



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

PROPAGACION *in vitro* DE DIFERENTES ESPECIES DE *Lupinus*

JOSE GABRIEL GARCÍA HERNÁNDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO.

2015

La presente tesis titulada: Propagación *in vitro* de diferentes especies de *Lupinus*, realizada por el alumno: José Gabriel García Hernández, 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
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: Nydia del Rivero B.

Dra. Nydia del Rivero Bautista

ASESORA: Luz del Carmen Lagunes E.

Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza

ASESOR: Alfonso Azpeitia M.

Dr. Alfonso Azpeitia Morales

ASESOR: Ramón Díaz Ruíz

Dr. Ramón Díaz Ruíz

H. Cárdenas, Tabasco, México, 08 de Diciembre de 2015

PROPAGACIÓN *in vitro* DE DIFERENTES ESPECIES DE *Lupinus*

José Gabriel García Hernández, MC

Colegio de Postgraduados, 2015

Resumen

El objetivo fue establecer un protocolo de propagación *in vitro* para diferentes especies del género *Lupinus*. Los experimentos se realizaron: Escarificación de semillas de *L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus* con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 98% a tres tiempos de inmersión (20, 30 y 40 min) se colocaron en el medio de cultivo basal (MS); posteriormente se evaluó el efecto del ácido sulfúrico al 98% sobre la germinación *in vitro* de semillas *L. campestris* y *L. exaltatus* en el medio de cultivo semisólido (MS), adicionado con y sin Fe-EDTA. Se evaluó la germinación de las tres especies y se colocaron en el medio de cultivo Gamborg adicionado con y sin Fe-EDTA. Se probaron tres reguladores de crecimiento (AIA, ANA, 6-BAP) para inducir la formación de brotes. Los resultados obtenidos mostraron que *L. Campestris* presentó el mayor porcentaje de germinación (67%), seguida de *L. exaltatus* (65%) durante 30 minutos en ácido sulfúrico y *L. montanus* (18%) en un tiempo de 40 minutos. Por otro lado, al suprimir la fuente de Fierro al medio de cultivo, se observó que el porcentaje de germinación se incrementó para *L. campestris* de 45% a 54% y para *L. exaltatus* de 37% a 52%. Para *L. montanus* el mayor porcentaje de germinación (26%) se encontró en las semillas, sembradas en el medio de cultivo MS sin Fe-EDTA y el menor porcentaje (10%) en el medio de cultivo MS que contenía Fe-EDTA. En el medio de cultivo Gamborg, *L. campestris* incrementó la germinación de 39% a 61% cuando se eliminó el Fe-EDTA, *L. exaltatus* y *L. montanus* no mostraron diferencias significativas. El mayor número de brotes se obtuvo en *L. campestris* (1.91) en el tratamiento que contenía ANA a una concentración de 0.1 mg L^{-1} y para *L. exaltatus* (1.50) en el tratamiento que contenía 1.0 mg L^{-1} de AIA. *L. montanus* (1.40) en el tratamiento de 6-BAP con una concentración de 1.0 mg L^{-1} .

Palabras clave: Germinación, latencia, medio de cultivo, reguladores de crecimiento

In vitro* PROPAGATION OF DIFFERENT SPECIES OF *Lupinus

José Gabriel García Hernández, MC

Colegio de Postgraduados, 2015

Abstract

The aim was to establish a protocol for *in vitro* propagation of the genus *Lupinus* species. Experiments performed: Scarification *L. campestris* seed, *L. montanus*, *L. exaltatus* and sulfuric acid (H₂SO₄) 98%, immersion three times (20, 30 and 40 min) were placed in the basal culture medium (MS); then the effect of 98% sulfuric acid on the *in vitro* seed germination *L. campestris* and *L. exaltatus* in semisolid medium (MS) supplemented with and without Fe-EDTA was evaluated. Germination of the three species evaluated and placed in culture medium supplemented with Gamborg without Fe-EDTA. Three growth regulators (IAA, NAA, 6-BAP) were tested for induce shoot formation. The results showed that *L. campestris* showed the highest germination percentage (67%), followed by *L. exaltatus* (65%) for 30 minutes and *L. montanus* (18%) in sulfuric acid a time of 40 minutes. Furthermore, by suppressing Fierro source to the culture medium, it observed that the germination percentage increased to *L. campestris* 45% to 54% and *L. exaltatus* from 37% to 52%. *L. montanus* to the highest germination percentage (26%) founded in the seeds sown in MS medium without Fe-EDTA and the lowest percentage (10%) in the culture medium containing MS Fe-EDTA. In the culture medium Gamborg, *L. campestris* increased germination of 39% to 61% when the Fe-EDTA removed *L. montanus* and *L. exaltatus* and there were no significant differences. The highest number of shoots formation obtained in *L. campestris* (1.91) in the treatment containing ANA at a concentration of 0.1 mg L⁻¹ and *L. exaltatus* (1.50) in the treatment containing 1.0 mg L⁻¹ of AIA. *L. Montanus* (1.40) in the treatment of 6-BAP at a concentration of 1.0 mg L⁻¹.

Key words: Germination, culture medium, growth regulators, seed dormancy

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico que recibí a través de una beca, para cursar los estudios de Maestría en Ciencias en el Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, y con ello elevar mi grado académico y por el financiamiento otorgado para realizar parte de la investigación de tesis a través del Proyecto CB-2012-01 181428.

Al Colegio de Posgraduados, Campus Tabasco, por la oportunidad que me brindó al ingresar y cursar la Maestría en Ciencias “Producción Agroalimentaria en el Trópico”, a todo el personal que en él labora y quienes hacen posible este programa de maestría.

Agradezco a mi Consejo Particular formado por la Dra. Nydia Del Rivero Bautista, la Dra. Luz Del Carmen Lagunes Espinoza, al Dr. Alfonso Azpeitia Morales y al Dr. Ramón Díaz Ruíz, por sus valiosas aportaciones durante la realización del presente trabajo y durante el tiempo que duró la Maestría.

Al Técnico Cesar Villareal Vitorino del Laboratorio de Cultivos de Tejidos por su apoyo para la elaboración de los medios de cultivo.

Agradezco a todos mis maestros, mi más profundo agradecimiento por la labor académica que desempeñan con gran ahínco, por sus enseñanzas, sugerencias y consejos, para el perfeccionamiento y/o adecuación de esta investigación. A todas las personas que colaboraron de alguna forma en la realización de esta investigación.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

DIOS:

Por ser mi Gran benefactor, brindarnos la vida y la posibilidad de aprender y servir, gracias por tus bendiciones porque sin tí nada de esto sería posible.

MIS PADRES:

Por su infinito amor y apoyo incondicional.

A MI ESPOSA:

Delfina Vázquez Arcos, que con su amor, apoyo y comprensión durante cada proyecto me ha impulsado tantas veces a dar lo mejor de mí en todos los retos que emprendo. Mi compañera y cómplice de vida que vive mis logros y mis intentos, te amo.

MIS HIJOS:

Perla Esmeralda y Ángel Gabriel

Fuentes de inspiración y apoyo para la culminación de este trabajo, y que además este esfuerzo les inspire a realizar su propia formación.

A MIS AMIGOS:

Salomón, Juan Pablo, Eglá, Andrés,
Omar, Sergio, José María,

Lili, Eva, Matías, Benjamín, Rodolfo por su apoyo y amistad durante esta travesía.

“Lo escuché y lo olvidé, lo vi y lo entendí, lo hice y lo aprendí”

Confucio

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. El género <i>Lupinus</i>	5
2.2. Distribución mundial del género <i>Lupinus</i>	6
2.3. Composición química del género <i>Lupinus</i>	10
2.4. Clasificación taxonómica y botánica.....	10
2.5. Descripción morfológica de especies del género <i>Lupinus</i>	11
2.6. Descripción morfológica de las especies de la región Centro Oriental del Estado de Puebla, México	13
2.7. Importancia económica y producción mundial.....	14
2.8. Concepto de latencia	15
2.9. Propagación por métodos tradicionales	16
2.9.1. Propagación sexual	16
2.9.2. Propagación asexual	17
2.9.2.1. Propagación por cultivo <i>in vitro</i>	17
2.9.2.1.1. Organogénesis.....	17
2.9.2.1.2. Embriogénesis somática	19
2.10. Factores que afectan los procesos morfogenéticos	20
3. MATERIALES Y METODOS	22
3.1. Sitios de colecta del material vegetal	22
3.2. Localización del sitio de estudio.....	23
3.3. Procedimientos generales.....	24
3.4. Procesamiento estadístico	25
3.5. Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄), sobre la escarificación y germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. campestris</i> , <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i>	25
3.6. Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄), sobre la escarificación y germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. campestris</i> y <i>L. exaltatus</i> en medio de cultivo semisólido MS con y sin Fe-EDTA.....	26
3.7. Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄), sobre la escarificación y germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Lupinus montanus</i> , en medio de cultivo semisólido MS con y sin Fe- EDTA.....	27

3.8.	Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄), sobre la escarificación y germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. campestris</i> , <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> , en medio de cultivo semisólido Gamborg <i>et al.</i> (1968) con y sin Fe-EDTA.....	28
3.9.	Evaluación del efecto de reguladores de crecimiento en la proliferación de brotes de <i>L. campestris</i> y <i>L. exaltatus</i> en medio de cultivo semisólido MS.	29
3.10.	Evaluación del efecto del 6-BAP para inducir la formación de brotes en plántulas de <i>L. montanus</i> en medio de cultivo semisólido Gamborg <i>et al.</i> (1968).	31
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1.	Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄), sobre la escarificación y germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. campestris</i> , <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i>	33
4.2.	Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄), sobre la escarificación y germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. campestris</i> y <i>L. exaltatus</i> en medio de cultivo semisólido MS con y sin Fe-EDTA.....	37
4.3.	Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄), sobre la escarificación y germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. montanus</i> en medio de cultivo semisólido MS con y sin Fe-EDTA.....	42
4.4.	Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄), sobre la escarificación y germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. campestris</i> , <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> en medio de cultivo semisólido Gamborg <i>et al.</i> (1968) con y sin Fe-EDTA.....	47
4.5.	Evaluación del efecto de reguladores de crecimiento en el establecimiento de brotes de <i>L. campestris</i> y <i>L. exaltatus</i> en medio de cultivo semisólido MS.	52
4.6.	Evaluación del 6-BAP para inducir la formación de brotes en plántulas de <i>L. montanus</i> en medio de cultivo semisólido Gamborg <i>et al.</i> (1968).	59
5.	CONCLUSIONES.....	63
6.	RECOMENDACIONES	65
7.	LITERATURA CITADA.....	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del género <i>Lupinus</i> en México (Fuente: Revisión herbario Bermúdez-Torres, 2013).....	8
Figura 2. Localización de los sitios de recolecta de <i>Lupinus</i> spp., en la región de los Valles de Libres y Serdán, Puebla (Fuente: Pablo-Pérez <i>et al.</i> , 2013).....	22
Figura 3. Localización del laboratorio de Cultivo de Tejidos del Campus Tabasco del Colegio de Postgraduados ubicado en el municipio de Cárdenas, Tabasco, México....	24
Figura 4. Semillas de <i>Lupinus</i> . a) <i>L. campestris</i> , b) <i>L. exaltatus</i> y c) <i>L. montanus</i> , empleadas como explantes iniciales para evaluar el efecto de la escarificación sobre la respuesta de germinación bajo condiciones <i>in vitro</i>	26
Figura 5. Establecimiento de yemas apicales de <i>L. campestris</i> y <i>L. exaltatus</i> . a) corte de la yema apical y b) establecimiento de la yema en medio de cultivo semisólido MS.	30
Figura 6. Establecimiento de yemas apicales de <i>L. montanus</i> . a) Corte de yemas apicales de plántulas de <i>L. montanus</i> y b) Establecimiento en el medio de cultivo Gamborg <i>et al.</i> (1968).	31
Figura 7. Porcentaje de germinación de tres especies de <i>Lupinus</i> en tres tiempos de inmersión en ácido sulfúrico a los 7 días de cultivo en medio semisólido MS.....	34
Figura 8. Germinación de semillas después de aplicar los tratamientos de escarificación química: a) <i>L. campestris</i> (30 min), b) <i>L. exaltatus</i> (30 min) y c) <i>L. montanus</i> (40 min). 36	
Figura 9. Porcentaje de germinación de dos especies de <i>Lupinus</i> (<i>L. campestris</i> y <i>L. exaltatus</i>) en medio de cultivo MS con y sin Fe-EDTA a los 23 días de cultivo.	38
Figura 10. Efecto del Fe-EDTA en el medio de cultivo MS sobre la germinación <i>in vitro</i> de semillas a los 30 días de cultivo. a) <i>Lupinus campestris</i> con Fe-EDTA y b) <i>L. campestris</i> sin Fe-EDTA c) <i>L. exaltatus</i> con Fe-EDTA y d) <i>Lupinus exaltatus</i> sin Fe-EDTA.....	40
Figura 11. Efecto de la escarificación química sobre el porcentaje de germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. montanus</i> en el medio de cultivo MS con y sin Fe- EDTA, a los 15 días de cultivo.	43
Figura 12. Efecto del Fe-EDTA en el medio de cultivo MS sobre la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. montanus</i> . a) Semillas de <i>L. montanus</i> con Fe-EDTA y b) Semillas de <i>L. montanus</i> sin Fe-EDTA, a los 15 días de cultivo.....	44
Figura 13. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de tres especies de <i>Lupinus</i> en medio de cultivo Gamborg <i>et al.</i> (1968) con y sin la adición de Fe-EDTA a los 12 y 23 días de cultivo.	47

Figura 14. Germinación *in vitro* de semillas de tres especies de *Lupinus* en medio de cultivo Gamborg. a) y b) *L. campestris* con y sin Fe-EDTA, c) y d) *L. exaltatus* con y sin Fe-EDTA, d) y e) *L. montanus*, con y sin Fe-EDTA respectivamente, a los 23 días de cultivo. 50

Figura 15. Efecto de reguladores de crecimiento sobre el número de brotes de *L. campestris* y *L. exaltatus*, en medio de cultivo MS a los XX días de cultivo. T0=Testigo, T1=0.1 mg L⁻¹ AIA, T2=0.5 mg L⁻¹ AIA, T3=1.0 mg L⁻¹ AIA, T4=0.1 mg L⁻¹ ANA, T5=0.5 mg L⁻¹ ANA, T6=1.0 mg L⁻¹ ANA, T7=0.1 mg L⁻¹ 6-BAP, T8=0.5 mg L⁻¹ 6-BAP, T9=1.0 mg L⁻¹ 6-BAP..... 52

Figura 16. Efecto de reguladores de crecimiento en *L. campestris* sobre medio de cultivo MS. a) T0=Testigo, b) T1=0.1 mg L⁻¹ AIA, c) T2=0.5 mg L⁻¹ AIA, d) T3=1.0 mg L⁻¹ AIA, e) T4=0.1 mg L⁻¹ ANA, f) T5=0.5 mg L⁻¹ ANA, g) T6=1.0 mg L⁻¹ ANA, h) T7=0.1 mg L⁻¹ 6-BAP, i) T8=0.5 mg L⁻¹ 6-BAP, j) T9=1.0 mg L⁻¹ 6-BAP. 57

Figura 17. Efecto de reguladores de crecimiento en *L. exaltatus* sobre medio de cultivo MS. a) T0=Testigo, b) T1=0.1 mg L⁻¹ AIA, c) T2=0.5 mg L⁻¹ AIA, d) T3=1.0 mg L⁻¹ AIA, e) T4=0.1 mg L⁻¹ ANA, f) T5=0.5 mg L⁻¹ ANA, g) T6=1.0 mg L⁻¹ ANA, h) T7=0.1 mg L⁻¹ 6-BAP, i) T8=0.5 mg L⁻¹ 6-BAP, j) T9=1.0 mg L⁻¹ 6-BAP..... 58

Figura 18. Efecto del 6-BAP en la proliferación de brotes de *L. montanus* en medio de cultivo Gamborg *et al.* (1968), a los 30 días de cultivo. T0=Testigo, T1=0.5 mg L⁻¹, T2=1.0 mg L⁻¹, T3=2.0 mg L⁻¹, T4=3.0 mg L⁻¹. 59

Figura 19. Efecto del 6-BAP en la proliferación de brotes de *L. montanus* en medio de cultivo Gamborg *et al.* (1968), a los 30 días de cultivo. a) Testigo, b) T1=0.5 mg L⁻¹, c) T2=1.0 mg L⁻¹, d) T3=2.0 mg L⁻¹, e) T4=3.0 mg L⁻¹..... 62

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de recolección del material vegetal	23
Cuadro 2. Promedio de altura de plántula y longitud de raíces en respuesta a la germinación <i>in vitro</i> de tres especies silvestres de <i>Lupinus</i> utilizando la escarificación de semillas con inmersión en ácido sulfúrico al 98%, evaluadas a los 30 días de cultivo.	37
Cuadro 3. Variables evaluadas con y sin FE-EDTA en el medio de cultivo MS.....	45
Cuadro 4. Efecto de la escarificación química sobre las variables altura de las plántulas, número de hojas y longitud de raíces de tres especies de <i>Lupinus</i> en medio de cultivo Gamborg <i>et al.</i> (1968) con y sin Fe-EDTA.	51
Cuadro 5. Efecto de reguladores de crecimiento en la variable número de hojas para <i>L. campestris</i> y <i>L. exaltatus</i> , en medio de cultivo MS.	55
Cuadro 6. Efecto del 6-BAP en las variables altura de brotes y número de hojas en <i>Lupinus montanus</i> a los 30 días de cultivo.....	60

1. INTRODUCCIÓN

El incremento acelerado de la población mundial genera una búsqueda permanente de nuevos recursos alimenticios, en este sentido las leguminosas son consideradas una importante fuente de proteínas y para muchos pueblos constituyen la base de la alimentación. Entre las ventajas del consumo de las leguminosas está su alto contenido de proteína, especialmente la soya con un valor promedio de 40%, y el de lupino con valores de 32 a 45% (Petterson, 1998; García-López *et al.*, 2001; Sujak *et al.*, 2006).

El género *Lupinus* está ampliamente distribuido a nivel mundial y en América se encuentran alrededor de 260 especies (Eastwood y Hughes, 2008). En México se han identificado cerca de 100 especies silvestres de éste género, con la mayor concentración en la Sierra Madre Occidental y en el Eje Neovolcánico Transversal (Bermúdez-Torres *et al.*, 2002; Ruiz-López *et al.*, 2006). En la Región de los Valles de Serdán y Libres de Puebla, las especies silvestres identificadas presentan un contenido elevado de proteínas y buen valor nutricional, pero altos contenidos de alcaloides (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012; Pablo-Pérez *et al.*, 2013).

Las semillas de *Lupinus* silvestres son difíciles de propagar debido a que la mayoría; presentan latencia por lo que su germinación es baja o irregular, atribuida principalmente a la impermeabilidad de la testa 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 la testa; este proceso se puede lograr con métodos como la escarificación mecánica (Alexander y Sánchez, 2002) y química (Acosta-Percastegui y Rodríguez-Trejo, 2005).

Pero para el estudio y multiplicación de las especies silvestres de *Lupinus*, se deben de buscar alternativas que permitan su multiplicación intensiva. Las técnicas de cultivo *in*

vitro pueden ser una alternativa para la propagación de especies silvestres de este género, iniciando por determinar las condiciones *in vitro* y el sistema de regeneración más eficiente para la obtención de plántulas completas de cada especie (Sanint, 2010; Rai, 2011).

Objetivo General

Establecer un protocolo de propagación *in vitro* para diferentes especies del género *Lupinus*.

Objetivos específicos

Evaluar el efecto del ácido sulfúrico sobre la escarificación y germinación *in vitro* de semillas de *L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus*.

Evaluar el efecto del ácido sulfúrico sobre la escarificación y germinación de las tres especies de *Lupinus* en diferentes medios de cultivo *in vitro*.

Determinar el efecto de reguladores de crecimiento en el establecimiento de plántulas de las especies de *Lupinus* en estudio.

Hipótesis

El tratamiento con ácido sulfúrico a las semillas de las especies silvestre en estudio incrementará la germinación *in vitro*, la cual dependerá de la composición del medio de cultivo y de la especie. Con los resultados obtenidos se podrá establecer un protocolo para la propagación masiva de las diferentes especies de *Lupinus* en estudio.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El género *Lupinus*

El nombre de este género es una derivación de la palabra en latín "lupus", que significa lobo. Según Aguilera y Trier (1978), esto se debe a que en los lugares donde existían los cultivares silvestres de lupinos, se tenían a los lobos como compañía. Los mismos autores mencionan que, el cultivo del *lupino* se encontró a principios de la era cristiana. En la agricultura romana, el cultivo de *Lupinus albus* estaba bien establecido e incluso ya había sido cultivado en Grecia desde varios siglos antes. La planta pudo llegar a ser conocida en Egipto y en Mesopotamia desde mucho tiempo antes que los romanos y los griegos; estos últimos llamaban a la planta "thermos", cuyo nombre varía a través de toda el área del Mediterráneo. Su significado y el resto de nombres que recibe parece tener el mismo origen: termis (Egipto), turmus (Arabia), altramuz (España) turmusa (Siria y Palestina) (Aguilera y Trier, 1978). Por lo anterior, se puede decir que esta especie fue cultivada y usada primeramente por los griegos. Dentro de los nombres comunes que tienen las especies de *Lupinus* se encuentran chocho, alverjilla (Colombia, Ecuador y Norte de Perú), Tarwi (Centro del Perú- Lengua Quechua), Tauri (Perú- Bolivia), Lengua Aymara) Altramuz, tremococo o termis en Europa, Pearl Lupin en Inglaterra, (Barney, 2011) mazorquilla, alfalfilla, flor de San Juan y flor de San Pedro en México (Pablo-Pérez *et al.*, 2013).

Putnam (1991), menciona que el mayor suceso de la historia para el desarrollo moderno de lupino es haber introducido en los años sesentas y setentas a Australia, el lupino azul o de hoja angosta (*Lupinus angustifolius*), que es una de las especies más resistentes a las sequías y es utilizada ampliamente en alimentación animal como una legumbre en rotación con trigo.

Autores como Dunn (2001) refiere que existen alrededor de 500 especies que han sido descritas mundialmente, sin embargo, pocas han sido caracterizadas. En el viejo mundo, entre las especies silvestres se encuentran: *Lupinus consentinii*, *Lupinus*

atlanticus, *Lupinus pilosus*, *Lupinus micranthus*, *Lupinus hispanicus*, *Lupinus paestinus*, *Lupinus digitatus*, *Lupinus princei*, *Lupinus somaliensis*.

Por otra parte, Mujica *et al.* (2002) describe que 13 especies son originarias de la región Mediterránea y Norte de África, 10 de ellas son silvestres y tres domesticadas las cuales son: *Lupinus albus* (lupino blanco, llamado así por el color de su flor), *Lupinus angustifolius* (lupino de hoja angosta) y *Lupinus luteus* (lupino amarillo). Mientras que, Clements *et al.* (2005) señala que en diferentes partes del mundo desde hace varios años, se cultivan cuatro especies (*Lupinus albus* L.; *Lupinus angustifolius* L.; *Lupinus luteus* L. y *Lupinus mutabilis* Sweet) debido a que las semillas representan una fuente importante de proteínas para alimentación humana y animal.

Por otro lado, Eastwood *et al.* (2008) señalan que el género *Lupinus* incluye más de 600 especies nombradas, pero solo hay cerca de 300 reconocidas como tales. Además, autores como Zamora y Terrazas (2012) mencionan que como muchas otras leguminosas, las especies del género *Lupinus* desempeñan un papel ecológico importante por la fijación biológica del nitrógeno que realizan; entre 197 y 282 kg N ha⁻¹ dds para *L. angustifolius* y *L. albus* respectivamente (Barrientos *et al.*, 2002).

2.2. Distribución mundial del género *Lupinus*

El género *Lupinus* se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo en latitudes de 65 °N (Islandia) a 42 °S (Chile y Nueva Zelanda), longitud (76° 3' 57" W) a nivel del mar (Australia) a 3,800 m (Bolivia) (Baylis y Hamblin, 1986), en países del Mediterráneo y en América.

De igual manera los encontramos en las tierras altas de los andes en Perú y regiones vecinas, en Brasil, Uruguay y Argentina. Unas cuantas especies se encuentran en el este y sureste de las costas de Estados Unidos, así como en la región del

Mediterráneo, incluyendo Grecia, Turquía, España y Portugal; también existen en tierras montañosas tropicales de África (Gladstone, 1974; McVaugh, 1987).

De las aproximadamente 500 especies de *Lupinus* existentes en el mundo, sólo 12 se encuentran en el viejo mundo, desde los alrededores del mediterráneo hasta el este de África, la mayor parte del resto se distribuyen en el continente americano (Dunn, 2001). El mismo autor, refiere que se conocen dos regiones principales de distribución: la región del Mediterráneo incluyendo Grecia, Turquía, España y Portugal y las que existen en tierras montañosas tropicales de África.

En el Nuevo Mundo, los lupinos se localizan desde Alaska hasta Argentina, donde se encuentran el mayor número de especies, con dos centros principales de diversidad: uno en el oeste de Norte América (100 especies) y otro en la cordillera de los Andes (85 especies) en las zonas altas de Bolivia, Perú (se localiza principalmente en ecosistemas de alta montaña y páramos de 2000 hasta 4500 msnm) (Barney, 2011), Ecuador, Venezuela y un poco en el sur de Colombia, todas silvestres con excepción de *L. mutabilis* que ha sido domesticado desde el imperio Inca y utilizado para la alimentación animal y humana, donde tuvo una importancia relevante reflejada en los vestigios de las tumbas y en dibujos en cerámicas (Barney, 2011). Durante la existencia del imperio Inca, ésta planta alcanzó su último y mayor auge, en donde el cultivo se expandió desde Venezuela hasta el norte de Argentina. Actualmente todavía se encuentran parcelas de *L. mutabilis* conocido con el nombre de "chocho" (español) o "tarwi" (aymara), éstas existen entre los 2500 a 4000 msnm, o de manera silvestre en las orillas de los caminos (Barney, 2011).

En México, las poblaciones naturales de *Lupinus* crecen en caminos, laderas de cerros, en bosques degradados y en ecosistemas naturales a altitudes que van desde el nivel del mar hasta más de 4000 m. Geográficamente se distribuyen desde Baja California hasta Tamaulipas y al sur hasta Chiapas. No obstante, la mayor concentración de especies se registra en la Sierra Madre Occidental y el Eje Neovolcánico Transversal (Ruiz-Moreno *et al.*, 2000). El cual, es considerado como un centro secundario de

diversificación de este género (Dunn, 1984; Cuanalo *et al.*, 1989; Planchuelo, 1996; Bermúdez-Torres *et al.*, 2000; Ruiz-López *et al.*, 2000; Ruiz-Moreno y Zamora -Natera, 2006; Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012), en donde se han encontrado *Lupinus montanus* Kunth, *Lupinus leptophyllus* Schltl y Cham., *Lupinus versicolor* Steud., *Lupinus potosinus* Rose y *Lupinus uncinatus* Schltl que crecen de manera natural a partir de los 1300 msnm (Alderete-Chávez *et al.*, 2008; Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012) (Figura 1).



Figura 1. Distribución del género *Lupinus* en México (Fuente: Revisión herbario Bermúdez-Torres, 2013).

Algunos autores mencionan que existen alrededor de 80 especies de *Lupinus* silvestres (McVaugh, 1987; Rzedowski y Rzedowski, 2001). Mientras que, Bermúdez-Torres *et al.* (2002) refiere que en México se han registrado más de 100 especies de *Lupinus* que se distribuyen ampliamente en zonas templadas y frías y a veces en regiones muy húmedas o secas.

Villaseñor y Espinosa (1998) señalan que en el Parque Nacional Pico de Orizaba, *L. montanus* es una de las especies dominantes del estrato herbáceo junto con *L. leptophyllus* y *L. campestris* Cham. y Schltldl. Por otro lado, en Jalisco se mencionan alrededor de 15 especies de *Lupinus* distribuidos en su mayoría en las zonas montañosas del estado, con mayor incidencia en el nevado de Colima, Lagos de Moreno, Sierra de Quila, la Sierra de los Huicholes que forman parte de la Sierra Madre Occidental, las Sierras de Talpa y Tapalpa en el Eje Neovolcánico Transversal, en altitudes que van desde los 1500 msnm (*L. exaltatus*) a los 4 200 msnm (*L. aschenbornii*) localizadas en los municipios de Tapalpa y Chiquilistlán (Sierra de Halo), Mezquitic (San Juan Peyotán y San Andrés Cohamiata), Tequila (Volcán de Tequila), Mascota (Cerro del Molcajete y Lago de Juanacatlán), Autlán (Sierra de Manatlán), San Martín de bolaños (San Miguel de la Sierra), Mazamitla (Sierra del Tigre), Cuquío (cerca del Río Agua Caliente), Jocotepec (Sierra de Tecuán), Tonila (Volcán de Fuego), Talpa (Cumbre del Cerro Tejamanil y Sierra de la Campana), ciudad Guzmán y Ojuelos (McVaugh, 1987). El mismo autor menciona que la especie *L. mexicanus*, tiene amplia distribución, es de fácil adaptación a hábitats perturbados y malezas. Además, se localiza a lo largo de carreteras o sobre las zonas cultivadas desde 1 300 a 1800 hasta 2 200 msnm en la Meseta Central y en la cuenca alta del Río Santiago. Su floración se presenta en Mayo hasta Noviembre.

Por otra parte, Villavicencio *et al.* (1998), indican la existencia de quince especies del género *Lupinus* en el estado de Hidalgo. Mientras que, en el estado de Morelos, Jiménez-Martínez *et al.* (2001) y Rodríguez-Ambríz *et al.* (2005) señalan la presencia de *L. campestris*. Autores como, Bermúdez-Torres *et al.* (2009) mencionan la presencia de *L. montanus* H.B.K, *L. stipulatus* J. Agardh., y *L. aschenbornii* Schauer en las montañas del Popocatepetl e Iztaccíhuatl.

2.3. Composición química del género *Lupinus*

En los últimos años ha crecido el interés en las especies de *Lupinus*, ya que se relacionan, no sólo con un alto contenido de proteína en las semillas, sino también con numerosos metabolitos secundarios: alcaloides, oligosacáridos de la familia de la rafinosa (ORP), compuestos fenólicos y otros (Sujak *et al.*, 2006; Gulewicz *et al.*, 2008). En estos estudios se destaca la importancia de estas especies por su contenido de metabolitos secundarios, principalmente los flavonoides y alcaloides quinolizidínicos, que han sido objeto de estudio por sus aplicaciones farmacológicas y agrícola (García *et al.*, 2004; Przybylak *et al.*, 2005). Las especies encontradas en México contienen entre 1.5 a 2.5 % de alcaloides en sus semillas (Pablo-Pérez *et al.*, 2013). Estas sustancias les confieren un sabor amargo, su presencia es mayor en las especies silvestres, que son consideradas tóxicas (Pablo-Pérez *et al.*, 2013) pero que protegen a la planta en el medio del ataque de depredadores e impiden que la semilla sin tratamiento pueda ser aprovechada para su consumo.

Según, Rodríguez-Ambríz *et al.* (2005) diversos estudios indican que el contenido y calidad de la proteína de especies mexicanas de *Lupinus*, como la de *L. campestris*, es adecuada para su utilización en la alimentación humana. Por otro lado, autores como Pablo-Pérez *et al.* (2013) señalan en un estudio realizado en el género *Lupinus* que las especies mexicanas tienen un alto contenido de proteínas (30-49%). Algunas especies de éste género (*L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, y *L. mutabilis* Sweet) han sido domesticadas, mejoradas y disminuido su contenido de alcaloides en las semillas, en Australia, Europa (Polonia, Alemania, Francia) y Sudamérica (Chile y Ecuador) para su uso en la alimentación humana y animal (FAO, 2010).

2.4. Clasificación taxonómica y botánica

La taxonomía de *Lupinus* ha sido y es aun notoriamente problemática, debido principalmente a la proliferación de especies, pero no se sabe si son especies

diferentes o ecotipos mostrados por la gran variedad de microambientes a los que se ha visto sometido (Smith, 1938-1952).

Por otro lado, Takhtajan (2009) clasificó al género *Lupinus* de la siguiente manera:

División: Magnoliophyta (Angiospermae)

Clase Magnoliopsida (Dicotyledone)

Subclase: Rosidae

Superorden: Fabanae

Orden: Fabales

Familia: Leguminosae (Fabaceae)

Subfamilia: Papilionoideae

Tribu: Genisteae

Género: *Lupinus*

Autores como, Wink *et al.* (1995) y Kass y Wink (1997) han realizado investigaciones con el empleo de datos serológicos y la secuenciación de los genes, RbcL e ITS, lo que ha permitido la clasificación como taxón monofilético, dándole las características propias del género *Lupinus*. Autores como Pascual (2004) menciona que aunque se han hecho trabajos con los más sofisticados métodos aún persisten problemas para la determinación y se están descubriendo nuevas especies, aun en Europa (Fernández-Pascual, 2007; Eastwood y Hughes, 2008).

2.5. Descripción morfológica de especies del género *Lupinus*

Las especies mediterráneas cultivadas son todas anuales, herbáceas, con hojas compuestas, flores con variados colores, desde el blanco, azul hasta el amarillo en *L. luteus*, autógamas, pero pueden cruzarse en un porcentaje variable. Las semillas son grandes (>60 mg) divididas en lisas y rugosas según la especie (Plitmann y Heyn, 1984) y con variado número de cromosomas (32-50).

El género incluye hierbas anuales, perennes, arbustos, e inclusive se conoce una especie arbórea (*Lupinus jaimehintoniana*) que alcanza los ocho metros de altura (Turner, 1995). Por lo general, posee hojas palmati-compuestas de 5 a 17 folíolos simples, pero también algunas especies tienen hojas simples; estipuladas adnadas en la base de los pecíolos con dos puntas libres; brácteas florales usualmente deciduas en anthesis; adnadas a la base del cáliz; el cáliz profundamente hendido; flores en racimos dispuestas en verticilos por lo regular azules, morados o violáceas, raramente blancas o amarillas; semillas compresas o en la mayoría obovoides (McVaugh, 1987).

Mientras que, Barney (2011) sugiere que las especies americanas silvestres son comúnmente herbáceas erectas y de hábitos rastreros, postrados, semipostrados, más raramente leñosas (árboles de 4 m de altura). Las hojas de diferentes tamaños y las flores con colores que van desde el azul violeta al rosado, naranja, hasta el amarillo y blanco. Las vainas en grupos y de distintos tamaños, dehiscentes. Semillas rugosas o lisas, de colores café o blanco, de tamaños variables.

Zamora y Terrazas (2012) refieren la anatomía foliar y del pecíolo de *L. aschenbornii* Schauer, *L. exaltatus* Zucc., *L. montanus* Kunth y *L. reflexus* Rose, y señalan que estas especies comparten la epidermis papilosa de paredes anticlinales con diferentes grados de ondulación, estomas anomocíticos, tricomas simples lineares y mesófilo bifacial. Los folíolos de *L. montanus* son glabros en la superficie abaxial, las estrías cuticulares sobre las células localizadas en la base de los tricomas es un rasgo característico de *L. montanus* y de *L. reflexus*. Las diferencias encontradas en espesor de la lámina y del mesófilo así como la abundancia de ceras epicuticulares pueden estar influenciadas por el ambiente. Distintivamente, el número y distribución de haces vasculares en los pecíolos difieren entre las cuatro especies y podrían ser de utilidad para diferenciarlas si estos resultados se confirman al estudiar un mayor número de especies de *Lupinus*.

2.6. Descripción morfológica de las especies de la región Centro Oriental del Estado de Puebla, México

Lupinus campestris se localiza entre 2 615 a 2 778 msnm, las poblaciones se encuentran asociadas a *Juniperus deppeana*, *Pinus patula*, *Pseudotsuga* spp., *Pinus montezumae* Lamb., y *Abies religiosa* (Kunth) Schltld. y Cham, en bordes de terrenos cultivados con maíz hasta altitudes de 3 052 msnm. Éstas presentan una altura promedio de planta de 0.5, 0.6 y 0.8 m respectivamente; además, de tallos sólidos, estípulas de 5 a 12 mm de largo, peciolo de 4 a 8 cm de largo y 4.5 a 8 foliolos por hoja. Se localizan en suelos con pH ácido a neutro (5.5 a 7.1) (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012).

Lupinus exaltatus se encuentra ubicado a partir de los 2 778 a 2 785 msnm, en suelos con pH ácido y asociadas a bosques de *Pinus montezumae* con pastizal de *Muhlenbergia* sp., en el sotobosque. Presentan una altura de planta de 0.3 a 1.0 m, estípulas pequeñas, unidas ligeramente en la base de los peciolo, tallos huecos, inflorescencias de 1.5 a 13 cm de largo, 4 a 7 foliolos por hoja, largo promedio de foliolos de 2.7, 3.8 y 4.0 cm y ancho promedio de foliolos de 0.9, 1.1 y 1.1 cm, vainas de 1.6 a 5 cm de largo y de 0.8 a 1.1 cm de ancho (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012).

Lupinus montanus presenta plantas con alturas que van de 1.2 a 2.4 m, diámetro del tallo principal de 9 a 35 mm, largo de inflorescencias de 7 a 35 cm, de 10.5 a 15 foliolos por hoja, largo y ancho de foliolos de 3.5 a 9.1 cm y de 0.5 a 1.3 cm respectivamente, estípulas grandes, envainantes y unidas en la base. Estas poblaciones se encuentran en bosques de *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii*, en altitudes de 3 080 a 3 275 m. Otros rodales de *L. montanus* se observan, a altitudes superiores a los 3 400 m, en suelos con pH ácido (4.9) y asociadas a bosque de *Pinus montezumae* con pastizal de *Muhlenbergia* sp., en el sotobosque y también se observaron en presencia de *Pinus rudis* (Endl.) y *A. religiosa* (Dunn, 2001; Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012).

2.7. Importancia económica y producción mundial

De acuerdo a DIG (2001), en la década de 1930 se desarrolló en Alemania las primeras selecciones de lupino dulce, libres de alcaloides, y que pueden ser consumidos directamente por el ser humano y los animales. Hoy estos lupinos son producidos como forraje o leguminosa de grano principalmente en la ex Unión Soviética, Polonia, Alemania y el Mediterráneo, además de producirse como “rubro exportable” en Australia, para ser vendido al mercado europeo y asiático principalmente. La producción y el comercio mundial se concentra actualmente en este tipo de lupino, pero existe además una proporción muy inferior, aunque nada despreciable, de producción de lupino amargo (con alto contenido de alcaloides), mayoritariamente en países del Mediterráneo, norte de África y Australia, los que son a su vez los principales actores del comercio internacional de este tipo de producto (unos como importadores y, en el caso de Australia, como exportador).

Existen más de trescientas especies de *Lupinus*, de los que sólo cinco son cultivadas (Glencross *et al.*, 2004) y de estas, sólo tres especies son explotadas comercialmente; lupino blanco (*L. albus*), lupino dulce o de hoja angosta (*L. angustifolius*) y lupino amarillo (*L. luteus*). El *L. angustifolius* domina la producción mundial y mayoritariamente es producido en climas mediterráneos y en el sur de Australia Occidental.

El mercado mundial de lupino está ampliamente dominado por la producción de Australia. En los últimos diez años este país ha aportado alrededor de 85% del lupino producido en todo el mundo. Después de Australia, la Unión Europea (27 países), como conjunto, ocupa el segundo lugar, promediando una producción de más de 65 mil toneladas en los diez últimos años. Esta cifra equivale, aproximadamente, al 5% de la producción mundial. A continuación, con una participación algo menos significativa, se ubican Bielorrusia, Chile y la Federación Rusa, que también resaltan como productores de esta leguminosa. En Australia se ha previsto que el área sembrada con lupino aumentará a cerca de 1 millón de hectáreas, tal como en la década de los noventa. Si sigue mejorando la productividad, a través de variedades más rendidoras y mejor

manejo, se proyecta que hacia 2011-12 la producción de lupino llegará a 1.2 millones de toneladas, presentando un 8% de incremento respecto a la situación previa a la sequía que hubo en 2006-2007 (Agüero, 2008).

2.8. Concepto de latencia

La función de una semilla es establecer una planta nueva, pero esto solo sucede una vez, porque la finalización de la germinación es un proceso irreversible. Las plantas han evolucionado el mecanismo de latencia para optimizar el tiempo de germinación (Foley, 2001) por lo tanto, la latencia de las semillas es una adaptación fisiológica a la heterogeneidad ambiental, es un factor primario que influye en la dinámica natural de las poblaciones (Bewley *et al.*, 2013). Proporciona una estrategia a las semillas para extender la germinación en el tiempo para reducir el riesgo de que la planta muera y la posible extinción de la especie en un ambiente desfavorable. La latencia ocurre por tres vías: 1) las semillas son dispersadas de la planta madre con diferentes grados de latencia. Frecuentemente la variación en la latencia es reflejada por la apariencia de las semillas o unidades de dispersión en términos de color, tamaño y grosor de la testa. 2) el rompimiento de la latencia a través de factores ambientales. 3) la dispersión a través de los animales, el aire o el agua (Bewley *et al.*, 2013). También hay heterogeneidad de latencia entre semillas a nivel de planta individual (Matilla *et al.*, 2005) dependiendo de la edad y el estado nutricional de la planta madre durante la maduración de las semillas, la posición de la semilla en la planta madre, tamaño y forma de la semilla, el tiempo de la semilla hasta la cosecha y la duración del almacenamiento de la semilla (Probert, 2000). A pesar de toda esta variación, la latencia de la semilla tiene claras bases genéticas (Graeber *et al.*, 2012.). Existen varias clases de latencia. La latencia morfológica que se refiere a las semillas que tienen un embrión subdesarrollado y requieren mayor tiempo para germinar y crecer. La latencia fisiológica, la más prevalente forma de latencia, parece estar involucrada ampliamente con el metabolismo del ácido abscísico (ABA) y las giberilinas (GAs). Además, existe una combinación de latencia morfofisiológica. Por el contrario, la latencia mediada por las

hormonas encontradas en las semillas y extensivamente estudiada en *Arabidopsis* o cereales, podría limitar el conocimiento de la regulación de la latencia fisiológica, la cual involucra el desarrollo de una capa o testa impermeable al agua (Baskin y Baskin, 2000). Este tipo de latencia se ha encontrado como mínimo en 17 familias de plantas, incluidas familias agronómicas importantes como las Fabaceae, Malvaceae, Cannaceae, Geraniaceae y Convolvulaceae (Baskin y Baskin, 2000) y se encuentra presente en progenitores de leguminosas cultivadas (Abbo *et al.*, 2014).

2.9. Propagación por métodos tradicionales

2.9.1. Propagación sexual

La multiplicación o reproducción sexual se realiza a través de semillas, que provienen de la unión de gametos, por ello en la descendencia hay variabilidad genética. La propagación naturalmente se realiza por semilla, éstas tienen la capacidad de evolución, los cuales le ha permitido adaptarse a cambios ambientales y colonizar áreas originalmente hostiles. Otra ventaja de la reproducción sexual es la capacidad del embrión de permanecer inactivo en condiciones difíciles, como en el caso de sequía, retrasando la germinación hasta que las condiciones sean favorables. Las plantas que provienen de semilla poseen un sistema radical profundo (Hartmann y Kester, 1998).

La principal forma de propagación de las leguminosas es por semillas; sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, muchas semillas viables son incapaces de germinar inmediatamente después de madurar, aunque se les coloque en condiciones favorables, característica denominada latencia o germinación diferida, y una de las causas es la impermeabilidad del tegumento (Corral *et al.*, 1990). Aparentemente la latencia es un mecanismo de supervivencia ante la presencia de determinadas condiciones climáticas: temperaturas muy bajas, alternancias de épocas secas y húmedas y climas desérticos. Además, la propagación sexual presenta una fase juvenil larga, heterogeneidad y morfología amorfa (la semilla guarda variabilidad genética) (Cruz y Takaki, 1983).

2.9.2. Propagación asexual

La propagación asexual, agámica o vegetativa, es la obtención de ejemplares a partir de una porción del vegetal o planta madre, se trate ésta de tallo, hoja o raíz. Esto es posible porque las células tienen toda la información genética necesaria para regenerar el organismo completo (totipotencia) idéntico a la planta madre que le dio origen (Hartmann y Kester, 1998).

2.9.2.1. Propagación por cultivo *in vitro*

Dentro de la propagación clonal a través del cultivo de tejidos existen dos vías alternativas por las cuales un explante puede regenerar en una planta: la organogénesis y la embriogénesis somática. En el primer caso, brotes y raíces se forman secuencialmente en respuesta a condiciones apropiadas de cultivo según el tipo y la concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Esta vía se caracteriza por la presencia de conexión vascular entre el tejido madre y la sección regenerada (Harada y Kwong, 2003). Por otra parte, la embriogénesis somática puede ser descrita como el proceso por el cual células somáticas haploides o diploides desarrollan en estructuras bipolares sin conexión vascular con el tejido materno, a través de una serie ordenada de etapas características sin la fusión de gametos (Fehér, 2006).

2.9.2.1.1. Organogénesis

La micropropagación masiva de clones puede obtenerse vía organogénesis directa, es decir, a partir de meristemo o yema aislada de un vástago. Esta vía aporta estabilidad genética o ausencia de mutaciones, y también plantas libres de virus (saneamiento). La vía indirecta o callo, consiste en regenerar plantas a partir de células desorganizadas y diferenciadas. Sin embargo, la vía "callo" se utiliza para obtener variantes somaclonales y mutantes, entre otros (Gautheret, 1983).

Ball (1946) fue el pionero de la multiplicación vegetativa *in vitro* de plantas enteras a partir de meristemas apicales de vástagos de *Tropaeolum majus* y de *Lupinus albus* L. El mismo autor, en 1960 experimentó con el cultivo de meristemas apicales de *Lupinus albus* L. en un medio que contenía aminoácidos, leche de coco, ácido giberélico y vitaminas y observó sólo una pequeña elongación del meristemo. Al repetir el experimento, dejó algunos primordios de hoja a los meristemas y obtuvo plantas completas.

Según, Wetmore (1954) un balance adecuado de auxinas y citoquininas *in vitro* induce la formación de yemas y/o raíces, dependiendo de la concentración de ambas y de la especie en que esté actuando, lo que implica que las hojas jóvenes son capaces de producir las auxinas necesarias para el desarrollo adicional de la raíz y que cuando maduran sintetizan citoquininas que promueven la formación de brotes, ya sean primordios y hojas o yemas laterales (la principal fuente de citoquininas son las raíces).

En 1990, Sator realizó un estudio con cuatro especies de *Lupinus* donde utilizó el medio de cultivo MS adicionado con 2 mg L de Benciladenina (BA) y 0.2 mg L de Ácido Naftalen Acético (ANA) y logró la inducción de callos en las diferentes partes de la planta empleadas como explantes (hoja, hipocótilo y raíz) en todas las especies estudiadas. Para la regeneración de plantas el autor utilizó el medio de cultivo MS suplementado con 2 mg L de BA más 2 mg L de Ácido Indol Acético (AIA) que nombró D1 y otro medio de cultivo MS adicionado con 2 mg L de BA más 0.2 mg L de AIA denominado D2 y obtuvo la diferenciación de plantas a partir de hoja, pecíolo e hipocótilo.

Por otro lado, Sroga (1987) obtuvo la regeneración de plantas de dos especies de *Lupinus* (*L. angustifolius* y *L. polyphyllus*) cuando utilizó un medio de cultivo modificado Lindsmaier y Skoog (LS) suplementado con 0.54 μ M de ANA y 4.40 μ M de BA y para el enraizamiento empleó solamente ANA.

Por otra parte, Bansal y Pandey (1993) establecieron un modelo de regeneración al obtener dos tipos de brotes a partir de explantes de *Sesbania aculeata* (Leguminosa), con diferentes concentraciones de auxina o auxina y citocinina. Mientras que, Harzic *et al.* (1998) desarrollaron una metodología para la formación de brotes de *Lupinus albus* a partir de nudos cotiledonares. Otros autores como, Rybczynski y Podyma (1993) en estudios realizados en diferentes especies de *Lupinus* (*L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius*, *L. hispanicus* y *L. polyphyllus*) obtuvieron un gran número de brotes con el empleo de medio de cultivo B5 solidificado con Gelrite y suplementado con diferentes concentraciones y combinaciones de BA y ANA a partir de nudos cotiledonares.

Otros autores como, Pniewski *et al.* (2002) obtuvieron la regeneración *in vitro* de cuatro especies de *Lupinus* vía inducción de yemas axilares. Las plántulas fueron regeneradas en un medio de cultivo MS con los macronutrientes a la mitad, micronutrientes completos, vitaminas MS y diversas concentraciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP). El mayor índice de multiplicación lo alcanzaron en *L. mutabilis* y *L. luteus*.

2.9.2.1.2. Embriogénesis somática

Las primeras investigaciones de la embriogénesis somática fueron realizadas por Waris en 1957 en *Oenanthe aquatica* (Simola, 2000), seguidas por las realizadas en zanahoria (*Daucus carota* L.) por Reinert (1958) y Steward *et al.* (1958).

La inducción del crecimiento embriogénico parece ocurrir en una de dos vías. Los embriones somáticos se pueden formar directamente sobre la superficie de un tejido organizado como una hoja, segmento de tallo, embriones cigóticos, protoplastos, microsporas (es decir, implica la existencia de células somáticas predeterminadas que necesitan las condiciones permisibles para expresarse). Ellas también se pueden formar indirectamente vía una fase de callos (en estos casos se requiere de la utilización de un medio de cultivo complejo, incluyendo factores adicionales para inducir

la desdiferenciación y reiniciación de la división celular de células ya diferenciadas antes que ellas puedan expresar su competencia embriogénica) (Jiménez, 2001).

2.10. Factores que afectan los procesos morfogénicos

Los cuatro principales factores que condicionan la obtención y el crecimiento de nuevos órganos *in vitro* son:

El genotipo, el cual es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos, desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* a la proliferación de callo o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos.

Las condiciones químicas seleccionadas para realizar el cultivo

Las condiciones físicas seleccionadas para realizar el cultivo

El explante, los procesos morfogénicos dependen del genotipo pero a esto debe sumarse el efecto del explante seleccionado. El tratamiento de la planta madre, las condiciones físicas y fisiológicas en las que ésta se encuentre y el sector del cual se tome el explante determinará a su vez la respuesta morfogénica en condiciones *in vitro*

Varios son los compuestos químicos que influyen en los patrones morfogénicos *in vitro* dentro de los cuales se pueden considerar:

La composición salina del medio de cultivo. La composición salina más empleada para inducir la formación de callo, la organogénesis directa o indirecta en la mayoría de las especies vegetales es la de Murashige y Skoog (1962) (MS).

Reguladores del crecimiento. Estos compuestos pueden promover la morfogénesis aun cuando la concentración salina no sea la adecuada. En condiciones óptimas de cultivo pueden aumentar significativamente la diferenciación de órganos.

Carbón activado. En general se utiliza para absorber compuestos tóxicos de la micro atmósfera gaseosa o el exceso de reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo.

Agar. Otro aspecto que debe tomarse en cuenta es la consistencia del medio de cultivo. Puede emplearse como semi sólido y líquido. El agente gelificante más empleado en el cultivo *in vitro* es el agar.

Atmósfera gaseosa. Está condicionada por el tipo y tamaño del envase seleccionado para el cultivo, así como también por el sistema de cobertura del mismo. En general se necesita una buena aireación para obtener cualquier tipo de proceso morfogénico.

Entre las condiciones físicas se pueden mencionar los efectos de la temperatura, la humedad relativa y la luz.

La temperatura de incubación es un factor importante. Si bien en condiciones naturales las plantas experimentan diferencias térmicas durante el día y la noche, las temperaturas *in vitro* se mantienen casi estables.

La humedad relativa (HR) dependerá del sello o cobertura del envase empleado. Si este cierre es hermético, la humedad interior será del 100%. Si en cambio existe la posibilidad de un intercambio gaseoso la humedad interna puede descender a niveles cercanos al 50%.

La luz suministrada a los cultivos debe ser evaluada en cuanto a la calidad, intensidad y período de suministro. La respuesta morfogénica de un explante puede variar según si se le proporciona luz o no (Mroginski *et al.*, 2011; Radice, 2011).

Las especies del género *Lupinus*, no están lo suficientemente estudiadas en México, estudios realizados de este género sobre la propagación por cultivo *in vitro* son escasos, por ello los resultados obtenidos en la presente investigación al obtener datos experimentales sobre la micropropagación de tres especies (*L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus*) representaría una contribución importante al conocimiento del género y sobre todo en la comprensión de la propagación mediante el cultivo de tejidos *in vitro*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Sitios de colecta del material vegetal

En agosto de 2012 y septiembre de 2013 se colectaron vainas maduras y secas de tres variedades de *Lupinus* (*L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus*) en la región de los Valles de Libres y de Serdán, Puebla (Figura 2).

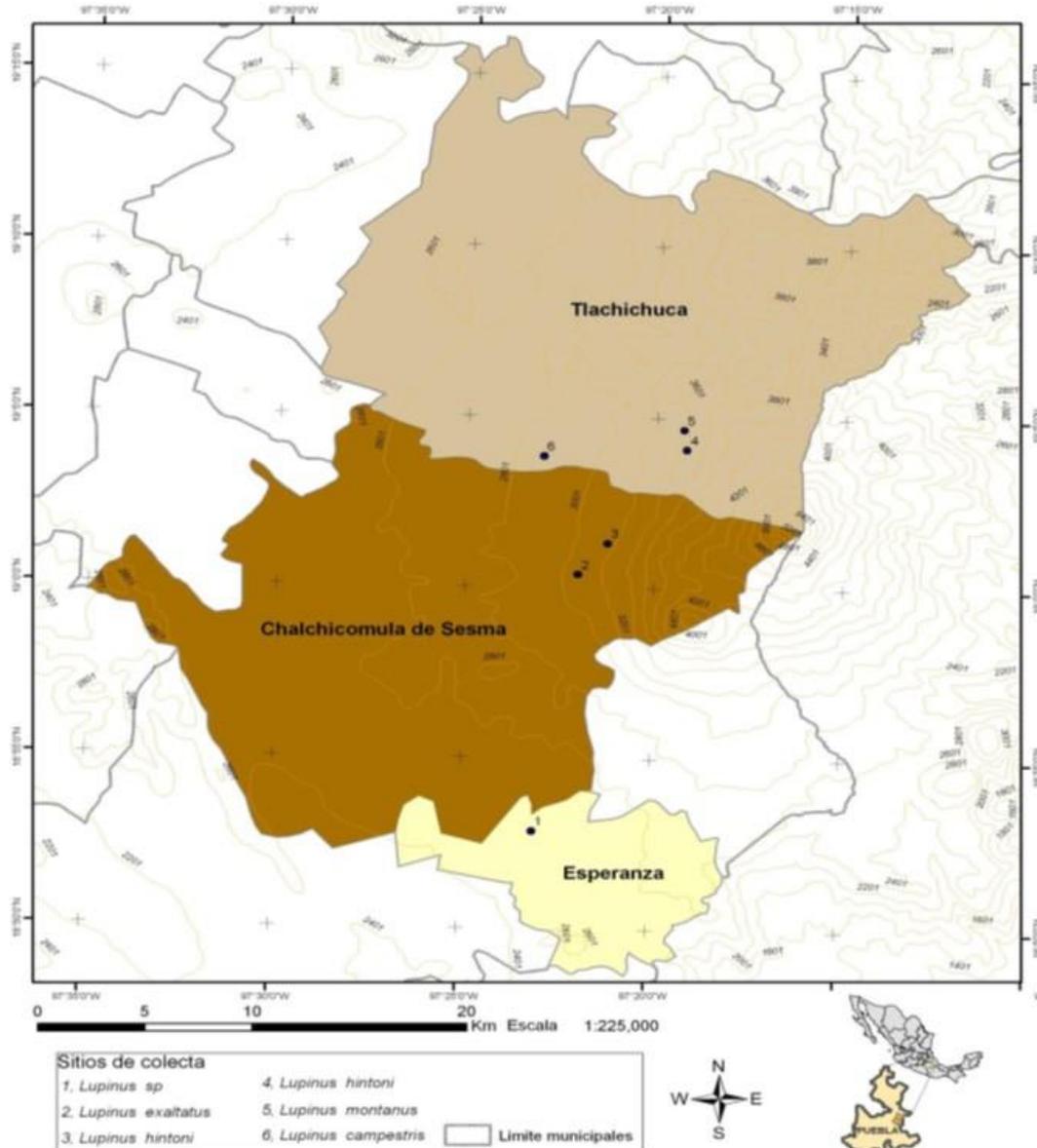


Figura 2. Localización de los sitios de recolecta de *Lupinus* spp., en la región de los Valles de Libres y Serdán, Puebla (Fuente: Pablo-Pérez *et al.*, 2013).

Estos municipios presentan un clima templado subhúmedo, con una temperatura media de entre 12°C a 18°C con una precipitación media anual que varía de 400 a 600 mm. Los sitios de recolección del material vegetal se ubicaron en los municipios de Tlachichuca y Chalchicomula de Sesma del Estado de Puebla (Cuadro 1).

Cuadro 1. Sitios de recolección del material vegetal

Especie	Localidad (municipio)	Ubicación	Altitud (msnm)
<i>L. campestris</i>	Tlachichuca	19°03' N: 97°23' W	2 866
<i>L. exaltatus</i>	Chalchicomula de Sesma	19°00' N: 97°22' W	3 066
<i>L. montanus</i>	Tlachichuca	19°04' N: 97°19' W	3 442

3.2. Localización del sitio de estudio

La presente investigación se realizó durante el período comprendido entre enero de 2013 a octubre de 2014 en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, el cual se encuentra ubicado en el Periférico Carlos A. Molina s/n, colonia Río Seco y Montaña perteneciente al municipio de Cárdenas, Tabasco, México (Figura 3).

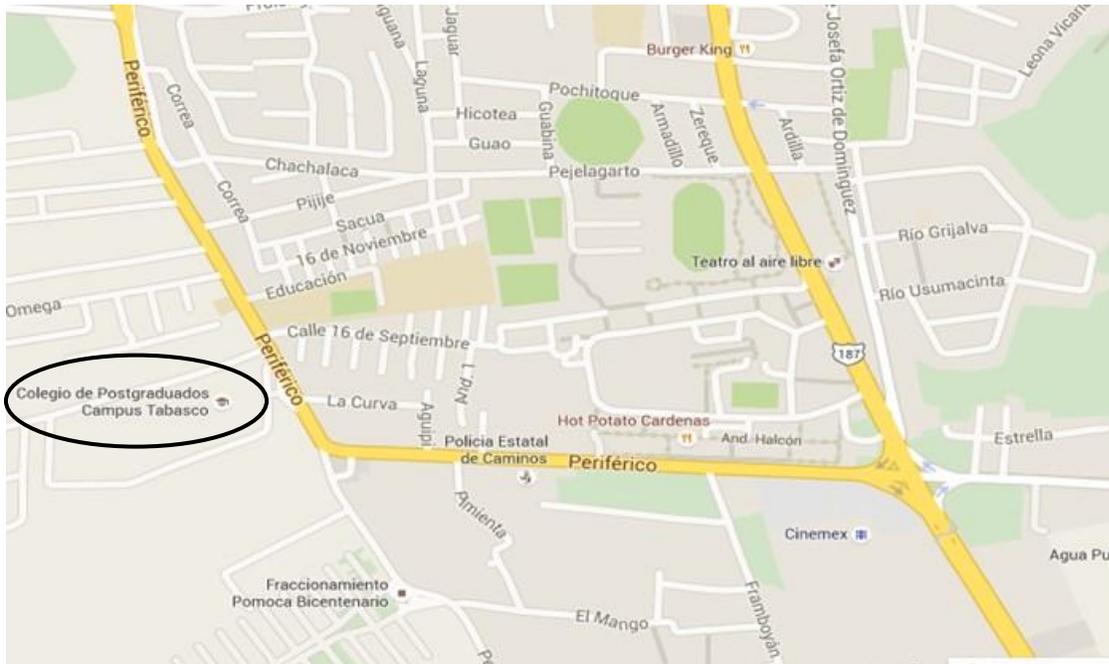


Figura 3. Localización del laboratorio de Cultivo de Tejidos del Campus Tabasco del Colegio de Postgraduados ubicado en el municipio de Cárdenas, Tabasco, México.

3.3. Procedimientos generales

Los medios de cultivo utilizados se especifican en cada experimento. Se dosificaron 30 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio con una capacidad total de 250 mL y 10 mL de medio de cultivo en tubos de ensayo con capacidad de 100 mL. El pH fue ajustado antes de la esterilización a 5.8 con soluciones de NaOH y HCl (0,1N). Como agente gelificante se utilizó el Agar Agar® (Sigma) a razón de 5.0 g L⁻¹. La esterilización se realizó en autoclave a una temperatura de 121°C y 1.2 kg cm⁻² de presión, durante 15 minutos.

Los experimentos de germinación y las plántulas obtenidas *in vitro* para el establecimiento del cultivo, de tres especies de *Lupinus*; se realizaron en la cámara de

crecimiento marca ThermoScientific (Estados Unidos de Norteamérica), la cual se programó a una temperatura constante de 20 °C/15°C y con un fotoperiodo de 14 h luz y 10 h oscuridad.

3.4. Procesamiento estadístico

En todos los experimentos evaluados a los datos obtenidos se les realizaron las comprobaciones de los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza (Lindman, 1974). Para el procesamiento estadístico de los datos experimentales, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple y factorial. En cada experimento se detallan las pruebas realizadas.

El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó con la ayuda de los paquetes computacionales SAS versión 9.0 para sistema operativo Windows de Microsoft®.

3.5. Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H₂SO₄) sobre la escarificación y germinación *in vitro* de semillas de *L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus*.

Este experimento se realizó para escarificar las semillas de *L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus*, colectadas en agosto de 2012, con ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 98% a diferentes tiempos de inmersión (20, 30 y 40 min). Después de escarificadas las semillas se colocaron en el medio de cultivo basal (MS) propuesto por Murashige y Skoog (1962) que contenía los macronutrientes y los micronutrientes completos. Se adicionaron 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa. El pH se ajustó a 5.8. Los experimentos se repitieron tres veces.

Se utilizaron como explantes iniciales semillas escarificadas de las tres especies arriba mencionadas (Figura 4).



Figura 4. Semillas de *Lupinus*. a) *L. campestris*, b) *L. exaltatus* y c) *L. montanus*, empleadas como explantes iniciales para evaluar el efecto de la escarificación sobre la respuesta de germinación bajo condiciones *in vitro*.

Cada tratamiento estuvo compuesto por 20 réplicas (tubos de ensayo) en los cuales se colocó una semilla por tratamiento. A los 15 días de cultivo se evaluó:

Número de semillas germinadas (expresado en porcentaje)

A los 30 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables:

Altura de las plántulas (cm)

Longitud de las raíces de las plántulas (cm)

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado. Los datos experimentales de las variables evaluadas, se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación factorial. La comparación de las medias se efectuó según la prueba de DMS, con un nivel de significación de 0.05.

3.6. Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H_2SO_4) sobre la escarificación y germinación *in vitro* de semillas de *L. campestris* y *L. exaltatus* en medio de cultivo semisólido MS con y sin Fe-EDTA.

Este experimento se realizó para evaluar el efecto del ácido sulfúrico sobre la germinación *in vitro* de semillas *L. campestris* y *L. exaltatus* en el medio de cultivo

semisólido (MS), adicionado con y sin Fe-EDTA. Las semillas se escarificaron con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 98% durante 30 minutos. Después de escarificadas las semillas se colocaron en el medio de cultivo basal (MS) propuesto por Murashige y Skoog (1962) que contenía los macronutrientes y los micronutrientes completos, se adicionaron 100 mg L^{-1} de mioinositol, 30 g L^{-1} de sacarosa. El pH se ajustó a 5.8. los experimentos fueron repetidos tres veces.

Cada tratamiento estuvo compuesto por 100 réplicas (tubos de ensayo) en los cuales se colocó una semilla por tratamiento.

A los 15 días de cultivo se evaluó:

Número de semillas germinadas (expresado en porcentaje)

A los 30 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables:

Altura de las plántulas (cm)

Longitud de las raíces de las plántulas (cm)

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado. Los datos experimentales de las variables evaluadas, se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple. La comparación de las medias se efectuó según la prueba de DMS, con un nivel de significación de 0.05.

3.7. Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H_2SO_4) sobre la escarificación y germinación *in vitro* de semillas de *Lupinus montanus*, en medio de cultivo semisólido MS con y sin Fe- EDTA.

Este experimento se realizó para conocer el efecto del ácido sulfúrico sobre la germinación de semillas de *L. montanus* en medio de cultivo semisólido MS adicionado con y sin Fe-EDTA. Las semillas se escarificaron con el ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 98% durante 40 minutos. Después de escarificadas las semillas se colocaron en el medio de cultivo basal (MS) propuesto por Murashige y Skoog (1962) que contenía los

macronutrientes y los micronutrientes completos, se adicionaron 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa. El pH se ajustó a 5.8. El experimento fue repetido tres veces.

Cada tratamiento estuvo compuesto por 100 réplicas (tubos de ensayo) en los cuales se colocó una semilla por tratamiento.

A los 15 días de cultivo se evaluó:

Número de semillas germinadas (expresado en porcentaje)

A los 30 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables:

Altura de las plántulas (cm)

Longitud de las raíces de las plántulas (cm)

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado. Los datos experimentales de las variables evaluadas, se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple. La comparación de las medias se efectuó según la prueba de DMS, con un nivel de significación de 0.05.

3.8. Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H₂SO₄) sobre la escarificación y germinación *in vitro* de semillas de *L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus*, en medio de cultivo semisólido Gamborg *et al.* (1968) con y sin Fe-EDTA.

Este experimento se realizó para evaluar el efecto del ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 98% durante 30 minutos sobre la respuesta de la germinación de semillas de *L. campestris*, *L. exaltatus*, y *L. montanus*) en medio de cultivo semisólido Gamborg *et al.* (1968) adicionado con y sin Fe-EDTA. Después de escarificadas las semillas se colocaron en el medio de cultivo basal (B5) propuesto por Gamborg *et al.* (1968) que contenía los macronutrientes y los micronutrientes completos, se adicionaron 100 mg L⁻¹ de

mioinositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa. El pH se ajustó a 5.8. El experimento fue repetido tres veces.

Cada tratamiento estuvo compuesto por 100 réplicas (tubos de ensayo) en los cuales se colocó una semilla por tratamiento.

A los 12 y 23 días de cultivo se evaluó:

Número de semillas germinadas (expresado en porcentaje)

A los 23 días de cultivo se evaluaron las siguientes variables:

Altura de las plántulas (cm)

Longitud de las raíces de las plántulas (cm)

Número de hojas

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado. Los datos experimentales de las variables evaluadas, se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple. La comparación de las medias se efectuó según la prueba de DMS, con un nivel de significación de 0.05.

3.9. Evaluación del efecto de reguladores de crecimiento en la proliferación de brotes de *L. campestris* y *L. exaltatus* en medio de cultivo semisólido MS.

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de tres reguladores de crecimiento en el establecimiento de plántulas obtenidas *in vitro* para inducir la formación de brotes. Los tratamientos evaluados fueron tres reguladores de crecimiento con tres niveles cada uno y un testigo. Ácido indolacético (AIA) (0.1, 0.5, 1.0 mg L⁻¹), Acido 1-naftalenacético (ANA) (0.1, 0.5, 1.0 mg L⁻¹) y 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (0.1, 0.5, 1.0 mg L⁻¹).

Una vez que la semilla germinó y expuso la yema, se procedió a eliminar las hojas cotiledonares, se cortó la yema apical con una longitud de 2.0 cm la cual se transfirió a

medio de cultivo semisólido MS, adicionado con 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa. El pH se ajustó a 5.8. Los experimentos fueron repetidos tres veces (Figuras 5a y 5b).

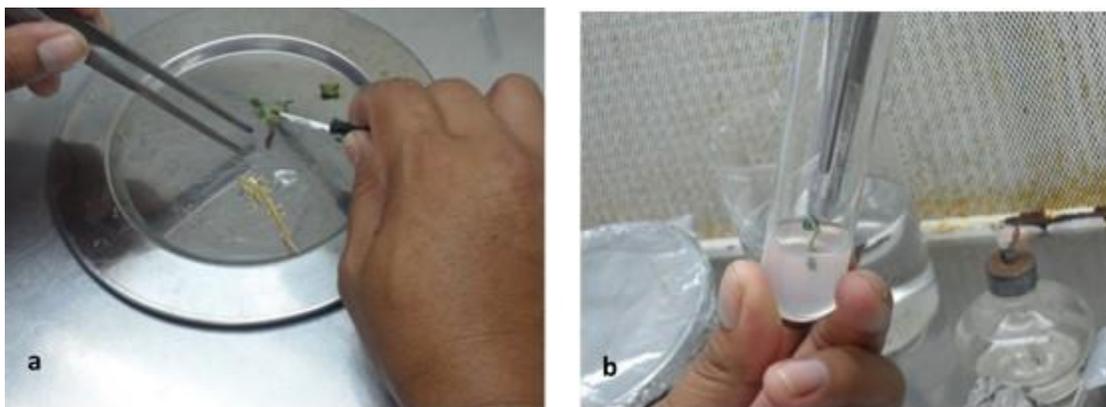


Figura 5. Establecimiento de yemas apicales de *L. campestris* y *L. exaltatus*. a) corte de la yema apical y b) establecimiento de la yema en medio de cultivo semisólido MS.

Cada tratamiento estuvo compuesto por doce réplicas (tubos de ensayo), en los cuales se colocó una yema apical, para un total de 12 yemas por tratamiento. Se evaluaron las siguientes variables a los 30 días de cultivo:

Número de brotes

Número de hojas

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado. Los datos experimentales de las variables evaluadas, se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación factorial. Para las variables número de brotes y número de hojas los datos se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación doble. La comparación de las medias se efectuó según la prueba de Tukey, con un nivel de significación de 0.05.

3.10. Evaluación del efecto del 6-BAP para inducir la formación de brotes en plántulas de *L. montanus* en medio de cultivo semisólido Gamborg *et al.* (1968).

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del 6-BAP para inducir la formación de brotes en plántulas obtenidas *in vitro*. Los tratamientos evaluados fueron cuatro niveles de 6-BAP (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, mg L⁻¹) y un testigo.

Una vez que la semilla germinó y expuso la yema, se procedió a eliminar las hojas cotiledonares, se cortó la yema apical con una longitud de 2.0 cm la cual se transfirió a medio de cultivo Gamborg *et al.* (1968) adicionado con 100.0 mg L⁻¹ de mioinositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa. El pH se ajustó a 5.8. Los experimentos fueron repetidos tres veces (Figura 6).

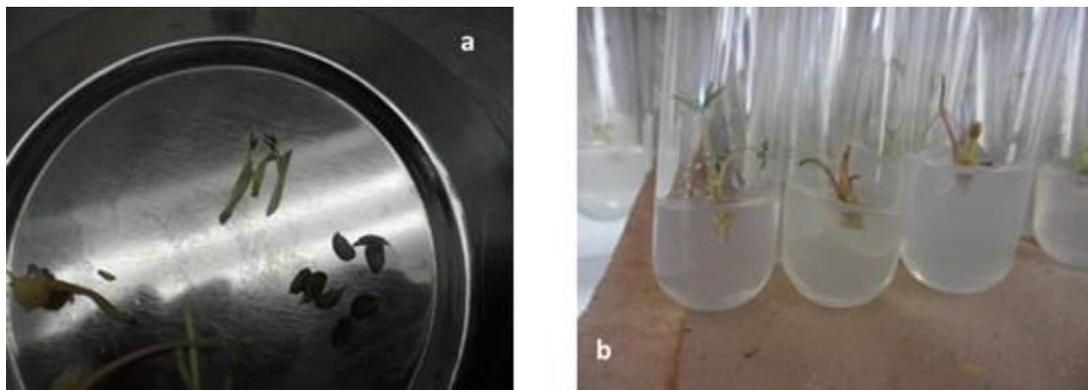


Figura 6. Establecimiento de yemas apicales de *L. montanus*. a) Corte de yemas apicales de plántulas de *L. montanus* y b) Establecimiento en el medio de cultivo Gamborg *et al.* (1968).

A los 30 días de cultivo se evaluó:

Altura de las plántulas (cm)

Número de brotes

Número de hojas

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado. Los datos experimentales de las variables evaluadas, se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple. La comparación de las medias se efectuó según la prueba de DMS, con un nivel de significación de 0.05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H₂SO₄) sobre la escarificación y germinación *in vitro* de semillas de *L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus*.

El tiempo de inmersión afectó la germinación de las semillas de las tres especies de *Lupinus* evaluadas. Los tratamientos estudiados mostraron diferencias significativas entre ellos. Las semillas de *Lupinus* sin escarificar (testigo) para cada especie no mostraron germinación. Al aplicar el tratamiento de escarificación con un tiempo de inmersión a 30 minutos, la germinación para *L. campestris* fue de 67 % y cuando aumentó el tiempo de inmersión a 40 minutos la germinación disminuyó. La misma tendencia se observó para *L. exaltatus*, la mejor respuesta en la germinación fue de 65 %. Sin embargo, para *L. montanus* la germinación fue baja; en el tiempo de inmersión más bajo no se observó germinación, cuando se fue incrementando el tiempo de inmersión la germinación aumentó de 8 % hasta 18 % (Figura 7). Esto demuestra que el ácido logró reblandecer la testa dura de las semillas de las especies estudiadas haciéndolas permeables, lo que influyó en la respuesta a germinación de *L. campestris* y *L. exaltatus* quienes presentaron los mayores porcentajes de germinación entre las especies evaluadas. La escarificación química es un método alternativo muy utilizado para debilitar la testa y permitir la imbibición; lo que, puede romper la latencia física de las semillas de lupino (Acosta-Perscástegui y Rodríguez-Trejo, 2005).

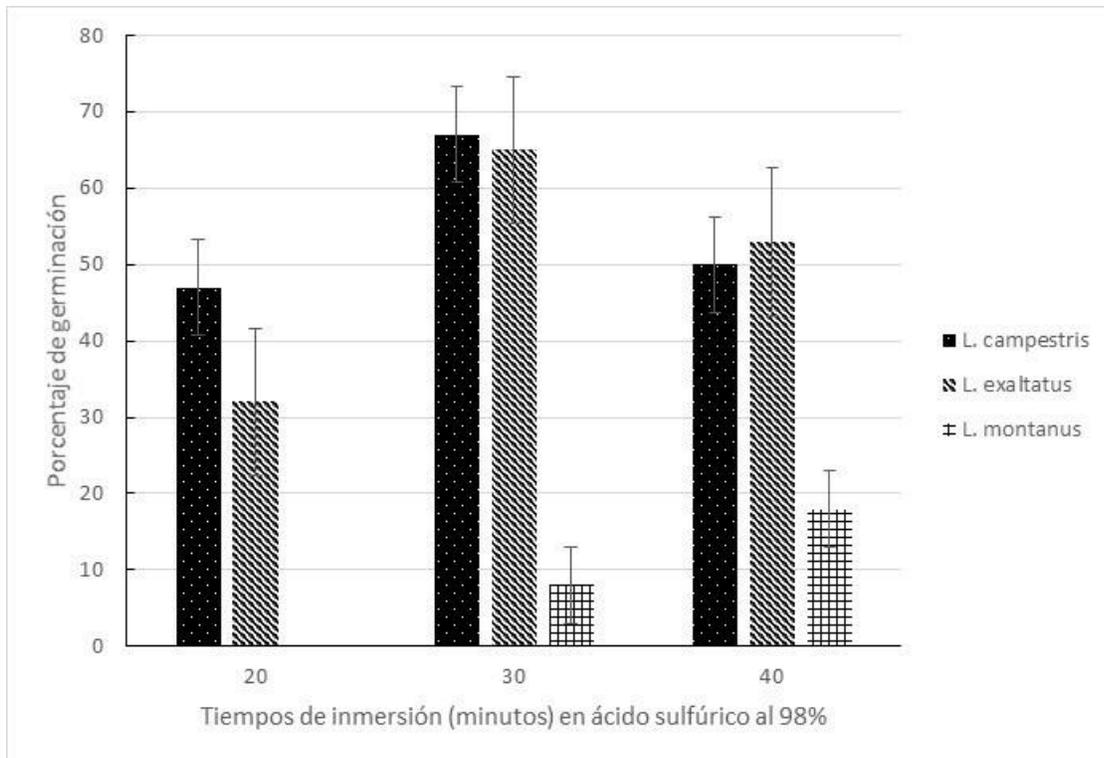


Figura 7. Porcentaje de germinación de tres especies de *Lupinus* en tres tiempos de inmersión en ácido sulfúrico a los 7 días de cultivo en medio semisólido MS.

La respuesta diferencial *in vitro* a la escarificación química de las semillas de *L. montanus* puede deberse a diferencias en la constitución de los tejidos que conforman la testa de esta especie, las condiciones que prevalecieron durante su maduración, la respuesta al medio MS, ó a pérdida de viabilidad de las semillas. Los resultados de esta especie contrastan con los obtenidos por Acosta-Perscástegui y Rodríguez-Trejo (2005) donde con 15 min de exposición al ácido sulfúrico lograron el 100 % de germinación en cajas Petri con papel húmedo. Mientras, que para *L. campestris* Gutiérrez *et al.* (2010) obtuvieron 50 % de germinación con un tiempo de inmersión en ácido sulfúrico de 90 minutos, resultados inferiores a los alcanzados en esta investigación. Corona *et al.* (2007) para *L. elegans* encontraron mayor porcentaje de germinación entre 88 % y 91 % cuando escarificaron las semillas con ácido sulfúrico en un tiempo de inmersión de 30 minutos. Sin embargo, Medina-Sánchez y Lindig-

Cisneros (2005) para esta misma especie obtuvieron 89 % de germinación cuando emplearon un tiempo de inmersión de 60 minutos. Lo anterior indica que la respuesta a la escarificación química va a depender de la especie y de la dureza de la testa. En esta última influyen la constitución anatómica y las condiciones ambientales de maduración de la semilla (sitio de procedencia).

Es posible que las semillas de *L. montanus* presentarán una baja variabilidad al momento de la aplicación de la escarificación química. Estas fueron colectadas en agosto de 2012 y al momento del estudio tenían cuatro meses conservadas a 4°C. Al momento de la aplicación de tratamientos no se realizaron pruebas de viabilidad a las semillas de las especies de *Lupinus* evaluadas, pero Hernández *et al.* (2008) señalan que la viabilidad de las semillas baja un 3.1% por año, si aplicáramos este factor, entonces el porcentaje de germinación se incrementaría en las especies en estudio. Para *L. elegans* se encontró una germinación de 85 % en semillas que tenían menos de un año de cosechadas (Medina-Sánchez y Lindig-Cisneros, 2005); mientras que, en semillas de *L. campestris* de 1 y 2 años nunca se alcanzaron porcentajes de germinación mayores del 64% (Gutiérrez *et al.*, 2010). En las especies silvestres evaluadas se observó pérdida de viabilidad de las semillas después de 3 años, siendo *L. montanus* el que mayor pérdida presentó (datos no mostrados).

La respuesta a la escarificación química de las especies de *Lupinus* silvestres estudiadas, indica que las semillas tienen testas duras o poco permeables, en especial *L. montanus*. Esta característica de la testa influye en la latencia que presentan y puede limitar su desarrollo agronómico (Pablo-Pérez *et al.*, 2013).

No se observaron daños a los embriones de las semillas en los tratamientos evaluados (Figura 8).

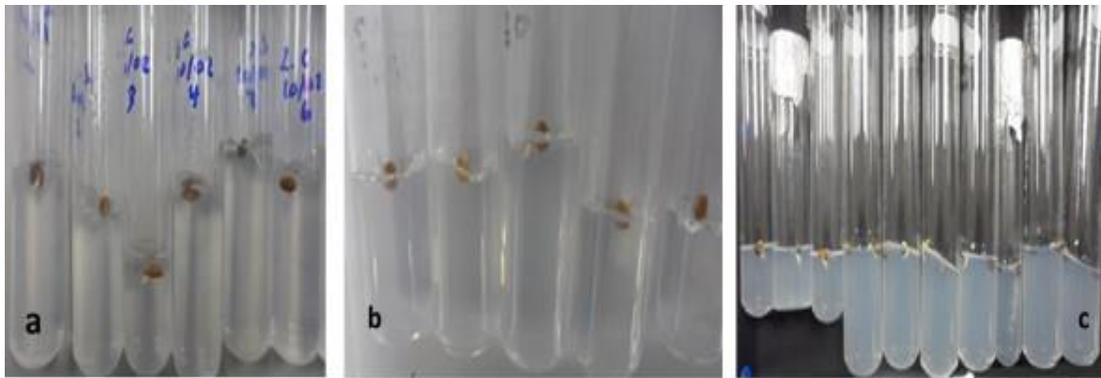


Figura 8. Germinación de semillas después de aplicar los tratamientos de escarificación química: a) *L. campestris* (30 min), b) *L. exaltatus* (30 min) y c) *L. montanus* (40 min).

Para altura de las plántulas y longitud de raíces se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Cuadro 2). *L. exaltatus* en un tiempo de inmersión de 30 minutos, mostró el mayor valor para altura de las plántulas 3.46 cm y longitud de las raíces 1.96 cm. *L. campestris* no mostró diferencias significativas en los tres tiempos de inmersión evaluados para ambas variables. Los menores valores para estas variables se observaron en *L. montanus*. *L. campestris* es la única especie que muestra una reducción en ambas variables conforme se incrementa el tiempo de inmersión en ácido sulfúrico indicando una posible pérdida de vigor, aun cuando no hay diferencias significativas, lo que puede afectar el desarrollo de la plántula.

Cuadro 2. Promedio de altura de plántula y longitud de raíces en respuesta a la germinación *in vitro* de tres especies silvestres de *Lupinus* utilizando la escarificación de semillas con inmersión en ácido sulfúrico al 98%, evaluadas a los 30 días de cultivo.

Especies	Tiempo de inmersión (minutos) en H ₂ SO ₄ al 98%	Altura de plántulas (cm)		Longitud de raíces (cm)	
<i>L. campestris</i>	20	1.89	abc	1.02	bc
	30	1.61	abc	0.96	bcd
	40	1.58	abc	0.83	bcde
<i>L. exaltatus</i>	20	1.14	bc	0.73	bcde
	30	3.46	a	1.96	a
	40	2.92	ab	1.14	ab
<i>L. montanus</i>	20	0.00	-----	0.00	-----
	30	0.08	c	0.04	de
	40	0.39	c	0.20	cde

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas según DMS ($p \leq 0.05$)

4.2. Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H₂SO₄) sobre la escarificación y germinación *in vitro* de semillas de *L. campestris* y *L. exaltatus* en medio de cultivo semisólido MS con y sin Fe-EDTA.

Las variables porcentaje de germinación, altura de plántulas, número de hojas y longitud de raíces no mostraron diferencias estadísticas cuando el medio de cultivo MS contenía Fe-EDTA. Sin embargo, se observa un incremento en el porcentaje de germinación cuando al medio de cultivo MS se le elimina el Fe-EDTA (Figura 9).

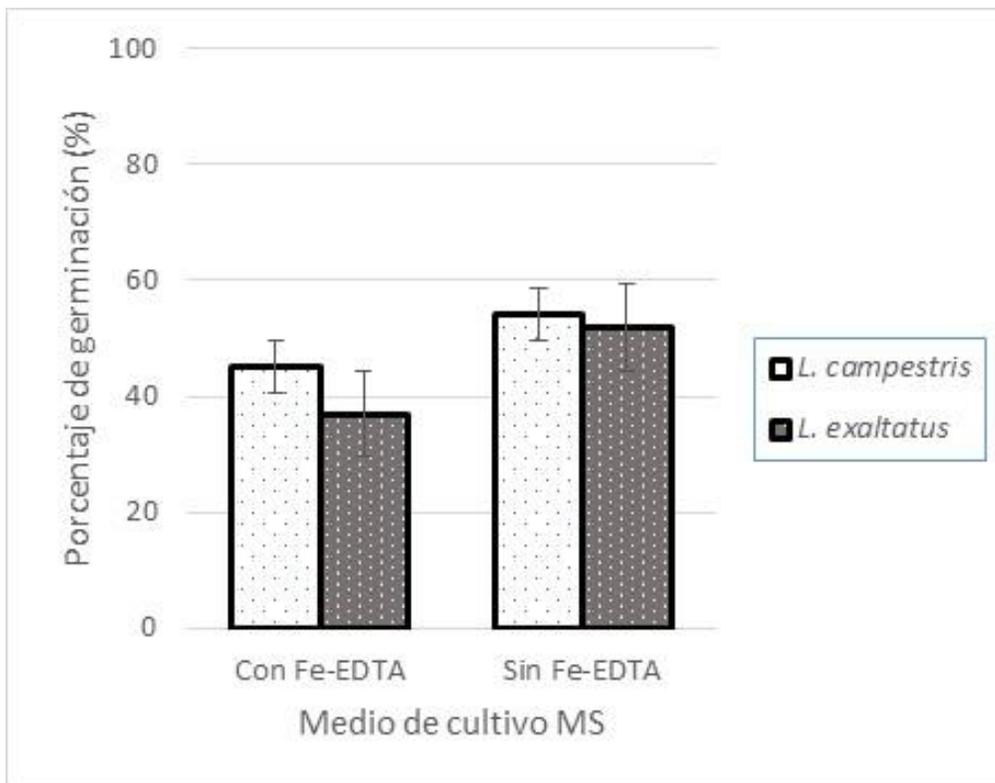


Figura 9. Porcentaje de germinación de *L. campestris* y *L. exaltatus* en medio de cultivo MS con y sin Fe-EDTA a los 23 días de cultivo.

Cuando al medio de cultivo se le suprimió el Fe-EDTA se observó que el porcentaje de germinación se incrementó para *L. campestris* de 45 % a 54 % y para *L. exaltatus* de 37 % a 52 %. Llorente (2000) señala que el hierro es esencial para el crecimiento celular y se le debe agregar al medio de cultivo en una concentración de 0.01 a 0.15 mM bajo la forma de quelato Fe-EDTA, ya que esta forma aumenta la solubilidad del hierro. Sin embargo, en este estudio al eliminar el Fe-EDTA del medio de cultivo se pudo observar un incremento en el porcentaje de germinación de las dos especies evaluadas, lo que parece indicar que el Fe llegó a disminuir la germinación de estas especies. El Fe puede participar en reacciones donde se liberan radicales libres y otras especies de oxígeno reactivas que son tóxicas. Este estrés oxidativo puede llevar a la disfunción de actividades metabólicas y daño en el ADN (Molassiotis *et al.*, 2003), lo

que puede afectar la germinación ya que durante la misma se sintetiza ADN por la intensa división celular.

La habilidad para asimilar hierro por parte de una planta u otro organismo depende de la acción conjunta de una serie de mecanismos, esta habilidad o eficiencia se sabe que varía bastante entre especies así como entre cultivares, cepas o variedades dentro de cada especie (Bianfait, 1988). Por ejemplo, Olsen y Brown (1980) encontraron que las plantas dicotiledóneas son en general más eficientes para enfrentarse a las deficiencias de hierro, que las monocotiledóneas. En el caso de *Lupinus*, una posible causa es el contenido de Fe en las semillas, que al iniciar los procesos de acidificación se liberan compuestos reductores de Fe, lo que haría un exceso de Fe si se adiciona más en el medio de cultivo. Los contenidos de Fe en las semillas en estudio son superiores a 70 mg kg⁻¹ (Pablo-Pérez *et al.*, 2013).

Para el crecimiento de las plantas *in vitro*, la disponibilidad de los nutrientes es esencial y está determinada por la concentración, fuente y relación iónica del medio de cultivo (Leifert *et al.*, 1992). Los explantes en condiciones *in vitro* no sintetizan cantidades suficientes de carbohidratos debido a la poca área foliar y por ende baja actividad fotosintética, por lo que los compuestos orgánicos y elementos minerales debe de proporcionarlos el medio de cultivo (Ruzic *et al.*, 2000). La composición mineral de los medios de cultivo resulta fundamental, ya que tiene un efecto decisivo en el potencial osmótico y el pH del medio, así como en la nutrición de los explantes (Morard y Henry, 1998). Cuando estos son adicionados, la respuesta en el crecimiento de los explantes no siempre es positiva. Este es el caso del Fe en las especies de *Lupinus* en estudio.

En la figura 10, se pueden observar las diferencias en altura de las plántulas y la longitud de las raíces de las semillas germinadas de *L. campestris* y *L. exaltatus* en el medio de cultivo MS con y sin Fe-EDTA.

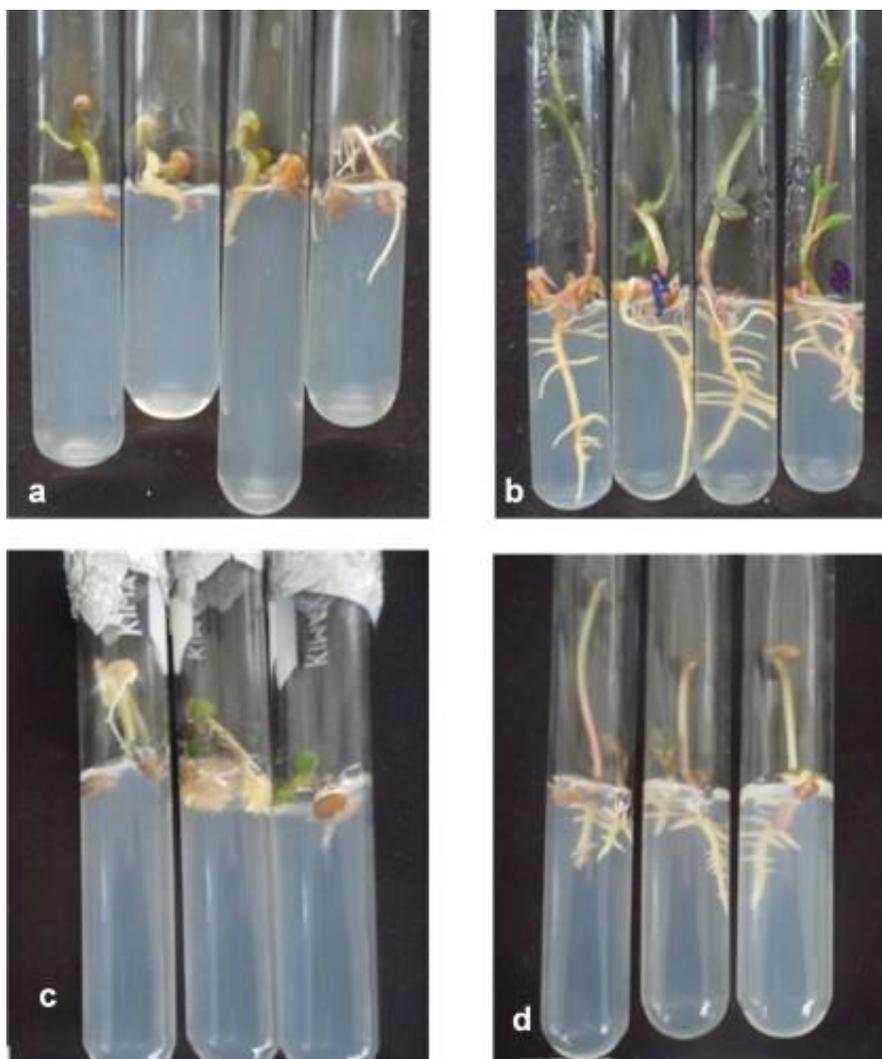


Figura 10. Efecto del Fe-EDTA en el medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de semillas a los 30 días de cultivo. a) *Lupinus campestris* con Fe-EDTA y b) *L. campestris* sin Fe-EDTA c) *L. exaltatus* con Fe-EDTA y d) *Lupinus exaltatus* sin Fe-EDTA.

Las semillas que estaban en el medio de cultivo que contenía Fe-EDTA tuvieron una germinación, altura de las plántulas y longitud de las raíces más baja, que las semillas que germinaron en un medio de cultivo sin Fe-EDTA. Esto pudo ser debido al efecto de estrés oxidativo generado por una acumulación de Fe en exceso en el medio de cultivo

o la liberación de formaldehído en el medio por la fotodegradación del Fe-EDTA (Boyer *et al.*, 1988; Molassiotis *et al.*, 2003). En mutantes de chícharo (*Pisum sativum*) con defectos en la regulación de la absorción del hierro, Becker *et al.* (1998) observaron que el Fe se acumula en las ferritinas y estas precipitan dicho metal, para depositarlo en forma de partículas denso-electrónicas en el citoplasma, mitocondrias y retículo endoplasmático, y que esto constituye un mecanismo de defensa de la planta contra la acumulación excesiva de Fe soluble el cual da lugar a estrés oxidativo. La misma conclusión fue obtenida por Deak *et al.* (1999) en plantas de tabaco transgénicas que sintetizaban ferritina en los tejidos vegetativos. El tabaco transgénico retuvo la función fotosintética normal en presencia de toxicidad causada por radicales libre generada por exceso de Fe, al parecer la captura intracelular del Fe por las ferritinas protegió a las plantas del daño oxidativo inducido por varios tipos de estrés.

En soya (*Glycine max*) la adición de Fe-EDTA *in vitro* hasta llegar a una concentración exógena de 5×10^{-4} M (es decir, 500 000 veces sobre el mínimo de 10^{-9} M) da lugar a incremento en el contenido de Fe en los tejidos acompañado de estrés oxidativo en la raíz. Al nivel sub-celular los autores encontraron que el contenido de Fe y la tasa de reducción de Fe-EDTA aumentaron en los microcuerpos aislados de las raíces expuestas al Fe, en comparación con un testigo sin adición de Fe. Al compararse con los de dicho testigo, los microcuerpos del retículo endoplasmático de las raíces en el medio con Fe mostraron 55 % de aumento en la generación de aniones superóxido, así como cuatro veces la tasa de producción de radicales hidroxilo (Caro y Puntarulo, 1996). El Fe quelatado con un sideróforo sintético (O-Trensox) no genera daño oxidativo, cosa que si ocurre con el Fe-EDTA y el Fe-citrato (Caris *et al.*, 1995). También se ha indicado que el EDTA y el oxalato inhiben la liberación de Fe, posiblemente debido a que inhiben la actividad de la polifenol oxidasa que participa en el crecimiento radicular y el Fe es un componente esencial de esta enzima (Boyer *et al.*, 1988).

Aunque la composición del medio de cultivo MS proporciona buenos resultados en el cultivo *in vitro* de la mayoría de las especies, los resultados de este estudio indican que en el caso de *Lupinus* la forma quelatada Fe-EDTA no es adecuada y otros estudios deberán de diseñarse para profundizar en el efecto de Fe en el crecimiento *in vitro* de estas especies, además de probar otra forma quelatada de Fe como Fe-EDDHA. De hecho la literatura indica que cuando se inicia un estudio debe seleccionarse una combinación de nutrientes en función del conocimiento de la fisiología de la especie, de los resultados experimentales obtenidos, del tipo de cultivo a desarrollar (plántulas, callos, raíces, meristemos, embriones) o del objetivo del trabajo (crecimiento, diferenciación u obtención de metabolitos) (Llorente, 2000), aunque diferencias en respuestas entre e intra especie pueden presentarse.

4.3. Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H₂SO₄) sobre la escarificación y germinación *in vitro* de semillas de *L. montanus* en medio de cultivo semisólido MS con y sin Fe-EDTA.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Al igual que para *L. campestris* y *L. exaltatus*, el mayor porcentaje de germinación (26%) se encontró en las semillas de *L. montanus*, sembradas en el medio de cultivo MS sin Fe-EDTA y el menor porcentaje (10%) se obtuvo en las semillas sembradas en medio de cultivo MS que contenía Fe-EDTA (Figura 11).

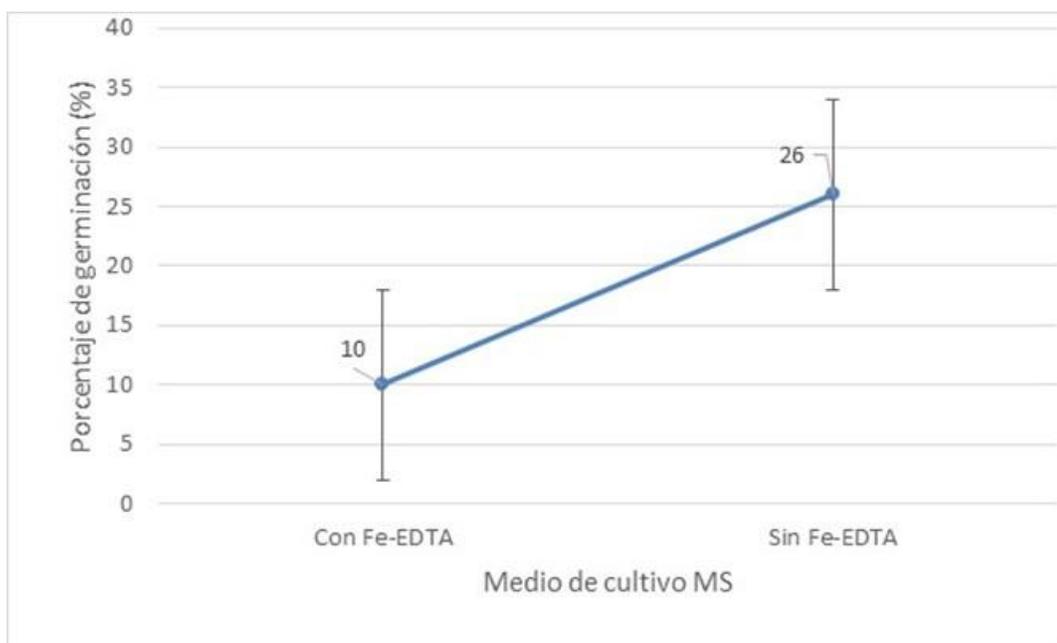


Figura 11. Efecto de la escarificación química sobre el porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *L. montanus* en el medio de cultivo MS con y sin Fe- EDTA, a los 15 días de cultivo.

Los resultados obtenidos en esta investigación difieren a los observados en otros estudios de escarificación química con ácido sulfúrico a semillas de *L. montanus*. Acosta-Percástegui y Rodríguez-Trejo (2005) alcanzaron 100 % de germinación después de 15 minutos de escarificación y de De La Cruz-Landero (2010) lograron el 100 % de germinación después de 12 y 25 minutos.

En otras especies de lupino, el tiempo de inmersión en ácido sulfúrico ha sido mayor. En *L. havardii* fueron necesarios 120 minutos para un 100 % de germinación (MacKay *et al.*, 1995). Para *L. arboreus* los más altos porcentajes de germinación se observan arriba de 60 minutos de escarificación (MacKay *et al.*, 2001). Para *L. varius* el 100% de germinación se obtuvo cuando la semilla se escarificó durante 24 horas en ácido sulfúrico (Karaguzel *et al.*, 2004).

En la figura 12 se puede observar que las plantas de *L. montanus* que germinaron en el medio de cultivo MS que contenía Fe-EDTA no presentan raíces; mientras que las semillas germinadas en el medio de cultivo que no contenía Fe-EDTA las plántulas se observan más grandes y muestran raíces.

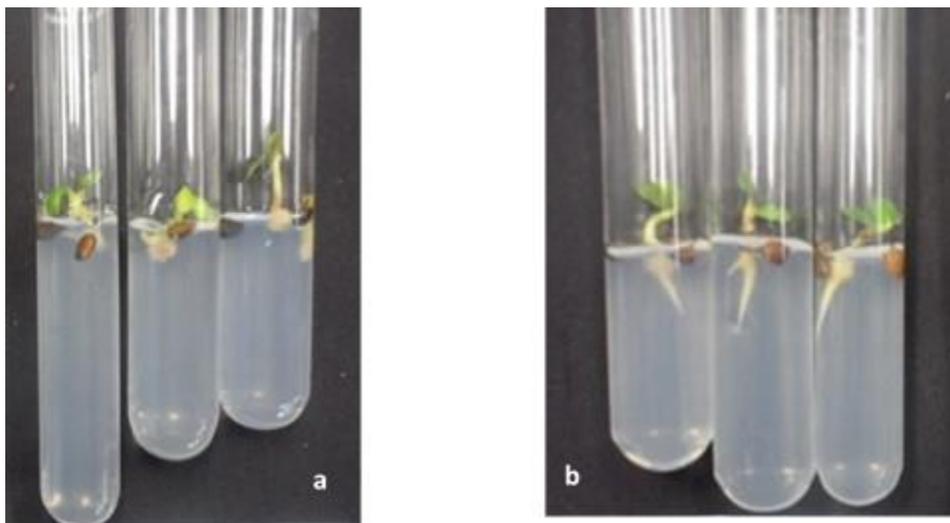


Figura 12. Efecto del Fe-EDTA en el medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de semillas de *L. montanus*. a) Semillas de *L. montanus* con Fe-EDTA y b) Semillas de *L. montanus* sin Fe-EDTA, a los 15 días de cultivo.

El medio nutritivo más utilizado para la germinación *in vitro* es el MS; no obstante, por su composición (macrosales, microsales y vitaminas), es uno de los que presenta un potencial osmótico muy negativo lo que puede dificultar la germinación causando desórdenes fisiológicos (Cárdenas y Villegas, 2002). El potencial osmótico, el balance iónico y las relaciones nutricionales del medio de cultivo son determinantes en el crecimiento y distribución de nutrientes de las plantas cultivadas *in vitro*. La inhibición de la germinación por la presencia de sales puede deberse a efectos osmótico y tóxicos. La presencia de sales en el medio disminuye el potencial hídrico, provocando una menor disponibilidad de agua para las semillas de manera que éstas deben generar suficiente potencial osmótico para mejorar el estatus hídrico de los embriones y permitir su crecimiento (Goycokic y Saavedra, 2007). El estrés osmótico provocado por

un medio rico en sales podría hacer que el metabolismo de los tejidos vegetales estimule la liberación de compuestos que son fáciles de oxidar convirtiéndose en fitotóxicos debido a la captación y acumulación de iones (Turkan y Demiral, 2009). A lo anterior, se suma el estrés oxidativo induciendo la presencia de enzimas que provocan la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos alterando el metabolismo normal de las células (Rai *et al.*, 2011). La inducción de síntesis de enzimas antioxidantes como catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa causada por estrés salino durante la germinación ha sido mencionada por Sekmen *et al.* (2012). Al igual que en *L. campestris* y *L. exaltatus* esto pudo ser debido al efecto de estrés oxidativo generado por una acumulación de Fe en exceso en el medio de cultivo o la liberación de formaldehído en el medio por la fotodegradación del Fe-EDTA (Boyer *et al.*, 1988; Molassiotis *et al.*, 2003). Hipótesis que deberá probarse en estudios posteriores.

Para las variables de crecimiento, los resultados mostraron diferencias significativas entre tratamientos. La mayor altura promedio de plántula (0.31 cm), longitud de raíces (0.34 cm) y número de hojas (0.26) se obtuvieron en el medio de cultivo que no contenía Fe-EDTA. Cuando al medio de cultivo se le adicionó Fe-EDTA, la altura de la plántula, longitud de raíces y número de hojas disminuyeron (Cuadro 3).

Cuadro 3. Crecimiento de *L. montanus* con y sin FE-EDTA en el medio de cultivo MS.

Especie	Medio de cultivo MS	Altura plántula (cm)	Longitud raíces (cm)	Número de hojas
<i>L. montanus</i>	Con Fe-EDTA	0.11±0.13 a	0.09±0.15 a	0.10±0.15 a
	Sin Fe-EDTA	0.31±0.13 b	0.34±0.15 b	0.26±0.15 b

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas según DMS para ($p \leq 0.05$).

Los resultados de la investigación difieren de los alcanzados por Karaguzel *et al.* (2004) para *L. varius* L. donde obtuvieron plántulas con una altura de 5.81 cm y longitud de raíces de 7.50 cm, a los 12 días de cultivo en una cámara de crecimiento.

El potencial osmótico, el balance iónico y las relaciones nutricionales del medio de cultivo son determinantes en el crecimiento y distribución de nutrientes de las plantas cultivadas *in vitro* (Cárdenas y Villegas, 2002). Además, el pH en el cultivo *in vitro* está directamente relacionado con las soluciones nutritivas; es decir, tener disponibles los elementos facilitando su absorción evitando el estrés o desgaste al cultivo ya que las plántulas se alimentan y lo realizan desde la raíz, en donde toma los elementos necesarios y/o disponibles, para llevarlos hasta las hojas en donde son digeridos y asimilados por la planta.

L. montanus crece en el Eje Neovolcánico Transversal en suelos con rangos de pH entre 4.5 y 5.2 y bajos contenidos de nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio y altos contenidos de Fe en la solución del suelo (Bermúdez-Torres *et al.*, 2009). Sin embargo, se pudo observar que cuando al medio de cultivo se le adicionó Fe-EDTA, este afectó la altura de la plántula, longitud de las raíces y número de hojas, lo que pudiera estar relacionado con un estrés causado por este metal. El principal mecanismo en especies tolerantes a metales, parece ser la captación en el compartimento vacuolar, la aparente tolerancia de las plantas para incrementar niveles de elementos tóxicos en sus tejidos puede ser resultado de la exclusión de los mismos elementos tóxicos de los sitios celulares donde se llevan a cabo los procesos vitales, tales como la división celular y la respiración. Lo anterior provee a la planta con un efectivo mecanismo de protección (Chaney *et al.*, 1997; Hall, 2002).

4.4. Evaluación del efecto del ácido sulfúrico (H₂SO₄) sobre la escarificación y germinación *in vitro* de semillas de *L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus* en medio de cultivo semisólido Gamborg *et al.* (1968) con y sin Fe-EDTA.

En la Figura 13, en *L. exaltatus* se puede observar que no hubo diferencias significativas en los tratamientos con y sin Fe-EDTA en el medio de cultivo a los 12 y 23 días. Para *L. campestris*, se obtuvieron porcentajes de 39 % a los 12 días en el medio de cultivo que contenía Fe-EDTA y se incrementó hasta 61 % cuando el medio de cultivo se le eliminó el Fe-EDTA. La misma tendencia puede observarse a los 23 días de cultivo cuando se encontraba en el medio de cultivo con Fe-EDTA la germinación fue de 54 % cuando el Fe-EDTA se eliminó la germinación incrementó a 64 %. En *L. montanus* no se encontraron diferencias en los tratamientos evaluados con y sin Fe-EDTA en el medio de cultivo a los 12 días y 23 días (Figura 13).

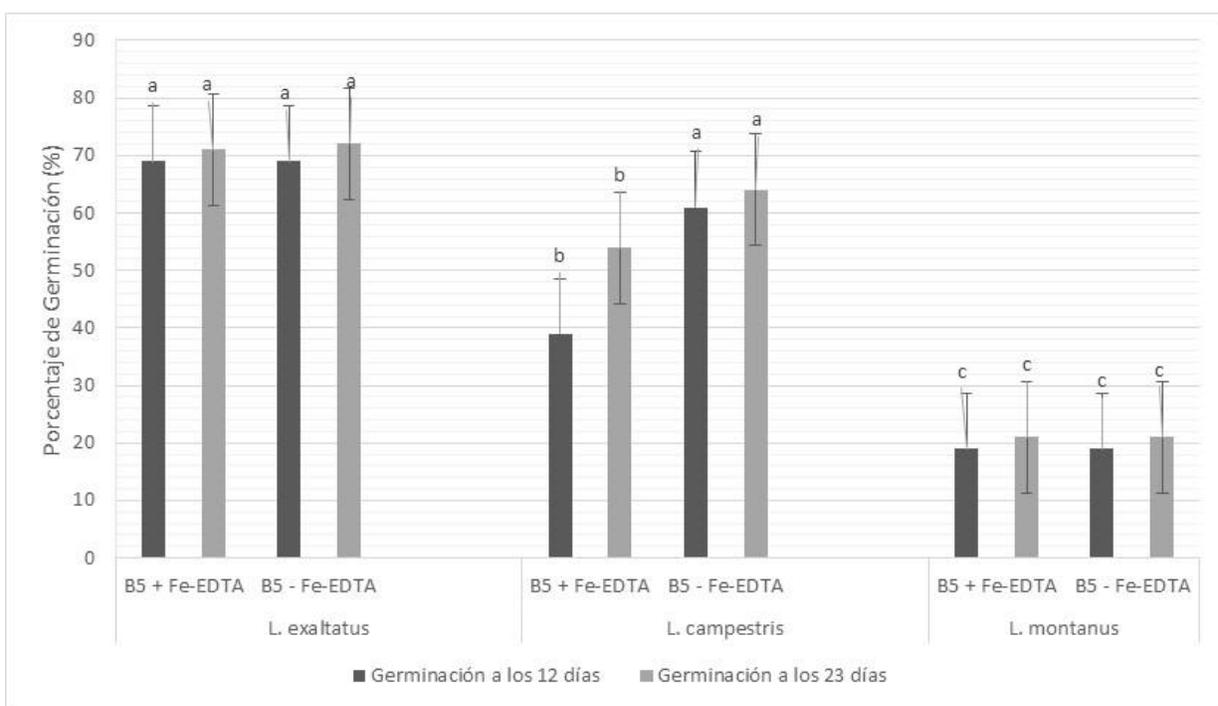


Figura 13. Germinación *in vitro* de semillas de tres especies de *Lupinus* en medio de cultivo Gamborg *et al.* (1968) con y sin la adición de Fe-EDTA a los 12 y 23 días de cultivo.

Los resultados mostraron para *L. exaltatus* los mayores porcentajes de germinación a los 12 y 23 días sin diferencias cuando el medio cultivo contenía o no Fe-EDTA. Cuando el Fe-EDTA se eliminó del medio de cultivo el porcentaje de germinación se incrementó para *L. campestris*; no así para *L. montanus*. Resultados que difieren de Mateo-Sagasta (1988) y Bonilla (2000) quienes afirman que la ausencia de complejos Fe-EDTA en el medio de cultivo B5, disminuye la actividad enzimática en el transporte de electrones e inactiva la síntesis de proteínas, procesos clave para el desarrollo de las plantas. Esto pudo ser debido, a que el medio de cultivo semisólido Gamborg *et al.* (1968) ó (B5), posee menores concentraciones de sales minerales que el medio propuesto por Murashige y Skoog (1962) el MS. El medio MS presenta uno de los potenciales osmóticos más negativos, lo que dificulta la entrada de agua a la semilla (Cárdenas y Villegas, 2002). Otros investigadores han relacionado las altas concentraciones de sales con efectos tóxicos debido a la captación y acumulación de iones (Turkan y Demiral, 2009), a lo anterior se suma el estrés oxidativo induciendo la presencia de enzimas que provocan la oxidación de lípidos proteínas y ácidos nucleicos alterando el metabolismo normal de las células (Rai *et al.* 2011).

El hierro es necesario para las reacciones de óxido reducción y la estabilización de los complejos enzima sustrato. Además, es importante en la biosíntesis de la clorofila, actúa en la síntesis de NADP⁺ durante la fotosíntesis y la reducción de nitrógeno (Duchefa, 2001). Sin embargo, el hierro pudo haber reaccionado con el contenido de hierro que tienen las semillas de *Lupinus* y el que se adicionó al medio de cultivo en forma de quelato. Las especies en estudio mostraron en un análisis químico contenidos de hierro en las semillas del 70.7, 81.3 y 73.7 mg kg⁻¹ para *L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus*, respectivamente (Pablo-Pérez *et al.*, 2013). Una razón podría ser la formación en el medio de cultivo de un exceso de Hierro y al eliminarlo la germinación de las semillas se incrementará. Otra podría ser la formación de formaldehído debido a la degradación fotolítica del Fe-EDTA en el medio de cultivo (Molassiotis *et al.*, 2003).

En la figura 14 se pueden observar las semillas germinadas de las tres especies de *Lupinus* en estudio. Las semillas que se encontraban en el medio de cultivo que contenía Fe-EDTA mostraron plántulas alargadas y raíces más pequeñas que las semillas germinadas en el medio de cultivo sin Fe-EDTA que mostraron plántulas con hojas verdaderas y raíces más gruesas.

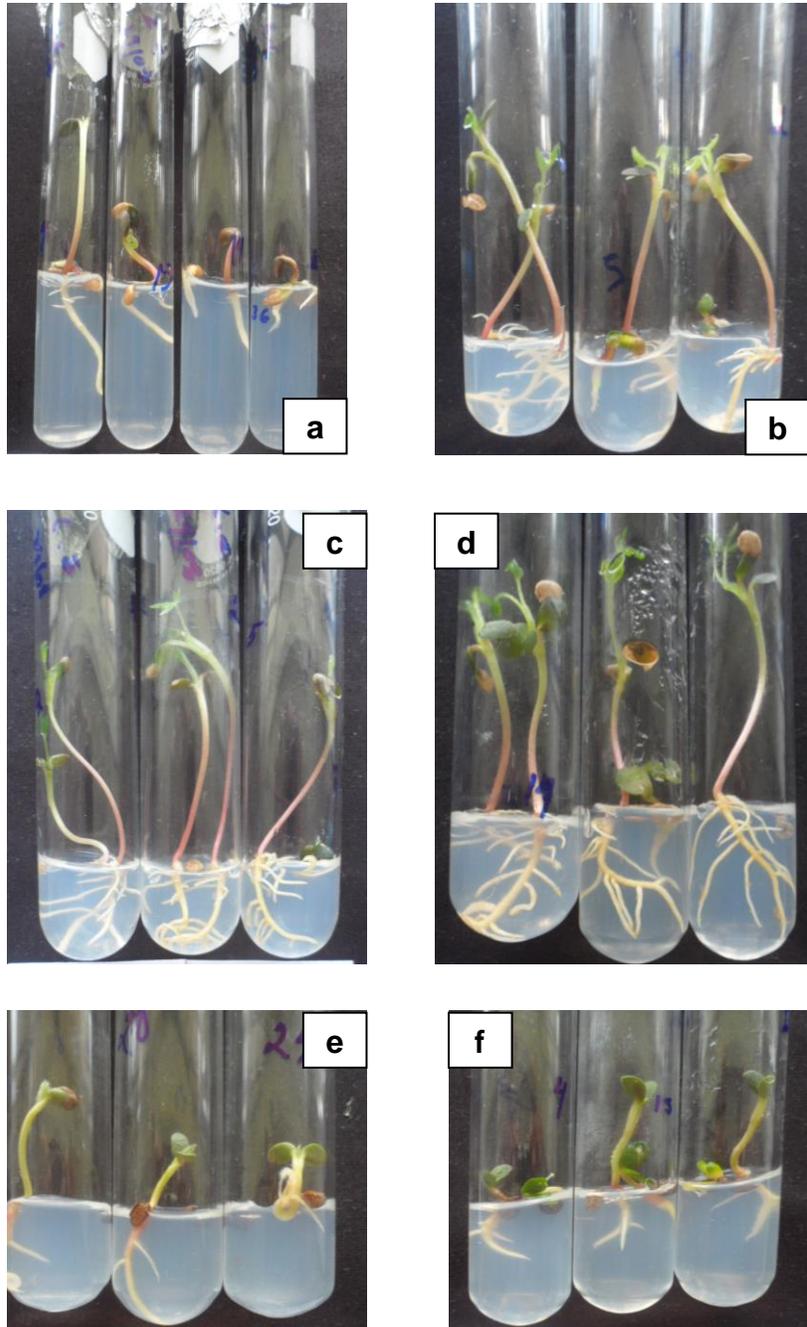


Figura 14. Germinación *in vitro* de semillas de tres especies de *Lupinus* en medio de cultivo Gamborg. a) y b) *L. campestris* con y sin Fe-EDTA, c) y d) *L. exaltatus* con y sin Fe-EDTA, e) y f) *L. montanus*, con y sin Fe-EDTA respectivamente, a los 23 días de cultivo.

Diferencias estadísticas significativas se observaron para altura de plántulas, número de hojas y longitud de raíces entre tratamientos. Para las tres especies en cultivo, altura de plántula, número de hojas y longitud de raíces, se obtuvieron en el medio de cultivo que no contenía Fe-EDTA comparadas con las que se encontraban en el medio de cultivo adicionado con Fe-EDTA (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de la adición de Fe-EDTA en medio de cultivo Gamborg *et al.* (1968) sobre la altura de las plántulas, número de hojas y longitud de raíces de tres especies silvestres de *Lupinus*.

Especies	Medio de cultivo Gamborg	Altura de plántula (cm)	Número de hojas	Longitud de raíces (cm)	
<i>L. exaltatus</i>		1.52±0.31	a	0.70±0.19	a
<i>L. campestris</i>	Sin Fe-EDTA	0.76±0.31	b	0.38±0.19	b
<i>L. montanus</i>		0.23±0.31	c	0.19±0.19	b
<i>L. exaltatus</i>		0.90±0.27	a	0.51±0.18	a
<i>L. campestris</i>	Con Fe/EDTA	0.77±0.27	a	0.38±0.18	a
<i>L. montanus</i>		0.18±0.27	b	0.13±0.18	b

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas según DMS para ($p \leq 0.05$).

Los resultados de esta investigación en cuanto a la altura de la plántula y longitud de las raíces difieren de los encontrados por Karaguzel *et al.* (2004) para *L. varius* cuando emplearon ácido sulfúrico para escarificar las semillas durante 16 horas.

4.5. Evaluación del efecto de reguladores de crecimiento en el establecimiento de brotes de *L. campestris* y *L. exaltatus* en medio de cultivo semisólido MS.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias estadísticas significativas en los tratamientos evaluados. En la figura 15, se puede observar en *L. campestris* para la variable número de brotes que el mayor valor (1.91) se obtuvo en el tratamiento que contenía ANA en una concentración de 0.1 mg L⁻¹, los tratamientos restantes no mostraron diferencias significativas para las dosis de AIA y 6-BAP. Mientras que para *L. exaltatus* los tratamientos con valores más altos y que no tuvieron diferencias fueron los que contenían AIA en dosis de 0.1 mg L⁻¹ y 1.0 mg L⁻¹ y 6-BAP 0.1 mg L⁻¹ y 0.5 mg L⁻¹, respectivamente. Para *L. exaltatus* se presentaron los promedios más bajos en el tratamiento testigo y en los tratamientos que contenían AIA y ANA en una concentración de 0.5 mg L⁻¹.

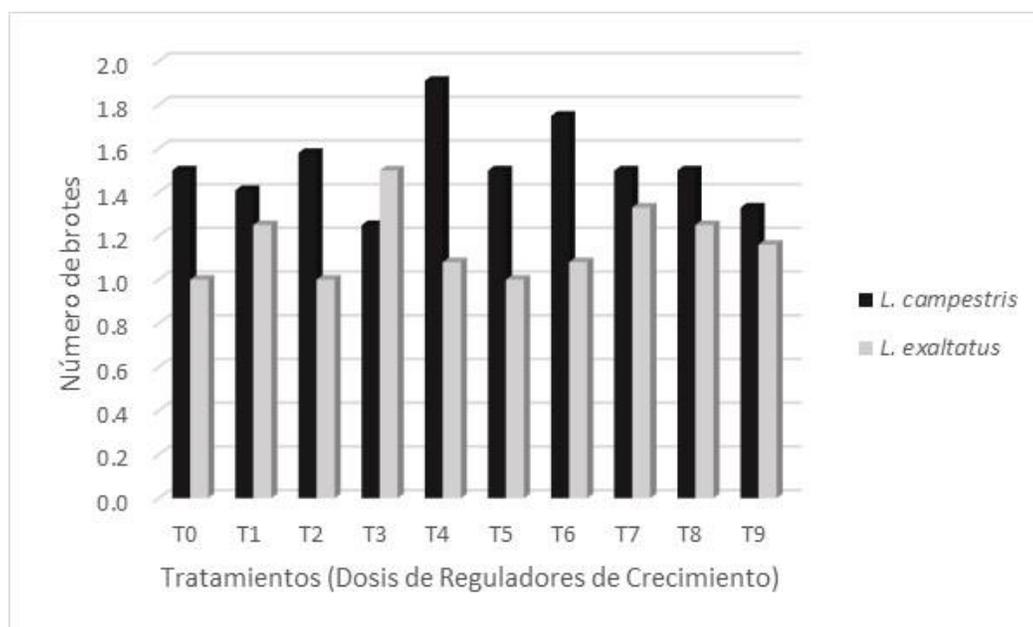


Figura 15. Efecto de reguladores de crecimiento sobre el número de brotes de *L. campestris* y *L. exaltatus*, en medio de cultivo MS a los 30 días de cultivo. T0=Testigo, T1=0.1 mg L⁻¹ AIA, T2=0.5 mg L⁻¹ AIA, T3=1.0 mg L⁻¹ AIA, T4=0.1 mg L⁻¹ ANA, T5=0.5 mg L⁻¹ ANA, T6=1.0 mg L⁻¹ ANA, T7=0.1 mg L⁻¹ 6-BAP, T8=0.5 mg L⁻¹ 6-BAP, T9=1.0 mg L⁻¹ 6-BAP

El medio de cultivo MS ha sido el más utilizado en diferentes trabajos de cultivo *in vitro* de especies de *Lupinus* (Rybczynski y Podyma, 1993; Harzic *et al.*, 1998; Swiecicki *et al.*, 2000). Empleando el medio de cultivo MS con los macronutrientes al 50 % y diversas concentraciones de ANA, AIA e IBA, Pniewski *et al.* (2002) observaron resultados similares a los obtenidos en las especies silvestres de lupino en estudio para el número de brotes. Este varió en *L. luteus* de 1.6 a 2.0 mg L⁻¹, en *L. albus* de 1.5 a 1.6 mg L⁻¹ y en *L. angustifolius* de 1.2 a 1.3 mg L⁻¹. Cuando adicionaron BAP al medio de cultivo el número de brotes fue mayor pero los brotes presentaron enanismo y vitrificación. En este trabajo, aunque se utilizaron diferentes reguladores de crecimiento no se observó una proliferación abundante de los brotes.

Resultados que difieren de los alcanzados por Santa Cruz (2001) para *L. stipulatus* con 5.58 brotes cuando utilizó 1.0 mg L⁻¹ de Kinetina (KIN) en medio de cultivo MS.

Con respecto a los reguladores de crecimiento se han utilizado como fuente de auxina ANA, AIA, 2,4-D y Picloram en combinación con las citocininas; kinetina (KIN), thidiazurón (TDZ), Benzilaminopurina (BAP) y 2-Isopentenil adenina (2iP) en diferentes concentraciones (Rybczynski y Podyma, 1993; Harzic *et al.*, 1998; Fernández-Romero *et al.*, 1998; Ochatt *et al.*, 1992). Por lo cual, para esta investigación, se utilizaron los reguladores AIA, ANA y 6-BAP. Con estos reguladores se logró la propagación por proliferación de meristemas apicales de *L. campestris* y *L. exaltatus* por el efecto de ANA que estimula la dominancia apical (Duchéfa, 2001), generando nuevos brotes.

Se ha logrado la regeneración desde 2 (Rybczynski y Podyma, 1993) hasta 65 brotes (Upadhyaya *et al.*, 1992; Swiecicki *et al.*, 2000) los cuales fueron desarrollados hasta obtener plantas completas a partir de un solo explante. La diferencia entre los promedios reportados y los obtenidos en el presente trabajo podrían deberse a que *L. exaltatus* es una especie erecta, poco ramificada, que presenta tallos huecos, mientras

que *L. campestris* presenta tallos sólidos con entrenudos cortos y pocas yemas meristemáticas (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012).

Para la variable número de hojas en *L. campestris* y *L. exaltatus* el rango varió desde 1.0 hasta 3.0. En *L. campestris* el mayor valor (2.91) se obtuvo en el tratamiento testigo con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Sin embargo, para *L. exaltatus* los valores menores se obtuvieron en los tratamientos que contenían ANA y 6-BAP en dosis de 0.5 mg L⁻¹ y el menor valor (1.08) se alcanzó en el tratamiento testigo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de reguladores de crecimiento en el número de hojas para *L. campestris* y *L. exaltatus*, en medio de cultivo MS.

Especies	Regulador de crecimiento	Dosis	No. promedio de hojas		
<i>L. campestris</i>	Testigo	0.0 mg L ⁻¹	2.91 ± 1.34	a	
	AIA	0.1 mg L ⁻¹	2.75 ± 1.34	ab	
		0.5 mg L ⁻¹	2.33 ± 1.34	abc	
		1.0 mg L ⁻¹	2.25 ± 1.34	abc	
	ANA	0.1 mg L ⁻¹	2.50 ± 1.34	ab	
		0.5 mg L ⁻¹	2.58 ± 1.34	ab	
		1.0 mg L ⁻¹	2.33 ± 1.34	abc	
	6 BAP	0.1 mg L ⁻¹	2.00 ± 1.34	abc	
		0.5 mg L ⁻¹	1.83 ± 1.34	abc	
		1.0 mg L ⁻¹	2.08 ± 1.34	abc	
	<i>L. exaltatus</i>	Testigo	0.0 mg L ⁻¹	1.08 ± 1.34	c
		AIA	0.1 mg L ⁻¹	2.00 ± 1.34	abc
0.5 mg L ⁻¹			1.83 ± 1.34	abc	
1.0 mg L ⁻¹			2.33 ± 1.34	abc	
ANA		0.1 mg L ⁻¹	2.00 ± 1.34	abc	
		0.5 mg L ⁻¹	1.50 ± 1.34	bc	
		1.0 mg L ⁻¹	2.08 ± 1.34	abc	
6 BAP		0.1 mg L ⁻¹	2.00 ± 1.34	abc	
		0.5 mg L ⁻¹	1.41 ± 1.34	bc	
		1.0 mg L ⁻¹	1.75 ± 1.34	abc	

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas según DMS para (p≤0.05)

Los resultados alcanzados en esta investigación para el número de hojas difieren de los obtenidos por Galek *et al.* (2008) para el híbrido *L. termis* x *L. mutabilis* MUT.628 y

L. termis con 5 hojas con una concentración de 1.5 mg L⁻¹ de IBA más 1.0 mg L⁻¹ de ANA en el medio de cultivo B5.

Las plántulas obtenidas a partir de meristemas apicales se obtuvieron en todos los tratamientos en estudio. Sin embargo, no se observó la regeneración de raíces en ninguno de los tratamientos. Aunque, la regeneración de raíces en el género *Lupinus* puede fácilmente ser inducida, cada una de las especies puede requerir una combinación diferente de reguladores de crecimiento adicionada en el medio de cultivo (Rybczynski, 2001) (Figuras 16 y 17).

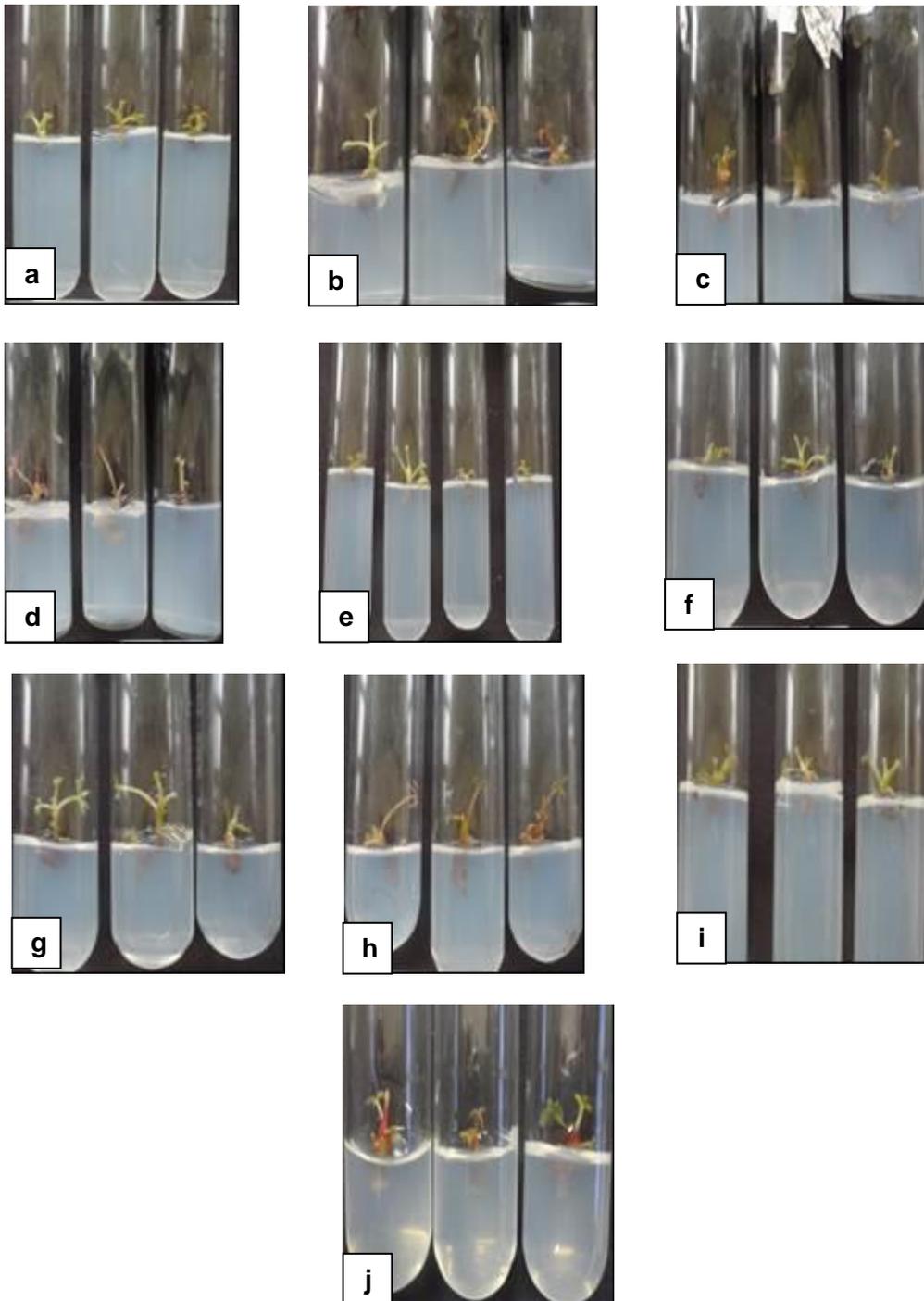


Figura 16. Efecto de reguladores de crecimiento en *L. campestris* sobre medio de cultivo MS. a) T0=Testigo, b) T1=0.1 mg L⁻¹ AIA, c) T2=0.5 mg L⁻¹ AIA , d) T3=1.0 mg L⁻¹ AIA, e) T4=0.1 mg L⁻¹ ANA, f) T5=0.5 mg L⁻¹ ANA, g) T6=1.0 mg L⁻¹ ANA, h) T7=0.1 mg L⁻¹ 6-BAP, i) T8=0.5 mg L⁻¹ 6-BAP, j) T9=1.0 mg L⁻¹ 6-BAP.

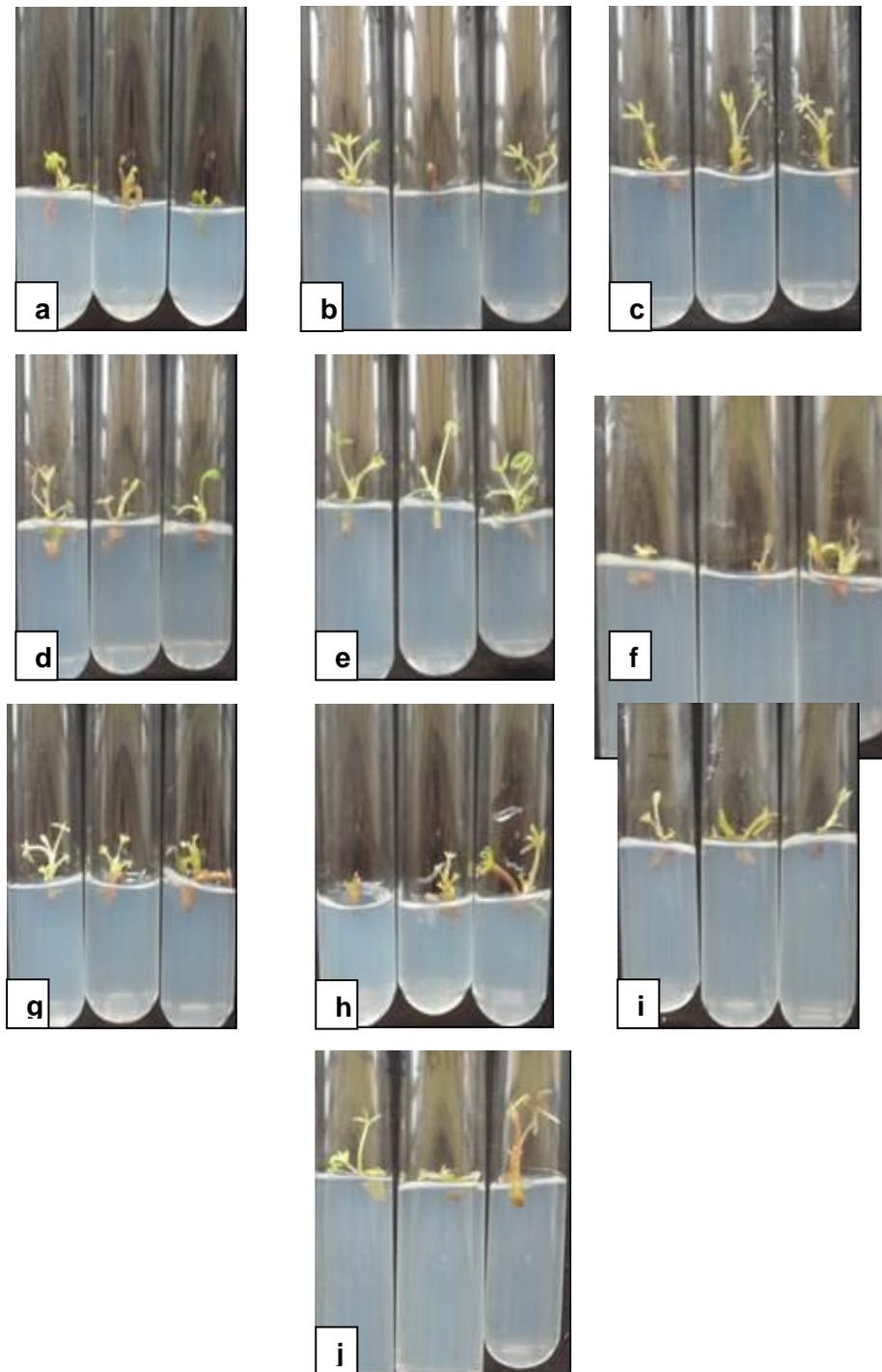


Figura 17. Efecto de reguladores de crecimiento en *L. exaltatus* sobre medio de cultivo MS. a) T0=Testigo, b) T1=0.1 mg L⁻¹ AIA, c) T2=0.5 mg L⁻¹ AIA , d) T3=1.0 mg L⁻¹ AIA, e) T4=0.1 mg L⁻¹ ANA, f) T5=0.5 mg L⁻¹ ANA, g) T6=1.0 mg L⁻¹ ANA, h) T7=0.1 mg L⁻¹ 6-BAP, i) T8=0.5 mg L⁻¹ 6-BAP, j) T9=1.0 mg L⁻¹ 6-BAP.

4.6. Evaluación del 6-BAP para inducir la formación de brotes en plántulas de *L. montanus* en medio de cultivo semisólido Gamborg *et al.* (1968).

Los resultados obtenidos en los tratamientos evaluados mostraron diferencias significativas entre ellos. Para la variable número de brotes no se observaron diferencias significativas en los tratamientos evaluados. Sin embargo, se puede observar que el mayor número de brotes (1.40) se obtuvo en el tratamiento que contenía 1.0 mg L⁻¹ de 6-BAP en el medio de cultivo y a medida que se incrementó la dosis el número de brotes disminuyó (Figura 18).

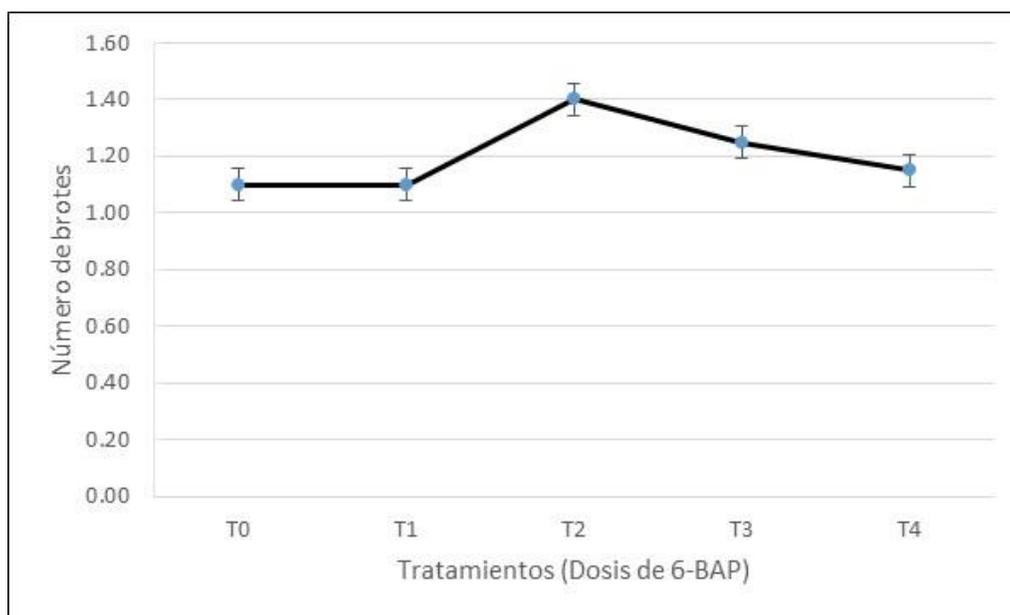


Figura 18. Efecto del 6-BAP en la proliferación de brotes de *L. montanus* en medio de cultivo Gamborg *et al.* (1968), a los 30 días de cultivo. T0=Testigo, T1=0.5 mg L⁻¹, T2=1.0 mg L⁻¹, T3=2.0 mg L⁻¹, T4=3.0 mg L⁻¹.

Resultados de esta investigación difieren de los encontrados por Ramírez-González *et al.* (2015) en *L. montanus* que obtuvieron 5.9 brotes a partir de explantes de hipocótilo y 10.1 de epicótilo cuando utilizaron una dosis de 0.53 mg L⁻¹ de AIA más 0.23 mg L⁻¹ de BA en el medio de cultivo MS. Sin embargo, concuerdan con otros autores que han

aplicado 1.0 mg L⁻¹ de BAP y dosis altas de thidiazurón (TDZ) (Sator, 1990; Rybczynski y Podyma, 1993; Harzic *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000).

Las cantidades de citoquinina aplicada en este estudio fueron superiores a las recomendadas por Rybczynski y Podyma (1993) y Pniewski *et al.* (2002). Las diferencias entre las especies de *Lupinus* en su respuesta a la citoquinina presente en el medio de cultivo para la proliferación de brotes pueden deberse a las diferentes tendencias que tienen estas especies para producir nuevos brotes. La Benzilaminopurina (BAP) es una citoquinina comúnmente utilizada para el cultivo *in vitro* de semillas de leguminosas para romper la dominancia apical que presentan ciertas especies.

En la variable altura de plántulas se observaron diferencias significativas en los tratamientos estudiados. La mayor altura de brote (2.44 cm) se obtuvo en el tratamiento que contenía una dosis de 2.0 mg L⁻¹ de 6-BAP y el menor promedio (1.70 cm) se obtuvo en el tratamiento testigo. Para la variable número de hojas el mayor valor (2.40) se encontró en el tratamiento que contenía una dosis de 3.0 mg L⁻¹, y el menor valor (1.95) se encontró en el tratamiento testigo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto del 6-BAP en las variables altura de brotes y número de hojas en *Lupinus montanus* en medio de cultivo Gamborg *et al.* (1968) a los 30 días de cultivo.

Especie	Tratamientos	Altura de brotes (cm)		Número de hojas	
<i>L. montanus</i>	Testigo	1.70 ± 0.43	b	1.95	c
	T1=0.5 mg L ⁻¹	2.30 ± 0.43	a	2.15	bc
	T2=1.0 mg L ⁻¹	2.43 ± 0.43	a	2.20	ab
	T3=2.0 mg L ⁻¹	2.44 ± 0.43	a	2.25	ab
	T4=3.0 mg L ⁻¹	2.31 ± 0.43	a	2.40	a

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas según DMS para (p≤0.05).

Los resultados obtenidos para altura de brotes en meristemos apicales cultivados en medio de cultivo adicionado con 2.0 mg L⁻¹ de 6-BAP contrastan con lo señalado por Ramírez-González *et al.* (2015). Dichos autores trabajaron con *L. montanus* obtuvieron brotes con una altura de 11.5 cm cuando combinaron 0.23 mg L⁻¹ de AIA más 0.58 mg L⁻¹ de BA, dosis más bajas de BA que las utilizadas en este estudio. Los autores observaron que el incremento en la concentración de auxina del tipo indolacético y la reducción en la concentración de BA (citoquinina) generan mayor altura de brotes que en aquellos tratamientos en los que la concentración de BA supera a la de la auxina.

En la Figura 19 se pueden observar los brotes de *L. montanus* en los tratamientos que contenían diferentes dosis de 6-BAP, empleadas para la proliferación de brotes. En los tratamientos estudiados se ven diferencias en cuanto a la altura de los brotes, número de hojas y la proliferación de brotes. No se observó iniciación de raíces ni necrosamiento en los explantes utilizados.

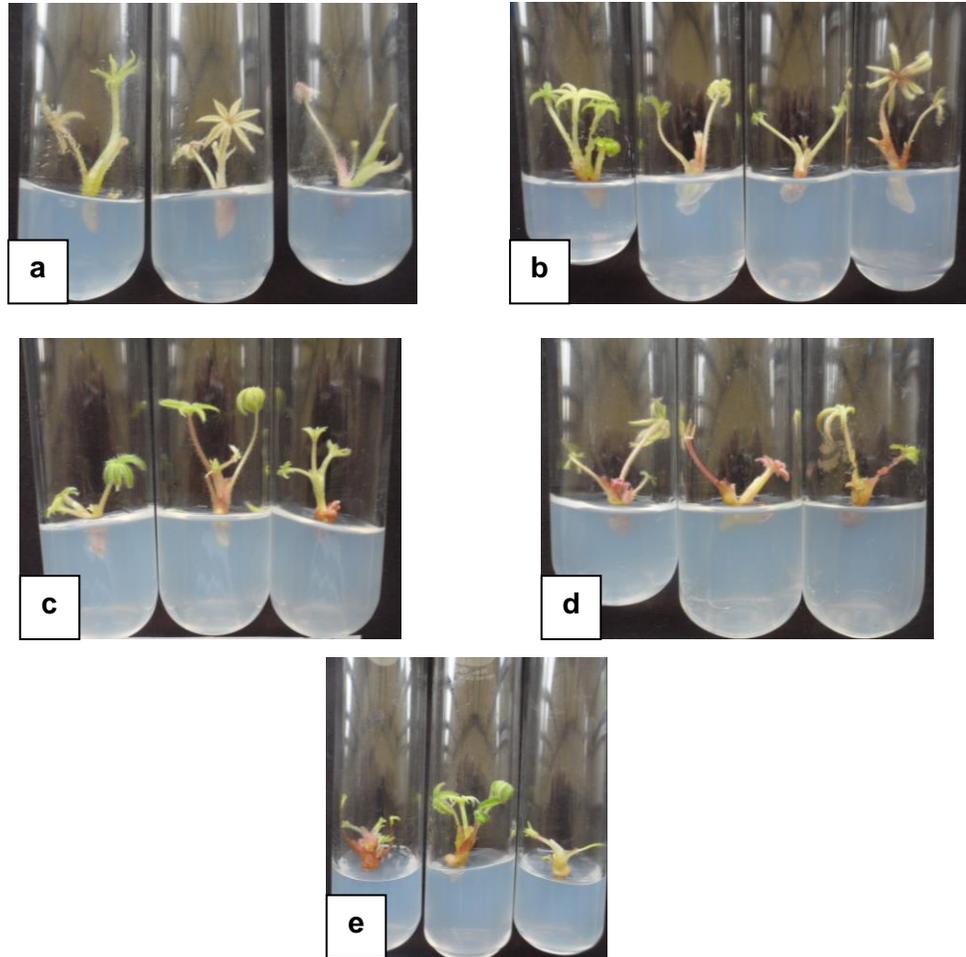


Figura 19. Efecto del 6-BAP en la proliferación de brotes de *L. montanus* en medio de cultivo Gamborg *et al.* (1968), a los 30 días de cultivo. a) Testigo, b) T1=0.5 mg L⁻¹, c) T2=1.0 mg L⁻¹, d) T3=2.0 mg L⁻¹, e) T4=3.0 mg L⁻¹.

5. CONCLUSIONES

El tiempo de inmersión afectó la germinación de las semillas de las tres especies de *Lupinus* evaluadas. En la especie de *L. campestris* y *L. exaltatus* se encontró el mayor porcentaje de germinación (67 % y 65 %) en un tiempo de inmersión de 30 minutos, para *L. montanus* el mayor porcentaje de germinación (18 %) se encontró en el tiempo de inmersión de 40 minutos.

En el medio de cultivo MS con Fe-EDTA la especie *L. campestris* mostro un porcentaje de germinación del 45 % a los 23 días de cultivo (inmersión de 30 min en H₂SO₄), cuando se suprimió el Fe-EDTA el porcentaje de germinación aumento a 54 %.

L. exaltatus cultivado en el medio de cultivo MS con Fe-EDTA obtuvo un porcentaje de germinación del 37 % y en el medio de cultivo MS sin Fe-EDTA alcanzó 52 % de germinación a los 23 días.

Las semillas de *L. montanus* cultivadas en el medio de cultivo MS con Fe-EDTA, mostraron una germinación de 10 % y en el medio de cultivo sin Fe-EDTA obtuvieron un porcentaje de germinación de 26 % a los 15 días.

L. campestris sembrado en el medio de cultivo Gamborg *et al.* (1968) con Fe-EDTA a los 12 días de cultivo se encontró un porcentaje de germinación del 39 % y a los 23 días 54 % de germinación, al cultivarlo en el medio sin el Fe-EDTA a los 12 días de cultivo mostro un 61 % de germinación y a los 23 días 64 %.

L. exaltatus cultivado en el medio Gamborg *et al.* (1968) con Fe-EDTA a los 12 días de cultivo mostro un 69 % de germinación y se incrementó a 71 % a los 23 días, no mostro diferencias significativas al suprimir el Fe-EDTA del medio.

Las semillas de *L. exaltatus* cultivado en el medio Gamborg *et al.* (1968) sin Fe-EDTA a los 12 días de cultivo obtuvo 69 % de germinación y a los 23 días 72 %.

L. montanus en el medio Gamborg *et al.* (1968) con Fe-EDTA a los 12 días se encontró un porcentaje de germinación de 19 % y a los 23 días se incrementó a 21 %, idénticos resultados se encontraron al sembrar las semillas en el medio de cultivo sin Fe-EDTA.

Para la inducción de brotes el mayor valor de 1.91 en *L. campestris* se obtuvo en el tratamiento que contenía ANA en una concentración de 0.1 mg L⁻¹. *L. exaltatus* mostro el mayor número de brotes (1.5) en el tratamiento que contenía AIA en una concentración de 1.0 mg L⁻¹. *L. montanus* registro el mayor promedio en el número de brotes (1.40) en el tratamiento que contenía 1.0 mg L⁻¹ de 6-BAP.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con los experimentos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para encontrar la dosis adecuada para la proliferación de brotes, inducir la formación de raíces.
- Estudiar otros agentes quelatantes y continuar con el protocolo de micropropagación de *Lupinus*.

7. LITERATURA CITADA

- Abbo, S., Pinhasivan-Oss, R., Gopher, A., Saranga, Y., Ofner, I., and Peleg, Z. 2014. Plant domestication versus crop evolution: a conceptual framework for cereals and grain legumes. *Trends Plant Science*, 19:351-360. doi:10.1016/j.tplants.2013.12.002
- Acosta-Percástegui, J. y D. A. Rodríguez–Trejo. 2005. Factor affecting germination and pregerminative treatments of *Lupinus montanus* seeds. *Interciencia*, 30(9):576-579.
- Aguilera, J. M., and Trier, A. 1978. The revival of the *lupin*. *Food Technology*, 32:70-76.
- Alderete-Chávez A., V. Espinosa H., E. Ojeda T., M. Ehsan, J. Pérez M., V. M. Cetina A., D.A. Rodríguez T. and N. De la Cruz L. 2008. Natural distribution and principal characteristics of *Lupinus* in the Oriental face of Tlaloc Mountain in Sierra Nevada, México. *Journal of Biological Sciences*, 8(3):604-609.
- Alexander, J. y G. Sánchez. 2002. Efecto del tratamiento de agua caliente e imbibición sobre la germinación de semillas de *Leucaena leucocephala*. *Revista Científica*, 2:581-583.
- Ball, E. 1946. Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaedum majus* L., and *Lupinus albus* L. *American Journal of Botany*, 33:301-318.
- Bansal, Y.K. y P. Pandey 1993. Micropropagation of *Sesbania aculeata* (Pers.) by adventitious organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32:315-355.
- Barney, D. V. E. 2011. Biodiversidad y Ecogeografía del género *Lupinus* L. (Leguminosae) en Colombia. Trabajo de grado presentado como requisito para

- optar el título Magister en Ciencias Biológicas línea Recursos Fitogenéticos Neotropicales. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. 81 pp.
- Barrientos D. L., A. Montenegro B. e I. Pino N. 2002. Evaluación de la fijación simbiótica de nitrógeno de *Lupinus albus* y *L. angustifolius* en un Andisol Vilcun del sur de Chile. Terra, 20:39-44.
- Baskin, J.M., and Baskin, C.C. 2000. Evolutionary considerations of claims for physical dormancy-break by microbial action and abrasion by soil particles. Seed Science Research, 10:409–413. doi:10.1017/S0960258500000453
- Baylis, J. and Hamblin J. 1986. *Lupins* in the farming system: a survey of production. In Proceedings of the Fourth International Lupin Conference, Geraldton, Western Australia, August 15-26; published for the International Lupin Association by the Department of Agriculture, 3 Baron-Hay Court, South Perth, Western Australia 6151. 161-172 pp.
- Becker, R., R. Manteuffel, D. Neumann and G. Scholz. 1998. Excessive iron accumulation in the pea mutants dgl and brz: subcellular localization of iron and ferritin. Planta, 207:217-223.
- Bermudez-Torres K., N. Robledo Q., J. Martínez H., J. Andreas and M. Wink. 2000. Biodiversity of the Genus *Lupinus* in Mexico. In E. van Santen, *et al.*, (Eds). *Lupin*, an ancient crop for the new Millenium. Proc. 9th Int. Lupin Conference. Klink/Muritz, 20-24/06/1999. International Lupin Association. Canterbury, Nueva Zealand: 294-296.
- Bermúdez-Torres K., N. Robledo Q., L. L. Barrera N. and M. Wink. 2002. Alkaloid profile of leaves and seeds of *Lupinus hintonii* C. P. Smith. Z. Naturforsch, 57:243-247.

- Bermúdez-Torres K., J. Martínez H., R. Figueroa B., M. Wink and L. Legal. 2009. Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican *Lupinus* against the lepidopteran crop pest *Spodoptera frugiperda*. *Biocontrol*, 54: 459-466.
- Bermúdez-Torres K. 2013. Colección Herbario Nacional MEXU. Revisión hecha por K. Bermúdez-Torres.
- Bewley, J.D., Bradford, K., Hilhorst, H., and Nonogaki, H. 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*, 3rd Edn. New York: Springer-Verlag. 392 pp.
- Bienfait, H.F. 1988. Mechanisms in Fe-Efficiency Reactions of Higher Plants. *J. Plant Nutrition*, 11:605-629.
- Bonilla, I. 2000. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. p. 83-97. En: Azcón-Bieto. J. y C. M. Talón (Eds.). *Fundamentos de Biología Vegetal*. 1era Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Barcelona, España. 522 pp.
- Boyer, R.F., H.M. Clark and A.P. LaRoche. 1988. Reduction and release of ferritin iron by plant phenolics. *Journal Inorganic Biochemistry*, 32:171-181.
- Cárdenas, L.M.A y Villegas M.A. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(2):213-217.
- Caris, C., P. Baret, C. Beguin, G. Serratrice, J.L. Pierre and J.P. Laulhère. 1995. Metabolization of iron by plant cells using O-Trensox, a high-affinity abiotic iron-chelating agent. *Biochemistry Journal*, 312:879-885.

- Caro, A. and Puntarulo S. 1996. Effect of *in vivo* iron supplementation on oxygen radical production by soybean roots. *Biochemical Biophys Acta*, 1291(3):245-251.
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S. and Baker, A.J.M. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8:279-284.
- Clements, J.C., B.J. Buirchell, H. Yang, P.M.C. Smith, M.W. Sweetingham and C.G. Smith. 2005. Chapter 9: *Lupin*. In: R. Singh and P. Jauhar (eds.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement, Series-II Grain Legumes*, CRC Press. *Plant Breed*, 123:266-270.
- Corona, M. A., M. Gómez R. y R. A. Lindig-Cisneros. 2007. Efecto de la escarificación y la calidad de la luz en la germinación de *Lupinus elegans*. *Biológicas*, 9:47-54.
- Corral, R., J. M. Pita and F. Pérez G. 1990. Some aspects of seed germination in four species of *Cistus* L. *Seed Science Technology*, 18(2):321-325.
- Cuanalo de la Cerda H., Ojeda T., Santos O. and Ortiz S. 1989. *Provincias, regiones y subregiones terrestres de México*. Ed. Futura-Colegio de Posgraduados. Texcoco, Estado de México. 624 pp.
- Cruz, M.S. y M. Takaki. 1983. Dormancy and germination of seed of *Cloris urthonothon*. *Seed Science Technology*, 11(2):323:329.
- Deak, M., G.V. Horvath, S. Davletova, K. Torok, L. Sass, I. Vass, B. Barna, Z. Kiraly and D. Dudits. 1999. Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Natural Biotechnology*, 17:192-196.

- Dehgan, B., Norcini, J.G., Kabat, S.M. and Pérez, H.E. 2003. Effect of Seed scarification and gibberellic acid treatment on seedling emergence of Sky-Blue Lupine (*Lupinus diffusus*). *Journal of Environmental Horticulture*, 21(2):64-67.
- De la Cruz-Landero N. 2010. Especies de leguminosas como fitorremediadoras en suelos contaminados. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Posgrado de Edafología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 123 pp.
- DIG. 2001. Diagnóstico sector leguminosas de grano-Lupino, y taller estratégico del sector. Informe Final. Diciembre 2001. Consultora Desarrollo, Innovación y Gestión Ltda., Santiago, Chile. 108 pp.
- Duchefa. 2001. Biochemicals Plant Cell and Tissue Culture. Catalogue. Zaandam, Netherlands. 164 pp.
- Dunn, D.B, 1984. Cytotaxonomy and distribution of new World *Lupin* species. Pp 68-85 In: proceeding of the Third International Lupin Conference. La Rochelle France.
- Dunn, D.B. 2001. *Lupinus*. In: Rzedowski GC, Rzedowski J, (eds). Flora Fanerogámica del Valle de México. Pátzcuaro, Michoacán: Instituto de Ecología, A.C. CONABIO, 290–300 pp.
- Eastwood, R.J., Drummond, C.S., Schifino-Wittmann, M.T. and Hughes, C.E. 2008. Diversity and evolutionary history of lupins – insights from new phylogenies. Pp. 346-354. In: Palta, J.A. and Burger, J.B. (Eds.) *Lupins for Health and Wealth*, Proceedings 12th International *Lupin* Conference, Fremantle, Australia, International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.
- Eastwood, R., and C. Hughes. 2008. Origen of domestication of *Lupinus mutabilis*. In the Andes. In: J.A. Palta and J.B. Berger (eds). 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. ISBN 0-86476-153-8.
- Fehér, A. 2006. Why somatic plant cells start to form embryos? En: A. Mujib y J. Samaj (eds.). Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monograph (2). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 85-101 pp.
- Fernández-Romero, M. D. R. Moral, J. Gil and M. Moreno. 1998. The effect of TDZ on the shoot regeneration in intact seedlings of faba bean (*Vicia faba* L.). 3rd European Conference on Gran Legumes. Valladolid. 366 pp.
- Fernández-Pascual M., J.J. Pueyo., M.R. de Felipe., M. P. Golvano and M. M. Lucas. 2007. Singular features of *Bradyrhizobium-Lupinus* symbiosis. Dynamic Soil, Dynamic Plant, 1:1-16.
- Foley, M.E. 2001. Seed dormancy: an update on terminology, physiological genetics, and quantitative trait loci regulating germinability. Weed Science, 49:305-317. doi:10.1614/0043-1745(2001)049[0305:SDAUOT]2.0.CO;2
- Galek, R., E. Sawicka-Sienkiewicz and M. Buzar. 2008. Morphogenesis potential of interspecific hybrid (*Lupinus albus* Termis x *Lupinus mutabilis* Mut. 628) and its parents in the tissue culture. In: J.A. Palta and B.J. Berger (eds). 2008. Lupins for Health and Wealth Proceedings of the 12 th International Lupin Conference, 14-18 Sep. 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. ISBN 0-86476-153-8.
- Gamborg, O.L. Miller, R. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50:151-158.

- García-López PM., Múzquiz MA., López-Ruiz MA., Zamora-Natera JF., Burbano C., Pedrosa, MM., Cuadrado C., Garzón-De la Mora P. 2001. Chemical composition and fatty acid profile of several Mexican wild *Lupins*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14:645-651.
- García, L., P. Garzón de la Mora, W. Wysocka, B. Maiztegui, M. Alzugaray, H. del Zotto and M. Boreli. 2004. Quinolizidine alkaloids isolated from *Lupinus* species enhance insulin secretion. *European Journal of Pharmacology*, 504:139-142.
- Gautheret, R. 1983. *Plant Tissue Culture: A history*. *Bot. Mag. Tokyo*, 96:393-410.
- Gladstones J. 1974. The Mediterranean white lupin". Department of Agriculture, Western Australia. *Technology Bulletin*, 26: 70-74.
- Glencross, B., D. Evans, W. Hawkins, and B. Jones. 2004. Evaluation of dietary inclusion of yellow lupin (*Lupinus luteus*) kernel meal on the growth, feed utilization and tissue histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 235(1):411-422.
- Goycokic, V. y G. Saavedra. 2007. Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *IDESIA*, 25(3):47-58.
- Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G., and Soppe, W. J.J. 2012. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environment*, 35:1769-1786. doi:10.1111/j.1365-3040.2012.02542.x
- Gulewicz P., Martínez-Villaluenga C., Frias J., Ciesiołka D., Gulewicz K., and Vidal-Valverde C. 2008. Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. *Food Chemistry*, 107:830-844.

- Gutiérrez, N. P., F. De León G., J. Etchevers B., and A. Casas F. 2010. Effect of scarification, self-inhibition, and sowing depth on seed germination of *Lupinus campestris*. Chilean Journal of Agricultural Research, 70(3):365-371.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal Experimental Botany, 53:1-11.
- Hartmann, H.T. y D. E. Kester. 1998. Propagación de plantas, principios y prácticas. Editorial Continental S. A de C. V. (CECSA). México, D. F. 810 p.
- Harzic, N.; Guilloteau, A. and Huyghe, C. 1998. *In vitro* shoot formation of *Lupinus albus* from cotyledonary node. 3rd European Conference on Grain Legumes. Valladolid, España. 369 pp.
- Hernández, F.E., R.K. Rivera, O.J. Ramos, F.C. Salinas, M. Rodríguez and K. Bermúdez. 2008. Effect of scarification treatments on germination of *Lupinus montanus* HBK seeds. In: J.A. Palta y J.B. Berger (eds.). Lupins for Health and Wealth. International Lupin Association. Canterbury, New Zealand. pp. 405-409.
- Jiménez-Martínez, G., H. Hernández-Sánchez., G. Álvarez-Manilla., N. Robledo-Quintos., J. Martínez-Herrera and G. Dávila-Ortiz. 2001. Effect of aqueous and alkaline thermal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid and tannin contents of *Lupinus campestris* seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81:421-428.
- Jiménez, M. V. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Revista Brasileira Fisiología Vegetal, 13(2):196-223.
- Jurado, E. and J. Flores. 2005. Is seed dormancy under environmental control or bound to plant traits? Journal of Vegetation Science, 16:559-564.

- Karaguzel O., Cakmakci S., Ortacesme V and Aydinoglu B. 2004. Influence of seed coat treatments on germination and early seedling growth of *Lupinus varius* L. Pak. Journal Botany, 36(1):65-74.
- Kass, E. and Wink M. 1997. Molecular phylogeny and phylogeography of the genus *Lupinus* (Family Leguminosae) inferred from nucleotide sequences of the RbcL gene and ITS +2 sequences of rDNA. Plant Syst. Evol. 208:139-167.
- Lagunes-Espinoza L.C., J. López-Upton, E. García-López, J. Jasso-Mata, A. Delgado-Alvarado y G. García-de-los-Santos. 2012. Diversidad morfológica y concentración de proteína de *Lupinus* spp., en la región Centro-Oriental del Estado de Puebla, México. Acta Botánica Mexicana, 99:73-90.
- Leifert C, Samanth P, Lumsden PJ, and Waites WM. 1992. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 30:171-179.
- Li, H., S. J. Wylie., and M.G.K. Jones. 2000. Transgenic yellow lupin (*Lupinus luteus*). Plant Cell Reports, 19:634-637.
- Lindman, R. H. 1974. Analysis of variance in complex experimental designs. W.H. Freeman and Company, EUA. ISBN-0-7167-0774-8. pp 34-36.
- Llorente, B.A. 2000. Aislamiento, purificación, caracterización y producción *in vitro* de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche. Capítulo 4. Cultivo *in vitro*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Exactas. Área Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. 201 pp.
- MacKay, W.A., Davis T.D., and Sankhla D. 1995. Influence of scarification and temperature treatments on seed germination of *Lupinus havardii*. Seed Science and Technology, 23:815-821.

- MacKay, W.A., Davis T.D., and Sankhla D. 2001. Influence of scarification and temperature on seed germination of *Lupinus arboreus*. *Seed Science and Technology*, 29:543-548.
- Matilla, A., Gallardo, M., and Puga-Hermida, M.I. 2005. Structural, physiological and molecular aspects of heterogeneity in seeds: a review. *Seed Sci. Res.* 15:63-76. doi: 10.1079/SSR2005203
- Mateo-Sagasta L. 1988. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 325 pp.
- McVaught, R. 1987. A descriptive Account of the vascular plants of Western Mexico. Leguminosae. (Ed). Mc Vaught. University of Michigan Press. pp 786.
- Medina-Sánchez, E. and R. Lindig-Cisneros. 2005. Effect of scarification and growing media on seed germination of *Lupinus elegans* H.B.K. *Seed Science and Technology*, 33:237-241.
- Molassiotis, A.N., Dimassi, K., Therios, I., and Diamantidis, G. 2003. Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalux* P. *Persica*) explants *in vitro*. *Biologia Plantarum*, 47(1):141-144.
- Morard, P. and Henry M. 1998. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. *Journal Plant Nutrition*, 21:1565-1576.
- Mroginski, L., Sansberro P. y Flaschland E. 2011. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Parte I Herramientas básicas. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (eds) Levitus, G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., y Mroginski L (Capítulo 2). Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Buenos Aires, Argentina. 648 pp.

- Murashige, T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*, 15:473-497.
- Mujica, A., S. Jacobsen and J. Izquierdo. 2002. Andean *Lupin* (*Lupinus mutabilis* Sweet.) Forty year researching Peru. In: Tenth International Lupin Conference. Laugarvatn, Iceland. pp.106.
- Ochatt, S.; B., Pasquis; C., Pontécaille and M. Rancillac. 1992. Rapid plant regeneration from juvenile explants of protein legumes. 1st European Conference on Grain Legumes Recueil de Communications Proceedings. Angers France. 367 pp.
- Olsen, R.A., and Brown, J.C. 1980. Factors related to iron uptake by dicotyledonous and monocotyledonous plants. I. pH and reductant. *Journal Plant Nutrition*, 2:629-645.
- Pablo-Pérez, M.; Lagunes-Espinoza, L. del C.; López-Upton, J.; Ramos-Juárez, J.; Aranda-Ibáñez, E.M. 2013. Morfometría, germinación y composición mineral de semillas de *Lupinus silvestres*. *Bioagro*, 25(2):101-108.
- Pascual, H. 2004. *Lupinus mariae-josephi* (Fabaceae), nueva y sorprendente especie descubierta en España. *Anales Jardín Botánico Madrid*, 61(1): 69-72.
- Petterson, D. S. 1998. Composition and food uses of *Lupinus*. In: Gladstones, J. S., C. A. Atkins y J. Hamblin (eds.). *Lupinus* as crop plant. Biology, production and utilization. CAB International. Oxon, UK. pp. 353–384.
- Pniewski, T., Kapusta, J., and Legocki, A.B. 2002. *In vitro* micropropagation of four lupin species. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(4):417-424.

- Planchuelo M. 1996. Relationship between South American and European species of *Lupinus*. In B. Pickergill and M Lock (Eds). Advances in Legume Systematic 8, Legumes of Economic importance: Royal Bot. Garden Kew Reino Unido. pp 109-116.
- Plitman, U., and C.C. Heyn. 1984. Old World lupins: Taxonomy, evolutionary relationship and links with New World species. 55-56 pp. In: Proceeding of the Third International Lupin Conference. International Lupin Association. La Rochelle, France.
- Probert, R.J. 2000. The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination, in seeds. The Ecology of Regeneration in Plant Communities. 2nd Edn, ed. M. Fenner (Wallingford: CABI publishing). 261–292. doi:10.1079/9780851994321.0261
- Przybylak, J. K., D. Ciesiolka, W. Wysocka, P. García-López, M. A. Ruiz-López, W. Wysocki and K. Gulewicz. 2005. Alkaloids profiles of Mexican wild lupin and effect of alkaloid preparation from *Lupinus exaltatus* seeds on growth and yield of paprika (*Capsicum annum* L.). Industrial Crops and Products, 21:1-7.
- Putnam, D.H. 1991. History and prospects for lupins in the upper Midwest, p. 33-40. In: Prospects for lupins in North America. Proc. Symp. March 21-22, 1991. St. Paul, MN. Center for Alternative Plant and Animal Products.
- Radice, S. 2011. Morfogénesis *in vitro*. (Capítulo 2). Parte I Herramientas básicas. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal (eds) Levitus, G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., y Mroginski L. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Buenos Aires, Argentina. 648 pp.

- Rai, M., R. Kaliaa., A. Singha., M. Gangolaa., and A. Dhawana. 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection - an overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71:89-98.
- Ramírez-González, G., Rodríguez-de la O, J.L., Arreola-Avila, J.G and Alvarez-Moctezuma, J.G. 2015. Morphogenic responses of three explants of *Lupinus montanus* (H.B.K.) cultured *in vitro*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 21(1):17-27.
- Reinert, J. 1958. Morphogenese und ihre Kontrolle and Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaften*, 45:344-345.
- Rodríguez-Ambriz, S.L., A.L. Martínez-Ayala, F. Millán and G. Dávila-Ortiz. 2005. Composition and functional properties of *Lupinus campestris* protein isolates. *Plant Foods Human Nutrition*, 60:99-107.
- Ruíz-López, P.M., García L., Castañeda V., Garzón M., Bañuelos P., Burbano C., Pedrosa M., Cuadrado C., and Múzquiz M. 2000. Chemical composition and antinutrient content of three *Lupinus* species from Jalisco, Mexico. *J. Food Comp. and Anal.*13:193-199.
- Ruíz-López M. A., M. R. Rodríguez y S. Navarro P. 2006. Evaluación químico-nutricional de *Lupinus exaltatus* Zucc., del Nevado de Colima, México, como fuente potencial de forraje. *Interciencia*, 31:758-761.
- Ruiz-Moreno, J. J., M. A. Ruiz-López and J. F. Zamora-Natera. 2000. The genus *Lupinus*: taxonomy and distribution in Jalisco, Mexico. In: van Santen, E., M. Wink, S. Weissman y P. Roemer (eds.). *Lupin an ancient crop for the new millennium. Proceedings of the 9th International Lupin Conference. 20-24 June, 1999. Klink, Alemania. pp. 297-300.*

- Ruiz-Moreno J.J. and Zamora-Natera J.F. 2006. Distribución de algunos lupinos silvestre en la zona occidente de México. In: Bañuelos P.J., Ruiz L.M., Soltero Q.R. and Castañeda V.H. Eds. Lupinos del Occidente de México: Estudios Biológico, Bioquímico y Toxicológico, pp. 33-52, Universidad de Guadalajara, Guadalajara.
- Ruzic D, Saric M, Cerovic R, and Culafic L. 2000. Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 63:9-14.
- Rybczynski, J. J. and E. Podyma. 1993. Preliminary studies of plant regeneration via somatic embryogenesis induced on immature cotyledons of white lupins (*Lupinus albus*). Gen. Pol. 34(3):249-257.
- Rybczynski, J.J. 2001. Biotechnologia lubinów (Przegląd literatury). Zeszyty Naukowe AR Wrocław, 427:93-114.
- Rzedowski, G. y J. Rzedowski. 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México. 2° edición. Instituto de Ecología, A.C.- Centro Regional del Bajío Comisión Nacional del Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, D.F. 1406 pp.
- Sanint, L.R. 2010. Nuevos retos y grandes oportunidades tecnológicas para los sistemas arroceros: producción, seguridad alimentaria, y disminución de la pobreza en América Latina y el Caribe. Capítulo 1. 3-13 pp. En: Producción ecoeficiente del arroz en América Latina. Tomo I. Capítulos 1-24. (eds.) Degiovanni, B.V., Martínez R.C.P. y Motta O.F. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 513 pp.
- Santa Cruz R. M. E. 2001. Distribución, abundancia y regeneración *in vitro* de *Lupinus stipulatus* J. Agardh (Leguminosae) del Nevado de Colima. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas. Universidad de Guadalajara. Centro

- Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Guadalajara, Jalisco. 70 pp.
- Sator, C. 1990. *Lupinus* (*Lupinus* spp.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 10:288-311.
- Sekmen, A., I. Turkan, Z. Tanyolac., C. Ozfidan., and A. Dinc. 2012. Different antioxidant defense responses to salt stress during germination and vegetative stages of endemic halophyte *Gypsophila ob lanceolata* Bark. *Environmental and Experimental Botany*, 77:63-76.
- Simola, L. K. 2000. Harry Waris a pioneer in somatic embryogenesis. En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*. (6):1-16. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Smith, C.P. 1938-1952. *Species Lupinorum*. Published privately by the author, Saratoga, California, USA.
- Sroga, G.E. 1987. Plant regeneration of two *Lupinus* spp., from callus culture via organogenesis. *Plant Science*, 51:245-249.
- Steward, F. C., Mapes M. O. and Mears K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II: Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal Botany*, 45:705-708.
- Sujak, A., A. Kotlarz and W. Strobel. 2006. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food Chemistry*, 98:711-719.
- Swiecicki, W., J. Rybczynski and W. K. Swiecicki. 2000. Domestication and genetics of the yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) and the biotechnological improvement of *Lupinus*. *Journal Appl. Genetic*, 41(1):1-34.

- Upadhyaya, A., T. D. Davis, D. Sankhla y N. Sankhla. 1992. Micropropagation of *Lupinus texensis* from cotyledonary node explants. HortScience, 27(11):1222-1223.
- Takhtajan, A. 2009. Flowering Plants. 2a. Edition Editorial Springer Netherlands. 871 pp. DOI:10.1007/978-1-4020-9609-9.
- Turkan, I., and T. Demiral. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. Environmental and Experimental Botany, 67:2-9.
- Turner B. 1995. A new species of *Lupinus* (Fabaceae) from Oaxaca, México: A Shrub or tree mostly three to eight meters high. Phytology, 79:102-107.
- Villaseñor, R. J. L. y F. J. Espinosa. 1998. Catálogo de malezas de México. Ediciones Científicas Universitarias. Serie Texto Científico Universitario. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica. México, D.F., México. 449 pp.
- Villavicencio, M. A., B. E. Pérez-Escandón y A. Ramírez-Aguirre. 1998. Lista florística del estado de Hidalgo. Recopilación bibliográfica. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo. 147 pp.
- Wetmore, R.H. 1954. The use of *in vitro* cultures in the investigation of growth and differentiation in vascular plants. Brookhaven Symp. Biol. 6:22-38.
- Wink, M., Meizner C., and Witte L. 1995. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. Phytochemistry, 38:139-153.
- Zamora, J. F. and Terrazas T. 2012. Foliar and petiole anatomy of four species of *Lupinus* (Fabaceae). Revista Mexicana de Biodiversidad, 83:687-697.

Páginas de internet consultadas

Agüero, T. 2008. El cultivo del lupino y su mercado. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile. Disponible en: [www.odepa.cl/articulo/el cultivo-del-lupino-y-su-mercado-5](http://www.odepa.cl/articulo/el_cultivo-del-lupino-y-su-mercado-5). Consultado el 30 de marzo de 2015.

FAO. 2010. Organización Cultivos Andinos, Tarwi o Chocho (*Lupinus mutabilis*) [monografía en internet]. Disponible en: http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro10/cap03_1_3.htm última consulta: 11 de febrero de 2015

Harada, J. J. and Kwong W.R. 2003. Plant embryogenesis (Zygotic and Somatic). En: Encyclopedia of Life Sciences, London: Nature Publishing Group. En línea: <http://www.els.net>. Consulta 5 de junio de 2014.