

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS



**DISTRIBUCIÓN, ABUNDANCIA Y REGENERACIÓN *IN VITRO* DE  
*Lupinus stipulatus* J. AGARDH (LEGUMINOSAE) DEL NEVADO  
DE COLIMA**

TRABAJO CON CARÁCTER DE  
**TESIS**  
PRESENTA

**LIC. EN BIOLOGÍA MARTHA EMILIA SANTA CRUZ RAMOS**  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (AREA DE ECOLOGÍA)**

GUADALAJARA, JALISCO, MÉXICO

OCTUBRE DEL 2001

## **DEDICATORIA**

A MI HIJA:

Olga Margarita

Con todo mi amor.

Gracias por su compañía y cariño incondicional.

Gracias por ser ese brillo de luz que me hace luchar cada día más para seguir adelante tanto en los momentos fáciles como difíciles, dándole un sentido a mi existencia.

Gracias por darme fuerza para seguir superándome en todo momento.

Gracias por estar conmigo.

TE AMO

A MIS PADRES:

Martha Margarita

Y

Carlos Guillermo

Quienes me han dado su amor, paciencia y por haber depositado en mi su confianza. Gracias por el apoyo brindado y los esfuerzos que realizaron para que yo siguiera adelante con mis estudios.

A MIS HERMANOS:

CARLOS, ADRIANA y PEDRO

Por su apoyo, por los esfuerzos compartidos, experiencias y además por su amistad que me han brindado siempre.

A MI DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. RAFAEL SOLTERO QUINTANA

Con cariño, respeto y admiración, por la ayuda en la realización de esta tesis.

Sobre todo por su apoyo y paciencia. Gracias por todo. Te quiero mucho.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este Trabajo se hizo posible gracias a la contribución de muchas personas, quienes de una u otra manera colaboraron en el desarrollo de esta tesis:

- A mi director de tesis M. en C. Rafael Soltero Quintana, maestro e investigador del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Guadalajara por sus comentarios y ayuda durante todo el trabajo.
- Al M. en C. Mario A. Ruiz por sus comentarios y asesoría.
- Al M. en C. Martín Huerta Martínez por su ayuda en la parte ecológica de este trabajo.
- Al Doctor Jacinto Bañuelos Pineda y a la M. en C. Carmen Cecilia Gómez Rodiles por su apoyo incondicional. Muchas gracias.
- A las personas que fungieron como asesores y sinodales, muy particularmente a Liberato Portillo Martínez.
- A mis amigos y compañeros: Liberato, Lili, Carlos, Francisco, Alejandro y Eduardo, con quienes he compartido momentos buenos y malos. Los quiero mucho.
- A la maestra Mollie Harker por su ayuda en la traducción del resumen.
- A la Universidad de Guadalajara.

## ABREVIATURAS

AIA	= Acido indolacético.
ANA	= Acido $\alpha$ -naftalenacético.
ANOVA	= Análisis de varianza.
2,4-D	= Acido 2,4-diclorofenoxiacético.
E	= Orientación Este.
GA <sub>3</sub>	= Acido giberélico.
GL	= Grados de libertad.
GLM	= Procedimiento general para modelos lineales.
IBUG	= Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara.
2iP	= 6- ( $\gamma$ , $\gamma$ -dimetilalilamino) purina.
KIN	= Cinetina.
MS	= Murashige y Skoog.
N	= Orientación Norte.
NE	= Orientación Noreste.
NO	= Orientación Noroeste.
O	= Orientación Oeste.
PC-L2	= Phillips y Collins-L2
S	= Orientación Sur.
SAS	= Sistema de análisis estadísticos.
SE	= Orientación Sureste.
SH	= Schenk y Hilderbrandt
SO	= Orientación Suroeste.
TDZ	= Tidiazuron.

## INDICE GENERAL

Resumen .....	x
Abstract .....	xi
1.- Introducción .....	1
2.- Antecedentes .....	5
3.- Justificación .....	7
4.- Objetivos .....	8
5.- Metodología .....	9
5.1 Area de estudio .....	9
5.2 Estudio de distribución .....	9
5.3 Estudio de abundancia .....	11
5.4 Establecimiento y multiplicación del material vegetativo .....	11
5.5 Micropropagación por brotes axilares .....	12
5.5.1 Enraizamiento .....	13
5.6 Regeneración por embriogénesis somática .....	13
5.6.1 Primera fase experimental .....	13
5.6.2 Segunda fase experimental .....	16
6. Resultados .....	18
6.1 Distribución y abundancia .....	18
6.1.1 Distribución .....	18
6.1.2 Descripción del hábitat en la zona de estudio .....	18
6.1.3 Abundancia .....	20
6.1.4 Distribución de tamaños (cobertura) en la población .....	24
6.2 Pruebas de germinación .....	26
6.3 Regeneración por brotes axilares .....	26
6.3.1 Resultados con KIN y ANA .....	26
6.3.2 Resultados con 2iP y ANA .....	28
6.3.3 Enraizamiento .....	33
6.4 Regeneración por embriogénesis somática .....	33
6.4.1 Primera fase experimental .....	33
6.4.2 Segunda fase experimental .....	35

7.- Discusión .....	38
7.1 Distribución .....	38
7.2 Descripción del hábitat en la zona de estudio .....	38
7.3 Abundancia .....	40
7.4 Distribución de tamaños (cobertura) en la población . ....	41
7.5 Pruebas de germinación .....	41
7.6 Micropropagación por brotes axilares .....	42
7.7 Regeneración por embriogénesis somática .....	43
8.- Conclusiones .....	46
9.- Literatura citada .....	47
10.- Anexos .....	53

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Arreglo factorial en medio MS para la inducción de brotes axilares de <i>Lupinus stipulatus</i> con ANA y KIN o 2iP.....	13
Cuadro 2. Arreglo factorial en los medio MS y SH para la inducción de embriones somáticos de <i>Lupinus stipulatus</i> con KIN y 2,4-D .....	14
Cuadro 3. Arreglo factorial en el medio SH para la inducción de embriones somáticos de <i>Lupinus stipulatus</i> con KIN y 2,4-D .....	15
Cuadro 4. Arreglo factorial en medio SH para la inducción de embriones somáticos de <i>Lupinus stipulatus</i> con TDZ y 2,4-D .....	16
Cuadro 5. Análisis de varianza para la producción de brotes axilares con ANA y KIN en <i>Lupinus stipulatus</i> .....	26
Cuadro 6. Comparación de medias del número de brotes por explante con KIN en <i>Lupinus stipulatus</i> , prueba de Duncan .....	26
Cuadro 7. Medias de producción de brotes por tratamiento de KIN en <i>Lupinus stipulatus</i> .....	27
Cuadro 8. Análisis de varianza para la producción de brotes con ANA y 2iP en <i>Lupinus stipulatus</i> .....	28
Cuadro 9. Comparación de medias de brotes por explante con diferentes niveles de 2iP en <i>Lupinus stipulatus</i> , prueba de Duncan .....	28
Cuadro 10, Comparación de medias de brotes por explante con diferentes niveles de ANA en <i>Lupinus stipulatus</i> , prueba de Duncan .....	29
Cuadro 11. Medias de producción de brotes por tratamiento, interacción ANA y 2iP en <i>Lupinus stipulatus</i> .....	30
Cuadro 12. Análisis de regresión de brotes por explante producidos con ANA y 2iP en <i>Lupinus stipulatus</i> .....	31

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lupinus stipulatus</i> J. Agardh .....	3
Figura 2. Mapa de ubicación del estado de Jalisco y la zona de estudio .....	10
Figura 3. Mapa de distribución de <i>Lupinus stipulatus</i> en el Nevado de Colima y en el resto del estado de Jalisco, basado en especímenes de herbario, observaciones de campo y revisión de literatura .....	19
Figura 4. a) Zona donde se presenta erosión del suelo. b) Vegetación de bosque pino-encino donde se desarrolla <i>Lupinus stipulatus</i> .....	21
Figura 5. Número de individuos de <i>Lupinus stipulatus</i> con diferentes etapas fenológicas en distintas exposiciones de ladera.....	22
Figura 6. Número de individuos de <i>Lupinus stipulatus</i> con diferentes etapas fenológicas que se desarrollan en distintos grados de Inclinación del suelo .....	23
Figura 7. Comportamiento fenológico de <i>Lupinus stipulatus</i> en dos muestreos en diferentes temporadas .....	24
Figura 8. Distribución de tamaños de acuerdo con el promedio de cobertura en la población de <i>Lupinus stipulatus</i> .....	25
Figura 9. Exposición de ladera con relación al promedio de cobertura en <i>Lupinus stipulatus</i> .....	25
Figura 10. Respuesta de <i>Lupinus stipulatus</i> a diferentes concentraciones de KIN sobre la producción de brotes por explante .....	27
Figura 11. Respuesta de <i>Lupinus stipulatus</i> a diferentes niveles de 2iP y ANA sobre la producción de brotes por explante .....	32
Figura 12. Raíces de <i>Lupinus stipulatus</i> producidas <i>in vitro</i> con 0.2 mg/l de ANA .....	33
Figura 13. Embrión de <i>Lupinus stipulatus</i> en etapa de corazón proveniente de la primera fase experimental del tratamiento de Inducción No. 10 y medio de expresión SH con glutamina .....	34
Figura 14. Callo embriogénico de <i>Lupinus stipulatus</i> proveniente del tratamiento de inducción No. 7 y del medio de expresión No. 4 .....	35

Figura 15. Embriones de <i>Lupinus stipulatus</i> en etapa globular provenientes del tratamiento de inducción No. 7 y expresión No. 5 .....	36
Figura 16. Embriones de <i>Lupinus stipulatus</i> en etapa globular provenientes del tratamiento de inducción No. 7 y expresión No. 5.....	36

## ANEXOS

Anexo 1. Ejemplares de herbario examinados y citas bibliográficas .....	53
Anexo 2. Descripción de <i>Lupinus stipulatus</i> .....	55
Anexo 3. Tablas de recopilación de datos de <i>Lupinus stipulatus</i> .....	56
Anexo 4. Componentes de los medios MS, SH y las vitaminas PC-L2 .....	58

## RESUMEN

Se presenta información concerniente a la distribución ecológica de *Lupinus stipulatus* J. Agardh en el Nevado de Colima, su abundancia y relación con factores ambientales que puedan servir para un manejo sostenido. Además se establecieron las técnicas de micropropagación por brotes axilares y se realizaron pruebas para la embriogénesis somática.

De acuerdo con la información obtenida la especie se desarrolla en cinco localidades. El área muestreada abarca 17,408 m<sup>2</sup>, en ella se establecieron 68 parcelas y se contaron un total de 155 individuos por lo que la especie se cataloga como escasa en la zona de estudio. *Lupinus stipulatus* se desarrolla en zonas con vegetación de bosque pino-encino en terrenos accidentados con pendientes abruptas entre los 21° a 50°, en sitios con laderas de exposición N y NE entre la cota altitudinal de 2,100 a 2,200 m. En suelos arenosos con un promedio de profundidad de 38.7 cm. Se acopiaron factores ambientales y se realizaron análisis estadísticos.

Para la inducción de brotes axilares, se utilizaron epicotilos como explantes y se estudió el efecto de dos diferentes fuentes de citocininas (KIN y 2iP), en combinación con una auxina (ANA) en diferentes concentraciones y combinaciones. Se obtuvieron promedios máximos de 5.5 brotes por explante con KIN y ANA, y 4.5 con 2iP y ANA en donde la interacción auxina-citocinina fue estadísticamente significativa. Se pudo establecer el modelo para la producción de brotes axilares.

Para la embriogénesis somática se utilizaron diferentes explantes, se hicieron combinaciones de reguladores de crecimiento con 2,4-D y KIN o TDZ, donde los explantes en su mayoría formaron callo con apariencia granulosa de color blanco-amarillento, en algunos tratamientos se observaron pocos embriones en diferentes estados de desarrollo. A pesar de que se han conducido un gran número de experimentos no se han podido establecer el modelo por embriogénesis.

## ABSTRACT

The distribution of *Lupinus stipulatus* J. Agardh on the locations in the volcano Nevado de Colima (19° 35' 25" N and 103° 32' 20" W) is presented. Its abundances and relation to environmental factors there are discussed which may apply to a sustainable management of this species. In addition, results of experiments using techniques for micropropagation by axillary shoots and tests related to somatic embryogenesis, are reported.

In the Nevado de Colima *L. stipulatus* is known in five locations. One of these was selected for study where 68 plots were established which included a total area of 17,408 m<sup>2</sup>. Only 155 plants of *L. stipulatus* were found there which indicates that the species is rare in this area. This specie is found in pine-oak on steep slopes of 21° to 50° with north and northeast exposition, between 2,100 and 2,200 m elevation on sandy soils with a mean depth of 38.7 cm. Other factors as well were included in the statistical analysis for the area studied.

In the experiments of axillary shoots induction, epicotyls were used with two cytokinins (KIN and 2iP) in combination with the auxin (NAA) in different concentrations. The average results were 5.5 shoots per explant with KIN and NAA. However, with 2iP and NAA 4.5 shoots were produced and this indicated a significant interaction between auxin and cytokinin. The model for regenerating by axillary shoots was established.

A variety of explants were tested in the somatic embryogenesis studies using several mixtures of plant growth regulators combining 2,4-D with KIN and TDZ. Most of the treatments produced a yellowish-white callus. In a few other treatments some somatic embryos were observed in different stages of development. Even though many experiments were performed, the model for regenerating *Lupinus stipulatus* by somatic embryos was not confirmed.

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Lupinus* J. Agardh pertenece a la familia de las leguminosas (Fabaceae) que constituye uno de los grandes grupos del reino vegetal, corresponde a la subfamilia Papilionoideae que comprende aproximadamente 400 géneros y 14,000 especies y en la que se encuentran plantas de importancia agrícola, como el frijol, soya, alfalfa y garbanzo (Anónimo, 1979). Son importantes por ser plantas pioneras en la lucha contra la erosión, además la mineralización de sus residuos constituye un aporte de nitrógeno disponible (Sator, 1990). Algunas sobresalen por su alto contenido de proteína y aceite, pero el contenido de alcaloides limita la utilización de algunas especies (Ruíz, 1995).

Los *Lupinus* se caracterizan por ser herbáceas anuales o perenes, algunas son arbustivas, con hojas compuestas de 5 a 7 foliolos, raramente simples con hojas enteras, estipulas adnadas en la base del peciolo. Flores comúnmente azules o violáceas, raramente blancas o amarillas, dispersas o en verticilios, en la parte terminal en racimos, las brácteas florales usualmente deciduas; bracteolas usualmente presentes en la base adnadas al cáliz bilabiado, con el labio superior bi ó tri partido; el estandarte orbicular; las alas coherentes en el ápice; la quilla muy arqueada hacia arriba; los filamentos de los estambres unidos en tubos. Los frutos son legumbres gruesas, pubescentes, transversalmente tabicadas, de muchas semillas (Gobierno del Estado de México, 1981 y McVaugh, 1987). La especie *Lupinus stipulatus* se diferencia de las demás por los foliolos maduros uniformes de 1.5 a 3 cm de largo, la porción adnada de 0.8 a 1.5 cm de largo, las puntas libres linear-atenuadas arriba de 1 a 2 cm de largo y de 1 a 2 mm de ancho en la base. Folíolos mayormente elíptico-oblancheolados, obtusos y apiculados el más largo de 7 a 16 cm de ancho (Figura 1, Anexo 2).

Este género se distribuye en bosque de pino o en matorrales entre 1,800 a 4,200 msnm (McVaugh, 1987) en suelos arenosos o limosos de baja fertilidad, con un pH de 4 a 8, en una temperatura entre los 6 a 26°C. Están presentes en

áreas con precipitación pluvial que va de los 250 a 350 mm durante su ciclo de crecimiento (Sator, 1990; Lopez-Bellido y Fuentes, 1986).

Los *Lupinus* han sido cultivados en la región mediterránea por más de 3,000 años, principalmente en Grecia donde son utilizadas como forraje y para consumo humano. En la región central de Europa fue introducido *Lupinus luteus* que crece exitosamente, así como *L. angustifolius* en otras partes del mundo como Nueva Zelanda y Australia (Sator, 1990). El proceso de domesticación en estas especies ha sido largo, pero se considera que mediante la aplicación de nuevos métodos, se puede lograr en menor tiempo. La obtención de plantas mediante las técnicas de micropropagación *in vitro* son alternativas que tienen ventajas sobre los métodos convencionales, ya que de esta forma es posible obtener grandes cantidades de plantas a partir de fragmentos de tallo, ápices de brotes, tejidos o células (George, 1993).

La producción de plantas por brotes axilares es utilizada generalmente como un método de propagación, cuyo propósito es la multiplicación de plantas mediante la estimulación de las yemas axilares (Hurtado y Merino, 1988). Los explantes que se utilizan son relativamente grandes, debido a que presentan una mayor supervivencia a condiciones *in vitro*, rápido crecimiento y contienen un mayor número de yemas axilares. La proliferación de brotes es inducida por la incorporación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo como son las citocininas que suprimen la dominancia apical y promueven el desarrollo de las yemas secundarias (George, 1993). Los nuevos brotes obtenidos deben someterse a un proceso de enraizamiento bajo condiciones *in vitro* para obtener plantas completas.

La embriogénesis somática es un proceso de regeneración donde se inducen plantas a partir de tejido somático y de origen unicelular, al formar estructuras bipolares llamadas embriones somáticos, que son semejantes a los embriones cigóticos, y que posteriormente se convierten en plantas completas. Los embriones somáticos pueden desarrollarse a partir de diferentes explantes como son: hipocótilos, cotiledones, embriones, hojas, etc.



Figura 1.- *Lupinus stipulatus* J. Agardh.

Existen tres eventos críticos en este proceso:

- 1.- La inducción de la citodiferenciación de células pro-embriogénicas; fase inicial donde se producen los embriones inmaduros
- 2.- La etapa subsecuente o maduración de las células pro-embriónicas para crecer y desarrollarse en embriones.
- 3.- La germinación que da lugar al desarrollo de la planta completa (George, 1993; Doods y Roberts, 1985).

Las células embriogénicas se caracterizan por presentar un denso contenido citoplasmático, gránulos de almidón y grandes núcleos de color oscuro (Dodds y Roberts, 1985). Después de varias divisiones celulares se presentan agregados con una zona suspensora y una cabeza embrionaria. Los estados de desarrollo de los embriones somáticos de plantas dicotiledóneas son los siguientes:

- **Pro-embrión:** agrupamiento de pequeñas células meristemáticas originadas de una sola célula las cuales pueden formar embriones somáticos.
- **Globular:** grupo de células que todavía no tienen una forma definida de embrión.
- **De corazón:** se caracteriza por presentar tres lóbulos, donde se puede apreciar una separación del polo vegetativo y radicular, además es posible identificar los cotiledones.
- **De torpedo:** presenta una elongación de la forma de corazón semejante o parecida al embrión de una semilla en proceso de germinación (George, 1993).

La obtención de plantas por embriogénesis somática es un prerrequisito para establecer programas de mejoramiento genético mediante técnicas no convencionales como selección celular o transformación genética, ya que permite la regeneración de plantas completas a partir de una sola célula, la cual pudo haber sido manipulada o modificada previamente.

## 2. ANTECEDENTES

### DISTRIBUCIÓN Y ABUNDANCIA

Todas las especies tienen dos niveles de distribución, el mayor de ellos llamado macrodistribución o distribución geográfica, el cual puede representarse en un mapa por medio de puntos o líneas que muestran su distribución general, en un área que frecuentemente comprende cientos o en ocasiones miles de kilómetros; dentro de esas extensas zonas, las especies se localizan de manera discontinua bajo ciertas condiciones ambientales, este segundo nivel de distribución se le conoce como microdistribución o distribución ecológica (Billings, citado en Huerta-Martínez, 1995).

Los reportes sobre distribución de la especie en estudio, consideran esencialmente el primer tipo de distribución arriba mencionado, entre estos destacan el de McVaugh (1987), quien consigna la distribución de *Lupinus stipulatus* en el estado de Jalisco con base en colectas botánicas. Vázquez *et al.* (1995) reportaron la presencia de *L. stipulatus* en la Sierra de Manantlán, en tanto Barrera (1996) realizó un trabajo de distribución de las especies de *Lupinus* en México basado en otros autores.

Lo anterior pone de manifiesto que, por lo menos para el estado de Jalisco, no se ha realizado ningún estudio sobre abundancia de esta especie y mucho menos para dilucidar sus relaciones con algunos factores del medio o distribución ecológica.

Existen algunos trabajos sobre *Lupinus* como son los de Maron y Jefferies (1999) donde realizaron estudios de las etapas vegetativas y mortalidad. Por otro lado Braatne y Bliss (1999) hicieron estudios tomando en cuenta las condiciones ambientales en el monte Santa Helena. Bishop y Schemske (1998) realizaron muestreos con relación a la variación fenológica de la colonización de lupinos.

## PROPAGACIÓN POR BROTES AXILARES

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. Harzic *et al.* (1998) desarrollaron una metodología para la formación de brotes de *L. albus* a partir de nudos cotiledonares. También Rybczynski y Podyma (1993a) cuyos experimentos los llevaron a cabo en *L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius*, *L. hispanicus* y *L. polyphyllus*, en los que se obtuvieron un gran número de brotes con el medio B5 solidificado con Gelrite y suplementado con diferentes concentraciones y combinaciones de BA y ANA a partir de nudos cotiledonares.

## EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Ranch *et al.* (1985) describieron un método de iniciación de embriones inmaduros de algunos genotipos de soya, mientras que Nadolska-Orczyk (1992) obtuvo embriones somáticos a partir de cotiledones inmaduros de *Lupinus angustifolius*, *L. albus* y *L. mutabilis* en el medio de inducción B5 suplementado con 5 mg/l de 2,4-D solo o combinado con 0.25 mg/l de cinetina; en la etapa de maduración agregó de 0.1 a 0.5 mg/l de ABA y una alta relación de  $\text{NH}_4/\text{NO}_3$ . Stuart y Strickland (1984a) mencionaron que los aminoácidos juegan un papel importante en el proceso de maduración de embriones de alfalfa. Por otro lado Malik y Saxena (1992) realizaron un procedimiento para la inducción de embriones somáticos en cultivos de cuatro especies de *Phaseolus* en un tiempo de 6 a 8 semanas para la formación de colonias de embriones en medio MS suplementado con bencilaminopurina (BAP). Rybczynski y Podyma (1993b) realizaron estudios preliminares para la regeneración de *L. albus* a partir de embriones inmaduros.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Algunas especies de *Lupinus* pueden ser utilizadas como alimento en humanos ó como forraje para animales, además de ser pioneras en la lucha contra la erosión, la mineralización de sus residuos constituye un aporte disponible de nitrógeno. Por otro lado los alcaloides que presentan pueden ser utilizados para la elaboración de insecticidas, fungicidas o productos farmacéuticos.

Este estudio se realizó en el Nevado de Colima por ser una localidad de fácil acceso, y se eligió la especie *Lupinus stipulatus* tomando en cuenta sus características favorables desde un punto de vista agronómico, como son: el tamaño de las semillas, porte de la planta, longitud de la espiga (hasta 60 cm) y alto contenido de proteína.

Se pretende reunir información concerniente a la distribución geográfica de *Lupinus stipulatus* en el estado de Jalisco, su abundancia y su relación con algunos factores del medio, con el fin de obtener datos para un mayor conocimiento de esta especie y sentar bases para apoyar un manejo sostenido en el Nevado de Colima. Además, se considera importante establecer las técnicas de micropropagación por brotes axilares para la producción de plantas, como medida estratégica para la posible recuperación de poblaciones; y la regeneración por embriogénesis somáticas como prerequisite para hacer mejoramiento genético en un futuro proceso de domesticación.

Actualmente esta especie no ha sido estudiada, por lo que no se conoce con exactitud su estado de conservación, es un hecho que el tipo de vegetación en que se desarrolla no ha sido erradicado, y es una realidad alentadora para impulsar actividades de conservación y restauración ecológica.

## 4. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar los aspectos de distribución, abundancia y regeneración *in vitro* de *Lupinus stipulatus* del Nevado de Colima.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Conocer la distribución y abundancia de *Lupinus stipulatus* con relación a algunos factores ambientales en el Nevado de Colima.
2. Establecer un modelo de regeneración "*in vitro*" por proliferación de brotes axilares.
3. Establecer un modelo de regeneración de plantas por embriogenésis somáticas.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 AREA DE ESTUDIO

El trabajo se realizó en el Nevado de Colima que se encuentra ubicado en el municipio de Ciudad Guzmán, en el sur (S) del estado de Jalisco, entre los 19° 35' 25" de latitud norte (N) y los 103° 32' 20" longitud oeste (O). Aproximadamente a 10 km por la brecha de El Fresno hacia las antenas de microondas a los 2,100 msnm. (Figura 2). Se realizaron un total de cinco visitas a la zona de estudio; el área muestreada comprende una superficie de 17,408 m<sup>2</sup> que puede ser extrapolada a un total de 15 km<sup>2</sup>. Se localiza en la Provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico, subprovincia "Volcanes de Colima" (SPP, 1981; SEMARNAP, 1996). Se hicieron revisiones de cartas topográficas, geológicas, edafológicas, uso del suelo y de uso potencial del suelo para conocer el entorno, estos datos fueron tomados del INEGI además se consiguieron registros de temperatura y precipitación pluvial para la localidad seleccionada.

### 5.2 ESTUDIO DE DISTRIBUCIÓN

Se hizo mediante la revisión de ejemplares de herbario, así como de literatura pertinente y mediante trabajo de campo en algunas localidades reportadas en el estado de Jalisco. De las plantas colectadas, algunos ejemplares se herborizaron, identificaron, se describieron y se incluyeron en la colección del herbario IBUG.

La identificación de las plantas herborizadas, se hizo mediante comparación con ejemplares del herbario y usando claves dicotómicas, se contó con la asesoría de especialistas para su correcta identificación.



Figura 2.- Mapa de ubicación del estado de Jalisco y la zona de estudio.

### 5.3 ESTUDIO DE ABUNDANCIA

La primer visita se hizo el 1 de diciembre de 1999 y la segunda el 27 de enero del 2001, para realizar el trabajo de campo se establecieron un total de 68 parcelas de 16 x 16 m, a lo largo del gradiente altitudinal entre los 2,100 y los 2,200 m, donde se realizaron muestreos poblacionales en cada una de ellas; además, se contabilizaron y se tomaron datos de las etapas fenológicas (juvenil, vegetativa, floración, floración-fructificación y fructificación) así como mediciones de altura y cobertura de los individuos contenidos en cada parcela. Se registraron además, algunas características físicas de las parcelas como pendiente, exposición, altitud y porcentaje de herbáceas árboles y arbustos; también se obtuvieron datos sobre perturbación relacionada con incendios, erosión, pastoreo y agricultura. En cinco parcelas tomadas al azar, se registraron datos de suelo como profundidad total, capa de humus, profundidad de horizonte superficial, capa de hojarasca, textura y color. Para recabar la información se diseñaron 2 tablas (Anexo 3), elaborados a partir de los formatos de Olvera *et al.* (1996) y Keel (1997) modificados para este estudio. En el segundo muestreo se establecieron el mismo número de parcelas, donde se contabilizó el número de individuos y se tomaron datos fenológicos además de algunas características físicas de las plantas. Se determinó la densidad media y estimada de la población en ambos muestreos.

### 5.4 ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DEL MATERIAL VEGETATIVO

Se utilizaron semillas de *Lupinus stipulatus* colectadas en noviembre de 1997. Para su germinación *in vitro*, se desinfectaron superficialmente mediante inmersión en alcohol etílico de 96° durante 10 segundos, después se pasaron a una solución de hipoclorito de sodio (blanqueador comercial) al 50% v/v durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues con agua desionizada estéril. Las semillas fueron sembradas para su germinación en frascos con 25 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento, suplementado con vitaminas PC-L2 (Phillips y Collins, 1979) (anexo 4), además

de 30 g/l de sacarosa y 10 g/l de agar y el pH fue ajustado a 5.8. El medio previamente fue esterilizado en autoclave a 125°C y 1.3 kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos. Los cultivos se incubaron a 27°C ± 2, con fotoperiodo de 16 horas e intensidad luminosa de 12.5 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (1,000 lux).

Fue evaluado el porcentaje de germinación a los 13 días de cultivo y de las plántulas de aproximadamente 7 cm de altura fueron seccionados el epicotilo e hipocotilo, el primero fue utilizado para la propagación mediante brotes axilares y el segundo para la iniciación de callos en los experimentos de embriogénesis somática durante la primera fase experimental. En la segunda fase experimental se utilizaron folíolos y peciolo como fuente de explante.

## 5.5 MICROPROPAGACIÓN POR BROTES AXILARES

Fue sembrado un brote por repetición, de aproximadamente 2 cm de largo, de aspecto uniforme y proveniente de cultivos que estuvieron durante dos meses en medio sin reguladores de crecimiento, cada brote presentaba al menos de 2 a 3 yemas.

Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento, fueron utilizados diseños completamente al azar en arreglo factorial 4x3 para KIN (0, 1, 2 y 3 mg/l) y ANA (0, 0.02 y 0.2) y 7x3 para 2iP (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mg/l) y ANA (0, 0.02 y 0.2 mg/l) (Cuadro 1); con 4 repeticiones y un total de 12 y 21 tratamientos respectivamente. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que en la germinación.

Como variable de respuesta fue evaluado el número de brotes producidos por explante a los 27 días de cultivo.

Para los análisis estadísticos y construcción de gráficas se utilizaron los programas SAS, Statgraphics y Excel. Se hicieron procedimientos GLM y ANOVA, con el objeto de determinar la significancia del modelo y de las variables independientes sobre la respuesta. Se aplicó la prueba de intervalos múltiples de Duncan para detectar diferencias entre las medias de los tratamientos (Montgomery, 1991). Se emplearon los procedimientos de

regresión polinomial y regresión para superficie de respuesta para estimar los parámetros de las variables; asimismo, se hizo el análisis canónico de la superficie para encontrar los valores críticos en el punto estacionario.

Para todos los análisis estadísticos el nivel de significancia fue del 95%.

Cuadro 1. Arreglo factorial en medio MS para la inducción de brotes axilares de *Lupinus stipulatus* con ANA y KIN o 2iP.

ANA mg/l	KIN ó 2iP mg/l						
	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
0.00	Trat 1	Trat 4	Trat 7	Trat 10	Trat 13	Trat 16	Trat 19
0.02	Trat 2	Trat 5	Trat 8	Trat 11	Trat 14	Trat 17	Trat 20
0.20	Trat 3	Trat 6	Trat 9	Trat 12	Trat 15	Trat 18	Trat 21

#### 5.5.1. Enraizamiento

Se utilizaron los brotes obtenidos de todos los tratamientos para inducir o mejorar el enraizamiento, para lo cual fueron probadas las siguientes auxinas: ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB) en concentración de 0.2 mg/l con base en las observaciones hechas en el factorial para la inducción de brotes. Se sembraron un total de 20 brotes por tratamiento y los resultados fueron evaluados a los 30 días de cultivo.

### 5.6 REGENERACION POR EMBRIOGENESIS SOMATICA

#### 5.6.1 Primera Fase Experimental

##### Medio de iniciación y multiplicación de callo

Inicialmente los cortes de hipocotilo fueron colocados en cajas de petri, en medio MS suplementado con 3 mg de 2,4-D, 2 mg/l de KIN y 2 mg/l de ANA, se colocaron cuatro explantes por caja donde desarrollaron callos de aspecto granuloso color crema.

### Medio de inducción

Los callos producidos fueron cultivados para la inducción de la embriogénesis en los medios basales MS y SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) (anexo 4), donde se evaluó el efecto de la interacción auxina-citocinina con 1,3,5,7 y 9 mg/l de 2,4-D y 0.00,0.02 y 0.20 mg/l cinetina (KIN) en arreglo factorial 5 x 3 (Cuadro 2) con 4 repeticiones, se colocó 1 gr de callo aproximadamente por caja de petri. Ambos medios fueron suplementados con vitaminas PC-L2, 30 g/l de sacarosa y el pH ajustado a 5.8; el medio MS fue coagulado con 10 g/l de agar y el SH con 3 g/l de fitigel. Los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación antes mencionadas.

Cuadro 2. Arreglo factorial en los medios MS y SH para la inducción de embriones somáticos de *Lupinus stipulatus* con KIN y 2,4-D.

		2,4-D mg/l				
		1.0	3.0	5.0	7.0	9.0
KIN mg/l	0.00	Trat 1	Trat 4	Trat 7	Trat 10	Trat 13
	0.02	Trat 2	Trat 5	Trat 8	Trat 11	Trat 14
	0.20	Trat 3	Trat 6	Trat 9	Trat 12	Trat 15

A los 35 días de cultivo en el medio de inducción los callos fueron transferidos al medio de expresión.

### Tinción diferencial

Se realizaron tinciones diferenciales según el método de Gupta y Durzan (1987) modificado para este trabajo. Se colocaron muestras de callo de aproximadamente 0.5 g en tubos de ensayo de punta cónica, los callos fueron tratados con tres gotas de acetocarmín al 2%, se colocaron en baño María a 60°C hasta un ligero vire de color; a continuación se lavaron dos veces con agua corriente para eliminar el exceso de colorante por medio de centrifugación a 2000 rpm y eliminar el sobrenadante. Posteriormente, se añadió 1 gota de azul de Evans al 0.5% y se dejó en reposo por 30 segundos para repetir el

lavado en la forma ya descrita. Finalmente se colocaron en portaobjetos y se observaron al microscopio estereoscópico.

Medio de expresión.

Se utilizaron los medios basales MS y SH suplementados con vitaminas PC-L2, 30 g/l de sacarosa, 4.4 g/l de glutamina y el pH ajustado a 5.8, el MS fue coagulado con 10 g/l de agar y el SH con 3 g/l de fitagel. Se colocaron cuatro porciones de aproximadamente.2 g de callo embriogénico proveniente de los medios de inducción. Los cultivos se mantuvieron en las condiciones de incubación antes mencionadas.

A los 35 días aproximadamente fue evaluado el número de embriones por caja de petri.

Partiendo de los resultados obtenidos de la primera fase experimental (Cuadro 2), se planteó un nuevo factorial donde se aumentaron drásticamente las concentraciones de KIN y se redujo el intervalo en los niveles de 2,4-D (Cuadro 3). En este caso se utilizaron foliolos como explantes.

Cuadro 3. Arreglo factorial en el medio SH para la inducción de embriones somáticos de *Lupinus stipulatus* con KIN y 2,4-D.

		2,4-D mg/l			
		6	7	8	9
KIN mg/l	1	Trat 1	Trat 4	Trat 7	Trat 10
	2	Trat 2	Trat 5	Trat 8	Trat 11
	3	Trat 3	Trat 6	Trat 9	Trat 12

Se utilizó el mismo medio de expresión antes mencionado en el experimento anterior.

### 5.6.2 Segunda Fase Experimental

#### Medio de inducción

Fue utilizado el medio basal SH suplementado con vitaminas PC-L2, 30 g/l de sacarosa, 3 mg/l de polivinilpolipirrolidona, 3 g/l de fitagel y el pH ajustado a 5.8. Se evaluó el efecto del tidiazuron (TDZ) agregando 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/l como fuente alternativa de citocinina en combinación con 2,4-D en 0, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 mg/l en arreglo factorial 5x5 con dos repeticiones (Cuadro 4).

Cuadro 4. Arreglo factorial en medio SH para la inducción de embriones somáticos de *Lupinus stipulatus* con TDZ y 2,4-D.

		2,4-D mg/l				
		0.0	2.0	4.0	6.0	8.0
TDZ mg/l	0.0	Trat 1	Trat 6	Trat 11	Trat 16	Trat 21
	0.5	Trat 2	Trat 7	Trat 12	Trat 17	Trat 22
	1.0	Trat 3	Trat 8	Trat 13	Trat 18	Trat 23
	1.5	Trat 4	Trat 9	Trat 14	Trat 19	Trat 24
	2.0	Trat 5	Trat 10	Trat 15	Trat 20	Trat 25

Los explantes que se utilizaron en esta fase fueron folíolos y pecíolos de hoja a los cuales se les hicieron lesiones transversales para mejorar el contacto con los reguladores de crecimiento. Se incubaron en las mismas condiciones antes mencionadas.

A los 35 días de cultivo se realizaron tinciones diferenciales ya descritas en la página anterior.

#### Primer medio de expresión

Se utilizaron las sales SH suplementadas con vitaminas PC-L2, 30 g/l de sacarosa, 3 g/l de fitagel, 3 g/l de polivinilpolipirrolidona y el pH ajustado a 5.8. Se hicieron dos bloques, uno con 4.4 g/l de glutamina como en la primera fase experimental y otro con 1 mg/l de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). Se colocaron aproximadamente .2 g de callo embriogénico proveniente de los medios de

inducción. A los 35 días de cultivo fueron transferidos al segundo medio de expresión.

#### Segundo medio de expresión

Se utilizó el medio SH suplementado con vitaminas PC-L2, 30 g/l de sacarosa, 4 g/l de fitagel y el pH fue ajustado a 5.8. Se colocaron aproximadamente .2 g de callo embriogénico proveniente de los medios de inducción, en las mismas condiciones de incubación.

Se contabilizaron los embriones desarrollados a los 35 días de cultivo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 DISTRIBUCIÓN Y ABUNDANCIA

#### 6.1.1 Distribución

De acuerdo con los ejemplares del herbario IBUG la especie en estudio ha sido colectada en cuatro localidades en la zona del Nevado de Colima. El tipo de vegetación en que se encuentra es bosque de pino-encino (Ramírez No. 501 IBUG y Harker s/n IBUG), bosque de oyamel (Santiago No. 4 IBUG) y en bosque mesofilo de montaña (Vazquez No. 17 IBUG). La cota altitudinal que citan los ejemplares de herbario es entre los 2,100 a 2,825 m. En cuatro localidades del Nevado de Colima es reportada como abundante (Harker No. 57 IBUG, Ramírez No. 501 IBUG y Vazquez No. 17 IBUG). El reporte de herbario (Vazquez No. 17 IBUG) menciona que el tipo de suelo es areno-arcilloso.

En suma, *Lupinus stipulatus* ha sido colectada en el estado de Jalisco en 23 localidades de 10 municipios, que coinciden en que la vegetación en donde crece es principalmente bosque de pino-encino, pero también en bosque mesofilo de montaña, en algunos casos en bosque de pino o encino y ocasionalmente en bosque de oyamel. La cota altitudinal de distribución de la especie en el estado de Jalisco es entre 1,400 a 2,825 m. Los pocos reportes de tipos de suelo en los ejemplares de herbario son arenoso o areno-arcilloso. La mayoría de las poblaciones se encuentran en la parte sur del estado de Jalisco (Figura 3).

#### 6.1.2 Descripción del hábitat en la zona de estudio

El tipo de vegetación en que se desarrolla *L. stipulatus* es bosque de pino-encino. La especie en la zona de estudio se desarrolla en la cota altitudinal entre los 2,100 a 2,200 m.

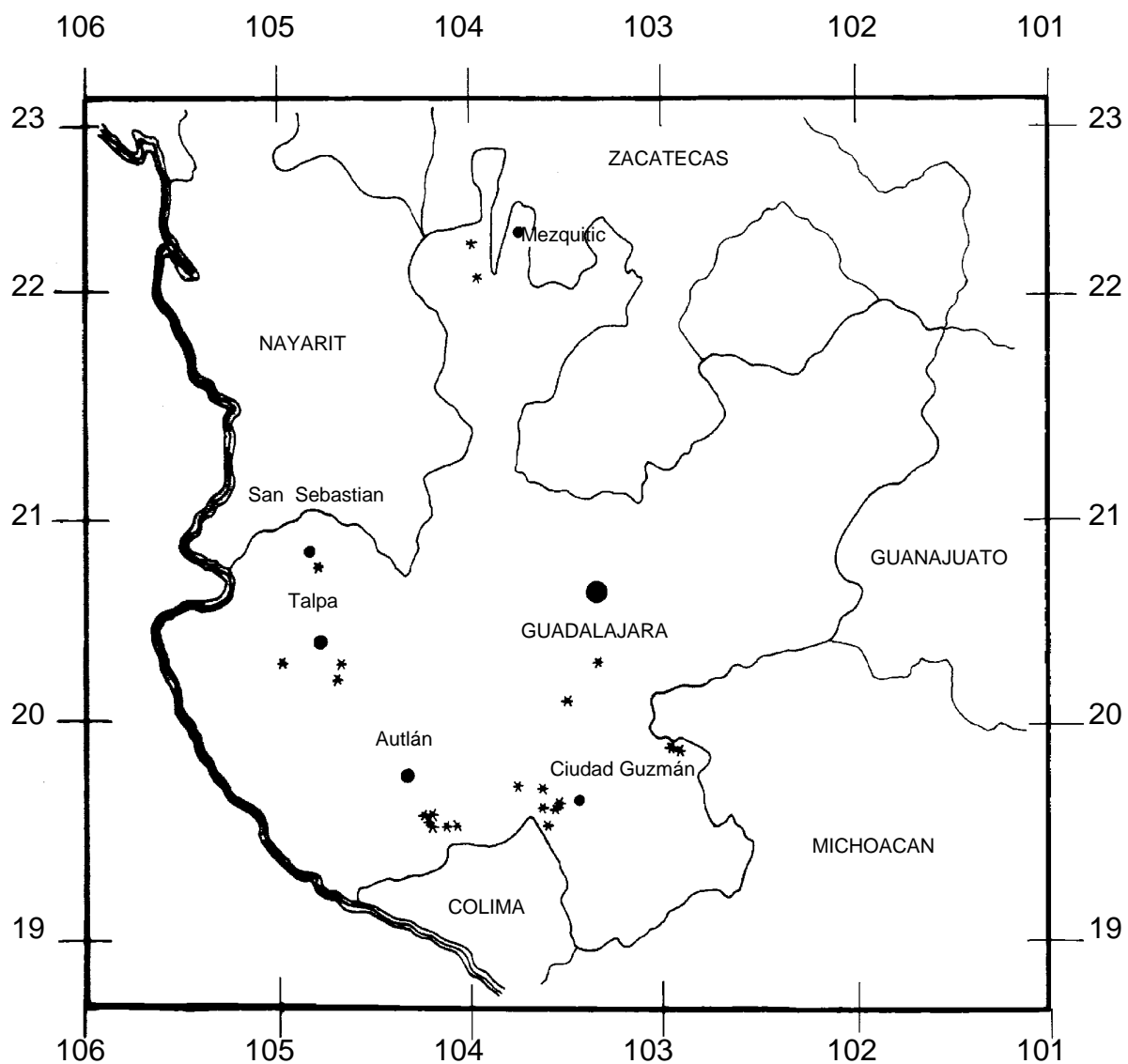


Figura 3. Mapa de distribución de *Lupinus stipulatus* (·) en el Nevado de Colima y en el resto del estado de Jalisco, basado en especímenes de herbario, observaciones de campo y revisión de literatura.

La profundidad promedio del suelo es de 38.7 cm, no presenta capa de humus, el horizonte superficial es de 30 cm en promedio y la capa de hojarasca es de 8.7 cm, son suelos de color negro de textura arenosa que presentan poca leña fina o gruesa, en algunas zonas la leña gruesa está ausente. Existen algunas partes que presentan rocas y/o piedras, pero en otras es notable su ausencia. En el primer muestreo (1 de diciembre de 1999) se observó humedad superficial abundante en el suelo, en cambio en el segundo (27 de enero del 2001) el suelo estaba seco.

Con respecto a las observaciones sobre perturbación; no se encontraron evidencias de incendios sobre la corteza de los árboles o en la superficie del suelo. En algunas parcelas se detectó erosión de leve hasta severa (Figura 4a), y no se encontró presencia de animales domésticos o excretas que nos indiquen algún grado de pastoreo. Existen algunas zonas donde la pendiente es nula y la vegetación ha sido perturbada por asentamientos humanos.

El bosque de pino-encino en donde se desarrolla *L. stipulatus* está compuesto por tres estratos; el arbóreo que comprende un 20%, el arbustivo 50% y el herbáceo de 30%. El estrato superior o arbóreo es joven y la competencia entre copas es poca o nula, debido a que ésta comunidad vegetal se encuentra en rodales aislados (Figura 4b).

### 6.1.3 Abundancia

La densidad media para el primer muestreo fue de 1.3 individuos por parcela y la densidad estimada de 54.2 individuos por hectárea, mientras que para el segundo estudio la densidad media fue de 0.8 individuos por parcela y la estimada de 34.3 individuos por hectárea.

a)



b)



Figura 4. a) Zona donde se presenta erosión del suelo. b) Vegetación de bosque pino-encino donde se desarrolla *Lupinus stipulatus*.

La densidad de la población de *L. stipulatus* en la zona de estudio varia de acuerdo con diversos factores ambientales como la exposición e inclinación de la ladera. Una mayor proporción de individuos se desarrolla en sitios con laderas de exposición N y NE (Figura 5), mientras que las orientaciones S, SO y NO, presentaron la menor proporción de individuos. Únicamente en la orientación N se encuentran representadas todas las etapas fenológicas. También se observa que al N, NE y E se encuentran individuos en etapa juvenil, lo que indica que en tales orientaciones hay un proceso natural de repoblación.

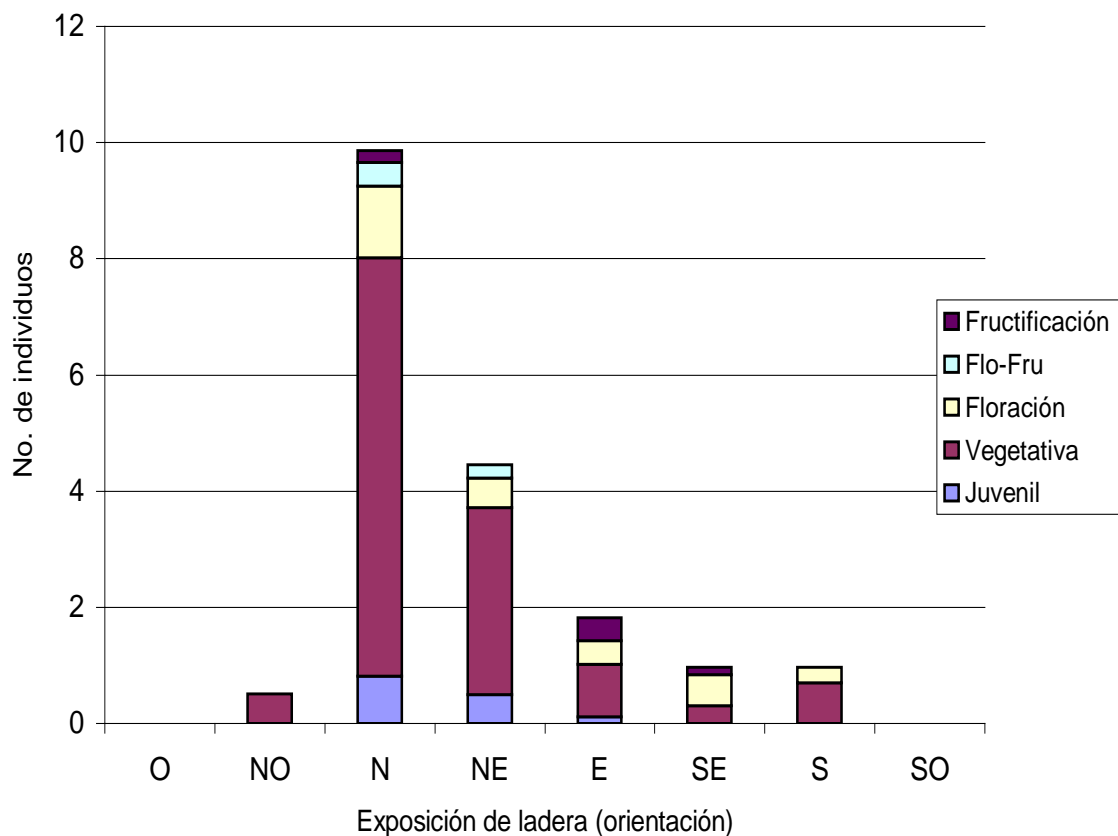


Figura 5. Número de individuos de *Lupinus stipulatus* con diferentes etapas fenológicas en distintas exposiciones de ladera.

Con relación a la pendiente (Figura 6), la especie se establece en laderas entre 21 a 50° de inclinación, pero preferentemente entre 31 a 40°. También en

este mismo rango se encuentran individuos en etapa juvenil, lo que no se observó en sitios con diferentes grados de inclinación.

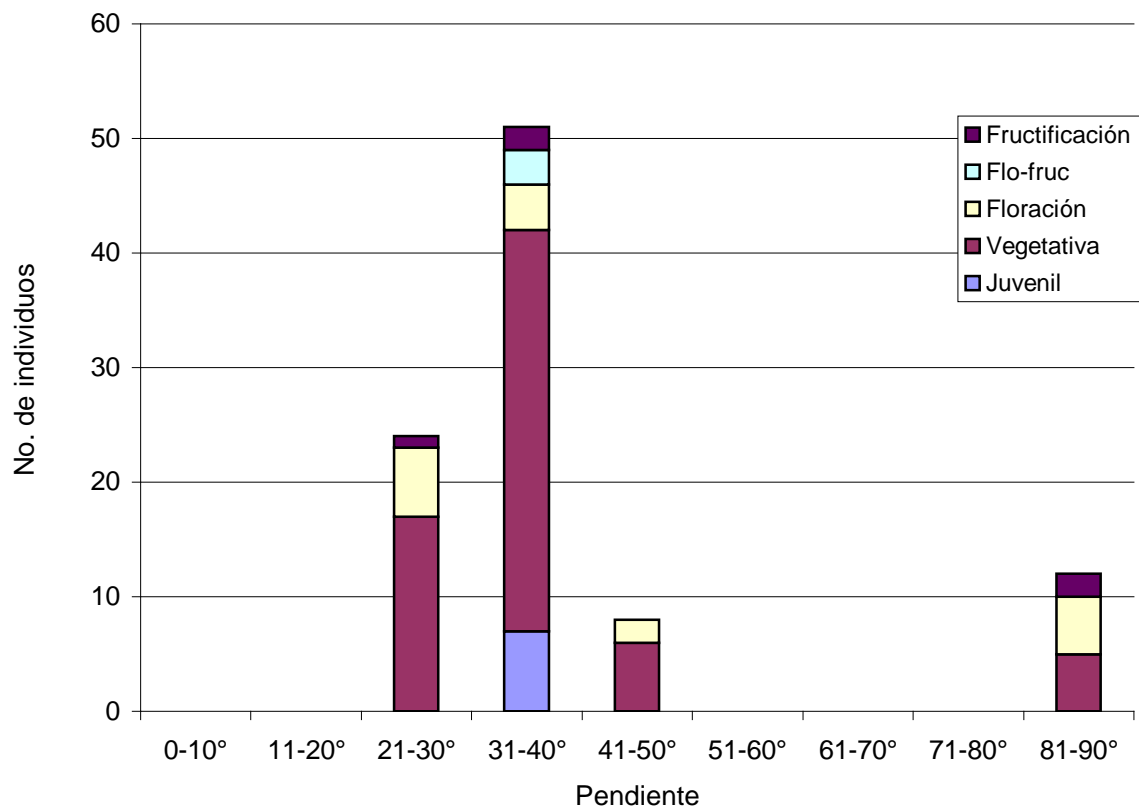


Figura 6. Número de individuos de *Lupinus stipulatus* con diferentes etapas fenológicas que se desarrollan en distintos grados de inclinación del suelo.

El comportamiento fenológico (Figura 7) de *L. stipulatus* durante el primer muestreo fue basado en un total de 95 plantas, que en su gran mayoría se encontraron en etapa vegetativa (70.5%) y en menor porcentaje corresponde a las etapas: Juvenil (7.3%), Floración (16.8%), Floración-fructificación (3.1%) y fructificación (5.2%). En el segundo muestreo con un total de 60 individuos, el 55% se encontró en etapa vegetativa, el 30% en fructificación, el 5% en etapa juvenil, el 5% en floración y el 5% en floración-fructificación. En general, en los dos muestreos la etapa vegetativa es la que predomina con relación a las otras. En el segundo muestreo se aprecia un aumento considerable en la etapa de fructificación.

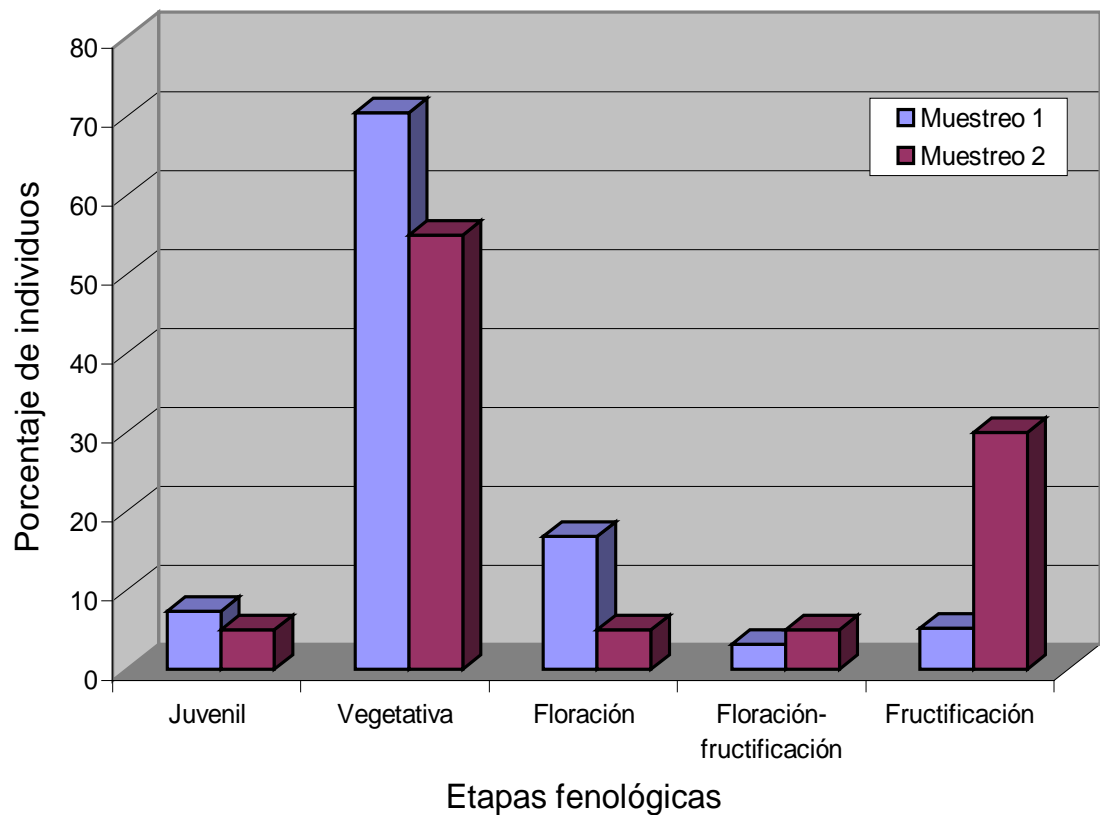


Figura 7. Comportamiento fenológico de *Lupinus stipulatus* en dos muestreos en diferentes temporadas.

#### 6.1.4 Distribución de tamaños (cobertura) en la población

La distribución de tamaños en la población cuando se considera cobertura como atributo, muestra que el mayor número de individuos se encuentra en la clase de tamaño de 0.5 a 3.0 m<sup>2</sup> (Figura 8), lo que indica que se trata de una población relativamente joven, ya que en clases de cobertura mayores disminuye drásticamente la proporción de individuos.

El mayor promedio de cobertura se encuentra en la exposición de ladera NE, disminuyendo gradualmente hacia el N y hacia el E (Figura 9).

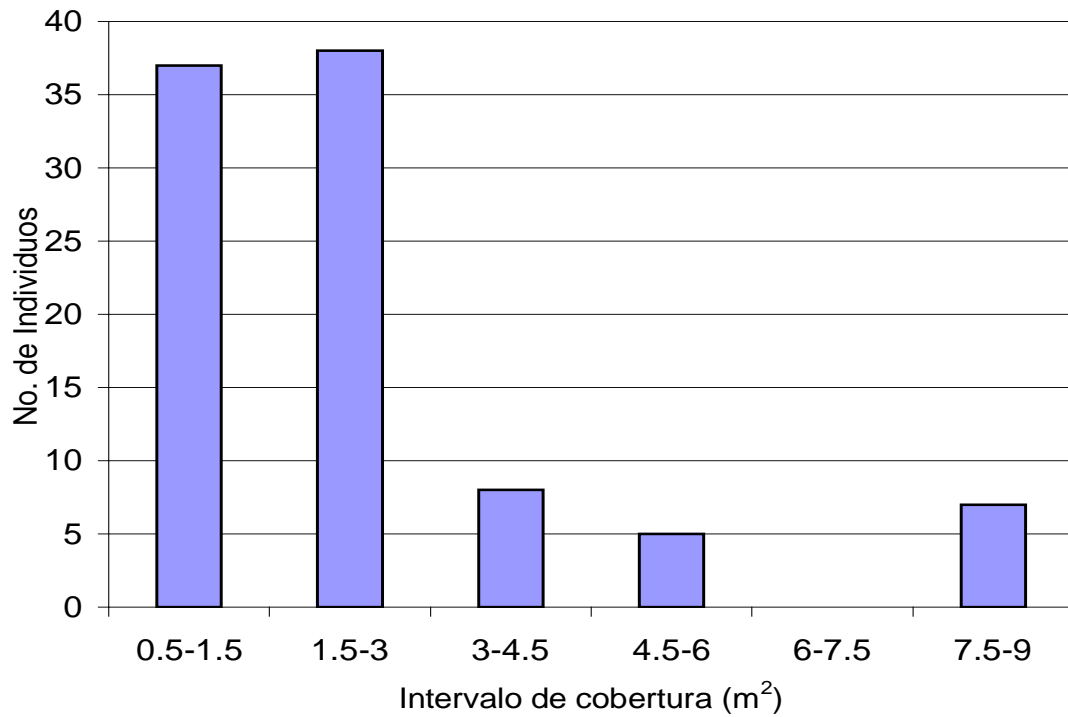


Figura 8. Distribución de tamaños de acuerdo con el promedio de cobertura en la población de *Lupinus stipulatus*.

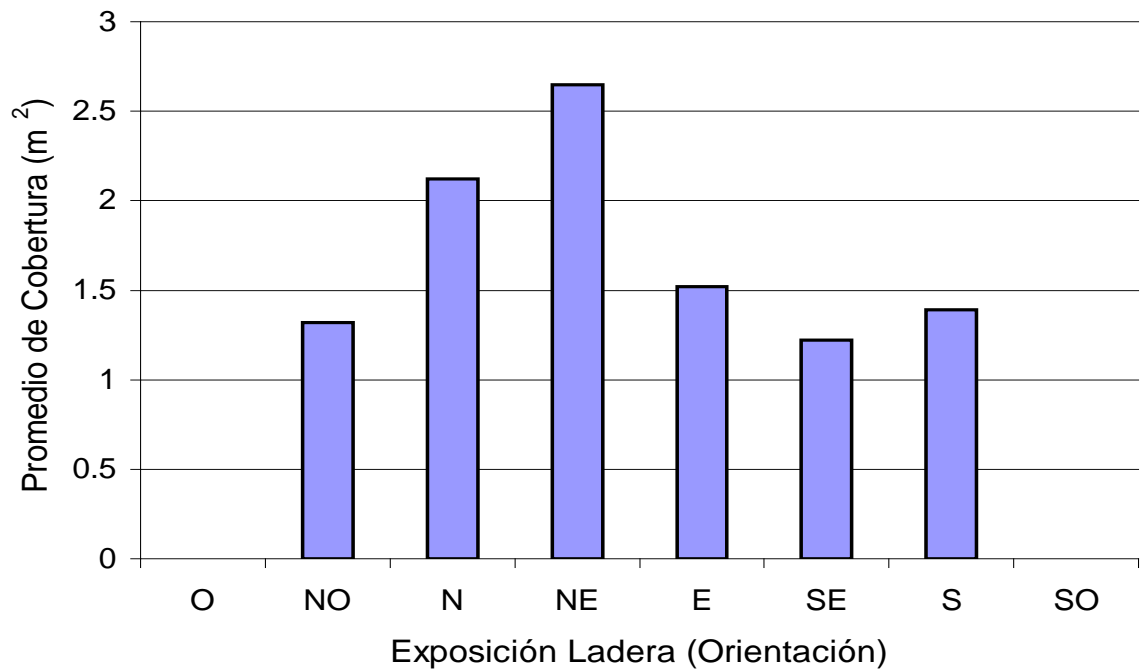


Figura 9. Exposición de ladera con relación al promedio de cobertura en *Lupinus stipulatus*.

## 6.2 PRUEBAS DE GERMINACIÓN

A las 24 horas de cultivo germinaron las primeras semillas y el proceso concluyó a los 13 días, con un total de 43 % de germinación. En algunos casos las semillas presentaron contaminación interna lo que ocasionó que no germinaran.

## 6.3 REGENERACIÓN POR BROTES AXILARES

### 6.3.1 Resultados con KIN y ANA

En la respuesta para la producción de brotes axilares, solamente la KIN dio un efecto significativo, en cambio el ANA así como su interacción con KIN no presentaron efectos significativos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para la producción de brotes axilares con ANA y KIN en *Lupinus stipulatus*.

FUENTE	G.L.	C. MEDIO	VALOR F	PROB > F
ANA	2	2.0833333	0.40	0.6735
KIN	6	32.6944444	6.24	0.0001**
ANA*KIN	12	5.3611111	1.02	0.4391

\*\* Altamente significativo

La comparación de medias para el factor KIN, indica que diferentes concentraciones dan como resultado promedios estadísticamente similares (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de medias del número de brotes por explante con KIN en *Lupinus stipulatus*, prueba de Duncan.

CONCENTRACIÓN DE KIN mg/l	n	MEDIA	GRUPO
1	12	5.58	A
2	12	5.33	A
0	12	4.50	B A
3	12	3.83	B A

Se observa que la media máxima obtenida fue de 5.58 brotes por explante obtenida con 1 mg/l de KIN (Cuadro 7).

Cuadro 7. Medias de producción de brotes por tratamiento de KIN en *Lupinus stipulatus*.

CONCENTRACION DE KIN mg/l	n	MEDIA	D.S.
0	12	4.50	2.64
<b>1</b>	<b>12</b>	<b>5.58*</b>	<b>1.97</b>
2	12	5.33	1.87
3	12	3.83	2.16

\* Media mas alta

Se observó que la respuesta a la concentración de KIN, sigue una distribución normal, por lo cual se ajustó el modelo al tipo polinomial de segundo orden (Figura 10). La media máxima fue de 5.58 brotes por explante obtenida con 1 mg/l de KIN.

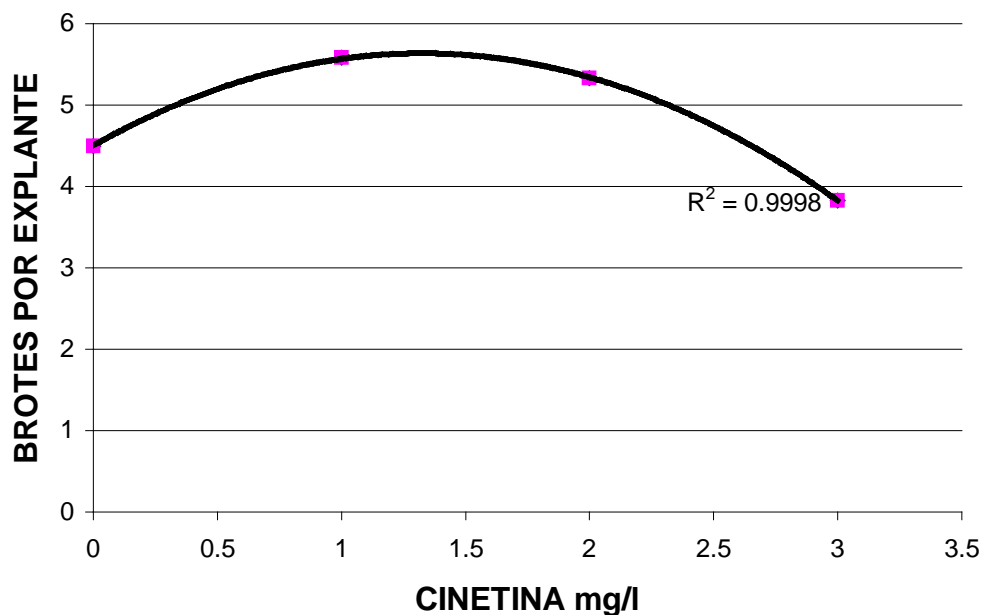


Figura 10. Respuesta de *Lupinus stipulatus* a diferentes concentraciones de KIN sobre la producción de brotes por explante.

### 6.3.2 Resultados con 2iP y ANA

Se encontró que el 2iP y ANA tienen efecto significativo y su interacción altamente significativo sobre la producción de brotes (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis de varianza para producción de brotes con ANA y 2iP en *Lupinus stipulatus*.

FUENTE	G.L.	C. MEDIO	VALOR F	PROB > F
2iP	6	4.04761905	3.04	0.0112 *
ANA	2	5.24571429	3.98	0.0236 *
ANA*2iP	12	3.61904762	2.72	0.0050 **

\* significativo \*\* altamente significativo.

La comparación de medias por factor para 2iP mostró dos grupos (Cuadro 9), donde se puede observar una disminución en la producción de brotes al aumentar la concentración de 2iP.

Cuadro 9. Comparación de medias de brotes por explante con diferentes niveles de 2iP en *Lupinus stipulatus*, prueba de Duncan.

CONCENTRACION DE 2iP mg/l	MEDIA	n	GRUPO
2	3.41	12	A
1	3.41	12	A
3	3.33	12	A
4	3.00	12	A
6	2.66	12	B A
5	2.58	12	B A
0	1.83	12	B

Mediante la comparación de medias por factor se obtuvo que con ANA se tienen 2 grupos (Cuadro 10), el A formado por los promedios más altos de producción de brotes, obtenidos con las concentraciones menores ANA (0.00 y 0.02 mg/l); y el grupo B donde se puede observar que mayores concentraciones de ANA son inhibitorias.

Cuadro 10. Comparación de medias de brotes por explante con diferentes niveles de ANA de *Lupinus stipulatus*, prueba de Duncan.

CONCENTRACIÓN DE ANA mg/l	n	MEDIA	GRUPO
0.02	28	3.179	A
0.00	28	3.107	A
0.20	28	2.393	B

La media máxima obtenida fue de 4.5 brotes por explante con 2 mg/l de 2iP y 0.02 mg/l de ANA (Cuadro 11).

Debido al efecto significativo de la interacción de las variables independientes, se realizó un análisis de regresión para superficie de respuesta (Cuadro 12), que presentó un valor altamente significativo en la regresión total.

Cuadro 11. Medias de producción de brotes por tratamiento, interacción ANA y 2iP en *Lupinus stipulatus*.

CONCENTRACION DE ANA mg/l	CONCENTRACION DE 2iP mg/l	n	MEDIA	D.S.
0	0	4	0.75	0.95
0	1	4	3.50	1.73
0	2	4	2.75	1.25
0	3	4	3.75	1.50
0	4	4	3.75	1.50
0	5	4	3.75	0.95
0	6	4	3.50	0.57
0.2	0	4	2.75	0.95
0.2	1	4	3.50	1.29
0.2	2	4	3.00	1.15
0.2	3	4	3.25	1.50
0.2	4	4	2.25	1.70
0.2	5	4	0.75	0.95
0.2	6	4	1.25	0.95
0.02	0	4	2.00	1.14
0.02	1	4	3.25	0.95
<b>0.02</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4.50*</b>	<b>0.57</b>
0.02	3	4	3.00	0.00
0.02	4	4	3.00	1.15
0.02	5	4	3.25	0.95
0.02	6	4	3.25	0.50

\*Media mas alta

Cuadro 12. Análisis de regresión de brotes por explante producidos con ANA y 2iP en *Lupinus stipulatus*.

Regresión	G.L.	Suma de cuadrados Tipo I	R <sup>2</sup>	Valor F	Prob > F
Lineal	2	10.331862	0.0638	3.715	0.0288
Cuadrática	2	14.838773	0.0916	5.336	0.0067
P. cruzados	1	28.406659	0.1753	20.429	0.0000
Regresión Total	5	53.577294	0.3307	7.706	0.0000

Al tomar en cuenta los parámetros estimados de la regresión, se construyó la superficie de respuesta (Figura 11) que muestra un valor crítico el cual indica que el punto estacionario es un máximo donde se espera la producción de 3.7 brotes por explante, y está situado en la intersección de las siguientes concentraciones: 0.02 mg/l de ANA y 3.68 mg/l de 2iP. Se puede notar con mayor exactitud en la gráfica de contorno (Figura 11b).

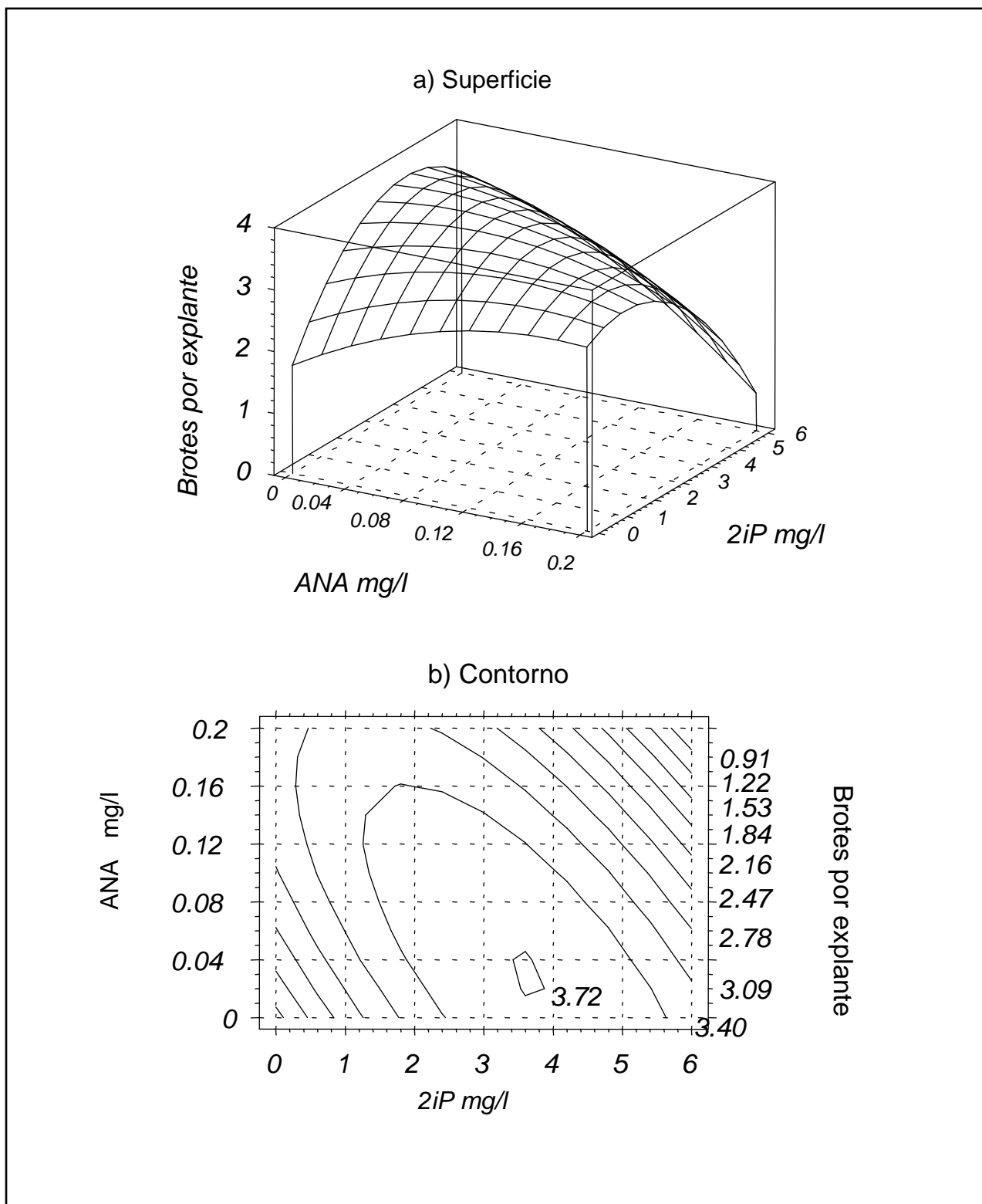


Figura 11. Respuesta de *Lupinus stipulatus* a diferentes niveles de 2iP y ANA sobre la producción de brotes por explante.

### 6.3.3 Enraizamiento

Los brotes no produjeron raíces en el medio sin reguladores de crecimiento. De las tres auxinas probadas el ANA fue el mejor, produjo un total de 9 plantas enraizadas que presentaron abundante ramificación radicular, con AIA fueron 7 con menor ramificación y con AIB solamente 5 con la ramificación mas baja (Figura 12). La evaluación de la producción de raíces hizo a los 30 días de cultivo.



Figura 12. Raíces de *Lupinus stipulatus* producidas *in vitro* con .2 mg/l de ANA.

## 6.4 REGENERACIÓN POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

### 6.4.1 Primera fase experimental

En todos los tratamientos de inducción continuó la formación de callo, de apariencia granulosa, color blanco-amarillento con grupos aislados de células friables.

De la preparación de tinciones diferenciales para su observación al microscopio, se observó la presencia de estructuras embrionales diferenciadas.

En la fase de expresión se formaron embriones en los medio MS y SH, pero el más apto fue el SH.

De estos cultivos se obtuvieron sólo cuatro embriones maduros de los callos provenientes de los tratamientos de inducción No.10 (7 mg/l de 2,4-D y 0 de KIN), No.12 (7 mg/l de 2,4-D y 0.20 mg/l de KIN) y el No. 14 (9 mg/l de 2,4-D y 0.02 de KIN); los cuales se desarrollaron hasta la etapa de corazón (figura 13), cabe señalar que también algunos se observaron en etapa de torpedo sin embargo no llegaron a la germinación. Los embriones se desarrollaron después de 35 días en el medio de expresión, pero no sobrevivieron a las etapas posteriores debido principalmente a la oxidación provocada por el envejecimiento del callo.



Figura 13. Embrión de *Lupinus stipulatus* en etapa de corazón proveniente de la primera fase experimental del tratamiento de inducción No. 10 y medio de expresión SH con glutamina.

En los experimentos efectuados para evaluar el efecto de las concentraciones de auxinas y citocininas, no se encontró relación entre los parámetros estudiados y el número de embriones obtenidos, por lo cual no fue posible realizar análisis estadísticos.

En el experimento con KIN y 2,4-D utilizando folíolos como explante (Cuadro 3), se desarrollaron 6 embriones provenientes del tratamiento 9 (8 mg/l de 2,4-D y 3 mg/l de KIN) que se tornaron necróticos y 2 en el tratamiento 8 (8 mg/l de 2,4-D y 2 mg/l de KIN) de los cuales uno se encontraba deforme, ninguno de ellos llegó hasta la fase de germinación.

#### 6.4.2 Segunda fase experimental

Cabe señalar que en todos los tratamientos el folíolo se desorganizó más rápidamente que el peciolo, pero sobrevive por más tiempo este último. En general, en todos los tratamientos se tuvo desarrollo de callo, con apariencia granulosa, de color blanco-amarillento y un poco friable (Figura 14). El callo se desarrolló a los 23 días en el medio de inducción.



Figura 14. Callo embriogénico de *Lupinus stipulatus* proveniente del tratamiento de inducción No. 7 y del medio de expresión No. 4.

Solamente en cultivos provenientes de folíolos en el tratamiento de inducción No. 7, se observaron embriones en diferentes estados de desarrollo indistintamente del medio de expresión. Algunos embriones se encontraron en etapa globular (Figuras 15 y 16).



Figura 15. Embriones de *Lupinus stipulatus* en etapa globular provenientes del tratamiento de inducción No. 7 y expresión No. 5.

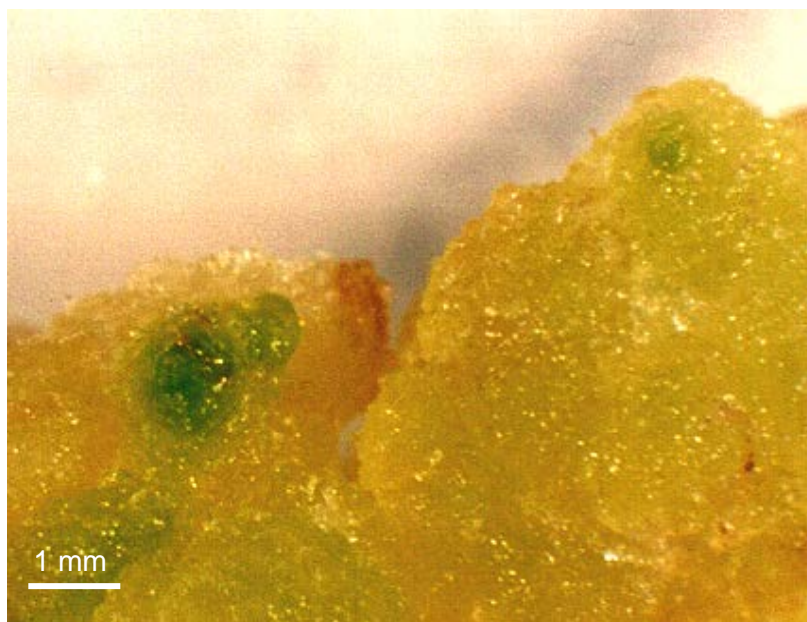


Figura 16. Embriones de *Lupinus stipulatus* en etapa globular provenientes del tratamiento de inducción No. 7 y expresión No. 5.

En esta segunda fase experimental al igual que en la primera, no se realizaron análisis estadísticos debido al bajo número de embriones producidos y a la ausencia de embriones maduros en la mayoría de los tratamientos.

## 7. DISCUSION

### 7.1 Distribución

De acuerdo con los ejemplares de herbario la especie ha sido colectada en cuatro localidades correspondientes a la zona del Nevado de Colima. El tipo de vegetación en que se desarrolla es bosque de pino-encino, bosque de oyamel y mesofilo de montaña; las observaciones del presente trabajo coincide en que el tipo de vegetación predominante es bosque de pino-encino. La cota altitudinal en que se desarrolla, de acuerdo a los reportes de herbarios, es entre los 2,100 a 2,825 m; McVaugh (1987) menciona que se localiza entre los 2,250 a 2,650 m en la zona, mientras que en el muestreo realizado para una localidad del Nevado, es entre los 2,100 a los 2,200 m.

En cuatro localidades citadas en los ejemplares de herbario del Nevado de Colima, la especie se reporta como abundante pero se considera que estos datos son subjetivos ya que no están basados en estudios poblacionales. Un reporte de herbario menciona que el tipo de suelo es areno-arcilloso, en cambio, en las observaciones realizadas el suelo fue catalogado como arenoso debido a su textura porosa.

### 7.2 Descripción del hábitat en la zona de estudio

González y Pérez, (1987); Cuanalo *et al.*, (1989); Guevara *et al.*, (1993); Miranda y Hernández, (1963); Martínez (s/f) y SPP, (1981) concuerdan con el presente estudio en que el tipo de vegetación en la zona es bosque de pino-encino.

La profundidad del suelo varía de 10 a 30 cm (SPP, 1981) mientras que en el presente trabajo se observó una profundidad de 38.7 cm en promedio.

Navarro *et al.* (1999) reportaron la presencia de un bosque laxo, donde en el estrato herbáceo predominan las gramíneas. Las observaciones de campo concuerdan en que el estrato arbóreo es escaso, predomina el arbustivo y es muy escaso el herbáceo. Esto se debe posiblemente, a que la vegetación se

encuentra en proceso de cambio, debido a que el estrato herbáceo acelera la formación de suelo e influye en la sucesión de plantas.

En la zona del Nevado de Colima no existe una estación meteorológica que proporcione datos con respecto al clima y precipitación anual en sus diferentes niveles altitudinales.

La información que se presenta está basada en documentos:

El régimen regional de humedad disponible reportado en el mapa edafológico del CETENAL (1976), Rzedowski y McVaugh, (1966) y Guevara *et al.*, (1993) coinciden en que es subhúmedo o moderadamente húmedo con precipitación anual de 904 a 945 mm. Navarro *et al.*, (1999), Cuanalo *et al.*, (1989) y Villalpando y García, (1993) mencionan que el índice de humedad es ligeramente alto, entre los 500 a 600 mm en los meses de junio a octubre que es el tiempo de mayor precipitación entre los 2,000 a 2,500 msnm. Al parecer, como mencionan Braatne y Bliss, (1999), la humedad en el suelo se ve relacionada a la profundidad del terreno, tipo de suelo y pendiente,

*Lupinus stipulatus* crece en clima templado en donde la temperatura promedio anual es de 15.4°C en el rango altitudinal antes mencionado (Navarro *et al.*, 1999), mientras que Villalpando y García (1993) reportan temperaturas medias anuales por arriba de los 18°C con máximas que van de los 26 a 30°C y mínimas anuales entre 12 a 14°C.

La carta de uso de suelo de CETENAL (1975a) considera la zona de estudio como bosque natural latifoliado que prospera en las barrancas como parte del bosque mesofilo de montaña (Alvarez, 1978).

La especie en estudio se desarrolla en suelos sobre rocas ígneas (Rzedowski, 1981) principalmente de toba (CETENAL, 1975b).

No existe aprovechamiento del suelo, ya que su uso potencial es catalogado como zona de vida silvestre, debido a que no son terrenos aptos para el desarrollo agrícola o pastoreo por estar restringidos a pendientes que van desde 30 al 80%, lo que impide el establecimiento de parcelas cultivables y

por la obstrucción superficial de la vegetación, que cubren de un 30 a 70% del área (CETENAL, 1977 y SPP, 1981).

El uso forestal que se da en esta zona es a nivel industrial, donde se hace una explotación y extracción intensiva de árboles (SPP, 1981).

En otro aspecto Maron y Jefferies, (1999) mencionan que el contenido de nitrógeno orgánico en el suelo es alto, sin embargo la relación carbono:nitrógeno es baja. Al parecer estas condiciones favorecen la descomposición microbiana y se da un alto nivel de mineralización de nitrógeno que incrementa la biomasa de las plantas pioneras como son los *Lupinus* y otras gramíneas exóticas dominantes.

### 7.3 Abundancia

Los ejemplares de herbario reportan que *L. stipulatus* es abundante, sin embargo estos datos son relativos; en la zona de estudio del Nevado de Colima se considera como escasa, dado que la densidad media de ambas muestras no sobrepasan de 1.3 individuos por parcela y una densidad estimada de 55 individuos por hectárea, además, la especie es frecuentemente confundida. En un estudio realizado en la zona de la “Meseta Purhepecha”, la población natural de *Lupinus spp.* oscila entre 10,000 a 80,000 plantas por hectárea (Lemus *et al.*, 1986). Puede ser que a la fecha estos datos han cambiado, debido a que con el paso del tiempo no prevalecen las mismas condiciones ambientales y la estabilidad de las poblaciones.

El hecho de que la mayoría de individuos se encuentren en la exposición N y en diferentes etapas fenológicas, se debe al efecto de umbría donde se manifiestan condiciones de humedad elevadas, acordes con las precipitaciones (Navarro *et al.*, 1999). Estas preferencias por la exposición N puede indicar que se trata de una especie de sucesión tardía, ya que se establece en lugares con menor insolación y por lo tanto menor temperatura, lo que favorece una mayor disposición de la humedad residual por un tiempo más prolongado con respecto a las exposiciones S.

Respecto a la inclinación de la pendiente, la especie se establece en laderas preferentemente entre 31 a 40°, en este rango de inclinación se desarrolla mejor debido posiblemente a que es una zona muy húmeda y el punto de saturación es moderado.

Con relación al patrón fenológico se encontró que para ambos estudios la gran mayoría se encuentra en etapa vegetativa. Al respecto Bishop y Schemske, (1998) mencionan que la etapa fenológica más importante y vulnerable es la floración que determina la sincronización y desarrollo de las semillas y por lo tanto la reproducción de la especie. Esta etapa tiene un período de tiempo largo en relación con las otras. Cada una es influenciada o sincronizada por condiciones ambientales adversas (Field y Putnam, 1991) y por el daño de los insectos herbívoros. Por otro lado se encontró un alto porcentaje de fructificación en el segundo muestreo realizado, debido a que en ese tiempo es el término del ciclo de vida de la especie.

#### 7.4 Distribución de tamaños (cobertura) en la población

La mayoría de los individuos presentaron una cobertura de 1.5 a 3.0 m<sup>2</sup>, esto indica que la población se considera relativamente joven. Condit *et al.*, (1998) señalaron que en ausencia de datos detallados sobre dinámica de las poblaciones, este hecho puede mostrar la salud de una población, si existe una mayor proporción de individuos jóvenes puede interpretarse como una población estable o incluso en ligero crecimiento. Sin embargo se hace patente la necesidad de realizar estudios demográficos que sustenten las tendencias de la población.

#### 7.5 Pruebas de germinación

De las 100 semillas sembradas en cultivos asépticos, un 43% germinaron en un lapso de quince días y el 57% restante no germinó, esto indica que la viabilidad es relativamente baja, ésta condición es determinada principalmente por la propia facultad germinativa de las semillas o por diversas condiciones ambientales como son la temperatura, humedad, tipo de suelo, etc. en cambio,

bajo condiciones *in vitro* estos factores son controlados. Al respecto M. A. Ruíz-López (com. pers.) menciona que la germinación de semillas de *Lupinus* es menor en condiciones de campo que en cultivos *in vitro*, esto puede ser ocasionado por los factores ambientales.

#### 7.6 Micropropagación por brotes axilares

El cultivo *in vitro* de *Lupinus* ha sido complicado debido a que el género está compuesto por especies consideradas como recalcitrantes. Ball en 1946 intentó su propagación por vez primera (Swiecicki *et al.*, 2000).

Se han realizado investigaciones para evaluar el desarrollo con diferentes tipos de explante como nudos cotiledonares (Upadhyaya *et al.*, 1992 y Harzic *et al.*, 1998) y meristemos apicales o brotes (Rybczynski y Podyma 1993a). En el presente estudio se utilizaron fragmentos de brote de aproximadamente 2.5 cm que, como hace mención George (1993) mientras más grande es el explante, tiene más posibilidad de supervivencia en condiciones *in vitro*.

Por otro lado, el medio de cultivo MS ha sido el más utilizado en diferentes trabajos (Rybczynski y Podyma, 1993a, Harzic *et al.*, 1998 y Swiecicki *et al.*, 2000). Este medio, también mostró ser el más adecuado en el presente trabajo.

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 KIN, TDZ, Benzilaminopurina (BAP) y 2iP en diferentes concentraciones (Rybczynski y Podyma, 1993a; Harzic *et al.*, 1998; Fernández-Romero *et al.*, 1998; Ochatt *et al.* 1992). Por lo cual, para esta investigación, se utilizaron los reguladores ANA en combinación con KIN ó 2iP.

Con estos reguladores se logró la propagación por proliferación de brotes axilares de *L. stipulatus* por el efecto de la KIN que estimula las yemas axilares (George, 1993), generando nuevos brotes.

Se han logrado producciones desde 2 (Rybczynski y Podyma, 1993a) hasta 65 brotes (Upadhyaya *et al.*, 1992 y Swiecicki *et al.*, 2000) los cuales fueron desarrollados hasta 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. stipulatus* es una especie erecta, poco ramificada, con entrenudos largos y pocas yemas meristemáticas.

En tratamientos testigo (sin reguladores de crecimiento) se obtuvo una producción de 4.5 brotes por explante, no existe mucha diferencia en relación a la media más alta. Esto podría ser debido a que la planta no presenta una fuerte dominancia apical.

Otras especies que se han propagado por cultivo de tejidos son *L. albus*, *L. mutabilis*, *L. angustifolius*, *L. hispanicus* y *L. texensis*. En el presente trabajo se obtuvo una producción de 5.5 brotes por explante en el medio MS con 1 mg/l de KIN a partir de yemas axilares, en *L. texensis* se obtuvo una respuesta de 15 brotes por explante en la misma concentración de KIN pero a partir de nudos cotiledonares (Upadhyaya *et al.*, 1992).

Respecto al enraizamiento de los brotes, se recomienda utilizar bajas concentraciones de ANA para estimular la inducción y desarrollo de raíz en brotes de *L. stipulatus*, ya que se observó que no producen raíces de manera espontánea en el medio basal, como sucede con otras especies. El tiempo necesario para la inducción de raíz es de aproximadamente 3 semanas; resultados similares fueron reportados por Grazyna (1987) y George (1993), aunque este último no hace mención del tiempo de desarrollo.

### 7.7 Regeneración por embriogénesis somática

Como es conocido, la embriogénesis somática es un método efectivo de propagación para algunas especies hasta obtener un número ilimitado de individuos (Swiecicki *et al.*, 2000). Al parecer la etapa de desarrollo del explante es el factor más importante en la regeneración de *Lupinus* (Rybczynski y Podyma, 1993b), de acuerdo a las observaciones hechas en el presente

estudio, la eficiencia de la embriogénesis es influenciada principalmente por el genotipo, el tipo de explante y su desarrollo y la concentración de auxina utilizada. La etapa crítica de la regeneración por esta vía en leguminosas, es la maduración y germinación, las cuales son significativamente influenciadas por la anatomía y morfología de los embriones somáticos. Los embriones morfológicamente normales presentan un polo radicular, el brote meristemático y cotiledones, en cambio los anormales presentan estructuras diferentes y no se desarrollan (Ochatt *et al.*, 1992 y Griga *et al.*, 1992).

Varios investigadores (Swiecicki *et al.*, 2000; Rybczynski, 1999; Rybczynski y Podima, 1993b; Malik y Saxena, 1992 y Nadolska-Orczyk, 1992) reportaron que para el desarrollo de la embriogénesis somática en *Lupinus* se recomienda iniciar a partir de embriones inmaduros. Son pocas las referencias donde han utilizado foliolos como explantes, como es el caso del cacahuate (*Arachis hypogaea*), (Chengalrayan *et al.*, 1994) y alfalfa (*Medicago sativa*), (Stuart y Strickland, 1984a). También Phoplonker y Caligari en 1992 reportaron que para la producción de callo, es mejor utilizar hipocotilos, discos de hojas, cotiledones, segmentos de raíz, peciolo o filamentos de anteras como material de explante. En el presente trabajo se utilizaron hipocotilos debido a que no se contaba con semillas inmaduras para las pruebas requeridas.

Para la embriogénesis somática en leguminosas se han utilizado varios medios basales, como el MS, SH y B5 de los cuales en el presente trabajo, se probaron el MS y SH. Se observó después de varios experimentos, que el medio SH produce el mejor crecimiento y desarrollo de callos, así como mayor sobrevivencia de los explantes.

Luo y Jia, (1998) mencionan que para la inducción de diferentes tipos de callo en *Astragalus adsurgens* (Leguminosae), el medio debe estar suplementado con 2,4-D y BA. Varios autores como Chengalrayan *et al.*, (1994) en cacahuate; Griga *et al.*, (1992); Phoplonker y Caligari, (1992); Nadolska-Orczyk, (1992) en *Lupinus*, y Stuart y Strickland, (1984b) en alfalfa, han trabajado con diferentes tipos de reguladores pero al parecer el más

utilizado es el 2,4-D, que también fue empleado en nuestros experimentos en combinación con KIN. El 2,4-D es usado comúnmente en altas concentraciones en especies forrajeras y leguminosas (Durham y Parrot, 1992 citados en Rybczynski y Podima, 1993b), pero al parecer es completamente inefectiva en la inducción embriogénica de cultivos *in vitro* de *L. albus* (Rybczynski y Podyma, 1993b). Los resultados del presente trabajo coinciden con este último.

En cuanto al número de embriones desarrollados Rybczynski y Podyma (1993b) mencionan que en *L. albus* varía de 1 o más por explante mientras que Nadolska-Orczyk (1992) reportó que en *L. angustifolia*, *L. albus* y *L. mutabilis* se desarrollan de 6 a 12 embriones por explante, en comparación Malika y Saxena, (1992) con *Phaseolus* obtuvieron entre 70 a 250. Los resultados obtenidos en este estudio hacen suponer que el genotipo y los reguladores de crecimiento influyen la inducción de la embriogénesis, independientemente del medio de expresión utilizado.

Hasta ahora no se puede considerar que se haya establecido el método de regeneración por embriogénesis somática, a pesar de que se han realizado más experimentos, donde se han probado otras fuentes de explante y de citocinina. Es necesario realizar ensayos con otros reguladores de crecimiento, como el ácido abscísico para la etapa de maduración, y el uso de semillas inmaduras como explante inicial.

## 8. CONCLUSIONES

1. En la zona del Nevado de Colima *Lupinus stipulatus* es una especie con densidad de población baja, por lo que se considera escasa.
2. *Lupinus stipulatus* se desarrolla en zonas donde la vegetación es bosque de pino-encino en terrenos accidentados con pendientes abruptas, que van desde los 21° hasta 50°, en sitios con laderas de exposición N y NE entre la cota altitudinal de los 2,100 a 2,200 m.
3. La mayor producción de brotes axilares se obtuvo con 1 mg/l de KIN siendo la media máxima de 5.5 brotes por explante.
4. Se obtuvieron pocos embriones maduros en callos provenientes de los tratamientos de inducción 4, 10, 12 y 14.
5. Se han conducido una gran cantidad de experimentos pero hasta ahora no se ha logrado establecer con exactitud cuáles son los factores que intervienen en la regeneración por embriogénesis somática.

## 9. LITERATURA CITADA

- Alvarez, J. R. 1978. Estado de Jalisco. Enciclopedia de México. Tomo 7 pp. 391-449.
- Anónimo, 1979. Tropical legumes: resource for the future. Report of an ad hoc panel of the advisory committee on technology innovation. National Academy of Science. Washington, E.U.A.
- Bansal, Y. K. y P. Pandey 1993. Micropropagation of *Sesbania aculeata* (Pers.) by adventitious organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 315-355.
- Barrera N., L. L. 1996. Diversidad genética de las cepas mexicanas de *Bradyrhizobium* simbiontes de *Lupinus sp.* Tesis de Doctorado. Colegio de Posgraduados. Chapingo, Edo. de México.
- Bishop G., J. y D. W. Schemske. 1998. Variation in flowering phenology and its consequences for lupines colonizing mount St. Helens. Ecology, 79 (2): 534-546.
- Braatne H., J. y L. C. Bliss. 1999. Comparative physiological ecology of lupines colonizing early successional habitats on mount St. Helens. Ecology, 80 (3): 891-907
- CETENAL. 1975a. Ciudad Guzmán E13 B25, Carta uso del suelo. Escala 1:50,000.
- CETENAL. 1975b. Ciudad Guzmán E13 B25, Carta geológica. Escala 1:50,000.
- CETENAL. 1976. Ciudad Guzmán E13 B25, Carta edafológica. Escala 1:50,000.
- CETENAL. 1977. Ciudad Guzmán E13 B25, Carta de uso potencial. Escala 1:50,000.
- Chengalrayan, K., S. S. Sathaye y S. Hazra. 1994. Somatic embryogenesis from mature embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaeae* L.). Plant Cell Reports 13: 578-581.

- Condit, R., R. Sukumar, S. P. Hubbell y R. B. Foster. 1998. Predicting population trends from size distributions: a direct test in a tropical tree community. *The American Naturalist*. 152(4): 495-509.
- Cuanalo de la C., E., E. Ojeda T., A. Santos O. y C. A., Ortiz S. 1989. Provincias regiones y subregiones terrestres de México. XXX Aniversario. 1959-1989. Colegio de Posgraduados, Centro de Edafología, Chapingo, México. 624 pp.
- Dodds, J. H. y L. W. Roberts. 1985. Experiments in plant tissue culture. Second Edition. Cambridge University Press. 232 pp.
- Fernández-Romero, M. D. R. Moral, J. Gil y M. Moreno. 1998. The effect of TDZ on the shoot regeneration in intact seedlings of faba bean (*Vicia faba* L.). 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Valladolid. 366 pp.
- Field A., L. y D., H. Putnam. 1991. Lupin: production and utilization guide. Crop description, growth and development. Center alternative plant and animal products. University of Minnesota. pp. 3-4.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. Edit. Exegetics Limited. Second Edition. 574 pp
- Gobierno del estado de México. 1981. Las leguminosas del estado de México. CODAGEM. Dirección de Recursos Naturales. Metepec, México. 251 pp
- González, V. L. M. y J. A. Pérez de la R. 1987 Guía de la excursión botánica al Nevado de Colima, Jalisco. Guías de excursiones botánicas en México VIII. X congreso Mexicano de Botánica. Guadalajara, Jalisco México. pp 101-139
- Grazyna E., S. 1987. Plant regeneration of two *Lupinus* spp. from callus cultures vía organogenesis. *Plant Science*, 51: 245-249
- Griga, M., J. Stejskal y H. Klrnoticová. 1992. Rapid plant regeneration from juvenile explants of protein legumes. 1<sup>st</sup> European Conference on Grain Legumes Recueil de Communications Proceedings. Angers France, pp 107-108

- Guevara, S., P. Moreno C. Y J. Rzedowski. 1993. Logros y perspectivas del conocimiento de los recursos vegetales de México en visperas del siglo XXI. Instituto de Ecología, A. C. y Soc. Bot. De México. Xalapa, Veracruz. 230 pp
- Gupta, P. K. y D. J. Durzan. 1987. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Bio/Technology* 5: 147-151.
- Harzic, N.; Guilloteau, A. y Huyghe, C. 1998. *In vitro* shoot formation of *Lupinus albus* from cotyledonary node. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Valladolid 369 pp.
- Huerta-Martinez, F. M. 1995. Aspectos ecológicos del “pitayo” y “cardón” en la cuenca de Sayula, Jalisco, México. Tesis Maestria. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Edo. de México. 77 pp
- Hurtado, M. D. y Merino M., M. E. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. 232 pp
- Keel, S. 1997. Los estudios florísticos en la evaluación ecológica rápida. *Rojasiana* 4(1): 85-117
- Lemus, L. O., I. E. Escobedo H. y T., Jiménez C. 1986 La tsirangeramani (*Lupinus* spp) en la “Meseta Purepecha”. Contribuciones 3. SEP. Uruapan, Michoacan. 31 pp
- López-Bellido, L y M., Fuentes 1986. Lupine as alternative protein source. *Adv. in Agron.* 40: 239-295.
- Luo, J. P. y Jia, J. F. 1998. Callus induction and plant regeneration from hypocotyls explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*. *Plant Cell Reports* 17: 567-570
- Malik, K. A. y Saxena, P. K. 1992. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from intact seedling of *Phaseolus acutifolius* A., *P. aureus* L. and *P. wrightii* L. *Plant Cell Reports* 11: 163-168
- Maron L., J. y R., L. Jefferies. 1999. Bus lupine mortality, altered resource availability and alternative vegetation states. *Ecology*, 80(2): 443-454

- Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 1220 pp
- Martinez M., F. s/f. Preservación de la flora y la fauna para el mejoramiento del ambiente. Revista bosque y fauna. SAG. II época. Noviembre-diciembre Vol. 10 No. 6: 14-26
- McVaugh R. 1987. Flora novogaliciana. A descriptive account of the vascular plants of western Mexico. Vol. 5 Leguminosae. Ann Arbor the University of Michigan Press. U.S.A. 786 pp
- Miranda, F. y E. Hernandez X. 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. Bol. Soc. Bot. Méx. 28: 29-179
- Mongomery, C. D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Ed. Nicolás Grepe P. E., Grupo Editorial Iberoamérica. México D. F. pp 61-72.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Nadolska-Orczyk, A. 1992. Somatic embryogenesis of agriculturally important lupin species (*Lupinus angustifolius*, *L. Albus*, *L. mutabilis*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28: 19-25
- Navarro P., S., A. Chavez H., R. Villavicencio G., H. Gomez S., J. Gallardo V. y J. P. Corona. 1999. Unidades ambientales del parque nacional Volcan–Nevado de Colima y su área de influencia. Reporte técnico Proyecto ordenación territorial del estado de Jalisco. Universidad de Guadalajara, México
- Ochatt, S.; B., Pasquis; C., Pontécaille y M. Rancillac. 1992. Rapid plant regeneration from juvenile explants of protein legumes. 1<sup>st</sup> European Conference on Grain Legumes Recueil de Communications Proceedings. Angers France. 367 pp
- Olvera V., M.; S., Moreno G. y B., Figueroa R. 1996. Sitios permanentes para la investigación silvícola; manual para su establecimiento. Universidad de Guadalajara, Jal. México. 55 pp

- Phillips, G.C. y G. B. Collins. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Sci. 19:59-64
- Phoplonker, M. A. y P. D. S. Caligari. 1992. Callus formation and plant regeneration in *Lupinus mutabilis*. 1<sup>st</sup> European Conference on Grain Legumes Recueil de Communications Proceedings. Angers France, pp 109-110
- Ranch, J. P.; L. Oglesby, A. C. Zielinski. 1985. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans. *In vitro* Celular and Developmental Biology. Vol. 21. No. 11: 653-658
- Ruiz M., J.J. 1995. Composición química y determinación de alcaloides en tres especies silvestres de *Lupinus* L. (Leguminosae) de Jalisco. Tesis de licenciatura Ingeniero Agrónomo. Universidad de Guadalajara
- Rybczynski, J. J. 1999. An assessment of the present status of *in vitro* culture of lupins. Proceeding of the 8<sup>th</sup> International Lupin Conference. Asilomar, California. pp 222-235.
- Rybczynski, J. J. y E., Podyma. 1993a. Micropropagation of some *Lupinus* species from seedling explants. Genetica Polonica, 34(3): 237-247
- Rybczynski, J. J. y E., Podyma. 1993b. Preliminary studies of plant regeneration via somatic embryogenesis induced on immature cotyledons of white lupin (*Lupinus albus* L.). Genetica Polonica, 34(3): 237-247
- Rzedowski, J. 1981. Vegetación de México. LIMUSA, México D.F. 432 pp
- Rzedowski, J. y R., McVaugh. 1966. La vegetación de nueva galicia. Contr. Univ. Michigan Herb. No 9
- Sator, C. 1990. Lupinis (*Lupinus spp.*). Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 10: 288-311
- Schenk, R. V. y A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50, 199-204

- SEMARNAP. 1996. Los Parques Nacionales de México. Instituto Nacional de Ecología, Departamento de Parques Nacionales, México.
- S.P.P. (Secretaria de Programación y Presupuesto) 1981. Síntesis geográfica de Jalisco, México. 306 pp
- Stuart, D. A. y S. G. Strickland. 1984a. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L.I. the roles of amino acid additions to the regeneration medium. Plant Science Letters, 34: 165-174
- Stuart, D. A. y S. G. Strickland. 1984b. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L.I., the interaction of amino acids with ammonium. Plant Science Letters, 34: 165-174
- Swiecicki, W.; J. Rybczynski y W. K. Swiecicki. 2000. Domestication and genetics of the yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) and the biotechnological improvement of lupinus. J. Appl. Genet. 41(1): 11-34
- Upadhyaya, A., T. D. Davis, D. Sankhla y N. Sankhla. 1992. Micropropagation of *Lupinus texensis* from cotyledonary node explants. HortScience 27(11): 1222-1223
- Vázquez G, J. A., R. Cuevas G., T.S. Cochrane y H. H. Iltis. 1990. Flora de la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, Jalisco-Colima, México. Universidad de Guadalajara. 166 pp
- Vázquez G, J. A., R. Cuevas G., T. S. Cochrane, H. H. Iltis, F. J. Santana M. y L. Guzmán H. 1995. Flora de Manantlán. Universidad de Guadalajara-IMCBIO/ University- Madison. 312 pp
- Villalpando, F. y E. García. 1993. Agroclimatología del estado de Jalisco. Universidad de Guadalajara. CUCBA y laboratorio bosque "La Primavera". 40 pp

## 10. ANEXOS

ANEXO 1. Ejemplares de herbario examinados y citas bibliográficas.

**Nombres Vulgares:** moco de guajolote, garbancillo, lupino o cola de borrego, hierba de caballo, cantués, cola de zorra, ilamaxóchitl, elotitos o piojillo (Martínez, 1979).

**Autlán:** Parte más alta de la Sierra de Manantlán, 0.5-1 km NE de la casa El Zarzamoro, 2 km al Este de Las Joyas, 6 km OSO del Rincón de Manantlán, altitud 1,900 m, Iltis 1262 (WIS) (Vázquez *et al.*, 1990). 4 km al Este de las Joyas, altitud 2,200 m, Puga 11536 (IBUG).

**Cd. Guzmán:** Volcán Nevado de Colima, 28 km al SO de Cd. Guzmán, altitud 2,800 m, Vázquez 17 (IBUG). Km 10 Cd. Guzmán-El Grullo, 6.5 km por el camino a las antenas de microondas del Nevado de Colima, altitud 2,825 m Santiago 4 (IBUG). 11 km brecha El Fresnito, Antenas del Canal 13. Altitud 2,320 m. Ramírez 501. Aproximadamente a 11 km por la brecha a El Fresnito, hacia las antenas de microondas, altitud 2,100 m. Santa-Cruz s/n. El Floripondio, carretera Ciudad Guzmán- Venustiano Carranza, altitud 2,350 m, Harker s/n.

**Cuautitlán:** Al NO, 1 km al N del Cerro El Muñeco, 2 km E de Los Jardines, en la Sierra de Manantlán oriental, 20 km al SEE de El Chante, altitud 2,600-2,780 m, Sorensen 7920 y Sorensen 7923 (IBUG). N Cerro de la Cumbre punto más alto del camino de Manantlán al Durazno, 16 km al SE de Ahuacapan, 17 km al SSO de El Chante, altitud 2,100 m Iltis 29121 (IBUG). Aserradero El Cuartón McVaugh 13848 (Vázquez *et al.*, 1995). Cerro El Almeal y las cercanías, 4-5 km por camino (3 km de distancia aérea) al SE de la Estación biológica “Las Joyas”, Sierra de Manantlán occidental, altitud 2,100 m Cochrane 10603 (IBUG). SO de la Cumbre, altitud 1,700-2,000 m, Cuevas-G. 3177 (WIS; ZEA) (Vázquez *et al.*, 1995).

**Jocotepec:** Sierra del Tecuan, bosque, San Juan Cosalá, altitud 2,200 m (Puga 1023, IBUG) (McVaugh, 1909), Sierra del Tecuan, bosque, San Juan Cosalá, altitud 2,000 m Puga 4268 (IBUG).

**Mazamitla:** 5 km al SE de Mazamitla, altitud 2,100 m Zepeda s/n (IBUG). Camino a la cascada “Los Cazos”, 2 km al SO de Mazamitla, altitud 2,120 m, Reynoso 22 (IBUG).

**Mezquitic:** Bajío de “Los Amoles” rumbo a Tuxpan de Bolaños cerca del Bajío de “Las Gallinas”, altitud 2,400 m Reynoso 979 (IBUG). Pinos Altos, altitud 2,700 m Santana 1815 (IBUG).

**San Sebastián del Oeste:** Camino de San Sebastián del Oeste a La Bufa, altitud 1,400-2,200 m Reynoso 2403 (IBUG).

**Talpa de Allende:** Camino Talpa-La Cumbre km 29 junto a la carretera, altitud 2,200 m, Ramírez 1883 (IBUG). Camino de Talpa a Desmoronado, altitud 1,200 m Vázquez 1160 (IBUG). Al SO de Tapalpa, Sierra de Cuale, SO del Cerro Piedra Rajada, altitud 1,800-2,250 m McVaugh 14295 IBUG (McVaugh, 1987).

**Tapalpa:** 8 km al N de Tapalpa junto a la carretera; altitud 2,200 m Ramos s/n (IBUG).

**Venustiano Carranza:** Carretera de Cd. Guzmán al Grullo, 35-40 Km rumbo al Rancho El Izote. González 4461 (IBUG).

## ANEXO 2. Descripción de *Lupinus stipulatus* (tomado de McVaugh, 1987).

Planta leñosa o herbácea, ramificada o subarborescente de 0.5 a 1.8 m de alto, densamente pubescente con vellosidades cortas adpresas-ascendentes; foliolos 8 ó 9, cuneado-oblongos, subagudos, obtusos y apiculados, 5.5 a 6.5 cm de largo, 9 a 15 mm de ancho, densamente sedoso-estrigosos por el envés mientras que el haz está finamente cubierto por vellosidades estrigosas de 0.5 a 1.5 mm de largo; estipulas mayormente de 1.5 a 2.5 cm de largo, porción adnata de (6-) 10 a 12 mm de largo, la porción libre linear-atenuada con los ápices casi tan largos como la porción adnata, 1-2 mm de ancho en la base; racimos de más de 15 –30 cm de largo, las flores tienden a abrirse todas al mismo tiempo; brácteas linear-lanceoladas de 10-14 mm de largo y más de 1.5 mm de ancho en la base; pedicelos de 5-8 mm de largo; cáliz algo desigual en la base, el lóbulo adaxial de 5-5.5 mm de largo, 3.2-3.5 mm de ancho de perfil, subtruncado en el ápice con pocos dientes apicales; el lóbulo abaxial evidentemente más angosto, 7.5-9 mm de largo, 1.6-2.2 mm de ancho; estandarte suborbicular-ovado, más ancho en la parte media, 12.5-15 mm de largo, 13-15 mm de ancho; alas de 14-16 mm de largo, 6.5-8 mm de ancho; quilla ciliolada, doblada casi en ángulo recto; fruto 4-6 cm de largo, 10 a 12 mm de ancho con cerca de 6 semillas.

ANEXO 3. Tablas de recopilación de datos de *Lupinus stipulatus*.

MUNICIPIO \_\_\_\_\_

LOCALIDAD \_\_\_\_\_

FECHA \_\_\_\_\_

ESPECIE \_\_\_\_\_

[illegible][illegible]

MUNICIPIO \_\_\_\_\_

FECHA \_\_\_\_\_

LOCALIDAD \_\_\_\_\_

ESPECIE \_\_\_\_\_

DATOS TOPOGRAFICOS				VEGETACION	
PENDIENTE	EXP.	TOPOGRA.	GEOFORMAS	TIPOS DE VEGETACION	
		regular	Parteaguas Ladera sup. Meseta Bajío Ladera inf. Dolina	BP	BMM
ALTITUD		irregular	Ladera med.	BE BPE BEP BO	BTC BTS BTP

DATOS DEL SUELO						
PROFUND. TOTAL	CAPA DE HUMUS	TEXTURA	LEÑA		PEDREGOSIDAD DEL SUELO	
		Arenosa	FINA	GRUESA	ROCAS	PIEDRAS
		Limosa	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
		Arcillosa	Poca	Poca	Pocas	Pocas
PROF. HOR. ZONTE SUP.	CAPA DE HOJARAS.	Franca	Escasa	Escasa	Cada 20 m.	Moderadas
		COLOR	Moderado	Moderado	Cada 10 m.	cada 20 m.
			Abundante	Abundante	Cada 1 ó 3 m	Abundante
					Predominan	cada 2 m.
						Muy abundante cada 50cm

DATOS SOBRE PERTURBACION						
INCENDIO		EROSION		PASTOREO		BOSQUE
Ausencia	Severo	Ausencia	Poco Severa	Ausencia	Fuerte	Denso
Ligero		Leve	Severa	Ligero	Intensa	Abierto
Moderado		Moderado	Muy Severa	Moderado		
Fuerte		Fuerte				

DATOS FISONOMICOS DE LA VEGETACION				
VEGETACION HERBACEA %	CONOS Y SEMILLAS	NUMERO DE ESTRATOS	ESTRATO SUPERIOR	COMPETENCIA ENTRE COPAS
VEGETACION ARBUSTIVA %	Ausencia	B. de 1 piso	Renuevo	Nula
VEGETACION ARBOREA %	Pocas	B. de 2 pisos	Joven	Poca
	Regular	B. de 3 pisos	J. reproduc.	Moderada
	Muchas	No se aprecia	Maduro	Fuerte
			Sobre-maduro	

OBSERVACIONES

#### Anexo 4. Componentes de los medios MS, SH y las vitaminas PC-L2.

Medio MS (Murashige y Skoog 1962).	mg/litro
Nitrato de amonio $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ .....	1,650
Nitrato de potasio $\text{KNO}_3$ .....	1,900
Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	440
Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	370
Fosfato de potasio $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	170
EDTA sal disódica $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .....	33.6
Sulfato ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	27.8
Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	22.3
Sulfato de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	8.6
Ácido bórico $\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	6.2
Yoduro de potasio $\text{KI}$ .....	0.83
Molibdato de sodio $\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0.25
Sulfato cúprico $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0.025
Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	0.025
Medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972).	mg/litro
Fosfato de amonio $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ .....	300
Nitrato de potasio $\text{KNO}_3$ .....	2,500
Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	200
Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	400
Sulfato ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	15
EDTA sal disódica $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .....	20
Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	10
Sulfato de zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....	1
Ácido bórico $\text{H}_3\text{BO}_3$ .....	5
Yoduro de potasio $\text{KI}$ .....	1
Molibdato de sodio $\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0.1
Sulfato cúprico $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	0.2
Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	0.1

Vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979)		mg/litro
Inositol .....		250
Tiamina .....		2
Piridoxina .....		0.5