

Morphogenic responses of three explants of *Lupinus montanus* (H.B.K.) cultured *in vitro*

Respuestas morfogénicas de tres explantes de *Lupinus montanus* (H.B.K.) cultivados *in vitro*

Gabriel Ramírez-González^{1*}; José L. Rodríguez-de la O²; Jesús G. Arreola-Ávila³; José G. Álvarez-Moctezuma^{1†}.

¹División de Ciencias Forestales, ²Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Chapingo, Texcoco, Estado de México. MÉXICO.

Correo-e: arzemir@gmail.com, tel.: 01 (55) 24531364 (*Autor para correspondencia).

³Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 carretera Gómez Palacio-Cd. Juárez. C. P. 35230. Bermejillo, Durango, MÉXICO.

Abstract

Necrosis and morphogenic response of cotyledon, epicotyl and hypocotyl explants of *Lupinus montanus* (H.B.K.) seedlings germinated *in vitro* were evaluated to establish the basic conditions of micropropagation. Necrosis was evaluated in MS medium with 0.40 mg·liter⁻¹ thiamine, 100 mg·liter⁻¹ myo-inositol, 3 % sucrose and 7 g·liter⁻¹ agar-agar and different doses of activated carbon (AC) and citric acid. Treatments with AC (50 mg·liter⁻¹ and 100 mg·liter⁻¹) were the best in the control of necrosis ($P = 0.001$); the cotyledon had a higher level of necrosis (< 60 %) than the epicotyl and hypocotyl (10 to 30 %). Morphogenic responses were analyzed on MS medium with 0.40 mg·liter⁻¹ thiamine, 100 mg·liter⁻¹ myo-inositol, 3 % sucrose, 7 g·liter⁻¹ agar-agar, 100 mg·liter⁻¹ AC and five combinations of IAA (indole acetic acid) and BA (6-benzyladenine). The hypocotyl and epicotyl explants showed higher organogenic response (> 70 %), whereas the cotyledon response was primarily callogenic (50 %). The epicotyl cultured on MS medium with 3.0 μM IAA and 1.0 μM BA had the highest number of shoots (10) and height thereof (11.4 ± 2.6 cm).

Keywords: Shoots, callus, necrosis, morphogenesis.

Resumen

El necrosamiento y la respuesta morfogénica de explantes de cotiledón, epicótilo e hipocótilo de plántulas de *Lupinus montanus* (H.B.K.) germinadas *in vitro* se evaluaron para establecer las condiciones básicas de micropropagación. El necrosamiento se evaluó en medio MS con 0.40 mg·litro⁻¹ de tiamina, 100 mg·litro⁻¹ de mioinositol, 3 % de sacarosa y 7 g·litro⁻¹ de agar-agar y distintas dosis de carbón activado (CA) y ácido cítrico. Los tratamientos con CA (50 mg·litro⁻¹ y 100 mg·litro⁻¹) fueron los mejores en el control del necrosamiento ($P = 0.001$); el cotiledón tuvo mayor nivel de necrosamiento (< 60 %) que el epicótilo e hipocótilo (entre 10 y 30 %). Las respuestas morfogénicas se analizaron en medio MS con 0.40 mg·litro⁻¹ de tiamina, 100 mg·litro⁻¹ de mioinositol, 3 % de sacarosa, 7 g·litro⁻¹ de agar-agar, 100 mg·litro⁻¹ de CA y cinco combinaciones de AIA (ácido indolacético) y BA (6-benciladenina). Los explantes de hipocótilo y epicótilo mostraron mayor respuesta organogénica (> 70 %) a diferencia del cotiledón, cuya respuesta fue primordialmente callogénica (50 %). El epicótilo cultivado en medio MS con 3.0 μM de AIA y 1.0 μM de BA tuvo el mayor número de brotes (10) y altura (11.4 ± 2.6 cm).

Palabras clave: Brotes, callo, necrosamiento, morfogénesis.

Introduction

Several recent studies have identified various potential applications arising from the cultivation and use of plants of the genus *Lupinus*, including agrochemicals (insecticides) (Bermúdez, Martínez, Figueroa, Legal, & Wink, 2009), food (protein isolates) (Lee et al., 2006) and even medicines (antimicrobial and hypoglycemic drugs) (Dove et al., 2011). In all the cases above, one of the major aims is to achieve a production system that ensures obtaining plants with specific characteristics based on the needs of the final product; for example, increased production of foliage for the extraction of alkaloids and seed production for obtaining protein isolates.

Currently, somatic clones can be obtained and whole plants regenerated with uniform characteristics through tissue culture techniques. As a result, valuable microorganism-free plant cultivars that are difficult to obtain by traditional farming methods can be established. However, establishing a protocol for large-scale micropropagation requires basic knowledge of the behavior of tissues cultured *in vitro*. Consequently, the objectives of this study were to determine the degree of necrosis in cotyledon, epicotyl and hypocotyl explants of *Lupinus montanus* (H.B.K.) seedlings under different concentrations of antioxidants (activated carbon and citric acid), and evaluate the morphogenic response under different concentrations of plant growth regulators (indole acetic acid and 6-benzyladenine).

Materials and methods

Plant material

The research was conducted in the Plant Tissue Culture laboratory belonging to the Department of Plant Science of the Universidad Autónoma Chapingo. As a source of explants, four- and six-week-old *L. montanus* seedlings, obtained by *in vitro* seed germination, were used. The seeds were obtained from plants collected in 2011 on Xipes Hill (19° 00' 48" NL, 97° 21' 20" WL), municipality of Libres, Puebla. The plants were identified using taxonomic keys and descriptions of Dunn (1979), were validated and subsequently deposited in the National Herbarium of Mexico (MEXU) of the Institute of Biology of the National Autonomous University of Mexico.

Germination of *L. montanus* seedlings

One hundred viable seeds with uniform morphological characteristics (shape, size, weight and color) were selected. Subsequently a random sample of 30 seeds was collected and subjected to a disinfection process consisting of a wash with Foca® detergent and Tween 80® (Thermo Scientific, USA) for 2 min, followed by immersion in 70 % alcohol for 3 min and a second wash in 10 % sodium hypochlorite for 15 min, following the procedure

Introducción

En la actualidad existen diversos estudios que han constatado las aplicaciones potenciales derivadas del cultivo y aprovechamiento de plantas del género *Lupinus*. Dichas aplicaciones pueden ser agroquímicas (insecticidas) (Bermúdez, Martínez, Figueroa, Legal, & Wink, 2009), alimenticias (aislados proteínicos) (Lee et al., 2006) y hasta médicas (antimicrobianas e hipoglucemiantes) (Dove et al., 2011). En cualquiera de los casos, uno de los mayores intereses es lograr una producción que permita asegurar la obtención de plantas con características específicas de acuerdo con las necesidades del producto final; por ejemplo, mayor producción de follaje para la extracción de alcaloides y producción de semilla para la obtención de aislados proteínicos.

Actualmente, se pueden obtener clones somáticos y regenerar plantas completas con características uniformes a través de técnicas del cultivo de tejidos y así establecer cultivares de plantas valiosas, libres de microorganismos y que son difíciles de obtener por los métodos de cultivo tradicionales. No obstante, el establecimiento de un protocolo de micropropagación a gran escala, requiere del conocimiento básico del comportamiento de los tejidos cultivados *in vitro*. En consecuencia, los objetivos de este trabajo fueron determinar el grado de necrosamiento de explantes de cotiledón, epicótilo e hipocótilo de plántulas de *Lupinus montanus* (H.B.K.) bajo diferentes concentraciones de antioxidantes (carbón activado y ácido cítrico), y evaluar la respuesta morfogénica bajo distintas concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (ácido indolacético y 6-benciladenina).

Materiales y métodos

Material vegetal

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, perteneciente al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Como fuente de explantes se utilizaron plántulas de *L. montanus* de cuatro y seis semanas de edad, obtenidas mediante la germinación de semillas *in vitro*. Las semillas se obtuvieron de plantas colectadas en el año 2011 en el cerro de Xipes (19° 00' 48" LN, 97° 21' 20" LO), municipio de Libres, Puebla. Las plantas fueron identificadas mediante claves taxonómicas y descripciones de Dunn (1979), posteriormente se validaron y depositaron en el Herbario Nacional de México (MEXU) del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Germinación de semillas de *L. montanus*

Cien semillas viables con características morfológicas uniformes (forma, tamaño, peso y color) fueron

described by Mroginski, Sansberro, and Flaschland (2010). Seeds were mechanically scarified by a lateral cut in the head, in order to break the physical latency due to its impermeability (Corona, Gómez, & Linding, 2013). The seeds were sown on MS basic medium (Murashigue and Skoog, 1962) supplemented with 0.40 mg·liter⁻¹ thiamine, 100 mg·liter⁻¹ *myo*-inositol, 3 % sucrose and 7 g·liter⁻¹ agar-agar, and incubated at 25 ± 1 °C and a photoperiod of 16:8 h (light/dark) for four weeks.

Evaluation of antioxidants on necrosis in *L. montanus* explants

After four weeks of growth, six *L. montanus* seedlings were harvested at random. Regions to be used as an explant source, namely the hypocotyl, cotyledon and epicotyl, were obtained from each seedling. These regions were sectioned into portions of approximately 3 x 3 x 2 mm and distributed (depending on the type of explant) randomly into five treatments with 12 replications, incubated in a photoperiod of 16:8 h (light/dark) for three weeks. Treatments consisted of the application of antioxidants in different doses: T0 = Control (no antioxidants), T1 = citric acid (CA, 100 mg·liter⁻¹), T2 = CA (150 mg·liter⁻¹), T3 = activated carbon (AC, 50 mg·liter⁻¹) and T4 = AC (100 mg·liter⁻¹). Antioxidants were applied on MS medium supplemented with 0.40 mg·liter⁻¹ thiamine, 100 mg·liter⁻¹ *myo*-inositol, 3 % sucrose and 7 g·liter⁻¹ agar-agar, at pH 5.7 ± 0.1. The antioxidant effect of each treatment was evaluated on the tissue of the explants using a visual scale with values from 1 to 3: 1 = low level of necrosis (< 30 %), 2 = medium level of necrosis (≥ 30 % < 60 %) and 3 = high level of necrosis (≥ 60 %). The results were obtained using a stereomicroscope (Leica® EZ4 [20X objective], Germany).

Morphogenesis induction in *L. montanus* explants by plant growth regulators

Morphogenesis induction was evaluated in 12 six-week-old seedlings harvested at random. The regions to be used as the explant source (hypocotyl, cotyledon and epicotyl) were cut into sections of approximately 3 x 3 x 2 mm. Subsequently, the explants with 10 replications were seeded on MS medium supplemented with 0.40 mg·liter⁻¹ thiamine, 100 mg·liter⁻¹ *myo*-inositol, 3 % sucrose, 100 mg·liter⁻¹ AC, 7 g·liter⁻¹ agar-agar and different concentrations of IAA (indole acetic acid) and BA (6-benzyladenine) as plant growth regulators (PGR). Treatments were as follows: T0 = Control (no PGR), T1 = IAA (0.1 µM) and BA (0.1 µM), T2 = IAA (0.1 µM) and BA (0.3 µM), T3 = IAA (0.3 µM) and BA (0.1 µM), T4 = IAA (1.0 µM) and BA (3.0 µM) and T5 = IAA (3.0 µM) and BA (1.0 µM).

Morphogenic responses of the explants were evaluated after a four-week incubation period under a light/dark period (16:8 h) at 25 ± 1 °C. The type of morphogenic response was evaluated based on a qualitative scale of 0 to 2: 0 = explants that showed no response, 1 = response

seleccionadas. Posteriormente se tomó una muestra aleatoria de 30 semillas, las cuales se sometieron a un proceso de desinfección que consistió en un lavado con detergente Foca® y Tween 80® (Thermo Scientific, USA) por 2 min, seguido de una inmersión en alcohol al 70 % durante 3 min y un segundo lavado en hipoclorito de sodio al 10 % por 15 min, de acuerdo con lo señalado por Mroginski, Sansberro, y Flaschland (2010). Las semillas se escarificaron mecánicamente mediante un corte lateral en la testa, con el fin de romper la latencia física debida a su impermeabilidad (Corona, Gómez, & Linding, 2013). Las semillas se sembraron en medio básico MS (Murashigue y Skoog, 1962) adicionado con 0.40 mg·litro⁻¹ de tiamina, 100 mg·litro⁻¹ de mioinositol, 3 % de sacarosa y 7 g·litro⁻¹ de agar-agar, y se incubaron a 25 ± 1 °C y un fotoperiodo de 16:8 h (luz/oscuridad) durante cuatro semanas.

Evaluación de antioxidantes sobre el necrosamiento de explantes de *L. montanus*

Después de cuatro semanas de crecimiento, se cosecharon seis plántulas de *L. montanus* de manera aleatoria. De cada plántula se obtuvieron las regiones a utilizar como fuente de explante: hipocótilo, cotiledón y epicótilo. Estas regiones fueron seccionadas en porciones de 3 x 3 x 2 mm aproximadamente y distribuidas (según el tipo de explante) aleatoriamente en cinco tratamientos con 12 repeticiones, incubados en un fotoperiodo de 16:8 h (luz/oscuridad) durante tres semanas. Los tratamientos consistieron en la aplicación de antioxidantes en diferentes dosis: T0 = Testigo (sin antioxidantes), T1 = ácido cítrico (AC, 100 mg·litro⁻¹), T2 = AC (150 mg·litro⁻¹), T3 = carbón activado (CA, 50 mg·litro⁻¹) y T4 = CA (100 mg·litro⁻¹). Los antioxidantes se aplicaron en medio MS adicionado con 0.40 mg·litro⁻¹ de tiamina, 100 mg·litro⁻¹ de mioinositol, 3 % de sacarosa y 7 g·litro⁻¹ de agar-agar, a pH 5.7 ± 0.1. El efecto antioxidante de cada tratamiento se evaluó sobre el tejido de los explantes mediante una escala visual con valores de 1 a 3: 01 = nivel bajo de necrosamiento (< 30 %), 2 = nivel medio de necrosamiento (≥ 30 % < 60 %) y 3 = nivel alto de necrosamiento (≥ 60 %). Los resultados se obtuvieron con ayuda de un microscopio estereoscópico (Leica® EZ4 [objetivo 20X], Alemania).

Inducción de morfogénesis en explantes de *L. montanus* mediante reguladores de crecimiento vegetal

La inducción de morfogénesis se evaluó en 12 plántulas de seis semanas de edad cosechadas de manera aleatoria. Las regiones a utilizar como fuente de explante (hipocótilo, cotiledón y epicótilo) se seccionaron en porciones de 3 x 3 x 2 mm aproximadamente. Posteriormente, los explantes con 10 repeticiones se sembraron en medio MS, adicionado con 0.40 mg·litro⁻¹ de tiamina, 100 mg·litro⁻¹ de mioinositol, 3 % de sacarosa, 100 mg·litro⁻¹ de CA,

in callus formation, 2 = response in shoot formation. The number of shoots and their height were also evaluated.

Statistical analysis

Necrosis and morphogenic response were evaluated in a completely randomized design. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test ($P \leq 0.05$). The number of shoots and their height were evaluated in a completely randomized design with a factorial arrangement, using the following model:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Where:

Y_{ijk} = Response in number of shoots or height

μ = Overall mean

A_i = Effect of the type of explant (hypocotyl, cotyledon and epicotyl)

B_j = Effect of the treatment (combinations of IAA: BA)

AB_{ij} = Interaction of the type of explant with the treatment

ξ_{ijk} = Experimental error

Data were subjected to an analysis of variance and Tukey's comparison of means ($P = 0.05$). All the analyses were performed with the SYSTAT V.13.1 statistical package (2009).

Results and discussion

Effect of antioxidants on the necrosis level of *L. montanus* explants

The explants evaluated three weeks after being planted showed different degrees of necrosis. In Figure 1 it can be seen that the highest necrosis percentage occurred in the control treatment (no antioxidants). In this treatment, the level of necrosis in the hypocotyl, cotyledon and epicotyl was high ($\geq 60\%$). The necrosis level in the treatments with CA at concentrations of 100 mg·liter⁻¹ and 150 mg·liter⁻¹ was also high ($\geq 60\%$). On the other hand, the treatments containing 50 mg·liter⁻¹ and 100 mg·liter⁻¹ AC induced a significant reduction ($P = 0.05$) in the oxidation level of the three explants cultured; the necrosis level in the hypocotyl and epicotyl was low ($< 30\%$).

The Kruskal-Wallis test ($P = 0.05$) showed the difference in the effect of at least one treatment in controlling necrosis in the explant ($X^2_{(4)} = 64.368$ and $P < 0.001$). Table 1 presents the results of the pairwise comparison test. This test allowed determining the treatments with statistically different effects in controlling oxidation.

According to Table 1, the best treatments to control necrosis in the explants were those containing AC. This result agrees with the findings of Azofeifa (2009),

7 g·litro⁻¹ de agar-agar y distintas concentraciones de AIA (ácido indolacético) y BA (6-benciladenina) como reguladores de crecimiento vegetal (RCV). Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: T0 = Testigo (sin RCV), T1 = AIA (0.1 μM) y BA (0.1 μM), T2 = AIA (0.1 μM) y BA (0.3 μM), T3 = AIA (0.3 μM) y BA (0.1 μM), T4 = AIA (1.0 μM) y BA (3.0 μM) y T5 = AIA (3.0 μM) y BA (1.0 μM).

Las respuestas morfogénicas de los explantes se evaluaron después de cuatro semanas de incubación bajo un periodo de luz/oscuridad (16:8 h) a 25 ± 1 °C. El tipo de respuesta morfogénica se evaluó con base en una escala cualitativa de 0 a 2:0 = explantes que no presentaron respuesta, 1 = respuesta en formación de callo, 2 = respuesta en formación de brote. El número de brotes y su altura también fueron evaluados.

Análisis estadístico

El necrosamiento y la respuesta morfogénica se evaluaron en un diseño completamente al azar. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$). El número de brotes y altura se evaluaron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial, utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Respuesta en número de brotes o altura

μ = Media general

A_i = Efecto del tipo de explante (hipocótilo, cotiledón y epicótilo)

B_j = Efecto del tratamiento (combinaciones de AIA: BA)

AB_{ij} = Interacción del tipo de explante con el tratamiento

ξ_{ijk} = Error experimental

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($P = 0.05$). Todos los análisis se hicieron con el paquete estadístico SYSTAT V.13.1 (2009).

Resultados y discusión

Efecto de los antioxidantes sobre el nivel de necrosamiento de explantes de *L. montanus*

Los explantes evaluados tres semanas después de haber sido sembrados presentaron diferentes grados de necrosamiento. En la Figura 1 se puede observar que el mayor porcentaje de necrosamiento ocurrió en el tratamiento testigo (sin antioxidantes). En este tratamiento, el nivel de necrosamiento en el hipocótilo, cotiledón y epicótilo fue de nivel alto ($\geq 60\%$). El tipo de necrosamiento en los tratamientos con presencia de AC en concentraciones de 100 mg·litro⁻¹ y 150 mg·litro⁻¹

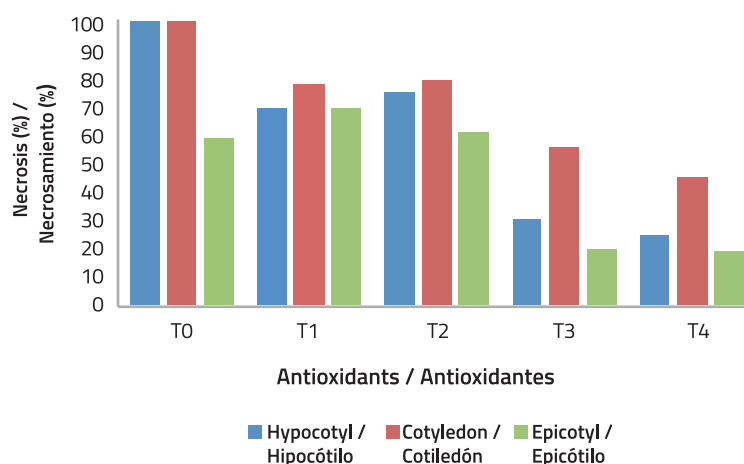


Figure 1. Effect of antioxidants (T0 = Control, T1 = citric acid [CA, 100 mg·liter⁻¹], T2 = CA [150 mg·liter⁻¹], T3 = activated carbon [AC, 50 mg·liter⁻¹] and T4 = AC [100 mg·liter⁻¹]) on the necrosis level in three types of *Lupinus montanus* explants (n = 12).

Figura 1. Efecto de los antioxidantes (T0 = Testigo, T1 = ácido cítrico [AC, 100 mg·litro⁻¹], T2 = AC [150 mg·litro⁻¹], T3 = carbón activado [CA, 50 mg·litro⁻¹] y T4 = CA [100 mg·litro⁻¹]) sobre el nivel de necrosamiento en tres tipos de explantes de *Lupinus montanus* (n = 12).

Table 1. Comparison of the evaluated antioxidants (citric acid [CA] and activated carbon [AC]) for controlling necrosis in explants (hypocotyl, cotyledon and epicotyl) of *Lupinus montanus*.

Cuadro 1. Comparación de los antioxidantes evaluados (ácido cítrico [AC] y carbón activado [CA]) para el control de necrosamiento en los explantes (hipocótilo, cotiledón y epicótilo) de *Lupinus montanus*.

Treatment/Tratamiento	Necrosis (%) / Necrosamiento (%)	Level of necrosis / Nivel de necrosamiento
Control/Testigo	85.0bc	High (≥ 60 %) / Alto (≥ 60 %)
CA (100 mg·liter ⁻¹) / AC (100 mg·litro ⁻¹)	72.6ab	Low (≥ 60 %) / Bajo (< 60 %)
CA (150 mg·liter ⁻¹) / AC (150 mg·litro ⁻¹)	73.0ac	High (≥ 60 %) / Alto (≥ 60 %)
AC (50 mg·liter ⁻¹) / CA (50 mg·litro ⁻¹)	33.3d	Low (< 30 %) / Bajo (< 30 %)
AC (100 mg·liter ⁻¹) / CA (100 mg·litro ⁻¹)	30.0d	Low (< 30 %) / Bajo (< 30 %)

Same letters show no statistically significant difference according to the Kruskal-Wallis test ($P = 0.05$)

Letras iguales no muestran diferencia significativa estadísticamente de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis a una ($P = 0.05$)

who reported the use of AC in culture media for woody species, due to the antioxidant role of AC in the absorption of substances exuded by the explant, which kill the tissue cells by making the medium toxic. Similarly, Phoplonker and Caligari (1993) found that the addition of AC in the culture medium decreased the level of necrosis in explants of *L. mutabilis* Sweet.

Regarding the relationship between the degree of necrosis and the type of explant cultured, it was observed that the cotyledon explants had higher levels of necrosis ($P < 0.001$) than the hypocotyl and epicotyl explants ($P = 0.057$). In other words, the degree of necrosis in the cotyledon under the evaluated antioxidants is associated with both the culture medium and the explant itself. This could be

también fue de nivel alto (≥ 60 %). Por otra parte, los tratamientos que contenían 50 mg·litro⁻¹ y 100 mg·litro⁻¹ de CA indujeron reducción significativa ($P = 0.05$) en el nivel de oxidación de los tres explantes cultivados; el tipo de necrosamiento en el hipocótilo y epicótilo fue de nivel bajo (< 30 %).

La prueba de Kruskal-Wallis ($P = 0.05$) evidenció la diferencia en el efecto de al menos un tratamiento en el control del necrosamiento del explante ($X^2_{(4)} = 64.368$ y $P < 0.001$). El Cuadro 1 presenta los resultados de la prueba de comparación por pares. Dicha prueba permitió conocer los tratamientos con efectos estadísticamente diferentes en el control de la oxidación.

related to the findings reported by some authors with respect to the presence of a large amount of secondary metabolites (alkaloids, phenols and terpenes) in the cotyledons of the seeds of *L. mexicanus* Cerv. ex. Lag. (Zamora-Natera, García-López, Ruiz-López, & Salcedo-Pérez, 2008) and *L. mutabilis* (Ortega-David, Rodríguez, David, & Zamora-Burbano, 2010). Cotyledons, when subjected to the stress of cutting for *in vitro* planting, release these metabolites into the culture medium, adding to the increased production of reactive oxygen species, resulting in increased necrosis of the explant (Arauz, 1998).

Evaluation of the morphogenic response of *L. montanus*

In the control treatment and the treatment with the combination of 0.1 μM IAA and 0.1 μM BA, no morphogenic response was obtained in the explants evaluated. In treatments where one of the two PGR (IAA or BA) exceeded the 0.1 μM concentration, there was a greater response in shoot formation (> 55 %) followed by the response in callus formation (< 24 %).

Effect of the *L. montanus* explant on the type of morphogenic response

Figure 2 shows that hypocotyl and epicotyl explants cultured under different combinations of IAA-BA (except T1 = 0.1 μM IAA and 0.1 μM BA) presented a greater organogenic response (72 to 80 %), while the cotyledon explants were divided into those with no response (40 %) and those with callus formation (> 50 %).

De acuerdo con el Cuadro 1, los mejores tratamientos para controlar el necrosamiento de los explantes fueron aquellos que contenían CA. Este resultado coincide con lo referido por Azofeifa (2009), quien reporta el uso de CA en medios de cultivo para especies leñosas, debido al papel antioxidante del CA en la absorción de sustancias exudadas por el explante, mismas que necrosan el tejido al toxificar el medio. De igual manera, Phoplonker y Caligari (1993) observaron que la adición de CA al medio de cultivo disminuyó el nivel de necrosamiento en explantes de *L. mutabilis* Sweet.

Con respecto a la relación entre el grado de necrosamiento y el tipo de explante cultivado se observó que los explantes de cotiledón presentaron niveles mayores de necrosamiento ($P < 0.001$) en comparación con los de hipocótilo y epicótilo ($P = 0.057$). Dicho de otra forma, el grado de necrosamiento en el cotiledón bajo los antioxidantes evaluados está asociado tanto al medio de cultivo como al propio explante. Esto podría estar relacionado con lo reportado por algunos autores respecto a la presencia de gran cantidad de metabolitos secundarios (alcaloides, fenoles y terpenos) en los cotiledones de las semillas de *L. mexicanus* Cerv. ex. Lag. (Zamora-Natera, García-López, Ruiz-López, & Salcedo-Pérez, 2008) y *L. mutabilis* (Ortega-David, Rodríguez, David, & Zamora-Burbano, 2010). Estos al ser sometidos al estrés del corte para su siembra *in vitro* liberan dichos metabolitos hacia el medio de cultivo, sumado al incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno, provocando mayor necrosamiento del explante (Arauz, 1998).

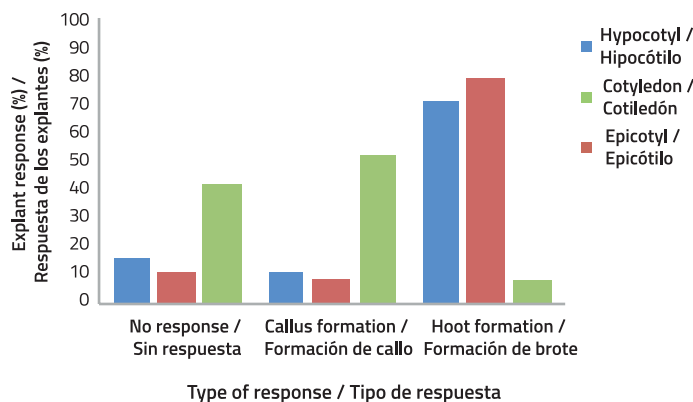


Figure 2. Type of response by *Lupinus montanus* explant (n =180) cultured with plant growth regulators (indole acetic acid and 6-benzyladenine).

Figura 2. Tipo de respuesta por explante de *Lupinus montanus* (n = 180) cultivados con reguladores de crecimiento vegetal (ácido indolacético y 6-benciladenina).

Callus formation. Results show that the cotyledon explants are mainly induced to callus formation (> 50 %) when combinations of IAA and BA are applied in a range of concentrations from 0.1 μM to 3 μM . In all cases, the calluses generated in this research showed a compact structure and a green coloration (Figure 3). This information is similar to that reported by Rivera et al. (2008), who were able to induce the greatest callus formation (45 %) of *L. aschenbornii*, S. Schauer from cotyledon explants, under a combination of auxin (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and cytokin (kinetin) at concentrations of 1 mg·liter⁻¹ (4.4 μM) and 0.5 mg·liter⁻¹ (2.1 μM) respectively.

Shoot formation. The cotyledon explant caused four cases of organogenesis; however, after four weeks, the shoots failed to differentiate clearly. Therefore, the response variable number of shoots was only evaluated for hypocotyl and epicotyl. Figure 4 shows shoot formation in these explants.

Number of shoots. Figure 5 shows the effects induced by the factors PGR and explant type. Their interaction had no statistical significance ($P = 0.74$), so the analysis of the factors was made in isolation. The analysis of variance showed that there was a significant difference ($P = 0.05$) in the effect of the PGR factor (IAA-BA) on the average value of the number of shoots. Tukey's test indicates that T5 (3.0 μM IAA and 1.0 μM BA) differs significantly from the other treatments by explant type (except for T4 = 1.0 μM IAA and 3.0 μM BA in hypocotyl, $P = 0.617$). These differences can be seen in Figure 5, which shows that the number of hypocotyl and epicotyl shoots (5.9 and 10.1, respectively) is greater in T5 than in the other treatments.

Figure 5 also shows that the explant factor generates different average values for the number of shoots ($P < 0.001$), with a higher response in the epicotyl explants, except for what occurs in T4 where the standard deviations of hypocotyl and epicotyl (± 2.4 and ± 2.8 , respectively) overlap.

Shoot height. The effect of the PGR factor on the average value of shoot height was statistically different ($P = 0.012$). In Figure 6 it can be seen that the epicotyl shoots cultured under the environmental conditions of the T5 medium (3.0 μM IAA and 1.0 BA) had greater height ($P = 0.05$) compared to the other treatments; however, hypocotyl shoots under T5 showed no significant differences in height with those obtained with T4 (1.0 μM IAA and 3.0 μM BA).

Results obtained for shoot height in hypocotyl cultured in medium supplemented with 1.0 μM IAA and 3.0 BA, and 3.0 μM IAA and 1.0 BA contrast with those reported by Rodríguez, Hechevarría, Rodríguez, and Rivera (2003). These authors worked with herbaceous species

Evaluación de la respuesta morfológica de *L. montanus*

En el tratamiento testigo y en tratamiento con la combinación de 0.1 μM de AIA y 0.1 μM de BA no se obtuvo respuesta morfológica en los explantes evaluados. En los tratamientos donde alguno de los dos RCV (AIA o BA) superaba la concentración 0.1 μM hubo mayor respuesta en la formación de brotes (> 55 %) seguida de la respuesta en la formación de callo (< 24 %).

Efecto del explante de *L. montanus* sobre el tipo de respuesta morfológica

La Figura 2 muestra que los explantes de hipocótilo y epicótilo cultivados bajo las distintas combinaciones de AIA-BA (excepto el T1 = 0.1 μM de AIA y 0.1 μM de BA) presentaron mayor respuesta de tipo organogénico (72 a 80 %), mientras que en el caso de cotiledón, los explantes se dividieron entre aquellos sin respuesta (40 %) y con formación de callo (> 50 %).

Formación de callo. Los resultados muestran que los explantes de cotiledón son inducidos principalmente a la formación de callos (> 50 %) cuando se aplican combinaciones de AIA y BA en un rango de concentraciones de 0.1 μM a 3 μM . En todos los casos, los callos generados en esta investigación presentaron estructura compacta y una coloración verde (Figura 3). Esta información es similar a la reportada por Rivera et al. (2008), quienes lograron inducir la mayor formación de callos (45 %) de *L. aschenbornii*, S. Schauer a partir de explantes de cotiledón, bajo una combinación de auxina (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y citocinina (kinetina) en concentraciones de 1 mg·litro⁻¹ (4.4 μM) y 0.5 mg·litro⁻¹ (2.1 μM) respectivamente.

Formación de brotes. El explante de cotiledón originó cuatro casos de organogénesis; sin embargo, al cabo de cuatro semanas, los brotes no lograron diferenciarse de manera clara. Por lo anterior, la variable respuesta número brotes sólo fue evaluada para hipocótilo y epicótilo. La Figura 4 muestra la formación de brotes en dichos explantes.

Número de brotes. La Figura 5 muestra los efectos inducidos por los factores RCV y tipo de explante. La interacción de los mismos no tuvo significancia estadística ($P = 0.74$), por lo que el análisis de los factores se hizo de manera aislada. El análisis de varianza mostró existencia de diferencia significativa ($P = 0.05$) en el efecto del factor RCV (AIA-BA) sobre el valor promedio del número de brotes. La prueba de Tukey señala que el T5 (3.0 μM de AIA y 1.0 μM de BA) presenta diferencias significativas con los tratamientos restantes por tipo de explante (a excepción del T4 = 1.0 μM de AIA y 3.0 μM de BA en hipocótilo, $P = 0.617$). Estas diferencias pueden apreciarse en la Figura 5, donde se

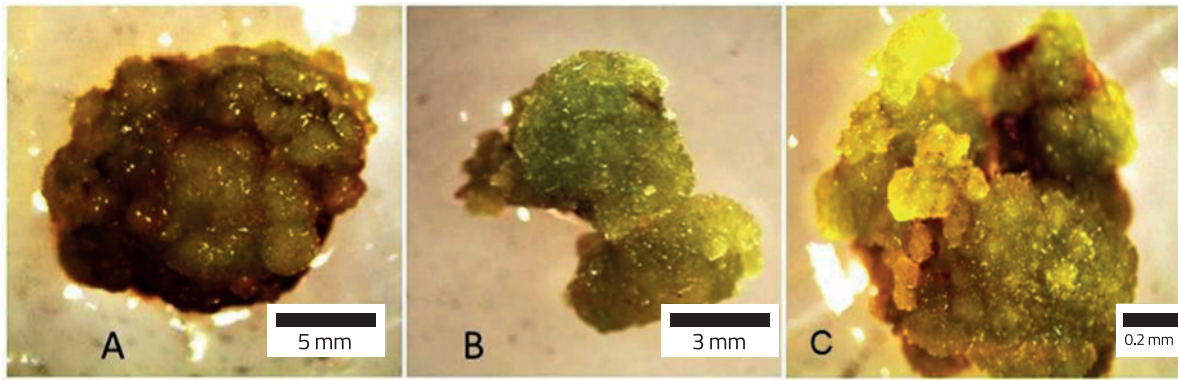


Figure 3. Most callus formation (> 50 %) came from cotyledon explants (C), while in explants of hypocotyl (A) and epicotyl (B) it was close to 10 %.

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

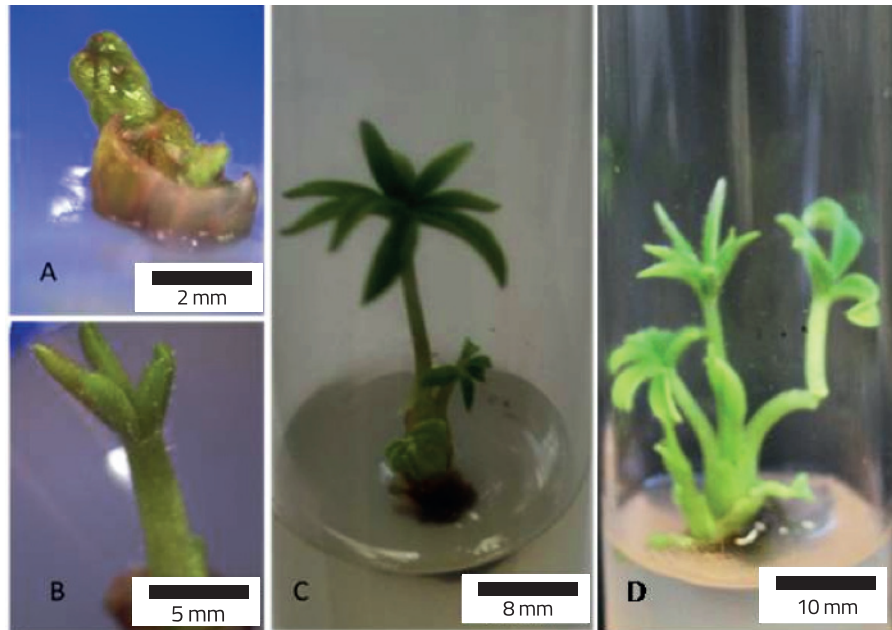


Figure 4. Shoot formation in epicotyl (A) and hypocotyl (B) of *Lupinus montanus*. Hypocotyl (C) and epicotyl (D) shoots of *L. montanus* in the fourth week, cultured with plant growth regulators (indole acetic acid and 6-benzyladenine).

Figura 4. Formación de brotes en epicótilo (A) e hipocótilo (B) de *Lupinus montanus*. Brotes de hipocótilo (C) y epicótilo (D) de *L. montanus* en la cuarta semana, cultivados con reguladores de crecimiento vegetal (ácido indolacético y 6-benciladenina).

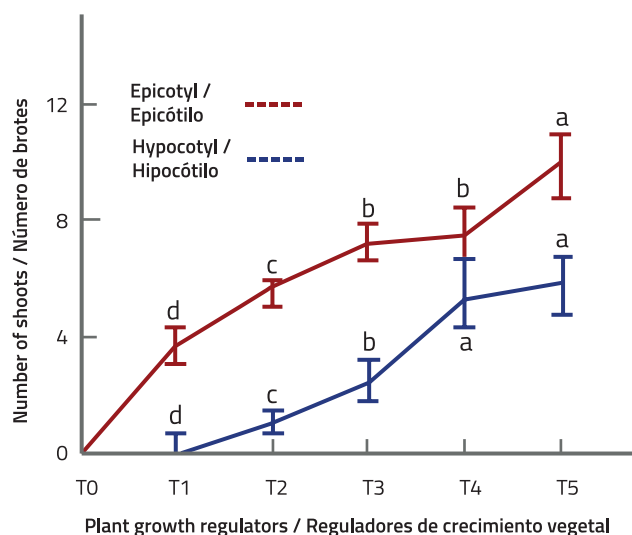


Figure 5. Number of shoots in *Lupinus montanus* explants cultured with plant growth regulators: T0 = Control, T1 = 0.1 μM IAA (indole acetic acid) and 0.1 μM BA (6-benzyladenine), T2 = 0.1 μM IAA and 0.3 μM BA, T3 = 0.3 μM IAA and 0.1 μM BA, T4 = 1.0 μM IAA and 3.0 μM BA, T5 = 3.0 μM IAA and 1.0 μM BA. Same letters indicate no statistical difference among treatments by explant type, according to Tukey's test ($P = 0.05$).

Figura 5. Número de brotes en explantes de *Lupinus montanus* cultivados con reguladores de crecimiento vegetal: T0 = Testigo, T1 = 0.1 μM de AIA (ácido indolacético) y 0.1 μM de BA (6-benciladenina), T2 = 0.1 μM de AIA y 0.3 μM de BA, T3 = 0.3 μM de AIA y 0.1 de BA, T4 = 1.0 μM de AIA y 3.0 μM de BA, T5 = 3.0 μM de AIA y 1.0 de BA. Letras iguales no presentan diferencia estadística entre tratamientos por tipo de explante, de acuerdo con la prueba de Tukey ($P = 0.05$).

such as *Artemisia absinthium* L. and found that the increase in the concentration of indoleacetic or indolebutyric auxin and the reduction in the concentration of BA generate greater shoot height than those treatments in which the BA concentration exceeds that of the auxin.

Conclusions

The best necrosis control (< 30 %) in explants cultured *in vitro* was obtained with the addition of activated carbon (50 mg·liter⁻¹ and 100 mg·liter⁻¹) to the culture medium. Cotyledon explants were more susceptible to the process of necrosis in all treatments evaluated. Regarding the type of morphogenic response, hypocotyl and epicotyl explants showed higher organogenic response, which may be of great use in scaling up the *in vitro* propagation of the species. At the explant level, the epicotyl shows significant differences in the number and height of shoots relative to the hypocotyl. At the level of plant growth regulators, the combination of IAA (1.0 μM) and BA (3.0 μM) and that of IAA (3.0 μM) and BA (1.0 μM) were the best media for inducing a greater number of shoots in the hypocotyl and epicotyl, while with IAA (3.0 μM) and BA (1.0 μM) the greatest height in epicotyl shoots was obtained. On the other hand, cotyledon explants showed a greater tendency toward callus formation in media containing plant growth regulators.

observa que el número de brotes de hipocótilo (5.9) y epicótilo (10.1) en el T5 es mayor con respecto a los obtenidos en los tratamientos restantes.

En la Figura 5 también se puede apreciar que el factor explante genera diferentes valores promedio del número de brotes ($P < 0.001$), siendo mayor la respuesta en los explantes de epicótilo, a excepción de lo que ocurre en el T4 donde las desviaciones estándar de hipocótilo y epicótilo (± 2.4 y ± 2.8 , respectivamente) se traslapan.

Altura de brotes. El efecto del factor RCV sobre el valor promedio de la altura de los brotes fue estadísticamente diferente ($P = 0.012$). En la Figura 6 se puede observar que los brotes de epicótilo cultivados bajo las condiciones del medio T5 (3.0 μM de AIA y 1.0 de BA) tuvieron mayor altura ($P = 0.05$) respecto al resto de los tratamientos; no obstante, los brotes de hipocótilo bajo el T5 no presentaron diferencias significativas en la altura obtenidas con el T4 (1.0 μM de AIA y 3.0 μM de BA).

Los resultados obtenidos para altura de brotes en hipocótilo cultivados en medio adicionado con 1.0 μM de AIA y 3.0 de BA, y 3.0 μM de AIA y 1.0 de BA contrastan con lo señalado por Rodríguez, Hechevarría, Rodríguez, y Rivera (2003). Dichos autores trabajaron con especies

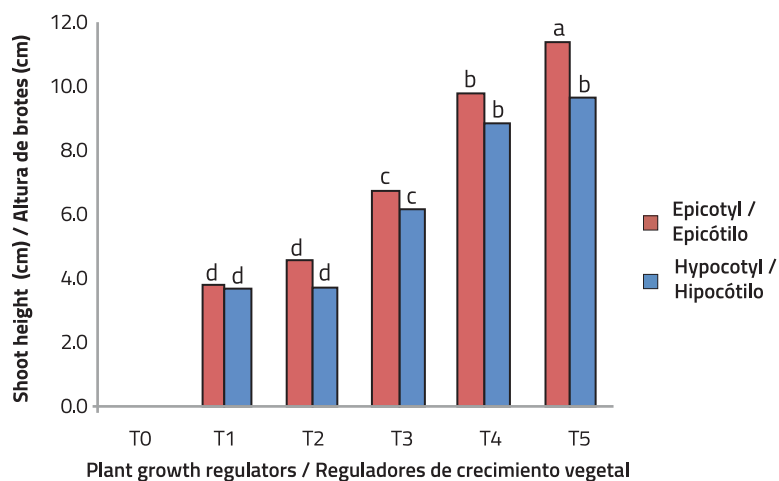


Figure 6. Shoot height in *Lupinus montanus* explants cultured with plant growth regulators: T0 = Control, T1 = 0.1 μM IAA (indole acetic acid) and 0.1 μM BA (6-benzyladenine), T2 = 0.1 μM IAA and 0.3 μM BA, T3 = 0.3 μM IAA and 0.1 BA, T4 = 1.0 μM IAA and 3.0 μM BA, T5 = 3.0 μM IAA and 1.0 BA. Same letters among treatments indicate statistically significant difference (Tukey, $P = 0.05$).

Figura 6. Altura de brotes en explantes de *Lupinus montanus* cultivados con reguladores de crecimiento vegetal: T0 = Testigo, T1 = 0.1 μM de AIA (ácido indolacético) y 0.1 μM de BA (6-benciladenina), T2 = 0.1 μM de AIA y 0.3 μM de BA, T3 = 0.3 μM de AIA y 0.1 de BA, T4 = 1.0 μM de AIA y 3.0 μM de BA, T5 = 3.0 μM de AIA y 1.0 de BA. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencia estadísticamente significativa (Tukey, $P = 0.05$).

End of English version

herbáceas como *Artemisia absinthium* L. y observaron que el aumento en la concentración de auxina del tipo indolacético o indolbutírico y la reducción en la concentración de BA generan mayor altura de brotes que aquellos tratamientos en los que la concentración de BA supera a la de la auxina.

References / Referencias

- Arauz, F. (1998). *Fitopatología: Un enfoque agroecológico*. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20, 153–175. doi: 10.15517/am.v20i1.4990
- Bermúdez, T. K., Martínez, H. J., Figueroa, R., Legal, L., & Wink, M. (2009). Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican *Lupinus* against the lepidopteran crop pest *Spodoptera frugiperda*. *BioControl*, 54, 459–46. doi: 10.1007/s10526-008-9180-y
- Corona, A., Gómez, M., & Linding, R. (2013). Efecto de la escarificación y la calidad de la luz en la germinación de *Lupinus elegans*. *Biológicas*, 9, 47–54. Obtenido de <http://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/view/20/20>
- Dove, E. R., Mori, T. A., Chew, G. T., Barden, A. E., Woodman, R. J., Puddey, I. B., Hodgson, J. M. (2011). Lupin and soya reduce glycaemia acutely in type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 106, 1045–1051. doi: 10.1017/S0007114511001334
- Dunn, D. B. (1979). *Lupinus*. In J. Rzedowski & G. C. de Rzedowski (Eds.), *Flora fanerogámica del Valle de México*. México, D. F.: Compañía Editorial Continental, S. A.

Conclusiones

El mejor control del necrosamiento (< 30 %) de los explantes cultivados *in vitro* se obtuvo con la adición de carbón activado (50 mg-litro⁻¹ y 100 mg-litro⁻¹) al medio de cultivo. Los explantes de cotiledón fueron más susceptibles al proceso de necrosamiento en todos los tratamientos evaluados. Respecto al tipo de respuesta morfogénica, los explantes de hipocótilo y epicótilo presentaron mayor respuesta de tipo organogénico, la cual podría ser de gran utilidad en el escalamiento de la propagación *in vitro* de la especie. A nivel de explante, el epicótilo muestra diferencias significativas en el número y altura de brotes respecto al hipocótilo. A nivel de reguladores de crecimiento vegetal, la combinación AIA (1.0 μM) y BA (3.0 μM) y la combinación AIA (3.0 μM) y BA (1.0 μM) fueron los mejores medios para la inducción de mayor número de brotes en el hipocótilo y epicótilo, mientras que con AIA (3.0 μM) y BA (1.0 μM) se obtuvo la mayor altura de los brotes en epicótilo. Por otro lado, los explantes de cotiledón presentaron mayor tendencia hacia la formación de callo en los medios que contenían reguladores vegetales.

Fin de versión en español

- Lee, Y. P., Mori, T. A., Sipsas, S., Barden, A., Puddey, I. B., Burke, V.,... Hodgson, J. M. (2006). Lupin-enriched bread increases satiety and reduces energy intake acutely. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 975–980. Obtenido de <http://ajcn.nutrition.org/content/84/5/975.full.pdf>
- Mroginski, L., Sansberro P., & Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, & L. Mroginski (Eds.), *Biología y mejoramiento vegetal 2* (pp.17–25). Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plant*, 15, 473–497. Obtenido de <http://essm.tamu.edu/media/46257/murashigeandskoogintropapersjanick.pdf>
- Ortega-David, E., Rodríguez, A. D., David, A. & Zamora-Burbano, A. (2010). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica*, 59, 111–118. Obtenido de http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/14094/14956
- Phoplonker, M. A. & Caligari, P. D. S. (1993). Cultural manipulations affecting callus formation from seedling explants of the pearl lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Annals of Applied Biology*, 123, 419–432. doi: 10.1111/j.1744-7348.1993.tb04104
- Rivera, M. R., Montes, H. E., Hernández, F. E., Salinas, P. F., Rodríguez, M. M., & Bermúdez, T. K. (2008). Effects of growth regulator and explant type on callus induction by *Lupinus montanus* H.B.K. In J. A. Palta, & J. D. Berger (Eds), *Lupins for health and wealth* (pp. 143–146). Australia: International Lupin Association.
- Rodríguez, G. H., Hechevarría, S. I., Rodríguez, F. C., & Rivera, A. M. M. (2003). Propagación *in vitro* de *Artemisia absinthium* L. en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(1). Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100003&lng=es
- SYSTAT 13 for Windows (2009). Bangalore, India: Cranes Software International.
- Zamora-Natera F., García-López, P., Ruiz-López, M., & Salcedo-Pérez, E. (2008). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Agrociencia*, 42(2), 185–192. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v42n2/v42n2a6.pdf>