



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Establecimiento de cultivos de
células de *Lupinus spp.* para la
obtención de alcaloides**

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática
y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

Presenta

Karla María Núñez Gavica

Zapopan, Jalisco

14 de julio de 2017



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Establecimiento de cultivos de células de *Lupinus spp.* para la obtención de alcaloides

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de
Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

Karla María Núñez Gavica

DIRECTOR

Dr. Ramón Rodríguez Macías

CODIRECTOR

Dr. Antonio Bernabé Antonio

ASESOR

Dr. Juan Francisco Zamora Natera

Dr. Liberato Portillo Martínez

Zapopan, Jalisco

14 de julio de 2017

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi madre Laura y a mi abuela Laura, por estar siempre a mi lado, apoyándome, alentarme a seguir adelante, por creer y tener fe en mí en todo momento, gracias por buscar lo mejor para nosotros, por guiarnos y por su amor.

A mis hermanos Laura (Tita), Georgia y Jorge, por su apoyo y estar ahí para darme palabras de alientos y por sus buenos deseos.

A mi novio Gabriel, por haberme acompañado durante todo el proceso, por sus palabras de alientos, su paciencia y comprensión en todo momento.

“En este lugar perdemos demasiado tiempo mirando hacia atrás.

Camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas.

Sé curioso... porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos”

Walt Disney

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento que permitió realizar mis estudios de maestría y la asignación de la beca 705824/582077.

A la Universidad de Guadalajara por la oportunidad que me brindo para continuar con mi formación profesional.

Al posgrado en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas, por las facilidades otorgadas para que este trabajo llegara a su término.

Al Departamento de Madera Celulosa y Papel, por permitirme realizar la parte experimental en sus instalaciones.

Al Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la UAEM, por haberme recibido durante mi periodo de estancia.

Mi eterna gratitud y sincero agradecimiento a mi director Dr. Ramón Rodríguez Macías, por su valiosa dirección durante el desarrollo y culminación de la presente investigación por brindarme siempre su confianza para que me realizara profesionalmente.

Al Codirector Dr. Antonio Bernabé Antonio por su valiosa colaboración incondicional brindada en el desarrollo de la investigación y culminación de la presente investigación por haberme brindado su confianza, su paciencia, disponibilidad y su apoyo durante todo mi desarrollo.

Al Dr. José Francisco Zamora Natera, por su colaboración para la realización del presente trabajo y su contribución durante la elaboración del trabajo.

Dr. Liberato Portillo Martínez, por su disponibilidad, enseñanzas y el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

A todos mis amigos que estuvieron en especial Inés Reynoso, Mei Lai García, Laura Acosta, Lulú Delgado, Mony Limón, Jorge García, Carla Blanco y Adriana Reyes. Por haberme apoyado de diversas formas para obtener este logro.

A todos aquellos que me brindaron su tiempo y su apoyo durante la elaboración de este trabajo: Dr. Eduardo Salcedo, M. en C. Pedro Macedonio, Dr. Cesar Ramírez, Isaías Pedroza, Chava Pérez, por las grandes experiencias que juntos compartimos. Además, a mi compañero de laboratorio Alejandro Sánchez que juntos realizamos un excelente equipo.

En general, agradezco a todas las personas mencionadas y a las faltantes, que de una forma estuvieron durante la realización de la tesis, apoyándome, brindándome su amistad y lo mejor de ellas, haciendo cada día diferente y especial.

Gracias por su confianza.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Historia general de <i>Lupinus</i>	2
2.2. Descripción botánica y morfológica	2
2.3. Clasificación taxonómica	3
2.4. Distribución geográfica.....	4
2.5. Importancia del género <i>Lupinus</i>	4
2.6. Los <i>Lupinus</i> en México.....	5
2.7. Metabolitos secundarios en plantas.....	8
2.7.1. Alcaloides	8
2.7.1.1. Alcaloides quinolizidínicos y distribución.....	9
2.7.1.2. Alcaloides quinolizidínicos en <i>Lupinus</i>	10
2.7.1.3. Método de extracción de alcaloides	12
2.8. Cultivo de tejidos de plantas	12
2.8.1. Reguladores de crecimiento vegetal	13
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVOS.....	15
4.1. Objetivo general	15
4.2. Objetivos específicos	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16

5.1.	Obtención del material vegetal.....	16
5.2.	Germinación de semillas	17
5.2.1.	Desinfección de las semillas	17
5.2.2.	Germinación y condiciones de incubación	17
5.3.	Inducción de callo	17
5.3.1.	Medio de cultivo para inducción de callo	17
5.3.2.	Evaluación de auxinas para inducir callo	18
5.3.3.	Evaluación de auxinas con antioxidantes	18
5.3.4.	Evaluación en condiciones de oscuridad	19
5.3.5.	Evaluación de tratamientos con agua de coco	19
5.3.6.	Inducción de callo de acuerdo a la auxina para cada especie	19
5.4.	Proceso de extracción de alcaloides	20
5.5.	Determinación de alcaloides por cromatografía en capa fina	21
5.6.	Determinación de alcaloides totales.....	22
5.7.	Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS)	23
5.8.	Análisis estadístico.....	23
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1.	Germinación de semillas	24
6.2.	Inducción de callo	24
6.2.1.	Evaluación de auxinas	25
6.2.2.	Evaluación de auxinas con antioxidante.....	26
6.2.3.	Evaluación en condiciones de oscuridad	27
6.2.4.	Evaluación de tratamientos con agua de coco	29
6.2.5.	Inducción de callo para cada especie de acuerdo con las auxinas utilizadas..	31

6.3.	Rendimiento de extractos	34
6.4.	Determinación de alcaloides por cromatografía en capa fina	35
6.5.	Determinación de alcaloides totales	38
6.6.	Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS)	39
7.	CONCLUSIONES.....	42
8.	LITERATURA CITADA.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos mediante tejidos de plantas de diferentes especies de <i>Lupinus</i>	11
Cuadro 2. Metabolitos secundarios obtenidos mediante cultivo de tejidos de plantas de diferentes especies.....	12
Cuadro 3. Ejemplo de algunas auxinas y citocininas usadas en el cultivo de tejidos vegetales.	14
Cuadro 4. Combinación y concentraciones de PIC con KIN para <i>Lupinua exaltatus</i> y 2.4-D con KIN para <i>Lupinus elegans</i> para inducir callo a partir de explantes de tallo.....	20
Cuadro 5. Formación de callo (%) a los 45 d con diferentes auxinas en la primera evaluación de <i>Lupinus</i>	25
Cuadro 6. Porcentaje de inducción de callo (%) en explantes de tallo de <i>Lupinus spp.</i> , a los 21 d de cultivo.	27
Cuadro 7. Apariencia de los callos obtenidos diferentes explantes de <i>Lupinus exaltatus</i> y <i>L. elegans</i> en condiciones de oscuridad y luz, a los 36 d de cultivo.....	28
Cuadro 8. Resultados de porcentaje de inducción de callo de <i>Lupinus spp.</i> en tallo a los 76 d en oscuridad.	29
Cuadro 9. Rendimientos de los extractos orgánicos de <i>Lupinus</i>	34
Cuadro 10. Resultados del factor de retardo (Rf) de <i>Lupinus</i>	37
Cuadro 11. Estimación del contenido de alcaloides totales en cultivos de callos en dos especies <i>Lupinus</i>	39
Cuadro 12. Determinación de algunos alcaloides presentes en los diferentes extractos de <i>Lupinus</i>	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta silvestre de <i>Lupinus exaltatus</i>	3
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Lupinus</i> en el mundo.	4
Figura 3. Distribución geográfica del género <i>Lupinus</i> en México.....	6
Figura 4. Distribución del género <i>Lupinus</i> en el Estado de Jalisco, de acuerdo con colectas realizadas.....	7
Figura 5. Distribución geográfica de <i>Lupinus exaltatus</i> Zucc. (a) y <i>Lupinus elegans</i> Kunth (b) en México.	7
Figura 6. Clasificación de los metabolitos secundarios.....	8
Figura 7. Clasificación de los alcaloides.	9
Figura 8. Estructura de la quinolizidina.....	10
Figura 9. Estructura química de algunos alcaloides quinolizidínicos comunes en <i>Lupinus</i>	11
Figura 10. Semillas que fueron utilizadas para la obtención de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Lupinus</i> : a) <i>L. exaltatus</i> b) <i>L. elegans</i>	16
Figura 11. Planta silvestre de <i>Lupinus</i> que fueron recolectadas a) <i>L. exaltatus</i> b) <i>L. elegans</i>	16
Figura 12. Plántulas de <i>Lupinus</i> cultivadas en <i>in vitro</i> durante 30 d de edad. a) <i>L. exaltatus</i> ; b) <i>L. elegans</i>	18
Figura 13. Proceso de extracción de la fase orgánica en muestras de <i>Lupinus</i>	21
Figura 14. Cámara de vidrio para cromatografía en capa fina.....	22
Figura 15. Cromatógrafo de Gases Agilent Technology® modelo 6890 plus, acoplado a un espectrómetro de masas 5973N.....	23

Figura 16. Plántulas de <i>Lupinus exaltatus</i> (a y b) y <i>Lupinus elegans</i> (c y d) a los 15 d de cultivo.	24
Figura 17. Callos de <i>Lupinus exaltatus</i> obtenidos en medio de cultivo MS conteniendo agua de coco. a) 2,4-D 5.37 + KIN 0.54 μ M con 5 % de agua de coco; b) 2,4-D 5.37 + KIN 0.54 μ M con 20 % de agua de coco; c) PIC 5.37 + KIN 0.54 μ M con 5 % de agua de coco; d) PIC 5.37 + KIN 0.54 μ M con 20 % de agua de coco.....	30
Figura 18. Cultivos de callos de <i>Lupinus</i> inducidos con diferentes auxinas. a) callo de <i>L. exaltatus</i> con PIC (5.37 μ M) +KIN (0.54 μ M); b) callo de <i>L. elegans</i> con 2,4-D (16.11 μ M) y KIN (16.11 μ M).	31
Figura 19. Inducción de callo (%) en explantes de tallo de <i>Lupinus exaltatus</i> con PIC y KIN. Los valores son medias \pm desviación estándar de 4 réplicas. Valores con la misma letra no presentan diferencia estadística significativa, Tukey ($\alpha=0.05$).....	32
Figura 20. Inducción de callo (%) en explantes de tallo de <i>Lupinus elegans</i> con 2,4-D y KIN. Los valores son medias \pm desviación estándar de 4 réplicas. Valores con la misma letra no presentan diferencia estadística significativa, Tukey ($\alpha=0.05$).....	33
Figura 21. Placas en capa fina de extractos de <i>Lupinus exaltatus</i> . 1) planta silvestre hoja; 2) planta silvestre hoja desengrasada; 3) planta <i>in vitro</i> hoja; 4) estandar de lupanina; 5) estandar de esparteina; 6) planta silvestre tallo; 7) planta silvestre tallo desengrasada. Nota: El “a” es revelado con reactivo de dragendorff. y el “b” con sulfato cérico.	35
Figura 22. Placas en capa fina de extractos de <i>Lupinus exaltatus</i> . 8) planta <i>in vitro</i> tallo; 9) planta silvestre flor; 10) planta silvestre flor desengrasada; 11) callo con ANA+KIN; 12) callo con 2,4-D 5.37+ KIN 0.54; 13) callo con 2,4-D 5.37+ KIN 0.54; 14) callo con 2,4-D 10.74+ KIN 0.54. Nota: El “a” es revelado con reactivo de dragendorff. y el “b” con sulfato cérico.	35

Figura 23. Placas en capa fina de extractos de *Lupinus exaltatus* y *Lupinus elegans*. 15) callo de *L. exaltatus* con PIC+KIN; 16) callo de *L. exaltatus* con PIC 5.37+ KIN 0.54; 17) callo de *L. exaltatus* con PIC 10.74+ KIN 0.54; 18) hoja de planta silvestre de *L. elegans*; 19): hoja de planta silvestre desengrasada de *L. elegans*; 20) hoja de planta *in vitro* de *L. elegans*; 21) tallo de planta de silvestre de *L. elegans*. Nota: El “a” es revelado con reactivo de dragendorff. y el “b” con sulfato cérico..... 36

Figura 24. Placas en capa fina de extractos de *Lupinus elegans*. 22) planta silvestre tallo desengrasada; 23) planta *in vitro* tallo; 24) planta silvestre flor; 25) planta silvestre flor desengrasada; 26) callo de ANA+KIN; 27) callo con 2,4-D+KIN; 28) callo con PIC+KIN. Nota: El “a” es revelado con reactivo de dragendorff. y el “b” con sulfato cérico. 36

RESUMEN

Lupinus exaltatus y *Lupinus elegans* son especies nativas de México, y en el estado de Jalisco se localiza en zonas abiertas en bosques de pino-encino. Se caracterizan por contener alcaloides que actúan contra microorganismos, mamíferos, insectos. Se establecieron cultivos de callo para determinar la presencia de alcaloides en sus extractos. Se evaluaron las auxinas ácido naftalenacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y picloram y la citocinina cinetina usando el medio de cultivo Murashige y Skoog. La inducción de callo se realizó con explantes de tallo de plántulas de cultivo *in vitro* de 36 d de edad. Para *L. exaltatus* los tratamientos con picloram (5.37 μM) y cinetina (0.54 μM o 10.74 μM) mostraron los mayores porcentajes de inducción (100 %), mientras que en *L. elegans* el mayor porcentaje (68.75 %) ocurrió con 2,4-diclorofenoxiacético (16.11 μM) y cinetina (16.11 μM); además, mostraron callos friables, los cuales puede ser usados para el establecimiento de cultivos de células en suspensión. Los extractos de cultivos de callo, plántulas de los cultivos *in vitro* y planta silvestre, de ambas especies, fueron comparados mediante cromatografía en capa fina, observándose solo presencia de alcaloides en los extractos de la planta silvestre y en plántulas de cultivo *in vitro*. En los callos del mejor tratamiento de *L. exaltatus* (5.37 μM picloram y 0.54 μM cinetina) y de *L. elegans* (16.11 μM 2,4-diclorofenoxiacético y 16.11 μM cinetina) se cuantificaron los alcaloides totales, encontrándose concentraciones de 0.48 y 0.34 mg EATr g^{-1} biomasa, respectivamente. Con el análisis por cromatografía de gases se determinó la presencia de algunos alcaloides como lupanina, isolupanina, hidroxilupanina, pero en concentraciones trazas.

ABSTRACT

Lupinus exaltatus and *Lupinus elegans* are native species of Mexico, and in the state of Jalisco it is distributed in pine-oak forests areas. Alkaloids are characterized by acting against microorganisms, mammalian, insect. Callus cultures were established to determine the presence of alkaloids in their extracts. The naphthaleneacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram auxins and the kinetin cytokinin were evaluated using Murashige and Skoog culture medium. Callus induction was established using stem explants from seedlings *in vitro* culture of 36-days-old. The highest percentage of induction in *L. exaltatus* (100 %) was with picloram (5.37 μM) and kinetin (0.54 μM or 10.74 μM), while in *L. elegans* the highest percentage (68.75 %) occurred with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (16.11 μM) and kinetin (16.11 μM). In addition, these callus showed friable callus, which can be used for the establishment of cell suspension cultures. Callus, *in vitro* seedlings and wild plant extracts of both species were compared by thin layer chromatography. Only wild plant and *in vitro* seedlings extracts showed the presence of alkaloids. In the calluses of the best treatment of *L. exaltatus* (5.37 μM picloram and 0.54 μM kinetin) and *L. elegans* (16.11 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 16.11 μM kinetin) total alkaloids were quantified, and concentrations of 0.48 and 0.34 mg EATr g⁻¹ biomass, were found, respectively. With the analysis by gas chromatography the presence of some alkaloids (traces concentrations) like lupanina, isolupanina, hydroxylupanine, was determined.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Lupinus* pertenece a la familia Fabaceae; comprende un grupo amplio de especies y es considerado uno de los más complejos desde el punto de vista taxonómico. La mayoría de las especies crecen en América, desde Alaska hasta Argentina y sólo doce especies crecen en las tierras altas de África y la región del Mediterráneo. En México, se cuenta con aproximadamente 111, las cuales se distribuyen desde Baja California a Chiapas a lo largo de las cadenas montañosas, con un mayor centro de diversidad en el eje Neovolcánico. Las especies *L. exaltatus* y *L. elegans* son nativas de México y en el estado de Jalisco crecen de forma abundante y se localizan en zonas abiertas en bosques de pino encino, no obstante, son especies muy poco estudiadas. Los *Lupinus* no tóxicos se usan comúnmente como fuente alimenticia para el ganado (Zamora *et al.* 2013). Según, la FAO (1983), menciona que se utilizan en la nutrición humana, aprovechando sus altos contenidos de proteína y aceite y, en menor medida, como abono verde, contribuyendo a mejorar la estructura del suelo e incrementar los contenidos de materia orgánica, nitrógeno y fósforo. Las especies comúnmente son invasoras de terrenos perturbados y desempeñan un papel activo en el ciclo del nitrógeno (Dunn, 2005). Las especies del género *Lupinus* se caracterizan por contener alta cantidad de metabolitos secundarios, principalmente alcaloides quinolizidínicos (lupanina, esparteina y lupinina), que, por su alta toxicidad disminuyen su valor alimenticio y representan un obstáculo para su aprovechamiento (Wink, 1992). Una función importante que se le ha atribuido a estos metabolitos secundarios es la defensa contra microorganismos, animales, insectos, pero existen pocos trabajos para buscar alternativas de aprovechar los recursos de manera sustentable y obtener metabolitos secundarios de interés agrícola (biocidas) o medicinal. En este sentido, la biotecnología vegetal, en específico el cultivo de tejidos vegetales es actualmente una de las herramientas potenciales para obtener compuestos de interés económico. Por ejemplo, se han desarrollado protocolos de propagación *in vitro* de especies con gran potencial hortícola, aromático, medicinal, frutícola, ornamental y forestal. Por otra parte, los cultivos de callos y de células en suspensión, es una de las técnicas actuales como una fuente alternativa para producir metabolitos secundarios, tales como saponinas, taninos, terpenos y alcaloides de gran interés (Verpoorte *et al.* 2002). Por lo que el objetivo del trabajo fue establecer cultivos de callo en diferentes explantes de *L. exaltatus* y *L. elegans* determinar la presencia de alcaloides en los extractos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Historia general de *Lupinus*

El origen remoto del nombre botánico de este género (*Lupinus*), se desconoce. Aunque parece ser que es una derivación de la palabra latina “Lupus” que significa lobo, probablemente porque esta planta se daba en terrenos difíciles y salvajes teniendo así por compañeros a los lobos (Gladstones, 1974). Sin embargo, el nombre griego de *Lupinus* fue “Thermos”, presumiblemente por el sabor amargo-caliente de las semillas, en donde al parecer todos los nombres esparcidos en el área del mediterráneo se generan de este vocablo, por ejemplo, “Termis” en Egipto, “Turmus” en Arabia, “Altramuz” en España y “Turmusa” en Siria y Palestina.

2.2. Descripción botánica y morfológica

Los integrantes del género *Lupinus* (figura 1), son plantas herbáceas o arbustivas, anuales o perennes; con tallos solitarios, cespitosos o abundantemente ramificados de 0.5 a 3.0 m de altura; hojas alternas, estipuladas, palmadamente compuestas, rara vez simples, de 4 a 12 folíolos; flores en racimos terminales pedunculados que normalmente sobresalen del follaje, racimos de 0.3 a 0.5 m o más largos; brácteas florales caducas o persistentes, usualmente deciduas en anthesis de largo variable, flores con pedicelos de 2 a 12 mm de largo; bractéolas comúnmente presentes; cáliz fuertemente bilabiado, labios enteros o dentados, el superior bifido, el inferior tridentado; corolas zigomorfas, generalmente azules o azul-moradas con una mancha blanca a amarilla en el centro del estandarte por encima del ángulo producido por su mitad exterior que es refleja, ocasionalmente las flores son rosadas, rojas, blancas o amarillas; corolas glabras, excepto en la quilla; quilla glabra o ciliada a lo largo de los bordes superiores, margen superior casi recto, ángulo del margen inferior de 80 a 120; 10 estambres, monadelfos, anteras dimórficas, alternando las más largas con las más cortas; fruto dehiscente más o menos compreso lateralmente, con diversos tipos de pubescencia; óvulos de 4 a 12; semillas de tamaño y color variable, generalmente semejan el color del suelo del área en que viven (Rzedowski y Calderon, 1979).



Figura 1. Planta silvestre de *Lupinus exaltatus*. Fotografía de Nuñez-Gavica KM.

2.3. Clasificación taxonómica

De acuerdo a Takhtajan (1987), el género *Lupinus* se clasifica de la siguiente manera:

División: Magnoliophyta (Angiospermae)

Clase: Magnoliopsida (Dicotyledone)

Subclase: Rosidae

Superorden: Fabanae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Papilionoideae

Tribu: Genistea

Género: *Lupinus*

2.4. Distribución geográfica

Un gran número de especies de lupinos se ubican en la costa y en las regiones montañosas del oeste de Norteamérica, desde Alaska hasta la frontera mexicana; en México, en las regiones superiores a los 1500 msnm. En Centro y Sudamérica, se distribuye en las tierras altas de los Andes en Perú y regiones vecinas; en Brasil, Uruguay y Argentina. Algunas especies se encuentran en el este y sureste de las costas en Estados Unidos, así como en la región del Mediterráneo, incluyendo; Grecia, Turquía, España y Portugal (figura 2). También existen en las tierras montañosas tropicales de África (Gladstones, 1974; Mc Vaugh, 1987; Putnam, 1991).



Figura 2. Distribución geográfica de *Lupinus* en el mundo. Fuente: <http://www.discoverlife.org>

2.5. Importancia del género *Lupinus*

El género *Lupinus* es considerado una de las leguminosas de mayor potencial para la alimentación animal y humana, debido a su alto valor proteico (30-50 %), ácidos grasos benéficos y fibra, de hecho, algunos lupinos son comparados con la soya por estas características (Gladstones, 1980; León, *et al*, 2001; Vance, 2001). Por lo contrario, los lupinos se sintetizan y almacenan como sustancias antinutricionales o tóxicas (Muzquiz *et al*. 1993). En particular, alcaloides quinolizidínicos como la esparteína, lupinina, ácido lupínico y lupanina, son tóxicos y confieren a la planta un sabor amargo. Aunque estos

pueden almacenarse en todos los órganos de la planta, las semillas son las principales almacenadoras de alcaloides (Wink *et al.* 1995). Por esta razón, desde los años 30, se han obtenido variedades sin alcaloides de interés agronómico y alimenticio. Gracias a su capacidad de desarrollarse en suelos pobres e incluso ácidos, climas fríos y por su capacidad de fijar nitrógeno, estas especies se usan en sistemas de producción agrícola, especialmente en la rotación con cereales, y como abono verde en zonas de baja productividad agrícola. Así mismo tiene efecto positivo en la fertilidad del suelo, y son capaces de resistir estrés provocado por nitratos, salinidad, herbicidas, sequías, acidez, etc. (De Felipe, 2007) Los lupinos tienen la habilidad para solubilizar y absorber fósforo y otros elementos del suelo gracias a su sistema radicular, debido a que presenta raíces pivotantes y profundas, existiendo grandes diferencias entre las distintas especies en lo que respecta a la longitud del mismo. Poseen raíces proteoides, que les ayudan a extender su sistema radicular, por lo que son más eficientes en la absorción de nutrientes, siendo fundamental para los lupinos, ya que son una de las pocas leguminosas que no forman micorrizas, por lo que la planta puede cambiar su microambiente, modificar el pH de la rizosfera, Estas características hace que estas especies tengan potencial para la recuperación de suelos erosionados, y a la vez, desarrollen condiciones favorables para los organismos del suelo, además, mejoran las propiedades físicas y químicas del mismo (Bahmanyar y Ranjbar, 2008; Falkengren y Schottelndreier, 2004; Garden y Parbery, 1983)

2.6. Los *Lupinus* en México

En México existe una gran diversidad de especies, de hecho, es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, alberga un gran número de animales y plantas. El género *Lupinus* no es la excepción, en nuestro país, existen aproximadamente 100 especies de *Lupinus* distribuidas en 26 estados (Mc Vaugh, 1987) (figura 3).



Figura 3. Distribución geográfica del género *Lupinus* en México. Fuente: <http://www.discoverlife.org>.

En Jalisco existen alrededor de 15 especies de *Lupinus*, en su mayoría en la Sierra Madre Occidental y Sierra Volcánica Transversal (figura 4); se han reportado en los municipios de Tapalpa y Chiquilistlán (Sierra del Halo), Mezquitic (San Juan Peyotán y San Andrés Cohamiata), Tequila (Volcán de Tequila), Mascota (Cerro del Molcajete y Lago de Juanacatlán), Autlán (Sierra de Manantlán), San Martín de Bolaños (San Miguel de la Sierra), Mazamitla (Sierra del Tigre), Cuquío (Cerca del Río Aguacaliente), Jocotepec (Sierra de Tecuán), Tonila (Volcán de Fuego), Talpa (cumbre del Cerro Tejamanil y Sierra de la Campana), Ciudad Guzmán, Ojuelos Lagos de Moreno, Yahualica, Atemajac de Brizuela, Venustiano Carranza, (La Primavera) Tala. (Mc Vaugh, 1987).



Figura 4. Distribución del género *Lupinus* en el estado de Jalisco, de acuerdo con colectas realizadas. Fuente: Mc Vaugh, 1987.

En relación con *L. exaltatus* Zucc. (figura 5a) se localiza en zonas abiertas en bosques de pino-encino, y ésta, es la especie más abundante en Jalisco; comúnmente se encuentra como maleza en zonas perturbadas o cultivadas, así como al borde de los caminos, en las montañas de la Sierra Volcánica Transversal, entre los 1,800-2,000 msnm. Su época de floración es en agosto y enero (Mc Vaugh, 1987). Respecto a *L. elegans* Kunth (figura 5b) es una especie endémica de México generalmente colectada en bosques de pino opino-encino, y se encuentra ampliamente distribuida en los estados de Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos y Zacatecas (Dunn, 2005).

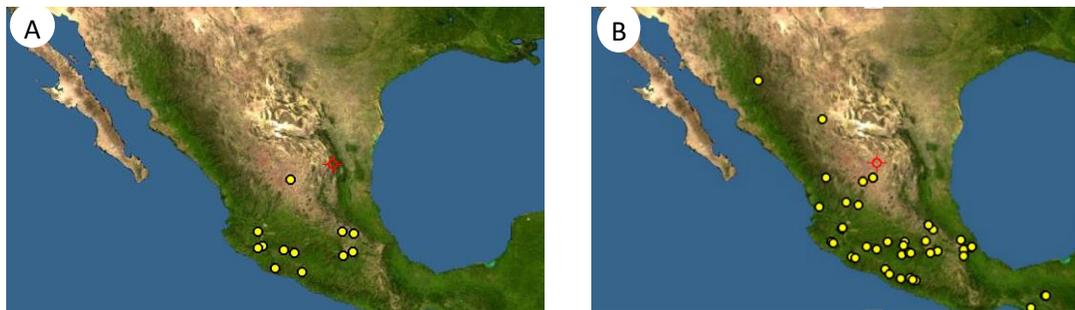


Figura 5. Distribución geográfica de *Lupinus exaltatus* Zucc. (a) y *Lupinus elegans* Kunth (b) en México. Fuente: <http://www.discoverlife.org>.

2.7. Metabolitos secundarios en plantas

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular (Sepúlveda *et al.* 2003). Son compuestos que produce las plantas los cuales no tienen una función reconocida o directa en el proceso de la fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos (Taiz y Zeiger, 2006). En la figura 6 se presenta la clasificación de los metabolitos secundarios de acuerdo a Kuklinski (2000).

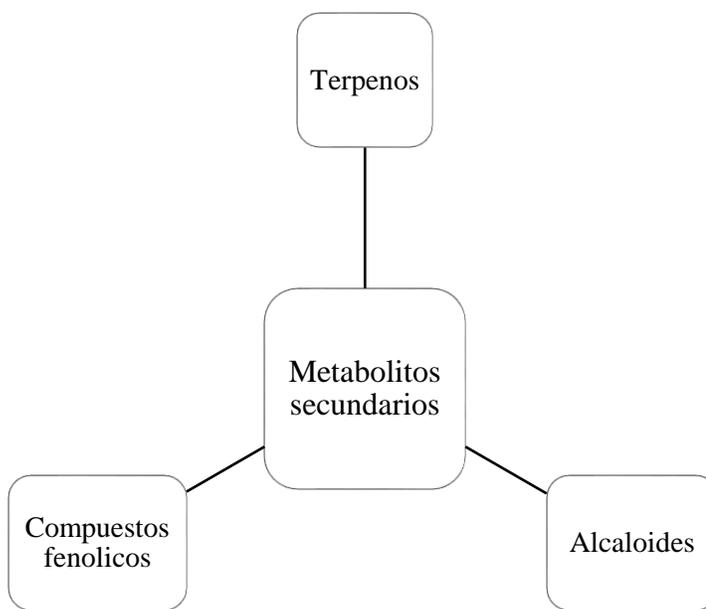


Figura 6. Clasificación de los metabolitos secundarios.

2.7.1. Alcaloides

Los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas con carácter básico y mayoritariamente de origen vegetal. Tienen una estructura generalmente compleja y ejercen acciones fisiológicas diversas incluso a dosis bajas (Kuklinski, 2000) (figura 7).

La distribución de los alcaloides es muy amplia, en el reino animal se han encontrado en diferentes grupos de artrópodos (Coleoptera, Myriapoda, Arachnida e Hymenoptera),

vertebrados (Amphibia, Dendrobatide) y animales marinos de los grupos Bryozoa y Ascidiars (Roberts y Wínk, 1998). También se encuentran en hongos, algas y vegetales inferiores. Sin embargo, la principal fuente de alcaloides son las plantas superiores; de hecho, las dicotiledóneas son el grupo de plantas donde más alcaloides se han encontrado, seguido por las monocotiledóneas (Domínguez, 1973).

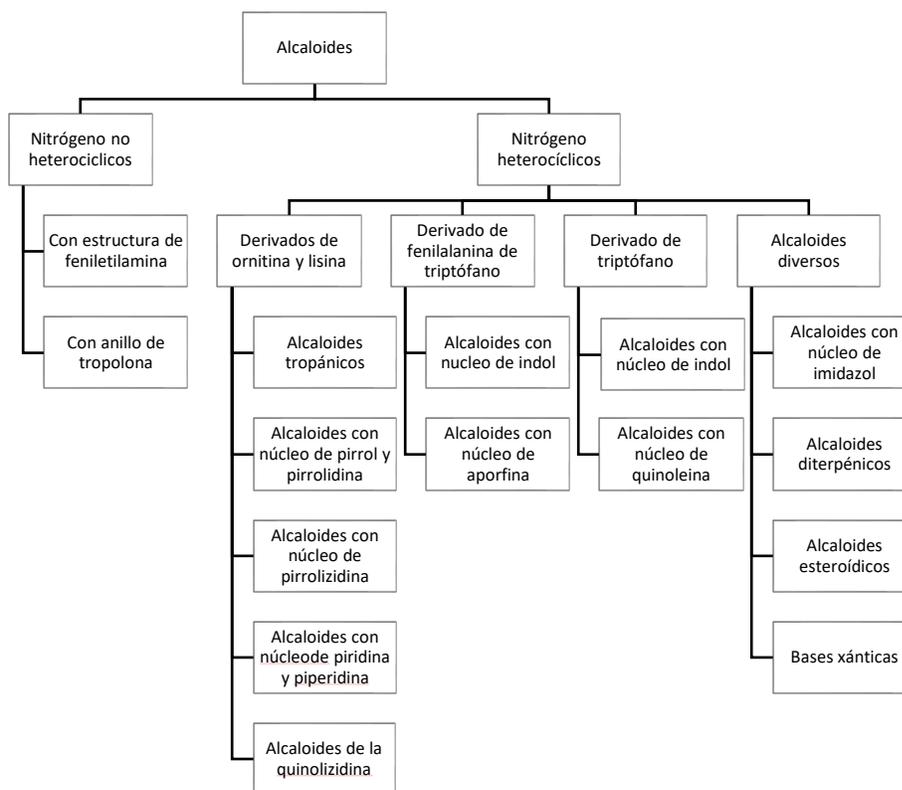


Figura 7. Clasificación de los alcaloides de acuerdo a Kuklinski (2000).

2.7.1.1. Alcaloides quinolizidínicos y distribución

Los alcaloides quinolizidínicos (AQ) son derivados de la quinolizidina (figura 8) en complejidad variable, aunque en su mayoría son bicíclicos o tetracíclicos (2 ó 4 anillos de nitrógeno), aparecen como aminas terciarias y como N-óxidos (Muzquiz *et al.* 1982; Ruiz, 1997).

Se distinguen de otros alcaloides, por la presencia de por lo menos, un sistema de anillo quinolizidínico (Kinghorn y Balandrín, 1984; Salatino y Gottlieb, 1980; Wink, 1993).

Los alcaloides quinolizidínicos se encuentran especialmente en las leguminosas (Fabaceae), principalmente en las tribus Genisteae (*Lupinus*), Sophoreae, Dalbergieae, Euchrestae, Thermopsidae, Bossiaeeae, Brongniartieae, Podalyrieae, Liparieae y Crotalarieae (Kingham y Balandrín, 1984). Sin embargo, sólo Fabaceae posee los genes necesarios para la biosíntesis, transporte y almacenamiento de alcaloides quinolizidínicos (Wink, 1993).

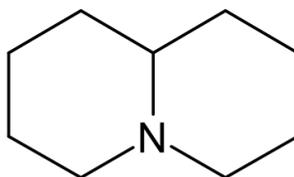


Figura 8. Estructura de la quinolizidina. Fuente: Muzquiz *et al.* 1982; Ruiz, 1997.

2.7.1.2. Alcaloides quinolizidínicos en *Lupinus*

El contenido de alcaloides es el principal factor limitante para utilizar de forma directa el follaje o semillas de los lupinos en la alimentación animal, de igual manera, influyen en la alimentación humana. Son considerados productos terminales del metabolismo del nitrógeno, se asocian a la protección vegetal contra depredadores, también se cree que intervienen en el crecimiento vegetal. Se distribuyen en toda la planta, en ocasiones aparecen solamente en alguna etapa de crecimiento, época del año o condiciones fisiológicas específicas (Domínguez, 1973; Jansen, 1981). Actualmente se han reportado más de 100 alcaloides del tipo quinolizidínico presentes en las especies silvestres del género *Lupinus* (figura 9). Sin embargo, existe variación inter especie en el contenido y proporción de algunos de ellos (Muzquiz *et al.*, 1982; Ruiz, 1997). Los AQ constituyen una defensa química de los *Lupinus* contra sus depredadores (insectos y mamíferos herbívoros) e individualmente muestran propiedades toxicológicas y farmacológicas importantes como neurotóxicos, antipiréticos, antiinflamatorios, depresores del sistema nervioso central y anti-arrítmico cardiaco, entre otros (Schmeller *et al.* 1994). Desde el punto de vista toxicológico los compuestos más importantes son la lupanina, esparteína, isolupanina, angustifolina, lupinina y 13-hidroxilupanina (Mohamed *et al.*, 1991; Priddis, 1983).

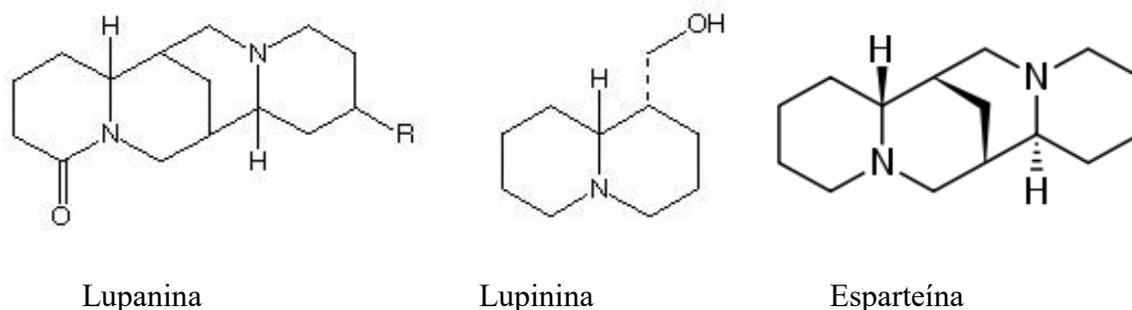


Figura 9. Estructura química de algunos alcaloides quinolizidínicos comunes en *Lupinus*.

Fuente: Mohamed *et al.*, 1991; Priddis, 1983.

Existe diversos estudios con diferentes especies de *Lupinus* en donde se han determinado y cuantificado la presencia de alcaloides quinolizidínicos (cuadro 1).

Cuadro 1. Metabolitos secundarios obtenidos mediante tejidos de plantas de diferentes especies de *Lupinus*.

Especie	Trabajo	Autores
<i>L. exaltatus</i>	Porcentaje total de alcaloides en	Bernal <i>et al.</i> 2005
<i>L. rotundiflorus</i>	<i>L. exaltatus</i> 1.93 ± 0.023,	
<i>L. montanus</i>	<i>L. rotundiflorus</i> 2.42 ± 0.061 y <i>L. montanus</i> 1.84 ± 0.064.	
<i>L. albus</i>	Se realizaron estudios de variación alcaloides	De Cortes <i>et al.</i> 2005
<i>L. angustifolius</i>	durante la germinación en diferentes especies	
<i>L. campestris</i>	de <i>Lupinus</i> . <i>L. albus</i> 2.36 % <i>L. angustifolius</i> 1.51 % <i>L. campestris</i> 2.45 %.	
<i>L. leucophyllus</i>	Tres de los principales alcaloides 5,6- deshidrolupanina, lupanina, y anagrina	Lee <i>et al.</i> 2007
<i>L. mexicanus</i>	La lupanina y 3β-hidroxilupanina fueron los principales alcaloides en el extracto (21.2 y 2.6 mg g ⁻¹).	Zamora <i>et al.</i> 2008

2.7.1.3. Método de extracción de alcaloides

El método de extracción a utilizar depende de la composición química de la semilla. La extracción de alcaloides esta generalmente basada en un hecho que normalmente ocurre dentro de la planta como sales y en su basicidad, en otras palabras, en la solubilidad diferencial de las bases y sales en agua y solventes orgánicos.

2.8. Cultivo de tejidos de plantas

El cultivo de tejidos consiste en aislar una porción de cualquier parte de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido, por ello, es necesario adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana. (cuadro 2).

Cuadro 2. Metabolitos secundarios obtenidos mediante cultivo de tejidos de plantas de diferentes especies.

Espece	Explante	Trabajo	Referencia
<i>Lupinus</i>	Se han realizado	Realizaron tratamiento	Sator, 1985
<i>Polyphyllus</i> ,	pruebas para regenerar	con 2 mg BA y 2 mg IAA	
<i>L. hartwegii</i>	plantas de diferentes	y con 2 mg BA y 0,2 mg	
<i>L. angustifolius</i>	especies de lupinos	IAA L ⁻¹ .	
<i>L. luteus</i> .	usando hojas, pecíolo foliar e hipocótilo de plántulas <i>in vitro</i> .		
<i>L. angustifolius</i>	Regeneración de las	Fue necesario utilizar	Sroga, 1987
<i>L. polyphyllus</i>	plantas se logró a partir	0,54 µM de ácido- de los cultivos de callos vía organogénica.	
		4,40 µM de 6- bencilaminopurina (BA), para la inducción de	

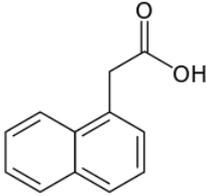
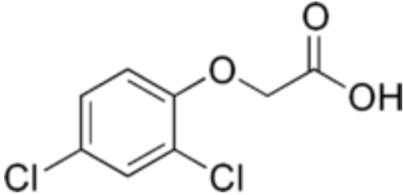
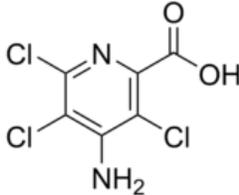
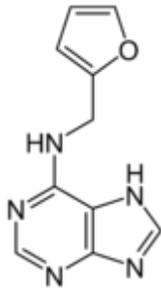
		brotos múltiples. Sólo se necesitaba NAA en el medio de enraizamiento.	
<i>Lupinus mutabilis</i>	Inducción de callo de plántulas <i>in vitro</i> (hoja, tallo).	Para la disminución de la oxidación fenólica. Pruebas con solución antioxidante, PVP y carbón activado.	Phoplonker y Caligari, 1993
<i>Phaseolus</i>	La tasa de crecimiento y el rendimiento de callo de especies y variedades de <i>Phaseolus</i> .	Fueron mayores en presencia de picloram que con 2,4-D.	Mok y Mok, 1977
<i>R. hybrida cv. Carefree Beauty</i>	Inducción de callo de plántulas <i>in vitro</i> (hoja, nódulos).	Aumentando la concentración 2,4-D de 11,3 a 181 μ M L ⁻¹ disminuye la inducción	Li <i>et al.</i> 2002
<i>Aconitum violaceum Jacq.</i>	Inducción de callo de plántulas <i>in vitro</i> (hoja, nódulos).	Mejor tratamiento 2,4-D 5.0 μ M + KIN 0.5 μ M.	Janhvi <i>et al.</i> 2013

2.8.1. Reguladores de crecimiento vegetal

Cuando estos metabolitos son producidos en forma endógena por las plantas, se les denomina hormonas vegetales o fitohormonas. El término “reguladores del crecimiento de las plantas” es usado por la industria de agroquímicos para nombrar a los compuestos sintéticos que tienen propiedades para regular el crecimiento de las plantas.

Algunos ejemplos de reguladores de crecimiento vegetal son (cuadro 3):

Cuadro 3. Ejemplo de algunas auxinas y citocininas usadas en el cultivo de tejidos vegetales.

Clasificación	Nombre	Estructura química
Auxina	Ácido 1-naftalenacético o ácido naftalenacético	
	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	
	Picloram	
Citocinina	Cinetina	

3. HIPÓTESIS

Mediante la producción de biomasa a partir de cultivos de callo de *Lupinus exaltatus* y *Lupinus elegans*, se obtendrá alcaloides, que de manera natural estas especies sintetizan y almacenan en sus hojas y semillas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Establecer cultivos de células de *Lupinus exaltatus* y *Lupinus elegans* para determinar la presencia de alcaloides en sus extractos.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Evaluar combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (auxinas y citocininas) para inducir callos.
- ✓ Determinar la mejor fuente de explante (hojas, tallos y cotiledones) para inducción de callo friable.
- ✓ Obtener extractos de las hojas, tallos y flor de la planta silvestre, de tallo y hoja de plántulas *in vitro* y de la biomasa celular.
- ✓ Determinar la presencia de alcaloides en cultivos celulares, plántulas *in vitro* y en la planta silvestre.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención del material vegetal

Las semillas de plantas silvestres de *Lupinus exaltatus* (figura 10a) y *L. elegans* (figura 10b) fueron proporcionadas por el Departamento de Botánica y Zoología del CUCBA, UdeG.

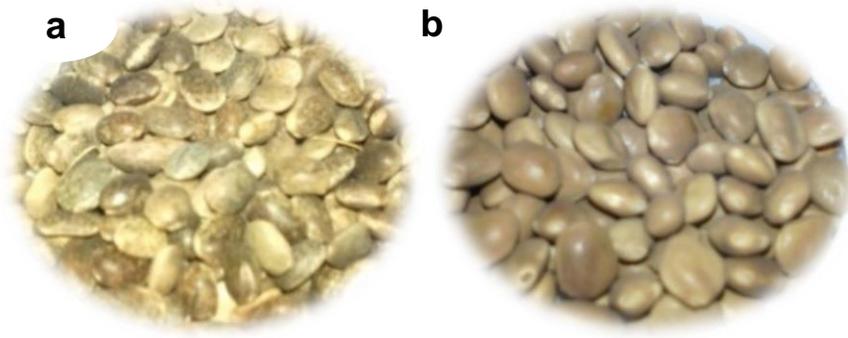


Figura 10. Semillas que fueron utilizadas para la obtención de plántulas *in vitro* de *Lupinus*: a) *L. exaltatus* b) *L. elegans*. Fotografía de Nuñez-Gavica KM.

Por otra parte, se colectaron plantas silvestres de *L. exaltatus* en Ciudad Guzmán, Jalisco, en diciembre del 2015 (figura 11a); mientras que las plantas de *L. elegans* se colectaron en enero del 2016, en la Sierra de Quila, Jalisco (figura 11b).

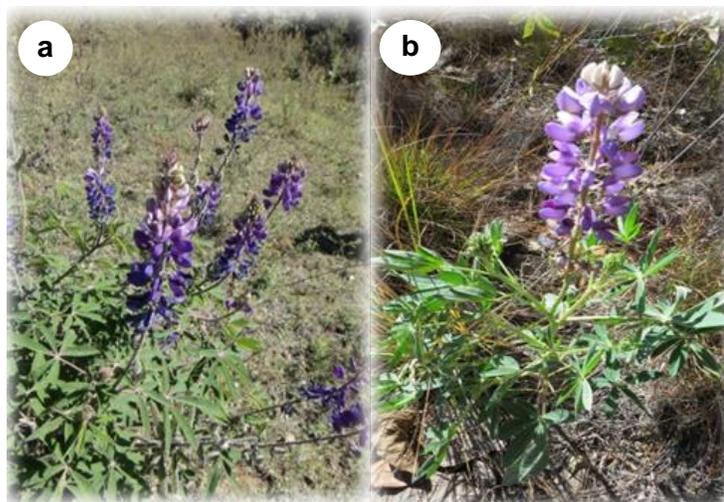


Figura 11. Planta silvestre de *Lupinus* que fueron recolectadas a) *L. exaltatus* b) *L. elegans*. Fotografía de Núñez-Gavica KM

5.2. Germinación de semillas

5.2.1. Desinfección de las semillas

Para poder obtener explantes asépticos, se germinaron semillas en condiciones *in vitro*, para lo cual, las semillas se sometieron primero a un proceso de escarificación mecánica usando una tijera haciendo una pequeña incisión del lado opuesto al embrión, después se lavó con una solución jabonosa por 5 min, luego se enjuagaron durante 10 min y se sumergieron etanol al 70 % durante 30 s. Finalmente, las semillas se sumergieron en una solución de cloro comercial (Cloralex®) al 50 % (v/v) con gotas Tween 20 (4 gotas/100 mL) durante 10 min, en agitación constante, y se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril.

5.2.2. Germinación y condiciones de incubación

Para germinación, se usó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50 % y sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y se suplementó con sacarosa (3 % p/v), se ajustó a pH 5.8 y se gelificó con fitagel (2 g L⁻¹). Aproximadamente, 25 mL de MS se vertieron en cada frasco tipo Gerber de 100 mL de capacidad y se esterilizaron en una autoclave a 121°C a 1.25 kg cm² durante 18 min. Se sembraron cuatro semillas (previamente desinfectadas) por cada frasco y se mantuvieron en un cuarto de incubación a 25°C ± 2 bajo un fotoperiodo de 16 h con luz blanca fluorescente (21 μmol m⁻² s⁻¹). Una vez que ocurrió la germinación, las plántulas se traspasaron a frascos de 1 L de capacidad conteniendo 100 mL de MS sin RCV.

5.3. Inducción de callo

5.3.1. Medio de cultivo para inducción de callo

Para inducción de callo, se hicieron varias pruebas usando el medio de cultivo MS y diferentes reguladores de crecimiento vegetal (RCV). Como citocininas, se utilizó sólo la cinetina (KIN) y esta se combinó en diferentes concentraciones con cada una de las auxinas ácido naftalenacético (ANA); ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4-D) y picloram, (PIC). Se sembraron cuatro explantes en cada frasco Gerber de 100 mL de capacidad conteniendo 25 mL de MS, pero suplementado con RCV. Las condiciones de esterilización e incubación fueron las mismas que en la sección de germinación. Cada tratamiento consto de cuatro

frascos. Las plantas asépticas con aproximadamente 30 d de edad en ambas especies se usaron como fuente de explantes para los tratamientos de inducción de callo (figura 12).



Figura 12. Plántulas de *Lupinus* cultivadas en *in vitro* durante 30 d de edad. a) *L. exaltatus*; b) *L. elegans*. Fotografía de Núñez-Gavica KM.

5.3.2. Evaluación de auxinas para inducir callo

Para iniciar las evaluaciones de inducción de callo, primero se evaluaron el efecto de tres auxinas (ANA, 2,4-D y PIC) a dos concentraciones (0.54 y 5.37 μM), y cada una se combinó con una citocinina (KIN) a una sola concentración (0.54 μM), obteniendo seis tratamientos para esta primera prueba, esta evaluación fue realizada usando tres fuentes de explantes (cotiledones, tallos y hojas) combinados en el mismo frasco, y esto se hizo para *L. exaltatus* y *L. elegans*.

5.3.3. Evaluación de auxinas con antioxidantes

No habiendo una buena respuesta de ANA sobre los explantes y, para disminuir el oscurecimiento de estos, se hizo otra evaluación usando solo 2,4-D y PIC (0.54 y 5.37 μM) cada uno combinado también con KIN (0.54 μM). Estos se evaluaron sobre explantes de cotiledones, tallos, hojas y semillas; pero el medio de cultivo se complementó con una

solución antioxidante compuesta de 100 mg L⁻¹ ácido cítrico con 150 mg L⁻¹ ácido ascórbico; además se agregó 250 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona CAS: 90003-39-8 (PVP).

5.3.4. Evaluación en condiciones de oscuridad

En una tercera evaluación, se realizaron seis tratamientos con 2,4-D y PIC, adicionando una concentración más de cada auxina (0.54, 5.37 y 10.74 µM) cada uno combinado también con la concentración baja de KIN (0.54 µM). Esta evaluación se realizó, pero solo con explantes de tallo, de cada una de las especies. Un lote de todos los tratamientos de cada especie se expuso normalmente a la luz, y el otro lote de tratamientos se mantuvo bajo condiciones oscuridad total. El medio de cultivo también se complementó con solución antioxidante y PVP que se mencionó anteriormente.

5.3.5. Evaluación de tratamientos con agua de coco

Con la finalidad de mejorar el crecimiento, se usaron los mismos tratamientos con RCV usados anteriormente, pero el medio de cultivo se complementó con 5 y 20 % de agua de coco y se adiciono también carbón activado (200 mg L⁻¹).

5.3.6. Inducción de callo de acuerdo a la auxina para cada especie

Una vez que se obtuvieron las condiciones más adecuadas en base a las evaluaciones previas, se hicieron combinaciones de PIC y KIN en concentraciones de 0.0 a 16.11 µM para *L. exaltatus*, mientras que para *L. elegans* se combinaron concentraciones de 2,4-D y KIN de 0.0 a 16.11 µM. El medio de cultivo MS se complementó con la solución antioxidante (100 mg L⁻¹ ácido cítrico con 150 mg L⁻¹ ácido ascórbico) y 0.25 g L⁻¹ de PVP, agua de coco 20 % y carbón activado 200 mg L⁻¹ (cuadro 4).

Cuadro 4. Combinación y concentraciones de PIC con KIN para *Lupinus exaltatus* y 2,4-D con KIN para *Lupinus elegans* para inducir callo a partir de explantes de tallo.

PIC o 2,4-D (μM)	KIN (μM)				
	0.00	0.54	5.37	10.74	16.11
0.00	0.00/0.00	0.00/0.54	0.00/5.37	0.00/10.74	0.00/16.11
0.54	0.54/0.00	0.54/0.54	0.54/5.37	0.54/10.74	0.54/16.11
5.37	5.37/0.00	5.37/0.54	5.37/5.37	5.37/10.74	5.37/16.11
10.74	10.74/0.00	10.74/0.54	10.74/5.37	10.74/10.74	10.74/16.11
16.11	16.11/0.00	16.11/0.54	16.11/5.37	16.11/10.74	16.11/16.11

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; PIC: Picloram; KIN: Cinetina.

5.4. Proceso de extracción de alcaloides

Se usaron muestras de hojas, tallo y flor de las plantas silvestre; hoja y tallo de la planta *in vitro* y de la biomasa de los cultivos de callo previamente molidas y deshidratadas. Las muestras, por separado, se metieron a un horno de secado a 45 °C hasta peso constante. Las muestras secas y molidas se sometieron a un proceso de extracción con hexano por 24 h para eliminar la grasa. Para la extracción de alcaloides se siguió el procedimiento realizado por Ganzera *et al.* (2010). De cada muestra se pesaron 250 mg, se agregaron 8 mL de ácido clorhídrico al (0.5 N) y se mantuvo en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm y se decantó el sobrenadante. La extracción se repitió dos veces más y se mezcló el sobrenadante de cada extracción. El sobrenadante final se ajustó el pH a 12 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N. Finalmente, al sobrenadante se traspasó a un embudo de separación y se le agregaron 30 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) para la extracción de los alcaloides (fase orgánica). Tres extracciones con CH_2Cl_2 se

realizaron sobre la muestra (figura 13). La fase orgánica se recuperó, se concentró en un rotavapor a 40 °C, y se dejó secar a temperatura ambiente.



Figura 13. Proceso de extracción de la fase orgánica en muestras de *Lupinus*. Fotografía de Nuñez-Gavica KM.

5.5. Determinación de alcaloides por cromatografía en capa fina

Los extractos fueron aplicados en placas de cromatografía en capa fina (CCF) (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄, 0.20 mm, silica gel 60 con indicador de fluorescencia. Las placas de tamaño de 4 cm de ancho por 4 cm de altura. Se marcaron con lápiz a 5 mm de la base y al frente, y cada muestra se colocó a 5 mm de distancia. Con capilares, se tomaron muestras de extractos y se aplicaron en la cromatoplaque, se dejó secar el extracto, y la placa se colocó dentro de una cámara de vidrio (figura 14). La fase móvil consistió en una mezcla de diclorometano/metanol (95 % CH₂Cl₂/ 5 % CH₃OH) y 1 mL de hidróxido de amonio (NH₄OH). Una vez que la fase móvil llegó a la marca, estas se retiraron y se dejaron evaporar, se observaron a luz ultravioleta (UV) y se revelaron con sulfato cérico y reactivo de dragendorff. Se calculó el factor de frente (R_f) que permite diferenciar un

compuesto de otro y es la relación recorrida por el compuesto en la placa y la distancia recorrida por el eluyente. Se determinó por la fase móvil: distancia recorrido por el analito (d_r) entre distancia recorrida por el eluyente (d_m); $R_f = d_r/d_m$.



Figura 14. Cámara de vidrio para cromatografía en capa fina. Fotografía de Nuñez-Gavica KM.

5.6. Determinación de alcaloides totales

Con los extractos de los cultivos de callo se determinaron los alcaloides totales mediante el uso de espectrofotometría usando verde de bromocresol (BCG), tomando como referencia a Fadhil *et al.* 2007. A 1 mL de muestra se le agregaron 5 mL Na_2HPO_4 a pH 4.7 y 5 mL BCG se agito vigorosamente y se realizó una extracción con cloroformo; fue extraído con 2, 2, y 3 mL de cloroformo y se aforó a 10 mL. El contenido de alcaloides totales se calculó en base a una curva de calibración con atropina en concentraciones desde 0 a $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, midiéndose la absorbancia a 470 nm utilizando un espectrofotómetro Uv-Vis. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de atropina (EAtr) por g de biomasa seca (mg EAtr g^{-1} BS).

5.7. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS)

Los extractos obtenidos del proceso de extracción (subsección 5.4) también se analizaron por GC/MS) (figura 15). Se usó un Cromatógrafo de Gases Agilent Technology modelo 6890 plus, acoplado a un espectrómetro de masas 5973N (Little Falls, CA, EUA) del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se usaron concentraciones de 2 mg de extracto por mL⁻¹ y se inyectaron soluciones de 1.0 µl. Se usó una columna capilar HP-5MS (30 m de largo x 0.25 mm de ancho, y 0.25 µm de tamaño de partícula. La temperatura del detector de 285°C y la columna se programó a 10 °C/ min-250 °C-5 min, 10 °C/min-285°C-20 min. El flujo del gas helio fue de 1.0 ml/min. Todos los análisis se realizaron por triplicado y los picos se integraron usando el software a ChemStation version C.00.01. Los espectros de los compuestos se compararon con la biblioteca NIST, versión 1.7a.



Figura 15. Cromatógrafo de Gases Agilent Technology® modelo 6890 plus, acoplado a un espectrómetro de masas 5973N. Fotografía de Nuñez-Gavica KM.

5.8. Análisis estadístico

Todos los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias por el método de Tukey, usando el programa Statgraphics®

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Germinación de semillas

La escarificación mecánica y el proceso de desinfección fue eficiente, para la germinación de semillas. En ambas especies se obtuvo un 100 % de desinfección de las semillas, ya que no se observó la presencia de hongos o bacterias.

En ambas especies, la germinación se presentó a los 8 d después de la siembra, obteniendo para *L. exaltatus* un 97.5 % de germinación (figura 16a y 16b) y para *L. elegans* un 95 % (figura 16c y 16d). Después de que las plántulas se traspasaron a frascos de 1 L, éstas tuvieron un desarrollo normal (figura 12), es decir no se observó contaminación o alguna deformidad de las plantas.

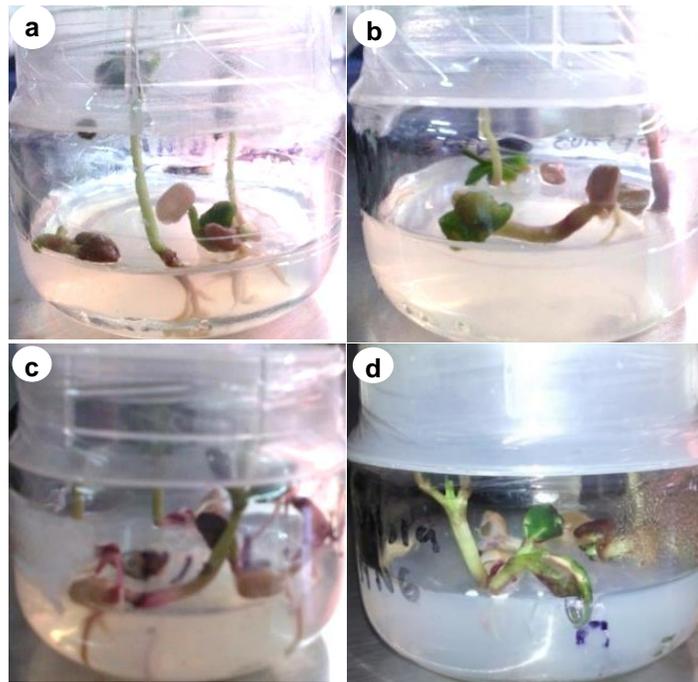


Figura 16. Plántulas de *Lupinus exaltatus* (a y b) y *Lupinus elegans* (c y d) a los 15 d de cultivo. Fotografía de Núñez-Gavica KM.

6.2. Inducción de callo

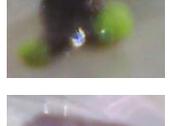
En el género *Lupinus* se han realizado pocos trabajos en cultivo *in vitro*, específicamente en el cultivo de células. Debido a la escasa información sobre las condiciones *in vitro* de estas especies, se realizaron diferentes evaluaciones para obtener los mejores resultados posibles,

es decir, se evaluaron diferentes reguladores de crecimiento, tipos de explantes, compuestos antioxidantes, condiciones de incubación (luz y oscuridad total) y modificación del medio de cultivo usando agua de coco.

6.2.1. Evaluación de auxinas

La primera prueba fue la evaluación de las auxinas (ANA, 2,4-D y PIC) con la citocinina (KIN) (cuadro 5). En este caso, en el mismo frasco se combinaron los diferentes tipos de explante debido a que no se tenía el suficiente material vegetal.

Cuadro 5. Formación de callo (%) a los 45 d con diferentes auxinas en la primera evaluación de *Lupinus*

Auxina	[μM]*	<i>L. exaltatus</i>		<i>L. elegans</i>	
		(%)	Apariencia de callo	(%)	Apariencia de callo
ANA	0.54	37.5		0.00	
ANA	5.37	75.00		6.25	
2,4-D	0.54	56.25		25.00	
2,4-D	5.37	75.00		31.25	
PIC	0.54	50.00		0.00	
PIC	5.37	87.50		18.75	

* Todos los tratamientos de ANA, 2,4-D o PIC se combinaron con KIN (0.54 μM).

Todos los tratamientos auxínicos fueron capaces de inducir callo a los 45 d de cultivo y la formación de callo ocurrió en el área de incisión del explante. Para *L. exaltatus*, se logró inducir callo en todos los tratamientos siendo el mejor PIC (5.37 μM) + KIN (0.54 μM) con 87.5 % de respuesta. En el caso de *L. elegans*, los explantes tuvieron menor respuesta de inducción, siendo el tratamiento con 2,4-D (5.37 μM) + KIN (0.54 μM) con el que presentó el máximo porcentaje de inducción de callo presentando 31.25 %. El problema que se observó fue la oxidación del explante y el tiempo de respuesta.

6.2.2. Evaluación de auxinas con antioxidante

Para ambas especies se decidió descartar los tratamientos de ANA ya que fue el tratamiento con menor respuesta y el crecimiento fue más lento comparado con las otras auxinas. En la siguiente evaluación se tomó la decisión de trabajar con PIC y 2,4-D para ambas especies y realizar más pruebas para corroborar resultados.

El medio enriquecido con solución antioxidante (100 mg L⁻¹ ácido cítrico con 150 mg L⁻¹ ácido ascórbico) y 250 mg L⁻¹ de PVP ayudaron notablemente en la disminución del oscurecimiento de los explantes de cotiledones, hojas y tallos. Uno de los problemas con las especies de leguminosa son los compuestos fenólicos que estos segregan y que provocan la oxidación y la muerte de los cultivos (Babaoúlu, 2000), lo que hace difícil la manipulación del cultivo *in vitro* (Bahgat *et al.* 2009). En un trabajo realizado por Phoplonker y Caligari (1993) sobre la inducción de callo de *Lupinus mutabilis* también encontraron problemas de oscurecimiento en explantes jóvenes de hoja y tallo durante su establecimiento. Ellos evaluaron soluciones antioxidantes (100mg L⁻¹ ácido cítrico con 150 mg L⁻¹ ácido ascórbico), PVP (5 g L⁻¹) y carbón activado (10 g L⁻¹), teniendo mejor resultado con solución antioxidante a base de ácido cítrico (100 mg L⁻¹) y ácido ascórbico (150 mgL⁻¹) ahí obtuvieron callos fieles. En el presente estudio, los explantes de *L. exaltatus* y *L. elegans* se evaluaron por separados, y solo el 50 % de los explantes de tallo mostraron una respuesta más rápida en inducir callo, comparada con los otros explantes, que no formaron callo, y solo se muestran datos de explantes de tallo (cuadro 6). Este bajo porcentaje pudo deberse a que el tiempo de evaluación fue en menor tiempo (21 d) que en la primera evaluación que fue a los 45 d; estos resultados también corresponde a lo obtenido en el trabajo de Phoplonker y

Caligari (1993) donde comparo hoja, peciolo y tallo en cultivos de callos de 40 días, obteniendo mejores resultados en tallo con 75 % de inducción de callo.

Cuadro 6. Porcentaje de inducción de callo (%) en explantes de tallo de *Lupinus* spp., a los 21 d de cultivo.

Auxina	[μ M]*	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. elegans</i>
2,4-D	0.54	0	0
2,4-D	5.37	50	25
PIC	0.54	25	0
PIC	5.37	50	0

* Todos los tratamientos de 2,4-D o PIC se combinaron con KIN (0.54 μ M).

6.2.3. Evaluación en condiciones de oscuridad

Las divisiones celulares iniciales de los explantes y el crecimiento de los tejidos del callo son a veces evitados por la luz; la luz es uno de los factores que favorecen el estrés y estimula la producción de compuestos fenólicos en cultivos de callo de algunas especies, y se acumulan mayores cantidades a medida que se aumenta la iluminancia y por consiguiente la oxidación de los explantes (Davies, 1972; George *et al.* 2007).

Cuadro 7. Apariencia de los callos obtenidos diferentes explantes de *Lupinus exaltatus* y *L. elegans* en condiciones de oscuridad y luz, a los 36 d de cultivo. Fotografía de Nuñez-Gavica KM.

Auxina [μM]*	<i>L. exaltatus</i>		<i>L. elegans</i>	
	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Luz
2,4-D 0.54				
2,4-D 5.37				
2,4-D 10.74				
PIC 0.54				
PIC 5.37				
PIC 10.74				

* Todos los tratamientos de 2,4-D o PIC se combinaron con KIN (0.54 μM).

En el presente trabajo, los cultivos se colocaron en oscuridad. Los tratamientos de auxinas, así como los antioxidantes, fueron los mismos de la sección 6.2.2. En este caso, se usaron tres diferentes concentraciones de PIC y 2,4-D (0.54, 5.37 y 10,74 μM) todas combinadas con KIN (0.54 μM). Se observó una disminución en el oscurecimiento y marchites del explante y los callos formados por los tallos crecieron más adecuadamente y con mejor apariencia (cuadro 7).

En este experimento, hubo alta respuesta de inducción de callo para ambas especies (cuadro 8). El 100 % de los explantes indujeron callo con 2,4-D (0.54 μM) más KIN (0.54 μM) tanto para *L. exaltatus* como para *L. elegans*; sin embargo, los callos de *L. exaltatus* fueron más pequeños que los de *L. elegans* con el mismo tratamiento.

Cuadro 8. Resultados de porcentaje de inducción de callo de *Lupinus spp.* en tallo a los 76 d en oscuridad.

Auxina	[μM]	Inducción de callo (%)	
		<i>L. exaltatus</i>	<i>L. elegans</i>
2,4-D	0.54	100	100
2,4-D	5.37	68.75	62.50
2,4-D	10.74	56.25	56.25
PIC	0.54	75.00	31.25
PIC	5.37	75.00	50.00
PIC	10.74	62.5	31.25

*El medio utilizado se le añadió solución antioxidante (100 mg L⁻¹ ácido cítrico con 150 mg L⁻¹ ácido ascórbico) y 0.25 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP). ANA: Ácido naftalenacético; 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; PIC: Picloram; KIN: Cinetina.

6.2.4. Evaluación de tratamientos con agua de coco

Algunos de los factores que influyen en los cultivos de callos es la baja temperatura (18°C), la diferencia de luz, la transferencia del callo al medio y la senescencia del explante (Wink, 1987). Para el mantenimiento de los cultivos de callo de Lupinos, estos se cambiaban al medio cada de tres semanas y cada vez que esto se realizaba el callo se sometía a un estrés y no todos los cultivos se lograban seguir manteniendo, para esto se decidió utilizar agua de coco para mejorar el crecimiento, adicionando al medio de cultivo 5 y 20 % de agua de coco. Cuando se añade agua de coco ayuda a las células vegetales dividirse y a crecer rápidamente, además, se ha encontrado que el líquido es beneficioso para inducir el crecimiento tanto de

cultivos de callos como de suspensión y la inducción de morfogénesis (George *et al.* 2007). Usando una concentración de 20 %; se observó una diferencia en la regeneración de callo y disminución de la oxidación al momento de hacer el traspaso a medio nuevo (figura 17). En un estudio realizado por Bertolini *et al.* (2014) en *Dendrobium chrysantum* Wall (*Orchidaceae*), adicionaron 15 % de agua de coco para promover la germinación de manera eficiente en la especie; Maldonado *et al.* (2013) trabajó con cultivo en suspensión de *Prosopis laevigata* añadiendo al medio 5 % de agua de coco, adicionando carbón activado 200 mg L⁻¹ para disminuir la oxidación del medio. El carbón activado retiene o absorbe compuestos oxidativos que ocasionan el necrosamiento de los explantes, aumentando la supervivencia de éste (Thomas, 2008).

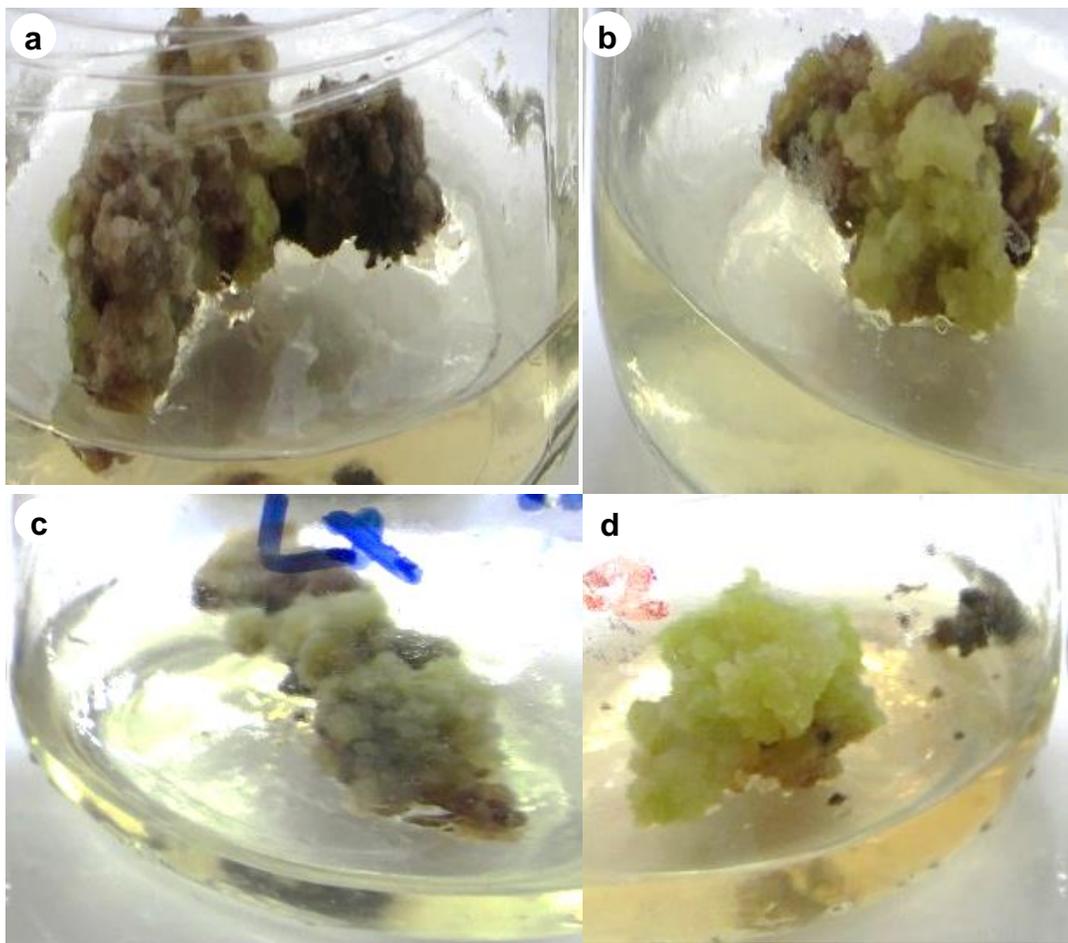


Figura 17. Callos de *Lupinus exaltatus* obtenidos en medio de cultivo MS conteniendo agua de coco. a) 2,4-D 5.37 + KIN 0.54 μ M con 5 % de agua de coco; b) 2,4-D 5.37 + KIN 0.54 μ M con 20 % de agua de coco; c) PIC 5.37 + KIN 0.54 μ M con 5 % de agua de coco; d) PIC 5.37 + KIN 0.54 μ M con 20 % de agua de coco.

6.2.5. Inducción de callo para cada especie de acuerdo con las auxinas utilizadas

Se observó que la auxina PIC tuvo un mejor efecto en la inducción de callo en tallos de *L. exaltatus*, los cuales fueron de color cremoso y de apariencia semifriable (figura 18a).

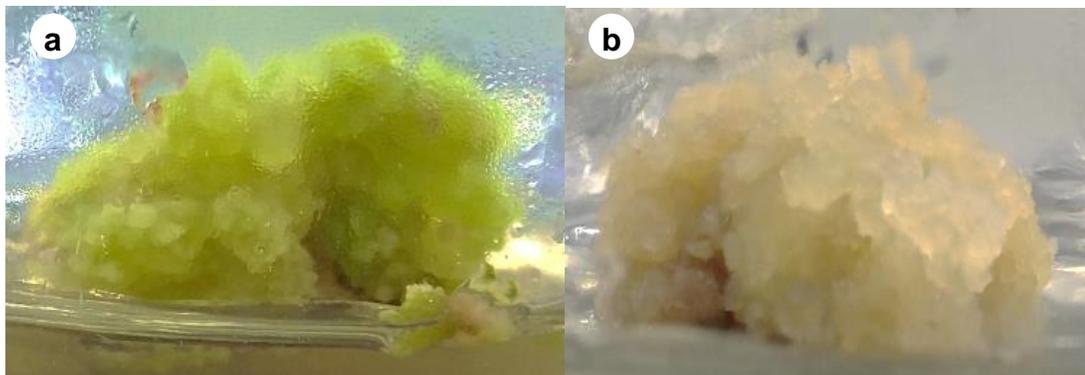


Figura 18. Cultivos de callos de *Lupinus* inducidos con diferentes auxinas. a) callo de *L. exaltatus* con PIC (5.37 μM) +KIN (0.54 μM); b) callo de *L. elegans* con 2,4-D (16.11 μM) y KIN (16.11 μM).

Los valores de inducción para *L. exaltatus* mostraron diferencias significativas en la comparación de medias (figura 19). En el caso de *L. exaltatus* los mejores valores de inducción de callo se observó al adicionar PIC (5.37 μM) +KIN (0.54 μM) y PIC (5.37 μM) + KIN (10.74 μM) con el 100 % de explantes con callo (figura 19). No obstante, de estos dos tratamientos, los callos provenientes con picloram y menor cantidad de cinetina (0.54 μM) mostraron callos con características más friables y con menor oxidación (figura 18a). En un estudio realizado por Phoplonker y Caligari (1993) en *Lupinus mutabilis*, obtuvieron también callo friable usando bajas concentraciones de PIC, especialmente cuando se combinó con cinetina. Mok y Mok (1977), encontró que la tasa de crecimiento y el rendimiento de callo de especies y variedades de *Phaseolus* fueron mayores en presencia de PIC que con 2,4-D en las mismas concentraciones (0.04- 1.25 μM), esta especie es una leguminosa al igual que la especie de interés y concuerda con los resultados obtenidos en el experimento con *L. exaltatus*.

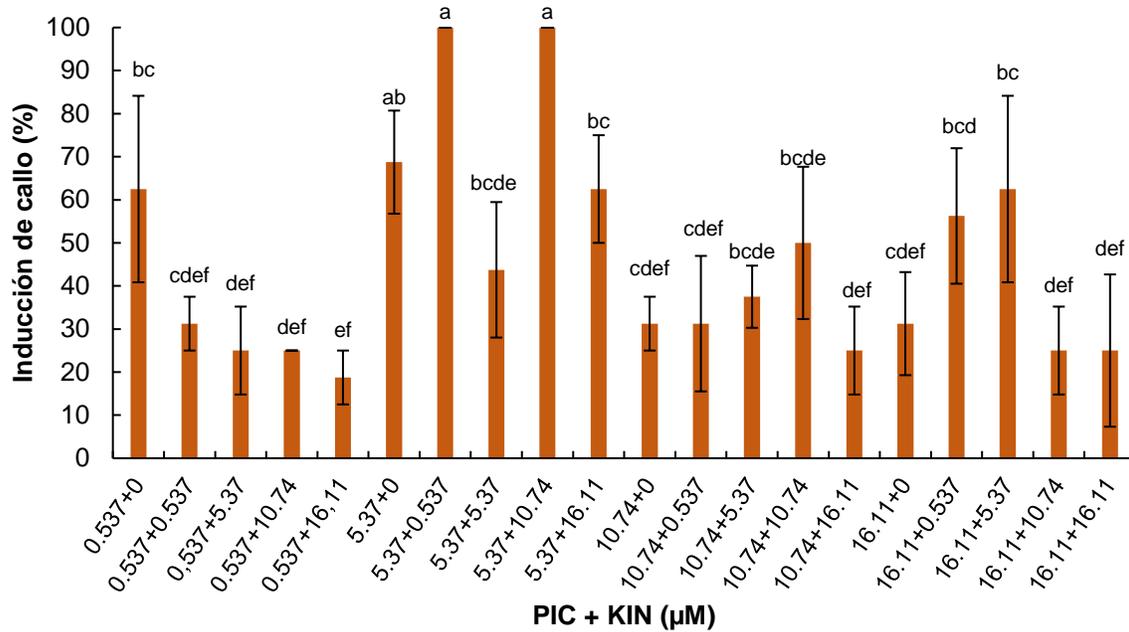


Figura 19. Inducción de callo (%) en explantes de tallo de *Lupinus exaltatus* con PIC y KIN. Los valores son medias \pm desviación estándar de 4 réplicas. Valores con la misma letra no presentan diferencia estadística significativa, Tukey ($\alpha = 0.05$). **Nota:** Sólo se muestran los tratamientos que mostraron inducción de callo.

Para el caso de experimento realizado con 2,4-D y KIN, los explantes de tallo de *L. elegans*, los callos fueron de color café y semifrías (figura 18b), independientemente de la cinetina. En cuanto al porcentaje de explantes con callo, hubo diferencias estadísticas significativas. El porcentaje máximo (68.8 %) se presentó al usar la misma concentración 2,4-D (16.11µM) y KIN (16.11µM). (figura 20). Los callos del resto de los tratamientos tuvieron crecimiento más lento y en algunos casos se observó oxidación y posteriormente murieron. En el caso del control para ambas especies, no hubo respuesta en la inducción de callo.

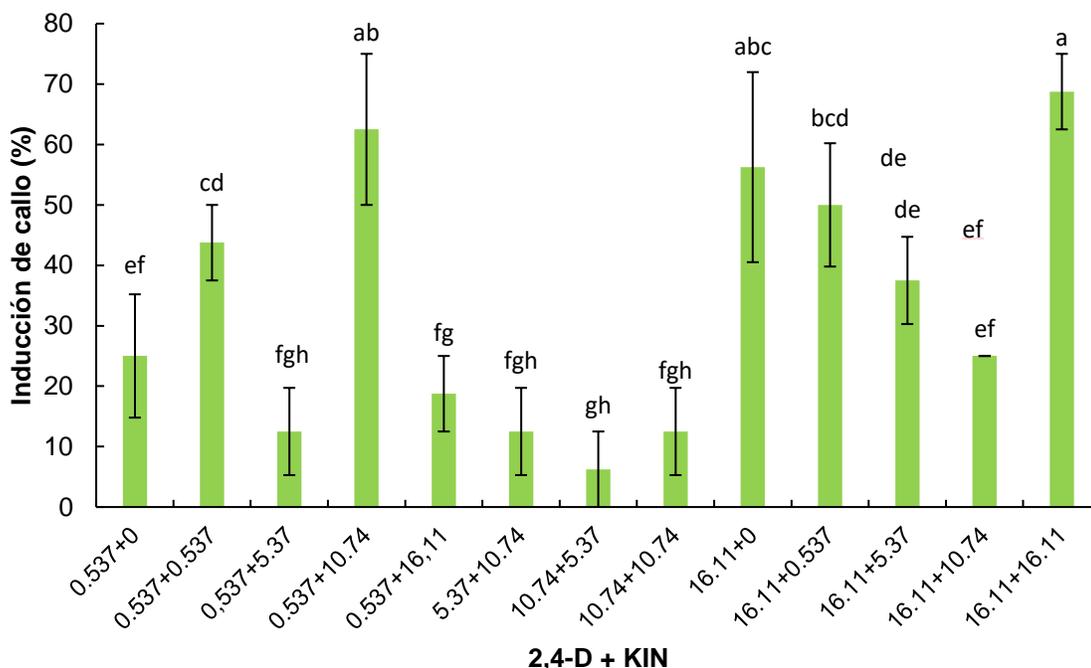


Figura 20. Inducción de callo (%) en explantes de tallo de *Lupinus elegans* con 2,4-D y KIN. Los valores son medias \pm desviación estándar de 4 réplicas. Valores con la misma letra no presentan diferencia estadística significativa, Tukey ($\alpha = 0.05$). **Nota:** Sólo se muestran los tratamientos que mostraron inducción de callo.

Li *et al* (2002) menciona que concentraciones altas de 2,4-D (de 11.3 a 181 μM) presenta una disminución de la inducción de callos en *Rosa hybrida cv. Carefree Beauty*. De la misma manera, Janhvi *et al* (2013) reporta una disminución de la frecuencia de inducción del callo en *Aconitum violaceum* Jacq usando 2,4-D (de 0.5 a 10 μM), obteniendo como mejor tratamiento en concentraciones de 2,4-D (5.0 μM) + KIN (0.5 μM). En general, en *L. exaltatus* y *L. elegans*, se observó que el 2,4-D, tuvo mayor respuesta de inducción a medida que la concentración se incrementó; además, las concentraciones en donde se tuvo mejor respuesta fueron similar a la de *L. exaltatus*.

6.3. Rendimiento de extractos

Se utilizó una técnica específica para alcaloides, Ganzera *et al.* (2010). En la cual se realizaron modificaciones, las muestras no se colocaron en un sonicador durante 30 min, sino que se mantuvieron en agitación por el mismo tiempo y en la centrifuga a 10000 rpm en lugar de 3000 y al extracto ácido se dejó a pH 12. Se calcularon los rendimientos (cuadro 9) de cada una de las muestras, siendo plantas silvestres (de 8 a 25 %) plántulas de cultivo *in vitro* (de 15 a 90 %) y de cultivos de callos (desde 8 a 60 %); estos fueron evaluados de forma cualitativa y cuantitativa.

Cuadro 9. Rendimientos de los extractos orgánicos de *Lupinus*.

Muestra	<i>L. exaltatus</i>	Rendimiento (%)	<i>L. elegans</i>	Rendimiento (%)
Planta silvestre hoja	Hoja	12.64	Hoja	11.12
	Hoja desengrasada	20.48	Hoja desengrasada	8.44
	Tallo	51.8	Tallo	15.56
	Tallo desengrasado	16.84	Tallo desengrasado	8.96
	Flor	19.96	Flor	12.76
	Flor desengrasada	14.88	Flor desengrasada	93.64
Plántula de cultivo <i>in vitro</i>	Hoja	12.12	Hoja	24.6
	Tallo	13.04	Tallo	18.56
Cultivos de callo (μ M)	2,4-D (5.37) + KIN (0.54)	56.88	2,4-D (16.11) + KIN (16.11)	9.88
	2,4-D (10.74) + KIN (0.54)	12.84	PIC (5.37) + KIN (0.54)	13.56
	PIC +KIN	14.32		
	PIC (5.37) + KIN (0.54)	15.72		
	PIC (10.74) + KIN (0.54)	12.64		

*ANA: Ácido naftalenacético; 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; PIC: Picloram; KIN: Cinetina.

6.4. Determinación de alcaloides por cromatografía en capa fina

Los extractos fueron evaluados de forma cualitativa por cromatografía en capa fina. Se revelaron con reactivo de dragendorff, que es selectivo para alcaloides, lo cual al revelarse muestran unas bandas color naranja.

En el cuadro 10. Se observa el factor de retado (Rf) de las muestras de cada extracto (UV, sulfato cérico, reactivo dragendorff). Se observaron las bandas, pero no en los cultivos de callos. Esto no quiere decir que los extractos no contengan alcaloides, sino que, es probable que se estén produciendo, pero en bajas concentraciones (figura 21a, 22a, 23a y 24a). Las muestras se observaron con luz ultravioleta (UV) y hubo presencia de compuestos, los alcaloides quinolizidínicos no observen la luz UV por la falta de anillos aromáticos, por ese motivo se hizo un duplicado, pero utilizando como revelador sulfato cérico, con el cual se observaron algunas evidencias de tales alcaloides (figura 21b, 22b, 23b y 24b).

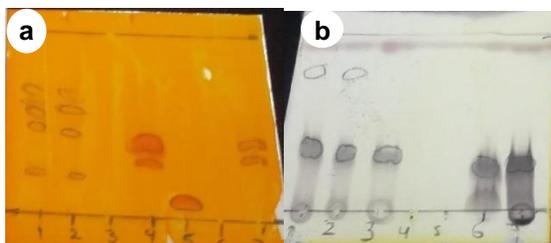


Figura 21. Placas en capa fina de extractos de *Lupinus exaltatus*. 1) planta silvestre hoja; 2) planta silvestre hoja desengrasada; 3) planta *in vitro* hoja; 4) estandar de lupanina; 5) estandar de esparteina; 6) planta silvestre tallo; 7) planta silvestre tallo desengrasada. Nota: El “a” es revelado con reactivo de dragendorff. y el “b” con sulfato cérico.

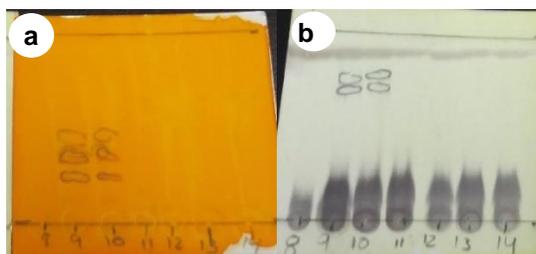


Figura 22. Placas en capa fina de extractos de *Lupinus exaltatus*. 8) planta *in vitro* tallo; 9) planta silvestre flor; 10) planta silvestre flor desengrasada; 11) callo con ANA+KIN; 12) callo con 2,4-D 5.37+ KIN 0.54; 13) callo con 2,4-D 5.37+ KIN 0.54; 14) callo con 2,4-D 10.74+ KIN 0.54. Nota: El “a” es revelado con reactivo de dragendorff. y el “b” con sulfato cérico.

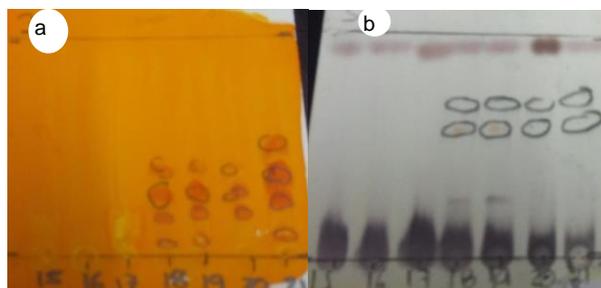


Figura 23. Placas en capa fina de extractos de *Lupinus exaltatus* y *Lupinus elegans*. 15) callo de *L. exaltatus* con PIC+KIN; 16) callo de *L. exaltatus* con PIC 5.37+ KIN 0.54; 17) callo de *L. exaltatus* con PIC 10.74+ KIN 0.54; 18) hoja de planta silvestre de *L. elegans*; 19): hoja de planta silvestre desengrasada de *L. elegans*; 20) hoja de planta *in vitro* de *L. elegans*; 21) tallo de planta de silvestre de *L. elegans*. Nota: El “a” es revelado con reactivo de dragendorff. y el “b” con sulfato cérico.

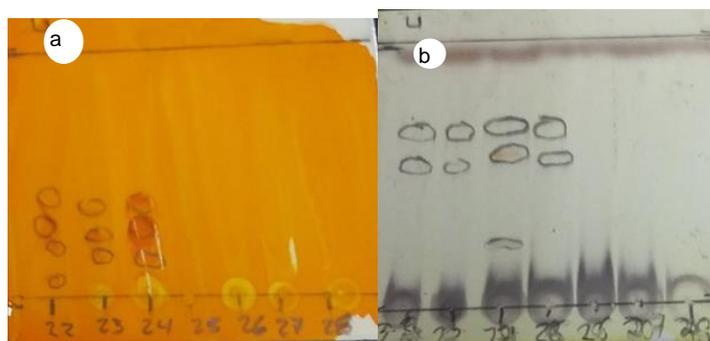


Figura 24. Placas en capa fina de extractos de *Lupinus elegans*. 22) planta silvestre tallo desengrasada; 23) planta *in vitro* tallo; 24) planta silvestre flor; 25) planta silvestre flor desengrasada; 26) callo de ANA+KIN; 27) callo con 2,4-D+KIN; 28) callo con PIC+KIN. Nota: El “a” es revelado con reactivo de dragendorff. y el “b” con sulfato cérico.

Cuadro 10. Resultados del factor de retardo (Rf) de *Lupinus*.

Muestras	Rf	Muestras	Rf
Lupanina	0.40	<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.57
Esparteina	0.10	<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.30
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja	0.77	<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.20
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja	0.63	<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.17
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja	0.53	<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.07
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja	0.43	<i>L.s elegans</i> : planta <i>in vitro</i> hoja	0.70
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja	0.33	<i>L. elegans</i> : planta <i>in vitro</i> hoja	0.57
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja	0.20	<i>L. elegans</i> : planta <i>in vitro</i> hoja	0.37
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.77	<i>L. elegans</i> : planta <i>in vitro</i> hoja	0.27
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.63	<i>L. elegans</i> : planta <i>in vitro</i> hoja	0.17
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.53	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo	0.70
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.40	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo	0.57
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.30	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo	0.50
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.20	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo	0.37
<i>L. exaltatus</i> : planta <i>in vitro</i> hoja	0.30	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo	0.23
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre tallo	0.17	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo	0.10
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre tallo desengrasada	0.40	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo desengrasada	0.67
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre tallo desengrasada	0.30	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo desengrasada	0.53
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre flor	0.73	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo desengrasada	0.37

<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre flor	0.67	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo desengrasada	0.23
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre flor	0.43	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo desengrasada	0.17
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre flor	0.33	<i>L. elegans</i> : planta silvestre tallo desengrasada	0.07
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre flor	0.23	<i>L. elegans</i> : planta <i>in vitro</i> tallo	0.67
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre flor desengrasada	0.73	<i>L. elegans</i> : planta <i>in vitro</i> tallo	0.53
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre flor desengrasada	0.67	<i>L. elegans</i> : planta <i>in vitro</i> tallo	0.33
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre flor desengrasada	0.43	<i>L. elegans</i> : planta <i>in vitro</i> tallo	0.20
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre flor desengrasada	0.33	<i>L. elegans</i> : planta <i>in vitro</i> tallo	0.13
<i>L. exaltatus</i> : planta silvestre flor desengrasada	0.23	<i>L. elegans</i> : planta silvestre flor	0.67
<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja	0.7	<i>L. elegans</i> : planta silvestre flor	0.57
<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja	0.57	<i>L. elegans</i> : planta silvestre flor	0.33
<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja	0.40	<i>L. elegans</i> : planta silvestre flor	0.23
<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja	0.27	<i>L. elegans</i> : planta silvestre flor	0.20
<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja	0.17	<i>L. elegans</i> : planta silvestre flor	0.13
<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja	0.07	<i>L. elegans</i> : planta silvestre flor desengrasada	0.67
<i>L. elegans</i> : planta silvestre hoja desengrasada	0.70	<i>L. elegans</i> : planta silvestre flor desengrasada	0.53

6.5. Determinación de alcaloides totales

Se cuantificaron alcaloides totales de acuerdo Shamsa *et al* (2007) la cual se expresa en miligramos de equivalente de atropina por gramo de biomasa seca (mg EAtr g⁻¹ BS). En general, para *L. exaltatus* se obtuvo mayor contenido de alcaloides totales con PIC que 2,4-D. En contraste, para *L. elegans* se observó mayor cantidad en los callos obtenidos con 2,4-D. Para *L. exaltatus* se analizaron los callos obtenidos con 2,4-D (5.37 µM) y KIN (0.54 µM), los cuales tuvieron 0.31 mg EAtr g⁻¹ BS, mientras que los de PIC (5.37 µM) y KIN (0.54 µM) fue de 0.48 mg EAtr g⁻¹ BS. Para *L. elegans* se usaron los callos obtenidos con PIC (5.37

μM) + KIN (0.54 μM), obteniendo apenas 0.07 mg EAtr g^{-1} BS, y en los callos con 2,4-D (16.11 μM) + KIN (16.11 μM) el rendimiento fue ligeramente mayor, con 0.34 mg EAtr g^{-1} BS (cuadro 11). De acuerdo a Wink (1987), la formación de alcaloides en los cultivos de callo y suspensión, el contenido de lupanina es baja (0.15- 150 μg lupanina g^{-1} BS) después de 1 a 2 años de iniciación del cultivo, comparado con hoja y tallo que fue de 5 a 50 μg lupanina g^{-1} BS.

Se ha cuantificado alcaloides en diferentes especies de *Lupinus*. En *L. hispanicus* se determinó la cuantificación de alcaloides totales por gravimetría en semillas; teniendo concentraciones de 20 mg g^{-1} (Múzquiz *et al.* 1989);

Cuadro 11. Estimación del contenido de alcaloides totales en cultivos de callos en dos especies *Lupinus*.

Especie	Cultivos de callo (μM)	Alcaloides totales (mg EAtr g^{-1} BS)
<i>L. exaltatus</i>	2,4-D (5.4) + KIN (0.54)	0.3128
<i>L. exaltatus</i>	PIC (5.4 + KIN (0.54)	0.4790
<i>L. elegans</i>	2,4-D (16.11) + KIN (16.11)	0.3400
<i>L. elegans</i>	PIC (5.37 ML) + KIN (0.54)	0.0721

*2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; PIC: Picloram; KIN: Cinetina.

6.6. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS)

Se realizó el análisis de alcaloides por cromatografía de gases acopladas a espectrofotometría de masa que permitió detectar algunos alcaloides en los diferentes extractos (cuadro 12). En los extractos de la planta silvestre se pudo observar la presencia de isolupanina, hidroxilupanina, 11, 12- dehidrolupanina, afilina y hidroxilo esparteína; en plántula de cultivo *in vitro* se observó la isolupanina, hidroxilupanina, 11, 12- dehidrolupanina, afilina y dehidro-oxosparteína. Y en cultivos de callos la isolupanina, hidroxilupanina y hidroxilo

esperteína. Estudios realizados por Zamora-Natera *et al.* (2005) en *L. exaltatus* encontraron que, en la semilla, la lupanina es el alcaloide mayoritario, seguido de epiafilina, afilina, α -isolupanina, dehidro-oxosparteína y 3α -hidroxilupanina. En otro estudio determinaron alcaloides en la parte aérea de *L. angustifolius* L, donde identificaron como compuesto mayoritario al 13α -Hydroxilupanina y lupanina (Erdemoglu *et al.* 2007).

Cuadro 12. Determinación de algunos alcaloides presentes en los diferentes extractos de *Lupinus*.

Compuestos	Tiempo de retención	Planta silvestre		Plántula <i>in vitro</i>		Cultivos de callo	
		<i>L. exaltatus</i>	<i>L. elegans</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. elegans</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. elegans</i>
Afilina	11.288	hoja, tallo, flor	hoja, tallo	Tallo	hoja, tallo		
11,12-Dehidrolupaniana	11.741	hoja, tallo	flor	Tallo	hoja, tallo		
Isolupanina	11.186	hoja, tallo, flor	hoja	Tallo		PIC (5.37 μ M o 10.74 μ M) + KIN (0.54 μ M)	PIC (5.37 μ M) + KIN (0.54 μ M);
Hidroxilupanina	12.186	tallo, flor	hoja				2,4-D (16.11 μ M) + KIN (16.11 μ M)
Hidroxilo de esparteina	13.705		hoja, tallo, flor		hoja, tallo		

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; PIC: Picloram; KIN: Cinetina.

7. CONCLUSIONES

De las tres auxinas evaluadas (ANA, PIC, y 2,4-D), el PIC presentó la mejor respuesta para inducir callo en *Lupinus exaltatus*, mientras que para *Lupinus elegans* fue el 2,4-D.

De los tres explantes considerados (hoja, tallo y cotiledón), el tallo fue el que mejor respondió, independientemente del tipo de auxina. En ambos casos, la combinación con KIN fue necesario para que el callo presentara una mayor friabilidad.

Aunque se presentaron problemas de oscurecimiento y necrosamiento de los explantes, esto se logró disminuir mediante la adición de antioxidantes al medio de cultivo; además, con la adición de agua de coco al medio de cultivo se observó un mejor crecimiento de los callos y con apariencia semifrías.

El mejor tratamiento para inducir callo en *L. exaltatus* fue con PIC (5.37 μM) + KIN (0.54 μM), y para *L. elegans* se obtuvo con 2,4-D (16.11 μM) + KIN (16.11 μM).

En los extractos obtenidos se encontraron alcaloides, aunque se presentaron en concentraciones trazas, los cuales se podrían incrementar mediante el uso de elicitores en los cultivos de callos.

Se logró la inducción de callo de *L. exaltatus* y *L. elegans*, pero es necesario realizar más estudios para obtener callos más fiables y establecer cultivos de células en suspensión, y, por consiguiente, poder obtener mayor cantidad de alcaloides.

8. LITERATURA CITADA

- Babaoúlu, M. (2000). Protoplast Isolation in Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet): Determination of Optimum Explant Sources and Isolation Conditions, *24*, 177–185.
- Bahgat, S. Shabban, O. El-Shihy, O. Lightfoot, D. El-Shemy, H. (2009). Establishment of the regeneration system for *Vicia faba* L. In *Current Issues Molecular Biology* (pp. 47–54).
- Bahmanyar, M. Ranjbar, G. (2008). The role of potassium in improving growth indices and increasing amount of grain nutrient elements of wheat cultivars. *Journal of Applied Sciences*, *8*, 1280–1285.
- Bernal, A. Zamora, J. Virgen, G. Nuño, R. (2005). Actividad Biológica *in vitro* de Extractos de *Lupinus spp.* sobre Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *23*, 140–146.
- Bertolini, V. Damon, A. Rojas, An. (2014). Quelato de hierro y agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae). *Acta Agronomica*, *63*(3), 229–237.
- Davies, M. E. (1972). Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet rose. *Planta*, *104*(1), 50–65.
- De Cortes Sánchez, M., Altares, P. Pedrosa, M. M. Burbano, C. Cuadrado, C. Goyoaga, C. Dávila-Ortiz, G. (2005). Alkaloid variation during germination in different lupin species. *Food Chemistry*, *90*(3), 347–355.
- De Felipe, M. (2007). III . Biotecnologías limpias en agricultura : Fijación biológica de nitrógeno . Estructura-función de la simbiosis *Rhizobium* -leguminosa. In R. A. N. de Farmacia (Ed.), *Contaminación y salud* (103–151).
- Domínguez, X. (1973). *Metodos de investigación fitoquímica*. (C. R. de A. Técnica, Ed.). Buenos Aires. Argentina: Agencia para el Desarrollo Internacional.
- Dunn, D. (2005). *Lupinus* L. In R. J. Calderón de Rzedowski G (Ed.), *Flora fanerogámica del Valle de México* (90–293, 296). Instituto de Ecología, A.C.
- Erdemoglu, N. Ozkan, S. Tosun, F. (2007). Alkaloid profile and antimicrobial activity of

- Lupinus angustifolius* L. alkaloid extract. *Phytochemistry Reviews*, 6(1), 197–201.
- Fadhil, S. Reza, M. Rouhollah, G. Reza, V. (2007). Spectrophotometric Determination of Total Alkaloids in *Peganum harmala* L. Using Bromocresol Green. *Research Journal of Phytochemistry*, 1(2), 79–82.
- Falkengren, G. Schottelndreier, M. (2004). Vascular plants as indicators of nitrogen enrichment in soils. *Plant Ecology*, 172, 51–62.
- FAO. (1983). El reciclaje de materias organicas en la agricultura de America Latina. Boletin de Suelos de la FAO No. 51. *Boletin De Suelos De La Fao*, 251.
- Ganzer, M. Krüger, A. Wink, M. (2010). Determination of quinolizidine alkaloids in different *Lupinus* species by NACE using UV and MS detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(5), 1231–1235.
- Garden, W. Parbery, D. (1983). The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. I. Some characteristics of the soil/root interface. *Plant and Soil*, 68, 19–32.
- George, E. Hall, M. Klerk, G. (2007). *Plant Propagation by Tissue Culture*. (E. F. George, M. A. Hall, G.-J. De Klerk, Eds.).
- Gladstones, J. (1974). The Mediterranean white lupin. Department of Agriculture Western Australia. *Technical Bulletins*, 26, 70–74.
- Gladstones, J. (1980). Recent developments in understanding improvement and use of *Lupinus*. In A. H. B. R. T. Summerfield (Ed.), *Advances in legume science, Proceedings of the International Legume Conference*.
- Janhvi, M. R. Balwant, R. Anup, C. ra, Subhash, N. (2013). Influence of plant growth regulators on indirect shoot organogenesis and secondary metabolite production in *Aconitum violaceum* Jacq. *African Journal of Biotechnology*, 12(44), 6287–6293.
- Jansen, D. (1981). The defence of legumes against herbivores. In *Advances in legumes systematics*. Edited (p. 340). Polrral and Raven.
- Kinghorn, A. Balandrín, M. (1984). Quinolizidine alkaloids of the Leguminosae: Structural types. analysis, chemotaxonomy, and biological activities. In S. W. Pelletier (Ed.), *Alkaloids: Chemical and Biological Perspective* (Vol. 2, p. 105–148.). Wiley, New

- York. Estados Unidos de América.
- Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. (S. . Ediciones Omega, Ed.).
- Lee, S. T. Ralphs, M. H. Panter, K. E. Cook, D. Gardner, D. R. (2007). Alkaloid profiles, concentration, and pools in velvet lupine (*Lupinus leucophyllus*) over the growing season. *Journal of Chemical Ecology*, 33(1), 75–84.
- León, O. Silva, P. Acevedo, E. (2001). Respuesta a la inoculación en dos especies de lupino (*Lupinus albus L.* y *Lupinus angustifolius L.*). Laboratorio de Relación Suelo-Agua-Planta. Facultad de Cs. Agronomicas. Universidad de Chile.
- Li, X. Krasnyanski, S. F. Korban, S. S. (2002). Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in Rosa. *Journal of Plant Physiology*, 159(3), 313–319.
- Maldonado, A. Orozco, J. Estrada, M. Bernabé, A. Cruz, F. (2013). Establishment of cell suspension cultures of *Prosopis laevigata* (HUMB. and BONPL. EX WILLD) m.c. johnst to determine the effect of zinc on the uptake and accumulation of lead. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3), 489–498. Retrieved from
- Mc Vaugh, R. (1987). Flora Novogaliciana. V. Leguminosae. In U. of Michigan (Ed.), *A descriptive account of the vascular plants of Western México*.
- Mohamed, M. H. Saito, K. Kadry, H. Khalifa, T. Ammar, H. Murakoshi, I. (1991). Lupin alkaloids from the seeds of *Lupinus termis*. *Phytochemistry*, 30(9), 3111–3115.
- Mok, M. C. Mok, D. (1977). Genotypic Responses to Auxins in Tissue Cultures of Phaseolus. *Physiologia Plantarum*, 40(4), 261–264.
- Murashige, T. Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Muzquiz, M. Burbano, C. Cuadrado, C. De La Cuadra, C. (1993). Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas I: Alcaloides. *Investigación Agraria. Producción Y Protección Vegetales*, 8(3), 351–361.
- Múzquiz, M. Burbano, C. Gorospe, M. Ródenas, I. (1989). A chemical study of Luínus

- hispanicus seed- Toxic and nutritional components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 47, 205–2140.
- Muzquiz, M. Ródenas, I., Villaverde, J. (1982). Valoración cuantitativa de los alcaloides en semillas del género *Lupinus* (196–206).
- Phoplonker, M. Caligari, P. (1993). Cultural manipulations affecting callus formation from seedling explants of the pearl lupin (*Lupinus mutabilis Sweet*). *Annals of Applied Biology*, 123(2), 419–432.
- Priddis, C. R. (1983). Capillary gas chromatography of lupin alkaloids. *Journal of Chromatography A*, 261, 95–101.
- Putnam, D. (1991). An interdisciplinary approach to the development of lupinas an alternative crop. In J. J. an. S. J. E. P. U. Indianapolis (Ed.), *Proceedings of the Second National Symposium of New Crops, exploration, research and comercialization* (117–120). Indiana. Estados Unidos de América.
- Roberts, F. Wink, M. (1997). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. (P. Press, Ed.). New York. Estados Unidos de América.
- Ruiz, L. (1997). A rapid screening test for lupine alkaloid. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 20, 51–52.
- Rzedowski, J. Calderon, R. (1979). *Flora fanerogámica del valle de México*. (CECSA, Ed.) (Vol. 1).
- Salatino, A. Gottlieb, O. (1980). Quinolizidine alkaloids as systematic markers of the *Papilionoideae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 8(2), 133–147.
- Sator, C. (1985). Studies on shoot regeneration of lupins (*Lupinus spp.*). *Plant Cell Reports*, 4(3), 126–128.
- Schmeller, T. Sauerwein, M. Sporer, F. Wink, W. (1994). Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *Journal of Natural Products*, 9, 1316–1319.
- Sepúlveda, G. Porta, H. Rocha, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355–363.

- Sroga, G. (1987). Plant regeneration of two *Lupinus spp.* from callus cultures via organogenesis. *Plant Science*, 51(2–3), 245–249.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. (E. U. Jaume, Ed.) (Tercera).
- Takhtajan, A. (1987). *Systema magnoliophytorum*. Nauka. Leningrado.
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*.
- Vance, C. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition, plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology*, 127, 390–397.
- Verpoorte, R. Contin, A. Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1(1), 13–25.
- Wink, M. (1987). Why do lupin cell cultures fail to produce alkaloids in large quantities? *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8(2), 103–111.
- Wink, M. (1992). The role of quinolizidine alkaloids in plant-insect interactions. In *Insect-plant interactions* (4:131–166).
- Wink, M. (1993). *Methods of Plant Biochemistry*. (A. Press, Ed.). Boca Ratón. Estados Unidos de América.
- Wink, M., Meissner, C. Witte, L. (1995). Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*, 38(1), 139–153.
- Zamora, F. Garcia, P. Ruiz, M. Sakcedo, E. (2008). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaidoideo. *Agrociencia*, 42, 185–182.
- Zamora, J. Zapata, I. Salcedo, P. Alejo, G. Moreno, J. (2013). El género *Lupinus* (Fabaceae) un recurso forestal no maderable: importancia ecológica y fuente potencial de alcaloides quinolizidínicos para su uso en la agricultura. In A. Ediciones (Ed.), *Recursos forestales en el occidente de México* (Primera, pp. 95–119).