



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

Evaluación de *Lupinus condensiflorus* C.P.Sm., *L. ballianus* C.P. Sm. y *Astragalus garbancillo* Cav. (Fabaceae) en la restauración de suelos que contienen plomo, cadmio y zinc

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Enoc Efer JARA PEÑA

ASESOR

José Séptimo GÓMEZ CARRIÓN

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Jara, E. (2018). *Evaluación de Lupinus condensiflorus C.P.Sm., L. ballianus C.P. Sm. y Astragalus garbancillo Cav. (Fabaceae) en la restauración de suelos que contienen plomo, cadmio y zinc.* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 043-UPG-FCB-2018

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO
ACADEMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Siendo las 16:10..... horas del día 17:10:2018.....en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por la:

| | |
|-------------------------------------|-----------------|
| Dra. Betty Gaby Millán Salazar | e integrado por |
| Dra. Susana Mónica Gutiérrez Moreno | (Miembro) |
| Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca | (Miembro) |
| Dr. Dan Erick Vivas Ruíz | (Miembro) |
| Dr. José Séptimo Gómez Carrión | (Asesor) |

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas, que solicitara el Señor Magíster Don **ENOC EFER JARA PEÑA**.

Después de darse lectura al Expediente N° 042-UPG-FCB-18, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, receptionaron la exposición de la Tesis Titulada:

"Evaluación de *Lupinus condensiflorus* C.P.Sm., *L. ballianus* C.P. Sm. y *Astragalus garbancillo* Cav. (Fabaceae) en la restauración de suelos que contienen plomo, cadmio y zinc" y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú. DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

1219

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: *Muy Bueno con la nota de 15*

A continuación la Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas al Magister..... *FDOC ELEC Ana Peña*

Siendo las..... *18:00* se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día 17 del mes de octubre del año 2018.

.....
Dra. Betty Gaby Millán Salazar
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE

.....
Dr. José Séptimo Gómez Carrión
Profesor Extraordinario Experto
ASESOR

.....
Dra. Susana M. Gutiérrez Moreno
Profesora Principal a T. C.

.....
Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca
Profesor Principal a D.E.

AGRADECIMIENTOS

- A JEHOVÁ, el único Dios verdadero por la vida, la salud y todas sus bendiciones de cada día.
- A mi amada esposa la Ms Sc. Noema Cano Flores mi fiel compañera por estar conmigo en todo tiempo, por su apoyo continuó e incondicional, que permitió la culminación de este trabajo.
- Al Programa de Promoción de Tesis de Posgrado 2017 para docentes-Doctorado del Vicerrectorado de investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos Proyecto B17100116a por el apoyo recibido para lograr la culminación de esta investigación.
- A mi Asesor de tesis, Doctor José Séptimo Gómez Carrión. Por su amistad, sus consejos, su disposición mostrada y su gran espíritu de colaboración en la realización de este trabajo.
- Al Doctor Gilber Mariano Astocóndor, por las facilidades y las coordinaciones prestadas para realizar el experimento de campo en Lachaqui, Canta.
- Al Señor Arquímedes Mariano Astocóndor, por cederme el espacio de su propiedad para realizar la construcción del vivero experimental, y por todas las facilidades brindadas en el mantenimiento del experimento.
- A la señora Graciela Huayanay Salazar de Mariano por su gentileza, la hospitalidad y su apoyo en el mantenimiento del experimento.

IN MEMORIAM

- De mi madre, Doña **Anatolia Peña Agama de Jara** (†) quien me dió la vida, su amor, inculcando el ejemplo de superación y por haberme encaminado a conocer la Ciencia de la vida.
- A mi padre, Don **Emiliano Jara Sáenz** (†) por haberme trasmitido y sembrado la semilla de los principios de valores humanos y enseñado el camino de poder conocer más allá de la tercera dimensión, el amor al prójimo, su ejemplo moral y sus consejos sabios.

DEDICATORIA

- Para mi esposa, **M.Sc. Noema Cano Flores** por su amor incondicional y el apoyo constante recibido para lograr la cristalización de este trabajo.

- Para mis hermanos: **Elizabeth, Evelina, Enma, Edith, Efraín y Edgar** los quiero a todos.

- Para la Familia Cano Flores.

- Para todos mis sobrinos y sobrinas.

CONTENIDO

Pág.

| | |
|--|------|
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| IN MEMORIAM | iii |
| DEDICATORIA | iv |
| ÍNDICE DE TABLAS | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xi |
| RESUMEN | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1 Género <i>Lupinus</i> | 4 |
| 2.1.1 <i>Lupinus ballianus</i> C.P. Sm. | 5 |
| 2.1.2 <i>Lupinus condensiflorus</i> C.P.Sm. | 7 |
| 2.2 Género <i>Astragalus</i> L..... | 9 |
| 2.2.1 <i>Astragalus garbancillo</i> Cav. | 9 |
| 2.3 La contaminación de suelos con metales pesados..... | 11 |
| 2.3.1 Cadmio..... | 15 |
| 2.3.2 Plomo..... | 16 |
| 2.3.3 Zinc..... | 16 |
| 2.4 Fitotecnologías utilizadas en la remediación de suelos contaminados..... | 17 |
| 2.4.1 Fitoextracción..... | 19 |
| 2.4.2 Fitofiltración..... | 20 |
| 2.4.3 Fitoestabilización..... | 20 |
| 2.4.4 Fitovolatilización..... | 22 |
| 2.4.5 Fitodegradación..... | 22 |
| 2.5 Especies de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> utilizados en la fitorremediación de suelos contaminados..... | 22 |
| 2.6 La dormición de semillas y tratamientos para eliminar la dormición..... | 25 |
| III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 27 |
| 3.1 Hipótesis..... | 27 |
| 3.1.1 Hipótesis de investigación (Hi)..... | 27 |
| 3.1.2 Hipótesis nula (Ho)..... | 27 |
| 3.2 Objetivos..... | 27 |
| 3.2.1 Objetivo General..... | 27 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.2.2 | Objetivos específicos | 28 |
| IV. | MATERIAL Y MÉTODOS | 29 |
| 4.1 | Métodos | 29 |
| 4.1.1 | Método de colecta de frutos de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 29 |
| 4.1.2 | Procesamiento y limpieza de los frutos y las semillas..... | 30 |
| 4.1.3 | Determinación del contenido de humedad de las semillas | 32 |
| 4.1.4 | Pre tratamiento de las semillas mediante escarificación mecánica..... | 33 |
| 4.1.5 | Método de prueba de viabilidad de las semillas | 34 |
| 4.1.6 | Método de prueba para evaluar la emergencia de plántulas en macetas..... | 37 |
| 4.2 | Método de evaluación del desarrollo de especies de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> con tratamientos de relave de mina | 41 |
| 4.2.1 | Variables de evaluación..... | 44 |
| 4.3 | Diseño experimental y análisis estadístico | 46 |
| 4.3.1 | Diseño Experimental y análisis estadístico para evaluar la viabilidad de las semillas de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> 46 | |
| 4.3.2 | Diseño experimental y análisis estadístico para evaluar la emergencia de plántulas de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> 47 | |
| 4.3.3 | Diseño experimental de la evaluación del desarrollo de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> con tratamientos de relave de mina | 47 |
| 4.4 | Registro de las condiciones ambientales de la evaluación del desarrollo de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> con tratamientos de relave de mina..... | 50 |
| V. | RESULTADOS y DISCUSIÓN..... | 51 |
| 5.1 | Evaluación de germinación de semillas de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> en condiciones de laboratorio..... | 51 |
| 5.2 | Evaluación de la emergencia de plántulas de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 59 |
| 5.3 | Contenido de humedad de semillas de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 65 |
| 5.4 | Crecimiento vegetativo de especies de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 68 |
| 5.5 | Acumulación de cadmio, plomo y zinc en órganos de especies de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> evaluadas con tratamientos de relave de mina..... | 74 |
| 5.5.1 | Acumulación de cadmio en <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 81 |
| 5.5.2 | Acumulación de plomo en especies de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 84 |
| 5.5.3 | Acumulación de zinc en <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 86 |
| 5.6 | Factor de bioconcentración y de transferencia de metales calculadas para las especies de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 96 |
| 5.6.1 | Factor de bioconcentración y de transferencia de cadmio para <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 96 |
| 5.6.2 | Factor de bioconcentración y de transferencia de plomo para <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 97 |
| 5.6.3 | Factor de bioconcentración y de transferencia de zinc para <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 98 |

| | | |
|-------|---------------------------------|-----|
| VI. | CONCLUSIONES..... | 107 |
| VII. | RECOMENDACIONES..... | 108 |
| VIII. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 109 |
| IX. | ANEXOS..... | 123 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|--|
| Tabla 1. Lugares de colecta de semillas. Ubicación geográfica, Altitud y coordenadas geográficas (UTM). .30 | |
| Tabla 2. Caracterización físico-química del suelo de la rizósfera de <i>Lupinus ballianus</i> procedente de Santa Rosa, Aquia, Áncash. Utilizadas en la prueba de germinación de semillas de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i>39 | |
| Tabla 3. Caracterización físico-química de suelo orgánico “tierra de monte” procedente de Santa Rosa, Aquia, Áncash. Utilizadas en la prueba de germinación de semillas de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i>40 | |
| Tabla 4. Caracterización físico-química del suelo de Lachaqui, Canta, Lima. Utilizado en el experimento. ..43 | |
| Tabla 5. Contenido de metales pesados analizadas en el relave polimetálico utilizado en el experimento..43 | |
| Tabla 6. Tratamientos y dosis de aplicación de relave de mina utilizadas en la evaluación del desarrollo de especies de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i>48 | |
| Tabla 7. Número de semillas germinadas acumuladas de <i>Lupinus ballianus</i> con el factor de escarificación y luz evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 10), indica el número de placas petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas por cada placa petri.57 | |
| Tabla 8. Número de semillas germinadas acumuladas de <i>Lupinus ballianus</i> por tratamientos evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 5), indica el número de placas petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas por cada placa Petri.57 | |
| Tabla 9. Número de semillas germinadas acumuladas de <i>Lupinus condensiflorus</i> con el factor de escarificación y luz evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 10) e indica el número de placas petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas por cada placa petri.58 | |
| Tabla 10. Número de semillas germinadas acumuladas de <i>Lupinus condensiflorus</i> por tratamiento evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 5) e indica el número de placas petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas por cada placa petri.58 | |
| Tabla 11. Número de semillas germinadas acumuladas de <i>Astragalus garbancillo</i> con el factor de escarificación y luz evaluadas en condiciones de laboratorio, n= 10, Indica el número de placas petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas por cada placa Petri.59 | |
| Tabla 12. Número de semillas germinadas acumuladas de <i>Astragalus garbancillo</i> por tratamientos evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 5), indica el número de placas Petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas en cada placa petri.59 | |
| Tabla 13. Número de plántulas emergidas acumuladas de <i>Lupinus ballianus</i> evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 6), endica el número de macetas utilizadas en el ensayo, con 20 semillas sembradas en cada maceta.....63 | |
| Tabla 14. Número de plántulas emergidas acumuladas de <i>Lupinus condensiflorus</i> evaluadas en condiciones de laboratorio (Tamaño de la muestra, n= 6), indica el número de macetas utilizadas en el ensayo, con 20 semillas sembradas en cada maceta.64 | |
| Tabla 15. Número de plántulas emergidas acumuladas de <i>Astragalus garbancillo</i> evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 6), indica el número de macetas utilizadas en el ensayo, con 20 semillas sembradas en cada maceta.65 | |
| Tabla 16. Análisis de varianza del contenido de humedad de las semillas de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i>67 | |
| Tabla 17. Contenido de humedad de las semillas de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i>67 | |

| | |
|---|-----|
| Tabla 18. Correlación de Pearson analizadas para la longitud de planta, número de hojas, Número de ramas, biomasa total y el número de nódulo de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> . | 72 |
| Tabla 19. Longitud de planta de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> evaluadas con tratamientos de relave de mina y en condiciones de invernadero. | 72 |
| Tabla 20. Número de hojas evaluadas en <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> evaluadas con tratamientos de relave de mina y en condiciones de invernadero. | 73 |
| Tabla 21. Biomasa total (gramos) de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> evaluadas con tratamientos de relave de mina y en condiciones de invernadero. | 73 |
| Tabla 22. Análisis de correlación de Pearson (coeficiente de Pearson) para la acumulación de cadmio evaluadas con tratamientos de relave de mina en <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> . | 75 |
| Tabla 23. Análisis de Correlación de Pearson (coeficiente de Pearson) para la acumulación de plomo evaluadas con tratamientos de relave de mina en <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> . | 76 |
| Tabla 24. Análisis de Correlación de Pearson (coeficiente de Pearson) para la acumulación de zinc evaluadas con tratamientos de relave de mina en <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> . | 76 |
| Tabla 25. Acumulación de cadmio en los tejidos de las raíces de <i>Lupinus ballianus</i> . | 83 |
| Tabla 26. Acumulación de cadmio en los tejidos de las raíces de <i>Lupinus condensiflorus</i> . | 83 |
| Tabla 27. Acumulación de cadmio en los tejidos de las raíces de <i>Astragalus garbancillo</i> . | 83 |
| Tabla 28. Acumulación de Plomo en los tejidos de las raíces de <i>Lupinus ballianus</i> . | 85 |
| Tabla 29. Acumulación de Plomo en los tejidos de las raíces de <i>Lupinus condensiflorus</i> . | 85 |
| Tabla 30. Acumulación de Plomo en los tejidos de las raíces de <i>Astragalus garbancillo</i> . | 86 |
| Tabla 31. Acumulación de Zinc en los tejidos de las raíces de <i>Lupinus ballianus</i> . | 87 |
| Tabla 32. Acumulación de Zinc en los tejidos de las raíces de <i>Lupinus condensiflorus</i> . | 88 |
| Tabla 33. Acumulación de Zinc en los tejidos de las raíces de <i>Astragalus garbancillo</i> . | 88 |
| Tabla 34. Análisis de varianza de la acumulación de cadmio total analizadas en los tejidos de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> . | 88 |
| Tabla 35. Acumulación de cadmio total analizadas en los tejidos de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> . | 89 |
| Tabla 36. Análisis de varianza de la acumulación de Plomo total analizadas en los tejidos de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> . | 89 |
| Tabla 37. Acumulación de Plomo total analizadas en los tejidos de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> . | 90 |
| Tabla 38. Análisis de varianza de la acumulación de zinc total analizadas en los tejidos de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> . | 90 |
| Tabla 39. Acumulación de Zinc total analizadas en los tejidos de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> . | 91 |
| Tabla 40. Factor de Bioconcentración de cadmio para <i>Lupinus ballianus</i> . | 101 |
| Tabla 41. Factor de Transferencia de cadmio para <i>Lupinus ballianus</i> . | 101 |
| Tabla 42. Factor de Bioconcentración de cadmio para <i>Lupinus condensiflorus</i> . | 101 |
| Tabla 43. Factor de transferencia de cadmio para <i>Lupinus condensiflorus</i> . | 102 |
| Tabla 44. Factor de Bioconcentración de cadmio para <i>Astragalus garbancillo</i> . | 102 |
| Tabla 45. Factor de Transferencia de cadmio para <i>Astragalus garbancillo</i> . | 102 |
| Tabla 46. Factor de Bioconcentración de plomo para <i>Lupinus ballianus</i> . | 103 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 47. Factor de Transferencia de plomo para <i>Lupinus ballianus</i> | 103 |
| Tabla 48. Factor de Bioconcentración de plomo para <i>Lupinus condensiflorus</i> | 103 |
| Tabla 49. Factor de Transferencia de plomo para <i>Lupinus condensiflorus</i> | 104 |
| Tabla 50. Factor de Bioconcentración de plomo para <i>Astragalus garbancillo</i> | 104 |
| Tabla 51. Factor de Transferencia de plomo para <i>Astragalus garbancillo</i> | 104 |
| Tabla 52. Factor de Bioconcentración de zinc para <i>Lupinus ballianus</i> | 105 |
| Tabla 53. Factor de transferencia de zinc para <i>Lupinus ballianus</i> | 105 |
| Tabla 54. Factor de Bioconcentración de zinc para <i>Lupinus condensiflorus</i> | 105 |
| Tabla 55. Factor de transferencia de zinc para <i>Lupinus condensiflorus</i> | 106 |
| Tabla 56. Factor de Bioconcentración de zinc para <i>Astragalus garbancillo</i> | 106 |
| Tabla 57. Factor de Transferencia de zinc para <i>Astragalus garbancillo</i> | 106 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Muestra de una planta adulta de <i>Lupinus ballianus</i> en una población de esta especie en Caruya-Río blanco, Distrito de Chicla, provincia de Canta, región Lima. | 6 |
| Figura 2. Fruto (a) y (b) semillas seleccionadas de <i>Lupinus ballianus</i> colectadas en Caruya-Río blanco, distrito de Chicla, provincia de Canta, región Lima. | 7 |
| Figura 3. Muestra de una planta adulta de <i>Lupinus condensiflorus</i> en el Cerro bendita, distrito de Lachaqui, provincia de Canta, región Lima. | 8 |
| Figura 4. Fruto (a) y semillas (b) seleccionadas de <i>Lupinus condensiflorus</i> colectadas en el Cerro bendita, distrito de Lachaqui, Provincia de Canta, región Lima. | 8 |
| Figura 5. Muestra de una planta de <i>Astragalus garbancillo</i> en floración en el Cerro bendita, distrito de Lachaqui, provincia de Canta, región Lima. | 10 |
| Figura 6. Semillas seleccionadas de <i>Astragalus garbancillo</i> (b) y fruto (a) colectado en el Cerro bendita, distrito de Lachaqui, provincia de Canta, región Lima. | 11 |
| Figura 7. Mecanismos implicados en la hipertolerancia a metales pesados y distribución del metal en una planta excluyente no hiperacumuladora (izquierda) y en una planta hiperacumuladora (derecha). | 14 |
| Figura 8. Fitotecnologías utilizadas en la eliminación, la inmovilización y/o en la degradación de los contaminantes orgánicos e inorgánicos. Fuente: Karaka et al. (2018). | 18 |
| Figura 9. Fitorremediación y fitominería de suelos ricos en metales pesados mediante el uso de plantas que hiperacumulan los metales en los órganos de la parte aérea de la planta | |
| Figura 10. Los mecanismos de la fitoestabilización de metales. Fuente: Karaka et al. (2018). | 21 |
| Figura 11. Tamices graduadas y apilables utilizadas para la separación de las semillas de <i>Lupinus</i> y <i>Astragalus</i> | 31 |
| Figura 12. Semillas de <i>Lupinus</i> separadas con los tamices graduadas. | 32 |
| Figura 13. Plántulas de <i>Lupinus ballianus</i> a los 25 días luego de haber realizado la siembra de semillas escarificadas en el sustrato. | 63 |
| Figura 14. Plántulas de <i>Lupinus condensiflorus</i> a los 25 días después de haber iniciado el ensayo de siembra de semillas pre tratadas con escarificación mecánica. | 64 |
| Figura 15. Plántulas emergidas de <i>Astragalus garbancillo</i> a los 12 días luego de haber iniciado el ensayo la siembra de semillas pre tratadas con escarificación mecánica. | 65 |
| Figura 16. Contenido de humedad de las semillas de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> | 68 |
| Figura 17. Valores de temperatura media mensual (°C) y de humedad relativa (%) registradas con un higrómetro en el invernadero donde se realizó la evaluación del desarrollo de <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> con tratamientos de relave de mina en el distrito de Lachaqui, provincia de Canta, región Lima. | 74 |
| Figura 18. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente cadmio total y la variable regresora cadmio raíces en <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> | 78 |
| Figura 19. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente cadmio total y la variable regresora cadmio hojas y tallos en <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> | 79 |
| Figura 20. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente plomo total y la variable regresora plomo raíces en <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> | 79 |

| | |
|---|----|
| Figura 21. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente plomo total y la variable regresora plomo hojas-tallos en <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> | 80 |
| Figura 22. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente zinc total y la variable regresora zinc hojas y tallos en <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> | 80 |
| Figura 23. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente zinc total y la variable regresora zinc en hojas y tallos en <i>Lupinus ballianus</i> , <i>L. condensiflorus</i> y <i>Astragalus garbancillo</i> | 81 |

RESUMEN

Los objetivos del estudio fueron conocer la viabilidad de las semillas, y evaluar el desarrollo de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* en suelos contaminados con cadmio, plomo y zinc y el uso potencial de estas especies en la fitorrestauración de suelos contaminados con metales pesados. El trabajo fue realizado en el invernadero en Lachaqui, Canta, región Lima, y en el Laboratorio de Fitología Aplicada en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La prueba de germinación de las semillas fue realizada en placas petri e incubadas en una cámara de crecimiento a una temperatura de 21/15 °C, un fotoperiodo de 12 horas día / y 12 horas noche, humedad relativa (80% día/ 90% noche), y una iluminación de 4800 lux: La prueba de emergencia de las plántulas fue realizado en un sustrato preparado en un diseño experimental completamente al azar. El contenido de la humedad de las semillas fue calculado en base al peso seco. Asimismo, el desarrollo de las tres especies vegetales fue evaluado con 12 tratamientos de relave de mina, y la unidad experimental fue una maceta de 19 cm de diámetro y 5 kg de capacidad. El experimento se realizó mediante el diseño experimental factorial completo de 3 x 4, y la distribución de las unidades experimentales de los tratamientos se realizó al azar, con 5 repeticiones por cada tratamiento. La acumulación de cadmio, plomo y zinc en los tejidos de las plantas se determinó mediante el método de absorción atómica. Las semillas con escarificación mecánica de lijado de la testa e inducidas en oscuridad, permitió una alta germinación de *Lupinus ballianus* *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*. Por lo tanto, las semillas escarificadas favorecieron la emergencia de plántulas en el sustrato, y la mayor emergencia de plántulas se obtuvo en *Astragalus garbancillo*. El mayor contenido de humedad en las semillas fue registrado en *Astragalus garbancillo*. La longitud de planta, el número de hojas y la producción de biomasa en las tres especies disminuyeron significativamente con el tratamiento de 100% de relave de mina. Los mayores valores de acumulación de cadmio total, plomo total, zinc total; y el contenido de estos metales en las raíces de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y en *Astragalus garbancillo*, fueron obtenidos con el tratamiento de 100% de relave de mina. El factor de bioconcentración de cadmio en las tres especies fue > 1. Pero, el factor de bioconcentración y de transferencia de plomo y zinc en las tres especies fue < 1, en conclusión, las tres especies son fitoestabilizadores de metales pesados.

Palabras claves: fitorremediación, plantas andinas, relave de mina, semillas.

ABSTRACT

The principal goals of this study were to find out the seed viability, to evaluate the development of *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* and *Astragalus garbancillo* in soils contaminated with cadmium, lead and zinc and finally recognize their potential use in the phytoremediation of soil contaminated with heavy metals. The study was carried out in a greenhouse in Lachaqui district, Canta, Lima region, and in the Laboratory of Applied Botany at San Marcos University (UNMSM). The germination test was carried out in petri dishes and incubated in a growth chamber at a temperature of 21/15 ° C, with a photoperiod of 12 hours day / and 12 hours night, relative humidity (80% day / 90% night), and 4800 lux of illumination. Seedlings emergence test was made on a substrate prepared in a completely randomized design and seeds moisture content was calculated based on dry weight. Likewise, the development of the three plant species was evaluated under 12 mine tailings treatments, and the experimental unit was a 19 cm diameter pot with 5 kg of capacity. This experiment was conducted under a complete experimental factorial design of 3 x 4, and the distribution of the experimental units was carried out randomly, with 5 repetitions for each treatment. Cadmium, lead and zinc accumulation in plant tissues was determined by the atomic absorption method. Seeds were prepared by mechanical scarification (their testa was physically opened by rubbed it with sand paper) and induced in darkness, this actions resulted in high germination rates of *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* and *Astragalus garbancillo*. Therefore, the scarified seeds favored the emergence seedlings in the substrate, and the greatest seedling emergence was obtained in *Astragalus garbancillo*. In the same way, the highest seeds moisture content was registered in *Astragalus garbancillo*. Plant length, number leaves and biomass production in the three species decreased significantly with the treatment of 100% mine tailings. The highest accumulation values of total cadmium, total lead, total zinc; and the metals concentration inside the roots of *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* and *Astragalus garbancillo* were obtained with the treatment of 100% mine tailings. The bioconcentration factor of cadmium for the three species was > 1. However, the bioconcentration factor and translocation of lead and zinc in the three species was <1. In conclusion, this three species are heavy metals phytostabilizers.

Keywords: phytoremediation, Andean plants, mine tailings, seeds.

I. INTRODUCCIÓN

La fitorrestauración o fitorremediación ha sido descrita como el uso de plantas para remediar *in situ* suelos, sedimentos, agua y aire contaminados por desechos orgánicos, nutrientes o metales pesados, eliminando los contaminantes del ambiente o haciéndolos inocuos (Salt *et al.*, 1998). Las tecnologías principales para la fitorremediación de metales son: (i) la fitoextracción, el uso de plantas para extraer los metales del suelo, transportarlos y acumularlos en los órganos de la parte aérea; (ii) fitoestabilización el uso de plantas para minimizar la movilidad de los metales mediante su acumulación en la raíz o su precipitación en la rizósfera (Alkorta *et al.*, 2004) a su vez, la fitodescontaminación implica la fitoextracción y la fitodegradación. Brooks *et al.* (1977) fueron los primeros en utilizar el término “planta hiperacumuladora” para referirse a las plantas con capacidad de acumular concentraciones mayores a 1000 ppm ($>1000 \text{ mg kg}^{-1}$ de materia seca). El término se redefinió posteriormente para designar aquellas especies vegetales que acumulaban Mn y Zn en concentraciones $>10\ 000 \text{ mg kg}^{-1}$, Co, Cu, Ni y Pb $>1\ 000 \text{ mg kg}^{-1}$, y concentraciones de Cd $>100 \text{ mg kg}^{-1}$ (Baker *et al.*, 2000).

En efecto, aquellas especies vegetales que crecen en suelos que contienen metales pesados han desarrollado diferentes estrategias basadas en mecanismos que les permiten acumular metales en formas no tóxicas o, por el contrario, excluirlos fuera de sus tejidos (Baker & Proctor, 1990). Chaney (1983) sugirió la idea de utilizar las plantas hiperacumuladoras para la limpieza de suelos contaminados con metales, a través de su cultivo y su posterior siega (fitoextracción). Estudios realizados en los últimos años han dado a conocer, que son pocas las especies hiperacumuladoras conocidas y ciertamente, sólo unas pocas especies son capaces de acumular varios metales a la vez, el empleo de otro tipo de especies tolerantes podría cobrar importancia, y existe un gran número de estudios que evidencian que los procesos evolutivos influyen en la hiperacumulación, pero se requiere un esfuerzo de muestreo considerable para explorar mejor este fenómeno. En tal sentido, es conveniente buscar plantas que han colonizado espontáneamente yacimientos mineros desde hace

suficiente tiempo como para que estén completamente adaptadas a estos ambientes contaminados (Diez, F.J., 2008).

Por otro lado, la colonización vegetal de los suelos ricos en metales depende de la capacidad de las plantas para desarrollar mecanismos de tolerancia (Ernst, 1990). Por eso, muchas de las especies vegetales que toleran altas concentraciones de los metales en el suelo, porque restringen su absorción y/o translocación hacia las hojas (estrategia de exclusión). Sin embargo, otras especies los absorben y acumulan activamente en su biomasa aérea (estrategia acumuladora), lo que requiere una fisiología altamente especializada (Baker & Proctor, 1990). En efecto, se han reconocido diferentes grados de acumulación metálica, desde concentraciones pequeñas hasta respuestas extremas, en las que el metal llega a exceder el 1% de la materia seca de la planta. Se ha probado con muchas especies vegetales que pueden modificar las condiciones de la rizósfera a través de procesos como la producción de exudados radiculares o la alteración del pH (Adriano *et al.*, 2001; Wenzel *et al.*, 2003b). Por tanto, la vegetación tiene un papel activo importante en el ciclo global de los metales, las plantas más usadas en los procesos de fitorremediación son las leguminosas por el papel que juegan en los procesos de sucesión natural y en el incremento de la fertilidad y la calidad del suelo (Alderete-Chávez *et al.*, 2008).

Sin embargo, en los programas de restauración de ecosistemas, la semilla de las especies vegetales es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores terrestres y acuáticas. Ésta desempeña una función fundamental en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas, la regeneración de los bosques y la sucesión ecológica. En la naturaleza la semilla es una fuente de alimento básico para muchos animales (Azcón-Bieto & Talón, 2000). Es uno de los principales recursos para el manejo agrícola y silvícola de las poblaciones de plantas, para la reforestación, la conservación del germoplasma vegetal y para la recuperación de especies valiosas sobreexplotadas. Las semillas pueden almacenarse vivas por largos periodos, asegurándose así la preservación de especies y variedades de plantas valiosas (Azcón-Bieto & Talón, 2008). En los procesos de

restauración ecológica, la información de los requerimientos ecológicos de las semillas y las plántulas, y en particular las semillas de las especies es rara vez articulada en la conservación y en los planes de manejo de los programas de restauración (Khurana & Singh, 2002). Hay pocos estudios acerca de la reproducción de especies nativas con fines de restauración ecológica (Castañeda *et al.*, 2006) y cada vez existe la necesidad de contar con material vegetal de buena calidad que permita desarrollar proyectos a mayor escala. Por tanto, el conocimiento sobre la germinación de las especies nativas o naturalizadas es entonces, el paso inicial toda vez que el material vegetal (plántulas) es el insumo de partida en el proceso (Pérez-Suárez, 2011). Su conocimiento no sólo está relacionado con requerimientos de germinación, sino que incluye los pretratamientos y las técnicas de almacenamiento para asegurar su disponibilidad a corto, mediano y largo plazo (Vargas & Pérez-Martínez, 2014).

II. ANTECEDENTES

La familia Fabácea es una de las familias más importante y también una de las más grandes. Esta familia se divide en 3 subfamilias: mimosoideas, ceasalpinoideas y faboideas (Mostacero *et al.*, 2009). En el Perú se han registrado alrededor de 145 géneros y 1000 especies (Brako & Zarucchi, 1993; Baldeón *et al.*, 2006), y en su mayoría son árboles y arbustos. Se han determinado 234 especies y 40 variedades como endémicas en 47 géneros. El género con mayor número de especies endémicas es *Lupinus*. En tal sentido, hay la necesidad prioritaria de realizar estudios taxonómicos detallados y una mayor recolección de especímenes de este género (Baldeón *et al.*, 2006). Por otra parte, las fabáceas endémicas ocupan la mayoría de regiones fitogeográficas, principalmente la mesoandina, como la puna húmeda y seca y los bosques muy húmedos montanos, entre los 1100 y 4 800 metros de altitud (Baldeón *et al.*, 2006).

2.1 Género *Lupinus*

El género *Lupinus* (Fabaceae) se encuentra ampliamente distribuido en casi todo el mundo y se han reconocidos dos grandes grupos separados geográficamente, de una parte, las especies con distribución en el Nuevo mundo, y otro distribuido en el Viejo Mundo (Barney, 2011, Walker *et al.*, 2003). Este género es grande y diverso con aproximadamente 500 especies que incluyen a especies anuales, herbáceas perennes, pocas especies semileñosas, arbustivas y arbolillos (Dunn, 1984).

En América, se encuentran la mayoría de las especies nativas representando el 90% de las especies del género. Se ha determinado dos centros importantes de diversidad, al Oeste de Norteamérica y en la zona oriental de los andes de Sudamérica (Eastwood y Hughes, 2008, Abdel-Kader & Bayer, 1999). Estas especies se encuentran, distribuidas desde las regiones templadas hasta la región subtropical del oeste de la cordillera de los andes en el nuevo mundo. Geográficamente, las leguminosas están distribuidas desde Alaska hasta el sur de Argentina y Chile (Dunn, 1984).

Por otra parte, la forma de crecimiento de las especies en el género *Lupinus* son hierbas o arbustos pubescentes, lanosos, seríceos a glabros. De raíz pivotante, con gruesos nódulos bacterianos globosos en su eje principal. Hojas alternas, en roseta a lo largo de los tallos, generalmente digitadas con 3-10 folíolos irradiando desde al ápice del peciolo; pocas especies unifoliadas; peciolo largo o muy breve, estípulas en general desarrolladas, agudas, agudas a la base del peciolo por más de su mitad similar a una vaina abierta. Racimos terminales o terminales y opositifolios, simples, en general erectos, multifloros, vistosos con brácteas caedizas y bractéolas pequeñas soldadas al cáliz (Flores, 1997). Con cáliz bilabiado, labios más largos que el tubo calicino campanulado; bractéolas soldadas al cáliz y emergiendo como dientecitos supernumerarios entre los labios (Flores, 1997). Corola violácea, rosa o blanca, o lila, rara vez amarilla, a veces con mancha central de otro color, estandarte circular u ovalado, a menudo reflexo, y sus bordes laterales muy doblados hacia atrás cubriendo el labio superior del cáliz, alas anchas obtusas, anteriormente soldadas entre sí por sus bordes (como ocurre en los pétalos de la quilla) y envolviendo a éste última; quilla ancha, en el ápice aguda y rostrada. Estambres monadelfos en tubo cerrado, anteras dimorfas, alternadamente cinco largas y cinco breves (Flores, 1997). Ovario sésil, con dos a numerosos óvulos, estilo incurvo y estigma apical. El tipo de fruto, es un legumbre comprimida, ascendente, rostrada, pubescente, interiormente septada, coriáceae, dehiscente, de valvas después espiraladas (excepto en especies domesticadas). Con semillas ovales o subcuadradas, sin arilo ni endospermo, hilio pequeño en un ángulo, con reborde tegumentario prominente (Flores, 1997).

2.1.1 *Lupinus ballianus* C.P. Sm.

Es arbusto de aproximadamente 1.50 metros de alto, con ramas y peciolos con una pubescencia atenuada (Figuras 1 y 2); estípulas de 1,5-1,8 cm de longitud adheridos al peciolo, subulada, seríceo-villosa; folíolos adpresos-pubescentes en las dos caras, oblongo, agudo, aplanado o con duplicado de 2-5 cm de longitud, por 4 mm de ancho; racimos con flores de color azules laxas, de más 10 cm de longitud, y con más de 12 verticilos de flores; pedúnculo de 3-5 cm de longitud; brácteas lanceoladas,

subuladas de 4-4,5 mm de longitud con pedicelos esparcidamente pubescentes de 5-8 mm de longitud. Flores de 15-16 mm de longitud, cáliz sub-adpreso viloso, con los labios superior bidentado, el lóbulo entero arqueado; estandarte suborbicular, con pubescencia en la punta, las alas de 10 mm de ancho, la quilla eciliada; ovario pubescente, cubierto con tricomas muy largos en la parte ventral, con 5-6 óvulos (Carrillo, 1970). Esta especie crece en las laderas rocosas y se desarrolla desde los 3000 hasta los 4000 metros de altitud, y está distribuida en los departamentos de Ancash, Ayacucho, Arequipa, Cusco, Lima y Puno (Brako & Zarucchi, 1993).



Figura 1. Muestra de una planta adulta de *Lupinus ballianus* en una población de esta especie en Caruya-Rio blanco, Distrito de Chicla, provincia de Canta, región Lima.



Figura 2. Fruto (a) y (b) semillas seleccionadas de *Lupinus ballianus* colectadas en Caruya-Río blanco, distrito de Chicla, provincia de Canta, región Lima.

2.1.2 *Lupinus condensiflorus* C.P.Sm.

Es una especie arbustiva de 60 a 110 centímetros de longitud, con tallos y ramas seríceo-adpresas (Figuras 3 y 4). Hojas de 5,2 – 7,5 cm de longitud. Estípulas de 8-11 mm de longitud. x 1,5-2 mm de ancho, oblanceoladas-aristadas, vellosas-apresas. Pecíolo de 1,8-3,6 cm de longitud. Foliolos de 6-8 verdes, extendidos, oblanceolados, ápice agudo, mucronado, de 2,5- 4,0 cm x 4,5 -0.9 cm de ancho, haz glabro, envés veloso-adpreso. Racimos densos, de 10-26 cm x 3,5-4,5 cm de ancho., con 8 a 16 verticilos de flores, pedúnculos de 3,8-10 cm longitud, veloso ascendente-adpresos. Brácteas oblanceoladas-aristadas, de 4-8 mm de longitud., vellosas-adpresas, persistentes o caducas, pedicelo de 6-12 mm de longitud., veloso. Flores azules-claras o intensamente azules, de 12-14 mm de longitud. Cáliz veloso, labio superior bidentado o bífido de 5,5-8 mm de longitud, el inferior tridentado, de 6-8mm de longitud reflexo. Estandarte suborbicular de 12-14 mm de longitud x 15-18 mm de ancho, veloso en la línea media y en el ápice; alas de 12-14,5 mm x 7,5 -10 mm de ancho, quilla de 12-14 mm x 4-6 mm de ancho eciliada u oscuramente ciliada. Ovario

veloso con 5 óvulos. Legumbre madura de 2,9 cm x 0,8 cm de ancho, vellosa con 3 a 5 semillas, rostrada (Flores, 1997).



Figura 3. Muestra de una planta adulta de *Lupinus condensiflorus* en el Cerro bendita, distrito de Lachaqui, provincia de Canta, región Lima.



Figura 4. Fruto (a) y semillas (b) seleccionadas de *Lupinus condensiflorus* colectadas en el Cerro bendita, distrito de Lachaqui, Provincia de Canta, región Lima.

2.2 Género *Astragalus* L.

El género *Astragalus*, es considerado como el género que tiene la mayor riqueza específica en la familia de fabáceas (Gómez-Sosa, 1979). Se han estimado que está conformado entre 2500 y 3000 especies (Lock & Simpson, 1991), y se encuentran distribuidas en las regiones frías y áridas de casi todo el mundo, con excepción de Australia y Nueva Zelanda (Gómez-Sosa, 1979).

En Norteamérica, se ha calculado que hay entre 400 y 450 especies, pero la mayor diversidad específica está en Asia con 1000 a 1500 especies (Wojciechowski et al., 1999). De otro lado, en América del Sur se han registrado 110 especies endémicas, distribuidas en Ecuador, Perú, Bolivia, Chile, Uruguay y Argentina (Gómez-Sosa, 1979).

En el Perú, se han registrado 27 especies de *Astragalus* (Zarucchi, 1993; Gómez-Sosa, 2010), de los cuales hay un total de 17 especies endémicas. Morfológicamente son hierbas perennes, inermes, glabras, pubescentes o villosas, en forma de matas o cojines densos, rara vez con rizomas viajeros; hojas imparipinadas, multifoliadas, sin estípulas, estípulas en la mayoría de las especies envainadas, membranosas; flores azules, violáceas blancas en racimos axilares pedunculados, espiciformes o laxos, rara vez solitarias, cáliz gamosépalo penta-lobulado frecuentemente con pubescencia negruzca; pétalos en general unguiculados, quilla breve, obtusa; estambres diadelfos, anteras uniformes; ovario sésil o estipitado, con numerosos óvulos, estilo filiforme glabro; vaina bivalva variada, elíptica, comprimida con suturas gruesas o algo inflada, alargado-acuminado, cilíndrica u ovoides-elíptica, con sutura inferior invaginada, formando como dos bolsones longitudinales y a veces prolongada anteriormente en falso tabique membranoso, que divide al fruto completamente o incompletamente en dos lóculos longitudinales amplios; semillas arriñonadas, pequeñas, sobre funículos alargados (Carrillo, 1970).

2.2.1 *Astragalus garbancillo* Cav.

Son matas densas perennes o más o menos arbustivas frecuentemente glabras o fuertemente pilosas, de tallos erectos o algunas veces decumbentes-ascendentes de más de 30 centímetros de alto, en lugares muy fríos son de reducido tamaño, de 12 a 14 pares de folíolos elípticos obtusos o emarginados, generalmente de 6 a 12 milímetros de largo por 3 a 5 milímetros de ancho, de color verde, glabro o piloso ceniciento (Figura 5); estípulas generalmente conspicuas, frecuentemente blancas membranosas; racimos en pedúnculos axilares cerca o igual al tamaño de las hojas

generalmente con muchas flores blancas con lilas de 2 centímetros de longitud, pedicelos de 2 milímetros de longitud; cáliz desarrollado de 14 milímetros de longitud pilosos más o menos de color marrón oscuro, los lóbulos cortos subulados de 4 milímetros de longitud y estandarte de 2 milímetros de longitud y uña muy pronunciada; ovario pubescente, estilo largo delgado. El fruto, es una vaina oblonga ovoide, algunas veces comprimida puberulento (Figura 6), con 3 a 4 semillas (Carrillo, 1970).



Figura 5. Muestra de una planta de *Astragalus garbancillo* en floración en el Cerro bendita, distrito de Lachaqui, provincia de Canta, región Lima.



Figura 6. Semillas seleccionadas de *Astragalus garbancillo* (b) y fruto (a) colectado en el Cerro bendita, distrito de Lachaqui, provincia de Canta, región Lima.

2.3 La contaminación de suelos con metales pesados

La contaminación es un proceso que deriva de acciones antrópicas, por los cuales entra y se acumula en el suelo uno o más contaminantes en una concentración tal que puede alterar las funciones del suelo y afectar negativamente a otros sistemas asociados como el aire, el agua y los organismos (Porta *et al.*, 2013). La contaminación de un suelo se produce, como consecuencia de las actividades humanas, hay un incremento en la concentración de una o varias sustancias potencialmente tóxicas, ya sea minerales (metales pesados, como el plomo, mercurio, cadmio, cobre cromo, selenio, arsénico y sus compuestos; materiales radioactivos; asbesto; y otros materiales peligrosos), ya sean sustancias orgánicas como los productos xenobióticos, fitosanitarios, dioxinas, hidrocarburos, plásticos, aceites, alquitrán, etc. La fuente de contaminación puede proceder de residuos industriales, fangos, derrame de petróleo, cenizas industriales, residuos de productos agroquímicos, entre otros (Porta *et al.*, 2013).

De otra parte, desde el punto de vista administrativo un suelo se considera contaminado cuando la concentración de uno o varios contaminantes, cuyos niveles están legalmente establecidos en cada país, y supone un riesgo para la salud humana o los organismos del ecosistema (Porta *et al.*, 2013). Asimismo, si se conoce la fuente de un contaminante, se habla de contaminación puntual, mientras si se desconoce el origen, se trata de una contaminación difusa, y el problema será mucho más difícil de resolver, por ejemplo, si el contaminante puede haber sido transportado por una capa freática lejos de su lugar de procedencia (Wuana & Okieimen, 2011). Una de las consecuencias más negativas de la revolución industrial ha sido la dispersión de los contaminantes en el agua, la atmósfera y en el suelo. De estos, el suelo es el medio más estático, donde los contaminantes pueden permanecer durante mucho tiempo. Esta permanencia a largo plazo es especialmente grave en el caso de los contaminantes inorgánicos como los metales pesados. Su persistencia, acumulación progresiva y/o su transferencia a otros sistemas supone una amenaza para la salud humana y los ecosistemas (Becerril *et al.*, 2007).

Por otra parte, el término de “metal pesado” se refiere a aquellos metales de la tabla periódica cuyo peso específico es superior a 5 g cm^{-3} o que tienen un número atómico por encima de 20, excluyendo generalmente a los metales alcalinos y elementos alcalinotérreos (Breckle, 1991). El término resulta algo impreciso si se tienen en cuenta las propiedades físico-químicas de los elementos, especialmente las propiedades iónicas que definen la capacidad de complejación y las propiedades biológicas. Se han utilizado otros términos como “metal tóxico” o “elemento traza”, sin que ninguno de ellos se refiera a los mismos elementos, resultando igualmente poco satisfactorios. En cualquier caso, parece que el término de “metal pesado” puede ser utilizado de una forma globalizadora para referirse a aquellos metales clasificados como contaminantes ambientales (Tiller, 1989).

Esta denominación tiene connotaciones de contaminación o toxicidad (Duffus, 2002), pero tiene un escaso significado biológico al agrupar elementos con distinto comportamiento (Duffus, 2002). Así, la esencialidad de algunos metales pesados para las plantas superiores (Cu, Fe, Mn, Zn) es bien conocida, también para animales (Co, Cr, Ni) y seres humanos (Fe, Mn, Ni, Zn, Cu, V, Co y Cr) (Oliver, 1997). Sin embargo, la presencia de otros metales pesados como por ejemplo Cd o Pb, no esenciales, pueden llegar a limitar el crecimiento vegetal y/o ser tóxicos para las plantas, animales y seres humanos (Adriano, 2001). Además, incluso elevadas concentraciones de elementos esenciales pueden causar efectos negativos sobre los seres vivos (Oliver, 1997). El estrés en las plantas, derivado de un excesivo contenido de metales pesados en los suelos, es mayor que el provocado por la deficiencia de metales pesados (Kabata-Pendias, 2004). En efecto la fitotoxicidad producida por la elevada concentración de metales pesados, que afecta al crecimiento y desarrollo vegetal, es debida tanto a la toxicidad intrínseca de los metales, como al carácter acumulativo de cada elemento (Gupta & Gupta, 1998). Por consiguiente, concentraciones altas de metales pesados (esenciales o no) en el suelo, pueden causar síntomas de toxicidad en las plantas e, inclusive, inhibir su crecimiento.

La fitotoxicidad puede venir provocada por alteraciones de numerosos procesos fisiológicos originados a nivel molecular y/o celular por la inactivación de enzimas, el bloqueo de grupos funcionales de moléculas metabólicamente importantes, el desplazamiento o la sustitución de elementos esenciales o la destrucción de la integridad de las membranas (Dary, 2015). El efecto bastante común de la toxicidad del metal pesado es el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno debido a la interferencia con la actividad de los transportadores de electrones, especialmente en la membrana de los cloroplastos (Pagliano *et al.*, 2006). Este incremento de especies reactivas provoca en la célula un estrés oxidativo que conduce a la peroxidación de lípidos, el deterioro de macromoléculas, el desmantelamiento de las membranas, la pérdida de iones y la rotura de las cadenas del ADN (Rascio & Navari-Izzo, 2011).

No obstante, las plantas acuden a una serie de mecanismos de defensa para controlar la absorción, la acumulación y el transporte de estos metales tóxicos y detoxificarlos excluyendo del citoplasma las formas iónicas libres (Figura 7). Una de las estrategias que las plantas más utilizadas es impedir la entrada del metal pesado a las células de la raíz atrapándolo en el apoplasto uniéndolo a exudados como los ácidos orgánicos (Watanabe & Osaki, 2002) o a grupos aniónicos de la pared celular (Dalla Vecchia *et al.*, 2005). La mayoría de los metales pesados que entran en la planta son confinados en las células de la raíz, donde son detoxificados uniéndose a sustancias orgánicas como los aminoácidos, ácidos orgánicos o péptidos de se unen a los metales y/o acumulándolos en las vacuolas (Hall, 2002).

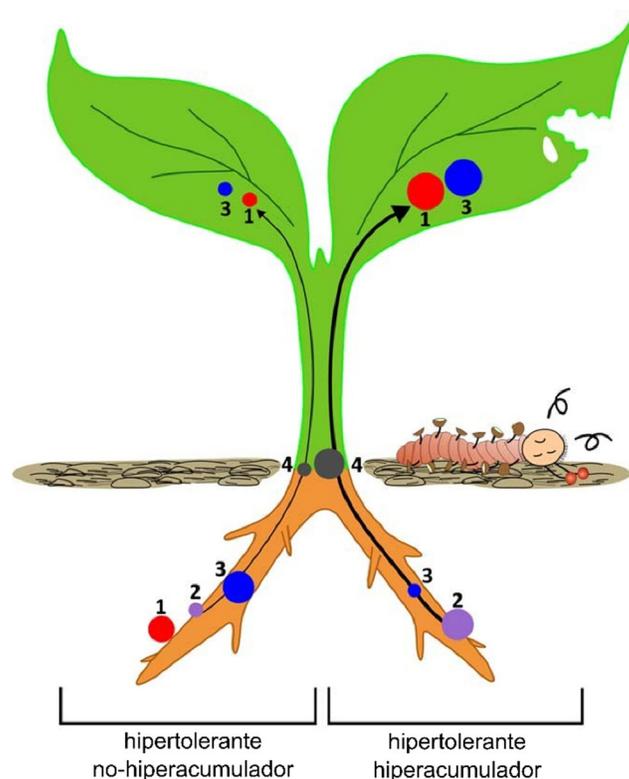


Figura 7. Mecanismos implicados en la hipertolerancia a metales pesados y distribución del metal en una planta excluyente no hiperacumuladora (izquierda) y en una planta hiperacumuladora (derecha). (1) Unión del metal pesado a la pared celular y/o a los exudados de la planta; (2) absorción por la raíz; (3) quelación en el citosol y/o acumulación en vacuolas; (4) transporte desde la raíz hasta la hoja. Los puntos de color indican el órgano de la planta donde ocurren los diferentes mecanismos y el tamaño del punto el nivel de cada uno de ellos. De acuerdo con la hipótesis elemental de defensa, las elevadas concentraciones de metales pesados convierten a las hojas hiperacumuladoras en veneno para los herbívoros. Fuente: Rascio & Navari-Izzo (2011), texto traducido por Enoc Jara.

También la movilidad y la biodisponibilidad de los metales pesados están determinados por factores ambientales, y la fijación de metales en los sedimentos ocurre por adsorción y reacciones con la materia orgánica, debido al tipo de suelos, la textura, capacidad de intercambio catiónico y de retención (Brunetti *et al.*, 2009). Los metales pesados pueden participar en una serie de procesos, incorporándose al ciclo del agua, principalmente en la fase relacionada con el suelo y el agua subterránea, puede acumularse en el suelo como resultado de reacciones químicas vía proceso de adsorción, solubilización, precipitación y cambios en su estado de oxidación, o bien pueden estar presentes en tejidos vegetales, debido a su asimilación por las plantas (Navarro *et al.*, 2009). Las consecuencias ecológicas de los suelos contaminados por metales pesados, aparentemente pasan desapercibidos, pero son potencialmente peligrosos para la vida de los organismos (Bernal *et al.*, 2007). Suponen un riesgo por su lixiviación hacia aguas superficiales y subterráneas, absorción por las plantas, y finalmente el paso a la cadena trófica. Cuando se dan niveles altos de biodisponibilidad, tanto los elementos esenciales (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo) como los no esenciales (Cd, Pb, Hg, Cr) pueden ser tóxicos. La amenaza que suponen para la salud humana y animal se agrava por su larga persistencia en el suelo. Para la descontaminación de elementos tóxicos en suelos se utilizan las técnicas de fitoextracción y fitoestabilización o fitoinmovilización (Carpena & Bernal, 2007).

2.3.1 Cadmio

El cadmio es uno de los metales pesados traza del suelo más solubles y peligrosos debido a su alta movilidad y que en pequeñas concentraciones tienen efectos nocivos en las plantas. Hay que considerar la peligrosidad del cadmio para la salud humana, a través de la ingestión de alimentos, ha llevado a muchos investigadores a analizar la posible influencia de las prácticas agrícolas en el contenido de cadmio en el suelo. De hecho, algunos resultados muestran importantes diferencias entre el contenido de cadmio en suelos agrícolas y aquellos que no han sido cultivados, por ejemplo, en Australia Jinadasa *et al.* (1997) observaron que el incremento del contenido de cadmio en el suelo está, en principio, asociado con el material originario.

Sin embargo, se ha visto incrementado a lo largo del siglo XX por la minería, contaminación atmosférica, quema de combustibles fósiles, depósito de embalajes de plástico y baterías que contienen cadmio, y por la aplicación en los suelos agrícolas de fertilizantes y de lodos depuración. En los suelos agrícolas, de todas las actividades enumeradas, la aplicación de fertilizantes fosforados es la principal fuente de contaminación de cadmio (Oliver, 1997).

2.3.2 Plomo

Es un metal potencialmente dañino que tiende a contaminar el ambiente ya que se acumula en los suelos a causa de su baja solubilidad y relativa susceptibilidad a la degradación microbológica por lo que permanece accesible a la cadena alimenticia y no hay evidencia de que juegue un rol esencial en el metabolismo humano (Estévez *et al.*, 2000). El plomo (Pb^{2+}) es uno de los metales pesados presentes en los suelos que no se degrada, pero sigue acumulándose continuamente. Los suelos contaminados con plomo comúnmente, se encuentran asociados con cadmio y zinc. La barrera suelo-planta limita la trasmisión del plomo a la cadena alimenticia, ya sea por procesos de inmovilización química en el suelo, o limitando el crecimiento antes que el plomo absorbidos alcancen los niveles que pueden ser dañinos para el ser humano. La absorción y movimiento del plomo por la contaminación atmosférica en las hojas pueden llegar a ser de un 73 a 95% del contenido del plomo total en hortalizas de hoja, como en espinacas y los cereales (Kabata-Pendias, 2011).

2.3.3 Zinc

Es un elemento traza esencial para las plantas superiores y los animales. Está presente en muchos alimentos y en suelos con bajo contenido de materia orgánica (Montenegro y Fredes, 2008). El zinc es un elemento esencial para las plantas, que participa en varios procesos metabólicos y es componente de varios enzimas. El contenido medio de zinc en la superficie de los suelos de diferentes países varía de 17 a 25 mg Kg^{-1} . Por otra parte, se considera como niveles de fitotoxicidad para el hombre

y animales de bajo a moderado, cuando la concentración de zinc es de 100 a 400 mg Kg⁻¹, y la fitotoxicidad es crítica y aguda en suelos ácidos (Kabata-Pendias, 2011).

2.4 Fitotecnologías utilizadas en la remediación de suelos contaminados

Hay la necesidad de utilizar procesos sostenibles con bajo costo efectivo y ecológicamente realizable y que no implique la remoción del suelo y/o acumulación y que no destruyan las funciones biológicas de los suelos. Además, se han reportado que altas concentraciones de cadmio, plomo, cobre y cromo originadas por las minas (Prasad & Freitas, 2003). Los metales como el plomo, cadmio, mercurio, arsénico son muy dañinos para la salud humana y para la mayoría de los organismos vivos. Son elementos no degradables, ni química, ni biológicamente, con lo que acaban acumulándose en los suelos (Llugany *et al.*, 2007).

Para eliminar muchos de los contaminantes de los suelos afectados se ha desarrollado una novedosa tecnología limpia, barata y eficaz. Se trata de la fitorremediación, que consiste en el uso de las plantas para limpiar suelos contaminados con metales, plaguicidas, solventes, explosivos, petróleo, lixiviados de vertederos de agua contaminada (Brock & Jackson, 1997). La fitorremediación tiene grandes ventajas de ser *in situ*, de bajo costo y sustentable para el ambiente (Ehsan *et al.*, 2009). Una tecnología verde basada en el uso de la energía solar, fácil de aplicar, uso frecuente a un amplio rango de metales, conocimiento de bases agrícolas, reciclado del metal tras mineralización con gran reducción de la masa del contaminante, etc. La fitorremediación ofrece la ventaja adicional de hacer los sitios contaminados estéticamente llamativos, lo que permite apoyo e interés público (Dary, 2015).

Particularmente, el tratamiento de los suelos contaminados mediante fitorremediación implica la interacción de los contaminantes, las raíces y la microflora en la rizósfera (la capa del suelo ocupada por las raíces). Entre las posibilidades en el tratamiento de los contaminantes se tienen que estos pueden extraerse del suelo y acumularse en los tejidos de las plantas o pueden degradarse en la rizósfera debido a la actividad enzimática de la planta y la microflora del suelo (Karaka *et al.*, 2018).

Asimismo, alternativamente los contaminantes pueden inmovilizarse en la rizósfera cuando se transforman en otras especies químicas con menor biodisponibilidad. Varios fitotecnologías se han descrito dependiendo del tipo de contaminante a ser tratado y de los procesos involucrado en la fitorremediación. Estas fitotecnologías son: la fitoacumulación (también llamada fitoextracción), fitoestabilización, rizofiltración, fitodegradación, rizodegradación (también llamada fitoestimulación) y fitovolatilización (Figura 8) (Karaká *et al.*, 2018). Sin embargo, cuando se tratan los suelos contaminados con metales pesados, e inclusive de los relaves de mina, solo son aplicables la fitoestabilización y la fitoextracción, con la limitación de que la profundidad de remediación se restrinja a la rizósfera (Mendez & Maier, 2008).

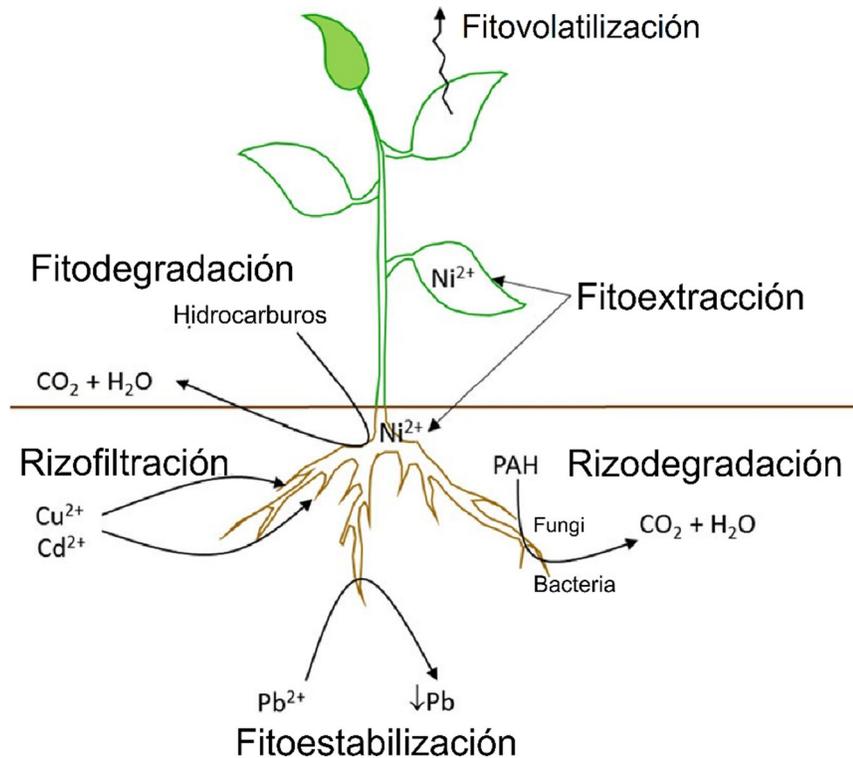


Figura 8. Fitotecnologías utilizadas en la eliminación, la inmovilización y/o en la degradación de los contaminantes orgánicos e inorgánicos. Fuente: Karaká *et al.* (2018), texto traducido por Enoc Jara.

2.4.1 Fitoextracción

También conocido como fitoacumulación, fitoabsorción o fitoquelación, que consiste en la absorción de contaminantes del suelo o el agua por las raíces de las plantas y, su traslocación y acumulación en la biomasa aérea como en las hojas y los tallos (Azrat *et al.*, 2013). La translocación de los metales a los brotes es un proceso bioquímico crucial y es deseable en una fitoextracción efectiva porque la cosecha de la biomasa de raíces generalmente no es factible (Zacchini *et al.*, 2009). Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado en plantas que acumulan metales y recientemente con materiales radioactivos (Piechalak *et al.*, 2008). Este método generalmente se aplica a suelos contaminados con metales con concentraciones de metales bajas o medianas, cuando la biotoxicidad del metal no afecte severamente el metabolismo de la planta. Además, la fitoextracción no destruye la estructura ni la fertilidad del suelo (USEPA, 2000). Es decir, el objetivo final de esta técnica es cosechar la parte aérea de la planta y tratarla como un residuo, confinándola en lugares especialmente acondicionados (Figura 9). Alternativamente, en el caso de que resultara económicamente rentable, se podría proceder a la recuperación del metal (Dary *et al.*, 2015).

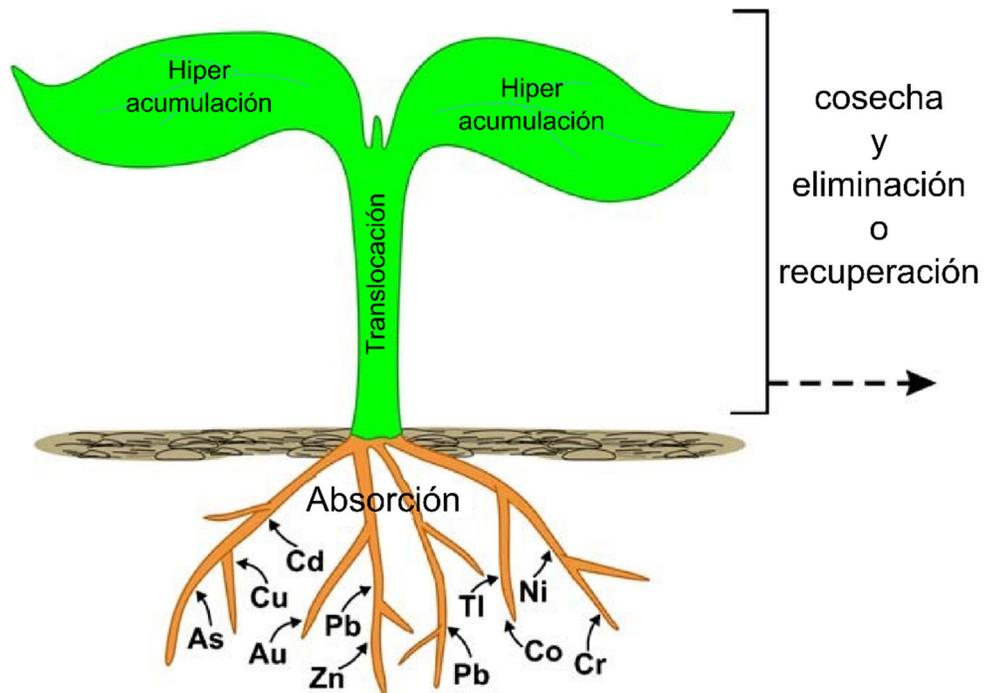


Figura 9. Fitorremediación y fitominería de suelos ricos en metales pesados mediante el uso de plantas que hiperacumulan los metales en los órganos de la parte aérea de la planta. La cosecha de la parte aérea de las plantas que conduce a la eliminación de grandes cantidades de metales pesados tóxicos extraídos del suelo o a la recuperación de los metales importantes que se utilizan. Fuente: Rascio & Navari-Izzo (2011), texto traducido por Enoc Jara.

2.4.2 Fitofiltración

Consiste en la remoción de los contaminantes de aguas superficiales o de aguas residuales contaminadas mediante el uso de plantas (Mukhopadhyay & Maiti, 2010). La fitofiltración puede ser rizofiltración (uso de raíces de las plantas) o blastofiltration (uso de plantas). Por consiguiente, en los procesos de fitofiltración el objetivo es que los contaminantes sean absorbidos o adsorbidos, y por lo tanto su movimiento a las aguas subterráneas se reduzca al mínimo.

2.4.3 Fitoestabilización

La fitoestabilización se centra en establecer un sistema vegetativo límite del área afectada y que tiende a modificar las condiciones fisicoquímicas en la rizósfera e

inducir la inmovilización de los metales pesados dentro del suelo contaminado (Sheoran *et al.*, 2012). La fitoestabilización de metales es una estrategia diferente que persigue la inmovilización de los metales en el suelo, impidiendo su dispersión y su entrada en la cadena trófica (Mendez & Maier, 2008). Además, la fitoestabilización resulta ser un método adecuado y barato para reducir de forma inmediata el impacto negativo de la contaminación. Se puede utilizar también en áreas contaminadas muy extensas o inaccesibles donde otros procedimientos de remediación son impracticables (Dary, 2015). Los metales se acumulan en las raíces de la planta o son precipitados por exudados radicales. Una planta fitoestabilizadora ideal debería ser tolerante a metales y acumularlos principalmente en las raíces, presentando muy pocos factores de translocación. Puesto que esta técnica no persigue la extracción de los contaminantes sino su estabilización, requiere una monitorización periódica (Dary, 2015). Por tanto, las leguminosas acumulan metales fundamentalmente en las raíces (Pajuelo *et al.*, 2007) por lo que son excelentes candidatas para su empleo como fitoestabilizadoras. Precisamente, los mecanismos de la fitoestabilización se muestran en la figura 10.

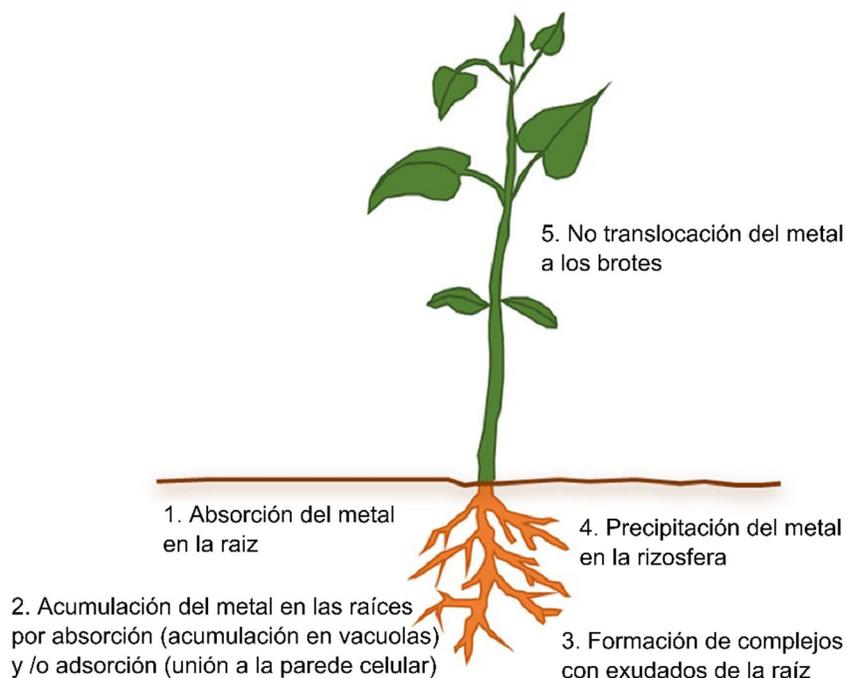


Figura 10. Los mecanismos de la fitoestabilización de metales. Fuente: Karaka *et al.* (2018), Traducido por Enoc Jara.

2.4.4 Fitovolatilización

Esta técnica se fundamenta en la capacidad de las plantas (o las asociaciones microbianas con las plantas) para absorber contaminantes (Se, As, Hg), transformarlos en compuestos volátiles de baja toxicidad y evaporarlos en la atmósfera (Kopstik, 2014). Esta técnica es útil cuando es posible convertir el metal en un compuesto volátil. Si esta conversión tiene lugar en el interior de la planta, se puede producir la evapotranspiración del compuesto volátil a través de las hojas. Esto ocurre, por ejemplo, con el selenio, que es complejado formando metil selenio cisteína y metil selenio metionina, las cuales son transportadas hasta las hojas. Una vez allí, estos compuestos se descomponen en metil selenio y dimetil selenio, los cuales son volatilizados en las hojas (Dary et al., 2015).

2.4.5 Fitodegradación

Consiste en la transformación de los contaminantes orgánicos en moléculas más simples. En determinadas ocasiones, los productos de la degradación le sirven a la planta para acelerar su crecimiento, en otros casos los contaminantes son biotransformados. Las plantas poseen la capacidad innata de detoxificar compuestos xenobióticos. Dado que son organismos fotosintéticos, en comparación con los microorganismos, normalmente suelen carecer de la ruta completa de degradación de estos compuestos. En las plantas superiores, los xenobióticos pueden ser parcialmente transformados a través de varios procesos bioquímicos (Gerhardt *et al.*, 2009).

2.5 Especies de *Lupinus* y *Astragalus* utilizados en la fitorremediación de suelos contaminados

Las especies de *Lupinus* que han sido estudiadas por su capacidad en la fitoestabilización de metales pesados han sido con algunas de las especies del sur de Europa. Por ejemplo, Dary *et al.* (2010) evaluaron la fitoestabilización *in situ* de suelos contaminados con metales pesados utilizando *Lupinus luteus*, señalan que ésta especie logró acumular rápidamente cobre y cadmio principalmente en las raíces, lo

que indica su uso potencial en la fitoestabilización de metales en el suelo. Martínez-Alcalá *et al.* (2010) evaluaron *Lupinus albus* en la fitorremediación de suelos contaminados con niveles altos de zinc, cadmio, cobre y plomo; y con valores de pH de 4,2 a 6,8. En la rizósfera de los suelos ácidos obtuvieron concentraciones bajas de manganeso, zinc y cobre. Sin embargo, en la planta encontraron concentraciones altas de metales pesados reflejando su mejor disponibilidad en el suelo. La limitada transferencia de los metales pesados al tallo confirma el papel potencial de esta especie en la fitoinmovilización de los metales pesados (Martínez-Alcalá *et al.*, 2009) particularmente en suelos alcalinos y neutros contaminados. Asimismo, Vásquez *et al.* (2006) evaluaron el uso de *L. albus* en la fitoestabilización de los suelos contaminados con cadmio y arsénico, recomiendan el uso de esta especie en la fitoestabilización y en la revegetación de los suelos contaminados por metales. Por otro lado, Pastor *et al.* (2003) luego de haber evaluado la acumulación de *L. albus* en suelos contaminados con zinc, la aplicación de 300 partes por millón (ppm) de zinc produjo desbalances nutricionales. Sin embargo, obtuvieron una alta acumulación de zinc en las raíces (4 640 ppm) y en la parte aérea (3 605 ppm), debido a estas características consideran que *L. albus* ofrece un potencial fitorremediador y útil para realizar la revegetación de áreas degradadas de suelos ácidos o neutros contaminadas con zinc. Asimismo, señalan que en forma complementaria que *L. albus* podría ser usado con el objetivo lograr la recuperación de suelos contaminadas con mercurio (Zornoza *et al.*, 2010).

Cabe resaltar, los estudios internacionales muestran que la tecnología con mayores beneficios y la más efectiva para estabilizar residuos mineros es la fitoestabilización, que consiste en el uso de plantas metalófitas excluyentes y mejoradores de sustrato adecuados para inmovilizar o reducir la biodisponibilidad de los metales presentes en un sustrato sólido *in situ*, como los residuos mineros. Las plantas pueden elegir con base a sus mecanismos de secuestro de los contaminantes, por ejemplo, reacciones redox, por ejemplo, la reducción de cromo VI a cromo III (Durham, 2004), precipitando el contaminante en una forma insoluble (por ejemplo, plomo en forma de fosfato de plomo o incorporando a los compuestos orgánicos dentro de la lignina de la planta (Cunningham *et al.*, 1995).

Para la fitoestabilización de un residuo en particular no sólo deben tolerar y acumular metales en forma adecuada, sino que también deben estar adaptadas al clima local y ser inocuas para el medio ambiente. Entre las especies nativas que se desarrollan en la región alto andinas del Perú, y que tendrían las capacidades potenciales para la fitoestabilización de suelos contaminados con metales pesados se tienen a varias especies nativas de *Lupinus* y *Astragalus*. En trabajos realizados con algunas especies de *Lupinus* de origen americano se destacan sus ventajas en la fitoestabilización de metales pesados. Como, por ejemplo, el trabajo publicado por Ehsan *et al.* (2009) en el crecimiento de *Lupinus uncinatus* con estrés de cadmio, por su grado de tolerancia al cadmio en esta especie y debido a la acumulación de este metal en la planta. Proponen el uso en la fitoestabilización y en la revegetación de los suelos contaminado con cadmio. También, De La Cruz-Landero *et al.* (2010) evaluaron la respuesta de *Lupinus versicolor* en suelos contaminados con metales pesados, y concluyen que esta especie puede ser utilizada en la extracción de metales pesados, en la fitoestabilización y en la revegetación de suelos contaminados, específicamente con cadmio, níquel y cobre.

Dada las enormes posibilidades destacables de las especies de *Lupinus* y *Astragalus* que han sido demostrado por sus múltiples bondades en los estudios realizados con otras especies de estos géneros en el extranjero, por su alta resistencia a diferentes situaciones de estrés: a) como la tolerancia a temperaturas bajas, b) la capacidad de desarrollarse en suelos ácidos o neutros lo que es habitual aquellas zonas afectadas por los residuos mineros, junto a la capacidad que tiene en fijar nitrógeno atmosférico al tratarse de especies leguminosas. De otra parte, hasta donde he podido indagar, en el Perú existen pocos estudios de fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados, particularmente utilizando las especies nativas y/o naturalizadas de *Lupinus* y *Astragalus*.

2.6 La dormición de semillas y tratamientos para eliminar la dormición

La dormición, dormancia o latencia de la semilla se refiere al estado actual de una población de semillas viables, en el cual las semillas viables no germinan cuando se les proporcionan las condiciones normalmente favorables para la germinación, como la humedad adecuada, un régimen de temperatura apropiado, atmósfera normal y, en algunos casos, luz. La dormancia ha evolucionado como una estrategia para evitar la germinación en condiciones donde la supervivencia de las plántulas es baja (Rao et al., 2007; Schmidt, 2000). Hay varios grados de dormición que varían de muy leve a muy fuerte (profundo). A veces, el desarrollo o el grado de latencia cambian durante la vida de la semilla, generalmente como respuesta a condiciones externas. Por lo tanto, la latencia puede ser innata, desarrollarse, romperse y desarrollarse en la semilla (Schmidt, 2000).

Existen varios tipos de dormición, la dormición primaria que está dada por factores exógenos y endógenos. La dormición exógena hace referencia a las condiciones ambientales básicas que determinan el proceso de germinación como disponibilidad de agua, luz y temperatura. En tanto, la dormición endógena es inherente a las características internas de la semilla, tales como dormancia por embriones rudimentarios, inhibición metabólica u osmótica. La dormición combinada (exógena-endógena) hace referencia a las combinaciones de latencia de la cubierta o el pericarpio con latencia fisiológica endógena (Baskin & Baskin, 2014). De otra parte, la falta de germinación de las semillas que presentan la dormición física se debe a que no se realiza la imbibición con el agua, lo cual impide la activación de sistemas metabólicos y de información. Se considera que este tipo de impermeabilidad es uno de los tipos más evolucionados de dormición (Baskin & Baskin, 2004; Baskin & Baskin, 2008). Se presenta en unas cuantas familias filogenéticamente avanzadas exclusivamente de las angiospermas como Cistaceae, Convolvulaceae, Fabaceae, Malvaceae y Rhamnaceae (Baskin & Baskin, 1998; Baskin, 2003). La gran familia pertenecientes a las dicotiledóneas; su aparente abundancia se debe a que es el mecanismo inhibitorio que prevalece en muchas leguminosas (Camacho, 2011).

Las semillas con dormición física tienen semillas o mantos de frutos impermeables al agua, y no pueden absorber agua cuando se colocan en un ambiente húmedo (Baskin & Baskin, 2000). La Impermeabilidad del agua en la semilla es causada por una o más capas de células en empalizada impermeables al agua que forman una barrera para la entrada de agua (Baskin y Baskin, 1998). Para romper esta condición existen diversos mecanismos, tales como la escarificación y la estratificación. La escarificación es una técnica donde, por métodos mecánicos o químicos, se induce la germinación a través de la rotura, abrasión o ablandamiento de la cubierta seminal, haciéndola más permeable al movimiento del agua y gases (Azcón & Talón 2008). Si las estructuras que cubren la semilla evitan el crecimiento del embrión, remuévalas para que pueda germinar. En algunos casos, la testa de la semilla contiene inhibidores que evitan o demoran la germinación, éstos se pueden lixiviar colocando la semilla en agua corriente durante varias horas o sumergiéndola en un gran volumen de agua que se debe cambiar cada seis a doce horas. La ISTA también recomienda utilizar ácido sulfúrico concentrado, durante 2 a 45 minutos dependiendo de la especie, para escarificar la testa. Este método, sin embargo, es costoso y peligroso, y se debe seguir con cautela (Rao et al., 2007).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis de investigación (Hi)

- Las semillas escarificadas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* tienen la capacidad de germinar en suelos contaminados con metales pesados.
- *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* inducen la absorción y acumulación del plomo, cadmio y zinc en el sistema radical, la inmovilización en el suelo, y minimizando el transporte de estos metales al tallo y a las hojas en estas especies.

3.1.2 Hipótesis nula (Ho)

- Las semillas no escarificadas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* tienen una baja capacidad de germinación en suelos contaminados con metales pesados.
- *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* no inducen la absorción y acumulación del plomo, cadmio y zinc en el sistema radical, los metales se movilizan en el suelo facilitando el transporte y la acumulación en los tallos y en las hojas en estas especies.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

- a. Conocer la calidad de las semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*, y evaluar el desarrollo de estas tres especies

promisorias en la fitorrestauración de suelos contaminados con cadmio, plomo y zinc en condiciones controladas.

3.2.2 Objetivos específicos

- a. Evaluar la viabilidad de las semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.
- b. Evaluar la emergencia de plántulas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* en almácigos.
- c. Determinar el contenido de humedad de las semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.
- d. Conocer el crecimiento vegetativo de *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* en suelos contaminados con cadmio, plomo y zinc.
- e. Determinar la acumulación de cadmio, plomo y zinc de *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.
- f. Calcular el factor de bioacumulación y de transferencia de cadmio, plomo y zinc en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Métodos

4.1.1 Método de colecta de frutos de *Lupinus* y *Astragalus*

Para realizar la colecta de los frutos de *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* en el campo se siguieron las recomendaciones de colecta de frutos y semillas descritas por Gold *et al.* (2004), indican, que antes de iniciar las colectas de frutos y semillas, es indispensable realizar las revisiones de las colectas herborizadas de las especies a colectar, las tres especies en estudio fueron revisadas en el Herbario (USM) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y también se realizaron las revisiones bibliográficas, que permitió conocer la distribución geográfica de estas especies en el Perú.

Para conocer la fenología reproductiva de las especies, se siguieron las recomendaciones dadas a conocer por Schmidt (2000) y antes de iniciar la colecta de los frutos y semillas se realizaron tres visitas preliminares a las poblaciones naturales de estas especies, lo que permitió conocer: la fenología de estas especies, los meses de inicio de la floración, de la fructificación, la maduración de los frutos y el inicio de la dispersión de las semillas, considerando que los frutos de las plantas no domesticadas no maduran uniformemente en comparación con sus parientes cultivadas de estas especies. Por otra parte, luego de haber realizado las colectas de los frutos y semillas de estas especies y de otras familias en las poblaciones naturales de la región andina durante 4 años continuos, se observaron que la mayoría de los frutos y las semillas de las especies vegetales altoandinas la maduración finaliza en el mes de julio. También, se observó que la dispersión de las semillas se inicia en el mes de agosto y finalizando la dispersión en el mes de octubre, y este proceso fisiológico coincide con la estación en la región andina del Perú. Los criterios como el indicador de la madurez de los frutos fue el cambio del color, la reducción en el contenido de humedad y también la dispersión, ya que es más factible que las semillas dispersadas estén maduras con respecto a semillas que deben ser extraídas del fruto (Schmidt, 2000). En la colecta,

los frutos maduros fueron desprendidos manualmente de los racimos de los ejes florales de estas especies cortando con una tijera de podar “pico de loro” y luego los frutos fueron guardados en bolsas de papel Kraft (Ailstock *et al.*, 2010). Finalizado las colectas, los frutos fueron envueltos con papel toalla para reducir la humedad y fueron colocadas dentro de bolsas de papel Kraft. Las bolsas con los frutos fueron rotuladas, indicando el lugar de colecta, la fecha y la descripción del área de colecta, y finalmente, los frutos fueron trasladadas al laboratorio.

Los frutos de *Lupinus ballianus* fueron colectados en poblaciones de esta especie, en el Centro poblado de Santa Rosa, distrito de Aquia, provincia de Bolognesi, región Ancash, y en el Centro Poblado de Caruya-Río blanco, distrito de Chicla, provincia de Huarochirí, región Lima (Tabla 1). Los frutos de *Lupinus condensiflorus* fueron colectados en poblaciones de esta especie en el Cerro bendita, distrito de Lachaqui, provincia de Canta, región Lima. Los frutos de *Astragalus garbancillo* fueron colectados en el Centro poblado de Santa Rosa, distrito de Aquia, provincia de Bolognesi, región Ancash, y en el Cerro bendita, distrito de Lachaqui, provincia de Canta, región Lima (Tabla 1).

Tabla 1. Lugares de colecta de frutos y semillas de especies de *Lupinus* y *Astragalus*, en la altitud y en las coordenadas geográficas (UTM) indicadas.

| Lugares de colecta | Distrito | Provincia | Región | Altitud (m) | Coordenadas UTM |
|-------------------------------|----------|------------|--------|-------------|-----------------|
| Centro poblado de Santa Rosa, | Aquia | Bolognesi | Ancash | 3 798 | 265166, 8894157 |
| Cerro bendita | Lachaqui | Canta | Lima | 3 780 | 322491, 8722856 |
| Caruya- Río blanco | Chicla | Huarochirí | Lima | 3 889 | 363325, 8701373 |

4.1.2 Procesamiento y limpieza de los frutos y las semillas

En el laboratorio de Fitología Aplicada de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, los frutos y las semillas fueron secados en una estufa marca Beltec a la

temperatura de 38 °C por 72 horas. Cumplido el tiempo de secado, para facilitar la liberación de las semillas de los frutos, los frutos secos de cada especie fueron golpeadas con una vara liviana de madera para facilitar el desprendimiento de las semillas de los frutos. Algunas semillas persistentes dentro de las vainas de los frutos se retiraron con la ayuda de una pinza fina. Luego las semillas de cada especie, y por separado fueron tamizadas utilizando un juego de tamices graduadas y apilables de los números 5, 10, 18, 35, 60 (Figura 11); que permitieron la separación y la selección de las semillas según su tamaño (Figura 12) y el grado de desarrollo (Rao *et al.*, 2007).



Figura 11. Tamices graduadas y apilables utilizadas para la separación de las semillas de *Lupinus* y *Astragalus*.



Figura 12. Semillas de *Lupinus* separadas con los tamices graduadas.

4.1.3 Determinación del contenido de humedad de las semillas

El contenido de humedad de la semilla se expresa en términos del peso del agua contenida en una semilla como porcentaje del peso total de la semilla antes del secado, conocido como peso húmedo en base al peso fresco (pf) (International Seed Testing Association (ISTA), 2005).

Previamente antes de iniciar la prueba, las placas petri de 60 x 15 mm fueron secadas en una estufa a la temperatura de 120 °C por una hora, en seguida se esperó que las placas Petri se enfríen. Luego con un plumón marcador cada placa petri fue rotulada indicando la especie y repetición. A continuación, las placas petri vacías fueron pesadas en una balanza analítica. En seguida se determinó el peso húmedo de las semillas, que consistió en poner una por una las placas Petri rotuladas dentro de la balanza analítica. Para determinar la humedad de las semillas de *Lupinus ballianus* y *L. condensiflorus* en cada placa Petri se agregó 20 semillas y luego se registró el peso de las semillas. En cambio, para determinar la humedad de las semillas de

Astragalus garbancillo se pesaron 100 semillas en cada placa Petri debido a que las semillas son pequeñas. Por cada especie se pesaron 5 réplicas, y para calcular los promedios. Por otro lado, para determinar el peso seco de las semillas de *Lupinus* y *Astragalus* fueron secadas en una estufa a la temperatura de 105 °C durante 4 horas, se siguió las recomendaciones de secado indicado por Pablo-Pérez (2013).

El contenido de humedad en las semillas fue calculado con base al peso seco (ps), es decir por la pérdida del peso y como porcentaje del peso seco de las semillas (Rao *et al.*2007), y los cálculos fueron realizado mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Contenido de Humedad (\% ps)} = \frac{(\text{peso fresco}) - (\text{peso seco})}{(\text{peso seco})} \times 100$$

4.1.4 Pre tratamiento de las semillas mediante escarificación mecánica

Para mejorar la hidratación de las semillas y encontrar las condiciones adecuadas para conseguir el éxito en la germinación de las semillas en estas especies, fue indispensable realizar un pre tratamiento de las semillas mediante una escarificación mecánica de la testa de las semillas, que consistió en lijar la cubierta engrosada de las semillas utilizando una lija fina al agua No. 180. Al lijar la cubierta de las semillas, se tuvo la precaución de lijar las testas de las semillas solamente hasta llegar al nivel los tejidos de los cotiledones, tejidos con presencia abundante de almidón. En la escarificación mecánica de las semillas con una lija se siguieron los siguientes pasos:

- a) Con una tijera se cortó un segmento de la cinta adhesiva “masking type”, y luego en la superficie adhesiva de la cinta, se adhirieron de 4 a 6 semillas.
- b) La cinta adhesiva con las semillas adheridas en su superficie se hizo friccionar sobre la superficie de la lija fina al agua No. 180, se rasparon varias veces la cubierta de las semillas hasta lograr observar una capa de los tejidos de los

cotiledones, y en ese momento se dejaron de raspar, y luego las semillas escarificadas fueron guardadas en una placa de Petri.

- c) Las semillas escarificadas fueron desinfectadas en una solución de lejía a una concentración del 30% por 20 minutos, cumplido el tiempo de desinfección, las semillas fueron enjuagadas varias veces hasta verificar que el olor de lejía haya desaparecido.

4.1.5 Método de prueba de viabilidad de las semillas

Para realizar esta prueba se siguieron las recomendaciones propuestas por Rao *et al.* (2007); y se realizaron los siguientes procedimientos:

- a) Las placas Petri, láminas de papel aluminio, hojas de papel filtro, beakers y pinzas finas fueron esterilizadas en una estufa a la temperatura de 140°C durante una hora.
- b) Se trazaron círculos en el papel filtro Whatman Grado 181 y luego con una tijera se cortaron los círculos.
- c) Se colocó el papel filtro de forma circular en la parte en las bases de cada placa Petri de 100 x 15 mm.
- d) Las placas Petri fueron rotuladas con un plumón permanente indicando el nombre de las especies, el tratamiento, el número de la repetición y la fecha de instalación de la prueba.
- e) A cada placa Petri con su papel filtro se agregó 6 mL de agua destilada estéril.
- f) Las semillas escarificadas y desinfectadas de cada especie y por cada tratamiento y por repetición fueron colocadas dentro de las placas Petri y con una separación de 1 cm entre las semillas.

- g) Cada una de las placas Petri fueron tapadas herméticamente y asegurando de que no quede aire encerrado proveniente del exceso de humedad en las tapas.
- h) Las placas Petri con las semillas fueron colocadas dentro de una cámara de crecimiento e incubadas a una temperatura de 21 °C de día, 15 °C de noche, con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, y con una humedad relativa de un 80% de día y un 90% de noche.
- i) El conteo de las semillas germinadas se realizó a los 3 y 10 días. Se consideró una semilla germinada, cuando presentó la emergencia de una radícula de al menos 0,5 mm de largo. En los días siguientes se continuó realizando el conteo de las semillas germinadas y no germinadas; el ensayo terminó a los 10 días de iniciado el ensayo, y finalmente se realizó el cálculo del porcentaje de semillas germinadas y no germinadas.

4.1.5.1 Prueba de tetrazolio para verificar la viabilidad de las semillas dormantes

Uno de los métodos más frecuentes utilizados para verificar la falta de germinación de las semillas es la prueba de tetrazolio (TZ), y que consiste en colocar las semillas cortadas longitudinalmente con el embrión expuesto, sobre una solución incolora de 2,3,5-cloruro de trifeníl tetrazolio 0,5% a 1%; si las células están vivas el compuesto se reduce produciendo un compuesto rojizo, producto de la acción de la actividad deshidrogenasa de la semilla, que se evidencia tanto en el embrión como en el endospermo (Schmidt, 2000).

Para preparar 1 litro de solución neutralizada de cloruro de tetrazolio al 1%, se realizó de la siguiente forma:

- a) Se disolvió 3,631 gramos de potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4) en 400 ml de agua destilada.

- b) Se disolvió 7,126 gramos de disodio hidrógeno fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 600 ml de agua destilada.
- c) Fueron Mezcladas las dos soluciones para preparar la solución neutralizada.
- d) Se disolvió 10 g de cloruro de 2,3,5,-trifenil-tetrazolio en 1 litro de la solución neutralizada.
- e) En una bureta de 1 litro, las tres soluciones preparadas fueron mezcladas, y luego se enrazó con agua destilada hasta un litro. Finalmente la solución preparada fue ajustado a un pH entre 6 y 8 para lograr los mejores resultados en la prueba de viabilidad de las semillas.
- f) La solución de tetrazolio fue transferida a un frasco de vidrio de color ámbar, cubierto con papel aluminio, y almacenado en oscuridad dentro de un refrigerador a 4 °C.

Para realizar prueba de tetrazolio se siguieron los procedimientos sugeridos por Rao *et al* (2007):

- a) Las semillas no germinadas se cortaron con una hoja de afeitar en forma longitudinal y poder dejar expuesto a los embriones y facilitar el teñido del embrión.
- b) La mitad de cada semilla fue descartada y la otra mitad fue colocada dentro de unos viales de vidrio color ámbar, y se les agregó la solución de tetrazolio al 0.5%.
- c) Lo viales fueron cubiertas con papel aluminio, para proteger de la luz, y se guardaron dentro de una refrigeradora por 24 horas.

- d) Después de la tinción, las semillas fueron lavadas varias veces con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
- e) Utilizando un estereoscopio las semillas fueron revisadas y con el patrón de tinción de las semillas; el color rojo intenso de los tejidos correspondió a semillas viables. Los tonos rosados y rojos muy oscuros indican tejidos muertos.
- f) Según el patrón de tinción, las semillas fueron clasificadas en tres categorías: semillas totalmente teñidas que son viables; semillas totalmente libres de coloración que son no viables; y semillas parcialmente teñidas que producirán plántulas normales o anormales, dependiendo de la intensidad y patrón de la tinción (ISTA, 2005).

4.1.6 Método de prueba para evaluar la emergencia de plántulas en macetas

4.1.6.1 Preparación del sustrato para la prueba de evaluación de emergencia de plántulas de *Lupinus* y *Astragalus*

Esta prueba fue realizada en octubre y noviembre de 2016, en el Laboratorio de Fitología Aplicada de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La temperatura media mensual fue de 24,3 °C y la humedad relativa media mensual fue de 68,6%.

Para preparar un kilogramo de sustrato, se realizaron los siguientes procedimientos:

- a) Utilizando una balanza de precisión se pesaron 300 gramos de suelo de rizósfera de *Lupinus ballianus*, colectado en Santa Rosa, distrito de Aquia, Región Ancash, 600 gramos de suelo orgánico “tierra de monte”, y 100 gramos de arena de río lavada.

Las características físico-químicas del suelo de rizósfera de *Lupinus ballianus*, y del suelo orgánico utilizado en esta prueba, están indicadas en las tablas 2 y 3, respectivamente.

- b) Los suelos y la arena fueron mezcladas hasta obtener un sustrato homogéneo.
- c) El sustrato preparado fue desinfectado por la técnica de solarización, que consistió en cubrir la mesa de trabajo con plástico transparente, se extendió bien para evitar las burbujas de aire, se agregó el sustrato preparado húmedo, los bordes del plástico se doblaron para que no se escape el calor. Se dejó directamente al sol por una semana.
- d) Los orificios de las macetas que se encuentran en la parte media de la maceta fueron cubiertos con papel periódico, para evitar que se derrame el sustrato preparado.
- e) El sustrato preparado y desinfectado se llenó las $\frac{3}{4}$ partes a cada maceta.

Tabla 2. Caracterización físico-química del suelo de la rizósfera de *Lupinus ballianus* procedente de Santa Rosa, Aquia, Áncash utilizadas en la prueba de germinación de semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Determinación | Valor | Metodología | Interpretación |
|--|-------|---------------------|-------------------|
| Arcilla (%) | 8 | | |
| Limo (%) | 28 | Hidrómetro de | Franco arenoso |
| Arena (%) | 64 | Bouyoucos | |
| Capacidad de campo (%) | 26 | Olla de presión | -- |
| pH (Relación agua 1:1) | 5,97 | Potenciometría | Ligeramente ácido |
| Conductividad Eléctrica (dS m ⁻¹) | 0,90 | Potenciometría | No salino |
| Materia orgánica (%) | 6,65 | Walkley y Black | Alto |
| Capacidad de Intercambio catiónico | 27,8 | Acetato de amonio | Medio |
| P disponible (mg kg ⁻¹) | 13,9 | Olsen | Medio |
| K disponible (mg kg ⁻¹) | 879 | Fotometría de llama | medio |
| K intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 1,82 | Fotometría de llama | Bajo |
| Ca intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 14,9 | Fotometría de llama | Medio |
| Mg intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 2,00 | Fotometría de llama | Medio |
| Sodio intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 0,07 | Fotometría de llama | Bajo |
| Zinc (mg kg ⁻¹) | 4,0 | DTPA | Bajo |
| Cobre (mg kg ⁻¹) | 1,8 | DTPA | Bajo |

Fuente: Laboratorio de Suelos, Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Tabla 3. Caracterización físico-química de suelo orgánico “tierra de monte” procedente de Santa Rosa, Aquia, Áncash. Utilizadas en la prueba de germinación de semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Determinación | Valor | Metodología | Interpretación |
|---|-------|---------------------------------------|-------------------|
| pH (Relación agua 1:1) | 6,03 | Potenciometría | Ligeramente ácido |
| Conductividad Eléctrica (dS m ⁻¹) | 1,64 | Potenciometría | No salino |
| Materia orgánica (%) | 21,63 | Walkley y Black | Alto |
| Capacidad de Intercambio catiónico | 35,20 | acetato de amonio | Medio |
| P disponible (mg kg ⁻¹) | 39,5 | Olsen | Medio |
| K disponible (mg kg ⁻¹) | 873 | Fotometría de llama | Medio |
| K intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 2,34 | Fotometría de llama | Bajo |
| Ca intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 21,30 | CH ₃ COONH ₄ 1N | Medio |
| Mg intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 3,73 | Fotometría de llama | Medio |
| Na intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 0,08 | Fotometría de llama | Bajo |
| Zn (mg kg ⁻¹) | 8,10 | DTPA | Bajo |
| Cu (mg kg ⁻¹) | 0,90 | DTPA | Bajo |
| B (mg kg ⁻¹) | 5,53 | Absorción atómica | Medio |
| Fe (mg kg ⁻¹) | 54,5 | Absorción atómica | Medio |

Fuente: Laboratorio de Suelos y Aguas, Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria La Molina.

4.1.6.2 Siembra de semillas de *Lupinus* y *Astragalus* en el sustrato para realizar la prueba de emergencia de plántulas

Se procedió como se detalla a continuación la siembra de semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*:

- a) Utilizando un tornillo de metal de 3 pulgadas, en el centro de la maceta con sustrato, se hizo un hoyito de 1 cm de profundidad, luego se sembró 02 semillas escarificadas y desinfectadas de estas tres especies, en seguida las semillas se taparon con el sustrato y para finalizar este paso el sustrato fue compactada ligeramente con una mayólica de 25 cm cuadrados, y evitar que las semillas se levanten al momento de regarlas.
- b) Las semillas sembradas en el sustrato fueron regadas con 30 mililitros de agua potable por cada maceta para poder humedecer las semillas, y dar las condiciones que favorezcan el inicio de proceso de la germinación.

- c) Las macetas fueron cubiertas con un plástico negro, y mantener en forma constante la humedad y la temperatura del sustrato.

4.1.6.3 Incubación de las semillas de *Lupinus* y *Astragalus* sembradas en sustratos en la prueba de emergencia de plántulas

Las macetas con las semillas sembradas en el sustrato fueron incubadas sobre la mesa de trabajo del Laboratorio de Fitología Aplicada de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La temperatura media mensual fue de 24,3 °C y la humedad relativa media mensual fue de 68,6%. Cada dos días los almácigos, fueron revisados para observar el inicio de la germinación de semillas.

4.1.6.4 Evaluación de la emergencia de plántulas de *Lupinus* y *Astragalus*

Se contabilizaron las plántulas emergidas (cotiledones expandidos) de cada especie por maceta y cada repetición. También observaron el color de las hojas y otras características de crecimiento de las plántulas en cada especie. El ensayo se realizó en el laboratorio de Fitología Aplicada, Facultad de Ciencias Biológicas, campus de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en noviembre de 2017.

4.2 Método de evaluación del desarrollo de especies de *Lupinus* y *Astragalus* con tratamientos de relave de mina

El experimento fue realizado en condiciones de invernadero y se evaluaron 12 tratamientos (Tabla 6). La unidad experimental fue una maceta de 19 cm de diámetro y 5 kg de capacidad. Como sustrato fueron utilizados suelo libre de metales pesados, cuyas características físico-químicas se señalan en la Tabla 4 y relave de mina polimetálico (RM), que fue obtenido de una concentradora polimetálica en la localidad de Yani, distrito de Huamantanga, Provincia de Canta y sus características químicas se indican en la Tabla 5. En seguida, se procedió con la adición de los sustratos en las

macetas, según los tratamientos correspondientes. Las semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* pre tratadas mediante una escarificación mecánica con lijado de la testa de la semilla utilizando una lija al agua número 180, fueron sembradas en cada uno de las macetas según los tratamientos correspondientes.

El experimento se realizó en un invernadero en el distrito de Lachaqui, provincia de Canta, región Lima. El ensayo fue instalado en octubre de 2011 y se culminó en noviembre de 2012.

Tabla 4. Caracterización físico-química del suelo de Lachaqui, Canta, Lima. Utilizado en el experimento.

| Determinación | Valor | Metodología | Interpretación |
|--|--------|---------------------------------------|-------------------|
| Arcilla (%) | 60 | | |
| Limo (%) | 28 | Hidrómetro de | Franco arenoso |
| Arena (%) | 60 | Bouyoucos | |
| Capacidad de campo (%) | 23,2 | Olla de presión | -- |
| pH (Relación agua 1:1) | 6,72 | Potenciometría | Ligeramente ácido |
| Conductividad Eléctrica (dS m ⁻¹) | 1,1 | Potenciometría | No salino |
| Materia orgánica (%) | 5,60 | Walkley y Black | Alto |
| Capacidad de Intercambio catiónico | 26,4 | Acetato de amonio | Alto |
| P disponible (mg kg ⁻¹) | 71,80 | Olsen | Medio |
| K disponible (mg kg ⁻¹) | 1948 | Fotometría en llama | Alto |
| K intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 3,42 | Fotometría en llama | Medio |
| Ca intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 16,77 | CH ₃ COONH ₄ 1N | Medio |
| Mg intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 3,00 | Fotometría en llama | Medio |
| Sodio intercambiable (cmoles ⁺ kg ⁻¹) | 3,21 | Fotometría en llama | -- |
| Zinc (mg kg ⁻¹) | 287,50 | DTPA | Alto |
| Cobre (mg kg ⁻¹) | 39,50 | DTPA | Medio |

Fuente: Laboratorio de Suelos, Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Tabla 5. Contenido de metales pesados analizadas en el relave polimetálico utilizado en el experimento.

| Determinación | Valor | Metodología |
|-------------------------------------|---------|------------------|
| Zinc total (mg kg ⁻¹) | 3780,00 | Digestión húmeda |
| Cobre total (mg kg ⁻¹) | 1440,00 | Digestión húmeda |
| Plomo total (mg kg ⁻¹) | 2846,00 | Digestión húmeda |
| Cadmio total (mg kg ⁻¹) | 48,10 | Digestión húmeda |

Fuente: Laboratorio de suelos y Aguas, Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria La Molina.

4.2.1 Variables de evaluación

4.2.1.1 Variables de crecimiento vegetativo

Las evaluaciones se realizaron cada 60 días, por cada tratamiento y repetición en cuatro fechas diferentes, a los 60, 90, 120 y 180 días después de iniciado el experimento. En esta etapa del ciclo biológico de las especies se evaluaron las siguientes variables dependientes:

a. Altura de planta (cm)

Se midieron con una cinta métrica graduada en centímetros, se midió la longitud de la planta desde el nivel superficial del sustrato hasta el ápice de la planta.

b. Número de hojas por planta

Se contaron solamente las hojas saludables libre de daños mecánicos, plagas y/ o enfermedades con buenos estados fisiológico y unidos a la planta.

c. Biomasa (g)

Se utilizaron plantas completas, separadas por órganos (raíces, tallos y hojas). Las muestras fueron secadas en estufa a 70 °C por 72 horas hasta obtener un peso constante, luego las muestras se enfriaron en un desecador y finalmente las muestras secas se pesaron en una balanza de precisión.

4.2.1.2 Análisis de acumulación de metales pesados

El contenido de cadmio, plomo y zinc fueron analizadas por órganos (en los tejidos de las muestras foliares y tallos, y en las raíces) de las tres especies estudiadas y cosechadas al final del experimento. Para realizar los análisis químicos de los contenidos de cadmio, plomo y zinc en los tejidos en cada órgano.

Las muestras fueron tratadas mediante una digestión húmeda y posteriormente la concentración de los elementos se determinó mediante un Espectrofotómetro de absorción atómica.

4.2.1.3 Valoración de la tolerancia de las especies vegetales a los metales

a. Factor de bioconcentración de metales pesados

El cálculo del factor de bioconcentración (FB) de los metales pesados se determinó para cada metal evaluado. Este factor fue calculado con los valores de las concentraciones de los metales acumulados en los tejidos de las raíces de las especies vegetales y la división entre el contenido de metales pesados en el suelo (Maldonado *et al.*, 2011; Malik *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2006) y fue calculado mediante la relación como está indicado en la siguiente ecuación:

$$\text{Factor de bioconcentración} = \frac{[\text{Metales pesados de raíces}]}{[\text{Metales pesados de suelos}]}$$

b. Factor de transferencia de metales pesados

El factor de transferencia (FT), nos indica la eficiencia de la planta en la translocación de los metales pesados acumulados desde las raíces a la parte aérea. Este factor fue calculado con los valores de los contenidos de metales pesados acumulados en los tejidos de la parte aérea de la planta (tallos y hojas) dividido, entre el contenido de metales pesados acumulados en los tejidos de las raíces (Tangahu *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2007). El cálculo de este factor está indicado en esta ecuación:

$$\text{Factor de transferencia} = \frac{[\text{Metales pesados de hojas y tallos}]}{[\text{Metales pesados de raíces}]}$$

4.2.1.4 Condiciones ambientales de la evaluación del desarrollo de *Lupinus* y *Astragalus* con tratamientos de relave de mina

Se registraron las temperaturas diarias (máximas y mínimas) y la humedad relativa; para lo cual se utilizó un sensor de temperatura y humedad relativa con un Higrotermógrafo marca Watch Dog. Modelo 1450. Estos valores fueron registrados de noviembre de 2011 hasta noviembre de 2012.

4.3 Diseño experimental y análisis estadístico

4.3.1 Diseño Experimental y análisis estadístico para evaluar la viabilidad de las semillas de *Lupinus* y *Astragalus*

El experimento se realizó en condiciones de laboratorio mediante el diseño experimental completamente aleatorizado. Fueron evaluadas la germinación de las semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*, fueron evaluadas en dos condiciones de luz (con y sin luz), y con dos tratamientos de escarificación (con escarificación mecánica, y sin escarificación). Por cada especie fueron evaluados cuatro tratamientos, con cinco repeticiones por cada tratamiento (Número de placas petri). Para el ensayo de germinación, a cada placa Petri se le agregó 20 semillas pre tratadas de cada especie. La distribución de las unidades experimentales (placas Petri con semillas) dentro de la cámara de crecimiento se realizó al azar.

En el análisis estadístico se realizó de acuerdo al diseño experimental y se realizó el análisis varianza (ANOVA), y la prueba de comparación múltiple de medias por Tukey ($\alpha= 0.01$), utilizando el programa Infostat versión 2016e (Balzarini *et al.*, 2008).

4.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico para evaluar la emergencia de plántulas de *Lupinus* y *Astragalus*

El experimento se realizó mediante un diseño experimental completamente al azar en condiciones de laboratorio. La unidad experimental fue una maceta con semillas sembradas en sustrato orgánico. En el ensayo se evaluaron la emergencia de plántulas de semillas sembradas con tratamientos de escarificación mecánica, y sin escarificación de las semillas de 3 especies andinas (*Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*). La distribución de las unidades experimentales (macetas con semillas sembradas en sustrato orgánico) en el laboratorio se realizó al azar.

En el análisis estadístico se realizó de acuerdo al diseño experimental y se realizó el análisis varianza (ANOVA), y la prueba de comparación múltiple de medias por Tukey ($\alpha= 0.05$), utilizando el programa Infostat versión 2016e (Balzarini et al., 2008).

4.3.3 Diseño experimental de la evaluación del desarrollo de *Lupinus* y *Astragalus* con tratamientos de relave de mina

El experimento se realizó mediante el diseño experimental completamente al azar. Los tratamientos se generaron de un diseño factorial completo de 3 x 4, en donde 3 indica las 3 especies nativas (*Lupinus* (*Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*), 4 nos indica los cuatros sustratos (30% de Relave de mina, 60% de Relave de mina, y 100 % de relave de mina, y sin relave (tratamiento de control negativo) y donde desarrollaron las especies altoandinas de *Lupinus* y *Astragalus*. La distribución de las unidades experimentales de los 12 tratamientos en el invernadero se realizó al azar, con 5 repeticiones por cada tratamiento (Tabla 6). La unidad experimental fue una maceta de 5 kg de capacidad en la que se colocaron relave de mina y/o suelo, o con la mezcla de los 2 sustratos según los tratamientos correspondientes.

Tabla 6. Tratamientos y dosis de aplicación de relave de mina utilizadas en la evaluación del desarrollo de especies de *Lupinus* y *Astragalus*.

| Tratamientos | Especies de <i>Lupinus</i> | Dosis de aplicación de Relave de mina (%) | Identificación |
|--------------|-------------------------------|---|----------------|
| 1 | <i>Lupinus ballianus</i> | 0 (Control negativo) | LB-CN |
| 2 | <i>Lupinus ballianus</i> | 30 | LB-30 |
| 3 | <i>Lupinus ballianus</i> | 60 | LB-60 |
| 4 | <i>Lupinus ballianus</i> | 100 | LB-100 |
| 5 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 0 (Control negativo) | LC-CN |
| 6 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 30 | LC-30 |
| 7 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 60 | LC-60 |
| 8 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 100 (Control negativo) | LC-100 |
| 9 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 0 (Control negativo) | AG-0 |
| 10 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 30 | AG-30 |
| 11 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 60 | AG-60 |
| 12 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 100 | AG-100 |

Antes de realizar el análisis de varianza (ANOVA), se verificó el cumplimiento de los supuestos tradicionales de un análisis de varianza que son:

a. Que las observaciones (distribuciones de probabilidad de la variable dependiente correspondiente a cada factor) sean normales, b. las muestras sobre las que se aplican los tratamientos sean independientes, c. todas las poblaciones tengan varianzas iguales (homogeneidad). Cabe indicar, en este análisis ha sido necesario realizar la transformación de los datos originales del experimento mediante la raíz cuadrada. Para explicar la variación de la respuesta, en los tratamientos evaluados en la acumulación de cadmio, plomo y zinc, analizadas en los tejidos de hojas y tallos, raíces y como elemento total en las especies de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*. En este análisis se utilizó el modelo lineal general:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk} , \text{ aplicado para los 3 metales}$$

En donde:

μ : Media general del contenido de cadmio, plomo y zinc en los tejidos de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*

α_i : Efecto de los tratamientos, $i=1,2,3,4$

β_j : Efecto de las especies vegetales evaluados en el experimento, $j=1,2,3$

$\alpha\beta_{ij}$: Interacción de los tratamientos con las especies de los niveles ij

ϵ_{ijk} : componente del error aleatoria $N(0, \sigma)$, $k=1,2,\dots, m$

Sobre la influencia del factor tratamiento (cuatro proporciones de relave de mina), la Hipótesis estadística es:

$H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4 = 0$

El factor tratamiento (Concentraciones de relave de mina) no influye

$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = 0$; el factor especie vegetal no influye

$H_0: (\alpha\beta)_{ij} = 0$ para todo i, j ;

No hay interacciones entre los tratamientos de relave de mina, y las especies vegetales no influyen para realizar la prueba

Asimismo, se realizaron la prueba de comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$), el análisis de correlación y de regresión lineal entre las variables dependientes en aquellos tratamientos que resultaron estadísticamente significantes, utilizando el programa Statistical Analysis System 9.1 (S.A.S, 1997 e Infostat versión 2016e (Balzarini *et al.*, 2008).

4.4 Registro de las condiciones ambientales de la evaluación del desarrollo de *Lupinus* y *Astragalus* con tratamientos de relave de mina

Se registraron las temperaturas diarias (máximas y mínimas) y la humedad relativa para lo cual se utilizó un sensor de temperatura y humedad relativa con un Higrotermógrafo marca Watch Dog modelo 1450. Estos valores fueron registrados de octubre de 2011 hasta noviembre de 2012.

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de germinación de semillas de *Lupinus* y *Astragalus* en condiciones de laboratorio

Al efectuar el análisis de varianza (ANAVA) del número de semillas germinadas de *Lupinus ballianus* con el factor de escarificación y luz se obtuvieron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,0001$), pero al analizar la interacción de los factores luz*escarificación no se obtuvieron diferencias estadísticas ($p < 0,0642$) (Tabla 60). Del mismo modo, al realizar los análisis de separación de medias por la prueba de Tukey del número de semillas germinadas y al ser analizadas por los factores de escarificación y luz (Tabla 7), y por tratamientos (Tabla 8) se obtuvieron diferencias para el número de semillas germinadas de *L. ballianus*. Las semillas que recibieron escarificación mecánica de lijado de la testa, obtuvieron el mayor número de semillas germinadas (15,4), y con el tratamiento de escarificación mecánica y en oscuridad germinaron 18,2 semillas (Tabla 8).

De otra parte, en el análisis de varianza del número de semillas germinadas de *Lupinus condensiflorus* con el factor de escarificación se obtuvieron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,0001$), y al analizar el efecto del factor luz ($p < 0,0171$) y de la interacción de los factores de escarificación * luz, se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,0262$) (Tabla 63). Igualmente, al realizar los análisis de separación de medias por la prueba de Tukey del número de semillas germinadas, y al analizar el efecto de los factores de escarificación y luz (Tabla 9), y por tratamientos (Tabla 10) se obtuvieron diferencias, para el número de semillas germinadas de *Lupinus condensiflorus*. Con el factor de escarificación mecánica de semillas se obtuvo un mayor número de semillas germinadas (15,9), y por tratamientos, con el tratamiento de escarificación mecánica y oscuridad germinaron el mayor número de semillas (17,8 semillas).

Por otro lado, al efectuar el análisis de varianza (ANAVA) del número de semillas germinadas de *Astragalus garbancillo* con el factor de escarificación se

obtuvieron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,0001$), pero al analizar con el factor luz ($p = 0,1262$), y con la interacción de los factores luz * escarificación no se obtuvieron diferencias estadísticas ($p = 0,8191$) (Tabla 66). Del mismo modo, al realizar los análisis de separación de medias por la prueba de Tukey del número de semillas germinadas analizadas por el factor escarificación y luz (Tabla 11), y por tratamientos (Tabla 12) se obtuvieron diferencias del número de semillas germinadas de *A. garbancillo*. Igualmente, mediante el factor de escarificación mecánica se obtuvo un mayor número de semillas germinadas (19,4) en comparación con las semillas no escarificadas, y cuando fueron analizadas por tratamientos, con el tratamiento de escarificación mecánica y en oscuridad germinaron el mayor número de semillas en esta especie (19,8).

Ciertamente, la presencia de la dormición física ha sido descrita en 17 familias de Angiospermas, incluyendo a la familia Fabaceae (Baskin & Baskin, 2014). La dormición física en las semillas de las leguminosas se caracteriza por la presencia de una testa dura, lignificada e impermeable, condición que les permite permanecer viables en su medio natural (Catalán & Balzarini, 1992). Asimismo, en la semilla la presencia de la dormición física dificulta la imbibición con el agua, lo cual impide la activación de los sistemas metabólicos y de información (Camacho, 2011). Por eso, diversos métodos artificiales han sido descritos y utilizados para romper la latencia física de las semillas, tales como la escarificación mecánica, la química con ácido sulfúrico y la térmica con calor húmedo (Baskin & Baskin, 2014). Por tanto, la aplicación de ácido sulfúrico actuaría desagregando en porciones la cubierta seminal, facilitando una rápida imbibición. El calor húmedo provocaría la apertura del lente (una ruptura) y una imbibición lenta y gradual, similar al proceso en la naturaleza (Baskin & Baskin, 2014). El tratamiento de semillas con testa leñosa con cualquiera de estos métodos requiere el ajuste del tiempo en que las semillas son sometidas a dichos tratamientos para evitar el daño o la muerte del embrión (Galíndez *et al.*, 2015; Baskin & Baskin, 2014;).

Por otro lado, Murdoch (2014) señala que la regeneración de las comunidades vegetales depende que las semillas estén en el estado fisiológico adecuado para

germinar en el lugar correcto y en el momento correcto. En algunas especies, este requisito se satisface con una estrategia de regeneración en la que las semillas germinan tan pronto se desprenden de la planta. En otras especies, las semillas pueden sobrevivir durante largos períodos en el banco de semillas del suelo, y se ha descrito dos prerequisites fisiológicos básicos para que las semillas sobrevivan en el suelo: la viabilidad que debe mantenerse mientras se evite la germinación por dormición o quiescencia. Además, para que tales semillas contribuyan a la regeneración, se debe eliminar la dormición y promover la germinación, tal vez dentro de un período limitado cuando haya una buena posibilidad de establecerse satisfactoriamente. Indudablemente, las semillas cumplen cuatro funciones claves en la persistencia de las especies en las poblaciones:

a) En la reproducción, b) La dispersión dentro de la misma comunidad, c) La expansión a nuevos territorios y hábitats, y d) La supervivencia del germoplasma en condiciones ambientales no favorables. Por tanto, las semillas constituyen composiciones genéticas únicas resultado de mezcla entre individuos lo cual mantiene la variación de la progenie, que a su vez aumenta la adaptabilidad ecológica (Forget & Wenny, 2005). De tal forma, las principales etapas en el ciclo de vida de las plantas, la dispersión, el establecimiento y la persistencia de los individuos en los ecosistemas, están relacionados con los procesos para el mantenimiento de los mecanismos de regeneración: dispersión de semillas, establecimiento de las plántulas y persistencia de los individuos y sus poblaciones (Vargas & Pérez-Martínez, 2014).

En efecto, referente a las investigaciones realizadas sobre la germinación de semillas en diferentes especies de *Lupinus* y *Astragalus* en América y Europa, se han obtenido respuestas muy variadas. Por ejemplo, Mackay *et al.* (1995), en pruebas de germinación evaluadas en muchas especies nativas de *Lupinus*, obtuvieron un bajo porcentaje de germinación, debido a la impermeabilidad del agua en la cubierta de la semilla. Sin embargo, las semillas con escarificación, mejoraron ligeramente la germinación. En efecto, Mackay *et al.* (1996) evaluaron la germinación de *Lupinus perennis* y con el tratamiento de escarificación mecánica de cortes con hoja de afeitar

ala testa de la semilla, obtuvieron el 100% de germinación En tanto, Davis *et al.* (1991) al estudiar la germinación de semillas de *Lupinus texensis* obtuvieron solamente un 80% de germinación. Por su parte, Hosokawa *et al.* (2001) al evaluar la germinación de *Lupinus versicolor* sin escarificación, obtuvieron un 50% de germinación. Pablo-Pérez *et al* (2013) en el estudio realizado de las características morfológicas, germinación y composición mineral de las semillas de *Lupinus campestris*, *L. exaltatus*, *L. hintonii* y *L. montanus*, señalan que la escarificación mecánica mejoró la germinación en todas las especies, y en las semillas de *L. exaltatus* obtuvieron una germinación de un 91.6 %. En otros trabajos fueron estudiadas, el efecto de la escarificación, la temperatura y el fotoperiodo en la germinación de semillas de *Lupinus*. Robles-Díaz *et al.* (2014) aplicaron tratamientos de calor a las semillas para romper la latencia de las semillas de *Lupinus elegans* y *Lupinus rotundiflorus*, con diferentes tiempos de almacenamiento (0, 1 y 2 años para *L. elegans* y de 0, 1, 2, 3 y 4 años para *L. rotundiflorus*. Un grupo de semillas fueron sumergidas en agua hirviendo por 5, 10 y 15 segundos. Otro grupo fue incubado en arena húmeda o seca a 100, 120 y 150 °C durante 60 y 90 minutos. Luego las semillas se pusieron a germinar a 25 °C con un fotoperíodo de 12 horas. En ambas especies, no hubo germinación de semillas incubadas a 120 y 150 °C. Para *L. rotundiflorus*, la germinación fue más alta en semillas incubadas en arena húmeda por 60 minutos que por 90 minutos. Las semillas frescas de *L. rotundiflorus* mostraron mayor germinación que las almacenadas, en los distintos tratamientos. Después de la escarificación con agua hirviendo, las semillas frescas de *L. elegans* germinaron más que las almacenadas por 1 y 2 años, mientras que para las semillas almacenadas por 1 y 2 años la incubación en arena húmeda y seca resultó en mayor germinación que para las semillas frescas. Acosta-Percástegui & Rodríguez-Trejo (2005) en el estudio de la germinación de semillas de *Lupinus montanus*, tomando en cuenta los factores de régimen de temperaturas día/noche, luz y tratamientos pre germinativo indican que la germinación, resultó significativa por la interacción de los factores de temperatura, luz y los tratamientos pre germinativos. Los mayores valores de germinación se obtuvieron en el régimen de temperatura 20/15°C (día y noche, respectivamente), con escarificación química con ácido sulfúrico durante 15 minutos, con luz se obtuvo un 100% de

germinación y sin luz un 98% de germinación. En el mismo modo, Martínez *et al.* (2008) indicaron, que el mejor tratamiento para obtener la mayor germinación de *Lupinus bilineatus*, fue mediante la inmersión de las semillas en ácido sulfúrico por 30 o 40 minutos, con un régimen de temperatura día/noche de 25/20 °C, y con luz, y alcanzaron un 82.5 % de germinación. En la interacción de los factores naturales de escarificación, luz y temperatura, el fuego presentó diferencias significativas con respecto al control en el régimen de temperatura 20/15 °C, con luz, favoreciendo una mayor germinación. Del mismo modo, Corona *et al.* (2007) determinaron el efecto de la escarificación y la calidad de la luz sobre la germinación de las semillas de *Lupinus elegans* determinan, que la germinación de las semillas de *Lupinus elegans* escarificadas fue notablemente mayor que las semillas no escarificadas, ya que el ácido sulfúrico adelgaza la testa de las semillas haciéndola más permeable y como consecuencia hay una germinación en menor tiempo en los cinco tratamientos diferentes de con una baja calidad de luz, con un fotoperiodo de 12 horas. Alderete-Chávez *et al.* (2010) evaluaron la germinación de semillas de *Lupinus leptophyllus*; con diferentes tiempos de exposición a la inmersión en ácido sulfúrico y al calor. En todos los tratamientos se obtuvo la germinación después de dos días del inicio del experimento y alcanzaron su máximo valor de germinación entre los días 27 y 29, casi al final del experimento. Las semillas tratadas con ácido sulfúrico respondieron positivamente en todos los casos, la inmersión en ácido sulfúrico durante quince minutos fue el tratamiento que mejoró los resultados. El tratamiento a 80 °C tuvo una germinación menor que el control. Sin embargo, en todos los demás casos, las semillas respondieron positivamente a los tratamientos con calor a temperaturas de 140 y 110 °C durante 2 minutos y con este tratamiento obtuvieron los mejores resultados (Alderete-Chávez *et al.*, 2010)

Por otro lado, en el estudio de la germinación de *Astragalus garbancillo*, con el tratamiento de escarificación mecánica y oscuridad se obtuvo el mayor número de semillas germinadas en esta especie (19.8). En la misma forma, en evaluaciones de germinación realizadas en otras especies de *Astragalus* y mediante pre tratamientos de escarificación obtuvieron resultados óptimos en la germinación. Por ejemplo, Patanè & Gresta (2006), al evaluar la germinación de *Astragalus hamosus* y *Medicago*

orbicularis, obtuvieron la germinación casi completa con la escarificación manual con lija, demostraron que la latencia está exclusivamente impuesta por la testa de las semillas. Martínez García *et al.* (2010) estudiando *Astragalus gines-lopezii* demostraron que la escarificación mecánica de las semillas fue efectiva para aumentar la germinación. Por lo tanto, la germinación inicial (22% - 60%) se incrementó a 97% - 99% cuando las semillas fueron escarificadas con papel de lija. Se obtuvieron una alta variabilidad intra e interpoblacional en la germinación de la semilla en esta especie. *A. gines-lopezii* produce semillas con diferentes grados de latencia física, variando este grado entre diferentes individuos dentro de una población. Por su parte, Statwick (2016) evaluó diferentes opciones de pre tratamientos de semillas de *Astragalus cicer* como una escarificación mecánica, con agua caliente y con inmersión con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno. Indica que sólo la escarificación física mejoró significativamente la germinación, mientras el tratamiento con agua caliente, no dio lugar a ninguna germinación. Asimismo, recomienda que las semillas de especies raras de *Astragalus*, así como de otras leguminosas de testa duro, se pre traten usando escarificación física. En otro trabajo Kunz *et al.* (2016) determinaron que las semillas de *Astragalus michauxii* posee solo una latencia física, esta dormancia física puede romperse con éxito mediante escarificación mecánica produciendo una tasa de germinación de un 94%. También desarrollaron un método eficaz para la propagación a gran escala de *A. michauxii* mediante la siembra directa de semillas en los sustratos, en lugar de trasplantar las plántulas de esta especie de las placas de Petri. Jones *et al.* (2016) evaluaron la respuesta en la germinación de *Astragalus filipes* y de *Dalea ornata*, dos especies de leguminosas nativas de Norte América, concluyeron que aquellas semillas tratadas mediante una escarificación mecánica con una lija obtuvieron una alta tasa de germinación, en comparación con las semillas que fueron pre tratadas con escarificación química con ácido sulfúrico.

Tabla 7. Número de semillas germinadas acumuladas de *Lupinus ballianus* con el factor de escarificación y luz evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 10), indica el número de placas Petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas por cada placa Petri.

| Factor Escarificación | Número de semillas germinadas | n | |
|---------------------------------|--------------------------------------|----------|---|
| Con escarificación mecánica | 15,4 | 10 | A |
| Sin escarificación mecánica | 4,1 | 10 | B |
| Factor Luz | | | |
| Con luz | 7,60 | 10 | B |
| En oscuridad | 11,90 | 10 | A |
| Diferencia mínima significativa | 1,91 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,01$).

Tabla 8. Número de semillas germinadas acumuladas de *Lupinus ballianus* por tratamientos evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 5), indica el número de placas Petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas por cada placa Petri.

| Tratamientos | Número de semillas germinadas | n | |
|---|--------------------------------------|----------|---|
| Con escarificación mecánica y oscuridad | 18,2 | 5 | A |
| Con escarificación mecánica y luz | 12,6 | 5 | B |
| Sin escarificación mecánica y oscuridad | 5,6 | 5 | C |
| Sin escarificación mecánica y luz | 2,6 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | 2,15 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,01$).

Tabla 9. Número de semillas germinadas acumuladas de *Lupinus condensiflorus* con el factor de escarificación y luz evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 10) e indica el número de placas Petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas por cada placa Petri.

| Factor Escarificación | Número de semillas germinadas | n | |
|---------------------------------|--------------------------------------|----------|---|
| Con escarificación mecánica | 15,9 | 10 | A |
| Sin escarificación mecánica | 2,5 | 10 | B |
| Factor Luz | | | |
| Con luz | 10,2 | 10 | A |
| En oscuridad | 8,2 | 10 | B |
| Diferencia mínima significativa | 2,19 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,01$).

Tabla 10. Número de semillas germinadas acumuladas de *Lupinus condensiflorus* por tratamiento evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 5) e indica el número de placas Petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas por cada placa Petri.

| Tratamientos | Número de semillas germinadas | n | |
|---|--------------------------------------|----------|---|
| Con escarificación mecánica y oscuridad | 17,8 | 5 | A |
| Con escarificación mecánica y luz | 14 | 5 | A |
| Sin escarificación mecánica y oscuridad | 2,6 | 5 | B |
| Sin escarificación mecánica y luz | 2,4 | 5 | B |
| Diferencia mínima significativa | 3,9 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,01$).

Tabla 11. Número de semillas germinadas acumuladas de *Astragalus garbancillo* con el factor de escarificación y luz evaluadas en condiciones de laboratorio, n= 10, Indica el número de placas Petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas por cada placa Petri.

| Factor Escarificación | Número de semillas germinadas | n | |
|---------------------------------|--------------------------------------|----------|---|
| Con escarificación mecánica | 19,4 | 10 | A |
| Sin escarificación mecánica | 7,1 | 10 | B |
| Factor Luz | | | |
| Con luz | 13,6 | 10 | A |
| En oscuridad | 12,9 | 10 | A |
| Diferencia mínima significativa | 1,25 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,01$).

Tabla 12. Número de semillas germinadas acumuladas de *Astragalus garbancillo* por tratamientos evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 5), indica el número de placas Petri utilizadas en el ensayo, y con 20 semillas en cada placa Petri.

| Tratamientos | Número de semillas germinadas | n | |
|---|--------------------------------------|----------|---|
| Con escarificación mecánica y oscuridad | 19,8 | 5 | A |
| Con escarificación mecánica y luz | 19 | 5 | A |
| Sin escarificación mecánica y oscuridad | 7,4 | 5 | B |
| Sin escarificación mecánica y luz | 6,8 | 5 | B |
| Diferencia mínima significativa | 2,23 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,01$),

5.2 Evaluación de la emergencia de plántulas de *Lupinus* y *Astragalus*.

Luego de haber realizado el análisis de varianza (ANAVA) del número de plántulas emergidas de *Lupinus ballianus* se obtuvieron diferencias estadísticas altamente significativas ($p<0,0001$) entre los tratamientos (Tabla 69), De otra parte, al realizar el análisis de separación de medias por la prueba de Tukey del número de plántulas emergidas se obtuvieron diferencias, El mayor número de plántulas

emergidas de *Lupinus ballianus* fue obtenido con el tratamiento con escarificación mecánica de las semillas (13 plántulas) (Tablas 13 y Figura 13).

Del mismo modo, al efectuar el análisis de varianza (ANAVA) del número de plántulas emergidas de *Lupinus condensiflorus* se obtuvieron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,0001$) entre los tratamientos (Tabla 72). De otro lado, al realizar el análisis de separación de medias por la prueba de Tukey del número de plántulas emergidas se obtuvieron diferencias, El mayor número de plántulas emergidas de *Lupinus condensiflorus* fue obtenido con el tratamiento con escarificación mecánica de las semillas (18 plántulas) (Tabla 14 y Figura 14).

De modo similar, al efectuar el análisis de varianza del número de plántulas emergidas de *Astragalus garbancillo* se obtuvieron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,0001$) entre los tratamientos (Tabla 75), Por otro lado, al realizar el análisis de separación de medias por la prueba de Tukey del número de plántulas emergidas se obtuvieron diferencias, El mayor número de plántulas emergidas de *Astragalus garbancillo* fue obtenido con el tratamiento con escarificación mecánica de las semillas (18,3 plántulas) (Tabla 15 y Figura 15).

Por otro lado, cabe indicar la emergencia de las plántulas, es el evento fenológico que más influye en el éxito de una plantación; representa el momento en el cual una plántula se hace independiente de las reservas seminales no renovables, originalmente producidas por sus progenitores, y cuando comienza el autotrofismo fotosintético, el tiempo de emergencia muchas veces determina si una planta compite exitosamente con sus vecinos, si es consumida por los herbívoros, infestada por las enfermedades y si florece, se reproduce y madura al final de su etapa de crecimiento (Forcella *et al.*, 2000), Por lo tanto, la emergencia y el establecimiento de la plántula son etapas muy críticas en el ciclo biológico de las plantas (Harper, 1977).

Ciertamente, en el trabajo realizado de la emergencia de plántulas de *Lupinus*, un mayor número de plántulas emergidas fue obtenido por *Lupinus condensiflorus* que

Lupinus ballianus. Ahora bien, en estudios realizados sobre la emergencia de plántulas en otras especies de *Lupinus*, han obtenido diferentes respuestas, por ejemplo, De la Cruz-Landero (2010) en condiciones de invernadero evaluó la germinación de semillas escarificadas de *Lupinus montanus*, *L. leptophyllus*, *L. versicolor*, *Clitoria ternatea* y *Leucaena leucocephala* y la emergencia de plántulas en suelos contaminados con metales pesados e hidrocarburos. Las semillas de estas especies previamente escarificadas con calor en una estufa a temperaturas de 110 y 140 °C por 2 y 5 minutos con la finalidad de simular la exposición de las semillas al fuego, con H₂SO₄ al 98% por 12 y 25 minutos para simular el paso de las semillas por el tracto digestivo de sus consumidores y mediante una escarificación mecánica de la ruptura de la testa con una navaja para simular el daño por causas naturales. En las especies evaluadas, el mayor porcentaje de emergencia de plántulas obtuvo con el tratamiento de escarificación mecánica y con un rango de emergencia de plántulas de un 80 a 100 %. De otra parte, Gómez-Romero & Lindig-Cisneros (2009), indican para la ejecución de proyectos de restauración ecológica es necesario contar con las técnicas de propagación más adecuadas de las especies seleccionadas. En el caso de muchas especies nativas, el sembrado directo es la mejor opción tanto por razones económicas como ecológicas, Sin embargo, son pocas las especies nativas que han sido estudiadas a este respecto, en particular sobre las profundidades óptimas de sembrado de *Lupinus elegans* y *Crotalaria pumila* dos especies de leguminosas nativas con potencial para proyectos de restauración ecológica (Gómez-Romero & Lindig-Cisneros, 2009), determinaron la profundidad óptima de sembrado de estas especies bajo condiciones controladas y de campo, En ambas especies una profundidad de sembrado cercana a los 2 cm es óptima para maximizar la emergencia de las plántulas. En condiciones controladas de invernadero la emergencia de plántulas de *L. elegans* es cercana al 80% y en *C. pumila* fue un 50%. Bajo condiciones de campo la emergencia de plántulas de *L. elegans* se duplica cuando las semillas fueron sembradas a una profundidad de 2 cm (6%) que cuando se cubren con una delgada capa de suelo (3%). A pesar de las marcadas diferencias en el tamaño de las semillas de ambas especies la profundidad óptima de sembrado fue muy similar (Gómez-Romero & Lindig-Cisneros, 2009). Sin embargo, Severns (2008) en el caso

de la especie endémica de *Lupinus oreganus* en condiciones naturales las poblaciones de esta especie, informó que la especie generalmente indica que menor del 1% de la cohorte de las semillas de esta especie se convirtieron en plántulas. Por su parte, Arfin-Khan *et al.* (2018) evaluaron el éxito de la germinación y la emergencia de plántulas de las especies de *Lupinus polyphyllus*, *Senecio inaequidens* y *Verbascum thapsus* en el invernadero y cámaras climáticas bajo regímenes climáticos correspondientes a siete ecorregiones. En general, *V. thapsus* mostró una mayor aptitud que *S. inaequidens* y *L. polyphyllus*. Las condiciones de climas cálida experimentales, semiáridos y húmedos son adecuados para los primeros pasos cruciales de éxito de invasión para *L. polyphyllus*, *S. inaequidens* y *V. thapsus*. La adaptación de la especie a su región de origen modificó las respuestas de las especies estudiadas en diferentes climas experimentales que representan las principales ecorregiones del mundo.

Por otra parte, Bushmana *et al.* (2015) realizaron una serie de experimentos en el invernadero para determinar los efectos de la escarificación, la profundidad de siembra y la composición del suelo sobre en la germinación y la emergencia de plántulas de *Dalea ornata*, *Dalea searlsiae* y *Astragalus filipes*. Considerando que las tres especies producen semillas duras, fue necesario realizar la escarificación de las semillas para aumentar la germinación y la emergencia de las plántulas. Comparando las profundidades de siembra en estas especies, una profundidad de siembra de 19 mm retrasó la tasa de emergencia en todas las especies. Las semillas con escarificación sembradas en suelos arenosos, lograron obtener la emergencia de plántulas de *Dalea ornata* del 80%, mientras que el *Astragalus filipes* obtuvo menor al 10% de emergencia de plántulas. Las semillas escarificadas sembradas en suelos con mayor contenido de arcilla, la emergencia total de las plántulas de *Dalea ornata* se redujo a un 58-70%, mientras que en *Astragalus filipes* la emergencia de plántulas aumentó aproximadamente en un 30%. Estos resultados ayudarán a los administradores de tierras a planificar el establecimiento óptimo de estas especies en proyectos de restauración, y la restauración de pastizales (Bushmana *et al.*, 2015).

Tabla 13. Número de plántulas emergidas acumuladas de *Lupinus ballianus* evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 6), indica el número de macetas utilizadas en el ensayo, con 20 semillas sembradas en cada maceta.

| Factor Escarificación | Número de plántulas emergidas | n | |
|---------------------------------|-------------------------------|---|---|
| Con escarificación mecánica | 13 | 6 | A |
| Sin escarificación mecánica | 1,83 | 6 | B |
| Diferencia mínima significativa | 3,51 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).



Figura 13. Plántulas de *Lupinus ballianus* a los 25 días luego de haber realizado la siembra de semillas escarificadas en el sustrato.

Tabla 14. Número de plántulas emergidas acumuladas de *Lupinus condensiflorus* evaluadas en condiciones de laboratorio (Tamaño de la muestra, n= 6), indica el número de macetas utilizadas en el ensayo, con 20 semillas sembradas en cada maceta.

| Factor Escarificación | Número de plántulas emergidas | n | |
|---------------------------------|-------------------------------|---|---|
| Con escarificación mecánica | 18 | 6 | A |
| Sin escarificación mecánica | 3,8 | 6 | B |
| Diferencia mínima significativa | 2,1 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).



Figura 14. Plántulas de *Lupinus condensiflorus* a los 25 días después de haber iniciado el ensayo de siembra de semillas pre tratadas con escarificación mecánica.

Tabla 15. Número de plántulas emergidas acumuladas de *Astragalus garbancillo* evaluadas en condiciones de laboratorio (tamaño de muestra, n= 6), indica el número de macetas utilizadas en el ensayo, con 20 semillas sembradas en cada maceta.

| Factor Escarificación | Número de plántulas emergidas | n | |
|---------------------------------|-------------------------------|---|---|
| Con escarificación mecánica | 18,33 | 6 | A |
| Sin escarificación mecánica | 1,6 | 6 | B |
| Diferencia mínima significativa | 0,72 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).



Figura 15. Plántulas emergidas de *Astragalus garbancillo* a los 12 días luego de haber iniciado el ensayo de la siembra de semillas pre tratadas con escarificación mecánica.

5.3 Contenido de humedad de semillas de *Lupinus* y *Astragalus*

Al haber realizado el análisis de varianza del contenido de humedad de las semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($p<0,0093$) entre los tratamientos (Tabla 16), Por otro lado, al realizar el análisis de separación de medias por la prueba de Tukey del contenido humedad se obtuvieron diferencias entre las especies (Tabla 17). El mayor contenido de humedad en las semillas fue registrado en *Astragalus garbancillo* (11,74%) (Tabla 17 y Figura 16).

En efecto, el contenido de humedad es el factor más importante para determinar la velocidad a la cual las semillas se deterioran, y tiene un impacto considerable en la longevidad de las semillas en almacenamiento en un banco de germoplasma. Es importante determinar el contenido de humedad antes de almacenar las semillas para predecir con exactitud el potencial de vida en almacenamiento que tendrá cada accesión (Rao *et al.*, 2006).

En el estudio llevado a cabo, en las dos especies de *Lupinus* el contenido de humedad registrado se obtuvieron valores de humedad por debajo del 10%, pero *Astragalus garbancillo* registró el contenido de humedad de un 11,74%. Sin embargo, en trabajos realizados en otras especies de *Lupinus* se han obtenidos valores diferentes tanto en especies silvestres y cultivadas de *Lupinus*. Por ejemplo, Martínez *et al.* (2008) evaluando las semillas de *Lupinus bilineatus* obtuvo el contenido de humedad de un 7,1 % y una viabilidad de un 98 %. Pablo-Pérez *et al.* (2013) estudiaron el contenido de humedad de las semillas de *Lupinus* de cuatro especies mexicanas. En el estudio el porcentaje de humedad en las semillas varió de 6,1% en *Lupinus campestris*, 6,2% en *L. exaltatus*, 7,2 % en *L. montanus* y un 8,4 % en *L. hintonii*. En el caso de especies cultivadas de *Lupinus* como las semillas de *Lupinus mutabilis*, Ortega *et al.* (2010), señalan que tiene un contenido de humedad de un 9,63%. Por su parte, Lara-Rivera *et al.* (2017) evaluaron 6 variedades de semillas de *Lupinus angustifolius* cultivadas en el estado de Jalisco, en México, indicaron que las variedades evaluadas registraron los siguientes valores de contenido de humedad: la variedad Haags blaue un 3,6%, Boregine un 3,7%, Borlu un 4,4%, Probor un 3,8%, Sonate un 3,8 % y Boruta un 3,7%.

Tabla 16. Análisis de varianza del contenido de humedad de las semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|------------------------------|
| Modelo | 19,55 | 2 | 9,77 | 8,21 | 0,0093 |
| Especies | 19,55 | 2 | 9,77 | 8,21 | 0,0093 |
| Error | 10,7 | 9,0 | 1,2 | | |
| Total | 30,3 | 11,0 | | | |

Tabla 17. Contenido de humedad de las semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Especies | Contenido de humedad de semillas (%) | n | |
|---------------------------------|---|----------|---|
| <i>Astragalus garbancillo</i> | 11,74 | 4 | A |
| <i>Lupinus condensiflorus</i> | 9,12 | 4 | B |
| <i>Lupinus ballianus</i> | 8,95 | 4 | B |
| Diferencia mínima significativa | 2,15 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

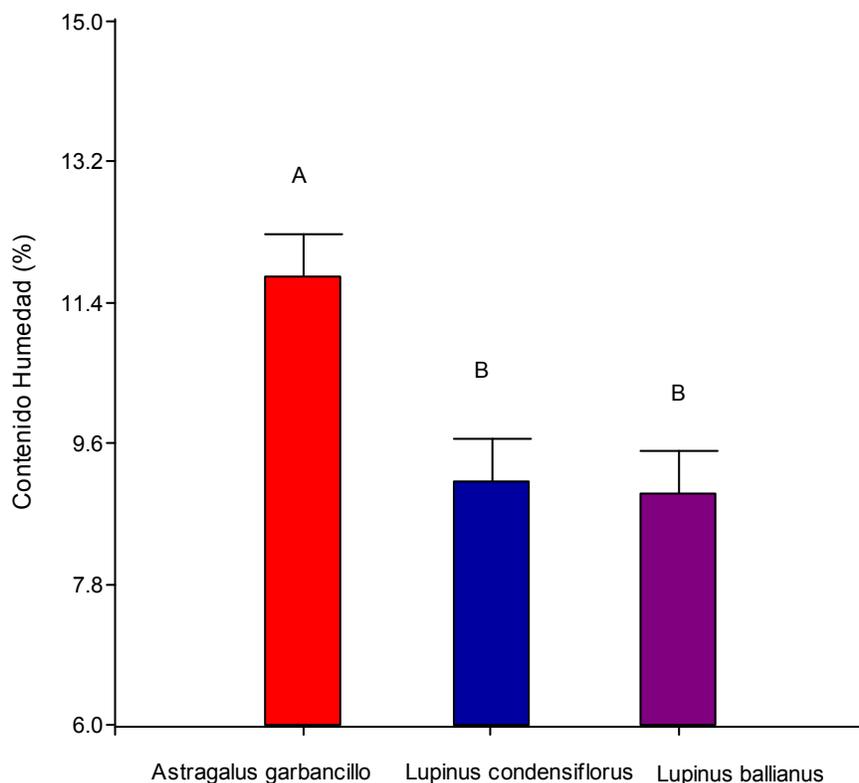


Figura 16. Contenido de humedad de las semillas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

5.4 Crecimiento vegetativo de especies de *Lupinus* y *Astragalus*

La evaluación del crecimiento en las tres especies fue realizada en condiciones de invernadero. El trabajo se inició en octubre de 2011 y culminó en noviembre de 2012, en este periodo se registraron la temperatura y la humedad relativa ambiental, los registros de estas variables están indicados en la figura 17.

De otra parte, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los variables dependientes de crecimiento vegetativo de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*. Ciertamente, en este análisis de correlación entre el número de hojas y el número de ramas, la correlación es altamente significativa ($r=0,85$; $p=0,0001$) (Tabla 18). De otro lado, la correlación entre el número de hojas y

biomasa total, es altamente significativa ($r=0,67$; $p=0,0001$) (Tabla 18). En ese sentido, en el análisis de correlación entre número de ramas y biomasa total, la correlación es altamente significativa ($r=0,92$, $p=0,0001$) (Tabla 18), Para finalizar, en el análisis de correlación entre la biomasa total y el número de nódulos, la correlación es altamente significativa ($r=0,92$, $p=0,0001$) (Tabla 18).

Por otro lado, para conocer las respuestas en el crecimiento vegetativo a los tratamientos de relave de mina en las tres especies estudiadas se realizó el análisis de varianza. Para las variables dependientes longitud de planta, número de hojas y biomasa total, en el análisis se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,0001$) por tratamientos, por especies y con la interacción de tratamientos * especies en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y en *Astragalus garbancillo* (Tablas, 76, 77 y 78, respectivamente).

Por ende, en el análisis de separación de medias por la prueba de Tukey de la longitud de planta se obtuvieron diferencias. De las tres especies la mayor longitud de planta se obtuvo en *Astragalus garbancillo* con el tratamiento de 0% de relave de mina (96,2 cm). Asimismo, respuestas similares fueron obtenidos en longitud de planta en *Lupinus ballianus* y *L. condensiflorus* en las cuales también la mayor longitud fueron obtenidas con el tratamiento de 0% de relave de mina (81 y 65,32 cm, respectivamente) (Tabla 19).

Luego, en el análisis de separación de medias por la prueba de Tukey del número de hojas se obtuvieron diferencias. De las tres especies el mayor número de hojas se obtuvo en *Astragalus garbancillo* con el tratamiento de 0% de relave de mina (861,4). Del mismo modo, para el número de hojas en *Lupinus ballianus* y *L. condensiflorus* fueron obtenidos respuestas similares en estas dos especies y los mayores valores del número de hojas fueron obtenidos con el tratamiento de 0% de relave de mina (282,4 y 205,2, respectivamente) (Tabla 20).

De la misma manera, en el análisis de separación de medias por la prueba de Tukey de la biomasa total se obtuvieron diferencias. De las tres especies analizadas la mayor acumulación de biomasa total fue obtenido por *Astragalus garbancillo* con el tratamiento de 0% de relave de mina (96,2 gramos). Del mismo modo, respuestas similares de biomasa total fueron obtenidos en *Lupinus ballianus* y *L. condensiflorus* donde los mayores valores de biomasa total fueron obtenidos con el tratamiento de 0% de relave de mina (81,0 y 65,32 gramos, respectivamente) (Tabla 21).

De otra parte, se conoce que la fitotoxicidad del cadmio está bien establecida, aunque los mecanismos involucrados en el proceso aún no se comprenden completamente. Esto se debe esencialmente a los efectos múltiples y entrelazados que este metal pesado puede ejercer sobre los eventos básicos del crecimiento, desarrollo y la fisiología de las plantas y al hecho de que las respuestas del cadmio en un evento dado, pueden ser diferente, y a veces opuestos, según la especie (Raschio *et al.*, 2008). De otra parte, el plomo es uno de elementos fitotóxicos conocidos, y la sensibilidad de las plantas a este metal en los diferentes procesos involucrados es variable, la respuesta de la planta depende del genotipo y las características fisiológicas. El plomo puede causar cambios en la ultraestructura de los cloroplastos, inhibir el crecimiento de las hojas y las raíces y la fotosíntesis, y producir daños inducidos en las membranas de la célula (Gupta *et al.*, 2013).

Asimismo, en trabajos realizados de crecimiento vegetativo de *Lupinus* y *Astragalus* en presencia de cadmio, plomo y zinc en el suelo, las respuestas obtenidas en el crecimiento vegetativo son variadas. Por ejemplo, Ehsan *et al.* (2015) evaluaron la acumulación de cadmio y zinc en *Lupinus uncinatus*. Esta especie mostró diferentes patrones de acumulación y distribución de metales en los órganos de la planta, lo que sugiere diferentes mecanismos de tolerancia para cada metal. No se observaron ningún efecto significativo en la producción de la biomasa a los tratamientos de cadmio y zinc. No obstante, la contaminación del zinc en el suelo redujo el crecimiento y el desarrollo de *Lupinus luteus* debido a que el tratamiento de 300 mg kg⁻¹ de suelo de Zn causó la marchitez de las plántulas (Wyszkowski & Modrzewska, 2015). Ehsan *et*

al. (2009) concluyen que el cadmio inhibió la altura de la planta y el número de hojas en *Lupinus uncinatus* e indujo un cambio significativo en el rendimiento de la materia seca de las raíces, hojas y tallos. Asimismo, Jara-Peña, *et al.* (2014) indicaron con el tratamiento de 100% de relave de mina la producción de la biomasa disminuyó significativamente en *Solanum nitidum*, *Brassica rapa*, *Fuertesimalva echinata*, *Urtica urens* y *Lupinus ballianus*. Igualmente, Pastor *et al.* (2003) en *Lupinus albus* cultivados en suelos con presencia de zinc reportaron una reducción en la altura de planta y en la producción de hojas en comparación con las plantas del tratamiento control negativo, en un suelo ácido con diversos niveles de suministro de zinc. También, se ha dado a conocer que otros metales pesados presente afectan el crecimiento vegetativo, como la reducción en altura de planta y la pérdida de hojas (Zornoza *et al.*, 2002). La disminución en el rendimiento también puede deberse a la toxicidad causada por la fracción de otros metales pesados presentes en el suelo, como el cadmio y el arsénico, que está presente en relave de mina utilizado en la investigación. Asimismo, Díez (2008) señala que al estudiar la resistencia y bioacumulación de zinc en diferentes plantas autóctonas de España, indica que la producción de biomasa en todas las especies/poblaciones estudiadas se vio reducida significativamente en los suelos contaminados con zinc debido a su toxicidad, aunque *Cytisus scoparius* (Fabáceae) presentó una mayor tolerancia y sólo vio afectada significativamente su producción a niveles elevados de contaminación.

Tabla 18. Correlación de Pearson analizadas para la longitud de planta, número de hojas, Número de ramas, biomasa total y el número de nódulo de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Variable (1) | Variable (2) | n | Pearson | Valor de probabilidad |
|--------------------|--------------------|----|---------|-----------------------|
| Longitud de planta | Longitud de planta | 60 | 1,00 | <0,0001 |
| Número de hojas | Número de hojas | 60 | 1,00 | <0,0001 |
| Número de hojas | Número de ramas | 60 | 0,85 | <0,0001 |
| Número de hojas | Biomasa total | 60 | 0,67 | <0,0001 |
| Número de hojas | Número de nódulos | 60 | 0,82 | <0,0001 |
| Número de ramas | Número de hojas | 60 | 0,85 | <0,0001 |
| Número de ramas | Número de ramas | 60 | 1,00 | <0,0001 |
| Número de ramas | Biomasa total | 60 | 0,92 | <0,0001 |
| Número de ramas | Número de nódulos | 60 | 0,95 | <0,0001 |
| Biomasa total | Número de hojas | 60 | 0,67 | <0,0001 |
| Biomasa total | Número de ramas | 60 | 0,92 | <0,0001 |
| Biomasa total | Biomasa total | 60 | 1,00 | <0,0001 |
| Biomasa total | Número de nódulos | 60 | 0,92 | <0,0001 |
| Número de nódulos | Número de hojas | 60 | 0,82 | <0,0001 |
| Número de nódulos | Número de ramas | 60 | 0,95 | <0,0001 |
| Número de nódulos | Biomasa total | 60 | 0,92 | <0,0001 |
| Número de nódulos | Número de nódulos | 60 | 1,00 | <0,0001 |

Tabla 19. Longitud de planta de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* evaluadas con tratamientos de relave de mina y en condiciones de invernadero.

| Tratamientos de relave de mina (%) | Especies | Longitud de planta (cm) | n | |
|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|---|-----|
| 0 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 96,2 | 5 | A |
| 30 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 91 | 5 | A B |
| 60 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 82,6 | 5 | B |
| 0 | <i>Lupinus ballianus</i> | 81 | 5 | B |
| 0 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 65,32 | 5 | C |
| 30 | <i>Lupinus ballianus</i> | 57,2 | 5 | C |
| 30 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 55,8 | 5 | C |
| 60 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 55,6 | 5 | C |
| 60 | <i>Lupinus ballianus</i> | 54,4 | 5 | C |
| 100 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 41,1 | 5 | D |
| 100 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 40,5 | 5 | D |
| 100 | <i>Lupinus ballianus</i> | 40,1 | 5 | D |

Diferencia mínima significativa 11,2

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 20. Número de hojas evaluadas en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* evaluadas con tratamientos de relave de mina y en condiciones de invernadero.

| Tratamientos de relave de mina (%) | Especies | Número de hojas | n | | | |
|------------------------------------|-------------------------------|-----------------|---|---|---|-----|
| 0 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 861,4 | 5 | A | | |
| 30 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 695,8 | 5 | | B | |
| 60 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 308,8 | 5 | | | C |
| 0 | <i>Lupinus ballianus</i> | 282,4 | 5 | | | C |
| 0 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 205,2 | 5 | | | D |
| 30 | <i>Lupinus ballianus</i> | 197,6 | 5 | | | D |
| 30 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 131 | 5 | | | E |
| 60 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 119,2 | 5 | | | E F |
| 60 | <i>Lupinus ballianus</i> | 103,6 | 5 | | | E F |
| 100 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 102,4 | 5 | | | E F |
| 100 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 93,4 | 5 | | | E F |
| 100 | <i>Lupinus ballianus</i> | 66,2 | 5 | | | F |
| Diferencia mínima significativa | | 57,8 | | | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$)

Tabla 21. Biomasa total (gramos) de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* evaluadas con tratamientos de relave de mina y en condiciones de invernadero.

| Tratamientos de relave de mina (%) | Especies | Biomasa total (g) | n | | | |
|------------------------------------|-------------------------------|-------------------|---|---|---|-------|
| 0 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 96,2 | 5 | A | | |
| 30 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 91 | 5 | A | | |
| 60 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 82,6 | 5 | | B | |
| 0 | <i>Lupinus ballianus</i> | 81 | 5 | | | C |
| 0 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 65,32 | 5 | | | C |
| 30 | <i>Lupinus ballianus</i> | 57,2 | 5 | | | C |
| 30 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 55,8 | 5 | | | D |
| 60 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 55,6 | 5 | | | D E |
| 60 | <i>Lupinus ballianus</i> | 54,4 | 5 | | | D E F |
| 100 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 41,1 | 5 | | | D E F |
| 100 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 40,5 | 5 | | | E F |
| 100 | <i>Lupinus ballianus</i> | 40,1 | 5 | | | F |
| Diferencia mínima significativa | | 5,17 | | | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

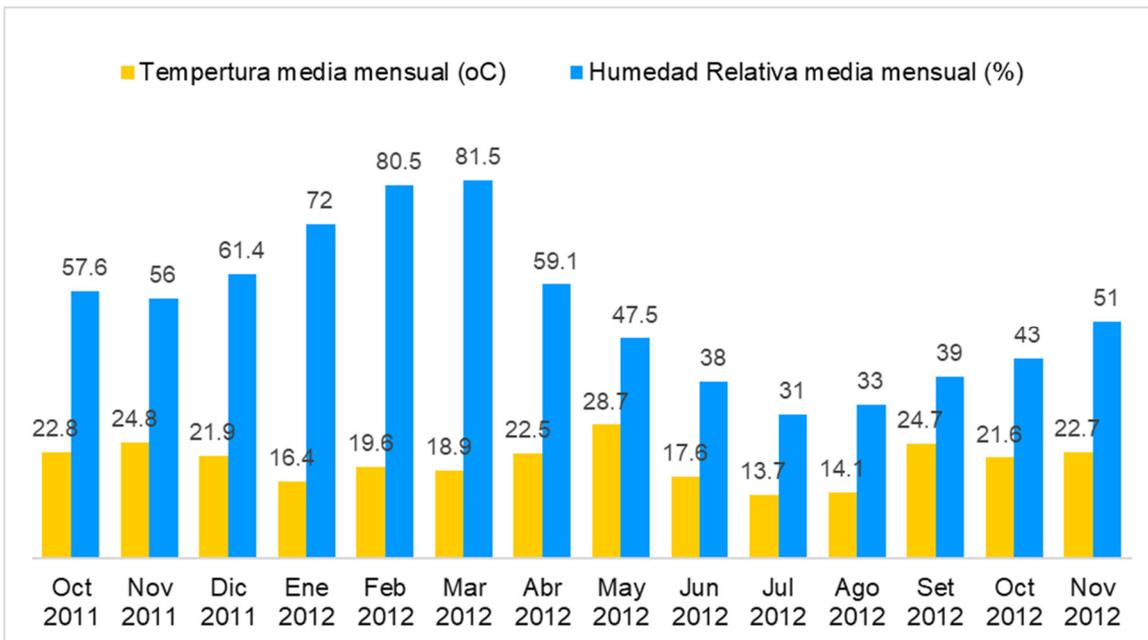


Figura 17. Valores de temperatura media mensual (°C) y de humedad relativa (%) registradas con un higrotermógrafo en el invernadero, donde se realizó la evaluación del desarrollo de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* con tratamientos de relave de mina en el distrito de Lachaqui, provincia de Canta, región Lima.

5.5 Acumulación de cadmio, plomo y zinc en órganos de especies de *Lupinus* y *Astragalus* evaluadas con tratamientos de relave de mina

Para conocer la respuesta de la acumulación de cadmio, plomo y zinc en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* evaluadas con tratamientos de relave de mina, se consideraron tres variables dependientes como: el contenido de metales pesados en las raíces, hojas y tallos, y el contenido total de los tres metales acumulados en toda la planta, Ya que el contenido total de cadmio, plomo y zinc de toda la planta corresponde a la suma de concentraciones de las dos variables dependientes anteriores. Para lo cual, se realizaron análisis de correlación y de regresión lineal simple para seleccionar a la variable que mejor represente en la acumulación de metales pesados en los tejidos en estas 3 especies.

En el análisis de correlación de Pearson, que es una medida de relación lineal entre dos variables aleatorias continuas. En el análisis de correlación realizado del

contenido de los tres metales se puede observar que el contenido total de metales en las plantas analizadas está altamente correlacionado con el contenido de metales en las raíces de las tres especies evaluadas, esta respuesta de correlación es posiblemente debido que estas especies tienen la capacidad de acumular los metales pesados en los tejidos de las raíces. En el caso de la correlación entre el contenido de cadmio en las raíces y el cadmio total, analizadas con los valores de concentración de cadmio de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* es altamente significativa ($r=0,99$, $p=0,0001$) (Tabla 22). De otro lado, la correlación entre el contenido de cadmio en hojas y tallos y cadmio total, es también altamente significativa ($r=0,89$, $p=0,0001$) (Tabla 22).

En el análisis de correlación de plomo, al realizar la correlación entre el contenido de plomo en raíces y plomo total es altamente significativa ($r=0,98$, $p=0,0001$) (Tabla 23). Asimismo, la correlación entre el contenido de plomo en hojas y tallos y plomo total, es también altamente significativa ($r=0,65$, $p=0,0001$) (Tabla 23).

Del mismo modo, en el análisis de correlación de zinc, entre el contenido de zinc en raíces y zinc total es altamente significativa ($r=0,97$, $p=0,0001$) (Tabla 24). De modo similar, en la correlación entre el contenido de zinc en hojas y tallos y zinc total, es altamente significativa ($r=0,91$, $p=0,0001$) (Tabla 24).

Tabla 22. Análisis de correlación de Pearson (coeficiente de Pearson) para la acumulación de cadmio evaluadas con tratamientos de relave de mina en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Variable 1 | Variable 2 | n | Pearson | Nivel de probabilidad |
|-------------------------------------|-------------------------------------|----|---------|-----------------------|
| Contenido de cadmio en raíces | Contenido de cadmio en hojas-tallos | 60 | 0,83 | 0,0001 |
| Contenido de cadmio en raíces | Contenido de cadmio total | 60 | 0,99 | 0,0001 |
| Contenido de cadmio en hojas-tallos | Contenido de cadmio total | 60 | 0,89 | 0,0001 |

Tabla 23. Análisis de Correlación de Pearson (coeficiente de Pearson) para la acumulación de plomo evaluadas con tratamientos de relave de mina en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Variable 1 | Variable 2 | n | Pearson | Nivel de probabilidad |
|------------------------------------|------------------------------------|----|---------|-----------------------|
| Contenido de plomo en raíces | Contenido de plomo en hojas-tallos | 60 | 0,48 | 0,0001 |
| Contenido de plomo en raíces | Contenido de plomo total | 60 | 0,98 | 0,0001 |
| Contenido de plomo en hojas-tallos | Contenido de plomo total | 60 | 0,65 | 0,0001 |

Tabla 24. Análisis de Correlación de Pearson (coeficiente de Pearson) para la acumulación de zinc evaluadas con tratamientos de relave de mina en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Variable 1 | Variable 2 | n | Pearson | Nivel de probabilidad |
|-----------------------------------|--------------------------------|----|---------|-----------------------|
| Contenido de zinc en raíces | Contenido de zinc hojas-tallos | 60 | 0,79 | 0,0001 |
| Contenido de zinc en raíces | Contenido de cadmio total | 60 | 0,97 | 0,0001 |
| Contenido de zinc en hojas-tallos | Contenido de zinc total | 60 | 0,91 | 0,0001 |

De otro lado, al realizar el análisis de regresión lineal simple considerando como variables dependientes a las concentraciones de cadmio total, plomo total y zinc total acumuladas en los tejidos de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*, en relación con las variables regresoras de las concentraciones de cadmio, plomo y zinc en las raíces y en hojas y tallos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

En el análisis de regresión lineal de cadmio total y la variable regresora de cadmio en raíces. El coeficiente de determinación obtenido fue de $R^2=0,99$, esto indica que el 99% del contenido total de cadmio en la planta es debido al contenido de cadmio en la raíz (Figura 18). El análisis de varianza resultó altamente significativo para el supuesto de existencia de una relación lineal entre el variable dependiente cadmio total y la variable regresora cadmio raíces (Tabla 79). Igualmente, en el análisis de regresión lineal entre el contenido de cadmio total y cadmio en hojas y tallos, se obtuvo un coeficiente de determinación de, $R^2=0,79$, esto indica que solo el 79% del contenido

total de cadmio en la planta de las tres especies evaluadas es explicada por el contenido de cadmio en hoja y tallos (Figura 19). El análisis de varianza resultó altamente significativo para el supuesto de la existencia de una relación lineal entre el variable dependiente cadmio total y la variable regresora cadmio de hojas y tallos (Tabla 80).

De modo similar, en el análisis de regresión lineal de plomo total y de plomo en raíces (variable regresora), el coeficiente de determinación obtenido fue de, $R^2=0,96$, lo que indica que el 96% del contenido total de plomo en la planta se debe al contenido de plomo en la raíz (Figura 20). El análisis de varianza resultó altamente significativo para el supuesto de la existencia de una relación lineal entre el variable dependiente plomo total y la variable regresora cadmio raíces (Tabla 81). Del mismo modo, en el análisis de regresión lineal entre el contenido de plomo total y plomo en hojas y tallos, (variable regresora) se obtuvo un coeficiente de determinación de $R^2=0,43$, esto indica que solo el 43% del contenido total de plomo en la planta de las tres especies evaluadas es explicada por el contenido de plomo en hojas y tallos (Figura 21). El Análisis de varianza fue significativo para el supuesto de la existencia de una relación lineal entre la variable dependiente plomo total y la variable regresora de plomo en hojas y tallos (Tabla 82).

Análogamente, en el análisis de regresión lineal de zinc total y de zinc en las raíces (variable regresora), el coeficiente de determinación obtenido fue de, $R^2=0,95$, lo que indica que el 95% del contenido total de zinc en la planta se debe al contenido de zinc en la raíz (Figura 22). El análisis de varianza resultó altamente significativo para el supuesto de la existencia de una relación lineal entre la variable dependiente zinc total y la variable regresora zinc raíces (Tabla 83). Del mismo modo, en el análisis de regresión lineal entre el contenido de zinc total y zinc en hojas y tallos (variable regresora) se obtuvo un coeficiente de determinación de $R^2=0,82$, esto indica que solo el 82% del contenido total de zinc en la planta de las tres especies evaluadas es explicada por el contenido de zinc en hojas y tallos (Figura 23). En consecuencia, el análisis de varianza resultó altamente significativo para el supuesto de existencia de

una relación lineal positiva entre la variable dependiente plomo total y la variable regresora de plomo en hojas y tallos (Tabla 84).

De los resultados obtenidos en los análisis de correlación y regresión lineal simple, se concluye que la variación en el contenido total de metales en la planta (las tres especies estudiadas) está explicada en mayor grado por la variación del contenido de metales en la raíz, con estas pruebas se pudo proseguir con el análisis de variancia usando principalmente la variable dependiente de contenido total de metales en la planta en las tres especies evaluadas (variable dependiente) dentro del diseño completamente aleatorio bajo el arreglo factorial de 4x3 (tratamientos de proporciones de relave mina y tres especie de leguminosas estudiadas).

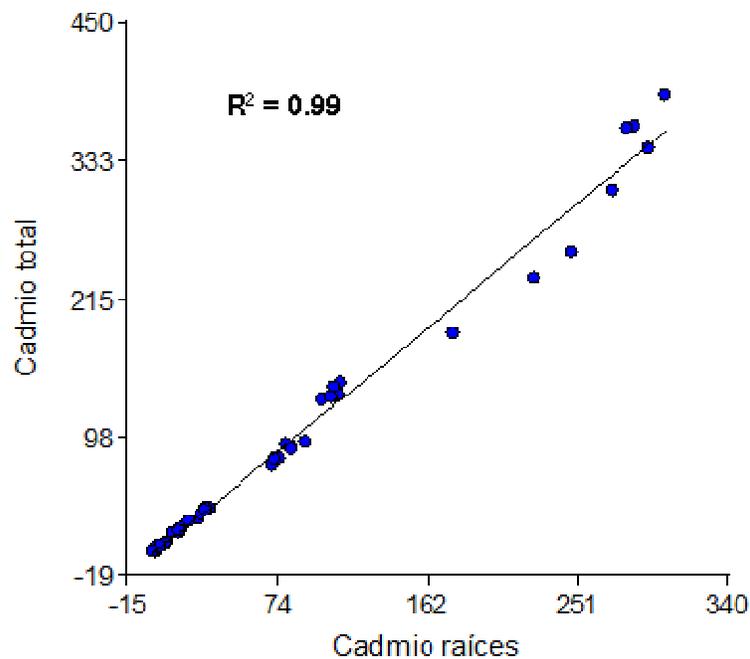


Figura 18. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente cadmio total y la variable regresora cadmio raíces en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

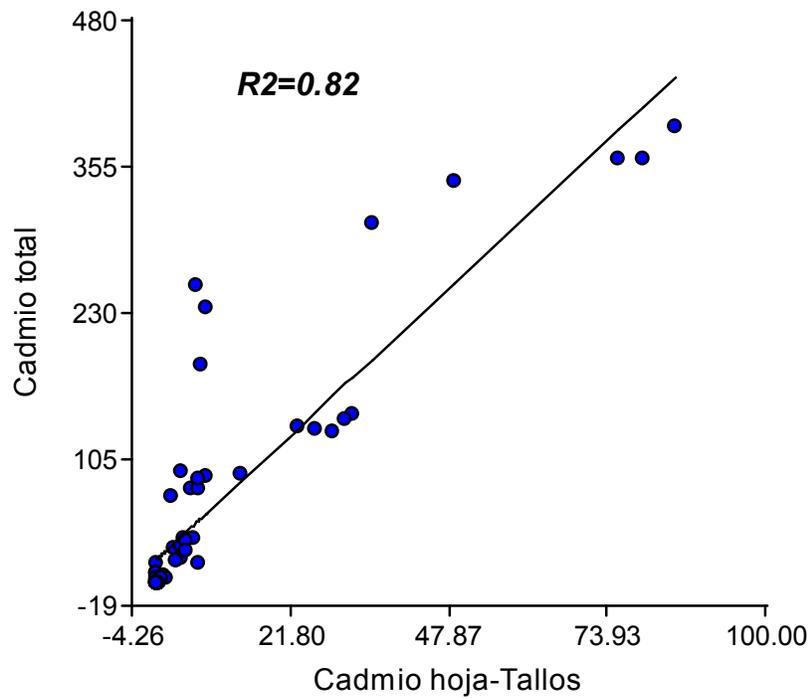


Figura 19. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente cadmio total y la variable regresora cadmio hojas y tallos en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

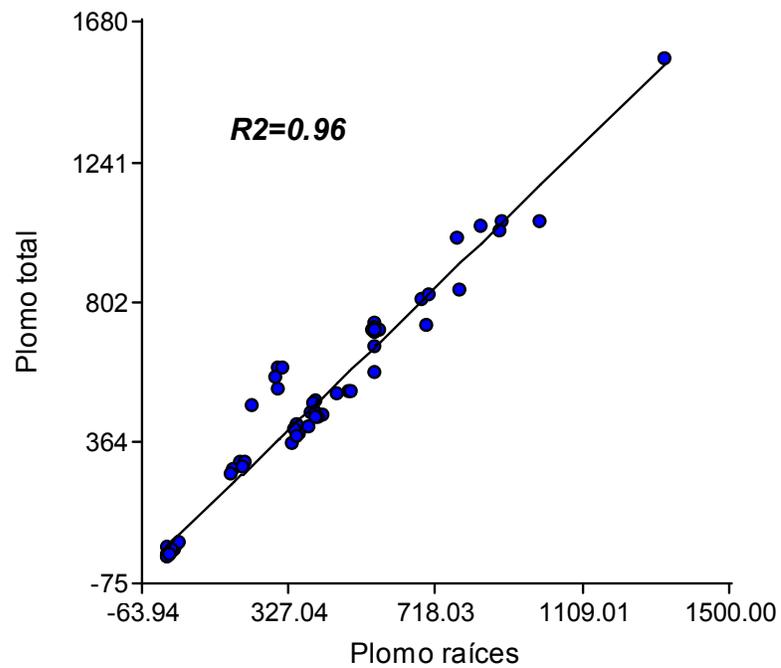


Figura 20. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente plomo total y la variable regresora plomo en raíces de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

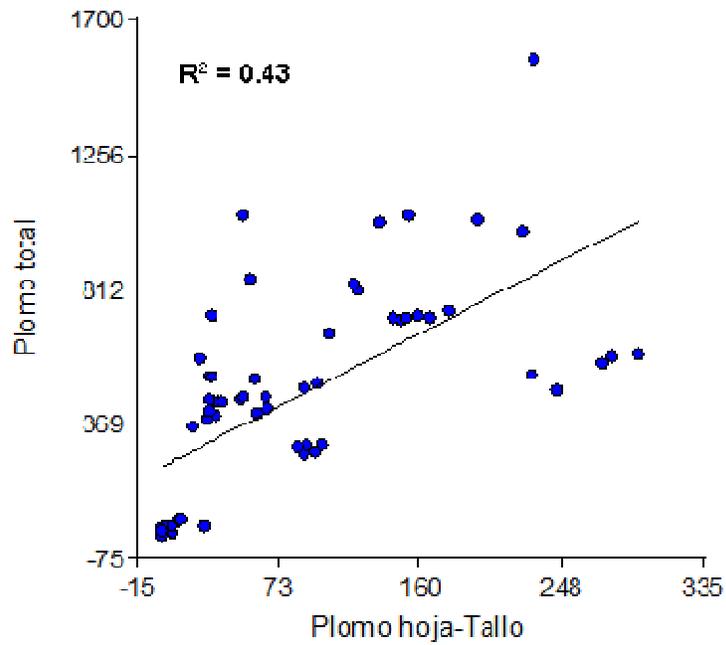


Figura 21. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente plomo total y la variable regresora plomo en hojas y tallos en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

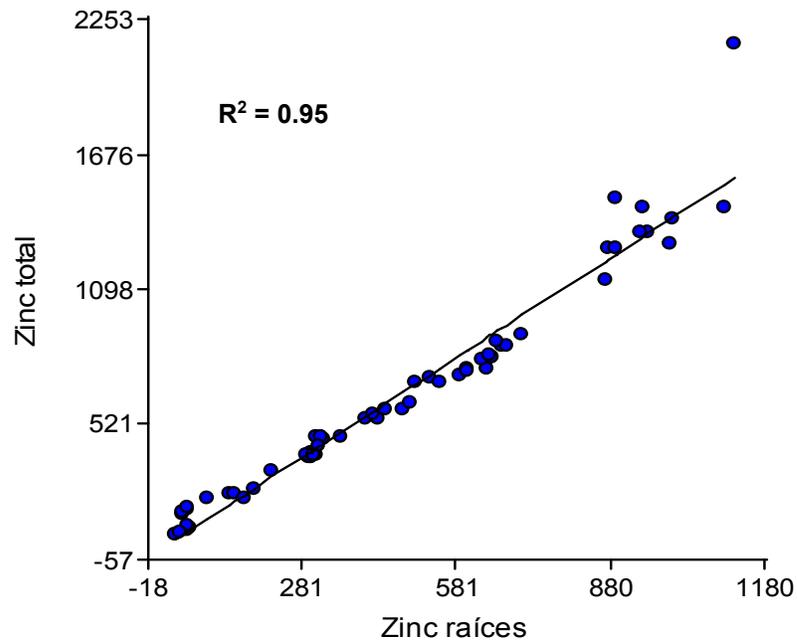


Figura22. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente zinc total y la variable regresora zinc en hojas y tallos en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

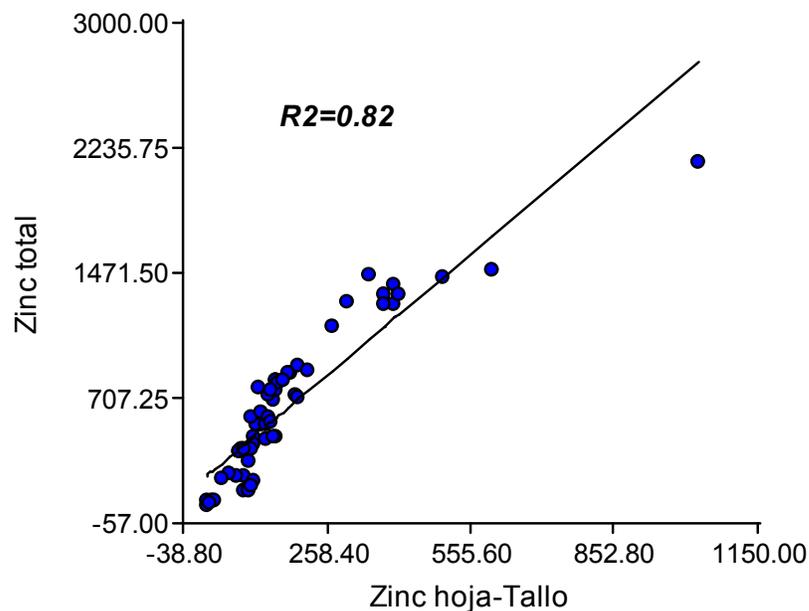


Figura 9. Análisis de Regresión lineal simple de la variable dependiente zinc total y la variable regresora zinc en hojas y tallos en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

5.5.1 Acumulación de cadmio en *Lupinus* y *Astragalus*

Al realizar el análisis de varianza de la acumulación de cadmio en las raíces, y como cadmio total se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) por tratamientos, por especies y en la interacción de los tratamientos * especies, en *Lupinus ballianus* *L. condensiflorus* y en *Astragalus garbancillo* (Tabla 34). Asimismo, en el análisis de separación de medias por la prueba de Tukey de la acumulación de cadmio en las raíces, y analizadas y como cadmio total en cada especie se obtuvieron diferencias (Tabla 35).

En *Lupinus ballianus*, el mayor valor de acumulación de cadmio en las raíces fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 287,3 mg de cadmio por kg^{-1} de materia seca (MS) (Tabla 25). Del mismo modo, el mayor valor de

acumulación de cadmio total en esta especie fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 18,76 mg kg⁻¹ MS de cadmio (Tabla 35), y al sacar la potencia de este valor, el valor equivalente de acumulación de cadmio total fue de 351,94 mg kg⁻¹ MS, porque para poder realizar el análisis de varianza de acumulación de cadmio total y cumplir con los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad e independencia, los datos originales fueron transformados con la raíz cuadrada.

En *Lupinus condensiflorus*. El mayor valor de acumulación de cadmio en las raíces también fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 109,96 mg de cadmio por kg⁻¹ de materia seca (MS) (Tabla 26). El mayor valor de acumulación de cadmio total en esta especie fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 12,62 mg kg⁻¹ MS de cadmio (Tabla 35), y al sacar la potencia de este valor, el valor equivalente de acumulación de cadmio total fue de 159,26 mg kg⁻¹ MS, porque para realizar el análisis de varianza de la acumulación de cadmio total y cumplir con los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad e independencia, los datos originales de concentración de cadmio fueron transformados sacando la raíz cuadrada.

En *Astragalus garbancillo*, el mayor valor de acumulación de cadmio en las raíces, también fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 78,2 mg kg⁻¹ MS de cadmio (Tabla 27). Análogamente, en las dos especies de *Lupinus*, el mayor valor de la acumulación de cadmio total en *Astragalus garbancillo* fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 11,62 mg kg⁻¹ MS de cadmio (Tabla 35), y al sacar la potencia de este valor, el valor equivalente de acumulación de cadmio total fue de 135,02 mg kg⁻¹ MS, porque para realizar el análisis de varianza de la acumulación de cadmio total y cumplir con los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad e independencia los datos originales de concentración de cadmio, fueron transformados sacando la raíz cuadrada.

Tabla 25. Acumulación de cadmio en los tejidos de las raíces de *Lupinus ballianus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Cadmio raíces (mg Kg ⁻¹ materia seca) | n | |
|---------------------------------|--|------|---|
| 100 | 287,3 | 5 | A |
| 60 | 162,7 | 5 | B |
| 30 | 9,17 | 5 | C |
| 0 | 0,53 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | | 72,4 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 26. Acumulación de cadmio en los tejidos de las raíces de *Lupinus condensiflorus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Cadmio raíces (mg Kg ⁻¹ materia seca) | n | |
|---------------------------------|--|-----|---|
| 100 | 106,96 | 5 | A |
| 60 | 30,06 | 5 | B |
| 30 | 3,02 | 5 | C |
| 0 | 0,06 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | | 4,9 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 27. Acumulación de cadmio en los tejidos de las raíces de *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Cadmio raíces (mg Kg ⁻¹ materia seca) | n | |
|---------------------------------|--|-----|---|
| 100 | 78,2 | 5 | A |
| 60 | 15,95 | 5 | B |
| 30 | 3,22 | 5 | C |
| 0 | 0,1 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | | 5,1 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

5.5.2 Acumulación de plomo en especies de *Lupinus* y *Astragalus*

En el análisis de varianza de la acumulación de plomo en las raíces, y como plomo total se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) por tratamientos con relave de mina, por especies, y en la interacción de tratamientos * especies (Tabla 36) en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y en *Astragalus garbancillo*. De otro lado, en el análisis de separación de medias por la prueba de Tukey de la acumulación de plomo en las raíces, analizadas por tratamientos y como plomo total en cada especie se obtuvieron diferencias.

En *Lupinus ballianus*, el mayor valor de acumulación de plomo en las raíces fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando $992,76 \text{ mg kg}^{-1}$ MS de plomo (Tabla 28), Asimismo, el mayor valor de acumulación de plomo total en esta especie fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando $33,73 \text{ mg kg}^{-1}$ MS de cadmio (Tabla 35), y al sacar la potencia de este valor, el valor equivalente de acumulación de plomo total fue de $1137,71 \text{ mg kg}^{-1}$ MS, porque para realizar el análisis de varianza de acumulación de cadmio total y cumplir con los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad e independencia los datos originales fueron transformados con la función de raíz cuadrada.

En el caso de *Lupinus condensiflorus*, el mayor valor de acumulación de plomo en las raíces también fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando $656,15 \text{ mg kg}^{-1}$ MS de cadmio (Tabla 27), El mayor valor de acumulación de plomo total en esta especie fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando $28,32 \text{ mg kg}^{-1}$ MS de plomo (Tabla 35), y al sacar la potencia de este valor, su valor equivalente de acumulación de cadmio total fue de $802,02 \text{ mg kg}^{-1}$ MS, porque para realizar el análisis de varianza de la acumulación de plomo total y cumplir con los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad e independencia los datos originales de concentración de plomo fueron transformados sacando la raíz cuadrada.

Por otro lado, en *Astragalus garbancillo*, el mayor valor de acumulación de plomo en las raíces, igualmente fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 559,56 mg kg⁻¹ MS de cadmio (Tabla 28). De modo similar, a las dos especies de *Lupinus*, el mayor valor de la acumulación de plomo total en *Astragalus garbancillo* fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 26,72 mg kg⁻¹ MS de plomo (Tabla 35), y al sacar la potencia de este valor, el valor equivalente de acumulación de plomo total fue de 713,96 mg kg⁻¹ MS, porque para realizar el análisis de varianza de la acumulación de plomo total y cumplir con los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad e independencia los datos originales de concentración de plomo fueron transformados sacando la raíz cuadrada.

Tabla 28. Acumulación de plomo en los tejidos de las raíces de *Lupinus ballianus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Plomo raíces (mg Kg ⁻¹ materia seca) | n | |
|---------------------------------|---|-------|---|
| 100 | 992,76 | 5 | A |
| 60 | 456,8 | 5 | B |
| 30 | 388,36 | 5 | B |
| 0 | 16,95 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | | 250,3 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 29. Acumulación de plomo en los tejidos de las raíces de *Lupinus condensiflorus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Plomo raíces (mg Kg ⁻¹ materia seca) | n | |
|---------------------------------|---|-------|---|
| 100 | 656,15 | 5 | A |
| 60 | 489,2 | 5 | B |
| 30 | 427,46 | 5 | B |
| 0 | 18,58 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | | 160,6 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 30. Acumulación de plomo en los tejidos de las raíces de *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Plomo raíces (mg Kg ⁻¹ materia seca) | n | |
|---------------------------------|---|------|---|
| 100 | 559,56 | 5 | A |
| 60 | 288,36 | 5 | B |
| 30 | 194,2 | 5 | C |
| 0 | 6,66 | 5 | D |
| Diferencia mínima significativa | | 33,6 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

5.5.3 Acumulación de zinc en *Lupinus* y *Astragalus*

Al realizar el análisis de varianza (ANAVA) de la acumulación de zinc en las raíces, y como zinc total se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,0001$) por tratamientos con relave de mina, por especies, y en la interacción de tratamientos * especies (Tabla 38) en *Lupinus ballianus* L. *condensiflorus* y en *Astragalus garbancillo*, De otra parte, en el análisis de separación de medias por la prueba de Tukey de la acumulación de zinc en las raíces, analizadas por tratamientos y como zinc total en cada especie se obtuvieron diferencias.

En *Lupinus ballianus*, el mayor valor de acumulación de zinc en las raíces fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 993,00 mg kg⁻¹ MS de zinc (Tabla 31). Asimismo, el mayor valor de acumulación de zinc total en esta especie fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 38,99 mg kg⁻¹ MS de zinc (Tabla 39), y al sacar la potencia de este valor, el valor equivalente de acumulación de plomo total fue de 1520,22 mg kg⁻¹ MS, porque para realizar el análisis de varianza de acumulación de cadmio total y cumplir con los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad e independencia los datos originales fueron transformados con la raíz cuadrada.

Para el caso de *Lupinus condensiflorus*, el mayor valor de acumulación de zinc en las raíces también fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 903,38 mg kg⁻¹ MS de cadmio (Tabla 30), El mayor valor de acumulación

de zinc total en esta especie fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 35,96 mg kg⁻¹ MS de zinc (Tabla 39), y al sacar la potencia de este valor, su valor equivalente de acumulación de zinc total fue de 1293,12 mg kg⁻¹ MS, porque para realizar el análisis de varianza de la acumulación de plomo total y cumplir con los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad e independencia los datos originales de concentración de cadmio fueron transformados sacando la raíz cuadrada.

Por otra parte, en *Astragalus garbancillo*, el mayor valor de acumulación de zinc en las raíces, igualmente fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 624,32 mg kg⁻¹ MS de zinc (Tabla 33), De manera similar, a las dos especies de *Lupinus*, el mayor valor de la acumulación de zinc total en *Astragalus garbancillo* fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 31,92 mg kg⁻¹ MS de zinc (Tabla 39), y al sacar la potencia de este valor, el valor equivalente de acumulación de plomo total fue de 996,54 mg kg⁻¹ MS, porque para realizar el análisis de varianza de la acumulación de plomo total y cumplir con los supuestos estadísticos de normalidad, homogeneidad e independencia los datos originales de concentración de zinc fueron transformados sacando la raíz cuadrada.

Tabla 31. Acumulación de zinc en los tejidos de las raíces de *Lupinus ballianus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Zinc raíces (mg Kg ⁻¹ materia seca) | n | |
|---------------------------------|--|-------|---|
| 100 | 993 | 5 | A |
| 60 | 763,6 | 5 | B |
| 30 | 471,8 | 5 | C |
| 0 | 174,4 | 5 | D |
| Diferencia mínima significativa | | 216,3 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 32. Acumulación de zinc en los tejidos de las raíces de *Lupinus condensiflorus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Zinc raíces (mg Kg ⁻¹ materia seca) | n | |
|---------------------------------|--|-------|---|
| 100 | 903,8 | 5 | A |
| 60 | 411,8 | 5 | B |
| 30 | 312,76 | 5 | B |
| 0 | 61,7 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | | 101,6 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 33. Acumulación de zinc en los tejidos de las raíces de *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Zinc raíces (mg Kg ⁻¹ materia seca) | n | |
|---------------------------------|--|------|---|
| 100 | 624,32 | 5 | A |
| 60 | 532,8 | 5 | A |
| 30 | 301,84 | 5 | B |
| 0 | 51,6 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | | 95,3 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 34. Análisis de varianza de la acumulación de cadmio total analizadas en los tejidos de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------|-----------------------|
| Modelo | 1938,1 | 11,0 | 176,2 | 167,3 | <0,0001 |
| Relave de mina (%) | 1500,4 | 3,0 | 500,1 | 474,8 | <0,0001 |
| Especies | 254,0 | 2,0 | 127,0 | 120,6 | <0,0001 |
| Relave *Especies | 183,7 | 6,0 | 30,6 | 29,1 | <0,0001 |
| Error | 50,6 | 48,0 | 1,1 | | |
| Total | 1988,6 | 59,0 | | | |

Tabla 35. Acumulación de cadmio total analizadas en los tejidos de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Especies | Cadmio total (mg Kg ⁻¹ materia seca) | n | |
|---------------------------------|-------------------------------|---|---|-----|
| 100 | <i>Lupinus ballianus</i> | 18,76 | 5 | A |
| 100 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 12,62 | 5 | B |
| 100 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 11,62 | 5 | B |
| 60 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 9,29 | 5 | C |
| 60 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 5,86 | 5 | D |
| 30 | <i>Lupinus ballianus</i> | 4,49 | 5 | D E |
| 30 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 2,98 | 5 | E F |
| 60 | <i>Lupinus ballianus</i> | 2,05 | 5 | F G |
| 30 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 1,82 | 5 | F G |
| 0 | <i>Lupinus ballianus</i> | 0,68 | 5 | G |
| 0 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 0,35 | 5 | G |
| 0 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 0,17 | 5 | G |
| Diferencia mínima significativa | | 2,22 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 36. Análisis de varianza de la acumulación de plomo total analizadas en los tejidos de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------|-----------------------|
| Modelo | 5475,5 | 11,0 | 497,8 | 127,3 | <0,0001 |
| Relave de mina (%) | 5208,8 | 3,0 | 1736,3 | 444,1 | <0,0001 |
| Especies | 100,5 | 2,0 | 50,3 | 12,9 | <0,0001 |
| Relave *Especies | 166,3 | 6,0 | 27,7 | 7,1 | <0,0001 |
| Error | 187,7 | 48,0 | 3,9 | | |
| Total | 5663,2 | 59,0 | | | |

Tabla 37. Acumulación de plomo total analizadas en los tejidos de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Especies | Plomo total (mg K ⁻¹ de materia seca) | n | |
|---------------------------------|-------------------------------|--|---|-----|
| 100 | <i>Lupinus ballianus</i> | 33,73 | 5 | A |
| 100 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 28,32 | 5 | B |
| 100 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 26,72 | 5 | B C |
| 60 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 23,49 | 5 | C D |
| 60 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 22,66 | 5 | C D |
| 30 | <i>Lupinus ballianus</i> | 22,63 | 5 | C D |
| 30 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 21,67 | 5 | D |
| 60 | <i>Lupinus ballianus</i> | 20,79 | 5 | D E |
| 30 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 16,91 | 5 | E |
| 0 | <i>Lupinus ballianus</i> | 5,06 | 5 | F |
| 0 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 4,71 | 5 | F |
| 0 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 2,52 | 5 | F |
| Diferencia mínima significativa | | 4,29 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 38. Análisis de varianza de la acumulación de zinc total analizadas en los tejidos de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------|-----------------------|
| Modelo | 4580,8 | 11,0 | 416,4 | 88,8 | <0,0001 |
| Relave de mina (%) | 3794,5 | 3,0 | 1264,8 | 269,7 | <0,0001 |
| Especies | 496,6 | 2,0 | 248,3 | 53,0 | <0,0001 |
| Relave *Especies | 289,8 | 6,0 | 48,3 | 10,3 | <0,0001 |
| Error | 225,1 | 48,0 | 4,7 | | |
| Total | 4805,9 | 59,0 | | | |

Tabla 39. Acumulación de Zinc total analizadas en los tejidos de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Especies | Zinc total (mg Kg ⁻¹ de materia seca) | n | |
|---------------------------------|-------------------------------|--|---|-----|
| 100 | <i>Lupinus ballianus</i> | 38,99 | 5 | A |
| 100 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 35,96 | 5 | A B |
| 100 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 31,28 | 5 | B C |
| 60 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 27,89 | 5 | C D |
| 60 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 26,04 | 5 | D |
| 30 | <i>Lupinus ballianus</i> | 24,22 | 5 | D E |
| 30 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 23,95 | 5 | D E |
| 60 | <i>Lupinus ballianus</i> | 20,08 | 5 | E F |
| 30 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 19,95 | 5 | E F |
| 0 | <i>Lupinus ballianus</i> | 15,6 | 5 | F G |
| 0 | <i>Lupinus condensiflorus</i> | 12,65 | 5 | G H |
| 0 | <i>Astragalus garbancillo</i> | 8,32 | 5 | H |
| Diferencia mínima significativa | | 4,7 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

En el trabajo realizado con estas especies andinas, se ha demostrado que *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* absorben y acumulan el cadmio, plomo y zinc en el tejido de las raíces. A este mecanismo que tienen algunas especies vegetales de realizar la acumulación de los metales preferentemente en las raíces se conoce como plantas fitoestabilizadoras. Idealmente, las especies de plantas utilizadas para la fitoestabilización no deberían acumular metales pesados en sus partes aéreas para evitar la entrada de estos contaminantes en la cadena alimenticia (Gómez-Sagástegui *et al*, 2012). Deben ser tolerantes a los metales, con un sistema radical extenso, producir una gran cantidad de biomasa y mantener la translocación tan pequeña de la raíz a las hojas y los tallos (Alkorta *et al*, 2010), Por ende, los diversos estudios realizados indican que la revegetación de los lugares con residuos de mina es posible y que varias especies de plantas se pueden utilizar con este propósito.

Por lo tanto, la fitoestabilización probablemente es la técnica más conveniente de remediación disponibles para la remediación de suelos contaminadas con metales, porque es una tecnología amigable con el ambiente, rentable y de larga duración de

los efectos de la estabilización (Oznur et al., 2018). En el proceso de fitoestabilización por las plantas se realiza la inmovilización de los metales debido a los mecanismos de absorción y acumulación en las raíces, adsorción sobre las raíces, o precipitación sobre la rizósfera. Las raíces de las plantas producen cambios en la especiación de los metales al producir variaciones en el potencial redox, secreción de protones, secreción de agentes quelantes, etc. Gran parte de los iones metálicos son adsorbidos físicamente a superficies externas de las paredes celulares cargadas negativamente (Lasat, 2002), o por enlaces químicos por ejemplo Pb-O (Marmioli *et al.*, 2005), mientras que otra gran parte de los iones son absorbidos y secuestrados dentro de las estructuras celulares de las raíces (ejemplo, En las, vacuolas), lo que los convierte en formas no disponibles para la translocación a la parte aérea de las plantas (Lasat et al, 1998).

Ahora bien, en estudios realizados con otras especies de *Lupinus*, se señala que resisten niveles elevados de elementos tóxicos en el suelo, con fuerte carácter exclusor, y una gran capacidad para retenerlos en las raíces, evitando su transporte a la parte aérea donde se encuentran los tejidos fotosintéticos indispensables para la vida de la planta (Zornoza *et al.*, 2002). Es necesario señalar en el trabajo realizado, en *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* los mayores valores de acumulación de cadmio fueron obtenidos en las raíces con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 287,3 mg kg⁻¹ de Materia Seca, 109,96 kg⁻¹ MS y 78,2 mg kg⁻¹ MS de cadmio, respectivamente. Lo que indican que estas tres especies tienen una alta tolerancia al cadmio absorbidas del relave de mina y acumuladas mayormente en sus raíces. En el trabajo realizado por Vázquez *et al* (2006) evaluando *Lupinus albus* el cadmio indujo la síntesis de altos niveles de fitoquelatinas (PC) en plantas de *Lupinus albus*, principalmente en raíces, siendo PC3 la fitoquelatina principal. La cantidad de cadmio complejoado por el tiol representó aproximadamente el 20% del cadmio total en hojas, 40% en tallos y 20% en raíces, Por lo tanto, la retención de cadmio en la pared celular podría representar más del doble de la cantidad de cadmio complejoado por fitoquelatinas en hojas y raíces. En tallos, ambos mecanismos contribuyeron por igual en la desintoxicación de cadmio,

Estos estudios indican que las plantas de *Lupinus albus* utilizan la unión de la pared celular y, en segundo lugar, la producción de fitoquelatinas, como mecanismos efectivos de desintoxicación del cadmio, Igualmente, Martínez-Alcalá *et al.* (2010) al evaluar *Lupinus albus* en la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados y con altos niveles de Zn, Cd, Cu y Pb en los suelos, y con valores de pH desde 4,2 a 6,8, indican que la limitada transferencia de metales pesados a los tallos confirma el papel potencial de esta especie en la fitoinmovilización de los metales pesados, particularmente en suelos alcalinos y neutros. De otro lado, Ehsan *et al.*, (2015) en un experimento con *Lupinus uncinatus* expusieron a las plantas a concentraciones crecientes de zinc (0, 30, 40 y 50 μ moles) y de cadmio (0, 3, 4 y 5 μ Moles) en un sistema hidropónico. Los resultados mostraron diferentes patrones de acumulación y distribución de metales en las partes de la planta, lo que sugiere diferentes mecanismos de tolerancia para cada metal. Las proporciones de hojastallos: raíz de zinc obtenidas en este experimento mostraron que *L. uncinatus* tenía el potencial de hiperacumular zinc. Los síntomas de toxicidad solo se observaron en el tratamiento con zinc más alto. Sin embargo, en el caso de cadmio, el comportamiento de la planta fue diferente. Aunque toleraba tratamientos con 3 y 4 μ moles de cadmio, No obstante, la mayor parte del cadmio fue acumulado en las raíces y el patrón de algunos nutrientes esenciales como K, Mg, Zn, Fe y Cu se alteraron. En base en estos hallazgos, concluyen que *L. uncinatus* puede considerarse como una especie candidato para la fitorremediación de sitios contaminados con metales. En un trabajo reciente, Jara *et al.* (2014) en las raíces de *Lupinus, ballianus* obtuvieron la más alta acumulación de cadmio, con una concentración de 287,3 mg kg⁻¹ MS con el tratamiento de 100% de relave de mina.

Ahora bien, en *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* los mayores valores de acumulación de plomo fueron obtenidos en las raíces con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 999,76 mg kg⁻¹ de Materia Seca, 656,15 kg⁻¹ MS y 559,56 78,2 mg kg⁻¹ MS de plomo, respectivamente, Estas especies andinas toleran la presencia de plomo en el relave de mina. En varios estudios realizados con *Lupinus* ha sido demostrado, en condiciones de estrés al

plomo las plantas sintetizan el malonil di aldehído y glutatión. En el trabajo realizado por García *et al.* (2017) con *Lupinus albus* cultivaron esta especie en hidroponía con concentraciones de 0, 90 y 180 mili moles de plomo divalente (Pb II) y añadiendo el quelante EDTA (etilén diamino tetra acético) durante 30 días. La distribución de plomo (proporción de brotes: raíces) fue de 0,34 y 0,46 para ambos tratamientos con plomo. En los brotes, no se detectaron disminuciones en la biomasa ni en los niveles de pigmentos fotosintéticos ni cambios en las concentraciones de malonil di aldehído y glutatión. En las raíces, el malonil dialdehído aumentó en un 20%, el glutatión en 2 a 3,6 veces y las concentraciones de fitoquelatinas de 4 a 5 veces. Esta alta tolerancia de *Lupinus albus* al plomo la convierte en una especie valiosa para la fitorremediación del suelo contaminado con plomo. De otra parte, Rodríguez *et al.* (2016) evaluaron el potencial de varios desechos industriales para inmovilizar metales en dos suelos contaminados derivados de una antigua mina de plomo y zinc. Utilizaron dos enfoques diferentes para evaluar el rendimiento de las diferentes enmiendas: uno químico, que utiliza la extracción con ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) y otro biológico, con *Lupinus albus*. Se utilizaron cuatro enmiendas: residuos de producción de azúcar inorgánico (espuma de azúcar), un lodo de tratamiento de agua potable (DWS). Las enmiendas probadas también fueron efectivas para reducir la biodisponibilidad de plomo y zinc en *L. albus*, lo que dio lugar a una disminución en la acumulación de los metales en los brotes por las plantas comparadas con las encontradas en el suelo de control. Esa disminución alcanzó hasta 5,6 y 2,8 veces para el plomo zinc, respectivamente, siendo estadísticamente significativa en la mayoría de los casos. Los resultados obtenidos mostraron que la tecnología propuesta es un medio viable para remediar los suelos mineros, ya que condujo a una disminución en la disponibilidad y toxicidad de los metales y, por lo tanto, facilitó el crecimiento de una capa de vegetación. De otro lado, Wichea *et al.* (2015) en un cultivo intercalado de avena (*Avena sativa* L.) con lupino blanco (*Lupinus albus* L.). Concluyen que el cultivo intercalado con lupino blanco al 11% podría ser una herramienta prometedora para la fitorremediación y la investigación fitoquímica, mejorando la movilidad de metales traza esencial, así como elementos con relevancia para fitorremediación de plomo y torio en el suelo.

De otra parte, en estudios realizados con especies de *Astragalus* realizados obtuvieron respuestas diferentes en referencia al trabajo realizado la especie de *Astragalus garbancillo*. Por ejemplo, Kirat & Nasuh (2015) evaluaron *Astragalus pycnocephalus* y *Verbascum euphraticum* especies que crecen en suelos con concentración de plomo entre 52,96 y 9909,13 mg kg⁻¹ y en concentración de zinc entre 115,1 a 10000 mg kg⁻¹. *Astragalus pycnocephalus* y *Verbascum euphraticum* fueron determinadas como especies indicadoras. Pero, en algunos lugares se determinaron como especies hiperacumuladores de plomo y zinc debido a los valores de concentración acumulados: concentraciones de plomo > 1000 mg kg⁻¹, de Zinc > 10000 mg kg⁻¹, los valores calculados de del factor de translocación para estos dos metales fueron mayor a 1, Igualmente, Akbar et al (2009) evaluando a las especies de *Ebenus stellata* y *Astragalus glaucanthus*, concluyeron que estas dos especies vegetales nativas toleraron y absorbieron altos niveles de metales, preferentemente en la biomasa aérea, lo que puede ser sugerido su uso en la fitorremediación de suelos contaminadas con cadmio y plomo en regiones áridas.

No obstante, en *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* los mayores valores de acumulación de zinc fueron también obtenidas en las raíces con el tratamiento de 100% de relave de mina, acumulando 993 mg kg⁻¹ de Materia Seca, 903,38 mg kg⁻¹ MS y 624,32 mg kg⁻¹ MS de zinc, respectivamente. De las tres especies evaluadas el mayor valor de zinc total fue obtenido por *L. ballianus* acumulando 1520,22 mg kg⁻¹ MS, los resultados indican que las especies evaluadas toleran concentraciones de zinc del relave de mina. En cambio, otras especies de *Lupinus* europeas estudiadas acumulan el zinc mayormente en las hojas y los tallos como en el caso de *Lupinus luteus*, la contaminación inducida de zinc en el suelo redujo el crecimiento y desarrollo de esta especie, una dosis de 300 mg kg⁻¹ de zinc en el suelo causó la marchitez de las plántulas. El compost y la bentonita redujeron la influencia negativa de la contaminación del zinc en el suelo en el rendimiento de *Lupinus luteus*, especialmente en las partes aéreas, (Wyszkowski & Modrzewska, 2015). De otro lado, Houben et al (2012) evaluando *Lupinus albus* e investigando simultáneamente los efectos de seis enmiendas (CaCO₃, polvo de hierro, cenizas,

estiércol, bentonita y harina de huesos) en la lixiviación y fitodisponibilidad de cadmio, zinc y plomo. La lixiviación de Cd y Zn se redujo con todas las modificaciones, principalmente debido al aumento de la alcalinidad, La lixiviación de plomo se vio fuertemente afectada por la liberación de carbono orgánico disuelto (DOC). Por lo tanto, los tratamientos con harina de huesos y estiércol, aumentaron altamente las concentraciones de DOC en los lixiviados, aumentaron las concentraciones medias de plomo en el flujo en 2, 3 y 16 veces, respectivamente, Sorprendentemente, el polvo de hierro indujo fuertes reducciones de lixiviación de cadmio y plomo, esta enmienda duplicó las concentraciones de cadmio y plomo en los brotes de *Lupinus albus*. Safronova *et al* (2012) estudiaron las poblaciones locales de las leguminosas como *Astragalus hamosus*, *Lotus edulis*, *Lotus ornithopodioides*, *Medicago ciliaris* y *Scorpiurus muricatus* de lugares contaminados con metales pesados y sin contaminación. La tolerancia de las especies a los metales pesados varió significativamente según la especie. Las especies *L. edulis*, *L. ornithopodioides* y *M. ciliaris* poseían la mayor tolerancia al zinc, cadmio y plomo. En cambio, *Cytisus scoparius* una especie arbustiva que desarrolla bien en suelos contaminados con zinc, especie una exclusor y con gran tolerancia al zinc, y que es capaz de fijar nitrógeno en los suelos. La fijación de nitrógeno podría facilitar la estabilización de la vegetación para promover el mantenimiento de la cobertura vegetal en suelos contaminados y pobres en nutrientes, como los suelos mineros (Diez, 2008).

5.6 Factor de bioconcentración y de transferencia de metales calculadas para las especies de *Lupinus* y *Astragalus*

5.6.1 Factor de bioconcentración y de transferencia de cadmio para *Lupinus* y *Astragalus*

Al realizar el análisis de varianza de los factores de bioconcentración y de transferencia de cadmio para *Lupinus ballianus* se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre los tratamientos de relave de mina. También, en el análisis de varianza del factor de bioconcentración de cadmio de *Lupinus condensiflorus* se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas

($p < 0,0001$) entre los tratamientos. No obstante, en el análisis de varianza para el factor de transferencia de cadmio de *L. condensiflorus*, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p = 0,4813$). Del mismo modo, en el caso de *Astragalus garbancillo* se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre los tratamientos relave de mina solamente para el factor de bioconcentración de cadmio de *A. garbancillo*. Sin embargo, en el análisis de varianza para el factor de transferencia de *A. garbancillo* no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p = 0,2367$).

De otra parte, en el análisis de separación de medias por la prueba de Tukey tanto en *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* se obtuvo diferencias para los factores de bioconcentración (FBC) y de transferencia (FT) de cadmio. Los mayor valores de los factores de bioconcentración y de transferencia de cadmio fue obtenido con el tratamiento de 100% de relave de mina (Tablas 40, 41, 42,43, 44 y 45, respectivamente). *Lupinus ballianus* obtuvo un alto valor del FBC de cadmio = 5,97, un valor de FT = 0,23. Del mismo modo, *Lupinus condensiflorus* obtuvo el valor del FBC de cadmio = 2,22, un valor de FT = 0,26. En el caso de *Astragalus garbancillo* obtuvo el valor del FBC de cadmio = 1,63, un valor de FT = 0,10.

5.6.2 Factor de bioconcentración y de transferencia de plomo para *Lupinus* y *Astragalus*

En el análisis de varianza de los factores de bioconcentración de plomo para *Lupinus ballianus* se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre los tratamientos de relave de mina. Por contrario, en el análisis de varianza del factor de transferencia de plomo para *Lupinus ballianus* no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p = 0,1236$). De otra parte, en el análisis de varianza del factor de bioconcentración de plomo para *Lupinus condensiflorus* se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) entre los tratamientos. No obstante, en el análisis de varianza para el factor de transferencia de plomo para *L. condensiflorus*, no se obtuvieron diferencias

estadísticamente significativas entre tratamientos ($p=0,0903$). En el caso de *Astragalus garbancillo* se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,0001$) entre los tratamientos de relave de mina para los factores de bioconcentración y de transferencia de plomo.

Por otra parte, en el análisis de la separación de medias por la prueba de Tukey tanto en *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* se obtuvo diferencias entre las especies para los factores de bioconcentración y de transferencia de plomo. Los mayores valores de los factores de bioconcentración y de transferencia de plomo en estas tres especies fueron obtenidos con el tratamiento de 100% de relave de mina (Tablas 46, 47, 48, 49, 50 y 51, respectivamente). Por consiguiente, *Lupinus ballianus* obtuvo un valor del FBC de plomo = 0,35, un valor de FT=0,23. De un modo similar, *Lupinus condensiflorus* obtuvieron el valor del FBC y de FT de plomo = 0,23. En el caso de *Astragalus garbancillo* obtuvo el valor del FBC de plomo = 0,20, y el valor de FT=0,28.

5.6.3 Factor de bioconcentración y de transferencia de zinc para *Lupinus* y *Astragalus*

En el análisis de varianza del factor de bioconcentración de zinc para *Lupinus ballianus* se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,0001$) entre los tratamientos de relave de min. Aunque, en el análisis de varianza del factor de transferencia de zinc de *Lupinus ballianus* no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p=0,050$). Por otra parte, en el análisis de varianza de los factores de bioconcentración y de transferencia de zinc para *Lupinus condensiflorus* se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,0001$) entre los tratamientos. Igualmente, en *Astragalus garbancillo* se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,0001$) entre los tratamientos de relave de mina para los factores de bioconcentración y de transferencia de zinc.

Asimismo, en el análisis de la separación de medias por la prueba de Tukey tanto en *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* se

obtuvieron diferencias entre las especies para los factores de bioconcentración y de transferencia de zinc. Los mayores valores de los factores de bioconcentración y de transferencia de zinc en estas tres especies fueron obtenidos con el tratamiento de 100% de relave de mina (Tablas 52, 53, 54, 55, 56 y 57, respectivamente). Por tanto, *Lupinus ballianus* obtuvo el valor del FBC de zinc = 0,26, un valor de FT=0,54. En ese sentido, *Lupinus condensiflorus* obtuvo el valor del FBC = 0,24 y el FT de zinc = 0,43. En el caso de *Astragalus garbancillo* obtuvo el valor del FBC de zinc = 0,14, y el valor de FT= 0,29.

Indudablemente, es necesario dar a conocer que el factor de bioconcentración (FB), también conocido como coeficiente de absorción biológica (CAB) o factor de acumulación (FA), Se define como el cociente de la concentración total de elementos en el tejido de las hojas y tallos (biomasa aérea y la concentración total de elementos del suelo en los relaves mineros (Brooks, 1998). El factor de translocación (FT), también conocido como el factor de transferencia, se define como el cociente de la concentración total de elementos en el tejido de los brotes, y la concentración total de elementos en el tejido de la raíz (Brooks, 1998). Estos dos factores son los dos índices importantes para evaluar la viabilidad de cualquier especie vegetal y sugerir su posible uso en la fitorremediación de metales pesados (Pandey, 2012). Las especies de plantas candidatas de para la fitoestabilización de los metales, no deberían translocar los metales a los tejidos de los brotes, y poder prevenir la exposición de la fauna silvestre y la contaminación de la superficie. Así, la relación de valores de la concentración de los metales del suelo, entre las concentraciones de metales en el tejido de la raíz deben tener valores menores a uno (>1) (Mendez & Maier, 2008). En trabajos realizados de los cálculos de los factores de bioconcentración (FB) y de translocación (FT), con especies de la familia de fabáceas obtuvieron los siguientes resultados: Así, por ejemplo, Maldonado-Magaña *et al.* (2011), en el estudio de la capacidad de tolerancia y acumulación de plántulas cultivadas *in vitro* de *Acacia farnesiana* al plomo, y expuestas con tratamientos de 250 y 500 y 1000 mg L⁻¹ de Pb²⁺. Las plántulas de *A. farnesiana* tratadas con 1000 mg L⁻¹ de Pb²⁺, acumularon valores $\geq 80\%$ del Pb²⁺, y obtuvieron un alto valor del factor de bioconcentración ($> 8,5$) y una

baja translocación ($\leq 0,03$). Los resultados indican la idoneidad de *A. farnesiana* para fines de la fitoestabilización del plomo. Asimismo, Rodríguez (2016), en la evaluación del riesgo de acumulación de metales pesados en *Prosopis laevigata*, observaron una mayor acumulación de metales en los tejidos de las raíces que en los tallos, siendo el plomo y el níquel los metales que presentaron el mayor valor de bioconcentración en los tallos (785 mg kg^{-1} de Pb y 734 mgkg^{-1} de Ni). Por otro lado, el plomo mostró los mayores valores de bioacumulación (FB), $\text{FB}=15,71$, Por otro lado, el cadmio es el metal con mayor capacidad de translocarse de la raíz a la parte aérea solamente cuando el cadmio está presente solo.

Tabla 40. Factor de bioconcentración de cadmio para *Lupinus ballianus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|---|---|
| 100 | 5.97 | 5 | A |
| 60 | 3.38 | 5 | B |
| 30 | 0.19 | 5 | C |
| 0 | 0.01 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | 1.5 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 41. Factor de transferencia de cadmio para *Lupinus ballianus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|---------|---|---|
| 100 | 0.23 | 5 | A |
| 60 | 0.03 | 5 | B |
| 30 | 0.00023 | 5 | B |
| 0 | 0.02 | 5 | B |
| Diferencia mínima significativa | 0.007 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 42. Factor de bioconcentración de cadmio para *Lupinus condensiflorus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|----------|---|---|
| 100 | 2.22 | 5 | A |
| 60 | 0.62 | 5 | B |
| 30 | 0.06 | 5 | C |
| 0 | 1.30E-03 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | 0.1 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 43. Factor de transferencia de cadmio para *Lupinus condensiflorus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|---|---|
| 100 | 0.26 | 5 | A |
| 60 | 0.14 | 5 | A |
| 30 | 0.11 | 5 | A |
| 0 | 0.29 | 5 | A |
| Diferencia mínima significativa | 0.39 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 44. Factor de bioconcentración de cadmio para *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|----------|---|---|
| 100 | 1.63 | 5 | A |
| 60 | 0.33 | 5 | B |
| 30 | 0.07 | 5 | C |
| 0 | 2.00E-03 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | 0.1 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 45. Factor de transferencia de cadmio para *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|---|---|
| 100 | 0.1 | 5 | A |
| 60 | 0.31 | 5 | A |
| 30 | 0.3 | 5 | A |
| 0 | 0.23 | 5 | A |
| Diferencia mínima significativa | 0.31 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 46. Factor de bioconcentración de plomo para *Lupinus ballianus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|---|---|
| 100 | 0.35 | 5 | A |
| 60 | 0.14 | 5 | B |
| 30 | 0.16 | 5 | B |
| 0 | 0.01 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | 0.08 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 47. Factor de transferencia de plomo para *Lupinus ballianus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|---|---|
| 100 | 0.16 | 5 | A |
| 60 | 0.12 | 5 | A |
| 30 | 0.16 | 5 | A |
| 0 | 1.8 | 5 | A |
| Diferencia mínima significativa | 2.4 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 48. Factor de bioconcentración de plomo para *Lupinus condensiflorus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|---|---|
| 100 | 0.24 | 5 | A |
| 60 | 0.11 | 5 | B |
| 30 | 0.08 | 5 | B |
| 0 | 0.02 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | 0.03 | | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 49. Factor de transferencia de plomo para *Lupinus condensiflorus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|------|---|
| 100 | 0.23 | 5 | A |
| 60 | 0.07 | 5 | A |
| 30 | 0.11 | 5 | A |
| 0 | 0.25 | 5 | A |
| Diferencia mínima significativa | | 0.23 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 50. Factor de bioconcentración de plomo para *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|----------|------|---|
| 100 | 0.2 | 5 | A |
| 60 | 0.1 | 5 | B |
| 30 | 0.07 | 5 | C |
| 0 | 2.30E-03 | 5 | D |
| Diferencia mínima significativa | | 0.01 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 51. Factor de transferencia de plomo para *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|------|---|
| 100 | 0.28 | 5 | B |
| 60 | 0.92 | 5 | A |
| 30 | 0.11 | 5 | C |
| 0 | 0.03 | 5 | D |
| Diferencia mínima significativa | | 0.12 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 52. Factor de bioconcentración de zinc para *Lupinus ballianus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|------|---|
| 100 | 0.26 | 5 | A |
| 60 | 0.2 | 5 | B |
| 30 | 0.12 | 5 | C |
| 0 | 0.05 | 5 | D |
| Diferencia mínima significativa | | 0.06 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 53. Factor de transferencia de zinc para *Lupinus ballianus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|-----|---|
| 100 | 0.54 | 5 | A |
| 60 | 0.29 | 5 | A |
| 30 | 0.27 | 5 | A |
| 0 | 0.41 | 5 | A |
| Diferencia mínima significativa | | 0.3 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 54. Factor de bioconcentración de zinc para *Lupinus condensiflorus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|------|---|
| 100 | 0.24 | 5 | A |
| 60 | 0.11 | 5 | B |
| 30 | 0.08 | 5 | B |
| 0 | 0.02 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | | 0.03 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 55. Factor de transferencia de zinc para *Lupinus condensiflorus*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|-----|---|
| 100 | 0.43 | 5 | B |
| 60 | 0.42 | 5 | B |
| 30 | 0.29 | 5 | B |
| 0 | 1.69 | 5 | A |
| Diferencia mínima significativa | | 0.3 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 56. Factor de bioconcentración de zinc para *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|-------|---|
| 100 | 0.14 | 5 | A |
| 60 | 0.17 | 5 | A |
| 30 | 0.08 | 5 | B |
| 0 | 0.02 | 5 | C |
| Diferencia mínima significativa | | 0.025 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 57. Factor de transferencia de zinc para *Astragalus garbancillo*.

| Tratamientos de relave mina (%) | Medias | n | |
|---------------------------------|--------|------|-----|
| 100 | 0.29 | 5 | A B |
| 60 | 0.25 | 5 | B |
| 30 | 0.32 | 5 | A B |
| 0 | 0.36 | 5 | A |
| Diferencia mínima significativa | | 0.01 | |

Valores con la misma letra en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0,05$).

VI. CONCLUSIONES

- a. En las semillas de las tres especies tratadas con escarificación mecánica de lijado de la testa e inducidas en oscuridad, se observó una mayor germinación, obteniendo 18,2 semillas germinadas en *Lupinus ballianus*, 17,8 en *L. condensiflorus* y 19,8 con *Astragalus garbancillo*, respectivamente. Asimismo, la escarificación de la testa de las semillas en las tres especies promovieron una alta emergencia de plántulas en el sustrato, y la mayor emergencia de plántulas fue obtenido en *Astragalus garbancillo*.
- b. El mayor contenido de humedad en semillas fue registrado en *Astragalus garbancillo*.
- c. La longitud de planta, el número de hojas y la producción de biomasa en las tres especies disminuyó significativamente con el tratamiento de 100% de relave de mina. En consecuencia, los mayores valores de crecimiento vegetativo fueron obtenidos con el tratamiento de control negativo.
- d. En las tres especies se obtuvo una alta correlación positiva entre los contenidos de cadmio, plomo y zinc en el tejido de las raíces y las concentraciones totales de cadmio, plomo y zinc.
- e. En *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y en *Astragalus garbancillo* los mayores valores de acumulación de cadmio total, plomo total, zinc total; y el contenido de los tres metales en las raíces, fueron obtenidos con el tratamiento de 100% de relave de mina.
- f. En las tres especies estudiadas los valores del factor de bioconcentración y de transferencia para plomo y zinc fueron menores a uno, pero el factor de bioconcentración de cadmio fue mayor a uno.
- g. *Lupinus ballianus*, *Lupinus condensiflorus* y *Astragalus garbancillo* son fitoestabilizadores de cadmio, plomo y zinc.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar el análisis químico de los sustratos utilizados (mezclas de suelo y de relave de mina) en los experimentos luego de haber terminado el experimento, y poder calcular cuanto de metales pesados quedaron en los sustratos en referencia a los metales que fueron absorbidos y acumulados en los tejidos de las las plantas de estas tres especies evaluadas, que por falta de presupuesto no se pudo realizar estos análisis.
- Llevar acabo ensayos pilotos de siembra de semillas escarificadas *in situ* y/o el transplante de plántulas de especies de *Lupinus* y *Astragalus* en suelos contaminados con metales pesados, y constatar la fitorremediación *in situ* de estas especies leguminosas de aquellos suelos contaminados con metales.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Kader, A.I & R.J. Bayer. 1999. Phylogenetic relationships in *lupines* (Fabaceae: Papilionoideae) based on Internal transcribed spacer sequences (its) of Nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 86(4): 590-607.
- Acosta-Percástegui, J., D.A. Rodríguez-Trejo. 2005. Factors affecting germination and pregerminative treatments of *Lupinus montanus* seeds. *Interciencia*, 30(9): 576-579.
- Adriano, D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. 2nd Edition, Springer-Verlag, New York, Berlin Heidelberg.
- Ahluwalia, S.S., D. Goyal. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater, *Biores, Technol* 98:2243-2257.
- Ailstock, M.S., D.J. Shafer, & A.D. Magoun. 2010. Effects of planting depth, sediment grain size, and nutrients on *Ruppia maritima* and *Potamogeton perfoliatus* seedling emergence and growt. *Restoration Ecology*. 18(4): 574–583.
- Akbar, A., S. Sinegani & F.S. Dastjerdi. 2008. The potential of Irankoh indigenous plant species for the phytoremediation of cadmium and lead contaminated. *Land, Soil & Sediment Contamination*, 17 (2): 181-188, doi: 10.1080/15320380701873124.
- Akbar, A., S. Sinegani & F.S. Dastjerdi. 2009. The Accumulation of zinc and nickel in Irankoh 8ndigenous plant species on a contaminated land. *Soil and Sediment Contamination*; 18:4 (1): 525-534, doi: 10.1080/15320380902978953.
- Alderete-Chávez, A. D.A. Rodríguez-Trejo, V. Espinosa-Hernández, E. Ojeda-Trejo & N. Cruz-Landero. 2010. Effects of different scarification treatments on the germination of *Lupinus leptophyllus* seeds. *International Journal of Botany*; 6(1): 64-68.
- Alkorta, I., J. Hernández-Allica, JM. Becerril, I. Amezaga, I. Albizu, C. Garbisu. 2000. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc and cadmium, and arsenic. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol*; 3(1): 71-90.
- Alkorta, I., J. M. Becerril & C. Garbisu. 2010. Phytostabilization of metal contaminated soils. *Reviews on Environmental Health*; 25(1):135–146.
- Alarcón, A.C. 1994. Contaminación Minero Metalúrgica del Lago Chinchaycocha y del río Mantaro, Instituto para el Desarrollo de la Pesca y la Minería. IPEMIN, La Oroya, Perú.

Alderete-Chavez, A., H.V. Espinosa, T.E. Ojeda, M. Ehsan, M.J. Perez, A.V.M. Cetina, T.D.A. Rodríguez & L.N. De La Cruz. 2008. Natural distribution and principal characteristics of *Lupinus* in the oriental face of Tlaloc mountain in Sierra Nevada, Mexico; *J Biol Sci* 8(3): 604-609.

Alex-Alan, F.D.A., R.R. Valle, M.S. Mielke & P. Gomes. 2007. Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr; *Bra. J. Plant. Physiol.* 19(2):83-98.

Alloway, B.J. 1995. Cadmium In: Heavy metals in soils, Blackie Academic and Professional. London, pp:123-151.

Azcón-Bieto, J y M. Talón. 2000. Fundamentos de fisiología Vegetal, Edit. McGraw-Hill, Barcelona, España, 522 p.

Azcón-Bieto, J y M. Talón. 2008. Fundamentos de fisiología Vegetal, McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid, España, 651 p.

Baldeón, S., M. Flores y J. Roque. 2006. Fabaceae endémicas del Perú. *Rev. Per. Biol.* Número especial 13(2): 302s - 337s (diciembre 2006). El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. Edic. Blanca León *et al.*, © Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM.

Baker, A. & J.M. Proctor. 1990. The influence of cadmium, copper, lead and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles; *Plant Systematics and Evolution*; 173 (1): 91-108.

Baker, A., J.M. McGrath, S.P. Reeves, R.D. Smith, J.A.C. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. En: Terry, N, & Bañuelos, G.S, (eds.), "Phytoremediation of Contaminated Soil and Water". Pp. 85-108, Lewis Publishers, Boca Raton, USA.

Barney D., V.E. 2011. Biodiversidad y ecogeografía del género *Lupinus* (Leguminosae) en Colombia. Tesis para obtener el Grado Académico de Magister en Ciencias Biológicas línea de Recursos Fitogenéticos Neotropicales. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Colombia, 69 p.

Baskin, C.C. & J. M. Baskin. 2014. Seeds: Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego, USA.

Baskin, J. M. & C.C. Baskin. 2008. Some considerations for adoptions of Nikolaeva's system in to seed dormancy classification. *Seed Science Research*, 18:131-137.

Baskin, J. M. & C.C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14:1-16.

Baskin, J. M. & C.C. Baskin. 2003. Classification, biogeography, and phylogenetic relationships of seeds dormancy, En Smith, R.D. et al. Edc., *Seeds conservation: turning science into practice*, Kew: Royal Botanic Gardens, Cap. 28, pp.518-544.

Baskin, C.C. & J. M. Baskin. 1998. *Seeds: Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination*. Academic Press, San Diego, USA.

Breckle, S. 1991. Growth under stress: heavy metals, En: Waisel, Y. Eshel, A., Kafkaffi, V (eds.). *Plant roots: the hidden half*, pp. 351-37. Marcel Dekker. Inc., New York.

Brako, M.L. & J.L. Zarucchi. 1993. *Catologue of the Flowering Plants and Gymnospermes of peru*. Monographs in systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol 45, Missouri Botanical Garden.

Becerril, J.M., O. Barrutia, J.I. García Plazaola, A. Hernández, J.M. Olano, C. Garbisu. 2007. *Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación*. *Ecosistemas*; 16 (2): 50-55.

Bernal, M., R. Clemente, S. Vásquez y D.J. Walker. 2007. *Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar*. *Ecosistemas*; 16 (2): 67-72.

Brooks, R.R. 1997. *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals*, CAB International. Oxon, United Kingdow.

Brooks, R.R. 1998. *Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining*. CAB International, Wallingford, United kingdow.

Brooks, R.R., J. Lee, R.D. Reeves, RT. Jaffré. 1977. Detection of metalliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration*; 7(1): 49-77.

Brunetti, G., P. Soler-Rovira, K. Farrag & N. Senes. 2009. Tolerance and accumulation of of heavy metals by wild plants species grown in contaminated soils in Apulia region, Southern Italy. *Plant Soil*, 318(1): 285-298.

Camacho, F. 2011. *Dormición de semillas, causas y tratamientos*. Edit. Trillas S.A de C.V. DF, México, 232 p.

Carpaena, R.O. & M.P. Bernal., 2007. *Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos*. *Ecosistemas*; 16(2):1-3.

Carrillo F., E. 1970. Las Leguminosas del Valle del Rímac, Tesis para optar el Grado Académico de Bachiller. Programa Académico de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Castañeda, S. L., A.E. Garzón, Cantillo, M.A., M.P. Torres & L.J. Silva. 2006. Análisis de la respuesta de ocho especies nativas del bosque alto andino ante dos métodos de propagación, *Colombia Forestal*; 10(20): 79-90.

Castaldi, P., L. Santona, P. Melis. 2005. Heavy metal immobilization by chemical amendments in a polluted soil and influence on white lupin growth. *Chemosphere*; 60 (3):365-371. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.098>.

Catalán, L., M. Balzarini. 1992. Improved laboratory germination condition for several arboreal *Prosopis* species: *P. chilensis*, *P. flexuosa*, *P. nigra*, *P. alba*, *P. caldenia* and *P. affinis*. *Seed Sc. Technol*; 29 (1): 293-298.

Cobbett C., & P. Goldsbrough. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53 (1):159-182.

Corona Mora, A., M. Gómez Romero & R.A. Lindig Cisneros. 2007. Efecto de la escarificación y la calidad de la luz en la germinación de *Lupinus elegans*. *Biológicas* 9(1): 47-54.

Cui, S., Q. Zhou and L. Chao. 2007. Potential hyper-accumulation of Pb, Zn, Cu and Cd in enduring plants distributed in an old smeltery, northeast China. *Environmental Geology*; 51(1): 1043-1048.

Cunningham, D., S. William, B. Jianwei & W. Huang. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Science*. 13:393-397.

Clements, J.C., M. Dracup, B.J., Buirchell & C.G. Smith. 2005. Variation for seed coat and pod wall percentage and other traits in a germplasm collection and historical cultivars of lupins, *Australian Journal of Agricultural Research*; 56(1): 75-83.

Chaney, R.L. 1983. Plant uptake of inorganic waste constituents. In: Parr, J.F., Marsh, P.B. Kla. J.M. (eds.) *Land treatment of hazardous wastes*. pp. 50-76, Park Ridge. NJ, USA: Noyes Data Corporation.

Davis, T., D.S.W. George, A. Upadhaya and J.M. Parsons. 1991. Improvement of seedling emergence of *Lupinus texensis* following seed scarification treatments. *J. Environ. Hort.* 9:17-21.

Dary, M., M.A. Chamber-Pérez, A.J. Palomares & E. Pajuelo. 2010. "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials* 177(3):323-330.

Dary, M. 2015. La simbiosis rizobio-leguminosa como bioherramienta para la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados, Tesis para optar el Grado Académico de Doctor en Biología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. España, Sevilla, 147 p.

De La Cruz-Landero, N., V.E. Hernández, E. Guevara, M.A. López, A.T. Santos, E. Ojeda-Trejo & A. Alderete-Chavez. 2010. *Lupinus versicolor* response in soils contaminated with heavy metals from a petroleum extraction field. J. Applied Sci; 10 (1): 694-69.

De La Cruz-Landero, N. 2010. Especies de leguminosas como fitorremediadoras en suelos contaminados, Tesis para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencia. Colegio de Postgraduados, Estado de México, México, 123 p.

Diez, F.J. 2008. Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados, Evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas, Tesis Doctoral. Universidad Santiago de Compostela. España, 331 p.

Duffus, J.H., 2002, Heavy metals, ¿a mean ingless term? Pure Appl. Chem; 74(1): 793-807.

Dunn, D.B. 1984. Cytotaxonomy and distribution of the New World lupin species, Proceedings of the Third International Lupin Conference, June 4-8, 67-85. La Rochelle, France.

Durhanm, S. 2004. Una planta delicada puede limpiar suelos contaminados por cadmio. En: Agricultural Research Service. pp, 1-2 USA.

Eastwood, R and C. Hughes. 2008. Origen of Domestication of *Lupinus mutabilis*, In the Andes in: J.A. Palta and Berger (Eds.) "Lupins for Health and wealt.

Ehsan, M., K. Santamaría-Delgado, A. Vázquez-Alarcón, A. Alderete-Chavez, N. De La Cruz-Landero, D. Jaén-Contreras & A. Molumeli. 2009. Phytostabilization of cadmium contaminated soils by *Lupinus uncinatus* Schdl. Journal of Agricultural Research; 7(2): 390-397.

Ehsan, M., F.M. Lara Viveros, V. E. Hernández, M.A. Barakat, A. R. Ortega, A.V. Maza & J.V. Monte. 2015. Zinc and cadmium accumulation by *Lupinus uncinatus* Schdl, grown in nutrient solution; Int. J. Environ. Sci. Technol. 12 (1): 307-316.doi 10.1007/s13762-013-0456-0.

Elliott, H.A., M.R. Liberati & CP. Huang. 1986. Competitive adsorption of heavy metals by soils; J. Environ. Qual.15:214-217.

Ernst, W.H.O. 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soil by plants; Applied Geochemistry. 11: 163–167.

Estévez, J., M.L. Andrade, P. Marcet y M.J. Montero. 2000. Fijación y movilidad de cadmio y zinc en tres tipos de suelos ácidos de Galicia, España. *Ciencia del Suelo*; 18(1):28-35.

Forcella, F. R.L. Benech, R. Sánchez, C.M. Ghersab. 2000. Modeling seedling emergence. *Field Crops Research*; 67 (2):123-139. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(00\)00088-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(00)00088-5).

Forget, P.M. & D. Wenny. 2005. How to elucidate seed fate? A review of methods used to study seed removal and secondary seed dispersation. In P.M. Forget, J. E. Lambert, P. E. Hulme & S.B. Vander Wall (Eds.). *Seed fate: Predation, dispersal and seedling establishment* (pp. 379–394), Wallingford, UK. CABI Publishing.

Flores, M. 1997. La familia leguminosae en el valle del Chillón-Parte media y alta, Tesis para optar el Grado Académico de Magister en Botánica Tropical, UNMSM, 102 p, Lima, Perú.

Galíndez, G., G. Malagrina, D. Ceccato, T. Ledesma, L. Lindow-López y P. Ortega-Baes. 2015. Dormición física y conservación ex situ de semillas de *Amburana cearensis* y *Myroxylon peruiferum* (Fabaceae); *Bo. Soc. Argent. Bot.* 50 (2): 153-161.

García, S., P. Zornoza, L. E. Hernández, E. Esteban & R.O. Carpena. 2017. Response of *Lupinus albus* to Pb-EDTA indicates relatively high tolerance. *Toxicological & Environmental Chemistry*; 99 (9-10):1378-1388, doi 0.1080/02772248.2017.1387263.

Gerhardt, K.E. X.D. Huang, B.R. Glick and B.M. Greenberg. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges; *Plant Sci.* 176(1): 20-30.

Glass, D.J. 2000. Economical potential of phytoremediation, In: Raskin I, Ensley B.D (eds). *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*, pp.15-31. John Wiley & Sons, New York.

Gold, K., P. León-Lobos y M. Way. 2004. Manual de recolección de semillas de plantas silvestres para conservación a largo plazo y restauración ecológica. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación Intihuasi. La Serena, Chile, Boletín INIA N° 110, 62 p.

Gómez-Sagasti, M.T., I. Alkorta, J.M. Becerril, L. Epelde, M. Anza & C. Garbisu. 2012. Microbial Monitoring of the Recovery of Soil Quality During Heavy Metal Phytoremediation *Water Air Soil Pollut*; 223:3249–3262, doi 10.1007/s11270-012-1106-8.

Gómez-Sosa. E. 1979. Las especies sudamericanas del género *Astragalus* (Leguminosae) las especies patagónicas argentinas. *Darwiniana*; 22: 313-376.

Gomez-Sosa, E. 2010. Nueva especie del género *Astragalus* (Leguminosae, Galegeae) para Perú; Darwiniana. 48(2): 175-178.

Gupta, U., S.C. Gupta. 1998. Trace element toxicity relationships to crop production and livestock and human health: implications for management. *Commum. Soil Sci. Plant Anal*; 29(1): 1491-1522.

Gupta, D.k. H.G. Huang & F.J. Corpas. 2013. Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res*; 20 (1):2150-2161, doi 10.1007/s11356-013-1485-4.

Harper, J. 1977. *Population Biology of Plant*. Academic. London, England.

Hazrat, A. L. Khan & M.A. Sajad. 2013. Phytoremediation of heavy metals. Concepts and applications; *Chemosphere* 91 (1): 869-881.

Hanumanth K., G., & J. Pramoda J. 2015. Heavy metal lead influative toxicity and its assessment in phytoremediating plants--A review. *Water, Air and Soil Pollution*; 226 (10): 1-11. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-015-2547-7>.

Houben, D., J. Pircar, P. Sonnet. 2012. Heavy metal immobilization by cost-effective amendments in a contaminated soil: Effects on metal leaching and phytoavailability, *Journal of Geochemical Exploration*; 123 (1): 87-94, doi, 2011.10.004G <https://doi.org/10.1016/j.gexplo>.

Hosokawa, J., D. Wick & T. Luna. 2001. Propagation protocol for production of container *Lupinus sericeus* Pursh, plants (172 ml containers); Glacier Natl. Park. West Glacier. MT. *In: Native Plants Network*, <http://www.nativeplantnetwork.org> (accessed Aug, 28, 2002), Moscow, ID: Univ,of Idaho, College of Natural Resources, For, Res, Nursery.

ISTA. 2005. *International Rules for Seed Testing*. Edición 2005. International Seed Testing Association. Bassersdorf, Suiza.

Jara-Peña, E., J. Gómez, H. Montoya. M. Chanco, M. Mariano & N. Cano. 2014. Capacidad fitorremediadora de cinco especies altoandinas de suelos contaminados con metales pesados, *Revista peruana de biología*; 21(2): 145-156, doi: <http://dx.do.org/10.15381/rpb.v21i2.9817>.

Jia, W.S. L.V.J. Feng, J. Yinxin & S. Li. 2016. Morphophysiological characteristic analysis demonstrated the potential of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in the phytoremediation of cadmium-contaminated soils. *Environ Sci Pollut Res.*; 23(1):18823-18831. doi 10.1007/s11356-016-7083-5.

Jinadasa, K.B., P.N. Milham, P.J. Hawkins, C.A. Cornish, P.S. Williams, P.A. Kaldor, C.J. Conroy, J.P. 1997. Survey of Cadmium levels in vegetables and soils of Greater Sydney, Australia. *Journal Environmental Quality*; 26(1): 924-933.

Jones, T.A., D.A. Johnson, D.S. Bushman, K. Connors, R.C. Smith. 2016. Seed Dormancy Mechanisms in Basalt Milkvetch and Western Prairie Clover. *Rangeland Ecology and Management*; 69 (2): 117-122.

Kabata-Pendias, A. & H. Pendias. 1992. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton. USA, 342 p.

Kabata-Pendias, A., W. Sadurski. 2004. Trace elements and compounds in soil, In: Elements and Their compounds in the Environment, 2nd eds, E. Merian, M. Anke, M. Ihnat, M. Stoepler. 79-99. Wiley-VCH. Weinheim.

Kabata-Pendias, A. 2011. Trace elements in soils and plants, 4th edi. RC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida, USA, 505 p.

Karaca, O., C. Cameselle & K.R. Reddy. 2018. Mine tailing disposal sites: contamination problems, remedial options and phytocaps for sustainable remediation, *Rev Environ Sci Biotechnol*. 17:205–228, <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9453-y>.

King, L.D. 1988. Retention of metals by several soils of the southeastern United States. *J. Environ. Qual.* 17(1):239-246.

Kirat, G., A. Nasuh. 2015. Pb-Zn Accumulation in Plants Grown in and Around a Pb-Zn Mine. *Pol. J. Environ. Stud.* 24 (2):545-554.

Kunz, M., J. Randall, G. Janet. B. W.A. Wall, M.G. Hohmann & G. Matthew. 2016. Germination and propagation of *Astragalus michauxii*, a rare southeastern US endemic legume, *Native Plants Journal*; 17(1): 47-58.

Koptsik, G.N. 2014. Problems and Prospects Concerning the Phytoremediation of Heavy Metal Polluted Soils. *Eurasian soil science*; 47(9):923-939.

Khurana, E. & J. Singh. 2001. Ecology of seed and seedling growth for conservation and restoration of tropical dry forest: a review. *Environmental Conservation*; 28(01): 39-52.

La Dou, J. 1999. *Medicina Laboral y Ambiental*, 2^a, Edición, México: Edit, El Manual Moderno, 456 p.

Lara-Rivera, A.H., M.A. Ruiz-Lopez, R. Rodríguez-Macias, C. Soto-Velasco, P.M. Garcia-López, L. Barrientos-Ramirez, J.F. Zamora-Natera. 2017. Grain yield, and chemical and protein composition of *Lupinus angustifolius* varieties grown in Mexico. *Phyton*; 86(1): 89-96.

Lasat, M.M. 2002. Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality*; 31(1): 109-120.

Lasat, M. A.J.M Baker, L.V. Kochian.1998. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*; 118: 875-883.

Lock, J.M. y K. Simpsom.1991. Legumes of West Asia: A Check-list, Royal Botanic Gardens, Kew. United Kingdom.

Llugany, M., R. Tolrà, C. Poschnrieder, J. Barceló. 2007. Hiperacumulación de metales: ¿una ventaja para la planta y para el hombre? *Ecosistemas*; 16 (2):1-6.

Mackay, W.A., TD, Davis & D. Sankhla. 1995. Influence of scarification and temperature treatments on seed germination of *Lupinus havardii*. *Seed Sci. Technol.* 23:815-821.

Mackay, W.A. T.D. Davis, D. Sankhla & D.E. Rimenschneider. 1996. Factors influencing seed germination of *Lupines perennis*. *J. Environ. Hort.* 14(4):167-169.

Maldonado, M.A., T.E. Favela. C.F. Rivera & S.T.L. Volke. 2011. Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. *Plant and Soil*; 339(1): 377-389.

Malik, R.N. S.Z. Husain & I. Nazir. 2010. Heavy metal contamination and accumulation in soil and wild plant species from industrial area of Islamabad, Pakistan. *Pak. J. Bot.* 42 (1): 291-301.

Martínez, D., A. Rodríguez-Trejo, E. Guizar-Nolazco, R. Bonilla-Beas. 2008. Escarificación artificial y natural de la semilla de *Lupinus bilineatus* Benth. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*; 14(2):73-79.

Martínez García, F., V. Martínez Fernandez, E. Bermejo. 2010. *Astragalus gines-lopezii*, In: Banares, A., G. Blanca, J. Gimenez, J.C. Moreno, S. Ortiz editor. Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España, Adenda 2010, Madrid, Dirección General del Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino)-Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas, pp. 58-59.

Martínez-Alcalá, I., R. Clemente & M.P. Bernal. 2009. Metal availability and chemical properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. growing in a high metal calcareous soil. *Water Air Soil Pollut*; 201:283-293.

Martínez-Alcalá, I., D.J. Walker & M.P. Bernal. 2010. Chemical and biological properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. alter soil heavy metal fractionation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 76(4): 595-602.

Mendelsohn, I.A., K.L. McKee & T. Kong. 2001. A comparison of physiological indicators of sublethal cadmium stress in wetland plants. *Environ. Exp. Bot.* 46:263-275.

Mendez, M.O and R.M. Maier. 2008. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments an emerging remediation technology. *Environ Health Perspect*; 116 (2): 278-283.

Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus & C. Boivin-Masson. 2001. Nodulation of legumes by members of the β subclass of Proteobacteria. *Nature*; 411: 948-950.

Mostacero, J. F.R. Mejía y O.A. Gamarra. *Fanerógamas del Perú, Taxonomía, utilidad y ecogeografía*. Primera edición. CONCYTEC. Lima, Perú.

Mukhopadhyay, S., S.K. Maiti. 2010, Phytoremediation of metal enriched mine waste: a review. *Global J. Environ. Res*, 4 (1): 135-150.

Murdoch, A. 2014. Seed dormancy, In *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities*. pp 151-178 CAB International, edited by Robert S. Gallagher, 3rd ed, United Kingdom.

Oliver. M.A. 1997. Soil and human health: a review. *European Journal of Soil Science*. 48 (1): 573-592.

Orchard, C., P. León-Lobos, & R. Ginocchio. 2009. Phytostabilization of massive mine wastes with native phylogenetic resources: potential for sustainable use and conservation of the native flora in north-central Chile. *Cien. Inv. Ag.* 36(3):329-352.

Ortega-David, E., A. Rodríguez, A. David & A. Zamora-Burbano. 2010. Characterization properties of lupin (*Lupinus mutabilis*) seeds grown in the Colombian Andean región. *Acta Agronómica*; 59 (1): 111-118.

Pastor, J.A., J. Hernández, N. Prieto & M. Fernández-Pascual. 2003. Accumulating behavior of *Lupinus albus* L, growing in a normal and a decalcified calcic luvisol polluted with Zn. *Plant Physiol.* 160(1): 1457-1465.

Patanè, C & F. Gresta. 2006, Germination of *Astragalus hamosus* and *Medicago orbicularis* as affected by seed-coat dormancy breaking techniques. *Journal of Arid Environments*; 67(1):165-173.

Patra, M., N. Bhowmik, B. Bandopadhyay & A. Sharma. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 52:199-223.

Pablo-Pérez, M., C. Lagunés-Espinoza, J. López-Upton, J. Ramos-Juárez y E. M, Aranda-Ibáñez. 2013. Morfometría, germinación y composición mineral de semillas de *Lupinus silvestre*. *Bioagro*; 25(2): 101-108.

Pagliano, C., M. Raviolo, F. Dalla. R. Vecchia, C. Gabbrielli, N. Gonnelli, R. Rascio, N. Barbato & N. La Rocca. 2006. Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.). *J Photochem Photobiol*; 84 (1): 70-78.

Pajuelo, E., J.A. Carrasco, L.C. Romero, M.A. Chamber, and C. Gotor. 2007. Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes, Regulation of the expression of O-acetylserine- (thiol)-lyase under metal stress. *Plant Biol.* 9(1): 672-681.

Pandey, V. 2012. Phytoremediation of heavy metals from fly ash pond by *Azolla caroliniana*. *Ecotox. Environ. Saf.* 82 (1): 8-12.

Pérez, G., M. Pita Villamil. 2001. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Hojas Divulgadoras No. 2112 H. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España, 11 p.

Pérez-Suárez, B. 2011. Observaciones sobre la germinación de tres especies del género *Citharexylum* Jacqm empleadas en restauración ecológica. *Colombia Forestal* 14(2):137-143.

Prasad, M.N. & H.M.O. Freitas. 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Journal of Biotechnology.* 6(3):285-321.

Porta, J., M. López-Acevedo y R.M. Poch. 2013. Edafología, uso y protección de suelo. Mundi-Prensa. España, 608 p.

Rao, N.K., J. Hanson, M.E. Dullo, K. Ghosh, D. Novell and M. Larinde. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma, Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Biodiversity Internacional, Roma, Italia, 165 p.

Rascio, N., F. Navari-Izzo. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: ¿How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* 180(1): 169-181.

Rivera, H., J. Chira, M. Campián & F. Cornelio. 2007. Análisis correlacionar y evolutivo de los metales pesados en sedimentos del río Santa entre Huaraz-Carhuaz, Departamento de Ancash. *Revista del Instituto de Investigaciones*; 11(2):19-24.

Robles-Díaz, E., M. Jurado, L. Ruiz-López, A. Yáñez-Espinoza & J. Flores. 2014. Heat shock effect in breaking physical dormancy in seeds of *Lupinus elegans* and *L. Rotundiflorus* from Jalisco, Mexico. *Botanical Sciences*; 92 (1): 123-129.

Rodríguez, E. 2016. Riesgo de acumulación de metales pesados por *Prosopis laevigata*, especie forrajera, Tesis para obtener el título de Químico en Alimentos, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

Salt, D.E. R.D. Smith & Y. Raskin.1998. Phytoremediation. In: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol Biol.* 49: 643- 668.

Sanita Di Toppi, L. & R. Gabrielli. 1999. Responses to cadmium in higher plants, *Environ Exp Bot* 41:105-130.

Safronova, V.I, G. Piluzza, Y. Nadezhda, A. Zinovkina, K. Kimeklis, A. Belimov & S. Bullitta. 2012. Relationships between pasture legumes, rhizobacteria and nodule bacteria in heavy metal polluted mine waste of SW Sardinia. *Symbiosis*; 58(1-3): 21-26, doi; 10.1007/s13199-012-0207-x.

Severo Baldeón, Mercedes Flores & José Roque. 2006. Fabaceae endémicas del Perú, *Rev, peru, biol*, Número especial; 13(2): 302-337.

Severns, P.M. 2008. Seedling population size and microhabitat association in *Lupinus oreganus* A. Heller var. *kincaidii* C.P, Sm. (Fabaceae), a threatened plant of western Oregon grasslands. *Native Plants Journal* 9(3):358–365.

Souza, V.L. 2007. Expressão gênica, respostas morfo-fisiológicas e morte celular induzidas por cádmio em *Genipa americana* L, (Rubiaceae). Ilhéus. Universidade Estadual de Santa Cruz. M.Sc. Dissertation.

Shaw, A.1990. Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects, CRC Press, Boca Ratón, Florida. USA.

Schmidt, L. 2000. Guide to handling of tropical and subtropical forest seed, Humlebaek, Denmark: Danida Forest Seed Centre.

Statwick, J. 2016. Germination pretreatments to break hard-seed dormancy in *Astragalus cicer* L. (Fabaceae). *PeerJ* 4(1): 2-8; doi 10,7717/peerj.2621.

Schützendübel, A. & A. Polle. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53:1351-1365.

Sheoran, V. A.S. Sheoran, P. Poonia P. 2012. Phytoremediation of metal contaminated mining sites. *Int. J Earth Sci Eng* 5(1):428-436.

Yoon, J., X. Cao, Q. Zhou and L.Q. Ma. 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment*. 368(1): 456-464.

Vargas, O & L.V. Pérez-Martínez. 2014. Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica. Grupo de Restauración Ecológica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, 176 p.

Vassilev, A., J. Vangronsveld, & I. Yordanov. 2002. Cadmium phytoextraction: present state, biological backgrounds and research needs. *Bulg. J. Plant Physiol.* 28:68-95.

Walker L.R., B.D. Clarkson. W. Silvester. B.R. Clarkson B. 2003. Colonization dynamics and facilitative impacts of a nitrogen-fixing shrub in primary succession. *J Veg Sci* 14:277-290, doi: 10.1658/1100-9233(2003)014[0277:CD AFIO]2.0.CO;2.

Tangahu, B.V., R.S. Abdullah, H. Basri, M. Idris, N. Anuar & M. Mukhlisin. 2013. Phytotoxicity of wastewater containing lead (Pb) effects scirpus grossus. *International Journal of Phytoremediation*; 15 (8): 814-826. doi:10.1080/15226514.2012.7364 37.

Tassi, E., M. Barbafiere, I. Rizzi and G. Petruzzeki. 2003. Phytoextracción of Pb and As by *Lupines albus* and *Brassica juncea*, Meeting in Stokolm, Sweden. Worshop Phytoremediations of toxic metals. pp: 12-13.

Tiller, K.G.1989. Heavy metals in soils and their environmental significance. *Advances in soil Scienc*; 9: 113-141.

Trejo N., I. Matus, A. Del Pozo, I. Walter and J. Hirzel. 2016. Cadmium phytoextraction capacity of white lupine (*Lupinus albus* L.) and narrow-leafed lupine (*Lupinus angustifolius* L.) in three contrasting agroclimatic conditions of Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76(2):228-235.

USEPA. 2000. Introduction to phytoremediation. US Environmental Protection Agency. Report No.8. EPA/600/R-99/107.

Vargas, O & L.V. Pérez-Martínez. 2014. Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica. Grupo de Restauración Ecológica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, 176 p.

Vázquez, S., R. Agha, A. Granado, M.J. Sarro, E. Esteban, J.M. Peñalosa & R.O Carpena. 2006, Use of lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water Air Soil Pollut* 177:349-365.

Vázquez, S., P. Goldsbrough and R.O. Carpena. 2006. Assessing the relative contributions of phytochelatins and the cell wall to cadmium resistance in white lupin. *Physiologia Plantarum* 128 (1): 487-495, doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00764. X.

Vollenweide, P.C. Cosio, M.S. Gunthardt-Goerg & C. Keller. 2006. Localization and effects of cadmium in leaves of a tolerant *Salix viminalis* L, Part II, Microlocalization and cellular effect of cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 58:25-40.

Wenzel, W., Bunkowski, M. Puschenreiter, M. Horak. 2003b. Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution*;123(1): 131-138.

Weberbauer, A. 1945. *El Mundo Vegetal de los Andes Peruanos*. Estación Experimental Agrícola. La Molina, Lima, Perú.

Wyszkowski, M., B. Modrzewska. 2015. Effect of neutralizing substances on zinc contaminated soil on the yield and macroelement content in yellow lupine (*Lupinus luteus* L.). *J. Elem.* 20(2): 503-512, doi: 10.5601/ jelem.2014.19.4.734.

Wichea, O., B. Szekelyb, N.A. Kummerd, C. Moschnera and H. Heilmeier. 2016. Effects of intercropping of oat (*Avena sativa* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) on the mobility of target elements for phytoremediation and phytomining in soil solution. *International Journal of Phytoremediation*, 18 (9):900-907. <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2016.1156635>.

Wojciechowski, M., M. Sanderson y M. Hu. 1999. Evidence on the monophyly of *Astragalus* (Fabaceae) and its major subgroups based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA trnL intron data, *Systematic Botany* 24: 409 -437.

Wong, M.H. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50: 775-780.

Ximenez-Embun, P., B. Rodríguez-Sanz, Y. Martínez-Albarrán & C. Cámara. 2002. Uptake of heavy metals by lupin plants in artificially contaminated sand: preliminary results. *Int. Environ Anal Chems* 82: 805-813.

Zacchini, M., F. Pietrini, G.S. Mugnozza, V. Lori, L. Pietrosanti, A. Massacci. 2009. Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water Air Soil Pollut.* 197(1):23-34.

Zornoza, P., R. Millán, M.J. Sierra, A. Seco & E. Esteban. 2010. Efficiency of white lupin in the removal of mercury from contaminated soils: Soil and hydroponic experiments. *Journal of Environmental Science*; 22(3):421-427.

Zornoza, P., S. Vasquez, E. Esteban, M. Fernández-Pascual & R. Carpena. 2002. Cadmium stress in nodulated White lupin, Strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol Biochem* 40: 1003-1009.

IX. ANEXOS

9.1 Anexos de Tablas

Tabla 58. Prueba de validación de la normalidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos del número de semillas germinadas de *Lupinus ballianus*.

| Variable | n | Media | D.E. | W* | p(Unilateral D) |
|--------------------------|----|-------|------|------|-----------------|
| RDUO Semillas germinadas | 20 | 0,00 | 1,54 | 0,87 | 0,0305 |

Tabla 59. Prueba de validación de la homogeneidad de varianza por Levene del número de semillas germinadas de *Lupinus ballianus*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|------|-----------------------|
| Modelo | 7,36 | 3 | 2,45 | 2,02 | 0,1513 |
| Escarificación | 2,59 | 1 | 2,59 | 2,14 | 0,1632 |
| Luz | 1,57 | 1 | 1,57 | 1,29 | 0,2723 |
| Escarificación*Luz | 3,2 | 1 | 3,2 | 2,64 | 0,1239 |
| Error | 19,41 | 16 | 1,21 | | |
| Total | 26,77 | 19 | | | |

Tabla 60. Análisis de varianza del Número de semillas germinadas de *Lupinus ballianus*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|--------|-----------------------|
| Modelo | 739,35 | 3 | 246,45 | 114,63 | <0,0001 |
| Escarificación | 638,45 | 1 | 638,45 | 296,95 | <0,0001 |
| Luz | 92,45 | 1 | 92,45 | 43,00 | <0,0001 |
| Escarificación*Luz | 8,45 | 1 | 8,45 | 3,93 | 0,0649 |
| Error | 34,40 | 16 | 2,15 | | |
| Total | 773,75 | 19 | | | |

Tabla 61. Prueba de validación de la normalidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos del número de semillas germinadas de *Lupinus condensiflorus*.

| Variable | n | Media | D,E, | W* | p(Unilateral D) |
|--------------------------|----|-------|------|------|-----------------|
| RDUO Semillas germinadas | 20 | 0,00 | 1,35 | 0,91 | 0,1967 |

Tabla 62. Prueba de validación de la homogeneidad de la varianza por Levene del número de semillas germinadas de *Lupinus condensiflorus*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|------|-----------------------|
| Modelo | 0,67 | 3 | 0,22 | 0,53 | 0,6708 |
| Escarificación | 0,51 | 1 | 0,51 | 1,2 | 0,2892 |
| Luz | 0,13 | 1 | 0,13 | 0,3 | 0,5912 |
| Escarificación*Luz | 0,03 | 1 | 0,03 | 0,08 | 0,7875 |
| Error | 6,82 | 16 | 0,43 | | |
| Total | 7,49 | 19 | | | |

Tabla 63. Análisis de varianza del Número de semillas germinadas de *Lupinus condensiflorus*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|--------|-----------------------|
| Modelo | 934,00 | 3 | 311,33 | 110,21 | <0,0001 |
| Escarificación | 897,80 | 1 | 897,80 | 317,81 | <0,0001 |
| Luz | 20 | 1 | 20,00 | 7,08 | 0,0171 |
| Escarificación*Luz | 16,20 | 1 | 16,20 | 5,73 | 0,0292 |
| Error | 45,20 | 16 | 2,83 | | |
| Total | 979,20 | 19 | | | |

Tabla 64. Prueba de validación de normalidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos del número de semillas germinadas de *Astragalus garbancillo*.

| Variable | n | Media | D,E, | W* | p(Unilateral D) |
|--------------------------|----|-------|------|------|-----------------|
| RDUO Semillas germinadas | 20 | 0,00 | 0,88 | 0,94 | 0,5428 |

Tabla 65. Prueba de validación de homogeneidad de varianza por Levene del número de semillas germinadas de *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|------|-----------------------|
| Modelo | 0,93 | 3 | 0,31 | 1,07 | 0,3895 |
| Escarificación | 0,29 | 1 | 0,29 | 1 | 0,333 |
| Luz | 0,13 | 1 | 0,13 | 0,44 | 0,5152 |
| Escarificación*Luz | 0,51 | 1 | 0,51 | 1,77 | 0,2018 |
| Error | 4,62 | 16 | 0,29 | | |
| Total | 5,55 | 19 | | | |

Tabla 66. Análisis de varianza de Número de semillas germinadas de *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|--------|-----------------------|
| Modelo | 758,95 | 3 | 252,98 | 273,5 | <0,0001 |
| Escarificación | 756,45 | 1 | 756,45 | 817,78 | <0,0001 |
| Luz | 2,45 | 1 | 2,45 | 2,65 | 0,1232 |
| Escarificación*Luz | 0,05 | 1 | 0,05 | 0,05 | 0,8191 |
| Error | 14,8 | 16 | 0,93 | | |
| Total | 773,75 | 19 | | | |

Tabla 67. Prueba de validación de la normalidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos del número de plántulas emergidas de *Lupinus ballianus*.

| Variable | n | Media | D.E. | W* | p(Unilateral D) |
|--|----|-------|------|------|-----------------|
| Residuo del Número plántulas emergidas | 12 | 0,00 | 2,61 | 0,91 | 0,3870 |

Tabla 68. Prueba de validación de homogeneidad de varianza por Levene del Número de plántulas emergidas de *Lupinus ballianus*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|------|-----------------------|
| Modelo | 13,37 | 1 | 13,37 | 4,41 | 0,0621 |
| Escarificación | 13,37 | 1 | 13,37 | 4,41 | 0,0621 |
| Error | 30,31 | 10 | 3,03 | | |
| Total | 43,69 | 11 | | | |

Tabla 69. Análisis de varianza del Número de plántulas emergidas de *Lupinus ballianus*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|------------------------------|
| Modelo | 374,08 | 1 | 374,08 | 49,99 | <0,0001 |
| Escarificación | 374,08 | 1 | 374,08 | 49,99 | <0,0001 |
| Error | 74,83 | 10 | 7,48 | | |
| Total | 448,92 | 11 | | | |

Tabla 70. Prueba de validación de la normalidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos del Número de plántulas emergidas de *Lupinus condensiflorus*.

| Variable | n | Media | D.E. | W* | p(Unilateral D) |
|--------------------------|----|-------|------|------|-----------------|
| RDUO Plántulas emergidas | 12 | 0,00 | 1,56 | 0,86 | 0,0773 |

Tabla 71. Prueba de validación de homogeneidad de varianza por Levene del número de plántulas emergidas de *Lupinus condensiflorus*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|------------------------------|
| Modelo | 0,04 | 1 | 0,04 | 0,05 | 0,8252 |
| Escarificación | 0,04 | 1 | 0,04 | 0,05 | 0,8252 |
| Error | 7,2 | 10 | 0,72 | | |
| Total | 7,24 | 11 | | | |

Tabla 72. Análisis de varianza del Número de plántulas emergidas de *Lupinus condensiflorus*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|------------------------------|
| Modelo | 602,08 | 1 | 602,08 | 224,38 | <0,0001 |
| Escarificación | 602,08 | 1 | 2,68 | 228,38 | <0,0001 |
| Error | 26,83 | 10 | | | |
| Total | 628,92 | 11 | | | |

Tabla 73. Prueba de validación de la normalidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos del Número de plántulas emergidas de *Astragalus garbancillo*.

| Variable | n | Media | D.E. | W* | p(Unilateral D) |
|---------------------------------------|----|-------|------|------|-----------------|
| Residuo de número plántulas emergidas | 11 | 0,00 | 0,50 | 0,79 | 0,0100 |

Tabla 74. Prueba de validación de homogeneidad de varianza por Levene del Número de plántulas emergidas de *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|------|-----------------------|
| Modelo | 0,0034 | 1 | 0,0034 | 0,16 | 0,7001 |
| Escarificación | 0,0034 | 1 | 0,0034 | 0,16 | 0,7001 |
| Error | 0,2 | 9 | 0,02 | | |
| Total | 0,2 | 10 | | | |

Tabla 75. Análisis de varianza del Número de plántulas emergidas de *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|------------------------------|
| Modelo, | 763,65 | 1 | 763,65 | 2712,96 | <0,0001 |
| Escarificación | 763,65 | 1 | 763,65 | 2712,96 | <0,0001 |
| Error | 2,53 | 9 | 0,28 | | |
| Total | 766,18 | 10 | | | |

Tabla 76. Análisis de varianza del Longitud de planta de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|------------------------------|
| Modelo | 21611,58 | 11 | 1964,69 | 73,73 | <0,0001 |
| Tratamientos (%) | 12709,72 | 3 | 4236,57 | 158,99 | <0,0001 |
| Especies | 6164,89 | 2 | 3082,44 | 115,68 | <0,0001 |
| Tratamientos (%) * especies | 2736,98 | 6 | 456,16 | 17,12 | <0,0001 |
| Error | 1279,05 | 48 | 26,65 | | |
| Total | 22890,63 | 59 | | | |

Tabla 77. Análisis de varianza del Número de hojas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|------------------------------|
| Modelo | 3561389,38 | 11 | 323762,67 | 456,82 | <0,0001 |
| Tratamientos (%) | 997270,85 | 3 | 332423,62 | 469,04 | <0,0001 |
| Especies | 1616938,63 | 2 | 808469,32 | 1140,72 | <0,0001 |
| Tratamientos (%) * Especies | 947179,9 | 6 | 157863,32 | 222,74 | <0,0001 |
| Error | 34019,2 | 48 | 708,73 | | |
| Total | 3595408,58 | 59 | | | |

Tabla 78. Análisis de varianza de Biomasa total de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|---------------------------|-------------------|--------------------|------------------|--------|-----------------------|
| Modelo | 13955,24 | 11 | 1268,66 | 223,83 | <0,0001 |
| Tratamientos (%) | 5257,73 | 3 | 1752,58 | 309,21 | <0,0001 |
| Especies | 6955,58 | 2 | 3477,79 | 613,6 | <0,0001 |
| Tratamientos (%)*Especies | 1741,93 | 6 | 290,32 | 51,22 | <0,0001 |
| Error | 272,06 | 48 | 5,67 | | |
| Total | 14227,3 | 59 | | | |

Tabla 79. Análisis de varianza de regresión lineal simple de cadmio total y la variable regresora cadmio de raíces en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|---------|-----------------------|
| Modelo | 647094,18 | 1 | 647094,18 | 5583,39 | <0,0001 |
| Cadmio raíces | 647094,18 | 1 | 647094,18 | 5583,39 | <0,0001 |
| Error | 6721,99 | 58 | 115,9 | | |
| Total | 653816,17 | 59 | | | |

Tabla 80. Análisis de varianza de regresión lineal simple de cadmio total y la variable regresora cadmio hojas-tallos en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|-------|-----------------------|
| Modelo | 513678,04 | 1 | 51367,04 | 212,6 | <0,0001 |
| Cadmio hojas-tallos | 513678,04 | 1 | 513678,04 | 212,6 | <0,0001 |
| Error | 140138,13 | 58 | 2416,17 | | |
| Total | 653816,17 | 59 | | | |

Tabla 81. Análisis de varianza de regresión lineal simple de plomo total y la variable regresora plomo de raíces en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|------------------------------|
| Modelo | 6650618,32 | 1 | 6650618,32 | 1267,4 | <0,0001 |
| Plomo raíces | 6650618,32 | 1 | 6650618,32 | 1267,4 | <0,0001 |
| Error | 304353,01 | 58 | 5247,47 | | |
| Total | 6954971,34 | 59 | | | |

Tabla 82. Análisis de varianza de regresión lineal simple de plomo total y la variable regresora plomo de hojas y tallos en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|------------------------------|
| Modelo | 2974396,32 | 1 | 2974396,32 | 43,34 | <0,0001 |
| Plomo hojas-Tallos | 2974396,32 | 1 | 2974396,32 | 43,34 | <0,0001 |
| Error | 3980575,01 | 58 | 68630,6 | | |
| Total | 6954971,34 | 59 | | | |

Tabla 83. Análisis de varianza de regresión lineal simple de zinc total y la variable regresora zinc de raíces en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|------------------------------|
| Modelo | 11404719,02 | 1 | 11404719,02 | 1097,65 | <0,0001 |
| Zinc raíces | 11404719,02 | 1 | 11404719,02 | 1097,65 | <0,0001 |
| Error | 602626,64 | 58 | 10390,11 | | |
| Total | 12007345,66 | 59 | | | |

Tabla 84. Análisis de varianza de regresión lineal simple de zinc total y la variable regresora zinc de hojas y tallos en *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

| Factores de Variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Valor de probabilidad |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|------------------------------|
| Modelo | 9902588,44 | 1 | 9902588,44 | 272,88 | <0,0001 |
| Zinc hojas-Tallos | 9902588,44 | 1 | 9902588,44 | 272,88 | <0,0001 |
| Error | 2104757,21 | 58 | 36288,92 | | |
| Total | 12007345,66 | 59 | | | |

9.2 Anexos de Figuras

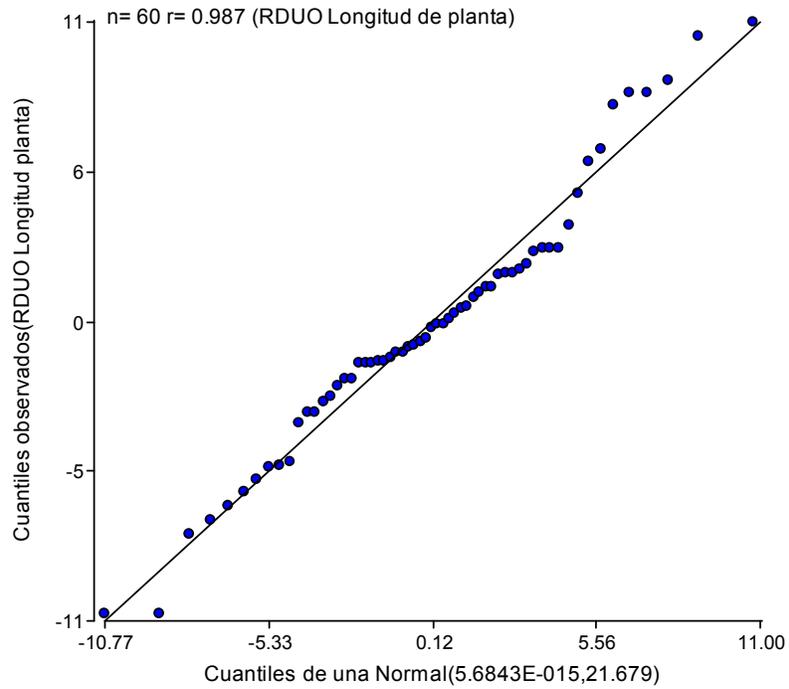


Figura 24. Validación gráficamente de la normalidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos de longitud de planta de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

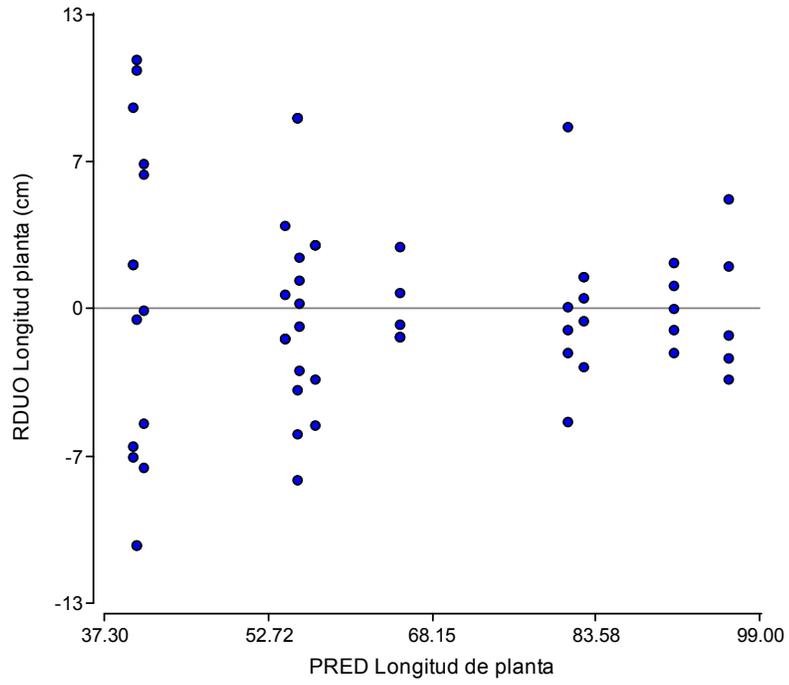


Figura 25. Validación gráficamente de la homogeneidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos de longitud de planta de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

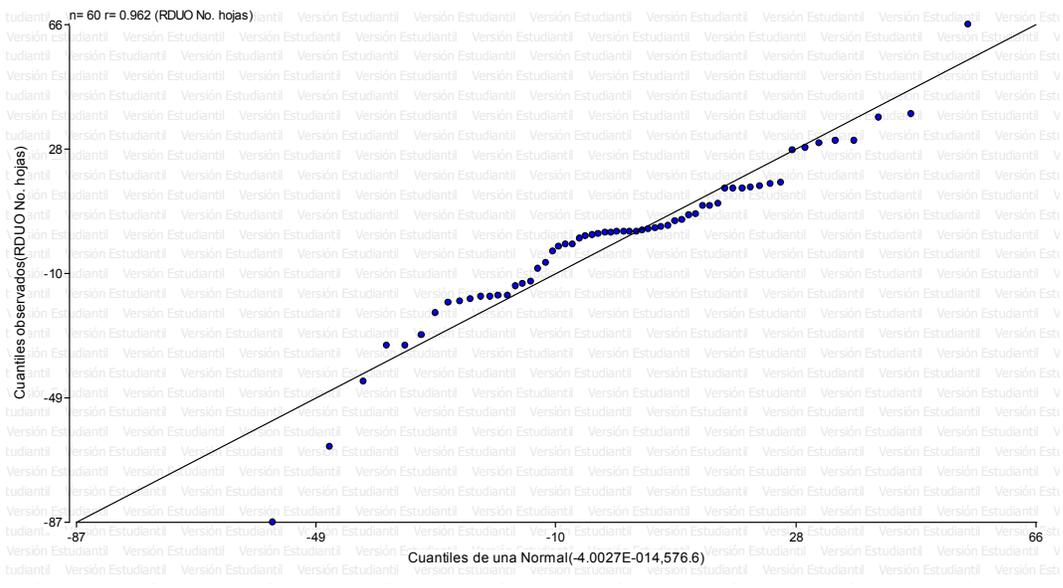


Figura 26. Validación gráficamente de la normalidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos del Número de hojas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

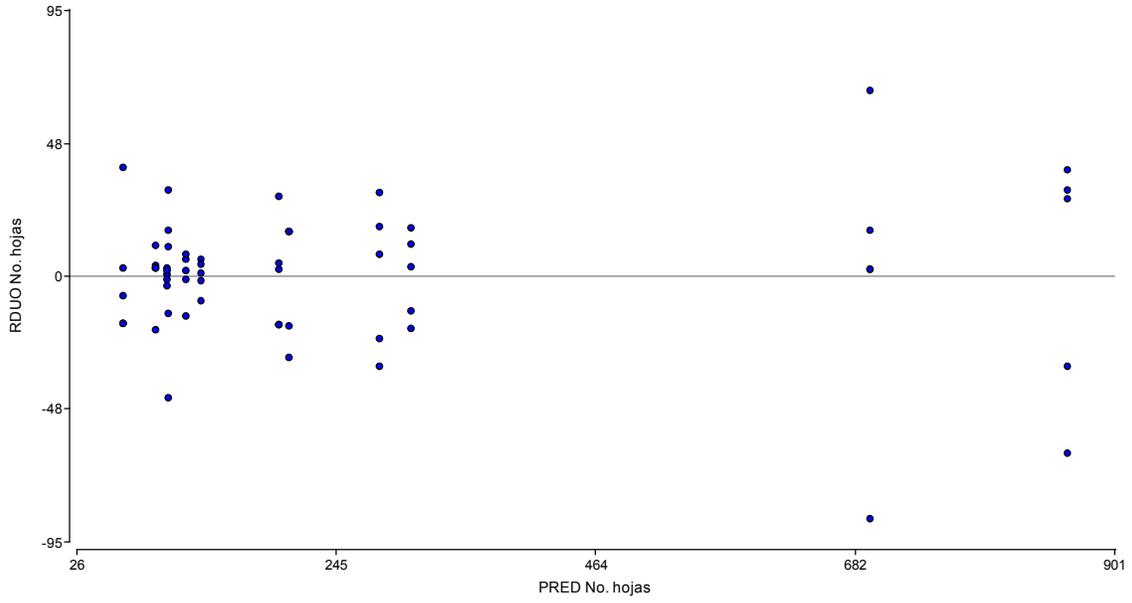


Figura 27. Validación gráficamente de la homogeneidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos del Número de hojas de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

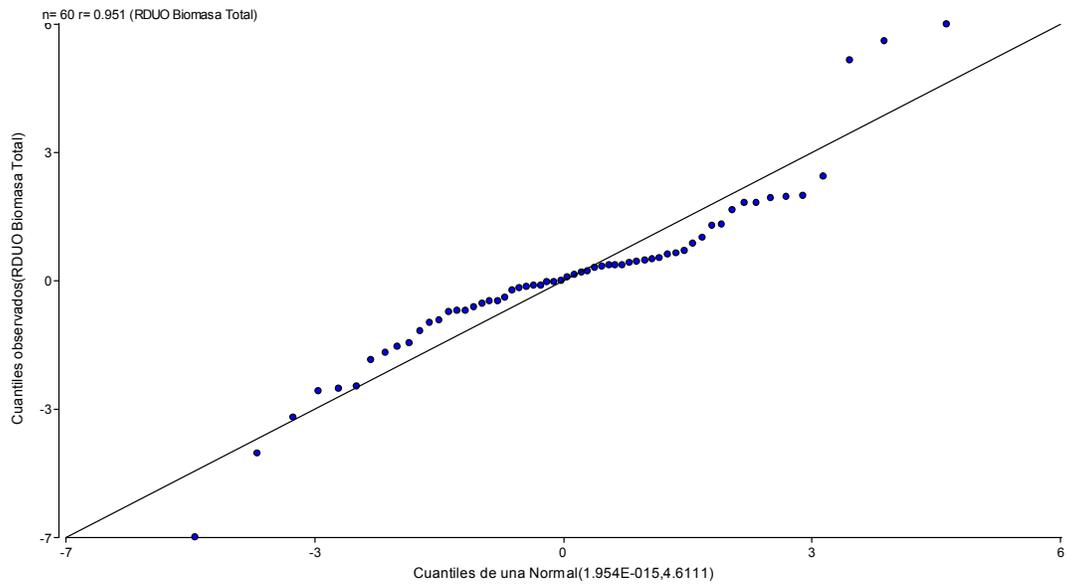


Figura 28. Validación gráficamente de la normalidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos de Biomasa total de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.

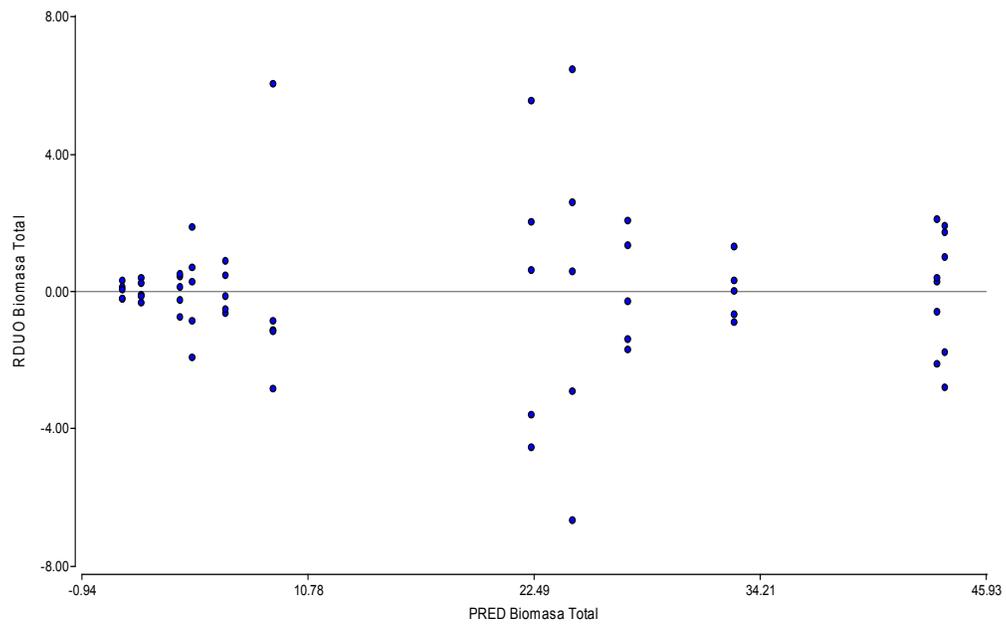


Figura 29. Validación gráficamente de la homogeneidad de varianza por Shapiro-Wilks para los residuos de la Biomasa total de *Lupinus ballianus*, *L. condensiflorus* y *Astragalus garbancillo*.