Crop for the Millennium*. Proc. 9th Int. Lupin Conference. Kl ink/Muritz, 20-24/ 06/1999. International Lupin Association. Canterbury, New Zealand. pp. 294-296.

Bermúdez, T. K., Martínez, H. J., Figueroa, R., Legal, L., & Wink, M. (2009). Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican *Lupinus* against the lepidopteran crop pest *Spodoptera frugiperda*. *BioControl*, 54: 459-46.

Dove, E. R., Mori, T. A., Chew, G. T., Barden, A. E., Woodman, R. J., Puddey, I. B., Sipsas, S., & Hodgson, J. M. (2011). Lupin and soya reduce glycaemia acutely in type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 106: 1045-1051.

Lee, Y. P., Mori, T. A., Sipsas, S., Barden, A., Puddey, I. B., Burke, V., Hall, R. S., & Hodgson, J.M. (2006). Lupin-enriched bread increases satiety and reduces energy intake acutely. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84: 975-980.

I. RESPUESTAS MORFOGÉNICAS DE TRES EXPLANTES DE *Lupinus montanus* HBK CULTIVADOS *in vitro*

MORPHOGENIC RESPONSE OF THREE EXPLANTS OF *Lupinus montanus* HBK CULTURED *in vitro*

Gabriel Ramírez-González¹ y Jesús Guadalupe Arreola-Ávila²

RESUMEN

Uno de los mayores retos, es lograr cultivares homogéneos que conserven o potencialicen las características deseadas por la industria. En este sentido, en la presente investigación se evaluaron las condiciones básicas de la micropropagación *in vitro* de *Lupinus montanus* HBK con el fin de obtener un protocolo que permita, propagar de manera clonal a esta especie. **Metodología.** Se evaluó el nivel de necrosamiento, tipo de respuesta, número y altura de brotes, de tres tipos de explante: hipocótilo, cotiledón y epicótilo. **Resultados.** Los mejores tratamientos antioxidantes fueron los que contenían carbón activado (p-value = 0.000). Los explantes de hipocótilo y epicótilo mostraron una respuesta de tipo organogénico (p-value=0.252) a diferencia de cotiledón. Los mejores tratamientos para inducción de brotes fueron las combinaciones de AIA 1µM y 3 µM BA; AIA 3µM y 1 µM BA (p-value = 0.617, y para altura de brotes AIA 3µM y 1 µM BA (p-value= 0.047). **Conclusión.** Se logro establecer un protocolo para la inducción de respuesta organogénica.

Palabras clave: Necrosamiento, Callo, Brotes, Morfogénesis

¹ Tesista

² Director

ABSTRACT

One of the biggest challenges is to achieve homogeneous cultivars or potentializing that retains the characteristics desired by the industry. Thus, in this investigation it is evaluated the basic conditions *in vitro* micropropagation of *Lupinus montanus* HBK to get a protocol that allows so clonal spread of this species. **Methodology.** We assessed the level of necrosis, response type, number and height of shoots of three types of explant: hypocotyl, cotyledon and epicotyl.

Results. The best treatments were those containing antioxidants, activated carbon (p-value = 0.000). The hypocotyl and epicotyl explants showed organogenic type response (p-value = 0.252) unlike cotyledon. The best treatments for shoot induction were 1 uM IAA combinations and 3uM BA, AIA 3µM and 1 uM BA (p-value = 0.617, and AIA 3µM shoot height and 1uM BA (p-value = 0.047). **Conclusion.** It was established a protocol for induction of organogenic response.

Keywords: Necrosis, Callus, Shoots, Morphogenesis

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen diversos estudios que han demostrado las distintas aplicaciones potenciales que pudiesen derivar del cultivo y aprovechamiento de plantas del género *Lupinus*. Dichas aplicaciones van desde las agroquímicas: insecticidas (Bermúdez Martínez, Figueroa, Legal, & Wink, 2009); alimenticias: aislados proteínicos (Lee, et al., 2006); hasta las médicas: antimicrobianos e hipoglucemiantes (Dove, et al., 2011).

En cualquier caso, uno de los mayores intereses es lograr una producción que permita asegurar la obtención de plantas con características específicas según las necesidades del producto a obtener (mayor producción de follaje para la extracción de alcaloides; producción de semilla para la obtención de aislados proteínicos, entre otros).

Actualmente, a través de las técnicas del cultivo de tejidos se pueden obtener clones somáticos y regenerar plantas completas con características uniformes y así establecer cultivares de plantas valiosas, libres de microorganismos y difíciles de obtener por métodos de cultivo tradicionales.

En consecuencia, los objetivos de la presente investigación, fueron establecer las condiciones para la propagación clonal de *Lupinus montanus* mediante técnicas de micropropagación, y evaluar la respuesta morfogénica de tres tipos de explantes (hipocótilo, cotiledón y epicótilo) bajo diferentes

concentraciones de reguladores de crecimiento en medio Murashigue y Skoog (1962).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación que a continuación se presenta, fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Material vegetal

Como fuentes de explante, se utilizaron plántulas de *Lupinus montanus* de 4 y 6 semanas de edad, obtenidas mediante la germinación *in vitro* de semillas donadas por investigadores del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo; colectadas en el año 2011 en el cerro de Xipes (19°00'48" latitud norte; 97°21'20" longitud Oeste), municipio de Libres, Puebla.

Germinación de la semilla. Se seleccionó un lote de 100 semillas viables con características morfológicas uniformes; forma, tamaño, peso y color. Posteriormente se tomó una muestra aleatoria de 30 semillas, las cuales se sometieron a un proceso de desinfección de acuerdo con lo señalado por Mroginski, Sansberro y Flaschland (2010). Posteriormente las semillas fueron escarificadas mecánicamente mediante un corte lateral en la testa a

fin de romper la latencia física debida a su impermeabilidad (Montes, et al, 2008). Finalmente la semilla fue sembrada en medio básico MS (1962) adicionado con 0.40 mg.L^{-1} de tiamina, 100 mg.L^{-1} de myo-inositol, 3% de sacarosa y 7 g.L^{-1} de agar agar e incubada durante 4 semanas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ y un fotoperíodo de 16:8 h luz/oscuridad.

Fase 1: Establecimiento del cultivo

En esta etapa, se evaluó el grado de necrosamiento que presentó cada explante bajo tratamientos que contenían antioxidantes (carbón activado y ácido cítrico).

Obtención del explante. Luego de 4 semanas de crecimiento, se cosechó de manera aleatoria un total de 6 plántulas. Las regiones a utilizar como fuente de explante (hipocótilo, cotiledón y epicótilo) fueron seccionadas en cortes de $3 \times 3 \times 2 \text{ mm}$ aproximadamente, y sembradas en condiciones de luz (16:8), bajo 5 diferentes tratamientos con 12 repeticiones cada uno (cuadro 1).

Cuadro 1. Antioxidantes utilizados para cada uno de los tratamientos

Tratamiento*	Ácido Cítrico (AC)	Carbón Activado (CA)
T ₀	0	0
T ₁	100 mg.L^{-1}	0
T ₂	150 mg.L^{-1}	0
T ₃	0	50 mg.L^{-1}
T ₄	0	100 mg.L^{-1}

* MS al 100%, adicionado con 0.40 mg.L^{-1} de tiamina, 100 mg.L^{-1} de myo-inositol, 3% de sacarosa y 7 g.L^{-1} de agar agar.

Fase 2: Inducción de morfogénesis

Una vez superados los problemas de necrosamiento, se procedió a cosechar un total de 12 plántulas de 6 semanas de edad. Se evaluó la respuesta morfológica de cada explante, bajo 5 tratamientos con 10 repeticiones cada uno (Cuadro 2).

Cuadro 2. Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV) utilizados en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento*	Ácido Indol Acético (AIA)	6 - Benciladenina (BA)
T ₁	0.1 µM	0.1 µM
T ₂	0.1 µM	0.3 µM
T ₃	0.3 µM	0.1 µM
T ₄	1 µM	3 µM
T ₅	3 µM	1 µM

* MS al 100%, adicionado con 0.40 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg.L⁻¹ de myo-inositol, 3% de sacarosa, 100 mg. L⁻¹ de CA y 7 g.L⁻¹ de agar agar.

Diseño experimental

Para la fase 1, se evaluó el nivel de necrosamiento del explante en cada tratamiento mediante una escala cualitativa de 0 a 3, donde 0 correspondió al nivel o grado nulo (< 10 %); 1 al grado bajo (> 10 % < 30 %); 2 al moderado (> 30 % < 60 %); y 3 al alto (> 60 %). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$), seguida por la prueba de comparación de pares de Dwass-Steel-Chritchlow-Fligner ($p \leq 0.05$) en el paquete estadístico SYSTAT V.13.1 (CIS, 2009).

Por otra parte, para la evaluación del tipo de respuesta morfogénica en la fase 2 se estableció de igual manera una escala cualitativa de 0 a 3, donde 0 correspondió a aquellos explantes que no presentaron respuesta; 1 a la respuesta en forma de callo; y 2 a la respuesta en forma de brote. El análisis de estos datos se realizó mediante la prueba de Kruskal- Wallis ($p \leq 0.05$), seguida por la prueba de comparación de pares de Dwass-Steel-Christchlow-Fligner ($p \leq 0.05$).

Con respecto a la evaluación de las variables cuantitativas (número de brotes; y altura), se realizó un arreglo factorial dentro de un diseño completamente al azar, utilizando el modelo $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \xi_{ijk}$, con los factores: A = Tipo de explante; Niveles = Hipocótilo, Cotiledón y Epicótilo; y B = RCV (Tratamiento); Niveles = T_1, T_2, T_3, T_4, T_5 . La información resultante, fue examinada mediante un análisis de varianza, seguido de una prueba de Tukey (ambas con un nivel de confianza del 95%).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación

La germinación de la semilla de *Lupinus*, alcanzó un valor del 100 %. El período de germinación no fue uniforme; iniciando en unas semillas, al segundo día de haber sido sembradas (13.3%), concluyendo la germinación de las últimas, a los cinco días de iniciado el proceso. El mayor porcentaje de germinación ocurrió al tercer día alcanzando un valor del 73.3 %.

La germinación in vitro de estas semillas hasta ahora no había sido reportada, sin embargo, los resultados coinciden con lo señalado por Montes et al. (2008) quienes obtuvieron igual porcentaje de germinación en un período de 2 a 6 días, aplicando el mismo procedimiento de escarificación, e incubando cámara de ambiente controlado.

Resultados fase 1

Efecto de Tratamientos. Los explantes evaluados 2 semanas después de haber sido sembrados, presentaron diferentes grados de necrosamiento en cada tratamiento. En la figura 1, se puede observar que el mayor porcentaje de necrosamiento ocurrió en el T₀ (testigo), en este tratamiento el nivel de necrosamiento para todos los casos fue de escala 3 (alto), mientras que en los tratamientos 3 y 4, a pesar de que se observa un porcentaje de necrosamiento de entre un 20 a 45 %, estos, correspondieron principalmente al grado de necrosamiento 1, lo cual no afectó sustancialmente la vida del explante.

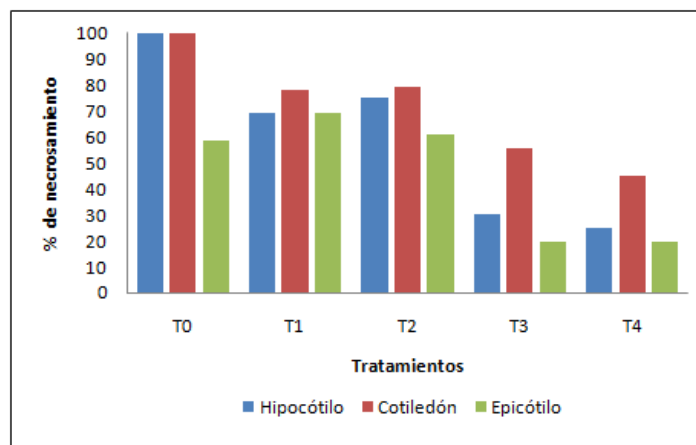


Figura 1. Porcentajes de necrosamiento Explante/Tratamiento (n=12).

Con un nivel de confianza del 95 %, la prueba de Kruskal-Wallis evidenció la diferencia en el efecto de al menos un tratamiento (antioxidante) en el control del necrosamiento del explante ($X^2_{(4)} = 64.368$ y $p\text{-value} = 0.000$). La prueba de comparación por pares, permitió conocer aquellos tratamientos con efectos estadísticamente diferentes en el control de la oxidación (cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de la comparación de tratamientos.

Tratamiento	Significancia 0.05
T0	BC
T1	AB
T2	AC
T3	D
T4	D

*Letras iguales no muestran diferencia significativa estadísticamente.

Lo anterior sirvió para confirmar el hecho observado, de que los mejores tratamientos para controlar el necrosamiento de los explantes, fueron aquellos que contenían carbón activado (T_3 y T_4). Este resultado coincide con lo referido por algunos autores, que reportan el uso de carbón activado en medios de cultivo para especies leñosas, por su papel antioxidante en la absorción de sustancias exudadas por el explante, mismas que necrosan el tejido al toxificar el medio (Azofeita, 2009).

Al mismo tiempo, los resultados contrastan con lo obtenido por Montes, Corona, Trejo, Trejo y Bermúdez (2009a), que si bien, logran controlar el necrosamiento de explantes de hipocótilo mediante el uso de carbón

activado (200 mg.L⁻¹), necesitaron la combinación de este con una mezcla de 4 antioxidantes más (ácido cítrico, ácido ascórbico, polivinilpolipirrodolina y L-cisteína) en una concentración de 50 mg.L⁻¹ cada uno.

Efecto del explante. Respecto a la relación entre el grado de necrosamiento y el tipo de explante cultivado, se observó que a un nivel de confianza del 95 %, la prueba de Kruskal-Wallis señala la existencia de diferencia estadística en el nivel de necrosamiento entre los diferentes tipos de explante ($X^2_{(2)} = 44.549$; p-value=0.001).

La interpretación de la comparación por pares, sumada a las observaciones experimentales, señalaron que a un nivel de confianza del 95 % los explantes de cotiledón presentan mayores niveles de necrosamiento (p-value = 0.000) en comparación con de hipocótilo y epicótilo (p-value = 0.057).

Dicho de otra forma, el grado de necrosamiento en el caso de cotiledón bajo los tratamientos evaluados, está asociado tanto al medio de cultivo como al tipo de explante. Este hecho, podría estar relacionado con lo reportado por Zamora, Ruíz, García y Salcedo (2008) respecto a la presencia de una gran cantidad de metabolitos secundarios (alcaloides, fenoles, terpenos, entre otros) en semillas de este género, concentrados en gran medida en los cotiledones (Porrás, 2010). Estos, al ser sometidos al estrés del corte para su siembra *in vitro*, liberan como respuesta dichas sustancias hacia el medio de cultivo, sumado a un incremento en la producción de especies reactivas de

oxígeno, provocando un mayor necrosamiento del explante (Arauz, 1998, citado por Azofeita, 2009).

Resultados fase 2

Efecto del tratamiento en el tipo de respuesta. De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis ($\chi^2_{(4)} = 41.663$; p-value = 0.000) y la prueba por pares, a nivel de tratamientos, después de un mes de incubación, todos los tratamientos mostraron en menor o mayor medida respuestas del tipo 1 y 2, a excepción del T₁ (p-value= 0.000) que no mostró respuesta de tipo 2 para hipocótilo y cotiledón.

Efecto del explante en el tipo de respuesta. En el caso de los explantes de hipocótilo y epicótilo, el tipo de respuesta estuvo asociada exclusivamente al medio de cultivo (p-value=0.252), sin embargo, para el caso de cotiledón, el tipo de respuesta estuvo asociado tanto al medio de cultivo, como al explante (p-value=0.000).

La figura 2, muestra que los explantes de hipocótilo y epicótilo cultivados bajo los tratamientos evaluados (excepto el T₁), presentaron una mayor respuesta de tipo organogénico (72 a $\approx$ 80 %), mientras que en el caso de cotiledón, los explantes se dividieron entre aquellos sin respuesta ($\approx$ 40 %) y aquellos que formaron callo (> 50 %).

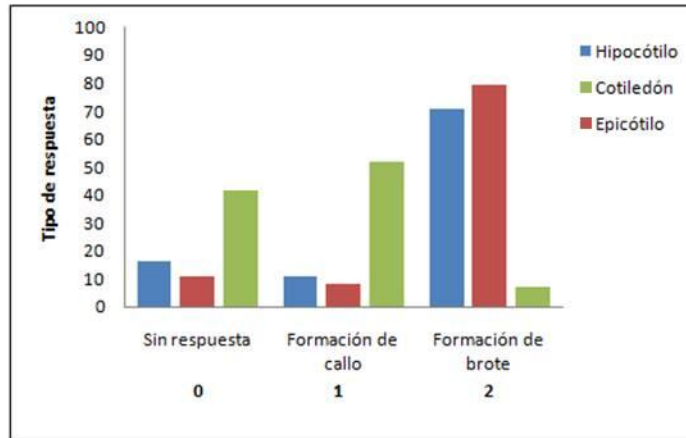


Figura 2. Porcentajes promedio del tipo de respuesta por explante (N=150).

Formación de callo

Los resultados obtenidos muestran que bajo los 5 tratamientos evaluados en el experimento, en un rango de concentraciones combinadas de 0.1 μM a 3 μM de auxina (AIA) y citocinina (BA), los explantes de cotiledón son inducidos principalmente a la formación de callos (>50 %).

Esta información es semejante a la reportada por Montes et al, (2009b), quienes lograron inducir la mayor formación de callos de *Lupinus ascherbornii* (45 %) a partir de explantes de cotiledón, bajo una combinación de auxina (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y citocinina (Kinetina), en concentraciones del orden de $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (4.4 μM).

En todos los casos, los callos generados en esta investigación, presentaron una estructura compacta y una coloración verde (Figura 3).

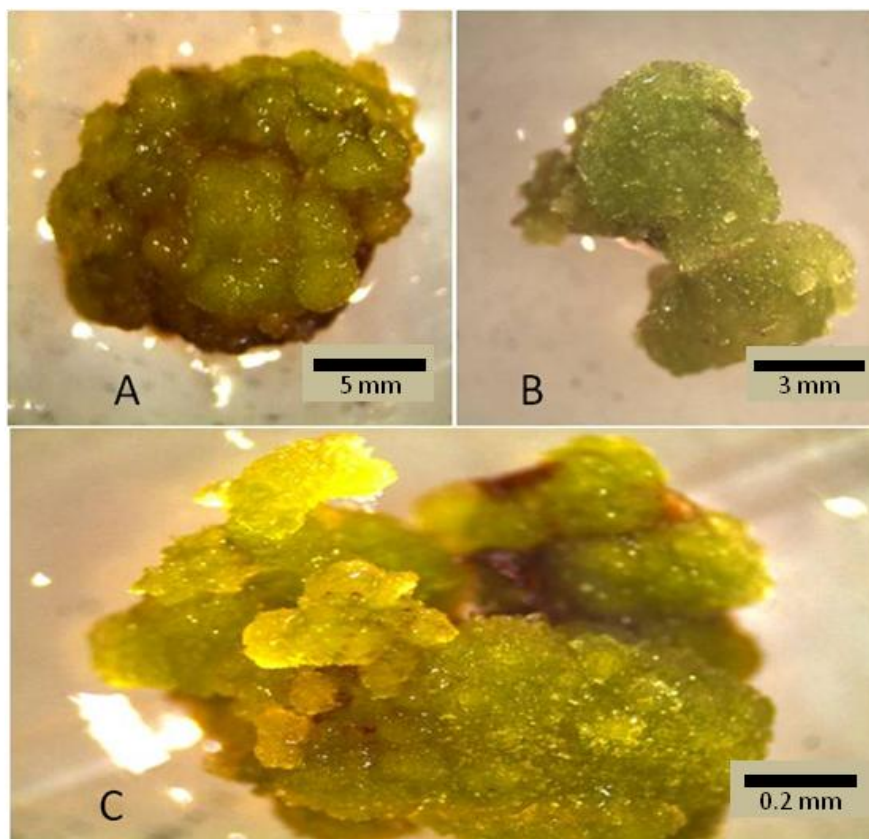


Figura 3. La principal formación de callo (> 50 %) se dio a partir de explantes de cotiledón (C), mientras que para explantes de hipocótilo (A) y epicótilo (B), esta cifra fue cercana al 10 %.

Formación de Brotes

Solo se presentaron cuatro casos de organogénesis a partir del explante de cotiledón, sin embargo, al cabo de 4 semanas, estos no lograron diferenciar brotes de manera clara, por tanto, la variable respuesta número de brotes, solo fue evaluada para hipocótilo y epicótilo (Figura 4).

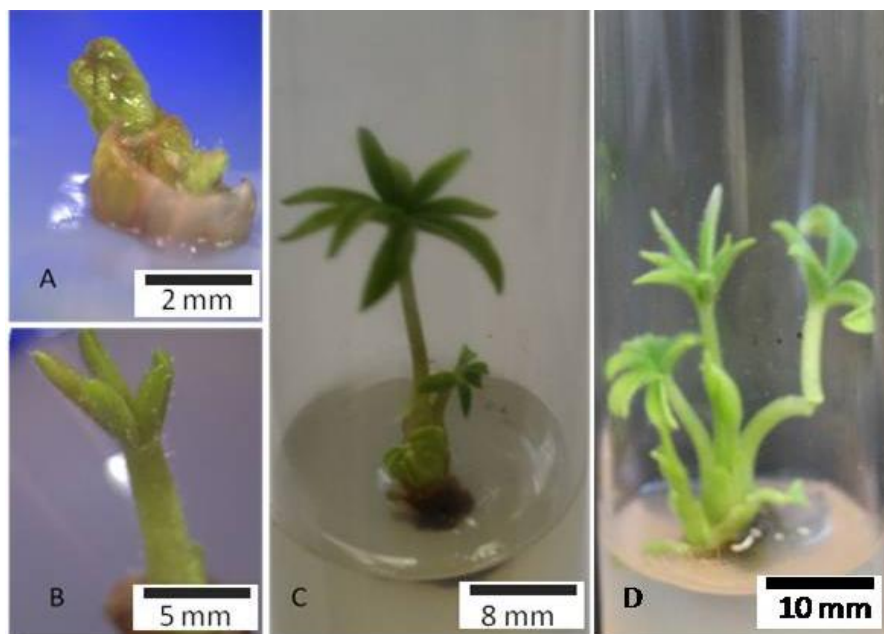


Figura 4. Formación de brotes en epicótilo (A) e hipocótilo (B), brote de hipocótilo (C) y epicótilo (D) en la cuarta semana.

Número de brotes. A un nivel de confianza del 95 %, el análisis de varianza mostró la existencia de diferencia significativa en el efecto del factor tratamiento sobre el valor promedio del número de brotes ($p\text{-value} = 0.000$). La prueba de Tukey señala que a nivel de tratamientos, el T_5 presenta diferencias significativas con los tratamientos restantes (a excepción del T_4 ; $p\text{-value} = 0.617$).

Estas diferencias significativas pueden apreciarse en la figura 5, donde se observa que en los tratamientos 4 y 5, el número de brotes de hipocótilo (5.4 y 5.9) y epicótilo (7.5 y 10.1) es mayor respecto de los obtenidos en los tratamientos restantes.

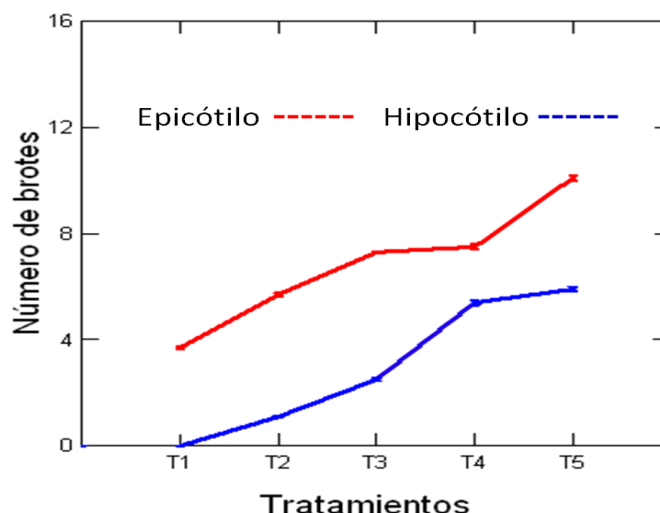


Figura 5. Interacción entre factor tratamiento vs factor explante.

En la misma figura, se puede apreciar también, que el factor explante genera diferentes valores promedio del número de brotes (p -value = 0.000), siendo mayor la respuesta en explantes de epicótilo, a excepción de lo que ocurre en el T_4 donde las desviaciones estándar de hipocótilo y epicótilo ($\pm 2.4 \pm 2.8$) se traslapan. Como se puede apreciar, los efectos principales inducidos por los factores tratamiento y tipo de explante en sus diferentes niveles, muestran una diferencia significativa al ser analizados de manera aislada, sin embargo, la interacción de los mismos no tuvo significancia estadística (p -value = 0.74).

Altura de plántulas regeneradas. Existieron diferencias estadísticamente significativas en el efecto del factor tratamiento sobre el valor promedio de altura (p -value = 0.012). El Tratamiento 5 presenta diferencia respecto a la altura (11.4 ± 2.6) con los tratamientos restantes (<0.001), a excepción del

T₄ (9.6 ±2.4), donde la diferencia estadística apenas fue significativa (p-value= 0.047).

CONCLUSIONES

El procedimiento de escarificación promueve exitosamente las respuestas hacia la germinación *in vitro* de semillas (100 %). Los medios de cultivo que mejor controlaron el necrosamiento, fueron aquellos adicionados con carbón activado. En estos, el nivel de necrosamiento fue de intensidad 1 (bajo). Los explantes de cotiledón fueron más susceptibles al proceso de necrosamiento en todos los tratamientos evaluados.

Respecto al tipo de respuesta, los explantes de hipocótilo y epicótilo presentaron una mayor respuesta de tipo organogénico, la cual podría ser de gran utilidad en el escalamiento de la propagación. A nivel de explante, epicótilo muestra diferencias significativas respecto al número y altura de brotes. A nivel de tratamientos, el T₄ (1μM AIA y 3 μM BA) y el T₅ (3μM AIA y 1 μM BA) resultaron ser los mejores medios para la inducción de tal respuesta.

Por otro lado, los explantes de cotiledón presentaron una mayor tendencia hacia la formación de callo en los medios que contenían reguladores vegetales.

AGRADECIMIENTOS

A los coautores por su tiempo y dedicación en la revisión y aporte en la elaboración de este documento. Al Dr. José Luis Rodríguez de la O, por los conocimientos, espacios y tiempos brindados para la realización de esta investigación. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada al primer autor a través del Programa Nacional de Posgrados de Calidad.

LITERATURA CITADA

- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20, 153-175.
- Bermúdez, T. K., Martínez, H. J., Figueroa, R., Legal, L., & Wink, M. (2009). Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican *Lupinus* against the lepidopteran crop pest *Spodoptera frugiperda*. *BioControl*, 54: 459-46.
- CSI (2009). SYSTAT 13 for Windows. Cranes Software International, Bangalore, India.
- Dove, E. R., Mori, T. A., Chew, G. T., Barden, A. E., Woodman, R. J., Puddey, I. B., Sipsas, S., & Hodgson, J. M. (2011). Lupin and soya reduce glycaemia acutely in type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 106: 1045-1051.

Lee, Y. P., Mori, T. A., Sipsas, S., Barden, A., Puddey, I. B., Burke, V., Hall, R. S., & Hodgson, J.M. (2006). Lupin-enriched bread increases satiety and reduces energy intake acutely. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84: 975-980.

Montes, E., Kyeneida, R., Meléndez, O., Ramos, J., Salinas, F.C., Rodríguez, M. & Bermúdez, K. (2008). Effect of scarification treatments on germination of *Lupinus montanus* HBK seeds. In Palta, J.A. & Berger, J.B. (2008). 'Lupins for Health and Wealth' Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand, pp. 405-409.

Montes, E., Corona, Ma. L., Trejo, G., Trejo, J. L., & Bermúdez, K. (2009a). El uso de antioxidantes en cultivos de callo de *Lupinus montanus* HBK. En: VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco, Guerrero, 2009. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Montes, E., Corona, Ma. L., Trejo, G., Rodríguez, J. L., & Bermúdez, K. (2009b). Evaluación de fitoreguladores para la inducción de callo de *Lupinus ascherbornii*. En: VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco, Guerrero, 2009. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plant*. 15: 473–497.
- Porras, J. (2010). Caracterización del proceso de aislados de proteína de *Lupinus silvestre* del Estado de Hidalgo. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Zamora, F., García, P., Ruiz, M. & Salcedo, E. (2008). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Agrociencia*, 42(2), 185-192.

II. CALLOGENESIS EN *Lupinus montanus* HBK A PARTIR DE EXPLANTES CULTIVADOS *in vitro*

CALLOGENESIS IN *Lupinus montanus* HBK FROM CULTURED EXPLANTS *in vitro*

Gabriel Ramírez-González¹ y Jesús Guadalupe Arreola-Ávila²

RESUMEN

Lupinus montanus HBK es una especie herbácea que se encuentra ampliamente distribuida en México. Perteneciente al género *Lupinus*, se caracteriza por sintetizar (como producto de su metabolismo secundario) alcaloides cuyas propiedades fungicidas, bactericidas e hipoglucemiantes han sido reportados a nivel experimental. Sin embargo, la obtención de dichos metabolitos vía extracción a partir de plantas cultivadas supone costos de inversión que pudiesen convertirla en una actividad poco rentable. En esta investigación se evaluaron los principales factores que participan en el desarrollo de callos que podrían dirigirse hacia el estudio en la síntesis y obtención de metabolitos secundarios, o bien, en la identificación y selección de líneas clonales o celulares deseadas. Los resultados de la investigación señalaron que, respecto a la ganancia en biomasa, los factores evaluados (Explante, Medio de cultivo e Incubación) así como sus interacciones, muestran diferencias en respuestas; bajo condiciones de luz se obtuvieron callos de estructura compacta, mientras que en oscuridad se obtuvieron callos friables. Los mayores rendimientos en biomasa se obtuvieron en callos originados a partir de epicótilo en combinaciones de 2,4-D, BA y Kinetina en concentraciones del orden de (4–6µM; 1–2µM y 2–2µM respectivamente) bajo condiciones de oscuridad.

Palabras clave: Friable, Necrosamiento, Auxina, Citocinina.

¹Tesista

² Director

ABSTRACT

Lupinus montanus HBK is an herbaceous species that is widely distributed in Mexico. This plant belongs to the genus *Lupinus*, characterized by synthesizing (as a product of secondary metabolism) quinolizidinic alkaloids as lupanine whose properties fungicides, bactericides and hypoglycemic have been reported experimentally.

However, these metabolites obtained via extraction and harvesting from cultivated plants involves investment costs that may make it uneconomical activity. That is why in this research study, It is we evaluated the major factors involved in the establishment and development of callus biomass that could be used for the production of secondary metabolites, or the desired amplification and selection of clonal lines.

There search results indicated that, compared to the gain in biomass, the factors evaluated (explant culture medium and incubation) and their interactions, show differences in responses (p-value = 0.000), lowlight conditions were obtained compact callus, while in darkness friable calli. The higher biomass yields were obtained in calli originated from epicotyl in combinations of 2,4-D, BA and kinetin in concentrations ranging from (4-6 uM;1-2 uM and 2-2 uM respectively) under dark conditions.

Keywords: Friable, Necrosis, Auxin, Cytokinin.

INTRODUCCIÓN

Diversos estudios en plantas, señalan la importancia de la callogénesis *in vitro* para la iniciación de cultivos en suspensión celular destinados al estudio sobre la síntesis de metabolitos secundarios. De igual manera, a partir de callos obtenidos *in vitro* se pueden inducir la formación de embriones somáticos a través de los cuales se podrían obtener clones específicos (Martínez et al., 2010).

En especies vegetales de tipo leñoso, la inducción y cultivo de callos resulta limitada, debido principalmente a la gran cantidad de sustancias metabólicas que el tejido libera como respuesta al estrés oxidativo al que es sometido, toda vez que es separado de la planta (Tang y Newton, 2004). Este hecho ocurre con explantes de la herbácea *Lupinus montanus* H.B.K., cuyas aplicaciones experimentales han resultado positivas tanto en el campo médico (Dove et al., 2011) como en el agroquímico (Bermúdez et al., 2009).

El objetivo general de este trabajo es contribuir a los medios de aprovechamiento biotecnológico de las propiedades de dicha planta, ya sea a nivel de cultivos en suspensión para la producción de metabolitos secundarios, o bien mediante la amplificación de material vegetal vía callogénesis y su subsecuente inducción a organogénesis como estrategia de micropropagación clonal.

De manera específica, el objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo que permitiese analizar los efectos inducidos por el tipo de explante (epicótilo, cotiledón e hipocótilo) medio de cultivo (suplementado con combinaciones de auxinas y citocininas) y condiciones de incubación (fotoperíodo 16:8, así como oscuridad permanente), en las características morfológicas de callos de *Lupinus montanus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación que a continuación se presenta, fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales perteneciente al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Material vegetal

Como fuente de explante se utilizaron plántulas de *Lupinus montanus* de 4 semanas de edad, obtenidas mediante la germinación *in vitro* de semillas donadas por investigadores del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo; colectadas en el año 2011 en el cerro de Xipes (19°00'48" latitud norte; 97°21'20" longitud Oeste), municipio de Libres,

Obtención del explante

Después de 4 semanas de crecimiento, se cosechó de manera aleatoria un total de 10 plántulas. Las regiones a utilizar como fuente de explante (hipocótilo, cotiledón y epicótilo) fueron seccionadas en tamaños aproximados de 6 mm³, y posteriormente sembradas en medio MS (Murashigue y Skoog, 1962) en cajas Petri bajo 6 diferentes tratamientos (Cuadro 1) con 12 repeticiones cada uno.

Cuadro 1. Medios de cultivo para la inducción de formación de callo.

Medio de Cultivo ¹	2,4-Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)	6-Bencilaminopurina (BA)	6-furfurilaminopurina (Kinetina)
C ₀	0µM	0µM	0 µM
C ₁	1.0µM	0.5 µM	0 µM
C ₂	1.0 µM	0 µM	0.5 µM
C ₃	2.0 µM	2.0 µM	1.0µM
C ₄	4.0 µM	1.0µM	2.0 µM
C ₅	6.0 µM	2.0 µM	2.0 µM

¹MS al 100%, adicionado con 0.40 mg.L⁻¹ de tiamina, 100 mg.L⁻¹ de myo-inositol, 3% de sacarosa y 7 g.L⁻¹ de agar agar, y 100 mg.L⁻¹ de carbón activado, a un pH de 5.7± 0.1

Posteriormente, se incubaron igual número de muestras por tratamiento tanto en condiciones de oscuridad permanente como bajo período luz/oscuridad

(16:8), a una temperatura promedio de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, durante un lapso de 4 semanas.

Diseño experimental

Las variables cualitativas fueron: respuesta callogénica, donde 0 represento la ausencia y 1 la formación de callo; nivel de necrosamiento medido mediante una escala de 0 a 3, donde 0 correspondió al nivel o grado nulo ($< 10\%$); 1 al grado bajo ($> 10\% < 30\%$); 2 al moderado ($> 30\% < 60\%$); y 3 al alto ($> 60\%$); color del callo (crema o verde) y estructura del callo (compacta o friable). Estos resultados fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$) mediante el paquete estadístico Minitab v.16.1. (2010).

Por otra parte, para la evaluación de la variable cuantitativa (biomasa), se seleccionaron de manera aleatoria 5 muestras de callo de tratamiento y se obtuvo el registro del peso fresco en cada caso. Posteriormente, estos datos fueron analizados bajo un diseño experimental de arreglo factorial, mediante el modelo:

$$Y_{ijkl} = M + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \xi_{ijkl}$$

Donde los factores fueron:

A = Tipo de explante: hipocótilo, cotiledón y epicótilo;

B = Medio de cultivo: C₀, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅

C = Condición de incubación: fotoperíodo (16 hrs. Luz: 8 hrs. Oscuridad) y oscuridad permanente.

Con un total de $A^3 \times B^5 \times C^2$ tratamientos con 5 repeticiones cada uno. Finalmente, la información resultante fue analizada mediante un análisis de varianza, mientras que la comparación de medias entre tratamientos se llevó a cabo mediante la prueba de Tukey (ambas con un nivel de confianza del 95 %).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta Callogénica

Después de cuatro semanas se observó que en ambos procedimientos de incubación (fotoperíodo (16:8), oscuridad permanente) los medios de cultivo que presentaron combinaciones de fitohormonas indujeron la formación de callo en los tres diferentes tipos de explante.

Las combinaciones de la auxina 2,4-D con BA produjeron resultados que estadísticamente no fueron diferentes a los obtenidos con combinaciones de 2,4-D con Kinetina, debido a que en todos los casos se presentó la formación de callo (Figura 1).

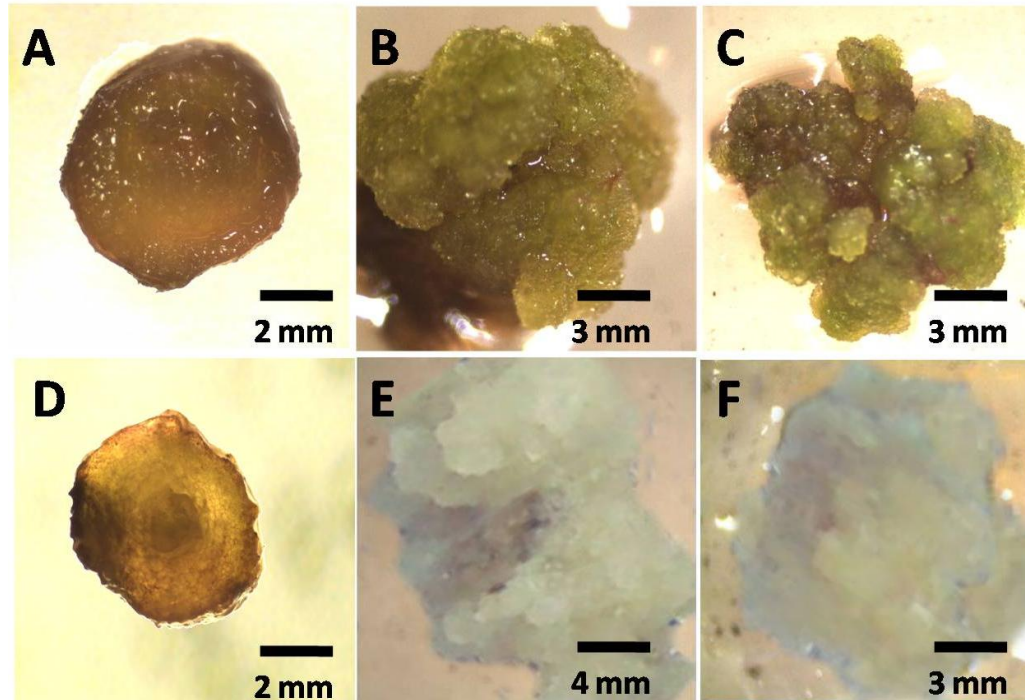


Figura 1. Formación de callos bajo ambas condiciones de incubación fotoperíodo. A) Medio sin reguladores; B) Combinación 2,4-D: BA; C) Combinación 2,4-D: Kinetina; Formación de callos bajo ambas condiciones de oscuridad permanente. D) Medio sin reguladores; E) Combinación 2,4-D: BA; F) Combinación 2,4-D: Kinetina.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Montes *et al*, (2009a), quienes lograron inducir la formación de callos de *Lupinus ascherbornii* a partir de explantes de cotiledón, raíz e hipocótilo, con combinación es de 2,4-D y Kinetina, en concentraciones $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (4 a $8\mu\text{M}$).

Grado de necrosamiento de los callos

La prueba de Kruskal Wallis señalo que estadísticamente, no existió diferencia respecto al grado de necrosamiento de los explantes bajo tratamientos incubados en ambas condiciones ($p\text{-value}= 0.105$). En general, bajo condiciones de oscuridad, el nivel de necrosamiento que presentaron

los callos formados a partir de los 3 tipos de explante, fue menor al 5 % del total de todas las repeticiones incubadas en los diferentes tratamientos. Por otro lado, en condiciones de luz/oscuridad, el nivel de necrosamiento fue cercano al 12% del total de todas las repeticiones; 15 de ellas correspondieron a cotiledón, 8 a hipocótilo y 3 a epicótilo. Cabe señalar que el grado de necrosamiento que presentaron estos tejidos correspondió en todos los casos a la categoría de nivel 2.

Color y estructura de callos

Se observó que tanto el color como la estructura del callo estuvieron íntimamente asociados a las condiciones de incubación (p-value= 0.000), independientemente del medio de cultivo y origen del explante. En condiciones de luz/oscuridad, la clorofila presente en las células de los callos se expresó generando un patrón de color verde uniforme (Figura 2A), mientras que, bajo condiciones de oscuridad permanente, la clorofila fue inhibida, como consecuencia de ello, el tejido adquirió una tonalidad cremosa (Figura 2B).

Este hecho coincide con lo observado comúnmente en cultivos *in vitro* de diversas especies en ambas condiciones, tal y como señalan los trabajos de Parsaeimehr *et al.* 2010 y Tavakkol *et al.*, 2011, quienes al evaluar el efecto de la luz y los reguladores de crecimiento en la inducción de callo de *brassic napus* L., y *Ephedra procera* observaron las mismas tonalidades en callos cultivados en luz y oscuridad.

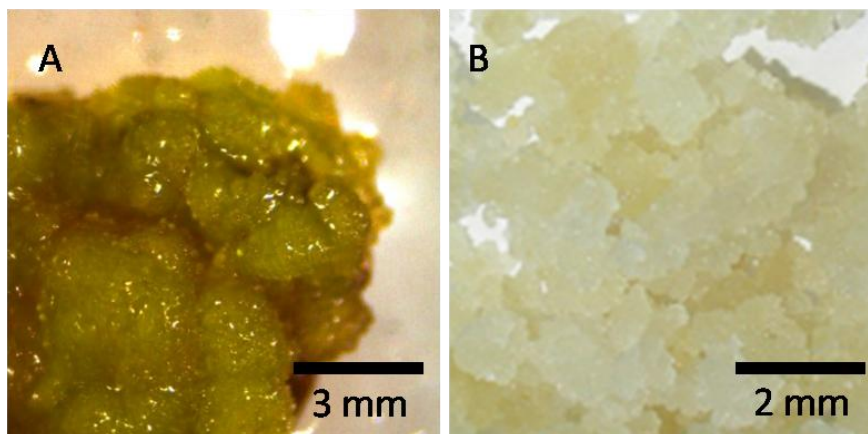


Figura 2. Color y estructura de callos. A) Callo formado a partir de explante de hipocótilo bajo condiciones de luz/oscuridad. B) Callo formado a partir de explante de hipocótilo en condiciones de oscuridad permanente.

Por otra lado, la Figura 2A ilustra la estructura compacta que presentaron los callos cultivados en fotoperíodo de luz/oscuridad, mientras que en el segundo caso (Figura 2B), la estructura fue de tipo friable en todas las repeticiones. Este resultado es acorde con lo señalado por Rajiv y Yadav (2006) respecto a la influencia de la luz en la inducción de callos friables incubados a intensidades bajas de luz u oscuridad, para diversas especies vegetales.

Biomasa de Callo

El análisis de varianza permitió observar los efectos que tienen los factores evaluados en el desarrollo de biomasa medida en gramos. A nivel de explantes, existió diferencia estadísticamente significativa ($p\text{-value}= 0.000$) respecto al efecto del explante en la respuesta biomasa, independientemente del medio de cultivo o condición de incubación a que fuese sometido (Figura 3A).

El explante a partir del cual se formaron callos con la mayor biomasa fue epicótilo (1.3307 ± 0.5151), mientras que entre hipocótilo y cotiledón la prueba de Tukey no señaló diferencia estadística alguna.

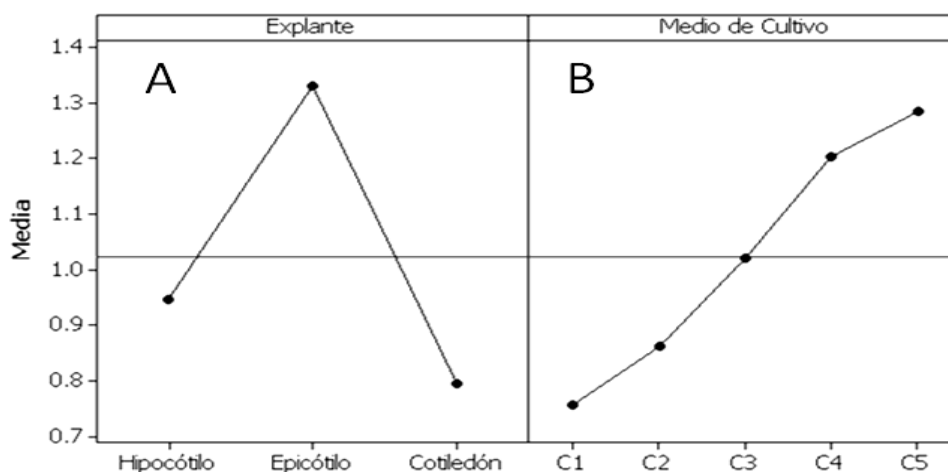


Figura 3. Gráficas de efectos principales sobre la biomasa de callo. A) Efecto del explante. B) Efecto del medio de cultivo.

A nivel de medios de cultivo el análisis de varianza evidenció que existió una respuesta significativamente diferente respecto la respuesta en biomasa ($p\text{-value} = 0.000$). En la Figura 3B se observa el efecto positivo que tiene los medios de cultivo con mayores concentraciones de 2,4-D, BA y Kinetina, en el incremento de biomasa en callo, independientemente del tipo de incubación.

Las respuestas inducidas por los medios de cultivo C₄ y C₅ fueron significativamente diferentes y mayores a las obtenidas con los medios restantes.

De igual modo, el efecto del factor incubación fue estadísticamente diferente ($p\text{-value}=0.000$) para las respuesta obtenidas en fotoperíodo y oscuridad permanente.

En la Figura 4 se muestra la interacción entre los diferentes factores analizados en el experimento. La respuesta en biomasa de callo fue mayor para los tres tipos de explante en los cultivos incubados bajo condiciones de oscuridad permanente (Figura 4A).

La interacción entre medios de cultivo y proceso de incubación, resulto significativa ($p\text{-value} =0.002$). Las respuestas promedio obtenidas para los medios con contenidos mayores a $1\text{ }\mu\text{M}$ de 2,4-D, BA y/o Kinetina (C_3 , C_4 , C_5) fueron significativamente diferentes a las obtenidas con los medios cuyas concentraciones de citocininas eran menores a $1\text{ }\mu\text{M}$ (C_1 , C_2).

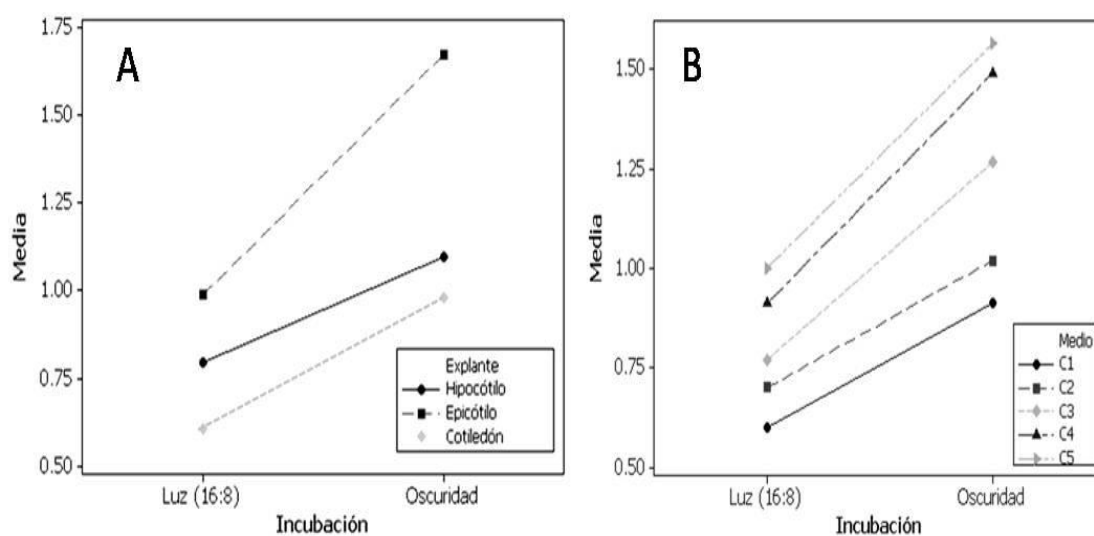


Figura 4. Gráficas de Interacción. A) Interacción explante vs incubación. B) Interacción medio de cultivo vs incubación.

Para cualquiera de los explantes evaluados bajo cualquiera de los diferentes medios de cultivo, la respuesta en biomasa se incrementa al pasar de un estado de incubación en luz, a una fase de oscuridad permanente.

El incremento en biomasa observado en condiciones de oscuridad, podría estar asociado al hecho de que las auxinas no sufren degradación por foto-oxidación, lo cual permite que estén presentes en mayor medida tanto en el medio (exógenas) como en el tejido (endógenas), promoviendo una mayor elongación de las células y consecuentemente, un mayor desarrollo de biomasa en comparación a lo que ocurre en condiciones de luminosidad, tal y como explican algunas investigaciones a nivel de tejidos vegetales (Taiz y Zeiger, 2010).

CONCLUSIONES

Los porcentajes de necrosamiento de los tejidos fueron muy bajos (5 % en oscuridad; 12% en fotoperíodo) y estuvieron dentro del nivel catalogado como moderado ($> 30\% < 60\%$).

El efecto de incubación indujo de manera directa una diferencia en estructura y coloración de los callos, siendo de color verde y estructura compacta bajo condiciones de luz/oscuridad, y de color crema y estructura friable en condiciones de oscuridad permanente.

A nivel de explante, el epicótilo fue el tejido que formó callos con el mayor peso, mientras que el cotiledón fue el que produjo menos biomasa. A nivel de medios de cultivo, el incremento y combinación de dosis de 2,4-D, BA y Kinetina potencializaron el incremento en biomasa en ambas, para los tres tipos de explante.

Finalmente, el factor luz tuvo un efecto negativo en el incremento de biomasa cuando esta está presente, y positivo en incubación sin luz.

AGRADECIMIENTOS

A los coautores por su tiempo y dedicación en la revisión y aporte en la elaboración de este documento. Al Dr. José Luis Rodríguez de la O, por los conocimientos, espacios y tiempos brindados para la realización de esta investigación. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada al primer autor a través del Programa Nacional de Posgrados de Calidad.

LITERATURA CITADA

- Bermúdez, K., H.J. Martínez, R. Figueroa, L. Legal y M. Wink. 2009. Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican *Lupinus* against the lepidopteran crop pest *Spodoptera frugiperda*. *BioControl*, 54: 459-46.
- Dove, E. R., T.A. Mori, G.T. Chew, A.E. Barden, R.J. Woodman, I.B. Puddey, S. Sipsas, y J.M. Hodgson. 2011. *Lupin* and soya reduce glycemia acutely in type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 106: 1045-1051.
- Martínez, R., H.S. Azpiroz, J.L. Rodríguez, N.M. Cetina y M.A. Gutiérrez. 2010. La Biotecnología y su aplicación en los recursos forestales. In: *Biotecnología Aplicada a los Recursos Forestales*. Martínez, R.; Azpiroz, H.S.; Rojo, G.E.; Rodríguez, J.L. y Ramírez, B. (coords). 1ª edición. Universidad Autónoma Indígena de México, Universidad Autónoma Chapingo. Colegio de Postgraduados. Campus Puebla. 1-36 pp.
- Minitab Inc. 2010. Diseño de un experimento. Meet Minitab 16. 2-12pp.
- Montes, E., Ma. Corona, G. Trejo, J. L. Rodríguez y K. Bermúdez. 2009a. Evaluación de fitoreguladores para la inducción de callo de *Lupinus ascherbornii*. En: VII Simposio Internacional de Producción de

Alcoholes y Levaduras. Acapulco, Guerrero, 2009. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Montes, E., Ma. Corona, G. Trejo, J.L. Trejo y K. Bermúdez. 2009b. El uso de antioxidantes en cultivos de callo de *Lupinus montanus* HBK. En: VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco, Guerrero, 2009. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Murashige, T., y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plant*. 15: 473–497.

Parsaeimehr, A., E. Sargsyan y K. Javidnia. 2010. Influence of plant growth regulators on callus induction, growth, chlorophyll, ephedrine and pseudoephedrine contents in *Ephedra procera*. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(13), pp. 1308-1317.

Rajiv, T. y P.R. Yadav. 2006. *Biotechnology Of Plant Tissues*. Discovery Publishing House. 1ª Edición (2006). Darya Ganj, New Delhi, India. 74-87 pp.

Taiz, L. y Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 428- 453. pp.

Tang, W., y R. Newton. 2004. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). Plant Science 167: 621-628.

Tavakkol R., R. Angoshtari y S. Kalantari. 2011. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. POJ 4(2):60-67

DISCUSIÓN GENERAL

El cultivo *in vitro* de *Lupinus montanus* resulta una estrategia adecuada para la propagación y multiplicación de plantas, tanto a partir de semillas, cómo de tejidos vegetales.

En la propagación a partir de semillas, los procesos de escarificación promueven exitosamente las respuestas hacia la germinación *in vitro*, lográndose alcanzar niveles del 100 %. Las plántulas germinadas bajo estas condiciones, presentan sin embargo, características heterogéneas (vigor, tamaño, entre otras) debido a su carga genética, de modo tal que la producción a partir de semilla podría no ser la estrategia idónea cuando se trate de obtener provecho de características asociadas a fenotipos o cargas genéticas de ejemplares selectos.

Por otro lado, la propagación y multiplicación a partir de tejidos amplía el espectro de las múltiples potencialidades que pueden ser aprovechadas a partir de cultivares homogéneos, o cultivos de callos. En condiciones de cultivo *in vitro*, los explantes de epicótilo, cotiledón e hipocótilo, muestran características meristemáticas que pueden ser dirigidas tanto al proceso de organogénesis como al de embriogénesis, según se varíen las concentraciones de auxinas, citocininas.

CONCLUSIONES GENERALES

Para el cultivo de tejidos de *Lupinus montanus*, la adición de carbón activado (a partir de concentraciones de 100 mg.L^{-1}) a los medios de cultivo, controló los niveles de necrosamiento de los explantes de epicótilo, hipocótilo y cotiledón.

Mediante la adición de auxinas como el AIA combinadas con citocininas como el BA en un rango de combinaciones de $1\mu\text{M}$ a $3\mu\text{M}$, se indujo el proceso de organogénesis en explantes de epicótilo e hipocótilo, siendo el primero, a partir del cual se generó tanto un mayor número de brotes, como una mayor altura en la plántula regenerada.

En contraste, el incremento en la concentración de la auxina 2,4-D ($4\text{-}6 \mu\text{M}$) y de las citocininas BA y Kinetina (en un rango de $1.0\text{-}2.0 \mu\text{M}$) indujeron una respuesta de tipo embriogénico en los tres explantes evaluados.

La formación de callo así como su biomasa se vio afectada al mismo tiempo por las condiciones de incubación. En condiciones de incubación bajo fotoperíodo, los callos fueron verdes, compactos y presentaron una menor biomasa en comparación con los obtenidos bajo condiciones de oscuridad permanente, donde además los callos se mostraron con estructura de tipo friable y coloración cremosa, características deseadas para el desarrollo de embriones somáticos. Finalmente, los mayores incrementos en biomasa de callo, se dieron a partir de explantes de epicótilo, en todos los tratamientos.

Con base a estos resultados, se puede afirmar que en ambas estrategias de cultivo de tejido, bajo las condiciones aquí evaluadas, los explantes de epicótilo resultan ser los más adecuados para propagar tanto plantas como callos de *Lupinus montanus*.