



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE
CALLOS IN VITRO A PARTIR DE COTILEDONES DE CHOCHO ANDINO
(*LUPINUS MUTABILIS*)



AUTOR

Paula Alejandra Villacis Urbina

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE
CALLOS IN VITRO A PARTIR DE COTILEDONES DE CHOCHO ANDINO
(*LUPINUS MUTABILIS*)

Trabajo de Titulación en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M. Sc. Fernando Xavier Rivas Romero

Autora

Paula Alejandra Villacis Urbina

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientadas a sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

Fernando Xavier Rivas Romero

Master en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

CC: 1718092701

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Alejandra Cruz Salazar
Master en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología
CC: 1719928572

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Paula Alejandra Villacis Urbina

CC: 1803070273

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron y guiaron con sus consejos durante el transcurso de mi trabajo de titulación en especial a Estefanía Almeida y Edgar Velastegui.

A mi profesor guía M. Sc. Fernando Rivas por la paciencia y orientación durante este trabajo.

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio por su apoyo y motivación.

DEDICTORIA

Quiero dedicar este trabajo de investigación principalmente a mis padres, Amparito Urbina y José Villacis por su apoyo constante y por darme la inspiración y dedicación para culminar este trabajo. Gracias por estar siempre a mi lado aconsejándome y dándome fuerzas en cada paso de este proyecto.

Los amo.

RESUMEN

El chocho andino (*Lupinus mutabilis*) es una leguminosa que se cultiva en la zona andina de América del Sur. En el Ecuador el chocho se cultiva en la región de la Sierra, principalmente en las provincias de Imbabura, Chimborazo y Cotopaxi. El grano es conocido y consumido por su alto contenido proteico, que representa aproximadamente el 40% de la composición. El chocho es una planta que se cultiva al aire abierto por lo cual requiere de varias etapas para su producción, en estas etapas existe una gran demanda de recursos hídricos y energéticos. Además, es común que los cultivos sufran de infestaciones de plagas y enfermedades lo cual causa pérdida de las semillas. El cultivo de chocho *in vitro* es un área poco estudiada debido a los altos índices de contaminación que sufren y la liberación de compuestos oxidantes. El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo de cultivo de callos a partir del cotiledón de chocho. Primero se estableció un protocolo de desinfección de semillas. Se realizaron 6 tratamientos de desinfección de los cuales el tratamiento 6 resultó ser el más viable. En el tratamiento 6 se aplicó etanol al 70% y una solución de hipoclorito de sodio 7%. También se formuló un medio de cultivo para la inducción a callogénesis que contenía macro y microelementos MS (Murashige y Skoog), 6-BAP (6 benzilaminopurina) (0.5 mg/L), ANA (ácido naftalenacético) (1.5 mg/L), y un agente antioxidante que fue el carbón activado (2 g/L). Mediante el uso de este protocolo de desinfección y el medio de callogénesis se logró obtener 38.88% de explantes viables (libres de contaminación y necrosamiento). Estos explantes fueron sometidos al medio de inducción de callos donde se obtuvo un crecimiento máximo de 219.5 mg.

ABSTRACT

Lupinus mutabilis, also known as chocho, is a legume that is cultivated in the Andean zone of South America. In Ecuador, chocho is cultivated in the region known as Sierra, mostly in the provinces of Imbabura, Chimborazo and Cotopaxi. The bean is known and consumed mainly due to its high protein content that represents approximately 40% of its composition. Chocho is a plant that is cultivated out in the open, for which it requires various stages for its production. In the main stages, there is a great demand for resources like water and energy. Also, it is common that crops suffer from plagues and illnesses that causes loss in the final product. *In vitro* culture of chocho is not a much studied area due to the high percentage of contamination and release of oxidizing compounds. The object of this investigation was to establish a protocol for a callus culture using chocho cotyledons. First a disinfection protocol was established for seeds. 6 treatments were tested, results showed that treatment number 6 was the best for producing viable explants. Treatment 6 consisted of submerging the seed in ethanol 70% and a solution of sodium hypochlorite 7%. A culture medium for callus formation was also formulated. It contained MS (Murashige and Skoog) macro and microelements 6-BAP (0.5 mg/L), ANA (1.5 mg/L), and an antioxidant, in this case active carbon (2 g/L). Through the disinfection protocol it was possible to obtain 38.88% of viable explants (free of contamination and necrosis). When these explants were transferred to the callus medium, there exists callus formation with a maximum weight of 219.5 mg.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.3 Objetivo general.....	4
1.4 Objetivos Específicos	4
1.5 Justificación	4
2. Marco Teórico	6
2.1 <i>Lupinus mutabilis</i>	6
2.2 Descripción Botánica.....	7
2.3 Distribución geográfica del cultivo	10
2.4 Condiciones de cultivo	11
2.4.1 Clima y suelo	11
2.4.2 Aspectos Agrotécnicos	12
2.5 Usos del chocho	12
2.6 Contenido nutricional.....	13
2.6.1 Proteínas.....	14
2.6.2 Lípidos.....	14
2.6.3 Glúcidos	15
2.6.4 Vitaminas y Minerales.....	16
2.7 Sustancias que confieren toxicidad al chocho.....	17
2.7.1 Saponinas.....	17
2.7.2 Alcaloides	18
2.8 Métodos de propagación del <i>Lupinus mutabilis</i>	19
2.8.1 Cultivos in vitro.....	19
2.8.2. Cultivo de callos.....	23
3. Diseño Experimental.....	24

4. Materiales y Métodos	26
4.1 Material Vegetal	27
4.2 Establecimiento.....	27
4.2.1 Desinfección	27
4.2.2 Obtención de explantes	27
4. 4 Inducción de callogénesis	28
4.4.1 Preparación de medios de cultivo	28
4.4.2. Siembra de explantes para callogénesis	29
4.5 Análisis de datos	30
5. Resultados y Discusión	30
5.1 Desinfección de explantes y establecimiento	30
5.1.1 Porcentaje de contaminación.....	30
5.1.2 Porcentaje de necrosamiento y viabilidad.....	37
5.2 Inducción a callogénesis.....	42
5.2.1 Crecimiento de callo	42
5.2.2 Efecto de agente antioxidante en explantes	48
6. Conclusiones y Recomendaciones	51
6.1 Conclusiones.....	51
6.2. Recomendaciones	52
Referencias.....	53
Anexos	69

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Lupinus mutabilis es una leguminosa, también conocida como chocho, nativa de la zona de los Andes, principalmente de los países de Perú, Ecuador y Bolivia. En el Ecuador crece en varias zonas de la sierra, entre 2500 y 3400 metros sobre el nivel del mar. El alto contenido proteico del chocho se ha convertido en el enfoque principal para su producción. El porcentaje de proteínas en el chocho puede variar de 30 a 50% (Carvajal, Linnemann, Nout, Kozoil, y Van Boekel, 2016, p. 1454). Estas proteínas llaman la atención por sus funciones tales como absorción de agua y aceites, actividad emulsionante, y capacidad de gelificación. Estas son algunas de las propiedades atractivas para la industria química y de alimentos (Carvajal et al., 2016, p. 1456).

En el Ecuador el cultivo de chocho ha ido aumentando con el pasar de los años. Según datos del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en el 2016 existían aproximadamente 10000 hectáreas sembradas de chocho en el Ecuador y con una superficie potencial estimada para el cultivo de chocho de 70000 hectáreas (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], 2016). Las provincias con mayor producción de chocho son Cotopaxi, Chimborazo, Tungurahua, Pichincha, Bolívar, Carchi e Imbabura (Parra, 2014, p. 14).

Los cultivos de chocho a gran escala se realizan por siembra de semillas. Este trabajo tiene varias etapas, empezando desde la preparación del suelo. Es necesario rastrar, arar y surcar la tierra con tractor o manualmente. Las semillas se colocan en los surcos y se riegan. Para mejorar el crecimiento de la planta se aplican fertilizantes y se controlan las malezas normalmente con tractor; esto ayuda también a la aireación del suelo. Es muy común que estos cultivos se contagien de enfermedades, plagas o virus lo que causa una pérdida de producto final (INIAP, 2012).

Se han desarrollado métodos de propagación de chocho como alternativas de la reproducción tradicional: los cultivos *in vitro*. Esta técnica tiene como objetivo la regeneración de plantas a partir de muestras de tejidos de forma asexual. Un proyecto de titulación realizado en la ESPE en Ecuador induce a la formación de brotes de *Lupinus mutabilis* a partir de yemas axilares. Realizaron desinfección de los explantes con jabón, yodo y *benlate* y obtuvieron un 15% de contaminación, lo cual se considera un porcentaje bajo. En la multiplicación de los explantes se obtuvo una media de crecimiento a los 45 días, usando el bioregulador 6-BAP (6 benzilaminopurina). Eligieron las plantas más grandes para pasar al medio de enraizamiento donde se colocó ANA (ácido naftalenacético) y AIA (ácido indolacético); a los 62 días obtuvieron 33.33% de plantas enraizadas. Determinaron que el mejor crecimiento radicular se da con 3 ppm de AIA u 1 ppm de ANA (Proaño, 2011). En 2014 científicos en Perú evaluaron la inducción de callogénesis en *Lupinus mutabilis*. Ellos utilizaron explantes de peciolo, foliolo e hipocótilo para iniciar la inducción a callogénesis. Utilizaron un medio de cultivo compuesto de sales Murashige Skoog, ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D), sacarosa y agua de coco. Obtuvieron éxito con 75% de formación de callogénesis de los explantes obtenidos en condiciones de asepsia (Bonifaz, Dueñas, Quiñones, y Varillas, 2014, p. 20).

Los métodos cultivos *in vitro* de chocho se desarrollan con distintos objetivos, uno de ellos que llama la atención es la producción de metabolitos de interés, que en el caso del chocho pueden ser las proteínas. Una de estas técnicas es el establecimiento de una suspensión celular. Una suspensión celular es una técnica de propagación celular en un medio en movimiento. Se inician a partir de callos o células, los cuales se obtiene del tejido vegetal que tenga las células deseadas que produzcan metabolitos de interés (Szabados, Mroginski, y Roca, 1993, p. 176; Maathius y Diatloff, 2013, p. 4). Debido a que el establecimiento de suspensiones celulares se da a partir de callos, se buscan maneras más efectivas y rápidas para la obtención de los mismos, a partir de distintos tejidos.

1.2 Planteamiento del Problema

El grano de *Lupinus mutabilis* posee muchas ventajas nutricionales sobre otras plantas, tales como su contenido proteico, de ácidos grasos, hierro y vitaminas. A pesar de ello, la semilla de chocho tiene compuestos tóxicos para los humanos, entre ellos los alcaloides. Estos componentes se encuentran en menor proporción con respecto a los nutrientes, pero pueden causar daño si se consumen en gran cantidad. La principal desventaja de poseer alcaloides es la toxicidad que causan al ser ingeridos, pero también alteran las características organolépticas de las semillas, dándoles un sabor amargo (INIAP, 2009).

Todas las especies del genero *Lupinus* contienen alcaloides. La concentración total de alcaloides puede encontrarse de 0.01 a 4%, dependiendo de la especie. Las semillas maduras tienen la mayor concentración de alcaloides; debido a ello su sabor es amargo (Falconí, Visser, y van Heusden, 2015, p. 729). Los alcaloides más abundantes en las semillas de *Lupinus* son la lupanina, 13-hidroxi-lupanina y esparteína. El consumo de estos alcaloides en grandes cantidades puede resultar tóxico para los seres humanos y animales. Los principales daños que pueden causar son enfermedades en el hígado y taponamiento neuromuscular (Carvajal et al., 2016, p. 1455). En un estudio realizado por la Autoridad de Alimentos de Australia y Nueva Zelanda se determinó que la dosis letal de lupanina y 13-hidroxi-lupanina es de 25 mg de alcaloides totales por kilogramo de peso en adultos y 10 mg de alcaloides totales por kilogramo de peso en niños (Australia New Zealand Food Authority, 2001). Esto, sin duda conlleva la obligación de buscar metodologías para eliminar los alcaloides del chocho. El método más aplicado para la remoción de alcaloides es el acuoso, el cual consiste en la cocción y remojo en agua de las semillas. Este proceso puede tardar hasta una semana y usa gran cantidad de agua y energía por largos periodos (Villacrés et al., 2008, p. 163). Es necesaria también una infraestructura adecuada, lo cual lleva a una inversión económica grande, de la cual no se recupera el 100% en la primera cosecha.

Actualmente el método de siembra tradicional por semillas es el más usado por agricultores y empresas productoras de chocho. Pero la aplicación de este método para la producción de semillas de chocho supone varias desventajas para el agricultor, entre ellas las condiciones necesarias de altitud, precipitación, y pH del suelo. Además, el cultivo posee una alta demanda de recursos hídricos, maquinaria para tratar el suelo y mano de obra para cuidar las plantas (INIAP, 2012). Esto que implica una alta inversión económica y presión sobre el medio ambiente, sin tomar en cuenta el tiempo que se debe invertir para lograr una buena producción de semillas de *Lupinus mutabilis*.

1.3 Objetivo general

Establecer un protocolo para la obtención de callos in vitro a partir de cotiledones de chocho andino (*Lupinus mutabilis*)

1.4 Objetivos Específicos

- Optimizar un protocolo efectivo de desinfección de semillas de *Lupinus mutabilis*.
- Formular un medio de cultivo adecuado para la inducción a callogénesis.
- Establecer un cultivo de callos de *Lupinus mutabilis* estable.

1.5 Justificación

El *Lupinus mutabilis* es una planta común en el Ecuador conocida por su uso en platos típicos y alto contenido nutricional. Como se comentó anteriormente, el contenido de nutrientes es bastante llamativo para los consumidores. Sin embargo, estas semillas contienen alcaloides que le proporcionan un sabor amargo, a pesar de que estén en pocas cantidades lo que merma su calidad organoléptica y genera rechazo en el consumidor. Debido a que la mayoría de

chocho producido en el Ecuador es mediante cultivo de semillas, es necesario realizar un proceso de desamargado para reducir o eliminar los alcaloides. El tratamiento de semillas con químicos aún no se aplica a nivel industrial, aunque la reducción de alcaloides si fue significativa, 97.7% y se logró en 20 horas. Estos procesos poseen desventajas por el uso de químicos que necesitan equipos e instalaciones para su almacenamiento y el riesgo que causa al medio ambiente. También existen tratamientos biológicos, pero estos se han mostrado menos efectivos en la remoción de alcaloides, reduciendo solamente 50% de la concentración inicial. De igual manera es necesaria una etapa de cocción y remojo, lo cual implica un gasto de recursos hídricos, energéticos y biológicos (Carvajal et al., 2016, p. 1454). Es por esta razón que la búsqueda de una alternativa a la eliminación de alcaloides de la semilla de *Lupinus mutabilis*.

Ante estos inconvenientes, se han desarrollado técnicas de mejoramiento genético en base a la selección artificial de variedades con características deseables y cruzarlas hasta obtener un grano de calidad con menor cantidad de alcaloides. Una vez obtenida la planta deseada, se puede usarla para iniciar nuevos cultivos con las mismas características. Se ha logrado grandes avances para la consecución de este objetivo, sin embargo, la técnica tiene un costo elevado y al tratarse de un producto de una planta adulta el tiempo de espera es largo. Además, la reducción de alcaloides puede crear en la planta susceptibilidad a plagas y enfermedades, puesto que los alcaloides en las plantas tienen un propósito defensivo, lo cual inevitablemente lleva al aumento del uso de plaguicidas en estos cultivos (García, Ruiz, Salcedo y Zamora, 2008, p. 188). La reducción de alcaloides tiene efectos adversos sobre los cultivos en campo, pero también la selección y cultivo de nuevas variedades sin estas sustancias puede causar alteraciones en la composición nutricional cambiando las concentraciones de proteínas y minerales lo cual puede disminuir el valor agregado y atractivo que posee la semilla. (Vioque, 2000, p. 134)

Debido a ello, se hace necesario buscar alternativas eficientes para aprovechar las características nutricionales del chocho sin perjudicar el medio ambiente y

ahorrar recursos económicos. Una de ellas es la implementación de un cultivo *in vitro* de callos para su futuro uso como tejido inductor a una suspensión celular. Un cultivo de callos tendría varias ventajas sobre los cultivos tradicionales y también de algunos *in vitro*, ya que al producir callos cantidad de espacio que se ocupa es mínima y se puede iniciar de cualquier tejido de la especie vegetal. Los callos son la base primordial para el establecimiento de una suspensión celular por lo cual su inducción y establecimiento de protocolos es necesario.

El establecimiento de un cultivo de chocho constituiría una alternativa viable para la producción de metabolitos dentro de una suspensión celular sin usar plantas adultas, estableciéndose un ahorro en recursos ambientales y económicos. Si bien un proceso de cultivo *in vitro* no es comparable con un cultivo agrícola, el desarrollo de este proyecto puede ser el punto de partida para futuras investigaciones sobre establecimiento de suspensiones celulares a partir de *Lupinus mutabilis*, producción o extracción de proteínas específicas de cualquier especie incluida el chocho, reduciendo drásticamente las áreas de cultivo, sin perder rendimiento de proteínas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Lupinus mutabilis*

Lupinus mutabilis, o chocho, como se lo conoce en Ecuador es una leguminosa que fue domesticada en las regiones Andinas de Sur América. Así como en la antigüedad, la semilla es utilizada principalmente como alimento de las poblaciones de estas regiones. Es una especie importante, incluso desde la época Pre Hispánica debido a su alto contenido proteico (Mujica, 1994, p. 138).

Los cultivos de *L. mutabilis* se fueron reemplazando por cultivos europeos, tales como el trigo, cebada, soya, maíz y centeno, debido a que la semilla de chocho tiene un contenido alto de alcaloides lo cual lo proporciona un sabor

amargo. Esto representa una desventaja frente a las gramíneas y otras leguminosas introducidas (Mujica, 1994, p. 139).

Es por esta razón, el cultivo de chocho disminuyó durante la colonia. Sin embargo, el redescubrimiento de las propiedades alimenticias de este cultivo ha significado el aumento de las hectáreas cultivadas de este alimento, aunque aún no se han alcanzado los niveles de cultivo prehispánico (Gross et al., 1988, p. 358, Eastwood y Hughes, 2008, p. 375).

2.2 Descripción Botánica

L. mutabilis es una planta anual que puede crecer hasta 3 metros de altura, dependiendo del genotipo y ambiente en el que crece. (Figura 1)



Figura 1: Lupinus mutabilis.

Tomado de: Granada Native Garden, 2013.

Posee una raíz principal con un tallo grueso principal. Las ramificaciones secundarias de la raíz tienen nudos simbióticos con bacterias del género *Rhizobium*. (Figura 2)



Figura 2: Raíz de *Lupinus mutabilis* con nodulaciones de *Rhizobium*.
Tomado de: Granada Native Garden, 2013.

Los tallos de *L. mutabilis* son cilíndricos y huecos, y las hojas tiene forma de palma. Posee un racimo con varias flores colocadas verticalmente; cada uno posee cinco flores, con colores que varían desde azul, púrpura, celeste, rosa o blanco. (Figura 3)



Figura 3: Racimo de Lupinus mutabilis y hojas.

Tomado de: Kress, 1997.

El fruto es una vaina indehiscente. La vaina es elíptica, y puntiaguda en ambos extremos posee hasta 7 semillas. El color de la semilla puede ser negro, blanco, plomo, o amarillo pálido. (figura 4) Posee un tegumento rígido que contiene alcaloides y representa el 10% del peso de la semilla (Kurlovich, 2002, p. 287).



Figura 4: Vainas de Lupinus mutabilis.

Tomado de: Van der Brink, 2009.

El ciclo de crecimiento varía entre 150 y 360 días, dependiendo del genotipo y la duración de maduración del tallo central (Kurlovich, 2002, p. 287).

2.3 Distribución geográfica del cultivo

L. mutabilis o chocho, es cultivado en la región andina de Sur América, principalmente en Ecuador, Perú, y Chile. (Figura 5) Es la única variedad de *Lupinus* de América en ser domesticado. Se distribuye desde Colombia hasta el norte de Argentina. Ha llamado la atención en Europa debido a su alto contenido nutricional (Wolko, Clements, Naganowska, Nelson, y Yang, 2010, p. 164).

En Perú *L. mutabilis* es cultivado en los alrededores del Lago Titicaca, desde Ilave hasta la frontera con Bolivia. También se pueden encontrar en áreas pequeñas en Cajamarca y Cuzco. En el Ecuador se produce principalmente en las provincias de Cotopaxi, Chimborazo y Pichincha. Se pueden encontrar cultivos de menor tamaño en las provincias de Carchi, Imbabura, Tungurahua y Bolívar (Atchison et al., 2016, p. 1601). (Figura 5)

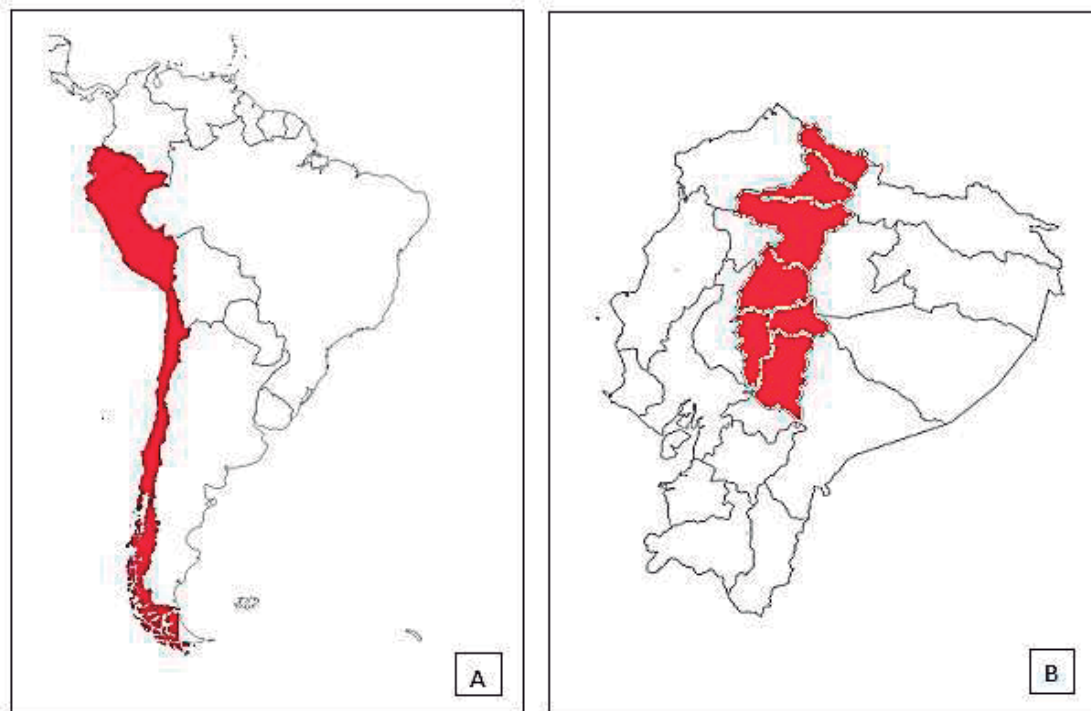


Figura 5: Distribución de cultivos de *L. mutabilis*.

(a) Distribución de cultivo de *L. mutabilis* en Sur América.

(b) Distribución de cultivo de *L. mutabilis* en Ecuador.

Cultivos de *L. mutabilis* andino se han intentado introducir en Europa. Los cultivos introducidos en Europa se caracterizan por un bajo rendimiento de semilla y largos periodos de crecimiento vegetativo, debido a las condiciones climáticas distintas que posee este continente (Eastwood y Hughes, 2008, p. 375).

2.4 Condiciones de cultivo

2.4.1 Clima y suelo

Se cultiva en regiones templadas y frías entre 2000 y 3850 metros sobre el nivel del mar. Con respecto a la demanda de lluvia, requieren entre 350 y 850 mm de precipitación. Es un cultivo sensible al exceso de humedad y a sequias

en las etapas de floración y envainado. No se desarrolla en heladas, en especial las etapas iniciales y formación de vainas. Requiere de un tipo de suelo franco y franco arenoso, con un buen balance de nutrientes y drenaje, el pH óptimo para este cultivo esta entre 5 y 7 (Mujica, 1994, p. 141).

2.4.2 Aspectos Agrotécnicos

El cultivo de *L. mutabilis* no requiere de gran cantidad de mano de obra, sobre todo en zonas altas con suelos delgados. La técnica adecuada de siembra es preparar surcos con distancias de 60 a 80cm entre ellos, hacer hoyos separados por 30cm y colocar aproximadamente 3 semillas en cada hoyo (Peralta et al. 2008, p. 18).

Otra labor importante que se debe hacer en el cultivo del chocho es la fertilización y aplicación de plaguicidas y fungicidas. Las principales plagas que afectan los cultivos de chocho son: *Copitarsia turbata* y *Agromyza sp.*, las cuales mastican el follaje y son barrenadores de tallo; *Frankiniella tuberosi* y *Myzus sp*, conocidos comúnmente como *trips*, tienen la capacidad de picar y chupar la savia de la planta (Proaño, 2011, p. 21).

Con respecto a las enfermedades, estas son causadas por distintos microorganismos. Una de las más importantes es la antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum*; roya causado por *Uromyces lupini* y fusariosis causado por *Fusarium oxisporium*. La cosecha se realiza cuando la planta alcanza la etapa de madurez completa. Para ello se recogen las vainas y se separan los granos, para luego ser procesados para el consumo humano (Proaño, 2011, p. 22).

2.5 Usos del chocho

Principalmente se usa el chocho en la alimentación humana. Existen varias maneras de preparar el chocho, previa la eliminación de alcaloides. Dependiendo de la región, el chocho se prepara de distintas maneras, por ejemplo; mote de chocho, en ensaladas, sopas, postres, ceviche o en ají. La semilla también se puede transformar en harina, la cual puede ser usada en panificación (Mujica, 1994, p. 143).

Los alcaloides provenientes del desamargado del chocho son empleados también para controlar ectoparásitos y parásitos intestinales de animales. También se puede usar el agua de remojo de chocho como laxante o como plaguicida. Por su contenido alto en alcaloides se siembra a menudo como cerco vivo para separar parcelas de diferentes cultivos. Este actúa como repelente y evita daños causados por animales (Jacobsen y Mujica, 2006, p. 3).

2.6 Contenido nutricional

Las semillas de *L. mutabilis* son el tejido con mayor valor nutritivo que posee la planta. La semilla posee proteínas y lípidos que forman más de la mitad de su peso. En general, las especies de *Lupinus* poseen gran cantidad de estos compuestos, 41 a 51% de proteínas y 14-24% de lípidos. Análisis realizados sobre la semilla de *L. mutabilis* nos muestran la composición de chocho, como se observa en la tabla 1 (Jacobsen y Mujica, 2006, p. 4).

Tabla 1.

Composición general de L. mutabilis. (g/100g).

Componente	<i>L. mutabilis</i>
Proteína	40 – 45
Grasa	15 – 20
Carbohidratos	25 – 30
Fibra	5 – 10
Ceniza	2 – 4

2.6.1 Proteínas

Las proteínas de chocho se definen por sus propiedades estructurales y fisicoquímicas, como son; el tamaño, la forma, la composición, la relación hidrofobicidad/hidrofilicidad, carga neta, arreglos estructurales y la adaptabilidad de la estructura dominante (Hettiarachchy y Ziegler, 1994, p. 519). Las proteínas con mayor presencia en las semillas leguminosas son globulinas (figura 6) y albuminas, otras proteínas como prolamina y gluteína están presentes en menor cantidad (Carvajal et al, 2015, p. 1463).

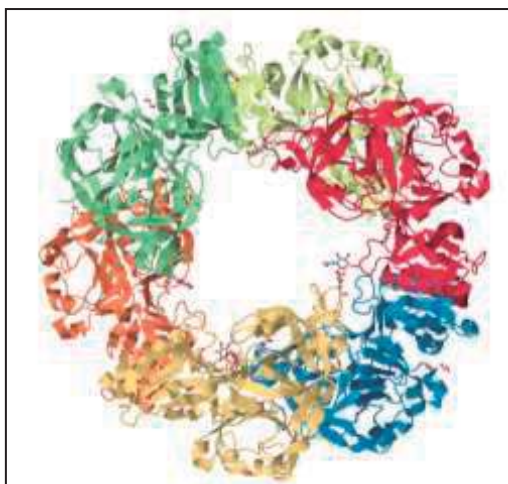


Figura 6: Estructura cristalina de la gamma conglutina, una proteína globulina de *L. angustifolius*.

Tomado de: PDB database; Acceso 4PPH.

2.6.2 Lípidos

Las especies del género *Lupinus* posee distintos contenidos de lípidos. Por ejemplo *L. luteus* posee 6%, *L. albus* de 7 a 14% y *L. mutabilis* hasta 20% (Borek, Pukacka, Michalski, y Ratajczak, 2009, p. 3457). *Lupinus mutabilis*

posee varios lípidos que conforman el 20% de su peso total seco. En la tabla 2 se encuentra el rango de la composición de lípidos de *L. mutabilis*, estos valores varían debido a las distintas variedades que existen.

Tabla 2:

Composición de L. mutabilis comparado con Glycine max (soya) y Arachis hypogaea (maní) (Porcentaje de lípidos en semilla).

Lípido	<i>Lupinus mutabilis</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Glycine max</i>
Acido palmítico	13-14	11	11
Ácido esteárico	2.5-8	3	4
Ácido oleico	41-42	55	22
Ácido linoleico	38.5-40	28	55
Ácido linolenico	2.5-3	1	8

Adaptado de: Gross et al., 1988 y Caicedo et al., 1998

Las concentraciones bajas de ácido linoleico, favorece el almacenamiento y conservación del aceite de lupino, ya que este lípido posee la capacidad de rápida oxidación y puede causar cambios en el sabor del aceite. La variación de los lípidos dentro del chocho se da por cambios en factores ambientales (Caicedo C, Peralta E, Villacrés E., 1998).

2.6.3 Glúcidos

Las semillas de *Lupinus* poseen distintas cantidades de glúcidos dependiendo de la variedad. Por lo general las semillas de *L. mutabilis* tienen un promedio de 33% de glúcidos (Carvajal et al., 2015, p. 1465). Se han encontrado catorce tipos de glúcidos solubles. Dentro de estos se encuentra la fructosa, sacarosa, galactosil ciclitoles, y oligosacáridos de la familia de la rafinosa. En la tabla 3 se observa la concentración de los glúcidos en las etapas de maduración de la semilla.

Tabla 3:

Composición de glúcidos en la semilla de Lupinus mutabilis (mg/g de semilla).

Glúcidos solubles	% en <i>L. mutabilis</i>
Sacarosa	9 – 10
Rafinosa	16 – 17
Staquinosa	67 – 68
Verbascosa	5 – 6

Adaptado de: Gross et al., 1988

2.6.4 Vitaminas y Minerales

2.6.4.1 Minerales

Las especies del género *Lupinus* posee bajas concentraciones de calcio y fósforo, pero su contenido de hierro, zinc y cobre es lo que las hace mejor fuente de microelementos que otras leguminosas, su producción de magnesio también es superior a otras leguminosas (Carvalho, 2005, p. 327). La mayor concentración de calcio del chocho se encuentra en la cáscara, y el fósforo en el núcleo, por lo cual la relación calcio-fósforo cambia tras el proceso de descascarado. En la tabla 4 se puede observar la composición de minerales de *L. mutabilis* en plantas con condiciones de riego óptimas.

Tabla 4:

Composición mineral de semillas de L. mutabilis, Lupinus albus y Glycine max.

Mineral	<i>L. mutabilis</i>	<i>L. albus</i>	<i>Glycine max</i>
Calcio mg/g	1.07 – 1.53	1.94	1.82
Sodio mg/g	0.25 – 0.75	0.19	0.11
Potasio mg/g	11.06 – 13.56	10.4	22.6
Magnesio mg/g	2 – 3.02	1.71	2.43
Fósforo mg/g	0.44 – 0.88	-	-
Hierro mg/kg	46 – 73.3	33.4	143
Zinc mg/kg	40 – 51.66	25.8	56.1
Manganeso mg/kg	21.33 – 29.10	767	130

Cobre mg/kg	4 – 12.10	5.7	12.4
--------------------	-----------	-----	------

Adaptado de: Rodríguez A., 2009 y Hill G, Hove E, King S., 2012

2.6.4.2 Vitaminas

La semilla de *Lupinus mutabilis* son una gran fuente de vitaminas, en especial de vitamina B. El contenido de vitaminas es similar al de otras leguminosas, por lo cual es una fuente aceptable de vitaminas para los humanos. En la tabla 5 se encuentran las vitaminas más abundantes en la semilla de chocho y sus concentraciones (Rodríguez, 2009).

Tabla 5:

Contenido de vitaminas en la semilla de Lupinus mutabilis.

Vitaminas	mg/100g
Beta-caroteno	0.09
Tiamina	0.51
Riboflavina	0.42
Niacina	4.1

Adaptado de Rodríguez A, 2009

2.7 Sustancias que confieren toxicidad al chocho

Al igual en todas las semillas de leguminosas, el grano de chocho posee sustancias anti nutritivas que impiden el uso directo del chocho en alimentación animal o humana. Dentro de estas sustancias se destacan las saponinas y los alcaloides

2.7.1 Saponinas

Las saponinas son compuestos no volátiles de superficie activa presentes en muchas especies vegetales. Son moléculas estructuralmente diversas que se

dividen en dos grupos; triterpenos y glicósidos esteroidales. Son moléculas anfipáticas y consisten en una aglicona no polar enlazada a uno o más residuos de monosacárido. Las saponinas pueden poseer de una a tres cadenas de azúcar, siendo las más comunes D-glucosa, L-rhamnosa y D-galactosa (Vincken, Heng, de Groot, y Gruppen, 2007, p. 276).

Dentro del género *Lupinus* la concentración de saponinas varía de 8 a 29 g/kg de saponinas, en la tabla 6 se puede observar el contenido de saponinas de variedades de *Lupinus* y algunas otras leguminosas.

Tabla 6:

Contenido de saponinas totales en variedades de Lupinus y otras leguminosas.

Especie	Saponinas (g/kg)
<i>L. hispanicus</i>	10 – 12
<i>L. Luteus</i>	11 – 13
<i>L. angustifolius</i>	8 – 10
<i>L. albus</i>	8 – 9
<i>L. mutabilis</i>	15 – 17
<i>Glycine max</i>	16 – 18
<i>Medicago sativa</i>	12 – 13

Adaptado de Muzquiz et al., 1989

Las saponinas tienen varios usos a nivel comercial; como agentes emulsificantes y espumantes en bebidas carbonatadas, farmacéutico; en productos de remoción de colesterol y suplementos dietéticos y cosmetológico en productos que contienen colores o sabores lipofílicos. También posee propiedades terapéuticas, por ejemplo, propiedades anticancerígenas, inmunoestimuladoras, anti-inflamatorias y anti-oxidantes (Sparg, Light, y van Staden, 2004, p. 219).

2.7.2 Alcaloides

Las plantas de género *Lupinus* contienen alcaloides de tipo quinolizidínicos (QA). Los QA son compuestos amargos y tóxicos que estructuralmente son similares a moléculas de sabor dulce. QA son alcaloides con uno o dos sistemas de anillos quinolizidínico. Los QA no están restringidos solamente para el género *Lupinus*, también se encuentran en las familias *Fabácea*, *Berberidácea* y *Solanácea*. Tampoco son el único tipo de alcaloide presente en *Lupinus*, pero son los más abundantes (Cheeke, 1989, p. 135). Los QAs son compuestos basados en el sistema de anillo de quinolozinidina bicíclico, esto incluye complejos de hasta 10 anillos. Dentro del género *Lupinus* se encuentran principalmente los QA de 2,3 y 4 anillos.

2.8 Métodos de propagación del *Lupinus mutabilis*

2.8.1 Cultivos in vitro

El cultivo in vitro de especies vegetales se enfoca en propagar órganos, tejidos o células vegetales con el fin de obtener una planta con las mismas características de la que se inició. Esto se realiza mediante el ajuste de las condiciones (pH, luz, temperatura, humedad, nutrientes) para obtener respuestas fisiológicas y morfológicas deseadas. Todas estas condiciones varían dependiendo del enfoque de la investigación, se puede perseguir la formación de órganos como brotes, raíces y embriones con el fin de regenerar plantas completas. Estos órganos se obtienen generalmente a partir de yemas, una vez obtenidos los brotes se subcultivan en un medio establecido para formación de raíz, este proceso se denomina organogénesis directa. Por otro lado, se puede obtener conglomerados de células no diferenciadas para estudios bioquímicos, fisiológicos o formación de embriones. Estos embriones se pueden obtener a partir de callos o células en suspensión, este método se denomina organogénesis indirecta (Ibáñez, 2013). (Figura 7)

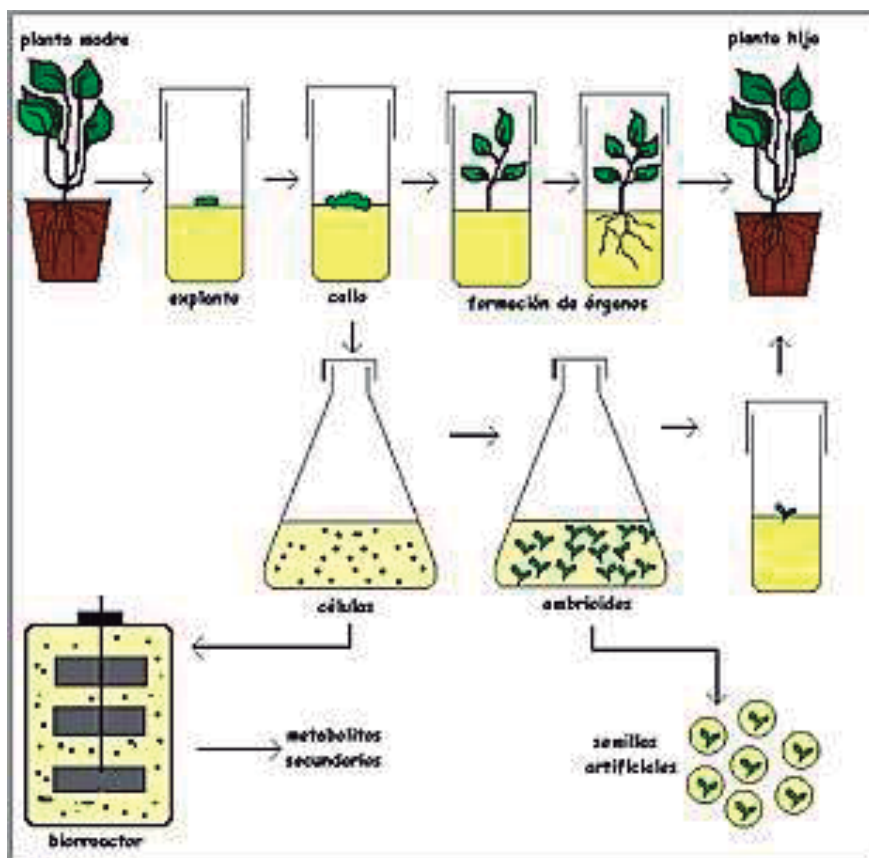


Figura 7: Cultivo de células y órganos vegetales.

Tomado de: Universidad Nacional de Quilmes [UNQ], 2006.

Los cultivos *in vitro* tienen varias aplicaciones desde el establecimiento de una especie vegetal hasta la mejora genética. Esto abarca estudios fisiológicos y bioquímicos, obtención de plantas libres de patógenos, conservación de germoplasma, producción de metabolitos secundarios, inducción de mutaciones e introducción de nuevas características (Seemann, 1993, p. 91).

2.8.1.1 Etapas del cultivo *in vitro*

Las etapas de cultivos *in vitro* se dividen en cinco estadios, los tres primeros estadios se desarrollan *in vitro* y los estadios cero y cinco se desarrollan en invernadero o en un área de desarrollo no estéril. A continuación, se enlistan los estadios según Debergh y Read (1991, p. 4):

Estadio 0. Preparación de los explantes.

En este estadio se busca la descontaminación de los explantes vegetales. Este proceso se realiza para eliminar cualquier contaminante, en especial hongos. Con respecto a contaminación bacteriana, no se puede conocer los efectos de la desinfección debido a que pueden ser bacterias exógenas o endógenas. Generalmente para el proceso de desinfección se usa agentes desinfectantes como el hipoclorito de sodio y el alcohol. Este paso es uno de los más importantes en el cultivo *in vitro* debido a que si no se lo realiza bien puede existir contaminación del explante a futuro y causar pérdida total del progreso o el explante no podrá crecer por la proliferación de microorganismos que existe (SIGMA-ALDRICH, 2017).

Estadio 1. Iniciación de cultivo

Esta etapa depende principalmente del tamaño de explantes, estado de desarrollo, estado fisiológico y la edad de la planta madre. El medio de cultivo se formula dependiendo del tipo de explante y el objetivo del cultivo. Para la iniciación de un cultivo generalmente se usa un medio basal, en muchos casos se usa el medio Murashige y Skoog.

Para la mayoría de cultivos *in vitro* se utilizan hojas y yemas, aunque existen casos donde se usa inflorescencias o endospermo. En esta etapa también se verifica si el proceso de desinfección del estadio 0 fue exitoso, a partir del tercer día ya se puede observar crecimiento microbiano.

Estadio 2. Multiplicación

La etapa de multiplicación se lo realiza con el fin de obtener brotes para posteriores subcultivos. Normalmente para este estadio es necesario subcultivar a un medio con una distinta formulación, óptima para la multiplicación de esta especie. La eficiencia de la multiplicación se ve reflejada en la homogeneidad de los cultivos.

Estadio 3. Inducción de raíz y elongación de las plantas

La elongación o enraizamiento de las plantas se puede realizar *in vitro* o *ex vitro*. *In vitro* los explantes pueden transferirse a un nuevo medio de cultivo separando las plantas individualmente, sembrar todo el grupo de plantas para que la elongación y enraizamiento se haga en conjunto o añadir medio líquido a los recipientes en lugar de trasplantar el explante. Las raíces que se forman *ex vitro* suelen presentar un mayor desarrollo que las formadas *in vitro*, pero no se puede aplicar a todas las especies vegetales.

Estadio 4. Aclimatación

Las plántulas que se obtiene de cultivo *in vitro* son muy sensibles a cambios ambientales, por esta razón se debe adaptar lentamente a la planta para que sobreviva por si misma fuera del recipiente. La aclimatación debe ser progresiva por lo cual es conveniente contar con instalaciones que brinden la temperatura, luz y humedad relativa que se ajusten progresivamente a las condiciones encontradas en invernaderos o en el campo (Alonso, 2002).

2.8.1.2 Factores que afectan los cultivos *in vitro*

Los cultivos *in vitro* son muy susceptibles a cambios en las condiciones. El éxito del cultivo depende de la formulación del medio, las condiciones del cultivo y el material vegetal del cual se extrae el explante. Los medios de cultivo están compuestos de nutrientes como minerales, vitaminas, carbohidratos, reguladores de crecimiento y un agente gelificante (en cultivos semi-sólidos). Cada componente del medio debe ser seleccionado y medido adecuadamente debido a que juegan un gran papel en el desarrollo del cultivo, la escases o exceso de alguno de estos componentes puede determinar el éxito del cultivo (Weldt, 2008).

Dentro de los factores físicos que afectan el cultivo esta la luz, la temperatura, el pH, la humedad relativa (HR) y las concentraciones de CO₂ y O₂. Las condiciones de luz y temperatura generalmente se eligen de acuerdo a las condiciones de los cultivos *in vivo*. La humedad relativa es normalmente alta en cultivos *in vitro* debido a la condensación que se forma en las paredes del

recipiente, la HR dentro del área de almacenamiento influye la contaminación, a una mayor HR en el área de almacenamiento los cultivos son más susceptibles a contaminación (Alonso, 2002).

2.8.2. Cultivo de callos

Se denomina a la formación de una masa de células no diferenciadas (callos), los cuales al iniciar a diferenciarse puede posibilitar una organogénesis o embriogénesis indirecta (Ortega, 2013, p. 13) Esta masa de células puede presentar distintas morfologías. Algunas son compactas y duras mientras otras forman tejidos friables con espacios intracelulares. (Figura 8)

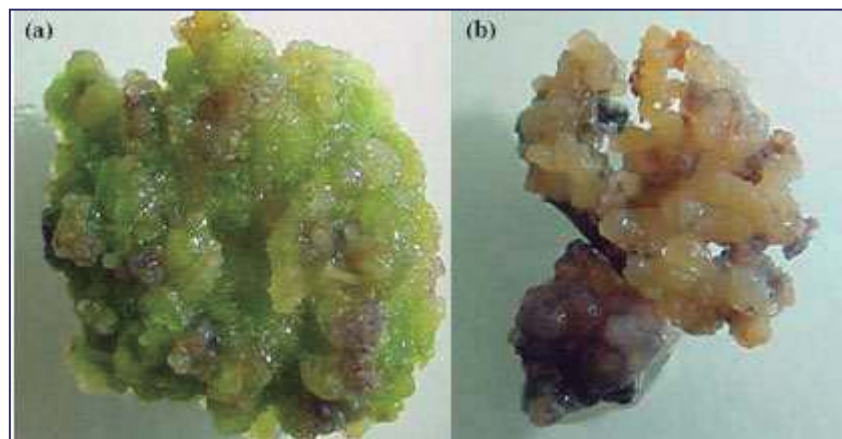


Figura 8: Callos de Melaleuca alternifolia.

Tomado de: Ling, Hong, y Hussein, 2007.

(a) callo en medio MS con 2,4-D y kinetina.

(b) callo en medio MS con 2,4-D.

El crecimiento de callo posee distintas fases, la fase de reposo, la exponencial, lineal, disminución progresiva y estacionaria. En la fase de reposo el explante se adapta al medio de cultivo y no muestra división celular. En la fase exponencial la velocidad de división aumenta gradualmente y llega a un punto donde su crecimiento se ve estancado esta es la fase lineal. En la fase de disminución progresiva la velocidad de división disminuye hasta que se terminan los nutrientes y llega a la fase estacionaria. En esta fase se ha

alcanzado la máxima densidad celular pero el cultivo aun es viable (Torres F, 2011, p. 31).

2.8.2.1. Establecimiento

Generalmente para iniciar un cultivo de callos, se parte de un explante de la especie vegetal deseada, es preferible que el tejido no sea maduro para que el cultivo inicie a partir de células “jóvenes”. Los cultivos de callos deben ser subcultivado periódicamente, la frecuencia de subcultivo depende de la velocidad de crecimiento celular (Moscatiello, Baldan, y Navazio, 2013, p. 76).

Para poder establecer un cultivo viable es necesario tener en cuenta tres factores; la obtención de explantes axénicos, el medio de cultivo, las condiciones ambientales, y el tipo de callo a utilizar.

Los explantes que se usan para cualquier tipo de cultivo *in vitro* deben ser descontaminados para tener explantes y cultivos libres de microorganismos. Además, es necesario estandarizar los protocolos de desinfección para obtener cultivos sin oxidación o con un porcentaje bajo de oxidación (Pérez, 2008, p. 54).

El medio que más se utiliza para cultivos *in vitro* es el medio Murashige y Skoog (MS), se compone principalmente de sacarosa, macro y micronutrientes y agar, se puede adicionar bioreguladores para la división y crecimiento óptimo de las células. Los bioreguladores que se adicionan para los cultivos celulares son auxinas y citoquininas, además se pueden adicionar agentes antioxidantes como polivinil piridona (PVP) o ácido absicico (Pérez, 2008, p. 56).

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Esta investigación está compuesta de 2 etapas principales: La desinfección de explante de *Lupinus mutabilis* obtenidas en campo y establecimiento del cultivo; y la inducción a callogénesis. En la etapa de desinfección se

implementará un diseño experimental completamente al azar (DCA) que consistió en 6 tratamientos: 3 tratamientos con la desinfección directa de la semilla y 3 tratamientos con la desinfección a nivel de vaina. La variable independiente evaluada en este paso fue la concentración de coloro comercial (Clorox) (5%, 6%, 7%) al que son sometidas las muestras vegetales. (Tabla 7). A partir de ello, se evaluará el porcentaje de contaminación y necrosamiento por tratamiento como variables dependientes. Se tomarán los datos en el día 7 y el día 15 a partir de la siembra.

Tabla 7:

Porcentaje de Cloro comercial aplicado para la desinfección de vainas de L. mutabilis.

Tratamiento	Tejido	Hipoclorito de sodio (%)
1	Vaina	5
2	Vaina	6
3	Vaina	7
4	Semilla	5
5	Semilla	6
6	Semilla	7

Para la inducción a callogénesis, se implementará un diseño experimental completamente al azar (DCA). Como variable dependiente se estableció el peso del callo a los 15, 30 y 45 días después de sembrados, y como variables independientes se evaluaron el tipo de citoquinina (6-BAP y kinetina), tipo de auxina (ANA y 2,4-D) y tipo de agente antioxidante (carbón activado y PVP) (Tabla 8). La temperatura al igual que el pH se mantiene constante, 22C y 5.6-5.8. En este experimento, se evaluará el color del callo como una variable cualitativa, pues el color es un indicativo del grado de oxidación del callo obtenido.

Tabla 8:

Formulación de medios de cultivo para inducción a callogénesis.

	Medio Basal		Auxina (mg/L)		Citoquinina (mg/L)		Antioxidante (g/L)	
	MS	GD	ANA	2, 4-D	6-BAP	Kinetina	C. activado	PVP
M1	+	-	1.5	-	0.5	-	10	-
M2	+	-	-	1.5	-	0.5	10	-
M3	-	+	-	1.5	-	-	-	10

Una vez obtenidos los resultados de todos los tratamientos en todas las etapas, se realizará un Análisis de varianza (ANOVA) Para determinar las variables independientes significativas e influyentes en la formulación de medios y crecimiento de callos. Adicionalmente, se realizarán pruebas de contraste de Duncan para destacar los mejores tratamientos.

En la figura 9 se detalla un diagrama de bloques de las principales actividades realizadas.

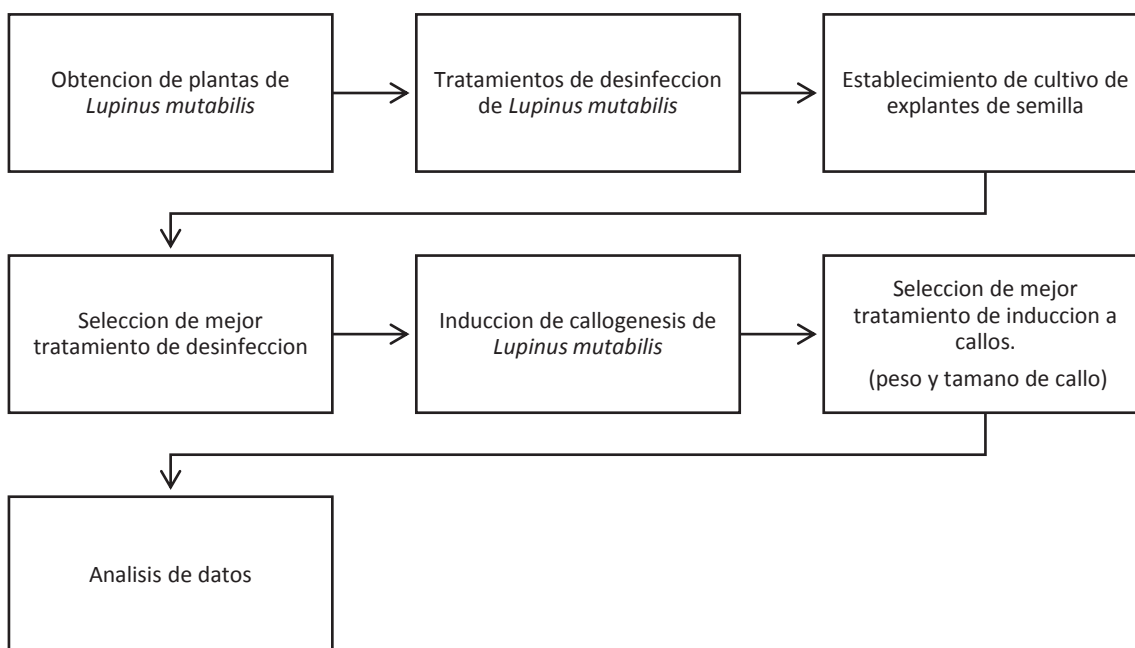


Figura 9: Diagrama de bloques de inducción a calogénesis de *Lupinus mutabilis*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Para el desarrollo de esta investigación, se emplearon vainas de *L. mutabilis*. Las vainas fueron obtenidas de la parroquia San Bartolomé de Pinillo en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador. Las muestras se obtuvieron a partir de un único individuo cultivado de aproximadamente 1.30 metros de alto. Las vainas poseían de 4 a 6 semillas. Ambato se encuentra a 2577 metros sobre el nivel del mar y la temperatura ambiental oscila entre 7 y 22 grados centígrados. Las ramas recolectadas se mantuvieron en agua destilada por un tiempo máximo de 48 horas.

4.2 Establecimiento

4.2.1 Desinfección

Las vainas recolectadas en el campo fueron llevadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal (LQ3) de la Universidad de las Américas, donde se realizó la desinfección.

Las vainas fueron lavadas con un detergente líquido por 10 minutos y sumergidas en una solución de alcohol al 70% por 30 segundos. Posteriormente se sumergieron las vainas en distintas concentraciones de hipoclorito de sodio (Tabla 7, Diseño Experimental). Una vez realizada la desinfección con Cloro comercial las vainas son lavadas 3 veces con agua destilada.

4.2.2 Obtención de explantes

Las vainas de chocho desinfectadas se cortaron dentro de la cámara de flujo laminar para obtener las semillas. A partir de este paso, se procedió de igual manera con la semilla desinfectada. Se retiró el tegumento de la semilla y la

radícula, El cotiledón restante se usó como explante. Los explantes obtenidos se colocaron en el medio de establecimiento, la cual se realizó en medios de cultivo MS basales (medios sin bioreguladores). Se cubrió la caja con plástico de laboratorio (*parafilm*) y se almacenaron las cajas en el área de desarrollo a 22°C. La obtención de datos se realizó en los días 7 y 15, donde se evaluó el porcentaje de contaminación y necrosamiento (Laboratorio de Biotecnología Vegetal, 2016)

El porcentaje de contaminación se evaluó mediante la ecuación 1, de la misma manera se evaluó el porcentaje de contaminación fúngica y bacteriana (ecuaciones 2 y 3).

$$\frac{\# \text{ explantes contaminados}}{\# \text{ explantes totales}} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\frac{\# \text{ explantes con contaminación fúngica}}{\# \text{ explantes totales}} * 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\frac{\# \text{ explantes con contaminación bacteriana}}{\# \text{ explantes totales}} * 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

El porcentaje de necrosamiento se calculó luego de desechar los explantes contaminados y se evaluó mediante el uso de la ecuación 4.

$$\frac{\# \text{ explantes necrosados}}{\# \text{ explantes sobrevivientes no contaminados}} * 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

4. 4 Inducción de callogénesis

4.4.1 Preparación de medios de cultivo

Como se puede observar en la Tabla 8 (ver Diseño Experimental), se prepararon tres medios de cultivo con variaciones en la formulación de bioreguladores y agentes antioxidantes.

Las formulaciones de medio de cultivo se basaron en investigaciones de inducción a callogénesis en especies del género *Lupinus*, un estudio realizado en la Universidad de Reading (Reino Unido) utilizó antioxidantes como PVP y carbón activado con mezclas distintas de bioreguladores para establecer como estos afectan la formación de callos de distintos tejidos de *Lupinus mutabilis* (Phloplonker y Caligari, 1993, p. 430). Otro estudio realizado por Bonifaz y colaboradores en Perú estudiaron la formación de callos de *Lupinus mutabilis* a partir de hipocótilo, peciolo y foliolo, usando un medio formulado solamente con un bioregulador, 2,4-D (Bonifaz et al., 2014, p. 19). La formulación de los medios se fueron modificaciones de los establecidos en estos estudios. Los medios de cultivos se prepararon según los volúmenes necesarios para cada siembra. En cada medio se colocó 30 g/L de sacarosa y se ajustó el pH en un rango de 5.6 – 5.8. Se colocó una concentración 8 g/L de Agar (Bacto agar, BD, Estados Unidos) en cada medio y se disolvió sobre una plancha de calentamiento a una temperatura promedio de 200°C. Se autoclavaron los medios a una temperatura de 121°C por 15 minutos a 15 psi de presión. Los medios se dispensaron dentro de una cámara de flujo en cajas Petri y se etiquetaron con la nomenclatura del medio correspondiente.

4.4.2. Siembra de explantes para callogénesis

Los explantes fueron extraídos del medio de establecimiento para colocarlos en los medios de callogénesis. Las cajas se cubrieron con papel aluminio para obtener total oscuridad para el crecimiento de callos y se colocaron dentro de una incubadora a 22°C. Los datos de peso se recolectaron a los 15, 30 y 45 días de inducción.

4.5 Análisis de datos

Para ambas etapas de esta investigación se realizaron análisis de determinación de normalidad, Shapiro-Wilk usando el programa estadístico SPSS. Posterior a ello, se realizó un análisis de varianzas ANOVA y una prueba de Duncan usando un alfa < 0.05 .

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Desinfección de explantes y establecimiento

5.1.1 Porcentaje de contaminación

Las cajas Petri con explantes se evaluaron mediante observación para determinación la presencia de contaminación ya sea bacteriana o fúngica (Figura 10). En la figura 11 se puede observar los porcentajes de contaminación bacteriana y fúngica a los 15 días. Todos los tratamientos de desinfección presentaron índices de contaminación, siendo la contaminación bacteriana la dominante en todos los tratamientos. Se pudo apreciar que el tratamiento 6 presentó solamente un 2.7% de contaminación fúngica presentándose a los 15 días. Sin embargo, la contaminación bacteriana fue alta en la mayoría de los tratamientos siendo el tratamiento 6, con un porcentaje del 27.77% el que menor índice mostró. Además, se pudo evidenciar que los tratamientos con 6% de hipoclorito de sodio ya sea en la vaina cerrada o en la semilla presentaron una menor contaminación dentro de su grupo. El tratamiento 1 es el que obtuvo el mayor porcentaje de contaminación bacteriana en las tres réplicas. Esto podría indicar que el usar hipoclorito de sodio al 5% en un tejido como la vaina, es inefectivo al momento de eliminar impurezas y contaminantes. El tratamiento 2 tuvo baja eficiencia en la eliminación de contaminantes ya que en los primeros siete días de evaluación

más de la mitad de los explantes mostraron contaminación bacteriana, y en el día 15 ya se tuvo 61.11% de la misma y un 13.88% de contaminación fúngica. El tratamiento 3 que consistía el aplicar la mayor concentración de hipoclorito de sodio redujo la contaminación en comparación con los dos primeros tratamientos, pero aun así el porcentaje no era el deseado para un protocolo de desinfección adecuado. Los tratamientos 4, 5 y 6 son los que fueron aplicados a la semilla de *Lupinus mutabilis*. En general estos tratamientos obtuvieron un menor porcentaje de contaminación que los tratamientos 1, 2 y 3. Esto se debe a que el tratamiento de desinfección fue aplicado directamente sobre el tejido con el que se va a trabajar. El tratamiento 4 es uno de los tratamientos con un índice alto de contaminación fúngica (11.11%), sin embargo, la contaminación bacteriana fue mínima (38.88%) en comparación con el tratamiento 5 en el cual se obtuvo 50% de contaminación bacteriana. Este porcentaje es mayor que el tratamiento 4 en el cual se aplica una menor concentración de hipoclorito de sodio.

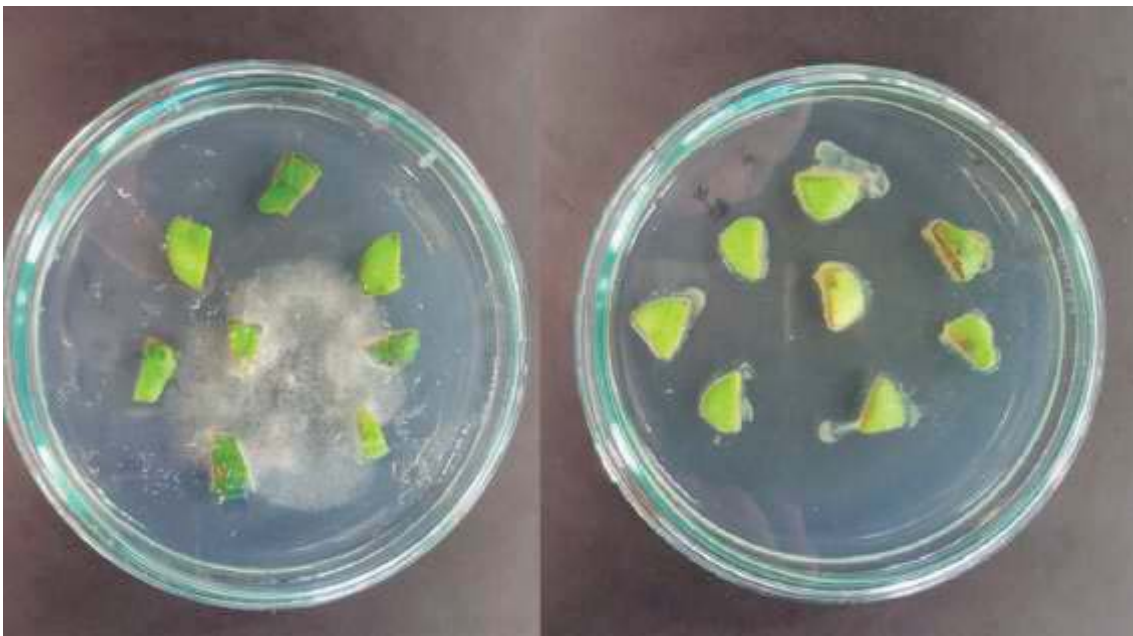


Figura 10: Izquierda: Contaminación fúngica en explantes de cotiledón de *Lupinus mutabilis*. Derecha: Contaminación bacteriana.

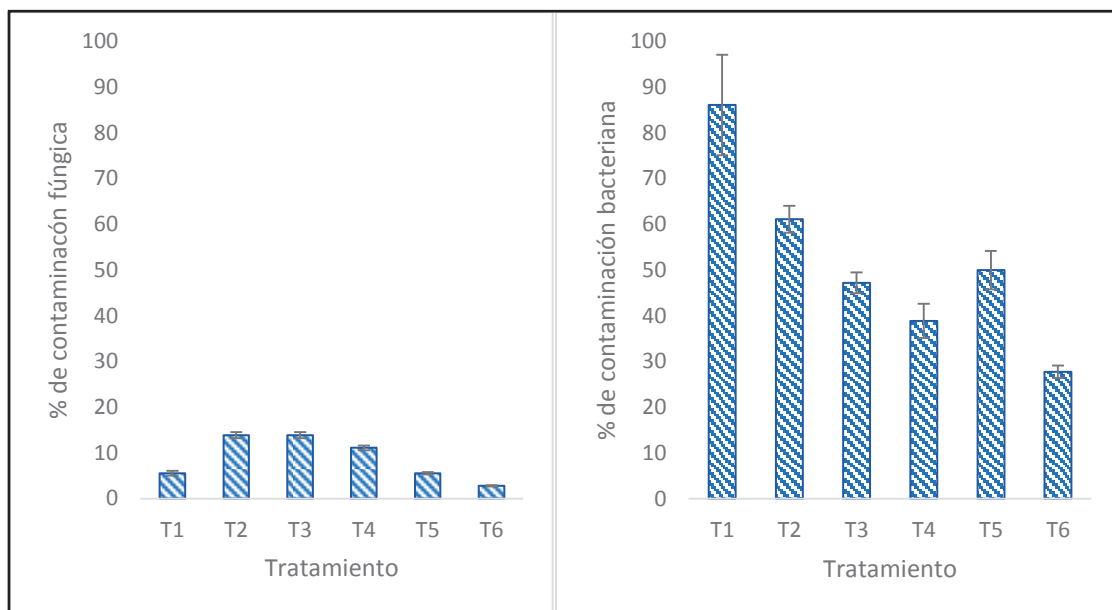


Figura 11: Porcentajes de contaminación a los 15 días de aplicados los tratamientos de desinfección.

Derecha: Bacteriana.

Izquierda: Fúngica.

En cuanto a la contaminación global (Figura 12), se pudo determinar que el tratamiento 6 es el que menor índice de contaminación reportó, ya que presentó un 30.55% de explantos contaminados. Los tratamientos 1, 2 y 3 siguen la tendencia de disminuir el porcentaje de contaminación con el aumento de concentración de hipoclorito de sodio siendo el tratamiento 1 el que demuestra el mayor porcentaje de contaminación global (91.66%) y el tratamiento 3 el menor de ese grupo de tratamientos (61.11%). Con respecto a los tratamientos 4, 5 y 6 la contaminación no sigue la tendencia de disminuir. El tratamiento 5 muestra un porcentaje alto (55.55%) en relación a los tratamientos 4 y 6.

El análisis de varianza ANOVA de un factor demostró que existe una diferencia entre los tratamientos dado que el valor F crítico es mucho menor al valor F ($3.10 \leq 28.68$). Esto indica que las concentraciones de hipoclorito de sodio afectan directamente el porcentaje de contaminación de los explantos. De igual manera en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk se evidenció que los datos siguen una distribución de normalidad. El análisis estadístico de Duncan indicó

que entre los tratamientos 4 y 5 no existieron diferencias significativas por lo cual las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio, aplicados sobre la semilla de chocho no influyen en la contaminación. Tampoco existió diferencia significativa entre estos tratamientos (4 y 5) y el tratamiento 3, esto se debe al cambio de tejido entre vaina y semilla. Esto demuestra que es más factible aplicar la desinfección sobre la semilla de *Lupinus mutabilis* ya que al usar la menor concentración de hipoclorito de sodio se tiene resultados similares comparado con usar la concentración más alta de hipoclorito de sodio sobre la vaina. El análisis también demostró diferencia significativa entre el tratamiento 1,2 y 6 comprobando lo que ya se había observado en los gráficos, la eficiencia del tratamiento 6 al momento de eliminar y reducir contaminantes. Por lo cual se puede inferir que el tratamiento 6 es el mejor para la desinfección de semillas de *Lupinus mutabilis*.

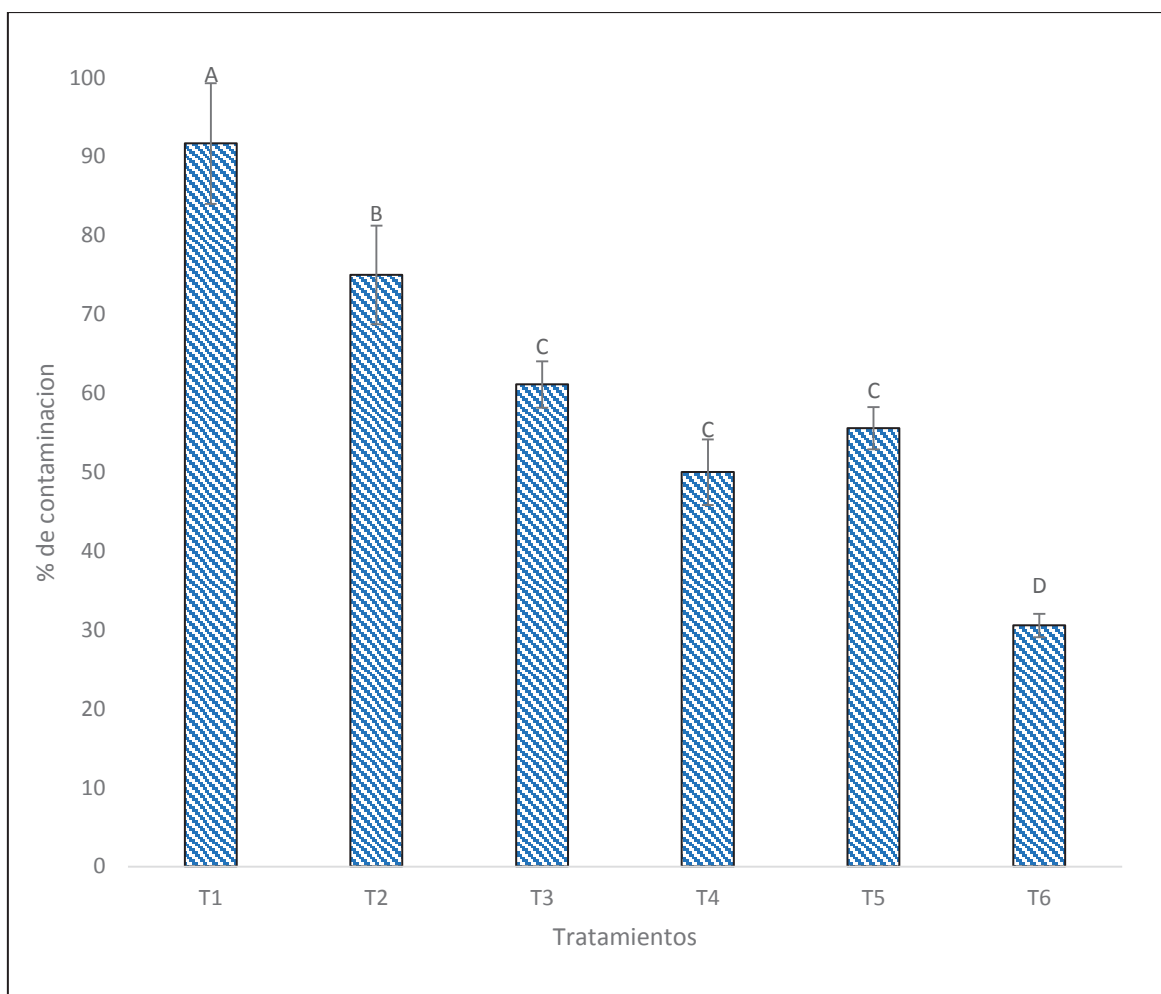


Figura 12: Contaminación global a los 15 días de aplicada de desinfección.

La desinfección del material vegetal es un paso esencial para iniciar un cultivo vegetal *in vitro*. Se han descrito muchos protocolos para la desinfección de ciertos tejidos o de plantas específicas. Todos los protocolos de desinfección usan uno o dos agentes antioxidantes, los más comunes siendo cloruro de mercurio, hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio y etanol (SIGMA-ALDRICH, 2017). Muchas veces se adiciona también un detergente para romper la tensión superficial y permitir un mejor contacto del desinfectante con la superficie vegetal, usualmente se adiciona Tween 20 u 80 para realizar esto. Tween 80, que es el detergente que se usa en esta investigación, actúa reduciendo la unión bacteriana a la superficie vegetal e inhibir la formación de biofilm (Brandl y Huynh, 2014, p. 5040). En una investigación realizada en el Instituto de Química Bioorgánica de Polonia, utilizaron dos agentes desinfectantes para eliminar impurezas de cuatro especies de *Lupino*: etanol al 70% e hipoclorito de sodio en su forma comercial al 1.5% al que se le adiciono Tween 20. En este estudio se obtuvo un 80% de explantes sobrevivientes, los cuales sirvieron para generar raíces y brotes (Pniewski, Kapusta, y Legocki, 2002, p. 419).

En muchas investigaciones se usa hipoclorito de sodio como el agente desinfectante principal. Es así como, en un estudio realizado en Irán en el 2012 donde prueban distintas concentraciones de hipoclorito de sodio (1, 2 y 4%) por 20 minutos y cloruro de mercurio 1% por 10,15,20 y 25 minutos, demostraron que el hipoclorito de sodio a 4% fue un mejor agente esterilizante, ya que se obtuvo en 80 y 90% de explantes sobrevivientes; de igual manera, con este tratamiento se obtuvo un mayor porcentaje de germinación de plantas de *Ziziphus spina*, casi 70% (Ahmadi, Nasr, Jalilvand, y Savadkoohi, 2012, p. 1301).

Como se puede evidenciar en estas investigaciones, el hipoclorito de sodio es el agente desinfectante más usado, normalmente en conjunto con un detergente. A medida que se aumenta la concentración de hipoclorito de sodio el porcentaje de contaminación va decreciendo, es por esto que en el tratamiento 6 y 3 que tienen el mayor porcentaje de hipoclorito de sodio el porcentaje de contaminación es menor a los otros 2 tratamientos de cada grupo (Ahmadi et al., 2012, p. 1301). El hipoclorito de sodio es el desinfectante más

usado debido a su capacidad de eliminar microorganismos, logra esto debido a su capacidad oxidativa, el hipoclorito de sodio oxida moléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos. Esto con lleva a la muerte celular de los microorganismos impidiendo que siga su crecimiento en el medio de cultivo (Yildiz y Er, 2002, p. 259).

Otro factor importante que afecta la eficiencia del proceso de desinfección es el origen del material vegetal. Los porcentajes de contaminación obtenidos son relativamente altos. Esto se debe a que los explantes fueron obtenidos a partir de una planta cultivada en el ambiente, debido a la presencia de microorganismos, del ambiente o patógenos en su superficie o en su interior (Caicedo y Peralta, 2001). Esto fue comprobado por Bonifaz y colaboradores en 2014, cuando utilizaron una solución de 96% de alcohol y 2% de hipoclorito de sodio para desinfectar tejido de *Lupinus mutabilis* con el fin de obtener callos. En los tres tratamientos que realizaron ninguno obtuvo resultados ya sea por contaminación, necrosis o despigmentación. La diferencia de los porcentajes de contaminación en el tipo de tejido sometido a desinfección también tiene una diferencia notable. La vaina a ser un tejido expuesto al medio ambiente es más susceptible a microorganismos, por lo cual los tratamientos realizados sobre la vaina se mostraron poco efectivos. Esto es debido a que las bacterias que son los contaminantes más comunes, y son los más difíciles de eliminar. Estos microorganismos no son detectables a simple vista y algunos resisten a los tratamientos de desinfección, y continúan su crecimiento una vez iniciado el cultivo *in vitro* (Hernández y Gonzales, 2010).

Al presentarse una mayor contaminación bacteriana que fúngica, se puede aseverar que la contaminación bacteriana pudo haberse producido por la presencia de bacterias endógenas y superficiales que no fueron removidas completamente, ya sea por su resistencia a los agentes desinfectantes o porque se encontraban dentro de grietas o lesiones en la superficie donde no llegó el desinfectante. Los géneros de bacterias que afectan mayormente a las plantas de chocho son las *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Kurlovich, 2002, 287).

Las *Pseudomonas* viven como saprofitas y parásitos en la superficie y dentro de las plantas. Pueden ayudar al crecimiento de la planta, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos, aumentando la resistencia a enfermedades y produciendo fitohormonas para promover el crecimiento. a su vez, también existen subespecies de *Pseudomonas* que viven como parásitos y causan daños en la planta como necrosis, pudrición e inhibición de crecimiento (Preston, 2004, p. 907). Por otro lado, las *Xanthomonas* causan marchitez y manchas en la superficie de tejidos vegetales y, al igual que *Pseudomonas*, infectan a la planta por heridas y se multiplican dentro y fuera de los tejidos (Boch, y Bonas, 2010, p 420). La presencia de estos microorganismos, beneficiosos o no, dentro de la planta constituye un problema al intentar iniciar un cultivo *in vitro*. Al momento de colocar el explante en el medio de cultivo, la bacteria, en el caso de estar contaminado el explante, empezará a proliferar por la gran cantidad de nutrientes que forman parte del medio. Debido a que un microorganismo tiene un tiempo de duplicación mucho más rápido que el de células vegetales, este le privará de nutrientes e impedirá el desarrollo y crecimiento del explante (Cassells, 2001, p. 353).

La muestra vegetal puede tener un gran número de contaminantes que no se removieron completamente con la desinfección, pero también existe el riesgo de contaminación por el ambiente en el que se encuentre el cultivo. Según un estudio realizado en Nigeria se encontraron 18 tipos de microorganismos en asociados a un laboratorio de cultivo de tejidos, 11 de los cuales eran bacterias y 8 hongos. Ente las bacterias que identificaron se encontraba *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*, y en el grupo de los hongos se encontraba *Aspergillus niger*, *Cladosporium sp.*, y *Fusarium oxysporum*. Estos y otros microrganismos se aislaron de todas las superficies de los laboratorios, del aire, los cultivos de plantas y de la piel humana. (Odutayo, Amusa, Okutade, y Ogunsanwo, 2007, p. 77). Esta investigación demuestra que la contaminación en los cultivos de tejidos no se debe solamente a los microorganismos endógenos o superficiales de planta, sino también por mala manipulación del investigador o por mala desinfección del área de trabajo y los utensilios a usar.

5.1.2 Porcentaje de necrosamiento y viabilidad

Para la variable necrosamiento se evaluó la mortalidad de los explantes con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio. Visualmente el tratamiento 1 obtuvo 0% de necrosamiento, esto se debe a que existió solamente un explante sobreviviente de la desinfección y este no se necrosó. Los tratamientos que presentaron el menor porcentaje de necrosamiento son los tratamientos 2 y 4 con 11.11% y el mayor porcentaje se presentó en los tratamientos 3 y 6 con 19.44% de necrosamiento. La comparación de los tratamientos se puede observar en la figura 13 y 14.

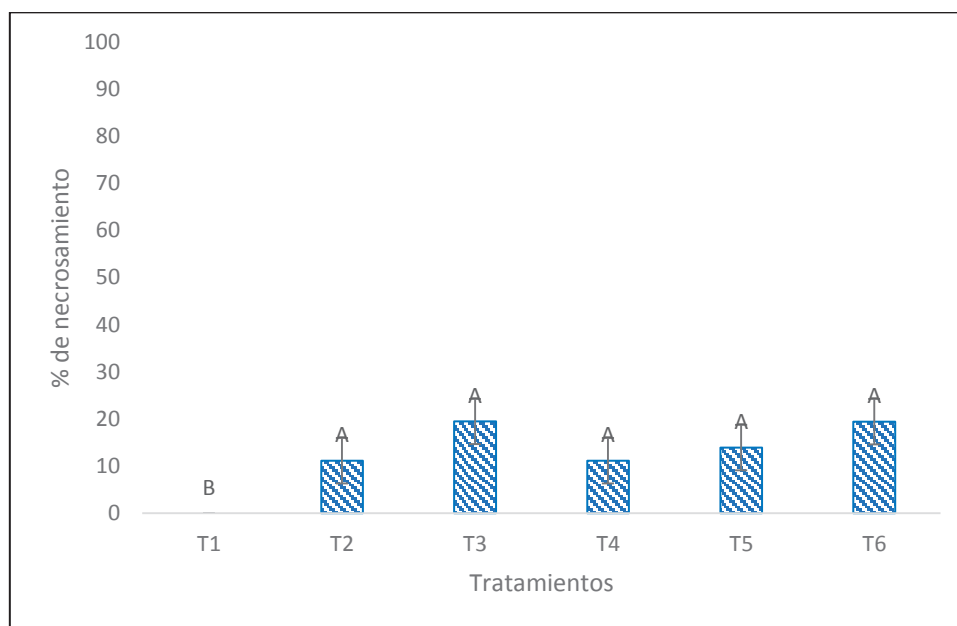


Figura 13: Porcentajes de necrosamiento de los tratamientos de desinfección.



Figura 14: Necrosamiento y oscurecimiento del medio de cultivo.

El ANOVA realizado demuestra que los datos poseen diferencias significativas debido a que el valor F crítico es menor al F ($3.10 \leq 8.03$). Como se puede observar los valores no son muy distante lo cual explica los resultados de la prueba de Duncan. El análisis de Duncan demuestra que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 13), pero como se mencionó anteriormente, los tratamientos 2 y 4 reportaron ser los mejores para evitar el necrosamiento. El tratamiento 5 es el siguiente tratamiento con menor porcentaje de necrosamiento (13.88%). Por último, están los tratamientos 3 y 6 con los mayores porcentajes de necrosamiento. Debido a lo observado en los análisis estadísticos, la concentración de hipoclorito de sodio no influye en la muerte de los explantes, por lo que los porcentajes de necrosamiento son similares entre tratamientos. El análisis Shapiro-Wilk demostró una distribución normal entre los tratamientos para necrosamiento.

Con respecto a la viabilidad de los explantes se tomó en cuenta la contaminación total y el necrosamiento producido en los explantes. Estos datos se evaluaron con respecto a los tratamientos de desinfección (concentración de hipoclorito de sodio). Se determinó que el tratamiento T6 es el que más explantes viables proporcionó, con un 38.88% de viabilidad (ver figura 15 y 16).

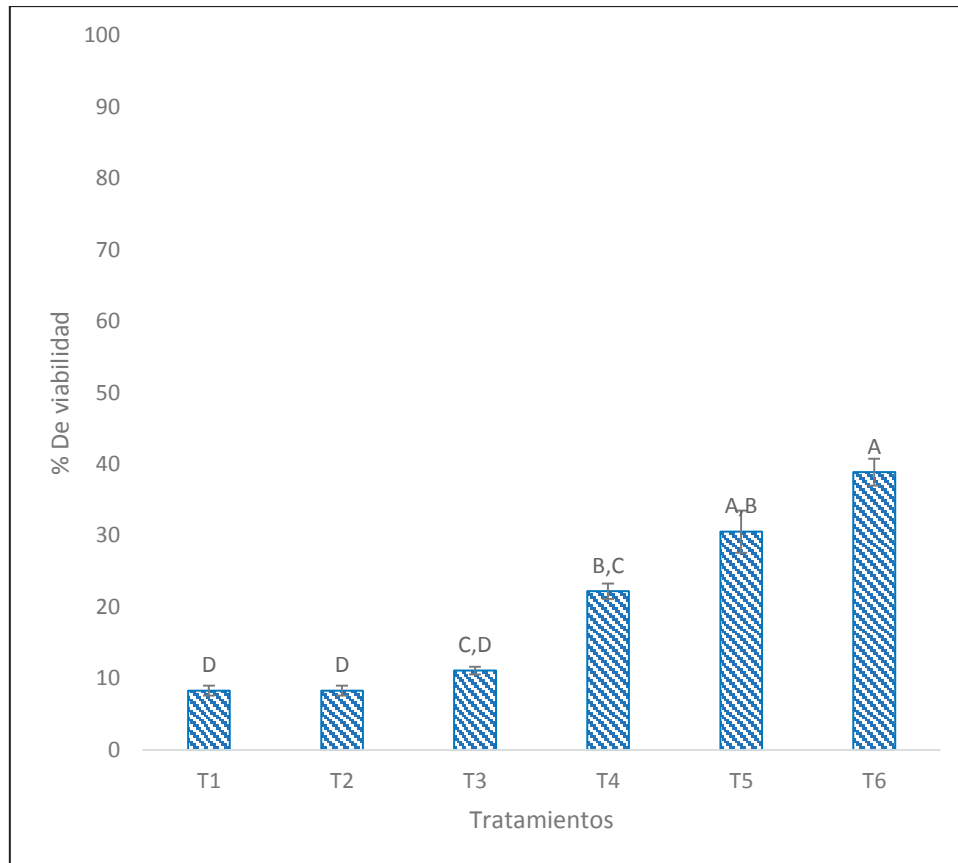


Figura 15: Porcentajes de viabilidad de los tratamientos de desinfección de chocho.

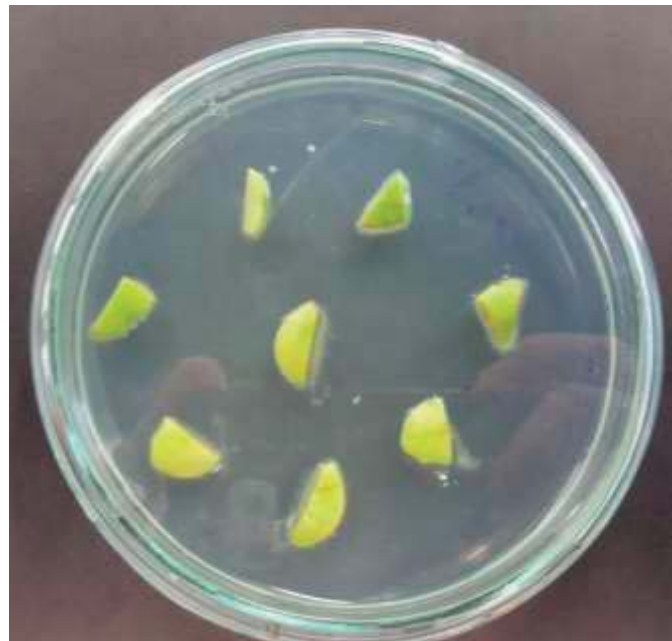


Figura 16: Explantes de *Lupinus mutabilis* viables.

En el análisis ANOVA se tiene un F crítico menor al F ($3.10 \leq 9.91$). Conociendo estos datos se concluye que existe diferencia significativa entre los tratamientos. La prueba de Duncan determinó que entre el tratamiento 1 y 2 no existieron diferencias significativas; y son los tratamientos con menor porcentaje de viabilidad. El tratamiento 5 es significativamente mayor que el 1, 2 y 3 con 30.55% de viabilidad. Estos datos permiten identificar al tratamiento 6 como el más eficiente en la desinfección de *Lupinus mutabilis*. El tratamiento 6 fue aplicado directamente a las semillas y consiste en sumergir las semillas en hipoclorito de sodio 7%. Este tratamiento fue el indicado para reducir el porcentaje de contaminación. A pesar de ser el tratamiento con un alto porcentaje de necrosamiento, se obtuvo el mayor número de explantes sobrevivientes. La prueba de Shapiro-Wilk demuestra que los datos de los tratamientos para viabilidad poseen una distribución normal.

Aunque el hipoclorito de sodio no sea significativamente influyente, si es un factor que afecta directamente al necrosamiento de los tejidos. Esto fue demostrado por Wegayehu, Firew y Belayneh (2015, p. 658) donde evaluaron 3 distintas concentraciones de hipoclorito de sodio (0.15, 0.25 y 0.5%), variando los tiempos (10, 15 y 20 minutos) para la desinfección de yemas de *Prunus persica* (durazno). Determinaron que a medida que aumentaba el tiempo de inmersión, la contaminación se reducía, al igual que al aumento de concentración de hipoclorito de sodio. A pesar de la reducción de contaminantes, al aumentar la concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión existía menor porcentaje de sobrevivencia de los explantes (Wegayehu *et al.*, 2015, p. 658). Ellos tomaron en cuenta la concentración de hipoclorito de sodio en el cloro comercial que es aproximadamente 5%, lo opuesto a lo que se realizó en esta investigación donde se variaron las concentraciones de cloro comercial (Clorox). Esto puede explicar por qué existió un alto índice de contaminación y relativamente bajo índice de necrosamiento, pues las concentraciones de hipoclorito de sodio utilizadas fueron bajas (0.35, 0.30 y 0.25%). En los tratamientos evaluados por Wegayehu y colaboradores, el menor porcentaje de necrosamiento se obtuvo en 0.15% de hipoclorito de sodio lo cual coincide con el tratamiento 1, pero a su

vez el porcentaje de contaminación fue el mayor de todos los tratamientos. Lo mismo se puede observar con el mayor porcentaje de necrosamiento que se obtuvo cuando se usó 0.5% de hipoclorito de sodio y en los tratamientos 3 y 6 donde se usó 0.3%.

El hipoclorito de sodio y cualquier otro agente desinfectante actúa como un agente fitotóxico sobre el explante en altas concentraciones. Una vez realizada la desinfección y colocado el explante sobre el medio de cultivo se puede empezar a evidenciar oscurecimiento alrededor del explante. Esto es causado por el estrés oxidativo que sufren las células del explante. Este estrés es causado por el incremento en la generación de radicales libres. Estos compuestos tienen la capacidad de oxidar compuestos celulares hasta el punto de causar la muerte celular (Azofeifa, 2009, p. 154). La oxidación y oscurecimiento del medio también es causado por compuestos fenólicos que se liberan al medio de cultivo. Estos inhiben la actividad celular e impiden el crecimiento del explante (Abdelwahd, Hakam, Labhilili, y Udupa, 2008, p. 999). Los compuestos fenólicos no son los únicos que causan inhibición de crecimiento; también puede existir oxidación proteica y actividad de enzimas peroxidasas que causan oxidación en presencia de peróxido. Todos estos compuestos y reacciones son liberados durante las fases de corte de explantes, desinfección y cultivo de explantes (Titov, Bhowmik, Mandal, Alam, y Uddin, 2006, p. 98).

Existe también la posibilidad de que el porcentaje de viabilidad y necrosis este definido por el tipo de tejido que se propaga. Por ejemplo, un estudio realizado en Polonia experimentó con la obtención de callos a partir de distintos tejidos de *Lupinus angustifolius*, *Lupinus polyphyllus* y *Lupinus hartwegii*. Probaron con tejidos de hipocótilo, ejes embrionarios, hojas, cotiledón y raíz. El mayor porcentaje de callogénesis se obtuvo a partir del hipocótilo, donde el 100% de explantes produjo callos. Sin embargo, cuando se indujo callogénesis en cotiledón se obtuvo un máximo de 15% de callogénesis y el resto de explantes no crecieron. Esto indica una menor susceptibilidad a producir callos a partir de cotiledón y la implicación de muerte celular en los tejidos y explantes que no lograron crecer (Sroga, 1987, p. 246).

Conociendo la disponibilidad que el cotiledón tiene a sufrir de necrosis es necesario tener una razón para la elección de este tejido para iniciar el cultivo de callos. El cotiledón, que conforma la mayor parte de la semilla, tiene un porcentaje alto de proteínas (40 a 45%). Es la parte de la planta de *Lupinus* que posee mayor cantidad de proteínas en comparación a las hojas y el tallo que poseen aproximadamente 25%. También posee más ácidos grasos (35 a 45%) en comparación a las hojas y tallo (0.1 a 2 %) (Pérez, Lagunes, López, Aranda y Ramos, 2015). Es por esta razón que se eligió el cotiledón como el tejido indicado para iniciar un cultivo de callos. El establecimiento de un cultivo de callos viable inducido a partir de cotiledón puede tener aplicaciones a futuro para la producción y extracción de proteínas ya se directamente de los callos o a partir de una suspensión celular.

5.2 Inducción a callogénesis

5.2.1 Crecimiento de callo

El crecimiento y formación de callo se determinó visualmente y mediante el incremento del peso del explante a los 15, 30 y 45 días de sembrado, en la figura 17 se pudo observar la formación de callos en cada medio de cultivo. En la figura 18 se puede observar los gráficos de crecimiento de callos a los días 15 y 30. La diferencia de pesos entre tratamientos muestra una clara superioridad de tratamiento 1 sobre los demás. En el día 15 se observó un incremento de la masa celular hasta los 93.75 mg, seguido por el tratamiento 2 que aumentó hasta los 80.75 mg y por último el tratamiento 3 con un peso final de 10.5 mg. En los datos tomados del crecimiento en el día 30 se observó la misma tendencia de los datos, siendo el tratamiento 1 el que obtuvo el mayor incremento (62.25 mg), el tratamiento 2 tuvo 38 mg y el tratamiento 3 que mostro un incremento mínimo de 4 mg.



Figura 17: Callos posterior a subcultivo.

- a) tratamiento 1.
- b) tratamiento 2.
- c) tratamiento 3.

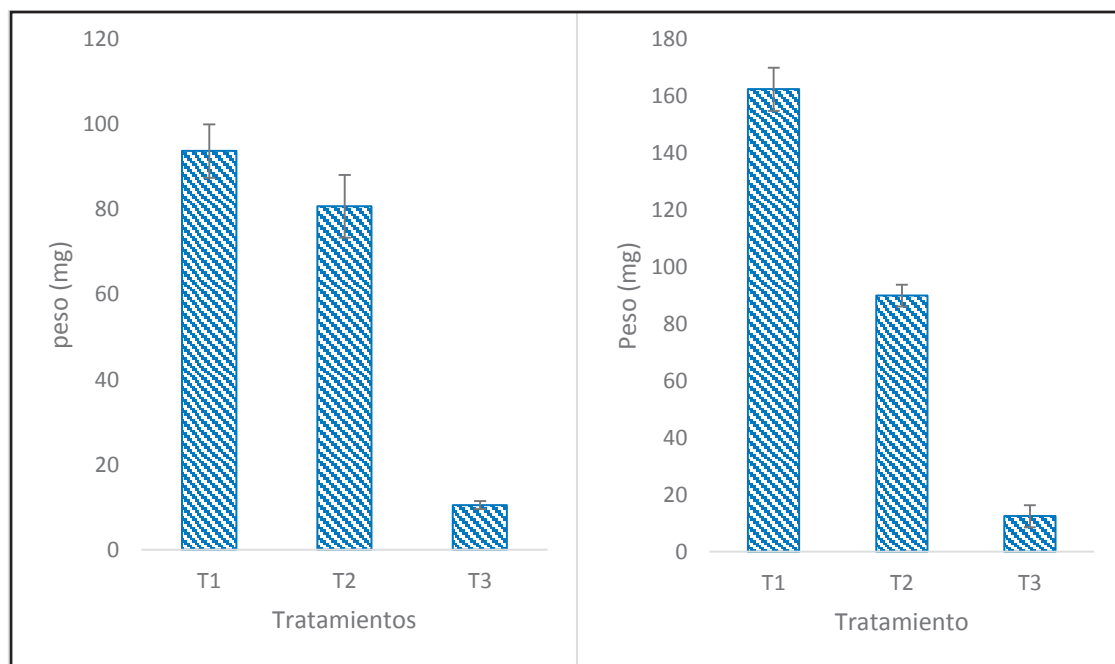


Figura 18: Crecimiento de callos a los días 15 y 30 en mg.

Una vez evaluado el crecimiento en el día 45, se pudo observar que, en efecto el tratamiento 1 fue el mejor estadísticamente como lo demuestra la prueba de Duncan en la figura 19, y también fue el tratamiento que demostró mejores resultados visualmente. Se obtuvo una masa total de 219.5 mg en el tratamiento 1, seguido del tratamiento 2 donde se obtuvo una masa final de 148.25 mg; y el tratamiento 3 en donde se no se observó un incremento

marcado de la masa del callo, siendo su masa final de 20.5 mg. El crecimiento de callos se puede observar en la figura 19.

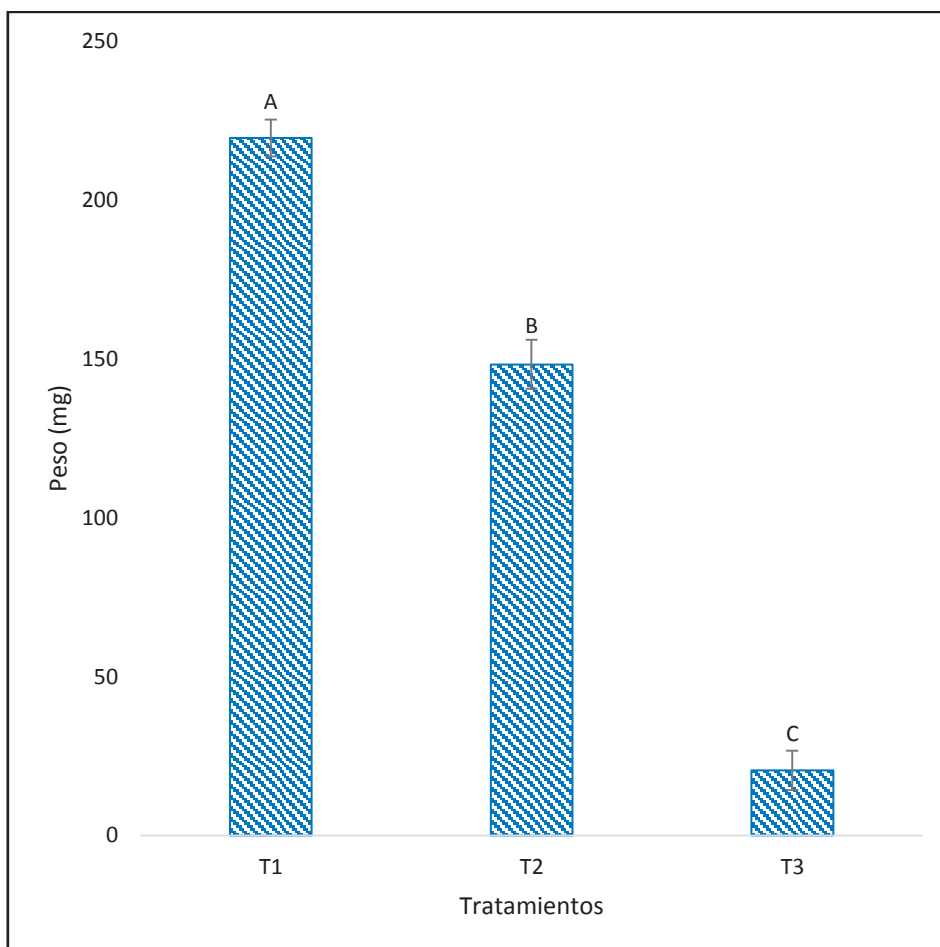


Figura 19: Formación de callos en el día 45.

En la figura 19 se puede observar la diferencia entre tratamientos. El análisis estadístico ANOVA reportó la presencia de diferencias significativas entre los tratamientos a nivel de masa de callo obteniendo un F crítico mucho menor al valor F ($4.25 \leq 927.13$). En la prueba de contraste de medias de Duncan indicó que tratamiento 1 fue el más óptimo para el crecimiento de callos de *Lupinus mutabilis*. Esto debido a la formulación del medio de cultivo, así como las concentraciones adecuadas de citoquininas y auxinas. De la misma manera se realizó en análisis Shapiro-Wilk en el cual se demostró que los tratamientos de formación de callo siguen una distribución normal.

Los medios basales usados (MS o GD) fueron elegidos por su efectividad mencionada en algunas investigaciones, como la realizada es *S. aucuparia* donde se inició un cultivo de embriones con el fin de obtener callos. Se probaron tres medios de cultivo GD, MS y WPM (medio para plantas leñosas). Los mejores resultados se obtuvieron con el medio MS suplementado con bajas concentraciones de auxinas y citoquininas, de los embriones obtenidos, donde se logró inducir la formación de callos, seguido del medio GD (Chalupa, 2012, p. 222). Estos medios de cultivo también son usados en otras investigaciones de formación de callos, como el estudio realizado en Estados Unidos sobre pasto de trigo. Se comprobó la formación de callos en medio MS y GD, suplementado con auxinas y citoquininas; y se obtuvo un mayor porcentaje de callogénesis en el medio MS (88%); de igual manera se tuvo una mayor tasa de formación de brotes a partir del callo (90%), en comparación al medio GD, donde se obtuvo 82% de brotes (Matand, y Acquaah, 2009, p. 223).

Existen también estudios donde aplican solamente el uso del medio GD. Como es la investigación realizada en Reino Unido, donde indujeron la transformación y regeneración de yuca a partir de embriones somáticos. Aseguraron que, al mantener el embrión en medio GD, se obtiene un callo embriogénico friable que es lo ideal para ser transferido a un medio líquido y obtener proliferación de más embriones somáticos (Hillocks, Thresh, y Bellotti, 2002, p. 190). Otra investigación que reporta la efectividad del medio GD es la realizada en India, donde estudian la viabilidad de usar el medio de cultivo GD para la regeneración de distintas variedades de trigo. Usan medio GD suplementado con 2,4-D como el único bioregulador. Obtuvieron éxito en la inducción a callogénesis en la mayoría de variedades usando una concentración de 2 mg/L de 2,4-D; el mayor porcentaje de callos fue de 93%. A pesar de que en investigaciones se ha reportado la efectividad del medio GD, en la presente investigación no concuerda. Posiblemente esto se deba a la baja concentración de sales que posee, pues es la principal diferencia entre los medios MS y GD; el medio MS es más salino, ya que la concentración de macronutrientes es alta y esto ayuda al crecimiento de callos en ciertas plantas (Murashige y Skoog, 1962).

Al ser los explantes provenientes de cotiledones jóvenes necesitan de la mayor cantidad de nutrientes para continuar con su crecimiento y transformarse en una planta adulta. En este caso el objetivo es tener callos para lo cual se necesita formular un medio con la concentración suficiente de nutrientes. Uno de los elementos importantes para el crecimiento del explante es el nitrógeno. El nitrógeno normalmente es fijado mediante la bacteria *Rhizobium* que forma una simbiosis con la raíz. Sin embargo, en el cultivo *in vitro* no existe formación de raíz y el explante necesita una forma de obtener nitrógeno. Es por esta razón que el medio de cultivo deber tener una concentración relativamente alta de nitrógeno, lo cual es proporcionado por el medio basal MS. El potasio también es otro elemento que influye en el crecimiento celular. El potasio tiene un efecto directo a la expansión celular y crecimiento, y también posee la actividad de reducir el efecto caotrópico que ocurre dentro del citoplasma, logra esto rompiendo puentes de hidrogeno entre moléculas de agua y macromoléculas sin interrumpir puentes de hidrogeno que sean de importancia para el crecimiento celular. El potasio cumple un papel muy indispensable dentro de la célula, por lo cual la concentración en el medio de cultivo debe ser la adecuada para el correcto crecimiento y funcionamiento celular. Otro elemento que es importante en las funciones celulares es fósforo. El fósforo es importante para la generación de energía dentro de la célula, también está presente en la síntesis de ácidos nucleicos y metabolismo de azúcares y fosfolípidos. Además, también regula actividad de proteínas. El fósforo al igual que los otros elementos mencionados debe estar en concentraciones adecuadas para abastecer la demanda de las células para un buen crecimiento y formación de callos. Estos elementos se encuentran en concentraciones altas en las sales del medio MS, excepto el fósforo que se encuentra en mayor concentración en el medio GD. A pesar de tener una mayor cantidad de fósforo, los demás nutrientes están en concentraciones bajas, lo cual no es lo óptimo para inducir callogénesis (Maathius y Diatloff, 2013, p. 10).

Existen también estudios que avalan la efectividad del medio MS. Tal como el estudio realizado en Nueva York por T.R Ganapathi y colaboradores, donde establecen la formación de una suspensión celular a partir de células

embriogénicas. Para obtener las células embriogénicas es necesario inducir la callogénesis de los explantes de banano. Los explantes se obtuvieron de yemas de plantas cultivadas en el laboratorio. Ellos probaron dos medios de cultivo, MS y HS (Schenk y Hidebrandt) usando los bioreguladores Kinetina y 2,4-D, o picloram. Obtuvieron mejores resultados en los tratamientos donde se usó MS como el medio basal y kinetina y 2,4-D como bioreguladores, donde el porcentaje de callogénesis que ellos obtuvieron fue de un 42%. En otras investigaciones también reportan los mismos resultados con respecto al medio basal. Es así que en una investigación realizada por Sator (1985, p. 126) estudian la regeneración de brotes de *Lupinus* spp. Para llegar a la regeneración ellos indujeron callogénesis en 3 tejidos distintos (hoja, hipocótilo y raíz) en cuatro especies de lupino diferentes (*L. luteus*, *L. angustifolius*, *L. polyphyllus* y *L. hartwegii*). Ellos usaron las sales de MS con variaciones de auxinas y citoquininas, y en la mayoría de los tratamientos obtuvieron un buen crecimiento de callos.

Esto nos lleva a considerar otro factor importante a la hora de formular medios para callogénesis: El balance auxinas/citoquininas. En el mismo estudio, se varió las concentraciones de auxinas y citoquininas y la combinación de las mismas. Desarrollaron 5 medios de cultivos con combinaciones de 6-BAP (1,5 y 2 mg/L) y ANA (0,2 y 2 mg/L) y también de 2,4-D (2 mg/L) y Kinetina (1,25 y 2 mg/L). Como se mencionó anteriormente todos los tratamientos obtuvieron buenos resultados, pero en general los tratamientos con 6-BAP (1,5 mg/L) y ANA (2 mg/L) mostraron mayor presencia de callos (aproximadamente 37 explantes hipocótilo de 40 sembrados) (Sator, 1985, p. 126). De igual manera, en otro estudio indujeron callogénesis en la leguminosa *Stylosanthes scabra* usando una combinación de 2,4-D con alguna citoquinina, ya sea kinetina o 6-BAP. Demostraron que al usar solamente una auxina como 2,4-D o una citoquinina como Kinetina no fue posible inducir la formación de callos, pero al adicionar 6-BAP, la tasa de transformación aumentó. En todos los medios con 6-BAP hubo una mayor formación de callos que cuando se usó kinetina (Godwin, Gordon, y Cameron, 1987, p. 5). Otra investigación que estudia el efecto de combinación de bioreguladores es la realizada por Phoplonker y

Caligari (1993, p. 430). Evaluaron el efecto de distintas auxinas (picloram, dicamba, 2,4,5-T, ácido fenilacético, ácido p-clorofenilacético, y algunos derivados de ácido indolacético (AIA) en conjunto con la citoquinina Kinetina. En este estudio determinaron que el tipo de bioregulador no tenía influencia sobre la formación de callos, en general, reportan que la mejor formación de callos se obtuvo al usar una concentración baja de auxinas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en tratamiento 3, donde solamente se usó una auxina como bioregulador. De igual manera Godwin y colaboradores demuestran que el uso de una auxina no es suficiente para promover el crecimiento de callos. Es por esto que la combinación de auxinas y citoquininas fue necesaria para tener crecimiento de callos de los explantes de *Lupinus mutabilis*.

5.2.2 Efecto de agente antioxidante en explantes

Se adicionaron dos distintos antioxidantes (carbón activado y PVP) a los medios de callogénesis para prevenir la oxidación y muerte del tejido. La evaluación se realizó de manera cualitativa basándose en una escala propuesta en esta investigación, que muestra el grado de oxidación del callo. (Figura 20). Como se puede observar, el tratamiento 1 fue el tratamiento con menos índice de oxidación con valores entre 2 y 1 según la escala de oxidación. El tratamiento 2 tampoco tuvo mucha oxidación encontrándose en el mismo rango que el tratamiento 1, y por último el tratamiento 3 fue el que tuvo mayor índice de contaminación llegando hasta 5 en la escala.

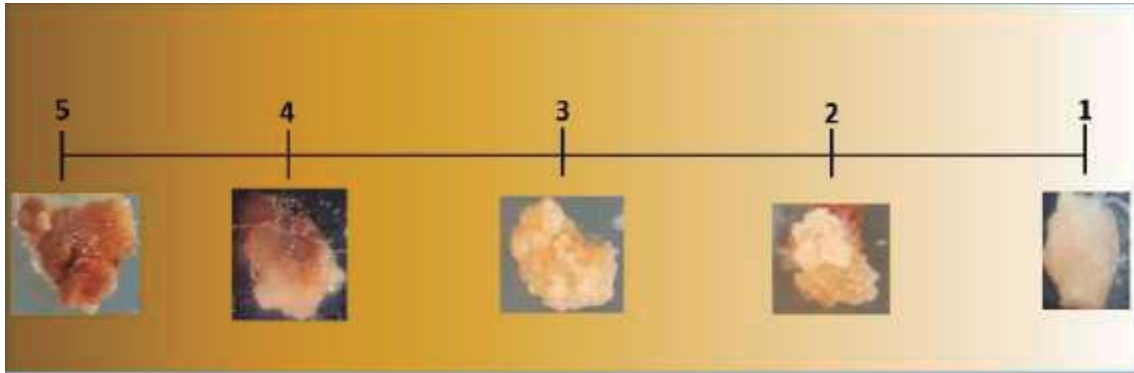


Figura 20: escala de valores de oxidación.

Los agentes antioxidantes que se emplearon presentaron buenos resultados a la hora de reducir el índice de oxidación. Se eligió al carbón activado como un agente antioxidante por propiedad de alta absorción. El carbón activado actúa absorbiendo compuestos inhibitorios en el medio de cultivo y disminuye la concentración de metabolitos tóxicos, como son los compuestos fenólicos que oxidan y oscurecen el medio. El carbón activado también posee una actividad estimuladora, la cual promueve el crecimiento, absorción de vitaminas y bioreguladores (Thomas, 2008, p. 618). El PVP tiene un mecanismo de acción similar al del carbón activado, actúa absorbiendo compuestos fenólicos, los cuales inhiben la actividad de proteínas. También se ha reportado que mejora la estabilidad de enzimas (Sigma, 2017).

El empleo de los agentes antioxidantes se basó en bibliografía que reportó su uso. Es así como un estudio realizado en la Universidad Autónoma de Chapingo en México, evaluaron el nivel de oxidación de explantes de *Lupinus montanus*, experimentaron con dos agentes antioxidantes, carbón activado (100 y 150 mg/L) y ácido cítrico (50 y 100 mg/L). Los experimentos realizados con carbón activado tuvieron un menor porcentaje de necrosamiento (menor a 30%) en los tratamientos. La actividad antioxidante de estos compuestos fue evaluada también sobre distintos tejidos: hipocótilo, cotiledón y epicótilo, siendo en el cotiledón donde existió mayor porcentaje de necrosamiento en relación con los otros tejidos (Ramírez, Rodríguez, Arreola, y Álvarez, 2015, p. 19). Estos resultados concuerdan con la presente investigación, dado que el carbón activado como agente antioxidante fue el mejor para evitar necrosamiento. De

igual manera existe otro estudio realizado por Prajapati y colaboradores donde incluyen carbón activado y PVP en la composición del medio para regeneración de *Curculigo orchioides*. Aseguran que la presencia de carbón activado ayuda a reducir drásticamente la oxidación del medio por compuestos fenólicos, pero que los medio con PVP no mostraron mejor en la inhibición de oxidación (Prajapati, Patel, Mehta, y Subramanian, 2003, p. 74). Esta investigación también aporta sobre el beneficio de colocar carbón activado en el medio de cultivo, siendo este uno de los mejores agentes usados para reducir la oxidación y necrosamiento de los explantes.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Se desarrolló un protocolo eficiente de desinfección de semillas, en el cual se obtuvo 40% de explantes libres de contaminación y necrosamiento. Esto se logró mediante el tratamiento 6 en el cual se aplicó 7% de cloro comercial directamente a semillas de *Lupinus mutabilis*. La concentración de hipoclorito de sodio fue la óptima para la desinfección de semillas debido a que eliminó la mayoría de contaminantes en relación con los otros tratamientos y el porcentaje de necrosamiento fue relativamente bajo.

Debido a la aplicación de sales MS y carbón activado (2 g/L) se logró tener un crecimiento óptimo de callos de *Lupinus mutabilis* con el máximo de crecimiento encontrándose en 219.5 mg en 45 días. El crecimiento de callos con este medio tuvo ventaja sobre los demás debido a que la combinación de auxinas y citoquininas cuyas concentraciones fueron las necesarias para la proliferación celular. Además, el uso del antioxidante, carbón activado, fue favorable para el medio debido a que redujo la oxidación de los explantes y de esta manera pudiesen tener un buen desarrollo.

Se concluye que las auxinas y citoquininas fueron los bioreguladores más influyentes para el desarrollo de callogénesis en *Lupinus mutabilis*, siendo las combinaciones de ANA 1.5 mg/L y 6-BAP 0.5 mg/L las mejores. La combinación de bioreguladores fue necesaria para la proliferación celular ya que al usar solamente un bioregulador (auxina) se tuvo la mínima cantidad de crecimiento.

Se logró inducir callogénesis en explantes de cotiledón de chocho (*Lupinus mutabilis*) mediante el uso de macro y micronutrientes Murashige Skoog (MS), carbón activado, con la adición de los bioreguladores 6-BAP (0.5 mg/L) y ANA (1.5 mg/L).

6.2. Recomendaciones

Para la fase de desinfección se recomienda aplicar una solución de antibióticos para reducir la contaminación bacteriana y también incluir una solución de antioxidantes al proceso de desinfección para que se elimine el factor de necrosamiento.

Para el establecimiento de un cultivo de callos de chocho se recomienda probar más combinaciones de concentraciones entre auxinas y citoquininas para optimizar el crecimiento y también la variación de macro y micronutrientes para conocer que compuestos son influyentes en la formación de callos.

Se recomienda establecer un cultivo de chochos viable, mediante el subcultivo continuo para que de esta manera en el futuro se pueda implementar una suspensión celular a partir de estos callos.

REFERENCIAS

- Aarifa, J., Bhat, K., Bhat, S., Mir, M., Bhat, M., Wani, I., y Rather, J. (2013). *Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for in vitro culture. Academic Journals*, 12(39), 5752. DOI: 10.5897/AJB2013.12918
- Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M., y Udupa, S. (2008). *Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in in vitro plantlet regeneration of faba bean. African Journal of Biotechnology*, 7(8). Recuperado el 20 de junio de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/27798233_Use_of_an_adsorbent_and_antioxidants_to_reduce_the_effects_of_leached_phenolics_in_in_vitro_plantlet_regeneration_of_faba_bean
- Ahmadi, E., Nasr, S., Jalilvand, H., y Savadkoobi, S. (2012). *Contamination control of microbe Ziziphus spina seed in vitro culture. Trees*, 26(4). DOI: 10.1007/s00468-012-0705-8
- Alonso, M. (2002). *Biología Aplicada a Mejora de Pelargonium* (Doctor). Universidad Complutense de Madrid. Recuperado el 25 de junio de 2017 de <http://biblioteca.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26001.pdf>
- Ali, M., Abbasi, B., e Ihsanulhaq. (2013). *Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of Artemisia absinthium L. Industrial Crops and Products*, 49. DOI:10.1016/j.indcrop.2013.05.033
- Aniszewski, T. (2015). *Alkaloids* (1st ed): Elsevier. Recuperado el 12 de junio de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=tQ6dBAAAQBAJ&pg=PA332&dq=Alkaloids+2015&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwiKu6iq0crVAhUBJ>

iYKHR5XAXoQ6AEIKTAB#v=onepage&q=Alkaloids%202015&f=false

- Atchison, G., Nevado, B., Eastwood, R., Contreras-Ortiz, N., Reynel, C., & Madrinan, S. et al. (2016). *Lost crops of the Incas: Origins of domestication of the Andean pulse crop tarwi, Lupinus mutabilis*. *American Journal of Botany*, 103(9). DOI: 10.3732/ajb.1600171
- Arias, J. (2013). *Optimización de Parámetros de Cultivo en Suspensión de Células de la Especie Vegetal Thevetia peruviana y su Efecto en la Producción de Metabolitos Secundarios* (Magister en Ciencias-Biotecnología). Universidad Nacional de Colombia. Recuperado el 15 de junio de 2017 de <http://www.bdigital.unal.edu.co/11584/1/8028288.2014.pdf>
- Australia New Zealand Food Authority. (2001). *Lupin alkaloids in food*. Australia: Technical Report. Recuperado el 3 de junio de 2017 desde https://books.google.com.ec/books/about/Lupin_Alkaloids_in_Food.html?id=B5tuAAAACAAJ&redir_esc=y
- Azofeifa A. (2009). Problemas de contaminación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1). Recuperado el 14 de junio de 2017 de http://www.mag.go.cr/rev_mesov20n01_153.pdf
- Boch, J., y Bonas, U. (2010). *Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function*. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1). DOI: 10.1146/annurev-phyto-080508-081936.
- Bonifaz, E., Dueñas, B., Quiñones, M., y Varillas, G. (2014). Inducción de Callogénesis in vitro de "Chocho Andino" *Lupinus mutabilis* (sweet) para Mejoramiento Genético. *Scientia*, Año XVI (16). Recuperado el 23 de junio de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/281286128_Induccion_de_

callogenesis_in_vitro_del_chocho_andino_Lupinus_mutabilis_Sweet
_para_mejoramiento_genetico

- Borek, S., Pukacka, S., Michalski, K., & Ratajczak, L. (2009). *Lipid and protein accumulation in developing seeds of three lupine species: Lupinus luteus L., Lupinus albus L., and Lupinus mutabilis Sweet*. *Journal of Experimental Botany*, 60(12). DOI: 10.1093/jxb/erp186
- Brandl, M., y Huynh, S. (2014). *Effect of the Surfactant Tween 80 on the Detachment and Dispersal of Salmonella entérica Serovar Thompson Single Cells and Aggregates from Cilantro Leaves as Revealed by Image Analysis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(16). DOI: 10.1128/aem.00795-14
- Bunsupa, S., Katayama, K., Ikeura, E., Oikawa, A., Toyooka, K., Saito, K., y Yamazaki, M. (2012). *Lysine Decarboxylase Catalyzes the First Step of Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis and Coevolved with Alkaloid Production in Leguminosae*. *The Plant Cell*, 24(3). DOI: 10.1105/tpc.112.095885
- Caicedo V., C., Peralta I., E., Villacrés, E., y Rivera M., M. (2001). *Poscosecha y mercado de chocho (Lupinus mutabilis Sweet) en Ecuador*. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Leguminosas. (Publicación Miscelánea no. 105). Recuperado el 12 de junio de 2017 de <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/799>
- Carvajal-Larenas, F., Linnemann, A., Nout, M., Koziol, M., & van Boekel, M. (2015). *Lupinus mutabilis: Composition, Uses, Toxicology, and Debittering*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9). DOI: 10.1080/10408398.2013.772089
- Carvalho, I. (2005). *Effects of Water Stress on the Proximate Composition and Mineral Contents of Seeds of Two Lupins (Lupinus Albus and*

Lupinus Mutabilis). *Journal of Food Quality*, 28(4). DOI: 10.1111/J.1745-4557.2005.00040.X

Cassells, A. (2001). *Contamination and its Impact in Tissue Culture. Acta Horticulturae*, (560). DOI: 10.17660/actahortic.2001.560.66

Chalupa, V. (2012). *Micropropagation of European Mountain Ash (Sorbus aucuparia L.) Wild Service Tree (Sorbus Torminalis)*. In Y. Bajaj, *Biotechnology in Agriculture, and Forestry 18: High-Tech and Micropropagation II* (1st ed). Berlin: Y.P.S Bajaj. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-76422-6_11

Cheeke, P. (1989). *Toxicants of plant origin* (1st ed). Boca Raton, Fla. CRC Pr. Recuperado el 20 de mayo de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=79i9mfl2PO4C&printsec=frontcover&dq=Toxicants+of+plant+origin+cheeke&hl=en&sa=X&ved=0a hUKEwi3moab08rVAhXFYCYKHaTNDTgQ6AEIJDA#v=onepage&q=Toxicants%20of%20plant%20origin%20cheeke&f=false>

D'Agostina, A., Antonioni, C., Resta, D., Arnoldi, A., Bez, J., Knauf, U., y Wäsche, A. (2006). *Optimization of a pilot-scale process for producing lupin protein isolates with valuable technological properties and minimum thermal damage. Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54. DOI: 10.1021/jf0518094

Department of Agriculture and Food. (2016). *Lupin foliar diseases: diagnosis and management*. Perth. Recuperado el 3 de junio de 2017 de <https://www.agric.wa.gov.au/lupins/lupin-foliar-diseases-diagnosis-and-management?page=0%2C1>

P.C. Debergh, R.H. Zimmerman (1991) *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Eds). Recuperado el 24 de junio de 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=NP_vCAAQBAJ&printsec=fr

ontcover&dq=Micropropagation:+Technology+and+Application+1991
&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwivq5HZ08rVAhWkSlQKHcA5DbsQ6AE
IJDA#v=onepage&q=Micropropagation%3A%20Technology%20an
d%20Application%201991&f=false

Diwan, F., Hassan, I., y Morammed, S. (2000). *Effect of saponin on mortality and histopathological changes in mice. Eastern Mediterranean Health Journal*, 6, 345. Recuperado el 3 de junio de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556022>

Doxastakis, G. (2000). *Lupin seed proteins. In: Novel Macromolecules in Food Systems*. Recuperado el 4 de junio de 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=lbpTAAAAMAAJ&q=Lupin+seed+proteins.+In:+Novel+Macromolecules+in+Food+Systems.&dq=Lupin+seed+proteins.+In:+Novel+Macromolecules+in+Food+Systems.&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwiZh_CF1MrVAhWisVQKHQvRChMQ6AEIJDA

Eastwood, R., & Hughes, C. (2008). *Origins of Domestication of Lupinus mutabilis in the Andes. Lupins for Health and Wealth, Proceedings of the 12Th International Lupin Conference*. Recuperado el 16 de junio de 2017 de https://www.researchgate.net/profile/Ruth_Eastwood/publication/228644166_Origins_of_Domestication_of_Lupinus_mutabilis_in_the_Andes/links/53e9d3d70cf2fb1b9b67325c/Origins-of-Domestication-of-Lupinus-mutabilis-in-the-Andes.pdf

El Telégrafo, (2016). El déficit de chocho llega a 6.397 toneladas. Recuperado el 14 de junio de 2017 de <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/8/eldeficit-de-chocho-llega-a-6-397-toneladas>

Falconi, C., Visser, R., & van Heusden, S. (2015). *Influence of plant growth stage on resistance to anthracnose in Andean lupin (Lupinus mutabilis)*. *Crop and Pasture Science*, 66(7). DOI: 10.1071/cp14104

- Galdames, R., y Peñaloza, E. Macha Café y Antracnosis. *Al Día*, 1. Recuperado el 15 de junio de 2017 de <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR17646.pdf>
- García, P., Ruiz, M., Salcedo, E., & Zamora, F. (2008). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Agrociencia*, 42(2), 185-192. Recuperado el 04 de julio de 2017, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000200006&lng=es&tlng=es.
- Ganapathi, T., Higgs, N., Balint-Kurti, P., Arntzen, C., May, G., y Van Eck, J. (2001). *Agrobacterium mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali (AAB)*. *Plant Cell Reports*, 20(2). DOI: 10.1007/s002990000287
- Godwin, I., Gordon, G., y Cameron, D. (1987). *Plant regeneration from leaf-derived callus cultures of the tropical pasture legume Stylosanthes scabra* Vog. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 9(1). DOI: 10.1007/bf00046073
- Granada Native Garden. (2013). *Lupine: Friend or Foe? The Granada Native Garden Newsletter*. Recuperado el 11 junio 2017, de <https://granadanativegarden.org/2013/04/29/lupine-friend-or-foe/>
- Gross R, von Baer E, Koch F, Marquard R, Trugo L, Wink M. (1988) *Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (Lupinus mutabilis cv. Inti) with low alkaloid content*. *Journal of Food Composition Analysis* 1. Recuperado el 3 de Julio de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/088915758890035X>
- Hillocks, R., Thresh, J., y Bellotti, A. (2002). *Cassava: Biology, Production, and Utilization* (1st Ed.) Recuperado el 20 de junio de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=qBOY6TrE3AwC&printsec=frontcover&dq=Cassava:+Biology,+Production,+and+Utilization&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjApNvs1MrVAhVEz1QKHdPnCAAQ6AEIJDA>

A#v=onepage&q=Cassava%3A%20Biology%2C%20Production%2C%20and%20Utilization&f=false

Hernández, Yunieta, & González, María E. (2010). Efectos De La Contaminación Microbiana Y Oxidación Fenólica En El Establecimiento In Vitro De Frutales Perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 00. Recuperado el 20 de junio de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&tlng=es.

Hettiarachchy, N. S., and Ziegler, G. R. (1994). *Protein Functionality in Food Systems*. Recuperado el 2 de julio de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=8khO5sJLzs8C&printsec=frontcover&dq=Protein+Functionality+in+Food+Systems&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwip6eiB1crVAhWkq1QKHbASDRQQ6AEIJDA#v=onepage&q=Protein%20Functionality%20in%20Food%20Systems&f=false>

Hove, E., King, S., y Hill, G. (1978). Composition, protein quality, and toxins of seeds of the grain legumes *Glycine max*, *Lupinus spp.*, *Phaseolus spp.* *Pisum sativum*, and *Vicia faba*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21(3). DOI: 10.1080/00288233.1978.10427434

Hurtado M, D., y Merino M, M. (1987). *Cultivo de tejidos vegetales*. Recuperado el 30 de junio de 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=1vBEAAAAYAAJ&q=Cultivo+de+tejidos+vegetales+hurtado&dq=Cultivo+de+tejidos+vegetales+hurtado&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwj3uqa1crVAhXli1QKHx2_CowQ6AEIJzAA

Ibañez, M. (2013). Propagación in vitro y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perplexum* L. Recuperado el 4 de julio de 2017 de <http://roderic.uv.es/handle/10550/26333>

INIAP, (2009). Catálogo de Variedades Mejoradas de Granos Andinos: Chocho, Quinoa y Amaranto, para la Sierra Ecuatoriana. Recuperado el 15 de julio de 2017 de <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/CATALOGO%20GRANOS%20ANDINOS.pdf>

INIAP, (2012). Manual Agrícola de Granos Andinos: Chocho, Quinoa, Amaranto y Ataco. Cultivos, variedades y costos de producción. Recuperado el 24 de julio de 2017 de <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/MANUAL%20AGRICOLA%20GRANOS%20ANDINOS%202012.pdf>

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2016). Simposio Regional del Chocho o Tarwi (*Lupinus mutabilis*). Recuperado el 20 de junio del 2017 de <http://www.agricultura.gob.ec/gobierno-del-ecuador-y-fao-impulsan-investigacion-cientifica-del-chocho/>

INIAP-FUNDACYT, (2001). *Poscosecha y Mercado de Chocho (Lupinus mutabilis Sweet) en Ecuador*. Recuperado el 17 de junio de 2017 de https://books.google.com.ec/books/about/Poscosecha_y_Mercado_de_Chocho_Lupinus_m.html?hl=es&id=YXszAQAAMAAJ

Jacobsen, S., Mujica, A. (2006) El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Recuperado el 1 de junio de 2017 de <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2028.pdf>

Jacobsen, S., Mujica, A. (2008) *Geographical distribution of the Andean lupin (Lupinus mutabilis sweet)*. Recuperado el 16 de junio de 2017 de https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/PGR/article-issue_155-art_1-lang_en.html

Jacobsen, S. y Sherwood, S. (2002). Cultivo de granos andinos en Ecuador. Recuperado el 29 de junio de 2017 de

https://books.google.com.ec/books/about/Cultivo_de_granos_andinos_en_Ecuador.html?id=s73gc3GcptcC&redir_esc=y

Kress, H. (1997). Photo: *Lupinus mutabilis* 1. Henriettes-herb.com. Recuperado el 11 junio 2017, de <http://www.henriettes-herb.com/galleries/photos/l/lu/lupinus-mutabilis-1.html>

Kurlovich, B. (2002). *Lupins: Geography, Classification, Genetic Resources, and Breeding*. Recuperado el 1 de julio de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=gObCswRkeOUC&printsec=frontcover&dq=Lupins:+Geography,+Classification,+Genetic+Resources,+and+Breeding&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjYoK671srVAhWILSYKHebaBxcQ6AEIJDA#v=onepage&q=Lupins%3A%20Geography%2C%20Classification%2C%20Genetic%20Resources%2C%20and%20Breeding&f=false>

La Hora Nacional. (2011). El chocho, un potencial desperdiciado. Recuperado el 14 de junio del 2017 de http://lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101192087/-1/EI_chocho,_un_potencial_desperdiciado.html

Laboratorio de Biotecnología Vegetal. (2016). *Protocolos de desinfección y siembra de explantes vegetales*. Quito: Universidad de las Américas.

Ling, A., Hong, H., y Hussein, S. (2007). *Callus Induction from Leaf Explants of Melaleuca alternifolia*. *International Journal of Agricultural Research*. 2(3). DOI: 10.3923/ijar.2007.227.237

Maathius, F., y Diatloff, E. (2013). *Roles and Functions of Plant Mineral Nutrients*. In F. Maathius, *Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols*. Recuperado el 23 de junio de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=4b0GkAEACAAJ&dq=Roles+and+Functions+of+Plant+Mineral+Nutrients.+In+F.+Maathius,+Plant+Mineral+Nutrients:+Methods+and+Protocols&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjCwMDd1srVAhXH4SYKHbv6CucQ6AEIJjAA>

- Matand, K., y Acquaah, G. (2009). *Principles of Plant Genetics, and Breeding*. Recuperado el 20 de mayo de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=mpc02INJRs8C&printsec=frontcover&dq=G.+Acquaah,+Principles+of+Plant+Genetics,+and+Bree ding&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjF-ev01srVAhVEeSYKHca0DHYQ6AEIJDA#v=onepage&q=G.%20Ac quaah%2C%20Principles%20of%20Plant%20Genetics%2C%20and %20Breeding&f=false>
- Mercx, S., Tollet, J., Magy, B., Navarre, C., y Boutry, M. (2016). *Gene Inactivation by CRISPR-Cas9 in Nicotiana tabacum BY-2 Suspension Cells*. *Frontiers in Plant Science*. DOI:10.3389/fpls.2016.00040
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., and Parajó, J. C. (2006). *Functionality of oilseed protein products: a review*. *Food Research International*. Recuperado el 24 de mayo de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996906000962>
- Moscatiello, R., Baldan, B., & Navazio, L. (2013). *Plant Cell Suspension Cultures*. DOI: 10.1007/978-1-62703-152-3_5
- Mujica, A. (1994). *1492 from a Different Perspective*. En J. Hernandez & J. Leon, *Neglected Crops*. Recuperado el 20 de mayo de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=IS5E7s0mcxgC&printsec=frontcover&dq=1492+from+a+Different+Perspective&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjv1Lrb18rVAhXC3SYKHSARCo0Q6AEIJDA#v=onepage &q=1492%20from%20a%20Different%20Perspective&f=false>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Múzquiz, M., Burbano, C., Gorospe, M., y Ródenas, I. (1989). *A chemical study of lupinus hispanicus seed—toxic and antinutritional*

components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 47(2). DOI: 10.1002/jsfa.2740470208

- Nelson, M. (2016). Programa de Leguminosas y Granos Andinos del INIAP. Recuperado el 12 de mayo de 2017 de <http://www.iniap.gob.ec/web/leguminosas-y-granos-andinos/>
- Odutayo, O., Amasa, N., Boutade, O., y Ogunsanwo, Y. (2007). *Determination of the Sources of Microbial Contaminants of Cultured Plant Tissues*. *Plant Pathology Journal*, 6(1). DOI:10.3923/ppj.2007.77.81
- Ortega, E., Rodríguez, A., David, A., y Zamora, A. (2009). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. Recuperado el 14 de junio de 2017 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169916223012>
- Ortega, G. (2013). Inducción al Proceso de Callogénesis in vitro a partir de Cotiledones y Ejes Embriogénicos de Semillas Maduras de Guarango (*Ceasalpinia spinosa*) como Coadyuvante para su Preservación en el Distrito Metropolitano de Quito. Recuperado el 1 de julio de 2017 de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/6285/1/AC-BIO-ESPE-038474.pdf>
- Parra, E. (2014). Proyecto para la creación de una empresa que se dedique a la elaboración y comercialización de productos derivados del chocho. Recuperado el 14 de junio de 2017 de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/7804>
- Peralta, E., Mazón, N., Murillo, A., Rivera, M., & Monar, C. (2008). Manual agrícola de granos andinos: chocho, quinua, amaranto y ataco. Cultivos, variedades y costos de producción. Recuperado el 3 de julio de 2017 de <https://books.google.com.ec/books?id=cJUzAQAAMAAJ&pg=PT49&pg=PT49&dq=Manual+agr%C3%ADcola+de+granos+andinos:+choc ho,+quinua,+amaranto+y+ataco.+Cultivos,+variedades+y+costos+de>

+producci%C3%B3n&source=bl&ots=m0oVztCMTR&sig=hqpylmbkZ95JLsKbFBivbHbP2Uo&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjkp6Hn2MrVAhWlQYKHZzADtAQ6AEIWzAM#v=onepage&q=Manual%20agr%C3%ADcola%20de%20granos%20andinos%3A%20chocho%2C%20quinua%2C%20amaranto%20y%20ataco.%20Cultivos%2C%20variedades%20y%20costos%20de%20producci%C3%B3n&f=false

Pérez, M. (2008). Evaluación de la Producción de Metabolitos Anticancerígenos a partir de Células en Suspensión de *Caléndula officinalis*. Recuperado el 15 de junio de 2017 de <http://www.bdigital.unal.edu.co/6575/1/TESIS.pdf>

Pérez, M., Lagunes, L., López, J., Aranda, E., y Ramos, J. (2015). *Lupinus* del estado de Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 38(1). Recuperado el 7 de julio del 2017 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802015000100007

Phoplonker, M., y Caligari, P. (1993). *Cultural manipulations affecting callus formation from seedling explants of the pearl lupin (Lupinus mutabilis Sweet)*. *Annals of Applied Biology*, 123(2). DOI: 10.1111/j.1744-7348.1993.tb04104.x

Pniewski, T., Kapusta, J., y Legocki, A. (2002). *In vitro micropropagation of four lupin species*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24(4). DOI: 10.1007/s11738-002-0038-0

Podolak, I., Galanty, A., y Sobolewska, D. (2010). *Saponins as cytotoxic agents: a review*. *Phytochemistry Reviews*, 9(3). DOI: 10.1007/s11101-010-9183-z

Porras, J. (2010). *Caracterización del proceso de obtención de aislados de la proteína de Lupinus silvestre en el Estado de Hidalgo*. Recuperado el 26 de junio de 2017 de <http://itzamna.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/9178/1/18.pdf>

- Prajapati, H., Patel, D., Mehta, S., y Subramanian, R. (2003). *Direct in vitro regeneration of Curculigo orchioides Gaertn., an endangered anticarcinogenic herb. Current Science*, 84(3), 748-749. Recuperado el 28 de junio del 2017 de http://www.jstor.org/stable/24107574?seq=1#page_scan_tab_contents
- Preston, G. (2004). *Plant perceptions of plant growth-promoting Pseudomonas. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359. DOI: 10.1098/rstb.2003.1384
- Proaño, A. (2011). Regeneración Y Conservación Mediante La Técnica De Crecimiento Mínimo De Lupinus Mutabilis (Chocho Andino) In Vitro. Recuperado el 24 de junio de 2017 de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9372/1/UPS-QT07125.pdf>
- Ramírez-González, G., Rodríguez-de la O, J., Arreola-Ávila, J., y Álvarez-Moctezuma, J. (2015). *Morphogenic responses of three explants of Lupinus montanus (H.B.K.) cultured in vitro. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales Y Del Ambiente*, XXI (1). DOI: 10.5154/r.rchscfa.2013.07.022
- Robertson, A. (1966). *Artificial Selection in Plants and Animals. Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*, 164(995). DOI: 10.1098/rspb.1966.0036
- Rodríguez, A. (2009). Evaluación "in vitro" de la Actividad Antimicrobiana de los Alcaloides del Agua de Cocción del Proceso de Desamargado del Chocho (Lupinus mutabilis Sweet). Recuperado el 12 de mayo de 2017 de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/219/1/56T00193.pdf>
- Santos, C., Ferreira, R., y Texeira, A. (1997). Seed Proteins of *Lupinus mutabilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10).

Recuperado el 4 de Julio de 2017 de <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf970075v>

- Sator, C. (1985). *Studies on shoot regeneration of lupins (Lupinus spp.)*. *Plant Cell Reports*, 4(3). DOI: 10.1007/bf00571297
- Seemann, P. (1993). Utilización de técnicas de micro-propagación. Avances en producción y sanidad vegetal. Cultivos no tradicionales. Universidad Austral de Chile. Recuperado el 24 de junio de 2017 de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fan9731e/doc/fan9731e.pdf>
- Sparg, S., Light, M., y van Staden, J. (2004). *Biological activities and distribution of plant saponins*. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3). DOI: 10.1016/j.jep.2004.05.016
- Sroga G. (1987) *Plant regeneration of two Lupinus spp. From callus cultures via organogenesis*. Recuperado el 12 de junio de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168945287901993>
- Szabados, L., Mroginski, L., & Roca, W. (1993). Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. Recuperado el 25 de mayo de 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=EXijYNw55DUC&printsec=frontcover&dq=,+Cultivo+de+Tejidos+en+la+Agricultura,+Fundamentos+y+Aplicaciones&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwi187vX2srVAhVITCYKHbeGA_oQ6AEIJzAA#v=onepage&q=%2C%20Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura%2C%20Fundamentos%20y%20Aplicaciones&f=false
- Thomas, T. (2008). *The role of activated charcoal in plant tissue culture*. *Biotechnology Advances*, 26(6). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003
- Torres, F., Nagata, A., y Dreifuss, W. (1980). *Methods of eliminating alkaloids from the seeds of Lupinus mutabilis Sweet*. Recuperado el 2 de julio de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/15986018_Methods_of_eliminating_alkaloids_from_the_seeds_of_Lupinus_mutabilis_Sweet

- Torres, F. (2011). Germinación in vitro y Cinética de Crecimiento de Callo de *Mammillaria huitzilopochtli* D.R. Hunt. Recuperado el 23 de junio de 2017 de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2162.pdf
- Titov, S., Bhowmik, S., Mandal, A., Alam, M., y Uddin, S. (2006). *Control of Phenolic Compound Secretion and Effect of Growth Regulators for Organ Formation from Musa spp. cv. Kanthali Floral Bud Explants. American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2(3). DOI: 10.3844/ajbbbsp.2006.97.104
- Van der Brink, M. (2009). Perú, Northern part: Cordillera Blanca - Marijn van den Brink. [Photos.v-d-brink.eu](http://photos.v-d-brink.eu). Recuperado el 11 junio 2017, de <http://photos.v-d-brink.eu/Flora-and-Fauna/South-America/Peru-Northern-part/i-kCfxpVN>
- Villacrés, E., Allauca, V., Peralta, E., Insuasti, G., Alvarez, J., y Quelal, M. (2015). *Germination, an Effective Process to Increase the Nutritional Value and Reduce Non-Nutritive Factors of Lupine Grain (Lupinus mutabilis Sweet)*. Recuperado el 12 de mayo de 2017 de <http://article.sapub.org/10.5923.j.food.20150504.01.html>
- Villacrés, E.; Peralta, E.; Cuadrado, L.; Revelo, J.; Abdo, S.; Aldáz, R. (2008). *Propiedades y Aplicaciones de los Alcaloides del Chocho (Lupinus mutabilis Sweet)*. Recuperado el 18 de junio de 2017 de [https://books.google.com.ec/books?id=V3ozAQAAMAAJ&pg=PA6&pg=PA6&dq=Propiedades+y+Aplicaciones+de+los+Alcaloides+del+Chocho+\(Lupinus+mutabilis+Sweet\).&source=bl&ots=2RE7qk6r7H&sig=IEMSDIvw54auq6frBIFrSH7FC4U&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjbvfm628rVAhVFKCYKHarTBR8Q6AEIMzAC#v=onepage&q=Propiedades%20y%20Aplicaciones%20de%20los%20Alcaloides%20del%20Chocho%20\(Lupinus%20mutabilis%20Sweet\).&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=V3ozAQAAMAAJ&pg=PA6&pg=PA6&dq=Propiedades+y+Aplicaciones+de+los+Alcaloides+del+Chocho+(Lupinus+mutabilis+Sweet).&source=bl&ots=2RE7qk6r7H&sig=IEMSDIvw54auq6frBIFrSH7FC4U&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwjbvfm628rVAhVFKCYKHarTBR8Q6AEIMzAC#v=onepage&q=Propiedades%20y%20Aplicaciones%20de%20los%20Alcaloides%20del%20Chocho%20(Lupinus%20mutabilis%20Sweet).&f=false)
- Vincken, J., Heng, L., de Groot, A., y Gruppen, H. (2007). *Saponins, classification and occurrence in the plant*

kingdom. Phytochemistry, 68(3).

DOI:10.1016/j.phytochem.2006.10.008

- Vioque, J. (2000). *Jornada internacional sobre proteínas alimentarias*. Recuperado el 13 de junio de 2017 de https://books.google.com.ec/books/about/Jornada_internacional_sobre_prote%C3%ADnas_a.html?id=emGEuFUzqigC&redir_esc=y
- Wegayehu, F., Firew, M., y Belayneh, A. (2015). *Optimization of explants surface sterilization condition for field grown peach (Prunus persica L. Batsch. Cv. Garnem) intended for in vitro culture. African Journal of Biotechnology, 14(8)*. DOI: 10.5897/ajb2014.14266
- Weldt, E. (2008). *Establecimiento, multiplicación y enraizamiento in vitro de Rosa canina L.* Recuperado el 26 de mayo de 2017 de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/faw445e/doc/faw445e.pdf>
- Wolko, B., Clements, J., Naganowska, B., Nelson, M., & Yang, H. (2010). *Lupinus. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. DOI: 10.1007/978-3-642-14387-8_9
- Yang, L., y Stöckigt, J. (2010). *Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. Natural Product Reports, 27(10)*. DOI: 10.1039/c005378c
- Yildiz, M., y Er, C. (2002). *The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and shoot regeneration of flax (Linum usitatissimum). Naturwissenschaften, 89(6)*. DOI: 10.1007/s00114-002-0310-6

ANEXOS

1. Composición de medios basales

1.1 Medio Murashige y Skoog (1962)

Microelementos	mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
FeNaEDTA	36.7
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
Macroelementos	mg/L
CaCl ₂	332.02
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
MgSO ₄	180.54
NH ₄ NO ₃	1650

1.2 Medio Gresshoff y Doy (1972)

Microelementos	mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
FeNaEDTA	36.7
H ₃ BO ₃	0.3
KI	0.8
MnSO ₄ .H ₂ O	1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.3

Macroelementos	mg/L
Ca(NO ₃) ₂ .2H ₂ O	208.81
KCl	65
KH ₂ PO ₄	300
KNO ₃	1000
MgSO ₄	17.09
NH ₄ NO ₃	1000

1.2.1 Vitaminas Gresshoff y Doy (1972)

Vitaminas	mg/L
Glycina	4
mio-Inositol	100
Ácido nicotínico	1
Piridoxina HCl	1
Tiamina HCl	10

