

Polibotánica

ISSN electrónico: 2395-9525

polibotanica@gmail.com

Instituto Politécnico Nacional

México

<http://www.polibotanica.mx>

GERMINACIÓN E INDUCCIÓN DE CALLO PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES DE DOS ESPECIES DE *Lupinus* EN CONDICIONES *in vitro*

GERMINATION AND CALLUS INDUCTION FOR ALKALOID PRODUCTION OF TWO *Lupinus* SPECIES UNDER *in vitro* CONDITIONS

Salcedo-Morales, G.; K. Morales-Muñoz; G. Paredes-Sastre; J.A. Valdovinos-Bazaldúa; A.B. Castrejón-Lorenzo; F. Rosales-de la Vega; Y. León Romero; E. Montes Hernández; I. Mejía Vigueras y K. Bermúdez-Torres

GERMINACIÓN E INDUCCIÓN DE CALLO PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES DE DOS ESPECIES DE *Lupinus* EN CONDICIONES *in vitro*

GERMINATION AND CALLUS INDUCTION FOR ALKALOID PRODUCTION OF TWO *Lupinus* SPECIES UNDER *in vitro* CONDITIONS



Germinación e inducción de callo para la producción de alcaloides de dos especies de *Lupinus* en condiciones *in vitro*

Germination and callus induction for alkaloid production of two *Lupinus* species under *in vitro* conditions

Salcedo-Morales, G.;
K. Morales-Muñoz;
G. Paredes-Sastre;
J.A. Valdovinos-Bazaldua;
A.B. Castrejón-Lorenzo;
F. Rosales-de la Vega;
Y. León-Romero;
E. Montes-Hernández;
I. Mejía-Vigueras
y K. Bermúdez-Torres

**GERMINACIÓN E
INDUCCIÓN DE CALLO
PARA LA PRODUCCIÓN DE
ALCALOIDES DE DOS
ESPECIES DE *Lupinus* EN
CONDICIONES *in vitro***

**GERMINATION AND
CALLUS INDUCTION FOR
ALKALOID PRODUCTION
OF TWO *Lupinus* SPECIES
UNDER *in vitro* CONDITIONS**

POLIBOTÁNICA
Instituto Politécnico Nacional

Núm. 57: 183-197. Enero 2024

DOI:
10.18387/polibotanica.57.11

Guadalupe Salcedo-Morales
<https://orcid.org/0000-0003-0909-0551>

*Lab. de Cultivo de Células vegetales, Depto. de Biotecnología,
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional.
Calle CEPROBI núm. 8, Colonia San Isidro, CP 62730, Yautepec, Morelos*

Karina Morales-Muñoz
Guadalupe Paredes-Sastre

*Universidad Politécnica de Tlaxcala. A. Universidad Politécnica, No.1,
San Pedro Xalcatzinco, 90180 Tlaxcala*

José Alfredo Valdovinos-Bazaldua
Ana Belem Castrejón-Lorenzo
Franco Rosales-de la Vega

*Universidad Politécnica del Estado de Morelos,
P. Cuauhnáhuac 566, Lomas del Texcal, 62574 Jiutepec, Mor.*

Yatzil León-Romero

<https://orcid.org/0000-0001-5913-9443>

*Centro Interdisciplinario de Ciencias de la Salud Unidad Milpa Alta IPN
Carretera Xochimilco - Oaxtepec Km 39.5, 12000 Milpa Alta, CDMX*

Edith Montes-Hernández

<https://orcid.org/0009-0007-6280-8776>

*Tecnológico de Estudios Superiores de Ixtapaluca,
Ciudad Nezahualcóyotl, México, México.*

Israel Mejía-Vigueras

*Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional.
Calle CEPROBI núm. 8, Colonia San Isidro, CP 62730, Yautepec, Morelos.*

Kalina Bermúdez-Torres / kbermudes@ipn.mx

<https://orcid.org/0000-0002-7267-7657>

*Depto. de Biotecnología, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos,
Instituto Politécnico Nacional. Calle CEPROBI núm. 8,
Colonia San Isidro, CP 62730, Yautepec, Morelos*

RESUMEN: *Lupinus* sintetiza alcaloides quinolizídicos (AQ) como estrategia de defensa en contra de herbívoros. Estos compuestos tienen una amplia variedad de aplicaciones; sin embargo, es necesario contar con la suficiente cantidad de materia prima para satisfacer las necesidades del mercado. Las especies ricas en estos compuestos son especies silvestres, lo que limita la obtención de la materia prima. Una de las estrategias para la obtención de materia prima y la producción de metabolitos secundarios es el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales. En este trabajo se reporta la caracterización de la germinación, la inducción de callo de *Lupinus bilineatus* y *L. montanus* y la caracterización del crecimiento *in vitro* y producción de AQ. El medio de cultivo y el protocolo de escarificación

permitieron la germinación de las semillas de ambas especies a los 12 días con porcentajes de 100% para *L. bilineatus* y de 74% para *L. montanus*. Con respecto a la inducción de callo, se empleó un barrido de concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) y cinetina (CIN) utilizando como explante cotiledón, hipocótilo y raíz. La mejor respuesta para la inducción de callo para ambas especies se presentó usando raíz con una combinación de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de CIN para *L. bilineatus* y 1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de CIN para *L. montanus*, en ambos casos se obtuvo callo friable con dos coloraciones: verde y beige. El crecimiento y la producción de AQ se caracterizaron para el callo verde, pues los AQ se sintetizan en tejidos fotosintéticos. La cinética de crecimiento muestra una característica curva de tres fases, una fase de adaptación que se alarga hasta el día siete, la fase de crecimiento más rápido y finalmente una fase de senescencia que inicia el día 18. La producción de AQ se observó el día 21. Este trabajo contribuye al conocimiento del comportamiento de la germinación, la inducción de tejido desdiferenciado y el crecimiento y producción de alcaloides en un cultivo de callo de dos especies de *Lupinus*, *L. montanus* y *L. bilineatus*, ambas con potencial en la industria química y de agroquímicos.

Palabras clave: Germinación, *in vitro*, callogénesis, *Lupinus montanus*, *Lupinus bilineatus*, Alcaloides quinolizidínicos

ABSTRACT: *Lupinus* synthesizes quinolizidine alkaloids (AQ) as a defense strategy against herbivores. These compounds have a wide variety of applications; however, it is necessary to have a sufficient amount of raw material to satisfy market needs. The species rich in these compounds are wild species, which limits the obtaining of the raw material. One of the strategies for obtaining raw material and producing secondary metabolites is the use of biotechnological tools such as plant tissue culture. In this work we report the characterization of germination, callus induction of *Lupinus bilineatus* and *L. montanus* and the characterization of in vitro growth and AQ production. The culture medium and seed scarification protocol allowed the germination of seeds of both species with percentages at 12 days of 100% for *L. bilineatus* and 74% for *L. montanus*. With respect to callus induction, a sweep of indolbutyric acid (2,4-D) and cinetin (CIN) concentrations was employed using leaf, stem and root as explants. The best response for callus induction for both species was presented using root with a combination of 2 mg L⁻¹ of 2,4-D and 1 mg L⁻¹ of CIN for *L. bilineatus* and 1 mg L⁻¹ of 2,4-D and 0.5 mg L⁻¹ of CIN for *L. montanus*, in both cases friable callus was obtained with two colorations: green and beige. Growth and AQ production were characterized for green callus, since AQ are synthesized in photosynthetic tissues. The growth kinetics shows a characteristic three-phase curve, an adaptation phase extending to day seven, the fastest growth phase and finally a senescence phase starting on day 18. AQ production was observed on day 21. This work contributes to the knowledge of germination behavior, the induction of dedifferentiated tissue and the growth and production of alkaloids in a callus culture in two species of *Lupinus*, *L. montanus* and *L. bilineatus*, both with potential in the chemical and agrochemical industry.

Key words: Germination, *in vitro*, callogenesis, *Lupinus montanus*, *Lupinus bilineatus*, Quinolizidine alkaloids.

INTRODUCCIÓN

En el mundo se han descrito cerca de 280 especies de *Lupinus* (Eastwood *et al.*, 2008), siendo México unos de los centros secundarios de diversificación. En nuestro país se han reportado entre 65 y 110 especies del género *Lupinus*, que representan entre el 23 al 40% de las especies a nivel mundial (Bermúdez Torres *et al.*, 1999; Sousa & Delgado, 1998). Las especies de ese género han sido utilizadas desde los tiempos de los romanos, griegos e incas como fuente de proteína vegetal (Clements *et al.*, 2005; Domínguez *et al.*, 2023; Gladstones, 1998). Las especies del género *Lupinus* sintetizan alcaloides quinolizidínicos (AQ) como estrategia de defensa contra herbívoros (Wink, 1993; Wink *et al.*, 1995). Estos compuestos tienen una gran diversidad de actividades biológicas que les confieren potencial en la industria de los agroquímicos como fuente de bioinsecticidas (Ruiz-López *et al.*, 2010; Wink *et al.*, 1995), en la

industria química como fuente de catalizadores quirales (Regla *et al.*, 2019) y en la industria farmacéutica como moduladores de la secreción de insulina (García López *et al.*, 2004), entre otros. Nuestro grupo de investigación ha evidenciado que los extractos de AQ de *L. bilineatus* presentan actividad larvicia y larvística sobre larvas de *Aedes aegypti*, vector del dengue y *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero del maíz (Bermúdez-Torres *et al.*, 2009, 2017; Michi Flores, 2016; Reyes Izquierdo, 2013). Para el abasto de estos compuestos se requieren grandes cantidades de materia prima; sin embargo, ambas especies son silvestres, lo que limita la obtención de este material. Una alternativa interesante es el cultivo *in vitro*, que permite la propagación y crecimiento de las especies de interés en condiciones controladas y la producción inducida de los AQ. Al respecto, Montes-Hernández (2010) reporta la inducción de callo y suspensiones de *L. aschenbornii*, indicando que bajo estas condiciones es posible obtener AQ; sin embargo, la producción de AQ es dos a tres órdenes menores a lo reportado para la planta, por lo que será necesario incluir a futuro procedimientos de elicitation para incrementar la producción de estos compuestos. Con base en el potencial de las especies mexicanas de *Lupinus* como fuentes de moléculas de interés y la necesidad de obtener suficiente materia prima, este trabajo tuvo como objetivo establecer las condiciones de germinación, inducción de callo y producción de alcaloides en dos especies de *Lupinus*, *L. montanus* y *L. bilineatus* en condiciones *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizaron semillas de *L. bilineatus* y *L. montanus* que fueron recolectadas en el Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatépetl, Estado de México, México y almacenadas a 4°C y 8-12% de humedad relativa. Los datos de colecta de las semillas de las dos especies se muestran en la tabla 1. Las semillas fueron desinfectadas y escarificadas de acuerdo con el protocolo reportado por Ramírez-Betancourt (2019).

Tabla 1. Datos geográficos de la colecta de las especies de *Lupinus*.
Table 1. Geographical Data of the Collection of *Lupinus* Species.

Especie	Código de población	Altitud (m s.n.m)	Longitud	Latitud	Fecha de colecta
<i>L. bilineatus</i> (No. de Voucher: MEXU 1297305)	LIP2camp	2937	N19°04'30.2"	W98°42'02.2",	Agosto del 2018
<i>L. montanus</i> (No. de Voucher: MEXU 1297279)	LIP2mon	3889	N19°08'26.8"	W98°38'59.8"	Septiembre del 2016

Germinación. Se sembraron 50 semillas de cada una de las especies de *Lupinus* en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) al 100% (Murashige y Skoog, 1962; Sigma-Aldrich) a razón de 4.4 g L⁻¹, suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2.2 g L⁻¹ de fitagel y ajustado a un pH de 5.8. Se sembraron cinco semillas por frasco y se cultivaron en un cuarto de cultivo a 25 °C de temperatura, un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad y una humedad relativa del 90%. Las semillas se observaron durante 12 días, se evaluaron las siguientes variables: emergencia y tamaño de radícula, documentadas mediante fotografías.

Inducción de callo de *L. montanus* y *L. bilineatus*. Para la inducción de callo se sembraron explantes de raíz, hipocótilo y cotiledón de aproximadamente 1cm de longitud en medio semisólido MS, suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹), fitagel (2.2 g L⁻¹), adicionado con

combinaciones de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D, 0.5, 1 y 2 mg L⁻¹) y cinetina (CIN, 0.0, 0.5 y 1 mg L⁻¹). El pH de los medios se ajustó a 5.8. La raíz y el hipocótilo fueron sembrados colocándolos sobre el medio de manera horizontal y para el caso de los cotiledones fueron sembrados con el haz hacia arriba, se colocaron cuatro explantes por frasco, de un total de 8 frascos. Las variables que se evaluaron fueron hinchamiento y formación de callo.

Crecimiento *in vitro* de células desdiferenciadas de *L. montanus* y *L. bilineatus*. Para realizar la cinética de crecimiento, se sembraron 0.25 g de biomasa obtenida de callos sembrados en medio semisólido MS, suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹) y fitagel (2.2 g L⁻¹). Los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.8 y se adicionó la combinación de reguladores que dio la mejor respuesta a la formación de callo para cada especie. Se cosecharon cuatro frascos en los días 0, 3, 7, 11 17 y 21 y se determinaron la biomasa fresca (BF) y biomasa seca (BS). Para la determinación de BF, las muestras fueron filtradas en una malla de 60 micras y se pesaron en una balanza analítica. Para determinar la BS las muestras fueron secadas en un horno a 40 °C por 48 h hasta peso constante y se pesaron en una balanza analítica. Se calculó la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\text{Velocidad específica de crecimiento} \quad \text{Tiempo de duplicación}$$

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_0}{t_f - t_0} \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde:

Xf= Biomasa final

Xo= Biomasa inicial

tf= Tiempo final

to= Tiempo inicial

Determinación de AQ. Los AQ fueron extraídos utilizando el protocolo reportado por Ramírez-Betancourt *et al.* (2021) y determinados por cromatografía de capa fina, utilizando como fase móvil ciclohexano (C₆H₁₂) y dietilamina (C₄H₁₁N), las placas fueron documentadas con el equipo Visualizer (CAMAG, Suiza) y el protocolo reportado por Ramírez-Betancourt (2019). Las muestras analizadas se colectaron a los 0, 3, 7, 11 17, y 21 días, correspondientes a la cinética de crecimiento y producción, para el análisis de los AQ las muestras cuatro muestras se unificaron.

RESULTADOS

Germinación de las especies de *Lupinus*

Los resultados muestran que al cuarto día el porcentaje de semillas germinadas fue igual o superior al 70% para ambas especies, 78 y 70% *L. bilineatus* y *L. montanus*, respectivamente, mientras que a partir del día siete el proceso de germinación en el caso de *L. montanus* se estancó en 74%, la germinación de las semillas de *L. bilineatus* continuó incrementando paulatinamente de 78% al 4to día, a 80% en el 5to, 88% al 6to, 92% al 7mo, llegando a 100% en el 12vo día (Figura 1). Tomando en cuenta los reportes sobre germinación de semillas, los resultados sugieren que las condiciones para la germinación de las semillas que se utilizaron para ambas especies de *Lupinus* fueron las adecuadas, ya que ambas tuvieron porcentajes mayores al 70% (Wolny *et al.*, 2018) y fueron mayores a lo reportado por Pablo Pérez *et al.*, (2013) para *L. montanus* (48%).

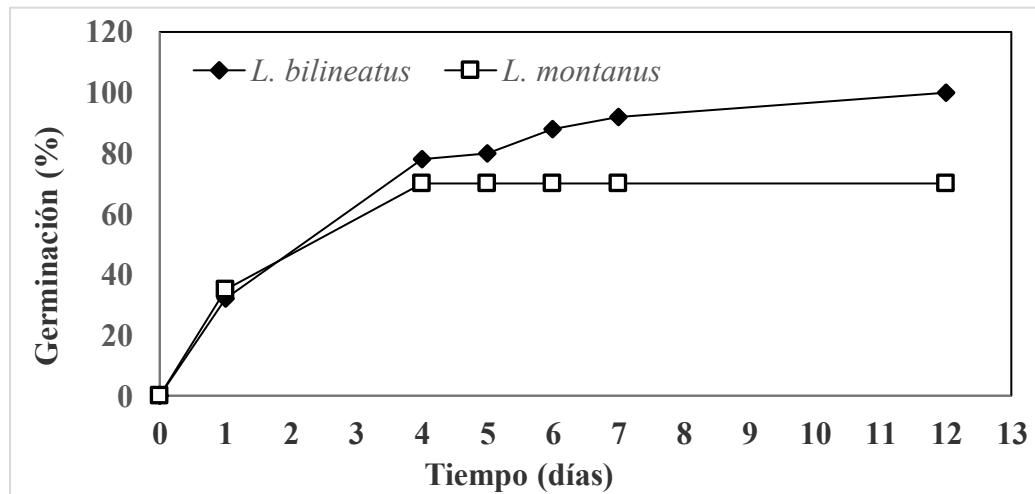


Figura 1. Germinación de *L. bilineatus* y *L. montanus*.

Figure 1. Germination of *L. bilineatus* and *L. montanus*.

Durante el proceso de germinación se realizaron observaciones del desarrollo en ambas especies, desde el inicio hasta el día 12 (Figura 2 y Figura 3). En el caso de *L. bilineatus*, las semillas presentaron una coloración entre amarilla y café con moteos oscuros, de acuerdo con lo ya reportado por Ramírez-Betancourt (2019). A partir del día uno (Figura 2B) se observó el rompimiento de la testa, dando inicio al crecimiento radicular (flecha roja) con una coloración amarilla y una longitud aproximada de 0.4 mm. Lo anterior corresponde a lo reportado por Wolny *et al.* (2018), quien define que la germinación de una semilla inicia con la absorción de agua y finaliza cuando la radícula sobresale de la estructura que la cubre, en este caso la testa, así como la emergencia del eje embrionario o radícula (Bewley, 1997). Wolny *et al.* (2018) reportan que durante el proceso de germinación hay tres fases, en la fase I hay una relación muy estricta con la tasa de absorción de agua (imbibición de agua por la semilla seca), hasta llegar a una completa hidratación de la semilla. Posteriormente, en la fase II hay una completa hidratación de la semilla, por lo tanto, ya no hay un requerimiento de agua. Finalmente, se tiene la fase III donde hay un aumento en la absorción del agua y está relacionada con la terminación de la germinación. Lo anterior, correlaciona con lo observado en este trabajo, ya que inicialmente las semillas de ambas especies vegetales mostraron un proceso de hinchamiento referido a la absorción de agua y posteriormente, la emergencia de la radícula, *in stricto sensu*, momento de la germinación. Posteriormente, en el día cuatro se observó un incremento en el crecimiento radicular hasta 5 veces más (llegando a aproximadamente 4.5 cm), adoptando una forma curva (flecha roja) y cambiando a un color crema (Figura 2C). En el día seis la raíz se sumergió en el medio de cultivo y se observó la presencia de vellosidades de aproximadamente 0.2 a 0.5 mm de longitud (flecha negra), además de que se observaron cambios en la coloración de esta, mientras que en la parte superior mostró un tono rosado, en la parte inferior la coloración fue crema (Figura 2D); en esta etapa de crecimiento la raíz presentó una longitud de hasta 7.7 cm. A partir del día siete se observó un crecimiento vertical y la presencia de vellosidades (Figura 2 EFG; flecha negra). En el día 12, continuó el crecimiento y desarrollo de las plántulas sin desprendimiento de la testa (Figura 2HIJK) y en algunos casos se llegaron a observar los cotiledones (Figura 2 IJ), indicados con una flecha roja, de tal forma que, en esta especie vegetal no se observó el desprendimiento de la testa y el desarrollo de las plántulas en su mayoría llegó a una altura de 6.5 cm, al límite superior del frasco Gerber (Figura 2 K).

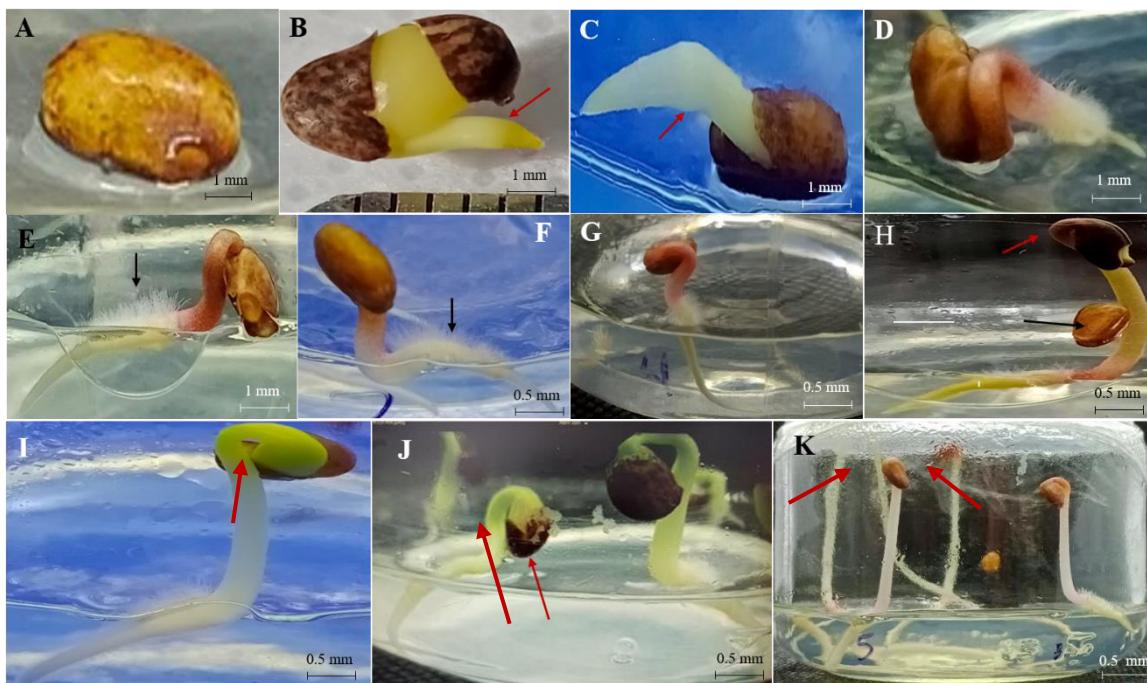


Figura 2. Germinación de semillas de *Lupinus bilineatus* después de 12 días de incubación a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A) Día 1, B) Día 2, C) Día 4, D) Día 6, EFG) Día 7, HIJK) Día 12.

Figure 2. Germination of *Lupinus bilineatus* seeds after 12 days of incubation at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A) Day 1, B) Day 2, C) Day 4, D) Day 6, EFG) Day 7, HIJK) Day 12.

Las semillas de *L. montanus* presentaron una coloración cremosa con pequeños puntos color café (Figura 3A) y un tamaño entre 0.4 y 0.7 mm, las semillas más grandes tardaron hasta dos días en romper la testa; mientras que, en las semillas más pequeñas la radícula se pudo observar a partir del día uno con una longitud de hasta 0.4 cm (Figura 3B). Posteriormente, al día cuatro la radícula llegó a una longitud de hasta 4.5 cm, evidenciando un incremento del 99% respecto al día uno (Figura 3D) y se observó como la radícula se sumergió en el medio de cultivo (flecha roja) buscando un soporte más firme. En el día cinco no hubo un crecimiento evidente de la radícula, sin embargo, se observó el crecimiento de pequeños pelos radiculares de aproximadamente 0.5 mm de longitud (flecha negra, Figura 3E), así como el inicio del desprendimiento de la testa (flecha roja). El crecimiento de la radícula continuó durante los días seis, siete y ocho, hasta alcanzar 3.3 cm de longitud (Figura 3 FGH). El proceso de desprendimiento de la testa continuó durante los días 9, 10 y 11 (Figura 3 IJK) y fue hasta el día 12 cuando la testa se desprendió totalmente, a diferencia de *L. bilineatus*, que mantuvo la testa. Hasta este día 12 las plántulas alcanzaron una longitud aproximada de 9.5 cm. A partir de las plántulas, se realizó la inducción de tejido desdiferenciado (callos).



Figura 3. Germinación de semillas de *L. montanus*. A) 0 día, B) 2 días, C) 3 días, D) 4 días, E) 5 días, F) 6 días, G) 7 días, H) 8 días, I) 9 días, J) 10 días, K) 11 días, L) 12 días.

Figure 3. Germination of *L. montanus* seeds. A) 0 days, B) 2 days, C) 3 days, D) 4 days, E) 5 days, F) 6 days, G) 7 days, H) 8 days, I) 9 days, J) 10 days, K) 11 days, L) 12 days.

Inducción de tejido desdiferenciado a partir de explantes de *L. bilineatus* y *L. montanus*

Con respecto a la respuesta a la inducción de callo utilizando las condiciones mencionadas en materiales y métodos, los resultados muestran que, en cuanto a la combinación de reguladores, *L. bilineatus* presentó mayores porcentajes de inducción de callo con 2,4-D (1mg mL^{-1}) y Cin (1 mg mL^{-1}), mientras que *L. montanus* con 2,4-D (1mg mL^{-1}) y Cin (0.5 mg mL^{-1}) (Tabla 2).

Tabla 2. Inducción de tejido desdiferenciado en dos especies de *Lupinus* empleando una combinación de 2,4-D y Cin.

Table 2. Induction of undifferentiated tissue in two *Lupinus* species using a combination of 2,4-D and Cin.

Explante	2,4-D (mg/mL)	Cin (mg/mL)	Respuesta a la formación de callo	
			<i>L. bilineatus</i>	<i>L. montanus</i>
Raíz	0.5	0.5	-	-
	1	0.5	-	+
	2	1	+	-
Cotiledón	0.5	0.5	-	-
	1	0.5	-	-
	2	1	-	-
Hipocótilo	0.5	0.5	-	-
	1	0.5	-	-
	2	1	-	-

La desdiferenciación del tejido inicia con un proceso de hinchamiento, los explantes de raíz de *L. bilineatus* con una combinación de reguladores de crecimiento 2,4-D (1 mg mL⁻¹) y Cin (1 mg mL⁻¹), mostraron una respuesta del 85% de hinchamiento con respecto a 71 y 33% en relación con lo observado con cotiledón y tallo, respectivamente. Como se puede observar con cotiledón, solo cuatro de 17 explantes que pasaron por un proceso de hinchamiento, dieron respuesta a la formación de callo (Tabla 3). Así mismo, cuando se utilizó como explante hipocótilo, de nueve cortes solo el 44% dio respuesta a la formación de callo, contrariamente a lo observado cuando se utilizó raíz, donde el 75% de los explantes dieron respuesta a la formación de callo. Con respecto a *L. montanus* (Tabla 4) con una combinación de reguladores de crecimiento de 2,4-D (1 mg mL⁻¹) y Cin (0.5 mg mL⁻¹), se observó una respuesta de hinchamiento de los explantes del 40%, 100% y 40% con raíz, cotiledón e hipocótilo, respectivamente, obteniendo una mayor respuesta respecto a lo observado con *L. bilineatus*. Así mismo, la mejor respuesta a la formación de callo se dio empleando como explante la raíz (100%). A una semana de haber sembrado los explantes de ambas especies de *Lupinus*, el explante de raíz de *L. bilineatus* mostró formación de callo en el tratamiento de 2,4-D de 2 mg L⁻¹ y Cn 1 mg L⁻¹ a partir del día 7, mientras que el explante de raíz de *L. montanus* mostró formación de callo hasta el día 11 con una concentración de 2,4-D de 1 mg L⁻¹ y Cn 0.5 mg L⁻¹.

Tabla 3. Respuesta de los explantes de *Lupinus bilineatus* al tratamiento para inducción de callo.

Table 3. Response of *Lupinus bilineatus* explants to callus induction treatment.

Explante	No. de explantes	% de cada explante	No. de explantes hinchados	% de explantes hinchados	No. de explantes con callo	% de explantes con callo
Cotiledón	24	100	17	70.8	4	16.7
Raíz	28	100	24	85.7	21	75
Hipocótilo	27	100	9	33.3	4	33.3

Tabla 4. Respuesta de los explantes de *Lupinus montanus* tratamiento para inducción de callo.

Explante	No. de explantes	% de cada explante	No. de explantes hinchados	% de explantes hinchados	No. de explantes con callo	% explantes con callo
Cotiledón	25	100	10	40	4	16
Raíz	25	100	25	100	25	100
Hipocótilo	25	100	10	40	3	12

En el caso del explante de hipocótilo se observó la emergencia de pequeñas hojas adventicias a la semana de haber sido sembrados, mientras que los explantes de cotiledones experimentaron una elongación, pero no hubo una buena respuesta a la formación de callo (Figura 4B), lo anterior fue observado con ambas especies de *Lupinus*, mientras que el explante de raíz presentó a las dos semanas un proceso de hinchamiento y posteriormente al mes se pudo observar la presencia de callo friable de pigmentación verde y beige (Figura 4E y F) para ambas especies, *L. bilineatus* y *L. montanus*.

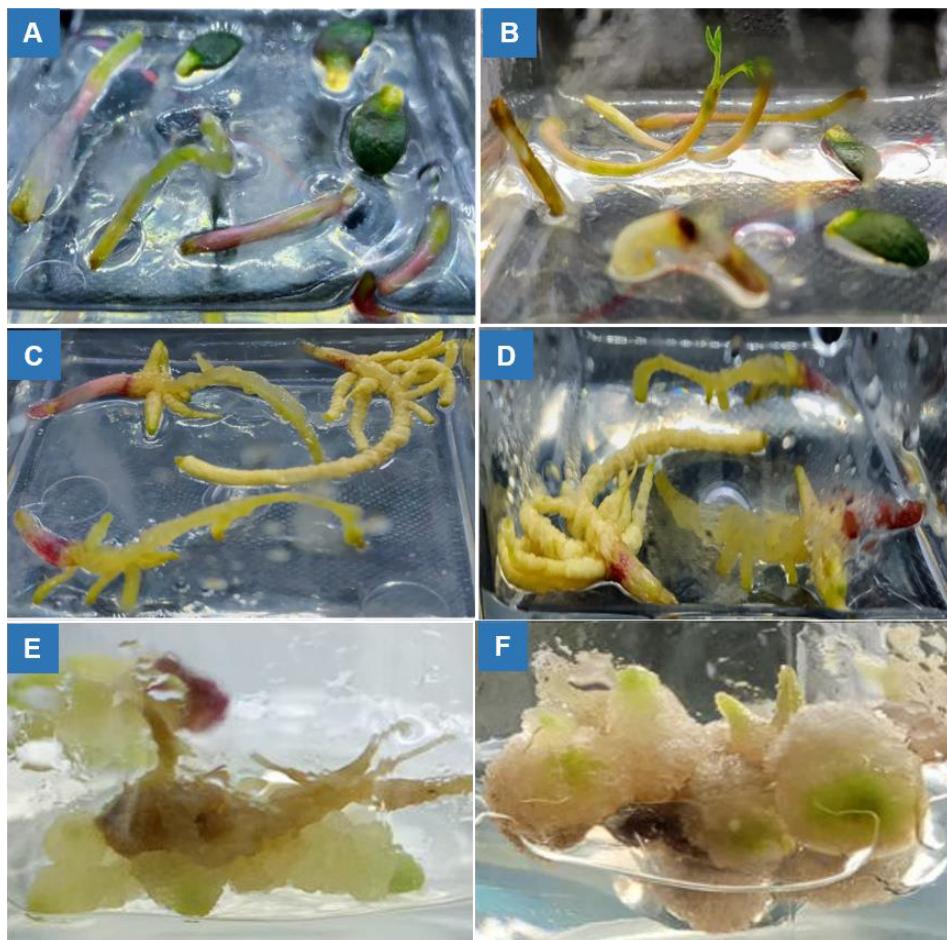


Figura 4. Inducción de tejido desdiferenciado (callo). A) Explantes, hipocótilo, cotiledón, raíz, B) Elongación de algunos explantes, C) Hinchamiento explantes de raíz, D) Inducción de tejido desdiferenciado, con raíz, E) Callo de *L. bilineatus* y F) Callo de *L. montanus*.

Figure 4. Induction of undifferentiated tissue (callus). A) Explants, hypocotyl, cotyledon, root, B) Elongation of some explants, C) Swelling of root explants, D) Induction of undifferentiated tissue, with root, E) Callus from *L. bilineatus*, and F) Callus from *L. montanus*.

Incremento de la biomasa en callos de *L. bilineatus* y *L. montanus*.

El incremento de la biomasa para ambas especies presenta tres fases: la fase lag o de adaptación, que se encuentra desde el día cero al día siete, momento en que inicia la fase exponencial, la cual se alarga hasta el día 21 en ambas especies *L. montanus* y *L. bilineatus*, con una velocidad específica de $\mu = 0.08049 \text{ h}^{-1}$ y 0.0568 h^{-1} y un tiempo de duplicación (td) de 8.60 h y 12.20 h, respectivamente. Los anteriores resultados nos indican diferencias en los parámetros finales μ y td de ambas especies de *Lupinus*. Mientras que en las etapas iniciales y hasta el día 14 el comportamiento de ambas especies similar, 0.0612 y 0.0647 g BS para *L. montanus* y *L. bilineatus*, respectivamente. Posteriormente, en el día 18, ambas especies alcanzaron su pico máximo de crecimiento: *L. montanus* con 0.0931 g BS y *L. bilineatus* con 0.0745 g BS y a partir de este tiempo, ambas iniciaron la fase de muerte.

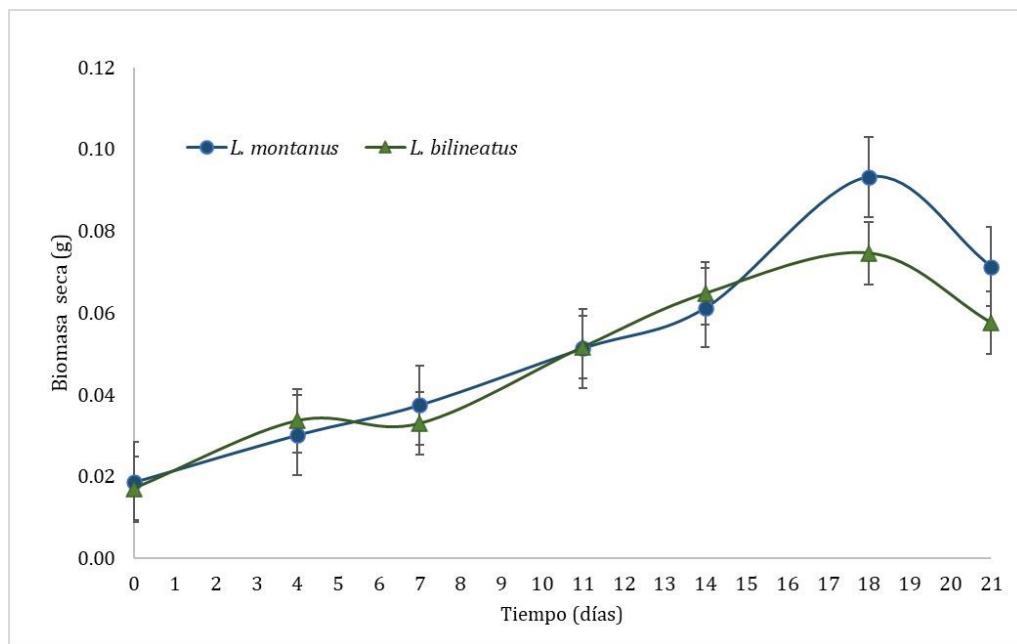


Figura 5. Crecimiento en base a biomasa seca (BS) de callos de • *L. montanus* y ▲ *L. bilineatus*.
Figure 5. Growth based on dry biomass (DB) of calli from • *L. montanus* and ▲ *L. bilineatus*.

Producción de alcaloides quinolizídicos (AQ) en callos

Se determinó la presencia de AQ por cromatografía de capa fina a diferentes tiempos de la cinética de crecimiento de 0, 4, 7, 11, 14, 18 y 21 días (Figura 6). Como se puede observar, en ambas especies durante los primeros días de crecimiento no se detectaron AQ, fue hasta el día 21 que se observó para ambas especies la presencia de AQ.

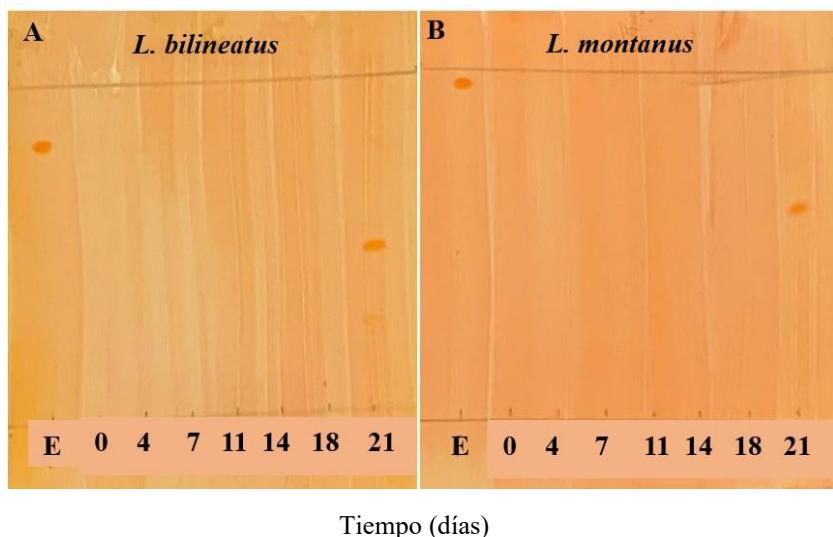


Figura 6. Evidencia de la producción de AQ en callos de *L. bilineatus* (A) y *L. montanus* (B) por cromatografía en capa fina. Las letras E corresponden al estándar de esparteína.

Figura 6. Evidence of the production of alkaloids in calli of *L. bilineatus* (A) and *L. montanus* (B) by thin-layer chromatography. The letter E corresponds to the standard of sparteine.

DISCUSIÓN

Germinación

Durante el proceso de germinación se pudieron observar diferencias importantes. Con *L. montanus* a partir del día cuatro se alcanzó un 70% de germinación, llegando hasta un 74% al día siete, mientras que las semillas de *L. bilineatus* alcanzaron un 100% de germinación al día 12. De acuerdo con lo reportado por Acosta-Percástegui y Rodríguez-Trejo (2005) la temperatura, la luz y la escarificación de las semillas son factores que afectan la germinación. El almacenaje a condiciones de baja temperatura y baja humedad relativa, así como el protocolo de escarificación utilizado (Ramírez Betancourt, 2019) favorecieron la respuesta de germinación de ambas especies, *L. montanus* y *L. bilineatus*. Otros autores reportan porcentajes de germinación menores, Mariel (2006) reporta un 56% de germinación de las semillas de *L. montanus* con escarificación mecánica, mientras que con tratamientos imbibición en agua caliente en semillas de *Lupinus diffusus*, los autores refieren daño grave de los embriones, ya que no emergió ninguna plántula (Dehgan *et al.*, 2003). En este trabajo es posible que las diferencias en el porcentaje de germinación se deban a la especie, la edad de las semillas, la susceptibilidad a los desinfectantes utilizados en el proceso de desinfección, etc. Las semillas de ambas especies fueron caracterizadas físicamente, observándose que ambas presentan testas ornamentadas y de coloración café con manchas oscuras. Ambas especies iniciaron el rompimiento de la testa a los dos días, seguida de la emergencia y crecimiento de la radícula hasta el desarrollo de las plántulas. Una diferencia notable entre las especies estudiadas en el presente trabajo es que las plántulas de *L. bilineatus* aun cuando mostraron la emergencia de los cotiledones no liberaron la testa (Figura 2K), mientras que *L. montanus* libera la testa en la fase de emergencia de los cotiledones, observándose también la emergencia de pelos radiculares (Figura 3E). Posteriormente, a los 11 días se observó como la testa estuvo a punto de ser liberada, sin embargo, no se desprendió totalmente; este comportamiento también ha sido observado en plántulas de *L. bilineatus* en condiciones *ex vitro* (datos no reportados).

Inducción de callo

Para ambas especies, el explante de raíz presentó mayor respuesta a la formación de callo (Figura 4), a diferencia de experiencias anteriores que refieren una mayor inducción de callo para *L. aschenbornii* utilizando hipocótilo con una combinación similar a la que se utilizó en este trabajo para la inducción de callo de *L. montanus* (Montes-Hernández, 2010), mientras que Sator (1985), reportó una alta generación de callo utilizando todas las partes de la planta de las especies de *L. polyphyllus*, *L. hartwegii*, *L. angustifolius* y *L. luteus* cuando se aplican combinaciones de ácido 3-indol-acético (AIA) y 6-bencilaminopurina (BAP) y Ramírez-González (2013) reportó una respuesta del 50% en cuanto a la inducción de callo en la especie de *L. montanus* (HBK), empleando como explante hipocótilo. A partir de las dos semanas se empezó a observar la presencia de tejido desdiferenciado, similar a lo reportado por Montes-Hernández (2010) quien menciona que a partir de los 15 días observó la iniciación de tejido desdiferenciado y al mes se tenía completamente la formación de callo, lo cual fue similar a lo observado en este trabajo para ambas especies. Los anteriores resultados indican un comportamiento similar en *L. bilineatus* y *L. montanus* en cuanto al tipo de explante, el tiempo de respuesta y la pigmentación de los callos, los cuales presentaron una coloración beige y verde (Figura 4E y 4F). En cuanto a la textura, los callos verdes fueron más compactos respecto a los beige, estos últimos presentaron una consistencia más friable, similar a lo reportado por Ramírez-González (2013) para los callos generados con *L. montanus*, los cuales presentaron estructura compacta y una coloración verde.

Incremento de biomasa en callos

Respecto a la cinética de crecimiento de ambas especies *L. bilineatus* y *L. montanus*, ambas presentaron un crecimiento similar hasta el día 14, donde *L. bilineatus* llegó a la fase estacionaria y decayó a la fase de muerte, mientras que *L. montanus* continuó en la fase estacionaria (Figura 4A). Caso contrario a lo reportado por Montes-Hernández (2010), este autor reporta para *L. aschenbornii* una fase exponencial de 7 a 14 días y una prolongada fase

estacionaria de 6 días y con una biomasa final de 4.6 gPF/L. Esto último similar a lo obtenido en este trabajo con *L. bilineatus*. Con respecto a *L. montanus*, se obtuvieron 5.24 veces más biomasa partiendo de 0.25 g (inóculo) con respecto a lo generado con *L. aschenbornii*. Con respecto a la biomasa seca, fue mayor con *L. montanus* (0.0931 g) respecto a *L. bilineatus* (0.0745 g). Es importante mencionar que no existen muchos reportes respecto a la generación de tejido desdiferenciado y al comportamiento en una cinética de crecimiento y producción, lo cual se reporta en este trabajo.

Producción de alcaloides

La presencia de alcaloides solo pudo ser detectada hasta el día 21. Lo anterior podría coincidir con lo reportado por Montes-Hernández (2010) para *L. aschenbornii*, que indica que la producción de AQ en cultivos en suspensión es dos a tres magnitudes menor que en hoja o semilla de planta silvestre. Aunque también puede deberse a la baja sensibilidad y baja especificidad para algunos AQ del reactivo de Dragendorff (Zhang *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES

Se obtuvieron altos porcentajes de germinación para las semillas de ambas especies, *L. bilineatus* (100%) y *L. montanus* (74%).

El explante que dio una mejor respuesta para la inducción de callo en ambas especies fue la raíz a una relación de reguladores de crecimiento de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de CIN para *L. bilineatus* y para *L. montanus* 1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de CIN.

La cinética de crecimiento presentó un comportamiento similar para ambas especies, con tres fases evidentes: la fase lag o de adaptación, la fase exponencial y la fase de senescencia.

La producción de AQ se detectó para ambas especies en el día 21.

La utilización de estos protocolos de germinación, inducción de callo y la realización de las cinéticas de crecimiento ofrecen una alternativa para la producción de metabolitos secundarios de gran importancia como son los AQ.

LITERATURA CITADA

- Acosta-Percástegui, J., & Rodríguez-Trejo, D. A. (2005). Factors affecting germination and pregerminative treatments of *Lupinus montanus* SEEDS. *Interciencia*, 30(9), 576–579.
- Bermúdez Torres, K., Robledo Quintos, N., Martínez Herrera, J., Tei, A., & Wink, M. (1999). Alkaloid profiles of leaves and seeds of *Lupinus aschenbornii* Schauer from Mexico. In E. van Santen, M. Wink, S. Weissmann, & P. Roemer (Eds.), “*Lupin, an ancient Crop for the new millennium*” Proceedings 9th international lupin conference (pp. 301–305). International Lupin Association.
- Bermúdez-Torres, K., Figueroa Brito, R., & Michi Flores, R. S. (2017). *Extracto para el control de plagas de Aedes aegypti* (Patent MX/a/2017/015640).
- Bermúdez-Torres, K., Martínez Herrera, J., Figueroa Brito, R., Wink, M., & Legal, L. (2009). Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican *Lupinus* against the lepidopteran crop pest *Spodoptera frugiperda*. *BioControl*, 54(3), 459–466. <https://doi.org/10.1007/s10526-008-9180-y>
- Bewley, J. Derek. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9, 1055–1056. <https://academic.oup.com/plcell/article/9/7/1055/5986415>
- Clements, J. C., Dracup, M., Buirchell, B. J., & Smith, C. G. (2005). Variation for seed coat and pod wall percentage and other traits in a germplasm collection and historical cultivars of lupins. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56(1), 75–83.

- Dehgan, B., Norcini, J. G., Kabat, S. M., & 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.
- Domínguez, R., Bermúdez, R., Pateiro, M., Lucas-González, R., & Lorenzo, J. M. (2023). Optimization and Characterization of Lupin Protein Isolate Obtained Using Alkaline Solubilization-Isoelectric Precipitation. *Foods*, 12(20). <https://doi.org/10.3390/foods12203875>
- Eastwood, R. J., Drummond, C. S., Schifino-Wittmann, M. T., & Hughes, C. E. (2008). Diversity and evolution history of *Lupinus*-insights from new phylogenies. In J. A. Palta & J. B. Berger (Eds.), "Lupins for Health and Wealth" Proceedings 12th international lupin conference (pp. 346–354). International Lupin Association.
- García López, P. M., De La Mora, P. G., Wysocka, W., Maiztegui, B., Alzugaray, M. E., Del Zotto, H., & Borelli, M. I. (2004). Quinolizidine alkaloids isolated from *Lupinus* species enhance insulin secretion. *European Journal of Pharmacology*, 504(1–2), 139–142. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.09.008>
- Gladstones, J. S. (1998). Distribution, origin, taxonomy, history and importance. In J. S. Gladstones, C. Atkins, & J. Hamblin (Eds.), *Lupins as crop plants; Biology, production and utilization* (pp. 1–4). CABI International.
- Mariel Valdez, O. J. (2006). *Evaluación de un método para la desinfestación y germinación de semillas de Lupinus montanus H.B.K* [Tesis de Técnico Superior Universitario]. Universidad Tecnológica de Tecámac.
- Michi Flores, R. S. (2016). *Efecto de extractos de alcaloides quinolizidínicos sobre larvas de Aedes aegypti*. Instituto Politécnico Nacional.
- Montes-Hernández, E. (2010). *Perfil de alcaloides quinolizidínicos en plantas y cultivos in vitro de Lupinus aschenbornii Shauer* [Tesis de Maestría]. Instituto Politécnico.
- Ramírez-Betancourt, A. P. (2019). *Perfiles de alcaloides quinolizidínicos en etapas tempranas del desarrollo de Lupinus aschenbornii S. Schauer, L. bilineatus Benth y L. montanus Kunth* [Tesis de Maestría]. Instituto Politécnico Nacional.
- Ramírez-Betancourt, A., Hernández-Sánchez, A. M., Salcedo-Morales, G., Ventura-Zapata, E., Robledo, N., Wink, M., & Bermúdez-Torres, K. (2021). Unraveling the biosynthesis of quinolizidine alkaloids using the genetic and chemical diversity of Mexican lupins. *Diversity*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/d13080375>
- Ramírez-González, G., Rodríguez-de La O, J. L., Arreola-Ávila, J. G., & Álvarez-Moctezuma, J. G. (2013). 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. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.07.022>
- Regla, I., López-Ortiz, M., Jiménez, O., Hernández-Ortega, S., Ramírez-Betancourt, A., & Bermúdez-Torres, K. (2019). Sustainable Process for Sparteine Sulfate Preparation. *Organic Process Research and Development*, 23(11), 2567–2570. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00379>
- Reyes-Izquierdo, L. (2013). *Efecto biológico de cultivos desarrollados in vitro de Lupinus campestris inducidos con metil jasmonato sobre Spodoptera frugiperda*. Instituto Politécnico Nacional.
- Ruiz-López, M. A., García-López, P. M., Rodríguez-Macías, R., Zamora Natera, J. F., Isaac-Virgen, M. L., & Múzquiz, M. (2010). Mexican wild lupines as a source of quinolizidine alkaloids of economic potential. *Polibotánica*, 29, 159–164.
- Sator, C. (1985). Studies on shoot regeneration of lupins (*Lupinus* spp.). *Plant Cell Reports*, 4, 126–128.
- Sousa, S. M., & Delgado, S. A. (1998). Leguminosas mexicanas: fitogeografía, endemismo y orígenes. In T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, & J. Fa (Eds.), *Diversidad biológica de México: Orígenes y distribución* (pp. 449–500). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wink, M. (1993). Quinolizidine alkaloids. In P. C. Waterman (Ed.), *Methods in plant biochemistry* (Vol. 6, pp. 197–2039). Academic Press.

Recibido:
7/septiembre/2023

Aceptado:
15/enero/2024

- Wink, M., Meissner, C., & Witte, L. (1995). Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*, 38(1), 139–153.
- Wolny, E., Betekhtin, A., Rojek, M., Braszewska-Zalewska, A., Lusinska, J., & Hasterok, R. (2018). Germination and the early stages of seedling development in brachypodium distachyon. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19102916>
- Zhang, N., Wang, M., Li, Y., Zhou, M., Wu, T., & Cheng, Z. (2021). TLC–MS identification of alkaloids in Leonuri Herba and Leonuri Fructus aided by a newly developed universal derivatisation reagent optimised by the response surface method. *Phytochemical Analysis*, 32(3), 242–251. <https://doi.org/10.1002/pca.2970>