



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Caracterización morfológica y germinación de semillas de la familia Fabaceae en
Bosques Andinos del Ecuador**

Sandoval Zambrano, Carlos Augusto

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en
Biotecnología

Ph. D. Proaño Tuma, Karina Isabel

24 de agosto de 2022



PROYECTO_UIC_SANDOVAL_CARLOS.docx

Scanned on: 20:25 August 19, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	47
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	220
Omitted Words	0



KARINA
ISABEL
PROANO TUMA



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **"Caracterización morfológica y germinación de semillas de la familia Fabaceae en Bosques Andinos del Ecuador"** fue realizado por el señor **Sandoval Zambrano Carlos Augusto**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 24 de agosto de 2022



Firmado digitalmente por:

**KARINA
ISABEL**

.....
Proaño Tuma, Karina Isabel Ph.D.
C. I. 1707245104



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Sandoval Zambrano, Carlos Augusto**, con cédula de ciudadanía n° 1724936669, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Caracterización morfológica y germinación de semillas de la familia Fabaceae en Bosques Andinos del Ecuador** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 24 de agosto de 2022

.....
Sandoval Zambrano, Carlos Augusto

C.I.: 1724936669



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Sandoval Zambrano, Carlos Augusto**, con cédula de ciudadanía n° 1724936669, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Caracterización morfológica y germinación de semillas de la familia Fabaceae en Bosques Andinos del Ecuador** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 24 de agosto de 2022

Carlos Sandoval

.....
Sandoval Zambrano, Carlos Augusto

C.I.: 1724936669

Dedicatoria

A mi madre María, quien con su amor, esfuerzo y apoyo me ha acompañado a lo largo de este camino, tú eres la razón principal de todo.

A mi padre Carlos, por sus palabras, ayuda y consejos brindados en los años de carrera, que hoy me han permitido culminarla.

A mi hermana Rebeca, por su enorme cariño, confianza y amor brindados a lo largo de estos años, siempre contarás conmigo y serás mi mayor admiración.

A toda mi familia, que han sido siempre motor y motivo de culminar esta etapa.

Por último, en memoria de mi tía Isabel, quien me brindó su apoyo incondicional, compartió su sabiduría y dio su inagotable amor, por siempre, mi segunda madre.

Agradecimientos

A Dios, a mis padres y hermana por ser apoyo constante en este proceso.

A mi directora de tesis, Dra. Karina Isabel Proaño Tuma Ph.D., por ser guía y compartir todos sus conocimientos.

Gracias a la Dra. María Claudia Segovia Ph.D., a la Ing. Gabriela Miño Mg. y a la Ing. Gabriela Pazmiño, por su orientación y guía en el desarrollo del presente proyecto.

Un agradecimiento especial a la Dra. Mónica Jadan Ph. D. y a Andrea Ortega M. Sc., por la apertura de sus instalaciones en la realización de este trabajo.

A mi Josselyn, por el amor, soporte y compañía ante las adversidades.

A mis amigos Alex, Kimberly, Miguel, Mateo, Andrea, Bryan, Paola, Yessenia y Darla por compartir su tiempo conmigo y permitirme ser parte de sus vidas.

A Luis, Ricardo, Francisco, Juan, Italo y Cristian por su incondicional y verdadera amistad.

A las pasantes Marcela, Karen, Nicole, Estefanía, Nathaly y Jessica por su aporte en la realización de este trabajo de titulación

Gracias a la Universidad de las Fuerzas Armadas, a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y los proyectos BIO-GEEC y HANS-BANK por la oportunidad de realizar este trabajo.

Índice de contenidos

Informe de Copyleaks.....	2
Certificación docente	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
RESUMEN.....	14
ABSTRACT	15
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	16
Planteamiento del problema.....	16
Justificación del problema.....	17
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
<i>Objetivo general</i>	19
<i>Objetivos específicos</i>	19
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	20
Los páramos como ecosistemas andinos del Ecuador.....	20
<i>Generalidades de los páramos andinos</i>	20
<i>Afectaciones antrópicas en los páramos del Ecuador</i>	21
<i>Importancia de los páramos andinos como ecosistema</i>	21
<i>Origen y distribución de la familia Fabaceae (o Leguminosae)</i>	23

<i>Generalidades y características morfológicas de la familia Fabaceae (o Leguminosae)....</i>	23
<i>Importancia y usos de la familia Fabaceae.....</i>	24
Género <i>Lupinus</i>	25
<i>Origen y distribución del género Lupinus</i>	25
<i>Características generales del género Lupinus</i>	26
<i>Aplicaciones del género Lupinus</i>	27
<i>Lupinus pubescens (Benth) K. T. Hartweg</i>	28
<i>Características de L. pubescens.....</i>	28
<i>Lupinus microphyllus Desr.....</i>	28
<i>Características de L. microphyllus.....</i>	28
<i>Lupinus tauris (Benth) K. T. Hartweg</i>	29
<i>Características de L. tauris.....</i>	29
Parámetros morfológicos de la semilla.....	29
<i>Parámetros morfológicos cuantitativos en semillas.....</i>	29
<i>Parámetros morfológicos cualitativos en semillas</i>	30
Ensayos de viabilidad de semillas.....	31
<i>Test de tetrazolio.....</i>	31
<i>Ensayos de germinación.....</i>	31
Estrategias para la preservación de la diversidad genética	32
<i>Cultivo in vitro de semillas</i>	32
<i>Bancos de germoplasma</i>	33
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	35

	10
Material Vegetal.....	35
<i>Recolección y transporte</i>	35
<i>Pretratamiento del material vegetal</i>	35
<i>Identificación de las especies</i>	35
<i>Parámetros cuantitativos</i>	36
<i>Parámetros cualitativos</i>	36
Ensayo de viabilidad de las semillas.....	37
<i>Prueba colorimétrica de tetrazolio</i>	37
Ensayo de desinfección de las semillas	38
Ensayo de germinación <i>in vitro</i> de las semillas.....	39
Análisis estadístico.....	42
<i>Estadística descriptiva de la caracterización de los parámetros morfológicos</i>	42
<i>Diseño experimental para el ensayo de viabilidad</i>	42
<i>Diseño experimental para la desinfección de semillas</i>	42
<i>Diseño experimental para la germinación de semillas</i>	43
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	44
Descripción morfológica de las especies del género <i>Lupinus</i>	44
Caracterización morfológica de las semillas del género <i>Lupinus</i>	45
<i>Parámetros cualitativos</i>	46
<i>Parámetros cuantitativos</i>	48
<i>Número de semillas por fruto</i>	48
<i>Tamaño, peso y contenido de humedad de las semillas</i>	48

Ensayo de viabilidad de las semillas del género <i>Lupinus</i>	50
<i>Prueba colorimétrica de tetrazolio (TZ)</i>	50
Desinfección de las semillas	55
Germinación de las semillas del género <i>Lupinus</i>	58
<i>Capacidad germinativa</i>	58
<i>Índice de latencia</i>	62
<i>Germinación acumulativa</i>	63
<i>Velocidad de germinación</i>	65
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	68
<i>Características morfológicas del género Lupinus</i>	69
<i>Viabilidad y germinación de las semillas del género Lupinus</i>	72
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.....	75
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	77
CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA.....	78
CAPÍTULO IX: APÉNDICES	88

Índice de tablas

Tabla 1 Distribución de tratamientos de las diferentes concentraciones de tetrazolio y tiempos de inmersión de las semillas de <i>Lupinus pubescens</i> , <i>L. microphyllus</i> y <i>L. tauris</i>	37
Tabla 2 Concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) utilizadas para la desinfección de las semillas de <i>Lupinus pubescens</i> , <i>L. microphyllus</i> y <i>L. tauris</i>	39
Tabla 3 Concentraciones de ácido giberélico (AG ₃) utilizadas para la germinación de las semillas de <i>Lupinus pubescens</i> , <i>L. microphyllus</i> y <i>L. tauris</i>	40
Tabla 4 Forma, color predominante y patrón de manchas de las tres especies de <i>Lupinus</i>	47
Tabla 5 Tipo de embrión, tipo de testa y textura de testa de las tres especies de <i>Lupinus</i>	47
Tabla 6 Número de semillas por fruto de las tres especies de <i>Lupinus</i>	48
Tabla 7 Valores del largo, ancho y grosor de las semillas de las tres especies de <i>Lupinus</i>	49
Tabla 8 Valores del peso y contenido de humedad de las tres especies de <i>Lupinus</i>	49
Tabla 9 Porcentaje de viabilidad de las semillas de las tres especies de <i>Lupinus</i> respecto a cada tratamiento de tetrazolio aplicado.	54
Tabla 10 Porcentaje de contaminación de las tres especies de <i>Lupinus</i>	56
Tabla 11 Porcentaje de germinación en las semillas de las tres especies de <i>Lupinus</i>	60
Tabla 12 Datos de la capacidad germinativa, índice de latencia y velocidad de germinación obtenidos en las tres especies de <i>Lupinus</i>	67

Índice de figuras

Figura 1	<i>Porcentaje de especies de Lupinus reportadas en las regiones y provincias del Ecuador.</i>	26
Figura 2	<i>Fichas técnicas de Lupinus microphyllus, L. pubescens y L. tauris.</i>	45
Figura 3	<i>Semillas del género Lupinus recolectadas en el páramo.</i>	46
Figura 4	<i>Tinción con tetrazolio de las diferentes semillas de Lupinus.</i>	50
Figura 5	<i>Porcentajes de viabilidad de cada tratamiento aplicado en las tres especies de Lupinus.</i>	52
Figura 6	<i>Porcentaje de viabilidad de las tres especies de Lupinus respecto a cada tratamiento aplicado.</i>	53
Figura 7	<i>Semillas de Lupinus contaminadas con agentes infecciosos.</i>	55
Figura 8	<i>Porcentajes de desinfección en las semillas de las tres especies de Lupinus.</i>	57
Figura 9	<i>Semillas de las tres especies de Lupinus germinadas.</i>	59
Figura 10	<i>Porcentaje de germinación en las tres especies de Lupinus respecto a cada tratamiento empleado.</i>	61
Figura 11	<i>Índice de latencia en las semillas de las tres especies de Lupinus.</i>	62
Figura 12	<i>Germinación acumulativa de L. pubescens.</i>	63
Figura 13	<i>Germinación acumulativa de L. microphyllus.</i>	64
Figura 14	<i>Germinación acumulativa de L. tauris.</i>	65
Figura 15	<i>Velocidades de germinación en las tres especies de Lupinus.</i>	66

RESUMEN

Los páramos son ecosistemas biodiversos que almacenan y regulan recursos hídricos indispensables para el desarrollo de la vida. En Ecuador, la familia *Fabaceae* posee cerca de 20 especies del género *Lupinus* en la zona andina, las cuales desempeñan funciones de remediación en los suelos, siendo así necesaria su conservación. El objetivo del presente estudio es realizar ensayos de caracterización morfológica, fisiológica, de viabilidad y germinación para establecer un banco de germoplasma con especies de importancia ecológica para proyectos de restauración. Para esto, se recolectaron semillas de tres especies endémicas *Lupinus pubescens* (Benth) K. T. Hartweg, *L. microphyllus* Desr y *L. tauris* (Benth) K. T. Hartweg de la familia *Fabaceae* en el Parque Nacional Cayambe Coca y en el Parque Nacional Antisana, a las que se les realizaron análisis de color, forma, manchas, número de semillas por fruto, tamaño (largo, ancho y grosor), peso, contenido de humedad, viabilidad, concentración eficaz de hipoclorito de sodio (NaClO) para desinfección y concentración óptima de ácido giberélico (AG₃) para germinación *in vitro*. Los resultados revelaron que las semillas tienen la capacidad de resistir la desecación, que su viabilidad se encuentra entre el 65 y 100%, que la concentración óptima para su desinfección fue de 5% de NaClO y que la adición de 1mg/L de AG₃ al medio de cultivo favoreció la capacidad germinativa. Los datos obtenidos permitieron establecer que las especies del género *Lupinus* son aptas para procesos de conservación y restauración de ecosistemas andinos.

Palabras clave: Páramo, conservación, restauración.

ABSTRACT

The paramos are biodiverse ecosystems that store and regulate water resources essential for the development of life. In Ecuador, the Fabaceae family has about 20 species of the *Lupinus* genus in the Andean zone, which perform remediation functions in soils, thus making their conservation necessary. The objective of this study is to carry out morphological, physiological, viability and germination characterization tests to establish a germplasm bank with species of ecological importance for restoration projects. For this, seeds of three endemic species *Lupinus pubescens* (Benth) K. T. Hartweg, *L. microphyllus* Desr and *L. tauris* (Benth) K. T. Hartweg of the Fabaceae family were collected in the Cayambe Coca National Park and in the Antisana National Park, to which color analysis was performed. shape, spots, number of seeds per fruit, size (length, width and thickness), weight, moisture content, viability, effective concentration of sodium hypochlorite (NaClO) for disinfection and optimal concentration of gibberellic acid (AG3) for germination in vitro. The results revealed that the seeds have the capacity to resist desiccation, that their viability is between 65 and 100%, that the optimum concentration for disinfection was 5% NaClO and that the addition of 1mg/L of AG3 to the culture medium favored germination capacity. The data obtained allowed us to establish that the species of the genus *Lupinus* are suitable for processes of conservation and restoration of Andean ecosystems.

Keywords: Paramo, conservation, restoration.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

Ecuador es un país que se caracteriza por ser extremadamente biodiverso, sobre todo dos regiones: los Andes tropicales y los Tumbes-Chocó-Magdalena. A pesar de su extensión, el Ecuador posee alrededor del 7.6% de las especies de plantas vasculares a nivel mundial (Mittermeier, *et al.*, 2011; Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2016). En el caso, del área de los Andes tropicales comprende al ecosistema de los páramos de alta montaña, que van desde los 3000 a 4500m s.n.m. Los páramos albergan cerca del 30% de las especies vegetales (Josse, Mena, & Medina, 2000), siendo estos de gran importancia en la captación de agua para el planeta.

A partir del año 2015, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y el Ministerio del Ambiente del Ecuador han reportado una disminución en el área forestal y un aumento en el número de especies en peligro de extinción. En el país, 1857 plantas se encuentran en peligro crítico y otras 9 se consideran extintas (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza [UICN], 2017). Los cambios climáticos, el ciclo biogeoquímico, la pérdida de biodiversidad, entre otros, afectan al funcionamiento de los ecosistemas y a los servicios ecosistémicos que hacen posible la vida humana (Reid, 2005). Siendo las actividades antropológicas principalmente las agrícolas y ganaderas la causa de su desequilibrio (Steffen, *et al.*, 2015).

Los páramos son ecosistemas frágiles que se ven afectados y amenazados por la pérdida de biodiversidad, la introducción de plantas exóticas, incendios, mal manejo del suelo y la actividad minera (Morocho & Chunchu, 2019). Los páramos se caracterizan por tener tasas de descomposición lentas, temperaturas bajas, almacenar agua y acumular materia orgánica. Son sumideros de carbono que regulan el clima reteniendo el CO₂ que va a la atmósfera (Podwojewski, Poulenard, Zambrana, & Hofstede, 2002; Villa, *et al.*, 2019).

Estos ecosistemas son fundamentales para la recolección, regulación, mantención y suministro del agua (Groot, Wilson, & Boumans, 2002).

En relación a estos problemas se han implementado estrategias de conservación de especies mediante la creación de jardines botánicos, arboretos y bancos de semillas o germoplasma los cuales, pueden ayudar a preservar la diversidad genética (Cochrane, Crawford, & Monks, 2007; Convenio sobre la Diversidad Biológica [CBD], 2012).

Actualmente, se han iniciado diversos proyectos de restauración ecológica para la conservación de las plantas, que implican estudios morfológicos, pruebas de viabilidad y ensayos de germinación, como es el proyecto de creación del banco de semillas HANS-BANK (Vargas & Pérez, 2014).

Justificación del problema

Ecuador es un país rico en biodiversidad, sin embargo, existen varios problemas que pueden afectar esta riqueza. Los sistemas agrícolas, el uso inadecuado del suelo, la quema forestal, el pastoreo, la introducción de especies exóticas, el aumento de la temperatura media anual, el cambio en la intensidad y frecuencia de las precipitaciones, entre otras actividades antrópicas y fenómenos ambientales, son varios de los factores que amenazan gran parte de los ecosistemas en el Ecuador, en especial los páramos (Poulenard, Podwojewski, Janeau, & Jean, 2001; Yuste, *et al.*, 2017).

Los páramos son ecosistemas importantes, ya que proporcionan recursos hídricos a las comunidades de las zonas bajas y a la población en general (Viviroli, Hans, Messerli, Meybeck, & Weingartner, 2007). La importancia de los páramos radica en la capacidad de almacenar y regular agua que reciben de las precipitaciones y de los descongelamientos (Carrillo, Silva, Rollenbeck, Célleri, & Bendix, 2019). Los sistemas hidrológicos de los páramos representan el mayor suministro de agua para las poblaciones de la serranía ecuatoriana (Morocho & Chuncho, 2019).

En base a esto, surge la necesidad de conservar las especies vegetales silvestres y endémicas de estos ecosistemas (Romero, Orellana, & Balseca, 2016). El establecimiento de bancos de germoplasma y el estudio morfológico de semillas se han considerado como estrategias para la conservación de la diversidad genética vegetal (Schoen & Brown, 2001). Es por ello, que los esfuerzos de restauración ecológica se deben enfocar en plantas que sean de importancia para la dinámica de estos ecosistemas (Vargas & Pérez, 2014). Una de las familias que tienen un rol importante en los páramos son las Fabáceas. Esta familia es frecuentemente visitada por aves e insectos en busca de polen o néctar y sirven ocasionalmente como alimento para algunos herbívoros (Ulloa & Moller, 2022).

Las Fabáceas son una de las familias más diversas y ampliamente distribuidas en el mundo debido a su gran variabilidad morfológica, fisiológica y ecológica. En Ecuador se han reportado 60 géneros, de los cuales 7 son nativos y se encuentran en los páramos. (Ulloa & Moller, 2022) *Lupinus* es uno de los géneros silvestres más representativos de la familia Fabaceae, posee alrededor de 300 especies arbustivas y arbóreas con un gran potencial agronómico, derivado al alto contenido en proteínas de sus semillas. Algunas especies del género *Lupinus* fijan nitrógeno atmosférico al suelo y biosintetizan diferentes metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes, potenciales para el desarrollo de productos antibacterianos (Martínez & Acosta, 2020).

Por ello, el presente proyecto tiene como objetivo desarrollar ensayos que permitan identificar la morfología, analizar la viabilidad y determinar los parámetros de germinación de especies de la familia Fabaceae, con la finalidad de preservar la diversidad genética. El apoyo del proyecto BIO-GEEC del cual forma parte la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE permitirá establecer un banco de semillas andinas denominado HANS-BANK, para contar con una base de datos de especies andinas.

HIPÓTESIS

Los tratamientos de germinación *in vitro* permiten incrementar el porcentaje de germinación de las semillas de la familia Fabaceae.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar la morfología y germinar semillas de la familia Fabaceae en Bosques Andinos del Ecuador.

Objetivos específicos

- Recolectar muestras de plantas y semillas para describirlas generando una línea base de la familia Fabaceae.
- Identificar las características morfológicas y fisiológicas de las especies de la familia Fabaceae con énfasis en sus frutos y semillas.
- Analizar la viabilidad en las semillas de la familia Fabaceae mediante la prueba colorimétrica de tetrazolio.
- Determinar los parámetros de germinación *in vitro* en las semillas de la familia Fabaceae.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

Los páramos como ecosistemas andinos del Ecuador

Generalidades de los páramos andinos

Los páramos son ecosistemas de las altas montañas que se encuentran localizados entre el límite superior del bosque que va desde los 3000 a 3500m s.n.m y el límite inferior de los glaciares que va desde los 4500 a 5000m s.n.m (Llambí, *et al.*, 2012). La superficie total de los páramos en América del Sur es de 3'576798ha, de las cuales aproximadamente el 50% se encuentran en Ecuador (Vargas, 2022). En los páramos la vegetación está dominada principalmente por plantas herbáceas, donde la temperatura ambiental fluctúa entre los 4 a 10 °C y la radiación solar es alta. Los páramos, además, se caracterizan por tener suelos con una alta cantidad de materia orgánica, una presión atmosférica y densidad de aire bajas (Buytaer, Cuesta, & Tobón, 2011).

En Ecuador los páramos se caracterizan por ser ecosistemas andinos biodiversos que cubren alrededor del 7% del territorio nacional (Carrillo, Gómez, Cotes, & Núñez, 2010). Poseen una extensión de 1'337119ha y se encuentran ubicados a una altitud promedio de 3300m s.n.m. (Pujos, 2013). Los páramos ecuatorianos son húmedos, tienen temperaturas de entre 3 a 20°C y albergan cerca de 2000 especies de plantas vasculares, de las cuales 680 son endémicas (Camacho, 2014; Hofstede & Llambí, 2019).

Los páramos andinos se encuentran a lo largo de la Cordillera de los Andes desde Venezuela hasta Perú y en los territorios de Panamá y Costa Rica (Morales & Estévez 2006; Buytaert, Cuesta, & Tobón, 2011). En Ecuador, los páramos se extienden desde el norte en la frontera con Colombia hasta el sur en los límites fronterizos con el Perú, gran parte de estos ecosistemas ocupan las provincias de Pichincha, Chimborazo, Azuay y Napo (Pujos, 2013).

Afectaciones antrópicas en los páramos del Ecuador

La actividad en los páramos actualmente se encuentra influenciada por diversas acciones humanas que ocasionan un gran deterioro. Entre ellas, el sobrepastoreo o ganadería extensiva, la quema para uso agrícola, incendios, las plantaciones de pinos, el mal uso del suelo y la agricultura. Todas estas actividades antrópicas han afectado a los ecosistemas andinos haciéndolos hábitats frágiles (MacDougall, 2013).

En los páramos ecuatorianos el mal uso del suelo y la presencia de sistemas agrícolas han aumentado la descomposición de la materia orgánica. Al romperse los agregados de la tierra, se elimina la protección física y deja a los terrenos susceptibles a la mineralización, cambios ambientales y ataques microbianos (Morocho & Chuncho, 2019; Vargas, 2022). La ganadería extensiva en los páramos es perjudicial para la flora local, lo que ocasiona pérdidas en la vegetación nativa y provoca que los suelos se vuelvan endebles, generando así un bajo contenido de materia orgánica (Cachiguango, 2019).

Los daños ocasionados en los páramos por la quema de uso agrícola y los incendios provocan infertilidad y pérdida en la capacidad de regeneración de los pastizales y otras especies vegetales (Beltrán, *et al.*, 2009; Bayas, 2015). Las temperaturas durante un incendio alteran las propiedades químicas de la superficie del suelo, afectando la capacidad de retener agua (Farley, 2013; Buytaert, Cuesta, & Tobón, 2011). La introducción de pinos (*Pinus radiata*) por la gran demanda en el mercado mundial debido a su rápido crecimiento, han afectado también a los páramos ecuatorianos. La plantación de pinos consume una gran cantidad de agua, lo que reduce el rendimiento hídrico del suelo y lo hace menos fértil (Hofstede, Groenendijk, Coppus, Fehse, & Sevink, 2002; Farley, 2013).

Importancia de los páramos andinos como ecosistema

Los páramos se caracterizan por ser hábitats naturales con gran biodiversidad de plantas, animales y microorganismos. Este ecosistema cumple con funciones naturales, económicas y biológicas que han permitido el desarrollo de muchas comunidades rurales ecuatorianas (Aguirre & Torres, 2014). Los páramos proporcionan servicios ecosistémicos

que abastecen gran parte de las necesidades básicas del ser humano (Vargas, 2022). Estos servicios de abastecimiento son productos o suministros bióticos y abióticos tomados directamente del ecosistema andino, como el agua, los alimentos, la fibra, la pesca, los recursos genéticos, entre otros (Vargas, 2022).

Una de las principales funciones biológicas que posee el páramo es la capacidad de producir, almacenar y regular agua de alta calidad. El abastecimiento de agua proviene de las precipitaciones y del descongelamiento del hielo que se encuentra en los puntos más altos (Buytaert, Cuesta, & Tobón, 2011; Morocho & Chuncho, 2019). El almacenamiento de los recursos hídricos en estos ecosistemas andinos es elevado debido a la presencia de pajonales y de especies vegetales xerofíticas, cuyo consumo de agua es escaso (Morocho & Chuncho, 2019). La alta producción de agua en los páramos permite a estos ecosistemas ser los principales proveedores de los recursos hídricos de la serranía ecuatoriana. Otra de las funciones biológicas del páramo es su capacidad de almacenar carbono. Las tasas de descomposición lentas, las temperaturas bajas y la acumulación de materia orgánica permiten a los ecosistemas andinos ser sumideros de carbono. Al capturar este elemento químico, los páramos regulan el clima reteniendo el CO₂ que va a la atmósfera (Morocho & Chuncho, 2019).

La importancia de los ecosistemas de páramo radica en la biodiversidad de flora y fauna. Estos hábitats albergan plantas endémicas que se han adaptado a condiciones climáticas y físico-químicas específicas, tales como las bajas temperaturas, alta radiación, niebla, alta humedad y baja presión atmosférica (Morocho & Chuncho, 2019). Los páramos ecuatorianos poseen cerca del 30 % de las plantas vasculares del país, las especies vegetales más predominantes son los pajonales, arbustos, rosetas y musgos (Richter & A, 2005). La fauna de los ecosistemas andinos se basa principalmente en aves y mamíferos, con alrededor de 80 y 70 especies respectivamente. Los animales más comunes que se encuentran son el tapir (*Tapirus pinchaque*), el venado (*Mazama rufina*), el oso de anteojos

(*Tremarctos ornatus*), el conejo silvestre (*Sylvilagus brasiliensis*), entre otros (Llambí, *et al.*, 2012).

Familia Fabaceae

Origen y distribución de la familia Fabaceae (o Leguminosae)

Las Fabáceas se originaron hace más de 60 millones de años durante el Cretácico. No obstante, hace 38 a 54 millones de años atrás, en el Eoceno, las leguminosas se diversificaron y proliferaron por el mundo (Vázquez, 2019). La familia Fabaceae se considera monofilética, es decir, que todos los individuos dentro de esta familia han evolucionado a partir de un ancestro en común (Stevens, 2009). Takhtajan en 1997 mencionó que las Fabáceas pueden clasificarse en tres subgrupos: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Faboideae (o Papilionoideae).

Los Fabáceas se localizan alrededor de todo el mundo, desde las regiones ecuatoriales hasta las latitudes cercanas a los polos, por ello, su distribución es cosmopolita (Peralta & Royuela, 2019). Las subfamilias Caesalpinioideae y Mimosoideae poseen especies arbóreas que se encuentran en las zonas tropicales y subtropicales. Por otra parte, el subgrupo Faboideae cuenta con especies arbustivas y herbáceas que se encuentran en las zonas templadas (Vázquez, 2019).

Generalidades y características morfológicas de la familia Fabaceae (o Leguminosae)

La familia Fabaceae consta con cerca de 750 géneros y 20000 especies en todo el mundo, excluyendo las regiones desérticas y polares, siendo así la tercer mayor familia de angiospermas en el planeta (Lewis, Schrire, Mackinder, Rico, & Clark, 2013). Las leguminosas representan alrededor del 27% de la producción agrícola mundial y proporcionan al ser humano el 33% de la proteína consumida en la dieta. Otra característica de las Fabáceas es la capacidad que tienen sus raíces de albergar bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, de tal manera que el cultivo de leguminosas contribuye también a la regeneración y fertilización del suelo (Vázquez, 2019).

Las Leguminosas se caracterizan por ser plantas herbáceas, arbóreas, trepadoras, arbustivas, anuales y perennes. Sus hojas generalmente son pinnadas o digitadas, simples o compuestas, algunas sin folios, otras unifoliadas y trifoliadas, frecuentemente las hojas presentan estípulas. Las flores son zigomorfas y en algunas especies actinomorfas, se disponen en racimos, espigas o panículas. La corola es papilionácea, de forma amariposada y presenta 5 pétalos libres; 1 en la parte superior, 2 laterales y 2 inferiores que suelen estar unidos formando una quilla o carena. El cáliz es campanulado y se encuentra formado por 5 sépalos. El androceo consta generalmente con 10 estambres que se encuentran libres o pegados entre sí por filamentos. El fruto es un tipo de legumbre seca, pluriseminada y dehiscente. Las semillas son arriñonadas, con dos cotiledones y una testa gruesa (Peralta & Royuela, 2019; Vázquez, 2019).

Importancia y usos de la familia Fabaceae

La principal importancia de las Fabáceas radica en su alto contenido proteico y el valor nutricional que poseen sus semillas. Los granos de algunas leguminosas han sido utilizados a través de los años para la alimentación de animales y humanos, tanto en el páramo como en otros tipos de ecosistemas. Algunos granos también se han empleado como abono verde y en forrajes (Vázquez, 2019). El color intenso y llamativo de algunas flores Fabáceas ha permitido que esta familia sea de las más visitadas por aves y abejas, que a su vez actúan como polinizadores en la dinámica del páramo y la de otros biomas. Existen también diversas especies de leguminosas que se han utilizado como plantas ornamentales en jardines y parques. Entre otros usos, las Fabáceas se destacan también como productoras de resinas, fuente de fenoles, flavonoides y taninos, esta diversidad de aplicaciones ha permitido que las leguminosas sean de gran importancia en la industria cosmética, farmacéutica, alimenticia y textil (Vázquez, 2019).

Género *Lupinus*

Origen y distribución del género Lupinus

El género *Lupinus* pertenece al orden Fabales, familia Fabaceae y subgrupo Papilionaceae. Este género alberga cerca de 300 especies herbáceas y arbustivas (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2004; Martínez & Acosta, 2020).

Existen diferentes teorías sobre el origen de este género. Drummond (2008) considera que *Lupinus* se originó en Norteamérica, en cambio, Dunn (1984) menciona que su origen fue en Sudamérica. Otros investigadores sostienen que los *Lupinus* se originaron en las costas del Mediterráneo (Barrientos, Montenegro, & Pino, 2002). En Ecuador, desde la época preincaica ya existían reportes de especies de *Lupinus*, originarios de los Andes centrales. Durante el tiempo de la conquista, las semillas de *Lupinus* representaron el alimento principal de los Caranquis y algunas comunidades lo consideraban como un grano divino por su color blanquecino (Estrella, 1998).

Las especies de *Lupinus* se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo (Alderete, *et al.*, 2008). En América Latina, estas especies predominan en las regiones de Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú (Martínez & Acosta, 2020). En Ecuador, la distribución por provincias y el porcentaje de reportes de *Lupinus* se refleja en la Figura 1.

Figura 1

Porcentaje de especies de *Lupinus* reportadas en las regiones y provincias del Ecuador.

Provincia	Especies de <i>Lupinus</i> (%)	Región
Pichincha	44	Sierra
Chimborazo	31	Sierra
Tungurahua	29	Sierra
Bolívar	27	Sierra
Azuay	26	Sierra
Carchi	24	Sierra
Cotopaxi	24	Sierra
El Oro	24	Costa
Napo	24	Oriente
Imbabura	19	Sierra
Loja	11	Sierra
Cañar	5	Sierra
Morona Santiago	3	Sierra
Sucumbíos	3	Oriente
Esmeraldas	3	Costa
Guayas	2	Costa
Santa Elena	2	Costa
Galápagos	0	Insular
Los Ríos	0	Costa
Manabí	0	Costa
Orellana	0	Oriente
Santo Domingo de los Tsáchilas	0	Costa
Zamora Chinchipe	0	Oriente

Nota: Recuperado de (Quintana, 2019).

La mayoría de especies de *Lupinus* se encuentran en el centro de la serranía ecuatoriana, mayoritariamente en las provincias de Pichincha y Chimborazo. No se ha tenido registro de *Lupinus* en la región insular ni en las provincias de Manabí, Los Ríos, Orellana, Santo Domingo de los Tsáchilas y Zamora Chinchipe (Quintana, 2019).

Características generales del género *Lupinus*

Las plantas del género *Lupinus* se caracterizan por crecer en suelos ligeramente ácidos y a temperaturas que van desde los 0 a 28°C (López & Fuentes, 1986). En Ecuador existen *Lupinus* silvestres y domesticados, la mayoría de especies silvestres son nativas de

los andes, se desarrollan con facilidad en suelos de reciente formación y crecen hasta altitudes de 4000m s.n.m (Quintana, 2019).

Las especies del género *Lupinus* son plantas dicotiledóneas anuales o perennes, leñosas o herbáceas y con una altura promedio de entre 1 a 1.5 metros (Alderete, *et al.*, 2008). Las hojas son digitadas, palmaticompuestas y presentan un pecíolo largo, algunas especies son unifoliadas y otras generalmente están compuestas de 6 a 15 folíolos ovalados o lanceolados. La inflorescencia se dispone en espigas o racimos. Las flores poseen corolas amarillas, azules, violetas, blancas o variegadas, el cáliz tiene un borde dentado pubescente, el estandarte es recto y los pétalos forman una quilla incurvada (Martínez & Acosta, 2020). El androceo posee 10 estambres basifijos, el ovario es sécil, el estigma es terminal y el estilo es glabro e incurvado. El fruto es una legumbre o vaina alargada, dehiscente y comprimida lateralmente. Las semillas son de forma redonda u ovalada, lenticulares y generalmente de color marrón, negro, café o blanco. (Barney, 2011; Luna, *et al.*, 2019; Quintana, 2019). Las semillas de *Lupinus* poseen un alto contenido en proteínas y fibra, sin embargo, se han identificado alcaloides quinolizidínicos que confieren cierta toxicidad y limitan el aprovechamiento agronómico de los granos (Pérez, Lagunes, López, Ramos, & Aranda, 2014).

Aplicaciones del género *Lupinus*

En las plantas de *Lupinus*, la semilla es la parte vegetal que más aplicaciones y usos tiene. Las semillas de algunas especies como *L. pubescens* son utilizadas para elaborar insecticidas debido al alto contenido de alcohol triterpénico que poseen (Jiménez & Ramos, 2019). En plantas como *L. mutabilis* y *L. albus* una vez que se remueven los alcaloides de las semillas, estas pueden ser usadas para la alimentación del ganado debido a la alta concentración de proteínas, fibra y ácidos grasos que poseen (Barney, 2011). Las semillas de *L. pubescens* son también empleadas para la restauración de quebradas y bordes de camino (Jiménez & Ramos, 2019). Especies como *L. angustifolius* y *L. luteus* se usan para el forraje y mejoramiento del suelo (Martínez & Acosta, 2020).

***Lupinus pubescens* (Benth) K. T. Hartweg**

Características de L. pubescens

La planta de *L. pubescens* es una especie vegetal terrestre, perenne y con una altura promedio de 80cm. Esta planta se caracteriza por crecer en altitudes de hasta los 4000m s.n.m (Jiménez & Ramos, 2019). El tallo de *L. pubescens* es pubescente, erecto y se ramifica en la parte superior. El pecíolo en las hojas mide de 4 a 8cm de largo y presenta generalmente de 6 a 9 folíolos de forma lanceolada que miden de 4.5 a 8cm de largo y de 9 a 15mm de ancho. La inflorescencia está dispuesta en racimos con brácteas filiformes que miden de 3 a 5.5mm de largo. Las flores presentan una pigmentación violeta con blanco cuya corola se encuentra conformada por 5 pétalos. Los cálices son pubescentes por fuera con un labio superior que mide de 3.4 a 4.8mm de largo y un labio inferior entero con una profundidad de 0.1mm. Los estandartes son orbiculares con alas que miden aproximadamente de 11.5 a 14mm de largo y quillas que forman un ángulo de 5mm. El fruto es una legumbre que mide de 4 a 5cm de largo y cerca de 9mm de ancho. Las semillas son aplanadas y de color café o negro (Jaramillo, 2013; Quintana, 2019).

***Lupinus microphyllus* Desr**

Características de L. microphyllus

La especie de *Lupinus microphyllus* es una planta rastrera de tipo arbustivo con un tamaño que va desde los 0.5 a 3cm de alto y que se caracteriza por ser tolerante a suelos ácidos, sequías y climas fríos (Quintana, 2019). El tallo de *L. microphyllus* es ramificado y presenta vellosidades de color blanco-grisáceo. El pecíolo en las hojas mide de 1 a 2.5cm de largo y consta generalmente con 6 a 8 folíolos de forma lanceolada que miden de 1.5 a 2.8cm de largo y de 2 a 8mm de ancho. La inflorescencia se encuentra dispuesta en racimos pequeños con brácteas filiformes que miden de 1 a 2cm de largo. Las flores son comúnmente de color violeta intenso con blanco y con un largo de hasta 10mm. El fruto es una vaina pubescente que mide 15mm de largo y de 5 a 9mm de ancho (Quintana, 2019; Missouri Botanical Garden, 2022).

***Lupinus tauris* (Benth) K. T. Hartweg**

Características de *L. tauris*

La especie de *L. tauris* es una planta arbustiva de 15 a 60cm de alto que se caracteriza por crecer hasta altitudes de 3900m s.n.m (Herbario de la Universidad del Azuay, 2019). Las hojas de *L. tauris* tienen estípulas y folíolos de forma lanceolada que miden 1cm de largo y 0.5cm de ancho. La inflorescencia se presenta en racimos densos con brácteas filiformes que miden de 3 a 5.4cm de largo. El cáliz de la flor es pubescente con un labio superior que mide de 3.4 a 4.8mm de largo y un labio inferior entero con una hendidura de 0.1mm. Los estandartes son orbiculares con alas que miden de 11.5 a 14mm de largo y quillas que forman un ángulo de 5mm. El fruto es una vaina pequeña de color verde claro que mide de 5 a 6mm. Las semillas son generalmente de color negro (Quintana, 2019).

Parámetros morfológicos de la semilla

Los parámetros morfológicos son características o rasgos fisiológicos y fenológicos medibles que brindan información sobre el crecimiento, supervivencia y rendimiento productivo de algunas especies (Violle, *et al.*, 2007). En las plantas, la semilla es la parte vegetal más comúnmente utilizada para obtener estos parámetros medibles. En las semillas se pueden medir características morfológicas de tipo cuantitativo y cualitativo. Estas características en combinación con datos de tipo fenológico pueden brindar información elemental en el proceso de conservación *ex situ* de especies vegetales (Romero & Pérez, 2016).

Parámetros morfológicos cuantitativos en semillas

Uno de los principales parámetros morfológicos cuantitativos que se puede obtener es el número de semillas por fruto. Este parámetro es esencial para programar y optimizar esfuerzos en la recolección de semillas de una especie. Otra característica fisiológica importante es el tamaño de la semilla, el cual engloba generalmente atributos como el largo,

ancho y grosor. Estos parámetros son claves al momento de recolectar y almacenar semillas (Romero & Pérez, 2016).

El contenido de humedad de las semillas es otra característica cuantitativa asociada con la germinación y tolerancia a la desecación (Daws, *et al.*, 2005). El porcentaje de humedad puede ayudar a determinar el tipo de semillas ya sean ortodoxas o recalcitrantes. Las semillas de comportamiento ortodoxo pueden tolerar la deshidratación y ser almacenadas a temperaturas bajas por largos periodos de tiempo. Por otra parte, las semillas recalcitrantes no toleran la deshidratación y deben ser conservadas por corto tiempo (Romero & Pérez, 2016).

La masa de las semillas también se ha considerado como un parámetro cuantitativo asociado a la capacidad de tolerar la deshidratación (Daws, *et al.*, 2005). Las semillas más pesadas son más propensas a ser recalcitrantes y no resistir la deshidratación, sin embargo, presentan un mayor porcentaje de germinación (Dickie & Pritchard, 2002; Pérez, *et al.*, 2014).

Parámetros morfológicos cualitativos en semillas

Las semillas poseen una gran diversidad de rasgos morfológicos cualitativos que contribuyen al mejoramiento del proceso de conservación *ex situ* de especies vegetales. Algunos de estos parámetros son el color, la forma, el patrón de manchas y la testa o textura de la cubierta de las semillas, la cual en función de su capacidad de absorber agua se clasifica en dura-impermeable o blanda-permeable (Varela & Albornoz, 2013). La testa desempeña funciones esenciales como la de proteger al embrión y controlar los tiempos de germinación. El tipo de testa de una semilla permite predecir el tiempo que se necesita para secar las muestras antes de su conservación (Romero & Pérez, 2016).

Un parámetro cualitativo esencial en las semillas es el tipo de embrión. Este rasgo interno proporciona información acerca del comportamiento germinativo y del tipo de dormancia de las semillas (Baskin, 2014). Determinar el tipo de embrión antes de la

conservación podría predecir posibles comportamientos en las semillas después del almacenamiento. Identificar embriones poco desarrollados permitiría optimizar la germinación acelerando la maduración de las semillas (Romero & Pérez, 2016).

Ensayos de viabilidad de semillas

La viabilidad es la capacidad que tienen las semillas de germinar y desarrollar plántulas en determinadas condiciones ambientales. Para evaluar, cuantificar y determinar la viabilidad de un lote de semillas se debe realizar diversos tipos de ensayos. Entre los ensayos más importantes destacan: el test de tetrazolio y los ensayos de germinación (Pérez & Pita, 2001).

Test de tetrazolio

El test de tetrazolio es un ensayo bioquímico que se utiliza para evaluar la viabilidad de un grupo de semillas (Vargas & Pérez, 2014). La prueba de tetrazolio se fundamenta en la hidratación de los diferentes tejidos de la semilla y en la activación de las rutas metabólicas en el embrión. La mayoría de reacciones bioquímicas que ocurren en la vía metabólica son reacciones de oxidación, por lo que se liberan electrones que son capaces de reducir algunos compuestos químicos. Las sales de cloruro o bromuro de 2,3,5-trifeniltetrazolio son las sustancias más empleadas para detectar la actividad metabólica que se produce en las semillas. Las sales de tetrazolio son incoloras, sin embargo, cuando se reducen se transforman en trifenilformazán. Este último producto es una sustancia estable y de color rojo intenso. Al sumergir un lote de semillas viables en una solución de tetrazolio, los electrones que se liberan de los tejidos del embrión reducirán a las sales y las semillas se teñirán de rojo. Si la muestra empleada tiene tejido muerto, el embrión no cambiará de color y la semilla se considerará como no viable (Pérez & Pita, 2001).

Ensayos de germinación

La germinación es un proceso que empieza con la rehidratación de los diferentes tejidos de la semilla y finaliza cuando la radícula crece atravesando la cubierta seminal

(Pérez & Pita, 2001). En algunos casos la germinación de semillas requiere de la aplicación de pretratamientos para romper la latencia (Pérez, Lagunes, López, Ramos, & Aranda, 2014). Algunos de estos tratamientos son el realizar un corte en la testa, almacenar las semillas a diferentes temperaturas o aplicar giberelinas. Cuando las semillas poseen una testa gruesa o dura se realiza una escarificación mecánica o química para permeabilizarla (Vargas, 2022).

Los ensayos de germinación se pueden evaluar utilizando sustratos, cajas Petri con papel filtro mojado o mediante cultivo *in vitro*. La utilización de sustratos como la tierra, arena y compost han sido eficaces en el proceso de germinación de semillas pesadas y grandes (Vargas & Pérez, 2014). El cultivo *in vitro* y el uso de cajas Petri con papel filtro humedecido permiten regular la germinación de las semillas en cámaras de incubación a temperaturas y fotoperiodos controlados (Vargas & Pérez, 2014). El apareamiento y elongación de la radícula se considera como el principal criterio de germinación en una semilla (Vargas, 2022).

Estrategias para la preservación de la diversidad genética

Las estrategias para la preservación de la biodiversidad vegetal son de tipo *in situ* y *ex situ*. Las técnicas de conservación más utilizadas son las de tipo *ex situ*, debido a que mantienen los componentes de la diversidad biológica como el polen, los tejidos celulares, el ADN y las semillas resguardados fuera de los hábitats frágiles (Romero, 2018). Entre las técnicas más utilizadas para la conservación *ex situ* están el cultivo *in vitro* de semillas y el establecimiento de bancos de germoplasma.

Cultivo in vitro de semillas

El cultivo *in vitro* además de ser un ensayo para evaluar la germinación de semillas es también una estrategia para preservar la diversidad genética de las especies. El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas experimentales utilizadas para la reproducción y crecimiento de explantes u órganos completos de plantas en condiciones

asépticas y controladas (Benavides & Córdova, 2015). En el cultivo *in vitro*, la micropropagación de plantas con características genéticas semejantes a la célula, explante u órgano madre es posible debido a la capacidad de totipotencia celular vegetal (Calva & Pérez, 2005).

La totipotencia celular vegetal es la capacidad que tiene una célula somática para regenerarse en una planta completa y con características semejantes a la planta madre. La capacidad de desarrollo y crecimiento que tienen los explantes vegetales se debe a que cada célula posee en su genoma la información necesaria para replicar cualquier rasgo químico, morfológico y funcional de la planta madre (Calva & Pérez, 2005).

El cultivo *in vitro* de semillas es un tipo de crecimiento organizado en el que se mantienen las características estructurales y el genotipo materno, de esta manera se producen plantas libres de virus y resistentes al estrés biótico o abiótico (Estrada, 2000). El cultivo *in vitro* es un crecimiento organizado que se puede realizar a partir de tejidos meristemáticos o embriones cigóticos. La semilla es el principal explante de tipo cigótico que puede acelerar el desarrollo de la plántula sin la necesidad de un tratamiento pregerminativo (Carillo, *et al.*, 2010).

Bancos de germoplasma

Los bancos de germoplasma surgieron en el siglo XX a partir del convenio sobre Biodiversidad Biológica de 1992 (Romero, 2018). Los bancos de semillas representan una de las estrategias *ex situ* más valiosas para la conservación del germoplasma vegetal y protección de la biodiversidad (Schoen & Brown, 2001). Los bancos de germoplasma *ex situ* proporcionan también herramientas para la investigación continua sobre de los requerimientos de germinación y condiciones de almacenamiento necesarios para la conservación a largo plazo de las semillas (Vargas, 2022).

En Ecuador, el banco de semillas público es administrado por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), el cual conserva cerca de 1800 accesiones de especies agrícolas. Otro banco de germoplasma corresponde al de la

Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), el cual almacena alrededor de 91 acciones de especies forestales distribuidas en los bosques secos del país (Romero, 2018).

Las diferentes estrategias para la preservación de la diversidad genética constituyen una base de datos para la investigación, conservación y recuperación de especies vegetales en ecosistemas frágiles como el páramo.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

Material Vegetal

Recolección y transporte

El material vegetal se obtuvo del Parque Nacional Cayambe Coca y del Parque Nacional Antisana durante el periodo de marzo a junio del 2022. Las semillas de *Lupinus pubescens* (Benth.), *L. microphyllus* (Desr.) y *L. tauris* (Benth.) se obtuvieron del fruto de plantas generalmente ubicadas en los bordes de camino. Previo a la recolección, se determinaron la hora, fecha, altitud y coordenadas de la toma de muestra mediante la aplicación Timestamp Camera Free versión 2022 (disponible en <http://www.timestampcamera.com/>).

Los frutos recolectados de *Lupinus pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* se almacenaron en diferentes fundas ziploc rotuladas con el nombre de la especie y la fecha de toma de muestra. Las muestras fueron transportadas en condiciones asépticas al laboratorio y se depositaron en un lugar fresco a temperatura ambiente.

Pretratamiento del material vegetal

Los frutos recolectados de las 3 especies de *Lupinus* se dispusieron sobre papel periódico y se dejaron secar durante 2 semanas en el laboratorio. Las semillas de *Lupinus pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* se extrajeron utilizando pinzas de laboratorio esterilizadas. Las muestras se colocaron en cajas Petri de plástico y se almacenaron a 4°C hasta realizar los análisis tanto morfológicos como de germinación.

Identificación de las especies

Las plantas de *Lupinus pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* se identificaron utilizando la aplicación de Floramo versión 2019 y la base de datos del Herbario del Instituto Nacional de Biodiversidad – INABIO.

Caracterización morfológica de las semillas

En las semillas de *Lupinus pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* se evaluaron los siguientes parámetros morfológicos cuantitativos: Número de semillas por fruto, tamaño, peso promedio y contenido de humedad. Por otra parte, los parámetros morfológicos cualitativos identificados fueron el tipo de testa y de embrión (Romero & Pérez, 2016).

Parámetros cuantitativos

A continuación, se detallan los parámetros cuantitativos empleados. El número de semillas por fruto de las 3 especies de *Lupinus* se obtuvo a partir de un total de 50 vainas por especie. El tamaño de las semillas (largo, ancho y grosor) se lo realizó a partir de la medición de 100 semillas por especie, utilizando el calibrador vernier. En el caso del peso, para cada ejemplar de *Lupinus*, se consideró un promedio de 1000 semillas utilizando una balanza analítica. El porcentaje de humedad se determinó pesando 100 semillas por especie en bandejas de metal y secándolas al horno a 105°C durante 3h. La humedad final se determinó utilizando la ecuación (1) (Internacional Seed Testing Association [ISTA], 2016).

$$\frac{\text{Pérdida de peso}}{\text{Peso inicial}} \cdot 100 = \frac{M1-M2}{M1} \cdot 100 \quad (1)$$

En donde

M1: peso en gramos inicial de la muestra.

M2: peso en gramos final de la muestra.

Parámetros cualitativos

Los parámetros cualitativos de las semillas de *Lupinus* que se determinaron fueron el color, la forma, el patrón de manchas, el tipo de embrión y la textura de la testa. En 100 semillas por especie se estableció el color dominante mediante una paleta Munsell. El patrón de manchas y la forma de las semillas se identificó mediante el manual de descriptores del género *Lupinus* (Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos [CIRF], 1981). El tipo de embrión de *Lupinus pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* se

identificó en base a la clasificación de embriones realizada por Martin (1946). La testa de las semillas en función al contacto con su superficie se catalogó como rugosa o lisa. Por otra parte, la textura de la testa se catalogó como dura o blanda en base a si esta se quebraba o no con el contacto manual (Romero & Pérez, 2016).

Ensayo de viabilidad de las semillas

Prueba colorimétrica de tetrazolio

En esta prueba se escogieron 80 semillas aleatorias por cada especie de *Lupinus* y se colocaron en remojo durante 24h previo a la tinción. Al finalizar el remojo, las semillas se cortaron longitudinalmente y se sumergieron en una solución al 0.5% y 1% de Cloruro de 2, 3, 5-Trifenil-2H-Tetrazolio (TZ) durante 24 y 48h. En la Tabla 1, se muestra la distribución de los tratamientos con las diferentes concentraciones de tetrazolio y tiempos de inmersión. El pH de la solución de tetrazolio se ajustó a 6,5 utilizando una solución tampón de 1.816g de ortofosfato dihidrógeno de potasio (KH₂PO₄) y de 2.842g de fosfato monobásico de sodio anhidro (NaH₂PO₄) (ISTA, 2016).

Tabla 1

Distribución de tratamientos de las diferentes concentraciones de tetrazolio y tiempos de inmersión de las semillas de Lupinus pubescens, L. microphyllus y L. tauris.

Tratamientos	Concentración de tetrazolio [%]	Tiempo de inmersión [Horas]
T1	0,5	24
T2	1	24
T3	0,5	48
T4	1	48

La unidad experimental para cada tratamiento, de las 3 especies de *Lupinus*, fue una caja Petri de vidrio con 10 semillas sumergidas en 10mL de solución de tetrazolio. Se realizaron 2 repeticiones para cada tratamiento. La variable que se evaluó fue el porcentaje de viabilidad, utilizando la ecuación (2) (Gómez, Guevara & Narváez, 2008).

$$\%viabilidad = \frac{\text{Semillas viables}}{\text{Total de semillas}} \cdot 100 \quad (2)$$

En donde:

Semillas viables: número de semillas de cada tratamiento con embrión teñido de rojo.

Total de semillas: número de semillas utilizadas en cada tratamiento.

Ensayo de desinfección de las semillas

Las semillas de *Lupinus pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* se desinfectaron siguiendo el protocolo de Benavides y Córdoba (2015). Las semillas de las 3 especies de *Lupinus* se sumergieron en alcohol etílico (C₂H₅OH) al 90% durante 10 segundos. Posteriormente, las muestras se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) a concentraciones de 1.5, 3 y 5% durante 6 minutos. En la Tabla 2, se muestra la distribución de los tratamientos con las diferentes concentraciones hipoclorito de sodio (NaClO). A continuación, las semillas se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Posteriormente, en una cámara de flujo laminar las semillas se sembraron en cajas Petri de vidrio con medio MS (Murashige y Skoog) a un ¼ de concentración, suplementado con sacarosa al 3% y solidificado con 2.2gL⁻¹ de agar. El pH del medio se ajustó a 5.8 con hidróxido de sodio (NaOH; [1N]). Las semillas se incubaron a temperatura ambiente durante 14 días. Los componentes del medio MS se muestran en el Apéndice 1.

Tabla 2

Concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) utilizadas para la desinfección de las semillas de *Lupinus pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris*.

Tratamiento	Concentración de Hipoclorito de Sodio (NaClO) [%]
T1	1.5
T2	3
T3	5

La unidad experimental para cada tratamiento, de las 3 especies de *Lupinus*, fue un lote de 10 tubos de ensayo con una semilla sembrada por cada tubo en 5mL de medio. Se realizaron 3 réplicas para cada tratamiento. La variable que se evaluó, al cabo de 14 días después de la siembra, fue el porcentaje de contaminación mediante la siguiente ecuación (3).

$$\% \text{contaminación} = \frac{\text{Semillas contaminadas}}{\text{Total de semillas}} \cdot 100 \quad (3)$$

En donde:

Semillas contaminadas: número de semillas de cada tratamiento con presencia de agentes patógenos (hongos o bacterias).

Total de semillas: número de semillas utilizadas en cada tratamiento.

Ensayo de germinación *in vitro* de las semillas

La germinación *in vitro* de las 3 especies de *Lupinus* se realizó en una cámara de flujo laminar previamente esterilizada durante 30 minutos con luz UV. Las semillas desinfectadas de *Lupinus pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* fueron escarificadas

mecánicamente mediante la realización de un corte o incisión en la testa. Las semillas de las 3 especies de *Lupinus* se introdujeron en medio MS (Murashige y Skoog) de concentración media, suplementado con sacarosa al 3% y con ácido giberélico (AG₃) a concentraciones de 0, 0.5 y 1mg/L (García, 1991). En la Tabla 3, se muestra la distribución de los tratamientos con las diferentes concentraciones de ácido giberélico (AG₃). El medio de cultivo se solidificó con 2.2gL⁻¹ de Agar y el pH se ajustó a 5.8 con hidróxido de sodio (NaOH; [1N]). Las semillas cultivadas se incubaron en condiciones de luz a 21°C durante 14 días en una cámara de germinación. Los componentes del medio MS se muestran en el Apéndice 1.

Tabla 3

Concentraciones de ácido giberélico (AG₃) utilizadas para la germinación de las semillas de Lupinus pubescens, L. microphyllus y L. tauris.

Tratamiento	Concentración de Ácido Giberélico (AG ₃) [mg/L; %]
T1	0
T2	0.5
T3	1

La unidad experimental para cada tratamiento, de las 3 especies de *Lupinus*, fue un lote de 10 tubos de ensayo con una semilla sembrada por cada tubo en 5mL de medio. Se realizaron 3 réplicas para cada tratamiento. Las variables que se evaluaron fueron: la capacidad germinativa, la germinación acumulativa, el tiempo de latencia y la velocidad de germinación. Todas estas variables se evaluaron en función de las concentraciones de ácido giberélico utilizado.

La capacidad germinativa representa el porcentaje de germinación final y se calculó utilizando la ecuación (4).

$$\% \text{germinación final} = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Total de semillas}} \cdot 100 \quad (4)$$

En donde:

Semillas germinadas: número de semillas (de cada tratamiento) que desarrollan una radícula visible superior a 1mm en 14 días.

Total de semillas: número de semillas utilizadas en cada tratamiento.

La germinación acumulativa representa el porcentaje de semillas germinadas a lo largo del tiempo de incubación, la cual se utilizó para observar la máxima germinación alcanzada y la homogeneidad de las variables. En los lotes de muestra, al observar la primera semilla germinada, se procedió a calcular la germinación acumulativa cada 2 días mediante la ecuación (5).

$$\% \text{germinación acumulativa} = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Total de semillas}} \cdot 100 \quad (5)$$

En donde:

Semillas germinadas: número de semillas (de cada tratamiento) que van germinando cada 2 días.

Total de semillas: número de semillas utilizadas en cada tratamiento.

El tiempo de latencia es el tiempo en el que se desarrolla la radícula e inicia la germinación. La velocidad de germinación es la relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación, se calculó mediante la ecuación (6).

$$VG = \frac{\sum n}{t} \quad (6)$$

En donde:

$\sum n$: número de semillas germinadas en cada tratamiento.

t: tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla en cada tratamiento.

Análisis estadístico

Estadística descriptiva de la caracterización de los parámetros morfológicos

En la estadística descriptiva de los parámetros morfológicos cuantitativos se analizó el número de semillas por fruto, el tamaño, el peso y el contenido de humedad. El número promedio de semillas por fruto de cada especie de *Lupinus* se calculó a partir de 5 lotes de 10 vainas cada uno. El promedio y desviación estándar del tamaño de cada semilla se obtuvo de la medición del largo, ancho y grosor de 5 lotes de 20 semillas para cada especie. El peso se calculó a partir de 10 lotes de 100 semillas por especie. Los valores obtenidos se calcularon mediante el software Excel versión 2019 y se graficaron en el software estadístico InfoStat versión 2020.

Diseño experimental para el ensayo de viabilidad

El análisis para el ensayo de viabilidad se realizó mediante un diseño factorial 2^2 completamente al azar. Se ejecutaron 2 repeticiones de 10 semillas en cada tratamiento y por cada especie de *Lupinus*. Para verificar la normalidad de los datos se realizó el test de Shapiro-Wilks. Para los tratamientos con valores paramétricos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA). En cambio, para los tratamientos con datos no paramétricos se aplicó la prueba de Kruskal Wallis. Las medias calculadas se compararon por medio de la prueba de Duncan con un nivel de significancia ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat versión 2020.

Diseño experimental para la desinfección de semillas

En este análisis se aplicó un Diseño Completamente al Azar con 3 réplicas de 10 semillas cada una. El factor que se evaluó fue la concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) a 3 concentraciones distintas (1.5, 3 y 5%). Para corroborar si las variables obtenidas seguían una distribución normal se empleó la prueba de Shapiro-Wilks. A continuación, se aplicó un análisis de varianza ANOVA para los datos que siguieron una distribución normal y una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para los datos que no

siguieron una distribución normal. En la prueba de diferencia entre medias se utilizó el método de rangos múltiples de Duncan con ($p < 0.05$). El procesamiento de los datos obtenidos se realizó mediante el software InfoStat versión 2020.

Diseño experimental para la germinación de semillas

En esta prueba se aplicó un Diseño Completamente al Azar con 3 réplicas de 10 semillas cada una. El factor a considerar fueron las diversas concentraciones de ácido giberélico utilizado (0, 0.5 y 1%). Para corroborar si las variables obtenidas siguieron una distribución normal se empleó el método de Shapiro-Wilks. A continuación, se aplicó un análisis de varianza ANOVA para los datos que siguieron una distribución normal. En cambio, para los valores no paramétricos se aplicó el test de Kruskal Wallis. En la prueba de diferencia entre medias se utilizó el método de rangos múltiples de Duncan con ($p < 0,05$). El procesamiento de los datos obtenidos se realizó mediante el software InfoStat versión 2022.

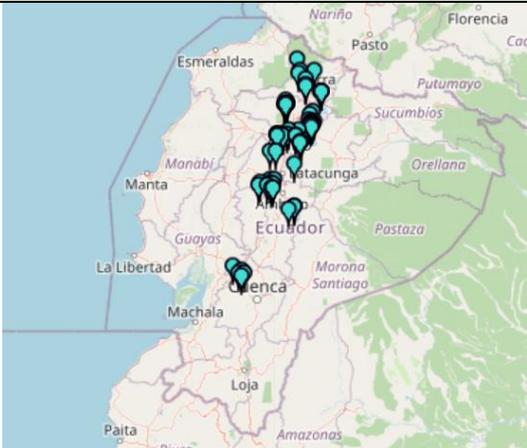
CAPÍTULO IV: RESULTADOS

Descripción morfológica de las especies del género *Lupinus*

La descripción morfológica de las especies de estudio se realizó para obtener una línea base con información relacionada a las especies de la familia *Fabaceae*. Los datos de *Lupinus pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* como hábitat, forma de vida, descripción morfológica, entre otras características, se muestran a manera de ficha técnica. En la Figura 2 se observa el ejemplo de ficha utilizado para la descripción de *L. microphyllus*. Los datos del resto de especies se encuentran en Apéndices.

Figura 2

Ficha técnica de *Lupinus microphyllus* Desr.

 <p>Foto: Sandoval, C.</p>	DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ESPECIE	
	<p>Nombre científico: <i>Lupinus microphyllus</i> Desr. Familia: Fabaceae Rango altitudinal: 2500 – 4500 msnm Forma de vida: Arbustivo</p>	
	MORFOLOGÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA ESPECIE	
	<p>Flor: Color morado con blanco en racimos pequeños Hojas: Peciolos cortos y de 6 a 8 foliolos de 1 a 3cm de largo Tallo: Velloosidades de color blanco Fruto: Legumbre dehiscente de 2 a 3cm de largo</p>	
DATOS ADICIONALES	DISTRIBUCIÓN	
<p>Usos: Restauración de suelos Propiedades: anti bactericidas</p>	<p>Azuay, Bolívar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Napo, Pichincha, Tungurahua</p>	
<p>Fuente: Quintana, W. (2019). Sinopsis del Género Lupinus (Fabaceae) Presentes en la Provincia de Cotopaxi. Smith, C. P. 1944. The genus Lupinus in Ecuador. 23–25: 364–390. In C. P. Smith Sp. Lupinorum. C. P. Smith, Saratoga. Jørgensen, P. M. & C. Ulloa Ulloa. 1994. Seed plants of the high Andes of Ecuador—A checklist. AAU Rep. 34: 1–443.</p>		

Caracterización morfológica de las semillas del género *Lupinus*

En las semillas de las tres especies de *Lupinus* se realizó una caracterización morfológica cualitativa y cuantitativa. Los parámetros cualitativos que se identificaron fueron el color, el patrón de manchas, la forma, el tipo de testa y el tipo de embrión. Por otra parte, los parámetros cuantitativos que se determinaron fueron el número de semillas por fruto, el tamaño, el peso promedio y el contenido de humedad. La determinación de estos

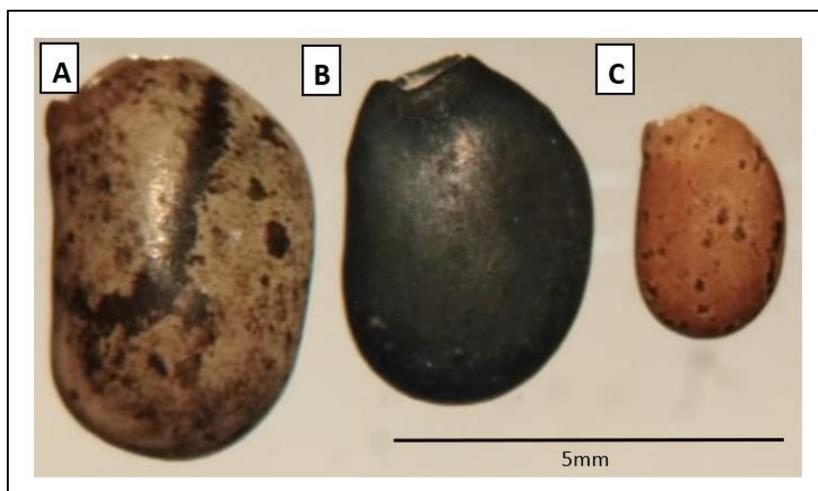
párametros es importante para la creación de una base de datos con información necesaria en la aplicación de procesos de conservación.

Parámetros cualitativos

La forma, el color y el patrón de manchas de las semillas de *Lupinus pubescens* (Benth.), *L. microphyllus* (Desr.) y *L. tauris* (Benth.) se muestran en la Figura 3. En base a estas características se identificó que la forma de las tres especies de *Lupinus* fue oval aplanada. El color predominante en *L. pubescens* fue negro y este no presentó ningún patrón de manchas. Por otra parte, las semillas de *L. microphyllus* fueron principalmente de color naranja y con manchas negras distribuidas en forma salpicada. Se observó que en *L. tauris* el color dominante fue el gris claro, con manchas salpicadas de color negro y una franja en forma de ceja a ambos lados de la testa.

Figura 3

Semillas del género Lupinus recolectadas en el páramo.



*Nota: Semillas de: A) *Lupinus tauris* (Benth.), B) *L. pubescens* (Benth.), C) *L. microphyllus* (Desr.).*

El detalle de las características morfológicas de forma, color y patrón de manchas encontradas en las semillas del género *Lupinus* se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Forma, color predominante y patrón de manchas de las tres especies de Lupinus.

Especie	Forma	Color predominante	Patrón de manchas
<i>L. pubescens</i>	Oval aplanada	Negro	Ninguna
<i>L. microphyllus</i>	Oval aplanada	Naranja	Salpicada
<i>L. tauris</i>	Oval aplanada	Gris claro	En ceja/Salpicada

Nota: La identificación de la forma, color y manchas se realizó a partir de 50 semillas por especie.

Adicionalmente, se identificaron en las semillas de las tres especies de este género los tipos de embrión y de testa que presentaron. Se encontró que en las tres especies de *Lupinus* el embrión fue de tipo axial doblado, la testa dura y de textura lisa. Estos datos se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5

Tipo de embrión, tipo de testa y textura de testa de las tres especies de Lupinus.

Especie	Tipo de embrión	Textura de testa	Tipo de testa
<i>L. pubescens</i>	Axial doblado	Lisa	Dura
<i>L. microphyllus</i>	Axial doblado	Lisa	Dura
<i>L. tauris</i>	Axial doblado	Lisa	Dura

Nota: La identificación del tipo de embrión y testa se realizó en 10 semillas por especie.

Parámetros cuantitativos

Número de semillas por fruto

En la determinación del número promedio de semillas por fruto de las tres especies de *Lupinus* estudiadas, se encontró que *L. microphyllus* presentó el mayor número de semillas con un valor de 4.27 ± 1.24 por fruto en comparación a las otras especies. Las especies de *L. pubescens* y *L. tauris* presentaron en promedio un valor de 3.06 ± 1.11 y 4.13 ± 1.13 semillas por fruto respectivamente. En la Tabla 6 se detallan estos resultados.

Tabla 6

Número de semillas por fruto de las tres especies de *Lupinus*.

Especie	Número de semillas por fruto
<i>L. pubescens</i>	3.06 ± 1.11
<i>L. microphyllus</i>	4.27 ± 1.24
<i>L. tauris</i>	4.13 ± 1.13

Nota: La tabla muestra en unidades el valor promedio y la desviación estándar del número de semillas encontradas en 50 frutos.

Tamaño, peso y contenido de humedad de las semillas

Las dimensiones que se obtuvieron para determinar el tamaño en las semillas de *Lupinus* fueron el largo, ancho y grosor. Se encontró que *L. tauris* posee las más semillas más grandes en comparación a las otras especies de *Lupinus*. Sin embargo, entre las especies de *L. tauris* y *L. pubescens* las diferencias del largo, ancho y grosor fueron menores en comparación a las variaciones de tamaño entre *L. tauris* y *L. microphyllus*, donde estas variaciones fueron mayores. Los valores del tamaño en las semillas de las tres especies de *Lupinus* se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7

Valores del largo, ancho y grosor de las semillas de las tres especies de *Lupinus*.

Especie	Largo (cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)
<i>L. pubescens</i>	0.455 ± 0.020	0.339 ± 0.023	0.214 ± 0.019
<i>L. microphyllus</i>	0.296 ± 0.016	0.205 ± 0.012	0.133 ± 0.016
<i>L. tauris</i>	0.538 ± 0.044	0.374 ± 0.035	0.245 ± 0.022

Nota: La tabla muestra el valor promedio y la desviación estándar de la medición del largo, ancho y grosor de 100 semillas por especie.

Al analizar el peso promedio de las tres especies de *Lupinus* se observó que las semillas de *L. tauris* fueron las más pesadas con un valor de 2.634 ± 0.110g. En cambio, las semillas de *L. microphyllus* fueron las más ligeras con un peso de 0.493 ± 0.014g. Por otro lado, al revisar el contenido de humedad se observó que los porcentajes más altos fueron los de *L. pubescens* y *L. tauris* con 7.775 ± 0.163 y 7.990 ± 0.133% respectivamente. En cambio, *L. microphyllus* fue la especie con el menor porcentaje de humedad en semillas (6.954 ± 0.012%). Los datos de peso y contenido de humedad de las tres especies de *Lupinus* se muestran en la Tabla 8. Todos los datos analizados permitirán determinar la calidad de las semillas para futuros planes de conservación.

Tabla 8

Valores del peso y contenido de humedad de las tres especies de *Lupinus*.

Especie	Peso (g)	Contenido de humedad (%)
<i>L. pubescens</i>	2.217 ± 0.018	7.775 ± 0.163
<i>L. microphyllus</i>	0.493 ± 0.014	6.954 ± 0.012
<i>L. tauris</i>	2.634 ± 0.110	7.990 ± 0.133

Nota: La tabla muestra el valor promedio y la desviación estándar del peso y contenido de humedad de 100 semillas por especie

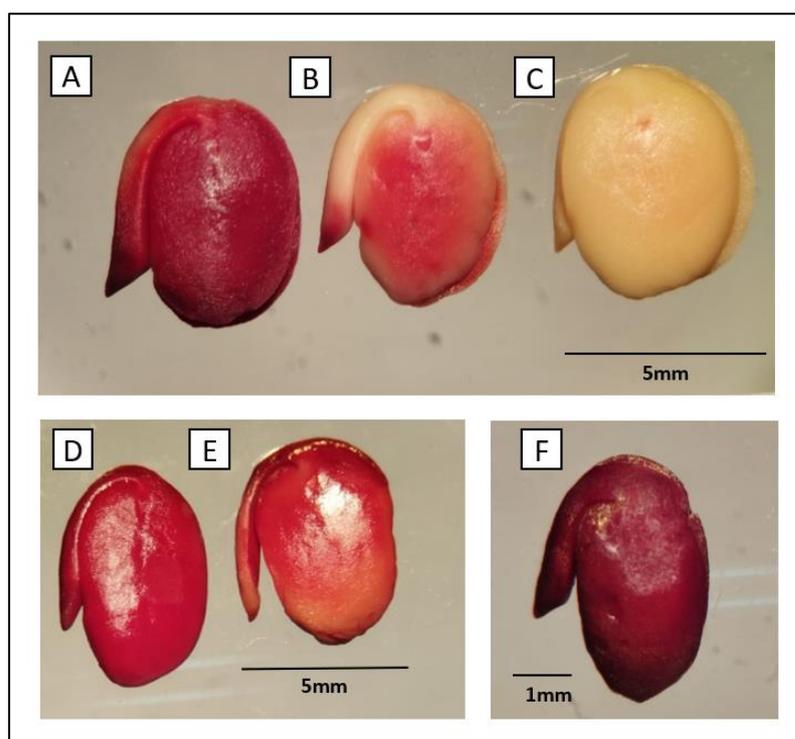
Ensayo de viabilidad de las semillas del género *Lupinus*

Prueba colorimétrica de tetrazolio (TZ)

La prueba bioquímica de tetrazolio permitió identificar a las semillas viables de cada uno de los lotes analizados. En la Figura 4 se muestran semillas de *Lupinus* teñidas con TZ, donde en *L. pubescens* se observan semillas viables con una coloración roja intensa de manera uniforme, semillas no viables con menos del 1/3 de la radícula y cotiledón teñidos y semillas sin tinción (Figura 4 A, B y C), adicionalmente se muestran semillas viables de *L. tauris* (Figura 4 D y E) y de *L. microphyllus* (Figura 4 F).

Figura 4

Tinción con tetrazolio de las diferentes semillas de Lupinus.



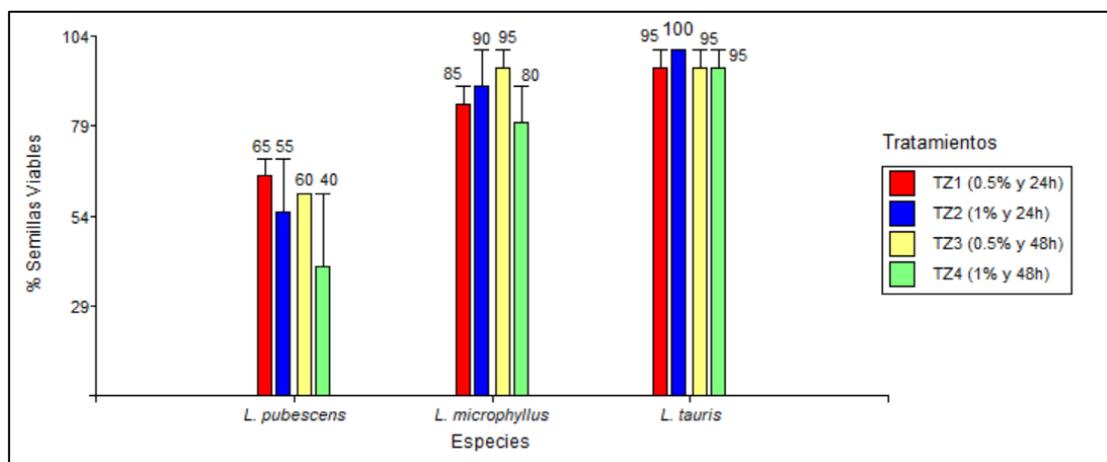
Nota: Semillas del género *Lupinus*: A) Semilla viable de *L. pubescens*, B) Semilla no viable (menos del 1/3 de la radícula y cotiledón teñidos) de *L. pubescens*, C) Semilla no viable (sin tinción) de *L. pubescens*, D) Semilla viable de *L. tauris*, E) Semilla viable (más del 1/3 de la radícula y cotiledón teñidos) de *L. tauris*, F) Semilla viable de *L. microphyllus*.

La viabilidad de las semillas de las tres especies de *Lupinus* se analizó mediante pruebas estadísticas. Se encontró mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilks que en las especies de *L. pubescens* y *L. tauris* los datos de viabilidad no siguieron una distribución normal. En cambio, los valores de viabilidad en *L. microphyllus* fueron paramétricos. En la prueba de Kruskal Wallis para *L. pubescens* y *L. tauris* los p-valores que se revelaron 0.7143 y 0.999 respectivamente, fueron mayores al estadístico de prueba ($\alpha = 0.05$) con lo que se determinó que no existen diferencias significativas entre los 4 tratamientos empleados (TZ1, TZ2, TZ3 y TZ4) para estas dos especies. En *L. microphyllus* se encontró mediante el análisis de varianza ANOVA que el p-valor 0.6151 fue mayor al estadístico de prueba, determinando también que no existe diferencia significativa entre los tratamientos empleados. Los p-valores obtenidos de cada especie de *Lupinus* en las pruebas de Shapiro-Wilks, análisis de varianza ANOVA, Kruskal Wallis se resumen en el Apéndice 2 y el test de Duncan se muestra en el Apéndice 3.

Los ensayos estadísticos previos para determinar la viabilidad en las semillas de las tres especies de *Lupinus* no revelaron una diferencia significativa entre los tratamientos aplicados. En base a esto, para identificar el mejor tratamiento se realizaron gráficos de barras en base al porcentaje de viabilidad. En la Figura 5 se muestran los tratamientos con los que se obtuvo el mayor porcentaje de viabilidad en cada especie de *Lupinus*.

Figura 5

Porcentajes de viabilidad de cada tratamiento aplicado en las tres especies de *Lupinus*.



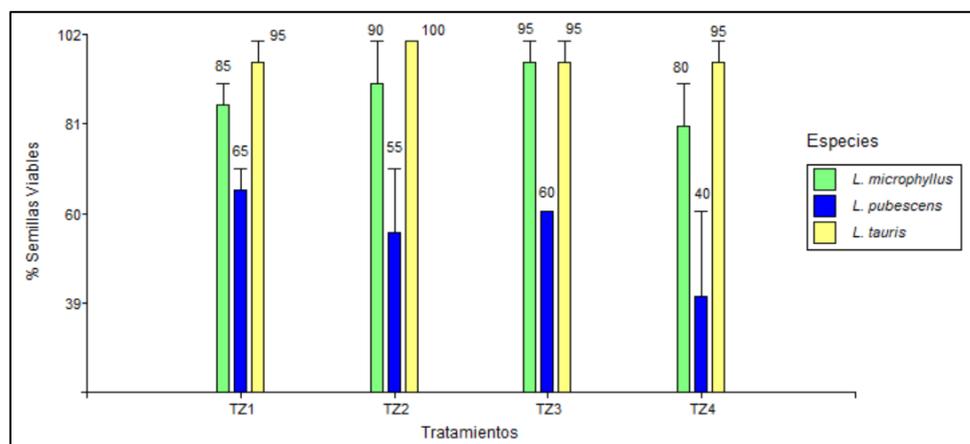
Nota: Tratamientos de viabilidad en semillas del género *Lupinus*: TZ1 (tetrazolio al 0.5% y tiempo de inmersión de 24h), TZ2 (tetrazolio al 1% y tiempo de inmersión de 24h), TZ3 (tetrazolio al 0.5% y tiempo de inmersión de 48h), TZ4 (tetrazolio al 1% y tiempo de inmersión de 48h).

En esta grafica podemos observar que en *L. pubescens* el tratamiento con 0.5% de tetrazolio y un tiempo de inmersión de 24h obtuvo el porcentaje de semillas viables más alto con un 65% en comparación al resto de tratamientos. Para *L. microphyllus* el porcentaje de viabilidad más alto con un valor del 95% se obtuvo con TZ al 0.5% y sumergiendo las semillas durante 48h. En cambio, en *L. tauris* el tratamiento con 1% de tetrazolio y 24h de inmersión permitió obtener un porcentaje de viabilidad del 100%.

El porcentaje de viabilidad que se obtuvo en las tres especies de *Lupinus* respecto a cada tratamiento aplicado se muestra en la Figura 6. Este análisis se realizó para determinar que especie de *Lupinus* fue la más viable.

Figura 6

Porcentaje de viabilidad de las tres especies de *Lupinus* respecto a cada tratamiento aplicado.



Nota: Tratamientos de viabilidad en semillas del género *Lupinus*: TZ1 (tetrazolio al 0.5% y tiempo de inmersión de 24h), TZ2 (tetrazolio al 1% y tiempo de inmersión de 24h), TZ3 (tetrazolio al 0.5% y tiempo de inmersión de 48h), TZ4 (tetrazolio al 1% y tiempo de inmersión de 48h).

En esta figura se observó que las semillas de *L. tauris* fueron más viables en los tratamientos TZ1 con un 95%, TZ2 con un 100% y TZ4 con un 95%, que las semillas de *L. pubescens* y *L. microphyllus*. En el tratamiento TZ3 las semillas de *L. tauris* y *L. microphyllus* obtuvieron el mismo porcentaje de viabilidad del 95%. Las semillas menos viables de las tres especies fueron las de *L. pubescens* con porcentajes de viabilidad de 65, 55, 60 y 40% en los tratamientos TZ1, TZ2, TZ3 y TZ4 respectivamente.

En la Tabla 9 se resume el porcentaje de viabilidad que se obtuvo en cada especie de *Lupinus* y respecto a cada tratamiento aplicado.

Tabla 9

Porcentaje de viabilidad de las semillas de las tres especies de *Lupinus* respecto a cada tratamiento de tetrazolio aplicado.

Especie	Semillas Viables (%)			
	TZ1	TZ2	TZ3	TZ4
<i>L. pubescens</i>	65	55	60	40
<i>L. microphyllus</i>	85	90	95	80
<i>L. tauris</i>	95	100	95	95

Nota: Tratamientos de viabilidad en las semillas del género *Lupinus*: TZ1 (tetrazolio al 0.5% y tiempo de inmersión de 24h), TZ2 (tetrazolio al 1% y tiempo de inmersión de 24h), TZ3 (tetrazolio al 0.5% y tiempo de inmersión de 48h), TZ4 (tetrazolio al 1% y tiempo de inmersión de 48h).

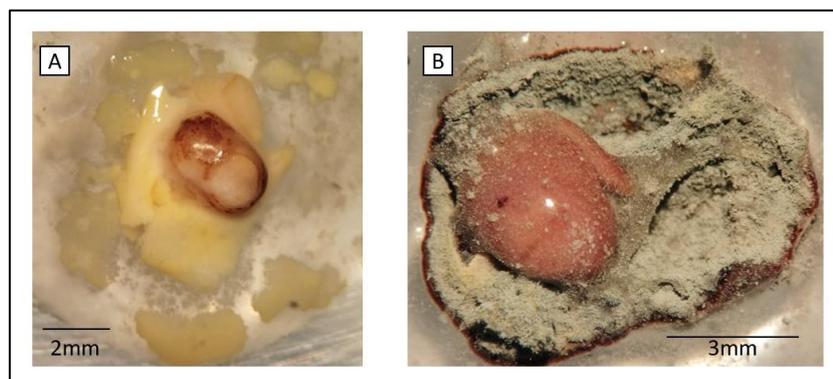
En el test colorimétrico de tetrazolio se observó que los tratamientos que mejor tiñeron y permitieron observar la viabilidad en las semillas fueron el tratamiento TZ1 (tetrazolio al 0.5% y tiempo de inmersión de 24h) en *L. pubescens*, el tratamiento TZ3 (tetrazolio al 0.5% y tiempo de inmersión de 48h) en *L. microphyllus* y el TZ2 (tetrazolio al 1% y tiempo de inmersión de 24h) en *L. tauris*.

Desinfección de las semillas

Previo a estandarizar las condiciones de germinación de las tres especies de *Lupinus* fue necesario establecer un protocolo de desinfección para evitar la contaminación de las muestras. En el ensayo de desinfección se evaluó la presencia de agentes infecciosos en las semillas de *Lupinus*. En la Figura 7 A se muestra una semilla de *L. microphyllus* con contaminación bacteriana, en cambio en la Figura 7 B se observa una semilla de *L. pubescens* contaminada con hongos.

Figura 7

Semillas de *Lupinus* contaminadas con agentes infecciosos.



Nota: Semillas del género *Lupinus*: A) Semilla de *L. microphyllus* con presencia de bacteria, B) Semilla de *L. pubescens* contaminada con hongo.

Con el objetivo de determinar la desinfección en estas semillas se realizaron análisis estadísticos en base al porcentaje de contaminación. Los porcentajes de contaminación obtenidos en las semillas de las tres especies de *Lupinus* siguieron una distribución normal, esto se corrobora mediante la prueba de Shapiro-Wilks. En el análisis de varianza ANOVA de los datos de contaminación, se obtuvieron para *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* p-valores de 0.0214, 0.0362 y 0.0002 respectivamente. Todos los p-valores calculados fueron menores al estadístico de prueba ($\alpha = 0.05$), revelando que existen diferencias significativas entre los tratamientos TD1, TD2 y TD3.

En el test de Duncan se encontró que para *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* el tratamiento TD1 tuvo la media más alta de contaminación en cada especie, los cuales fueron 26.67, 43.33 y 63.33% respectivamente. En *L. pubescens* TD1 fue diferente significativamente a los tratamientos TD2 y TD3. Por otra parte, en *L. microphyllus* se reveló que TD2 no fue significativamente diferente con respecto a TD1 y a TD3. En *L. tauris* se observó que TD1, TD2 y TD3 fueron diferentes significativamente entre sí. Los valores estadísticos obtenidos de cada especie de *Lupinus* en las pruebas de Shapiro-Wilks y de análisis de varianza ANOVA se muestran en el Apéndice 4. El test de Duncan se resume en el Apéndice 5.

Con la finalidad de determinar que tratamiento obtuvo la mejor desinfección en las especies de *Lupinus*, se calcularon los porcentajes de semillas contaminadas con hongos o bacterias en cada tratamiento aplicado. Se encontró que en *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* el tratamiento TD3 contaminó únicamente al 3.33, 6.67 y 16.67% de las semillas respectivamente. En la Tabla 10 se resumen los porcentajes de semillas contaminadas según cada tratamiento aplicado en las tres especies de *Lupinus*.

Tabla 10

Porcentaje de contaminación de las tres especies de Lupinus.

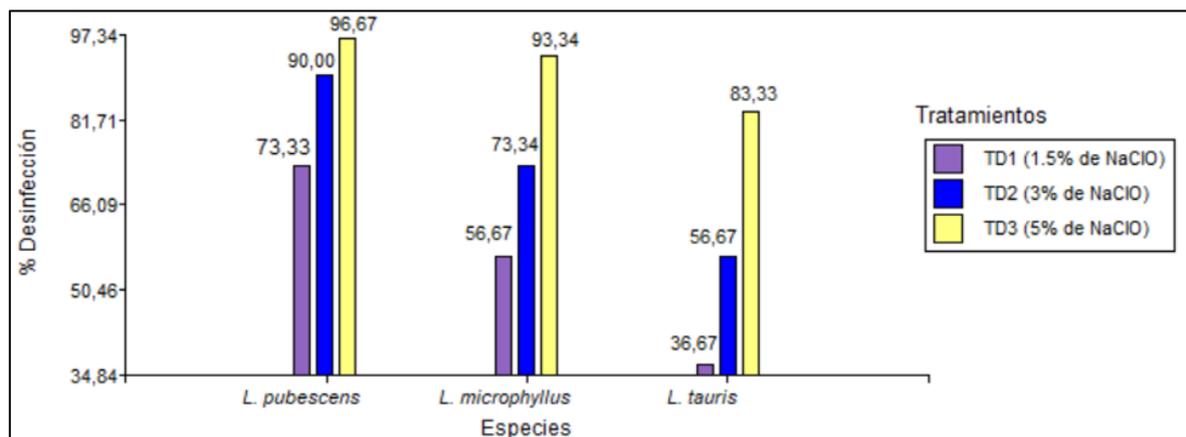
Especies	Semillas contaminadas (%)		
	TD1	TD2	TD3
<i>L. pubescens</i>	26.67	10	3.33
<i>L. microphyllus</i>	43.33	26.66	6.66
<i>L. tauris</i>	63.33	43.33	16.67

Nota: Tratamientos de desinfección en las semillas del género *Lupinus*: TD1 (NaClO al 1.5% de), TD2 (NaClO al 3%), TD3 (NaClO al 5%).

La determinación del mejor tratamiento de desinfección para las semillas de *Lupinus* se obtuvo mediante un gráfico de barras. En la Figura 8 se observan los porcentajes de desinfección obtenidos después de la aplicación de los tratamientos TD1, TD2 y TD3.

Figura 8

Porcentajes de desinfección en las semillas de las tres especies de Lupinus.



Nota: Tratamientos en semillas del género *Lupinus*: TD1 (NaClO al 1.5% de), TD2 (NaClO al 3%), TD3 (NaClO al 5%).

Se encontró que el tratamiento TD3 desinfectó a las semillas de *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* en un 96.67%, 93.34% y 83.33% respectivamente. Estos resultados mostraron que el mejor tratamiento de desinfección para las semillas de las tres especies de *Lupinus* fue con hipoclorito de sodio al 5%. Se observó además que en ningún tratamiento se produjo oxidación o necrosis en las muestras.

Germinación de las semillas del género *Lupinus*

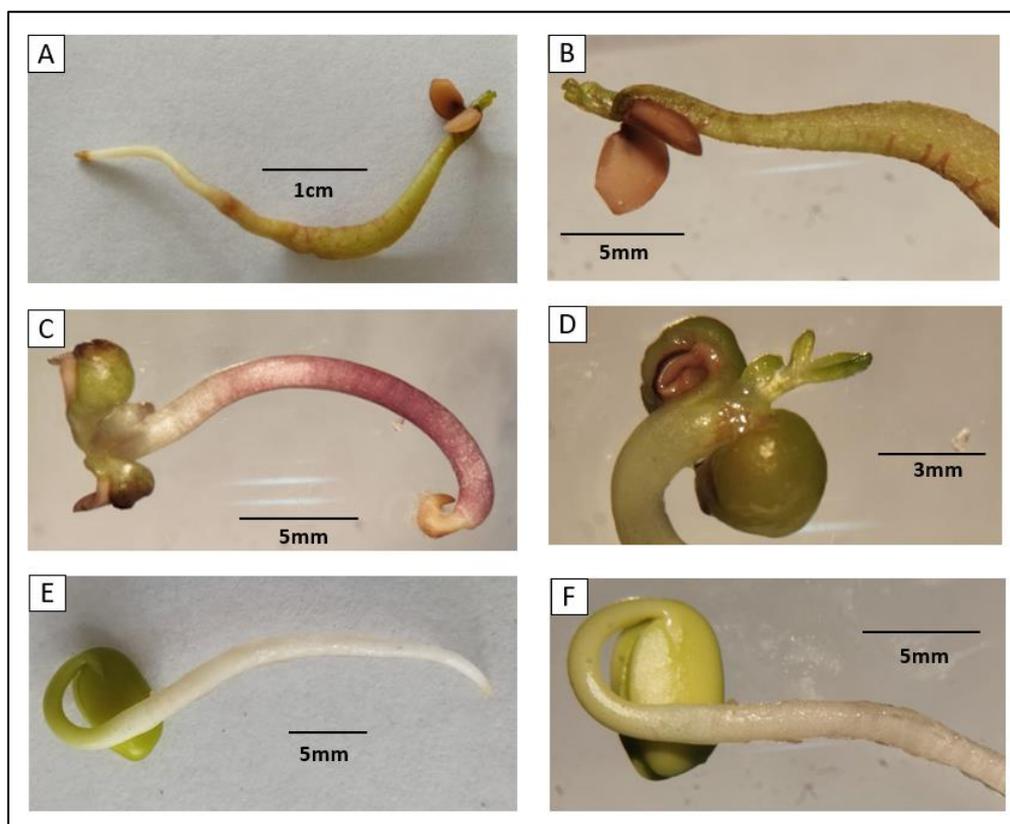
Las condiciones de germinación en las semillas de las tres especies de *Lupinus* se estandarizaron en base a diferentes concentraciones de ácido giberélico, los tratamientos fueron TG1 (AG₃ al 0%), TG2 (AG₃ al 0.5%), TG3 (AG₃ al 1%). Se evaluó la capacidad germinativa, el tiempo de latencia, la velocidad de germinación y la germinación acumulativa en las semillas de *L. pubescens* (Benth.), *L. microphyllus* (Desr.) y *L. tauris* (Benth.).

Capacidad germinativa

La capacidad de germinación se determinó en base al número de semillas que desarrollaron una plántula al final de los ensayos. Las semillas germinadas de *Lupinus* mediante cultivo *in vitro* se muestran en la Figura 9. En *L. pubescens* (Figura 9 A y B) y *L. microphyllus* (Figura 9 C y D) se observó el apareamiento de hojas primarias, radícula e hipocótilo al final de los 15 días de germinación. En cambio, en *L. tauris* (Figura 9 E y F) solo se observó el apareamiento de hojas primarias y radícula.

Figura 9

Semillas de las tres especies de *Lupinus* germinadas.



Nota: Semillas del género *Lupinus*: A) Semilla de *L. pubescens* con radícula, hipocótilo y hojas primarias expuestas, B) Semilla de *L. pubescens* con hipocótilo y hojas primarias expuestas, C) Semilla de *L. microphyllus* con radícula y hojas primarias expuestas, D) Semilla de *L. microphyllus* con hipocótilo y hojas primarias expuestas, E) Semilla de *L. tauris* con hojas primarias y radícula expuestas, F) Semilla de *L. tauris* con hojas primarias expuestas.

A partir de estos resultados se analizaron mediante pruebas estadísticas los porcentajes de germinación. Los porcentajes en *L. pubescens* y *L. microphyllus* siguieron una distribución normal. En cambio, en las semillas de *L. tauris* los porcentajes de germinación no fueron paramétricos. El análisis de varianza ANOVA reveló para *L. pubescens* y para *L. microphyllus* un p-valor de 0.0580 y 0.0892 respectivamente. En el test de Kruskal Wallis el p-valor que se determinó para *L. tauris* fue de 0.0571. En las tres

especies de *Lupinus* todos los p-valores determinados fueron mayores al estadístico de prueba ($\alpha = 0.05$), revelando que no existen diferencias significativas entre los tratamientos de ácido giberélico empleados. En la prueba de Duncan para *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* el tratamiento TG3 obtuvo la media más alta con un 90, 80 y 100% de germinación. Sin embargo, en *L. pubescens* y en *L. microphyllus* los tratamientos TG3 y TG1 no fueron significativamente diferentes a TG2. En cambio, en *L. tauris* el tratamiento TG3 fue significativamente diferente a los tratamientos TG1 y TG2. Los datos del p-valor obtenidos de cada especie de *Lupinus* en las pruebas de Shapiro-Wilks, análisis de varianza ANOVA y Kruskal Wallis se resumen en el Apéndice 6. El test de Duncan se muestra en el Apéndice 7. Los porcentajes de germinación obtenidos al cabo de 15 días se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11

Porcentaje de germinación en las semillas de las tres especies de Lupinus.

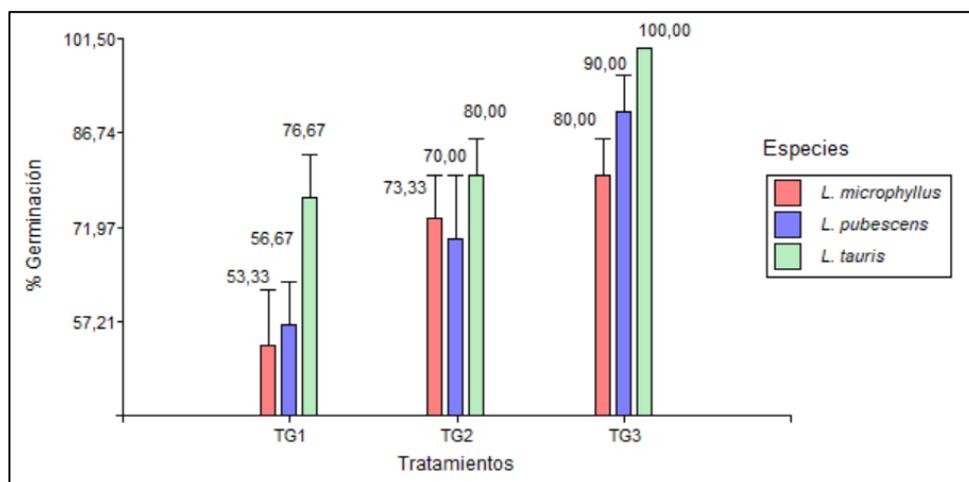
Especies	Semillas Germinadas (%)		
	TG1	TG2	TG3
<i>L. pubescens</i>	56.67	70	90
<i>L. microphyllus</i>	53.33	73.33	80
<i>L. tauris</i>	76.67	80	100

Nota: Tratamientos de germinación *in vitro* en semillas del género *Lupinus*: TG1 (AG₃ al 0%), TG2 (AG₃ al 0.5%), TG3 (AG₃ al 1%).

En la Tabla 11 se observa que el tratamiento con ácido giberélico al 1% obtuvo la germinación del 90, 80 y 100% de las semillas en las especies de *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* respectivamente. En la Figura 10 se muestran los porcentajes de semillas germinadas en cada especie de *Lupinus* respecto a los tratamientos de ácido giberélico aplicados, lo que permite visualizar los datos obtenidos.

Figura 10

Porcentaje de germinación en las tres especies de *Lupinus* respecto a cada tratamiento empleado.



Nota: Tratamientos en semillas del género *Lupinus*: TG1 (AG₃ al 0%), TG2 (AG₃ al 0.5%), TG3 (AG₃ al 1%).

Se observó que para cada tratamiento de ácido giberélico empleado, la especie *L. tauris* obtuvo la mayor capacidad germinativa en comparación al resto de especies. Por otra parte, *L. pubescens* obtuvo una mayor capacidad germinativa que *L. microphyllus* en los tratamientos TG1 y TG3. En cambio, en el tratamiento TG2 las semillas de *L. microphyllus* obtuvieron porcentaje mayor de germinación que las semillas de *L. pubescens*.

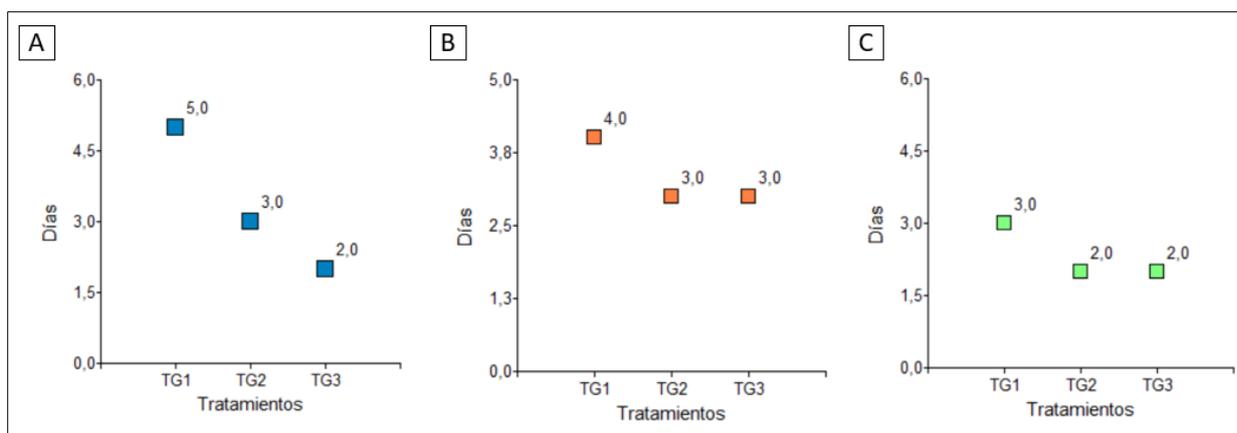
En los ensayos de capacidad germinativa se observó que el tratamiento óptimo fue el TG3 (1mg/L de AG₃ suplementado al medio MS) ya que produjo la mayor germinación en las especies de *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris*.

Índice de latencia

El índice de latencia se obtuvo para determinar el tiempo en que se interrumpió la dormancia en las semillas de *Lupinus*. En la Figura 11 se muestran los días en que inició la germinación de las semillas en las especies *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris*.

Figura 11

Índice de latencia en las semillas de las tres especies de *Lupinus*.



Nota: Semillas del género *Lupinus*: A) Índice de latencia en *L. pubescens*, B) Índice de latencia en *L. microphyllus*, C) Índice de latencia en *L. tauris*, TG1 (AG₃ al 0%), TG2 (AG₃ al 0.5%), TG3 (AG₃ al 1%).

En el gráfico se observó que en las semillas de *L. microphyllus* el tratamiento con 0.5% y 1% de ácido giberélico rompió la dormancia al tercer día. En cambio, en *L. pubescens* el tratamiento con 1% de giberelinas interrumpió la dormancia de las semillas al segundo día. Se encontró además que en *L. tauris* la germinación de las semillas empezó al segundo día de siembra con los tratamientos TG2 y TG3.

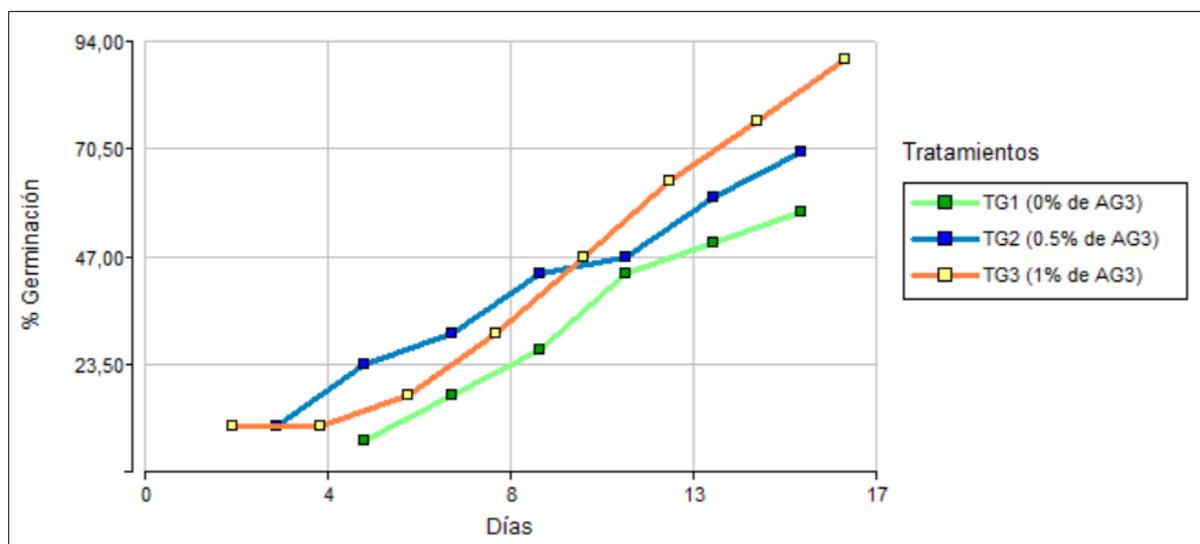
En el índice de latencia se observó de manera general que el tratamiento óptimo fue el TG3 (1mg/L de AG₃ suplementado al medio MS) puesto que interrumpió la dormancia en las semillas de *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* en menor tiempo que los otros tratamientos.

Germinación acumulativa

La germinación acumulativa se obtuvo para determinar el porcentaje de semillas que germinaron durante un intervalo de tiempo (2 días) hasta finalizar el ensayo. A continuación, se muestran los picos de germinación alcanzados por las tres especies de *Lupinus* durante los 15 días de incubación en base a las concentraciones de ácido giberélico aplicado. En la Figura 12 se puede observar la germinación acumulativa en *L. pubescens*.

Figura 12

Germinación acumulativa de *L. pubescens*.

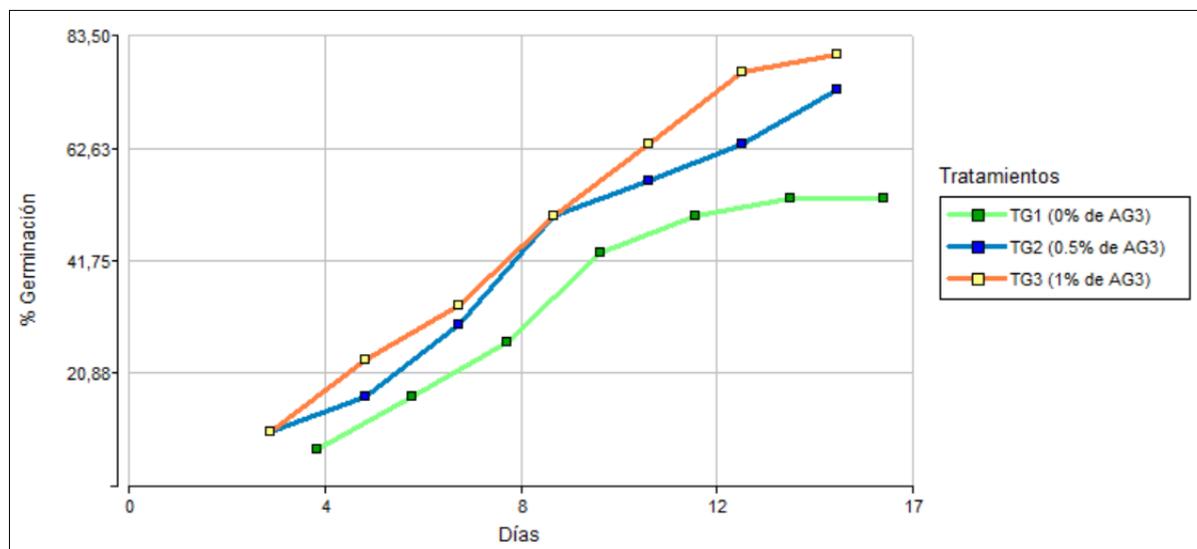


En esta figura se observa que el tratamiento TG3 en *L. pubescens* obtuvo el porcentaje de germinación más alto con un 90% a los 16 días de siembra. En los tratamientos TG1, TG2 y TG3 se observó que la germinación fue en aumento a partir del quinto día y que alcanzó su pico máximo en los días 15 y 16.

En la Figura 13 se puede observar la germinación acumulativa en *L. microphyllus*. En esta figura se encontró que en *L. microphyllus* los tratamientos TG1, TG2 y TG3 a partir del cuarto día aumentaron la germinación de las semillas hasta un máximo del 53.33, 73.33 y 80% respectivamente. Los picos más altos de germinación para los tratamientos TG1, TG2 y TG3 fueron a los 16, 15 y 13 días respectivamente.

Figura 13

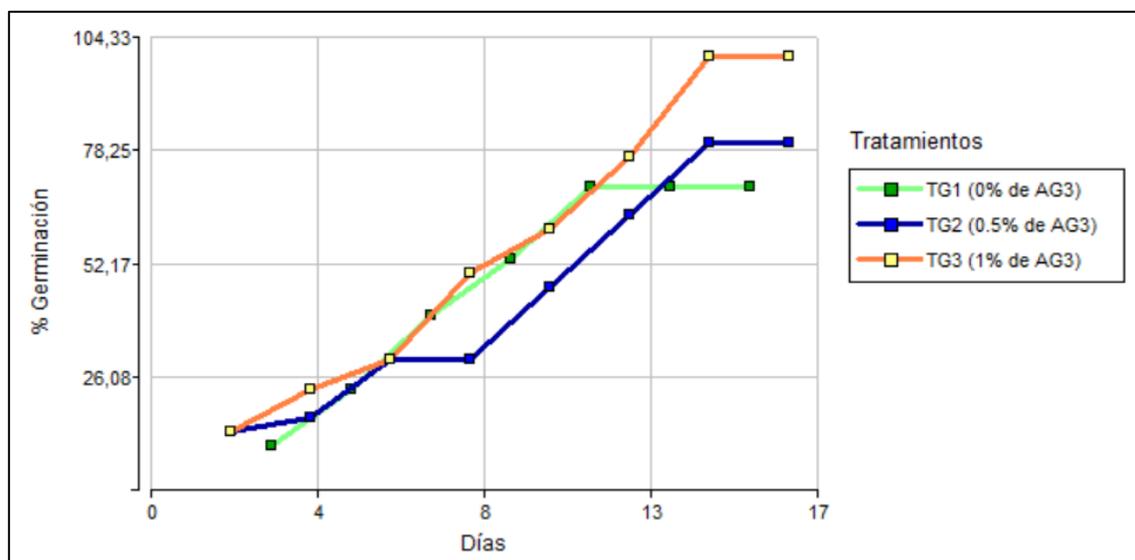
Germinación acumulativa de *L. microphyllus*.



En la Figura 14 se observa la germinación acumulativa de *L. tauris*. En esta gráfica se observó que el porcentaje de germinación aumento en los tratamientos TG1, TG2 y TG3 a partir del tercer día. En esta gráfica se observa, además, que en el tratamiento TG1 desde el onceavo día, la germinación en las semillas fue constante. En cambio, en los tratamientos TG2 y TG3 el porcentaje de germinación no varió a partir del día 14. El pico máximo de germinación fue del 100% con el tratamiento TG3.

Figura 14

Germinación acumulativa de *L. tauris*.



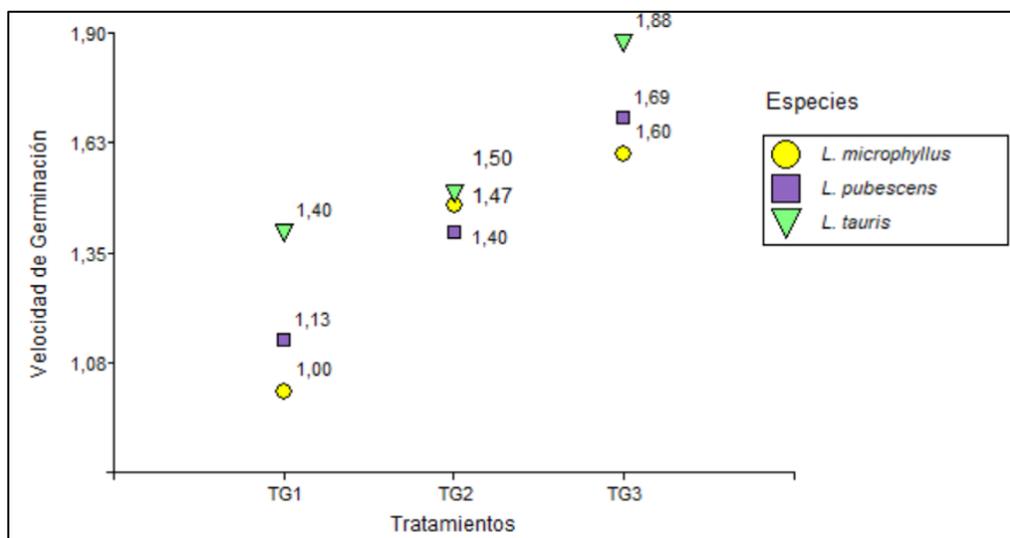
En los ensayos de germinación acumulativa se observó que el tratamiento óptimo fue el TG3 (1mg/L de AG₃ suplementado al medio MS) ya que produjo los picos de germinación más altos en las semillas de *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris*.

Velocidad de germinación

La velocidad de germinación se obtuvo para determinar que especie de *Lupinus* desarrollo más plántulas a partir del día de siembra hasta el final del ensayo. En la Figura 16 se muestran las velocidades de germinación obtenidas para cada especie de *Lupinus* en base a los tratamientos de ácido giberélico aplicado.

Figura 15

Velocidades de germinación en las tres especies de *Lupinus*.



Nota: TG1 (AG₃ al 0%), TG2 (AG₃ al 0.5%), TG3 (AG₃ al 1%).

En esta gráfica se observó para *L. tauris* que los tratamientos TG1, TG2 y TG3 obtuvieron una velocidad de germinación de 1.40, 1.50 y 1.88 respectivamente, siendo estos valores los más altos en relación al resto de especies. Sin embargo, en el tratamiento TG2 las diferencias de velocidades de germinación entre *L. tauris* con *L. microphyllus* fueron menores.

En la velocidad de germinación se observó de manera general que el tratamiento óptimo fue el TG3 (1mg/L de AG₃ suplementado al medio MS) debido a que aumentó considerablemente las velocidades de crecimiento en las semillas de *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* en comparación al resto de tratamientos.

Finalmente, en la Tabla 12 se resumen los valores de capacidad germinativa, índice de latencia y velocidad de germinación de las tres especies de *Lupinus* respecto a las diferentes concentraciones de ácido giberélico aplicado.

Tabla 12

Datos de la capacidad germinativa, índice de latencia y velocidad de germinación obtenidos en las tres especies de Lupinus.

Especies	Capacidad Germinativa (%)			Índice de Latencia (Días)			Velocidad de germinación		
	TG1	TG2	TG3	TG1	TG2	TG3	TG1	TG2	TG3
<i>L. pubescens</i>	56.67	70	90	5	3	2	1.13	1.40	1.69
<i>L. microphyllus</i>	53.33	73.33	80	4	3	3	1	1.47	1.60
<i>L. tauris</i>	70	80	100	3	2	2	1.40	1.50	1.88

Nota: Los datos de velocidad de germinación se expresan en unidades, TG1 (AG₃ al 0%), TG2 (AG₃ al 0.5%), TG3 (AG₃ al 1%).

Los análisis de la viabilidad y germinación en las semillas del género *Lupinus* permitirán conocer que capacidad de generar plántulas poseen estas especies para los planes de restauración ecológica.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Los páramos son ecosistemas andinos con una alta biodiversidad en flora y fauna. En Ecuador estos ecosistemas albergan cerca de 1500 especies vegetales (Llambí, *et al.*, 2012). Los páramos además brindan servicios ecosistémicos a los seres vivos y cumplen funciones biológicas relacionadas a la regulación de los recursos hídricos. Sin embargo, las diferentes actividades antropológicas y el cambio climático han convertido a los páramos en hábitats frágiles y susceptibles (MacDougall, 2013). En base a esto, se han desarrollado estrategias de conservación y restauración para preservar a largo plazo los componentes genéticos de la biodiversidad vegetal presentes en estos ecosistemas (Romero, 2018).

En los páramos ecuatorianos la vegetación se ve predominada por plantas herbáceas y arrosetadas (Castañeda & Montes, 2017). A pesar de ello, en estos ecosistemas andinos se han reportado algunas Fabáceas, generalmente especies del género *Lupinus* (Ulloa & Moller, 2022). La importancia de las plantas de *Lupinus* radica en la variedad de alcaloides que poseen y en la capacidad que tienen las raíces de fijar nitrógeno atmosférico al suelo (Proaño, 2011). Sin embargo, en Ecuador no se dispone de programas o bases de datos que permitan la conservación de este tipo de plantas. Por tal motivo, es necesaria la implementación de bancos de germoplasma que proporcionen información sobre las semillas de este género, debido a la importancia de estas en la dinámica del páramo (Romero, 2018).

Los bancos de semillas se han establecido como una estrategia para la restauración ecológica y conservación de especies vegetales de diferentes ecosistemas (Vargas, 2022). En los bancos de germoplasma se evalúan ciertos parámetros que permiten garantizar la conservación de las semillas a largo plazo (Romero & Pérez, 2016). Los parámetros evaluados generalmente son el hábito de vida y adaptación de las plantas. Otros parámetros importantes proceden de ensayos de caracterización morfológica, fisiológica, pruebas de viabilidad y germinación (Vargas, 2022). A partir de ello, el presente trabajo abarca la determinación de parámetros cualitativos, cuantitativos y el establecimiento de

protocolos de viabilidad y germinación en semillas de las especies de *Lupinus pubescens* (Benth.), *L. microphyllus* (Desr.) y *L. tauris* (Benth.).

Características morfológicas del género Lupinus

En la selección de plantas para planes de conservación y restauración ecológica se requiere de datos acerca de las formas de vida de las especies vegetales, su ubicación altitudinal y tolerancia a diferentes tipos de estrés ambientales propios del ecosistema andino (Vargas, 2022). La recolección y posterior descripción morfológica de las especies de *Lupinus* estudiadas permitió la elaboración de una línea base con información relacionada a la familia de las Fabáceas. Se determinó que la forma de vida en *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* fue de tipo arbustiva. Las plantas con este tipo de forma de vida poseen una amplia distribución en el páramo y según Cuatrecasas (1958) se caracterizan por crecer en grupo, lo que optimiza las condiciones microclimáticas como temperatura, luz, humedad, entre otros.

En relación al rango altitudinal se sabe que a partir de los 3500m s.n.m. el ambiente empieza a ser severo (Baruch, 1992) y a mayor altitud existe un mayor estrés abiótico para las plantas en donde la competencia por nutrientes disminuye, por el menor número de especies vegetales que se encuentran a estas alturas. La altitud de las plantas recolectadas para este ensayo fue de 3629.7m s.n.m. en *L. pubescens*, 3728.3m s.n.m. en *L. microphyllus* y 3712.7m s.n.m. en *L. tauris*.

En los procesos de conservación y restauración es importante seleccionar plantas con formas de vida de fácil distribución, con características morfológicas y fisiológicas óptimas que permitan una buena viabilidad y alta tasa de germinación para futuros planes de reinsertión en estos ecosistemas (Vargas, 2022).

Una de las características morfológicas más importantes en las plantas es la descripción de las semillas. Las características cualitativas de las semillas permiten obtener información para mejorar los procesos de conservación (Romero, 2018). La forma, el color y

el patrón de manchas en las semillas se encuentra determinado por factores genéticos y las interacciones con el medio ambiente (Baskin, 2014). En las tres especies de *Lupinus* la forma de las semillas fue oval aplanada, este hallazgo se asemeja con el estudio de Pérez y sus colaboradores (2014), en donde determinaron que la forma de las especies silvestres de *Lupinus campestris*, *L. montanus* y *L. hintonii* era oval en todas las especies que estudiaron.

En *L. pubescens* el color de la testa fue negra y no presentó patrón de manchas. En cambio, en *L. microphyllus* y *L. tauris* el color varió de naranja a gris claro y las manchas fueron a manera de salpicadura y en forma de ceja respectivamente. Pérez y sus colaboradores (2014), identificaron en la testa de *L. campestris* y *L. montanus* colores marrón y negro con manchas veteadas. La variabilidad del color, manchas y forma de las semillas existente entre las especies de *Lupinus* se debe posiblemente a una variación en el contenido de alcaloides e hibridación entre especies (Aniszewski, Kupari, & Leinonen, 2001).

El tipo de testa y embrión son otros parámetros cualitativos a considerar. La testa es una capa exterior que protege al embrión y regula la germinación (Romero, 2018). En las tres especies de *Lupinus* estudiadas la testa fue dura y de textura lisa. Vallejos y sus colaboradores (2021), determinaron que la testa en *L. mutabilis* fue gruesa. Estos hallazgos en el género *Lupinus* concuerdan con lo que menciona el libro de las Reglas Internacionales de las Semillas (ISTA, 2016), en donde se indica que en la mayoría de especies la familia Fabácea las semillas poseen una cubierta seminal dura e impermeable al agua. El embrión en las tres especies de *Lupinus* se identificó que era de tipo axial doblado. Estos datos coinciden con el estudio de identificación de embriones en Fabáceas realiza por Arambarri, (2018). La dureza de la cubierta seminal en las especies de *Lupinus* sugiere que estas semillas poseen mecanismos de supervivencia en ecosistemas hostiles como el páramo, sin embargo, esta rigidez puede atrasar la germinación (Romero, 2018).

Las características cuantitativas de las semillas son imprescindibles para determinar las condiciones de conservación y almacenamiento. En las tres especies de *Lupinus* el número de semillas varió de 3 a 4 por fruto. En un estudio de Lozano (2019) realizado en otras especies de Fabáceas como *Enterolobium contortisiliquum* encontró en promedio 15 semillas por fruto. La variación intra especie del número de semillas por fruto según Romero (2018) sugiere que se debe a una estrategia de las especies en su establecimiento y sistemas de reproducción.

Otros parámetros como el tamaño, peso y contenido de humedad pueden clasificar a las semillas en ortodoxas o recalcitrantes, lo que puede predecir su capacidad de ser conservadas con éxito (Vargas, 2022). En relación al tamaño las semillas más grandes (largo, ancho y grosor) fueron las de *L. tauris* (0.54, 0.37 y 0.25cm), las intermedias las de *L. pubescens* (0.45, 0.33 y 0.21cm) y las más pequeñas fueron las de *L. microphyllus* (0.3, 0.2 y 0.1cm). Daws y sus colaboradores en 2005 señalaron que las semillas mayores a 1.7cm se consideran recalcitrantes, el tamaño reportado en las semillas de *Lupinus* fue en general menor 0.5cm, por lo que se puede descartar que estas semillas sean sensibles a la desecación hasta posteriores análisis.

El peso en las semillas se relaciona con la capacidad de las especies para sobrevivir y colonizar territorios (Vargas, 2022). La masa en las semillas de las tres especies de *Lupinus* estudiadas varió de 0.49 a 2.63g, siendo las semillas más pesadas las de *L. tauris* y las más livianas las de *L. microphyllus*. La variabilidad de pesos entre especies según Vargas (2022) se debe al hábitat, las condiciones de campo, luz y sombra.

El contenido de humedad es un rasgo fisiológico que permite determinar la capacidad que poseen las semillas de tolerar la desecación (Romero, 2018). El porcentaje de humedad en las especies de *Lupinus* fue de 7.7 en *L. pubescens*, 6.9 *L. microphyllus* y 8% *L. tauris*. Según Romero (2018) las semillas ortodoxas poseen un contenido de humedad de entre 3 a 8%. Además, Farrant con sus colaboradores (1993) y Gentil (2001) mencionaron que semillas con un porcentaje de humedad de entre 10 a 12.5% son capaces de tolerar la

deshidratación. En base a esto, se puede considerar que las semillas de las tres especies de *Lupinus* posiblemente son ortodoxas y se podrían almacenar por largos periodos de tiempo a bajas temperaturas.

Viabilidad y germinación de las semillas del género Lupinus

La prueba de viabilidad de tetrazolio permite identificar las semillas que son capaces de germinar (Vargas, 2022). Conocer esta viabilidad es un requisito indispensable para el establecimiento de bancos de germoplasma. En el presente estudio los porcentajes de viabilidad más altos para las especies de *Lupinus* se obtuvieron con TZ al 0.5% durante 24h de inmersión en *L. pubescens*, TZ al 0.5% en 48h de sumergimiento para *L. microphyllus* y TZ al 1% durante de 24h de inmersión en *L. tauris*. Salazar y Botello (2018) probaron los mismos tratamientos en la Fabácea *Glycine max L.*, en donde con 0.5 y 1% de TZ a un tiempo de inmersión de 24 y 48h encontraron un 97 y 95% de viabilidad respectivamente. Los porcentajes de semillas viables más altos fueron de 65% en *L. pubescens*, 95% en *L. microphyllus* y 100% en *L. tauris*. La alta viabilidad en semillas de *L. microphyllus* y *L. tauris* puede deberse según Gallo (2016), a que las muestras no presentan malformaciones o daños en la estructura del embrión. En cambio, la baja viabilidad en *L. pubescens* sugiere la presencia de células o tejido muerto debido al deterioro de las semillas (Pérez & Pita, 2001).

Las semillas son consideradas como la materia prima principal en los planes de conservación debido a la gran variabilidad genética que poseen (Vargas, 2022). El cultivo *in vitro* se ha consolidado como una estrategia en la multiplicación de especies necesarias para la restauración de ecosistemas. La propagación *in vitro* se basa en la siembra de explantes vegetales como órganos, tejidos, embriones, semillas, entre otros, en medios suplementados con nutrientes y bajo condiciones estériles a fin de evitar la contaminación (Pérez & Castañeda, 2017).

En el cultivo *in vitro* los agentes desinfectantes más utilizados son el etanol (C_2H_5OH) y el hipoclorito de sodio ($NaClO$) (Benavides y Córdoba, 2015). En la desinfección de las semillas de *Lupinus* la concentración de alcohol etílico utilizado fue del 90% y el

tiempo de inmersión de las muestras fue de 10 segundos. La utilización de este protocolo se sustenta en los estudios de Benavides y Córdoba (2015), quienes obtuvieron la mayor desinfección de las muestras de *L. pubescens* con etanol al 90%. El tiempo de inmersión en las semillas no debe superar los 30 segundos, puesto que mucho tiempo de exposición puede ocasionar necrosis en las muestras (Ruiz, 2000). La acción antimicrobiana y antifúngica del alcohol etílico se debe a la desnaturalización de las proteínas presentes en los hongos y bacterias (Capra, 2020).

En las semillas de las tres especies de *Lupinus* la utilización de 5% de hipoclorito de sodio (NaClO) y un tiempo de inmersión de 6 minutos redujo la contaminación de las muestras. De forma similar, en semillas de *L. pubescens* Benavides y Córdoba (2015), reportaron que la utilización de 3% de cloro durante 10 minutos redujo la contaminación fúngica y bacteriana. La diferencia entre estos intervalos de tiempo se puede justificar según lo mencionado por Arcos (2010), quien indicó que a mayor tiempo de inmersión en cloro las semillas pueden perder su capacidad de sobrevivencia, por lo que se sugiere exponer a las muestras de entre 5 a 15 minutos máximo. En cuanto a la concentración de cloro empleado, Pérez y Castañeda (2017) utilizaron concentraciones desde 0 a 7% de cloro para la introducción *in vitro* de semillas altoandinas, obteniendo altos resultados de desinfección con cloro al 5%. La muerte de agentes infecciosos a causa de la aplicación de hipoclorito de sodio, se debe posiblemente al contacto directo del cloro con las membranas celulares y enzimas de microorganismos patógenos (Mateos, 2004).

El porcentaje de germinación de las especies es un dato útil en la selección de plantas para el establecimiento de bancos de germoplasma (Vargas, 2022). En las tres especies de *Lupinus* la utilización de ácido giberélico tuvo un efecto positivo en el desarrollo de las semillas. Los porcentajes de germinación más altos en las tres especies de *Lupinus* fueron con la utilización de 1mg/L de ácido giberélico (AG₃), ya que se obtuvieron porcentajes de germinación del 90% en *L. pubescens*, 80% en *L. microphyllus* y 100% en *L. tauris*. En el estudio de Proaño (2011), con la aplicación de giberelinas en semillas del

mismo género de *Lupinus* se obtuvo una germinación del 100% en 4 días. Los índices de latencia obtenidos en el presente en este estudio fueron de 2 días en *L. pubescens*, 3 días en *L. microphyllus* y 2 días *L. tauris*. Se observó que la aplicación de 1% de AG₃ aumentó la capacidad germinativa y la velocidad de germinación en las tres especies de *Lupinus* estudiadas. La incidencia positiva que tuvo la aplicación de ácido giberélico en la capacidad germinativa, índice de latencia, germinación acumulativa y velocidad de germinación en las semillas se debe a que las giberelinas según Cartagena y Barreto (1998), posiblemente promueven la germinación en semillas de diferentes especies vegetales al sintetizar el ARN y las proteínas en los cotiledones junto con el eje embrionario.

Las especies de la familia Fabaceae encontradas y recolectadas en los páramos del Ecuador pertenecieron al género *Lupinus*. La selección de plantas para el establecimiento de bancos de germoplasma se debe realizar en base al hábito de vida, viabilidad, resistencia a la desecación y capacidad germinativa que poseen las semillas. Los análisis morfológicos y fisiológicos realizados en las semillas de *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* sugirieron que son de carácter ortodoxo, por lo que según Vargas (2022), estas semillas son aptas y viables para ser conservadas con éxito a bajas temperaturas y largos periodos de tiempo. Por otra parte, la viabilidad y capacidad germinativa de las semillas fue superior al 60% en todas las especies de *Lupinus*, lo que aseguraría según Holl y sus colaboradores (2011), el crecimiento rápido de plántulas con capacidad de brindar requerimientos para el desarrollo de otras especies. Los beneficios que podrían brindar a las demás plantas las especies de *Lupinus*, tienen que ver con el enriquecimiento del suelo en minerales ya que estas plantas se caracterizan por poseer nódulos en las raíces que fijan nitrógeno atmosférico al suelo (León, Díaz, & Vargas, 2007). En base a lo expuesto, se debe considerar a las especies del género *Lupinus* como aptas para la conservación en bancos de semillas y necesarias para la restauración de los páramos ecuatorianos.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación tuvo como objeto caracterizar y germinar semillas de la familia *Fabaceae* en bosques andinos del Ecuador. En base a esto, se realizaron ensayos de caracterización morfológica, fisiológica, viabilidad y germinación en semillas de *L. pubescens* (Benth.), *L. microphyllus* (Desr.) y *L. tauris* (Benth.) con lo que se llegó a concluir que:

- La recolección de plantas y semillas de *Lupinus* es importante y permitió elaborar fichas técnicas de *L. pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* con datos de la forma de hábito y rango altitudinal que son útiles para el ingreso de la información al banco de germoplasma.
- *L. tauris* presentó el tamaño promedio de semilla más grande (0.538cm de largo, 0.374cm de ancho y 0.245cm de grosor), *L. pubescens* el tamaño intermedio (0.455cm de largo, 0.339cm de ancho y 0.214cm de grosor) y la semilla más pequeña fue la de *L. microphyllus* (0.296cm de largo, 0.205cm de ancho y 0.133cm). Estas dimensiones sugieren que todas estas semillas son ortodoxas.
- *L. tauris* presentó el peso y contenido de humedad promedio más altos (2.634g y 7.99%), *L. pubescens* el peso y contenido de humedad intermedios (2.217g y 7.775%) y la semilla más liviana con el menor contenido de humedad fue *L. microphyllus* (0.493g y 6.954%). Estos datos confirman que todas las semillas posiblemente son ortodoxas.
- El mejor tratamiento que obtuvo el 65% de semillas viables en *L. pubescens* fue el tratamiento con 0.5% de tetrazolio y 24h de inmersión. En *L. microphyllus* el mejor tratamiento con un 95% de viabilidad fue en el que se aplicó 0.5% de tetrazolio y 48h de inmersión. En *L. tauris* el mejor tratamiento con un 100% de semillas viables fue el de 1% de tetrazolio con 24h de

inmersión. Esto sugiere que las semillas de *L. tauris* son las que mayor viabilidad para la germinación presentan.

- El tratamiento de desinfección más eficiente para las muestras de semillas fue el tratamiento con 5% de hipoclorito de sodio durante 6 minutos. En *L. pubescens* se obtuvo el 96.67% de explantes libres de agentes infecciosos, similar a lo que se obtuvo para *L. microphyllus* con el 93.34% y en *L. tauris* con el 83.33%.
- El medio MS suplementado con 1mg/L de ácido giberélico fue el mejor tratamiento para el establecimiento *in vitro* de las semillas ya que permitió obtener en *L. pubescens* una germinación del 90%, en *L. microphyllus* del 80% y en *L. tauris* del 100%. Este medio además redujo el tiempo de latencia, mejoró la germinación acumulativa y aumento la velocidad de germinación de las tres especies.
- La caracterización morfológica y fisiológica, así como los ensayos de viabilidad y capacidad germinativa en semillas, permitieron determinar la selectividad que poseen las especies de *Lupinus pubescens*, *L. microphyllus* y *L. tauris* para ser conservadas en bancos de germoplasma y utilizadas en procesos de restauración de ecosistemas andinos.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

En los ensayos de determinación del contenido de humedad se almacenaron las semillas a 4°C durante una semana, según referencias bibliográficas se sugiere almacenar las semillas durante mínimo un mes para poder evaluar mejor la tolerancia a la desecación.

Se recomienda realizar ensayos de caracterización molecular para diferenciar genóticamente a las especies del género *Lupinus* e identificarlas, puesto que su diferenciación fenotípica es compleja.

Sería importante investigar sobre un protocolo *in vitro* para la obtención de callos con posible potencial de extracción de metabolitos secundarios, para analizar sus propiedades fungicidas, insecticidas, bactericidas y nematocidas

CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, N., & Torres, J. (2014). *Guía para la Restauración Ecológica en los Páramos del Antisana*. Universidad Nacional de Loja. Ecuador.
- Alderete, A., Espinosa, V., Ojeda, E., Ehsan, M., Pérez, J., Cetina, V., . . . De la Cruz, N. (2008). Natural Distribution and Principal Characteristics of Lupinus in the Oriental Face of Tlaloc Mountain in Sierra Nevada. *Journal of Biological Sciences*, 8: 604-609.
- Aniszewski, T., Kupari, M., & Leinonen, A. (2001). Seed number, seed size and seed diversity in Washington lupin (*Lupinus poluphyllus* Lind.). *Annals of Botany*, 87: 77-82.
- Arambarri, A. (2018). *Diásporas y semillas*. Argentina: Universidad Nacional de la Plata.
- Barney, V. (2011). *Biodiversidad y ecogeografía del género Lupinus I. (Leguminosae) en Colombia*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Barrientos, L., Montenegro, A., & Pino, I. (2002). Evaluación de la fijación simbiótica de nitrógeno de *Lupinus albus* y *L. angustifolius* en un Andisol Vilcun del sur de Chile. *Terra Latinoamericana*, 20(1): 39-44.
- Baruch, Z. (1992). Patterns of energy content in plants from the venezuelan paramos. *Oecologia*, 55(1): 47-52. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/BF00386717>
- Baskin, C. (2014). *Seed: Ecology, biogeography and evolution of Dormancy and Germination (second edi.)*. Elsevier.
- Bayas, D. (2015). *Diversidad florística a diferente altitud en el Ecosistema Páramo del cantón Tisaleo, provincia de Tungurahua. (Tesis de grado)*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

- Beltrán, K., Salgado, S., Cuesta, F., Yáñez, L., Romoleroux, K., Ortiz, E., . . . Velasteguí, A. (2009). Distribución espacial, sistemas ecológicos y caracterización florística de los páramos en el Ecuador. *EcoCiencia*.
- Benavides, T., & Córdova, A. (2015). Desarrollo de un protocolo de propagación in vitro de *Geranium chilloense* y *Lupinus pubescens*. Para la obtención de Plantas completas para la restauración de quebradas de Quito. *Universidad Politécnica Salesiana*.
- Buytaer, W., Cuesta, F., & Tobón, F. (2011). Regiones, Impactos Potenciales del Cambio Climático en los Servicios Ambientales de los Alpes Tropicales Húmedos. *Global Ecology and Biogeography* , 20: 19–33.
- Cachiguango, C. (2019). Composición y cobertura florística en el páramo del Parque Nacional Cotopaxi en dos diferentes estados de conservación: páramo conservado y sobrepastoreado. (Tesis de grado). *Universidad Central del Ecuador*.
- Calderón de Rzedowsky, G., & Rzedowsky, J. (2004). Manual de malezas de la región de Salvatierra, Guanajuato. Flora del Bajío y Regiones Adyacentes. *Instituto de Ecología, A. C. Pátzcuaro*.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Camacho, M. (2014). Los Páramos Ecuatorianos: Caracterización Y Consideraciones Para Su Conservación Y Aprovechamiento Sostenible. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Central Del Ecuador*.
- Capra, V. (2020). Ethyl Alcohol as an Antiseptic and Disinfectant.
- Carrillo, G., Silva, B., Rollenbeck, R., Céleri, R., & Bendix, J. (2019). La Respiración del Altiplano Andino: Intercambio Ecosistémico Neto y Evapotranspiración sobre el Páramo del Sur de Ecuador. *Agricultural and Forest Meteorology*, 265: 30–47.
Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2018.11.006>

- Carrillo, Y., Gómez, M., Cotes, J., & Núñez, E. (2010). Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio. . *Agronomía Colombiana*, 28(2): 245-253.
- Cartagena, J., & Barreto, J. (1998). Efecto del ácido giberélico y el método de siembra en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de Anona Colorada (*Annona reiculata* L.).
- Castañeda, A., & Montes, C. (2017). Carbono almacenado en páramo andino. *Entramado*, 13(1): 210–221. Obtenido de <https://doi.org/10.18041/entramado.2017v13n1.25112>
- Cochrane, J., Crawford, A., & Monks, L. (2007). La importancia de la conservación de semillas ex situ para la reintroducción de plantas amenazadas. *Revista Australiana de Botánica*, 55(3): 356-361.
- Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos. CIRF. (1981). Descriptores de *Lupinus*. *International Board for Plant Genetic Resources (CIRF/IBPGR)*.
- Convenio sobre la Diversidad Biológica. CBD. (2012). Estrategia Global para la Conservación de las Plantas, 2011-2020. *Botanic Gardens Conservation International*.
- Cuatrecasas, J. (1958). Aspectos de la vegetación natural de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*, 10(40): 225-264.
- Daws, M., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C., & Pritchard, H. (2004). Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastaneum* across Europe. *New Phytol*, 162: 157-166.
- Dickie, J., & Pritchard, H. (2002). Systematic and evolutionary aspects of desiccation tolerance. In: Black M, Pritchard H (eds) *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying* CAB international. 239-259.

- Drummond, C. (2008). Diversification of *Lupinus* (Leguminosae) in the western New World: derived evolution of perennial life history and colonisation of montane habitats. *Molecular Phylogenetics and Evolution* , 48: 408-421.
- Dunn, D. (1984). Cytotaxonomy and distribution of New World lupin species. *IN Proceedings 3rd International Lupin Conference*, 67-85.
- Estrada, N. (2000). *La biodiversidad y mejoramiento genético de la papa*. Bolivia: Plural editores.
- Estrella, E. (1998). *El pan de América. Etnohistoria de los alimentos aboígenes del Ecuador* (3era Edición ed.). Quito. Ecuador: FUNDACYT.
- Farley, K. (2013). Changes in carbon storage under alternative land uses in biodiverse Andean grasslands: Implications for payment for ecosystem services. *Conservation Letters* , 6(1): 21-27.
- Farrant, J., Pammenter, N., & Berjak, P. (1993). Seed development in relation to desiccation tolerance: a comparison between desiccation sensitive (recalcitrant) seeds of *Avicennia marina* and desiccation tolerant types. *Seed Sci. Res.* 3, 1-13.
- Gentil, D. (2001). Conservação de sementes do cafeeiro: ¿resultados discordantes ou complementares? *Bragantia* , 60(3): 149-154.
- Groot, R., Wilson, M., & Boumans, R. (2002). Una tipología para la clasificación, descripción y valoración de las funciones, bienes y servicios de los ecosistemas. *Ecological Economics* , 41: 393–408.
- Herbario de la Universidad del Azuay. (2019). Obtenido de <https://herbario.uazuay.edu.ec/>
- Hofstede, R., & Llambí, L. (2019). Diversidad Vegetal en Páramo—Pastizales Húmedos Neotropicales de Alta Montaña. *Sistemas Terrestres y Ciencias Ambientales*. Elsevier. Obtenido de <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11858-5>

- Hofstede, R., Groenendijk, J., Coppus, R., Fehse, J., & Sevink, J. (2002). Impacto de las plantaciones de pino en suelos y vegetación en el Alto Andes ecuatoriano. *Mountain Res. Dev*, 22: 159–76.
- Holl, K., Zahawi, R., Cole, R., Ostertag, R., & Cordell, S. (2011). Planting Seedlings in Tree Islands Versus Plantations as a Large-Scale Tropical Forest Restoration Strategy. *Restoration Ecology*, 19(4): 470-479. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2010.00674.x>
- Internacional Seed Testing Association. ISTA. (2016). *International Rules for Seed Testing*. (Vol. 8, Issue i)).
- Jaramillo, T. (2013). *Plantas Nativas de la Hoya de Quito*. Quito: Quito: Fundación Botánica de los Andes.
- Jiménez, R., & Ramos, C. (2019). Evaluación de la eficiencia fitorremediadora de *Lupinus pubescens*, *Plantago major* y *Scirpus californicus* en suelos contaminados con arsénico. (Tesis grado). *Universidad Politécnica Salesiana*.
- Josse, C., Mena, P., & Medina, G. (2000). *La Biodiversidad de Los Páramos*.
- León, O., Díaz, A., & Vargas, O. (2007). *Generación de doseles: un primer paso para la restauración ecológica*. En: Vargas, O. & Grupo de Restauración Ecológica (Eds.). *Estrategias para la restauración ecológica del bosque altoandino: el caso de la reserva forestal de Cogua, Cundinamarca*. Colombia: Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia.
- Lewis, G., Schrire, D., Mackinder, A., Rico, L., & Clark, R. (2013). A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context—a tool for collections management and taxon sampling. *South African Journal of Botany*, 89: 76-84.
- Llambí, L., Soto, A., Celleri, R., De-Bievre, B., Ochoa, B., & Borja, P. (2012). *Páramos andinos. Ecología, hidrología y suelos de páramos*. Proyecto páramo andino.

- López, L., & Fuentes, M. (1986). Lupin crop as an alternative source of protein. *Adv. Agron*, 40: 239-289.
- Lozano, E. (2019). Efecto de pretratamientos en semillas de *Enterolobium contortisiliquum* (Fabaceae) de la selva pedemontana Argentina. (*Tesis de grado*). *Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta*.
- Luna, G., Martínez, A., Mendoza, S., Gonzáles, F., Sosa, E., Rodríguez, L., . . . Luna-Botello, A. (2019). Lupino (*Lupinus angustifolius* L.): Una alternativa de proteína. *Agro Productividad*. Retrieved from <https://doi.org/10.32854/agrop.v0i0.1451>
- MacDougall, J. (2013). *Informe Regional de Desarrollo Humano. Seguridad Ciudadana con Rostro Humano*. PNUD.
- Martin, A. (1946). *The comparative internal morphology of seeds*. *Amer.Midl.Nat* .
- Martínez, K., & Acosta, R. (2020). Extracción de alcaloides presentes en las semillas de *Lupinus mutabilis* y su actividad antibacteriana. *Facultad de Ciencias Básicas Programa de Química. Universidad Santiago de Cali*.
- Mateos, P. (2004). Control de las poblaciones microbianas: Esterilización y desinfección. Departamento de Microbiología y Genética. (U. d. Salamanca, Ed.) Obtenido de <http://www.atl-gestion.com/Asepsia%20y%20desinfeccion.htm#ancho141391>
- Merk KGaA. (2019). Murashige and Skoog Plant Cell Culture Media Formulations.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador, K. (2016). Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030. Obtenido de <https://www.cbd.int/doc/world/ec/ec-nbsap-v2-p01-es.pdf>
- Missouri Botanical Garden. (2022). Obtenido de <https://www.missouribotanicalgarden.org/>
- Mittermeier, R., Turner, W., Larsen, F., Brooks, T., & Gascon, C. (2011). Conservación de la biodiversidad global: el papel fundamental de los puntos críticos, en puntos críticos

de biodiversidad: distribución y protección de áreas prioritarias para la conservación. *Springer*.

- Morales, J., & Estévez, V. (2006). El Páramo: ¿Ecosistema En Vía De Extinción? . *Revista Luna Azul*, 22: 39-51.
- Morocho, C., & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *Bosques Latitud Cero* . *Latindex*, IX, 71-83.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. (2016). Estado de los bosques del mundo 2016: Bosques y agricultura: desafíos y oportunidades del uso de la tierra. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-i5588e.pdf>
- Peralta, J., & Royuela. (2019). Flora Arvense de Navarra. Herbario. *Departamento de Ciencias Universidad Pública de Navarra*.
- Pérez, A., & Castañeda, L. (2017). Establecimiento in vitro de compuestas nativas silvestres a partir del cultivo de semillas. *Foresta Veracruzana*, 19(2). Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49753656008>
- Pérez, F., & Pita, J. (2001). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. *Universidad Politécnica de Madrid. Madrid. España*.
- Pérez, M., Lagunes, L., López, J., Ramos, J., & Aranda, E. (2014). Morfometría, germinación y composición mineral de semillas de *Lupinus Silvestres*.
- Podwojewski, P., Poulénard, J., Zambrana, T., & Hofstede, R. (2002). Efectos del Sobrepastoreo en la Cobertura Vegetal y Propiedades del Suelo de Ceniza Volcánica en el Páramo de Llangahua y La Esperanza (Tungurahua, Ecuador). *Uso y manejo del suelo*. 18: 45–55. Obtenido de <https://doi.org/10.1079/SUM2001100>
- Poulénard, J., Podwojewski, P., Janeau, J., & Jean, D. (2001). Escorrentía y Erosión del Suelo Bajo Simulación de Lluvia de Andisoles del Páramo Ecuatoriano: Efecto de Labranza y Quema. *Catena* 45.

- Proaño, A. (2011). Regeneración y conservación mediante la técnica de crecimiento mínimo de *Lupinus mutabilis* (chocho andino) in vitro. (*Tesis grado*). *Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE*.
- Pujos, L. (2013). Diversidad Florística a diferente Altitud en el Ecosistema Páramo en tres comunidades de la Organización de Segundo Grado Unión de Organizaciones del Pueblo Chibuleo. (*Tesis de grado*). *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*.
- Quintana, F. (2019). Sinopsis del género *Lupinus* (fabaceae) presentes en la provincia de Cotopaxi (2018-2019). (*Tesis de grado*). *Universidad Técnica de Cotopaxi*.
- Reid, W. (2005). Evaluación de Ecosistemas del Milenio, WRI: Instituto de Recursos Mundiales. Obtenido de <https://policycommons.net/artifacts/1360846/millennium-ecosystem-assessment/1974825/>.CID: 20.500.12592/5qwvp6
- Richter, M., & A, M. (2005). Heterogeneidad Climática y Diversidad Vegetacional En El Sur de Ecuador: Un Método de Fitoindicación. *Revista Peruana de Biología*, 217–38 .
- Romero, J. (2018). *Conservación de semillas: Una alternativa inmediata para almacenar germoplasma forestal y recuperar los bosques secos amenazados del Ecuador*. Loja. Ecuador: Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Romero, J., & Pérez, C. (2016). Rasgos morfológicos de semillas y su implicación en la conservación ex situ de especies leñosas en los bosques secos tumbesinos. *Ecosistemas*. 25(2): 59–65. Obtenido de <https://doi.org/10.7818/ECOS.2016.25-2.07>
- Romero, J., Orellana, V., & Balseca, M. (2016). Morfología, imbibición y germinación de semillas de *Cae-salpinia glabrata* Kunth (Fabaceae) distribuidas en un bosque seco tropical. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 15(2): 89-101. Retrieved from <https://doi.org/10.5154/r.rchsza.2016.05.004>

- Ruiz, B. (2000). *Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta in vitro de Anthurium andraeanum L.* Honduras .
- Salazar, A., & Botello, E. (2018). *Viabilidad de semillas de Glycine max (L.) Utilizando la prueba de tetrazolio.* Cúcuta. Colombia .
- Schoen, D., & Brown, A. (2001). La conservación de especies vegetales silvestres en bancos de semillas . *Biociencia*, 51(11): 960-966. Obtenido de [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0960:TCOWPS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0960:TCOWPS]2.0.CO;2)
- Steffen, W., Richardson, K., Rockstrom, J., Cornell, S., Fetzer, I., & Bennett, E. (2015). Límites planetarios: guiando el desarrollo humano en un planeta cambiante. *Ciencia* 347:1259855. doi:10.1126/ciencia.1259855
- Stevens, P. (2009). *Angiosperm Phylogeny Website*. Obtenido de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Ulloa, C., & Moller, P. (2022). *Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador*. Obtenido de http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=10335
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. UICN. (2017). *Resumen de categorías de la Lista Roja Totales por país (Animales)*. Obtenido de <http://cmsdocs.s3.amazonaws.com/summarystats/2017->
- Vallejos, J., Mamani, P., Huiza, J., & Ortega, G. (2021). Adaptabilidad de dos especies de *Lupinus* en diferentes ambientes de los valles interandinos de Bolivia. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 9(2): 69-80. Retrieved from <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2021.090200069>
- Varela, R., & Albornoz, P. (2013). Morpho-anatomy, imbibition, viability and germination of the seed of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Fabaceae). *Revista de Biología Tropical*, 61: 1109-1118 .

- Vargas, O. (2022). *Bases ecológicas y sociales para la restauración de los páramos*. Colombia: Departamento de Biología Universidad Nacional de Colombia.
- Vargas, O., & Pérez, L. (2014). *Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica*. Bogotá. Colombia: Grupo de Restauración Ecológica. Universidad Nacional de Colombia.
- Vázquez, J. (2019). *Leguminosas (Fabaceae): características, hábitat, cultivo, usos*. Lifeder. Obtenido de <https://www.lifeder.com/leguminosas-fabaceae/>
- Villa, J., Mejía, G., Velásquez, D., Botero, A., Acosta, S., Marulanda, J., . . . Bohrer, G. (2019). Secuestro de carbono y emisiones de metano a lo largo de un gradiente microtopográfico en una turbera andina tropical. *Ciencia del Medio Ambiente Total*, 654: 651–61. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.109>
- Violle, C., Navas, M., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., G, H., & Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be funcional! *Oikos*, 116: 882-892.
- Viviroli, D., Hans, H., Messerli, B., Meybeck, M., & Weingartner, R. (2007). Montañas del mundo, torres de agua para la humanidad: tipología, mapeo y significado global. *Water Resources Research*, 43: 1–13. Obtenido de <https://doi.org/10.1029/2006WR005653>
- Yuste, J., Heres, A., Ojeda, G., Paz, A., Pizano, C., García, D., & Lasso, E. (2017). Soil Heterotrophic CO₂ Emissions from Tropical High-Elevation Ecosystems (Páramos) and Their Sensitivity to Temperature and Moisture Fluctuations. *Soil Biology & Biochemistry Journal*, 110: 8–11. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.02.016>

CAPÍTULO IX: APÉNDICES