



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela Para Graduados



**CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE
Galium latoramosum CLOS y *Galium bigeminum*
GRISEB PARA SU DOMESTICACIÓN Y CULTIVO
EN JARDINES TINTÓREOS**

Ing. Agr. Laura Rojas

Tesis
Para optar al Grado Académico de
Doctora en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2019

**CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE *Galium latoramosum* Clos y
Galium bigeminum Griseb PARA SU DOMESTICACIÓN Y CULTIVO EN
JARDINES TINTÓREOS**

Ing. Agr. Laura Rojas

COMISION ASESORA DE TESIS

Director: Ing. Agr. (Dra) Jacqueline Joseau

Asesores: Ing. agr. (Dra) Paula Bima

Ing. Agr. (Dr.) Anibal Verga

TRIBUNAL EXAMINADOR DE TESIS

Ing. Agr. (Dra) Paula Bima

Biol. (Dra) Lorena Torres

Ing. Agr. (Dr) Hugo Chludil

Presentacion formal académica

29 Noviembre del 2019

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

AGRADECIMIENTOS

Después de tantos años, son muchas las personas que me han ayudado por lo que quiero agradecerle a cada uno por haber hecho posible de alguna u otra forma este trabajo.

A mi directora Dra Jacqueline Joseau por haberme permitido descubrir el mundo de la investigación y por dirigirme en este largo camino.

A la Dra Susana Nuñez Montoya por dedicarme su tiempo y por compartir sus conocimientos y ser ejemplo de profesionalismo y dedicación e introducirme en el mundo de la química.

A la Dra Laura Mugas por dedicarme tiempo y paciencia y compartir sus conocimientos y esclarecer mis dudas siempre.

A Mgter Analía Pascualides, por haberme enseñado con tanto amor y por haber sido un pilar muy importante en mi formación

Al Mgter Roberto Hernandez, por haber hecho todos mis viajes de cosecha más entretenidos y por haberme enseñado tanto de plantas en cada uno de nuestros viajes, por transmitirme desinteresadamente todos sus conocimientos, pasión por las plantas y sobre todo por esa gran amistad que me brindó y me brinda, por escucharme y aconsejarme siempre.

A mi comisión asesora, integrada por los Doctores Paula y Anibal, por haberme dirigido y asesorado en este largo camino.

Al Dr. Pablo Palavecino por haber despejado todas mis dudas, compartir su tiempo, conocimiento y por su paciencia infinita en evacuar mis dudas sobre colores.

Al Dr. Juan Argüello por haberme dado ánimo y consejos muy útiles.

A los estudiantes que realizaron su iniciación profesional en tintóreas, en especial Nati y Luciana que le pusieron dedicación y buena onda a las tareas de vivero y a todos aquellos estudiantes que me acompañaron en algún que otro viaje de muestreo.

A mi mamá por su acompañamiento incondicional, por su amor y por su ayuda.

A mi hermano por su amor infinito, por su ayuda incondicional, por su hermoso sentido del humor, por haber confiado en mí, por sus consejos y por todo el amor que siempre me dio como hermano mayor.

A mi amiga del alma Soledad por estar siempre dispuesta a escucharme, por darme siempre un consejo positivo y por sus reflexiones que me llenaban de fuerza y me hacían muy feliz.

A mis otras amigos y amigas que de alguna u otra manera hicieron mi camino más llevadero y que siempre estuvieron para escucharme: Guadalupe, Yoe, Nati, Peter, Analía, Maira, Jime, Justi. A Mgter Alejandra Rojas Vargas, por compartir sus conocimientos de propagación *in vitro*.

A mis compañeros de cátedra, Nidia, Javier, Jime y en especial Charlie por estar siempre para socorrerme.

A Eugenia Rodriguez por haberme dado ánimo y por haberme escuchado en las últimas instancias.

Al comité evaluador, al Dr. Hugo Chludil por sus valiosos aportes en las correcciones y a la Dra. Lorena Torres y Dra. Paula Bima por sus minuciosas sugerencias y correcciones.

Gracias a la vida por darme lecciones y recompensas, por enseñarme a valorar el presente y por haberme permitido conocer lugares maravillosos de las sierras Cordobesas durante los viajes de recolección. Gracias también, por darme la posibilidad de conocer y estudiar en profundidad estas especies del género *Galium* y así aportar mi granito de arena para su conservación y cultivo.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

DEDICATORIA

A mi mamá Isabel y mi hermano Marco.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue caracterizar morfológica y químicamente poblaciones de *Galium spp.* para su domesticación en jardines tintóreos. El material de trabajo fueron dos especies del género *Galium*: *G. latoramosum* Clos y *G. bigeminum* Griseb. Se caracterizaron morfológicamente las plantas madres de crecimiento espontáneo y su descendencia, en condiciones de vivero, de 3 poblaciones de *G. latoramosum* y 3 de *G. bigeminum*. Se evaluó la capacidad tintórea y caracterización colorimétrica de las tres especies abordadas. Se estimó el rendimiento y calidad del órgano tintóreo en cultivo a campo y en condiciones controladas para *G. latoramosum* y *G. bigeminum*. Se ajustó un método de tinción para evaluar la calidad de tinción para las tres especies. Se determinaron los compuestos químicos con propiedades tintóreas sólo para *G. latoramosum* y con la finalidad de iniciar su domesticación se efectuaron estudios morfoanatómicos, de ruptura de dormición de las semillas de las poblaciones de crecimiento espontáneo y registros de estadios fenológicos en condiciones de cultivo, además de evaluar su comportamiento bajo 3 niveles de sombreo en vivero y frente a la multiplicación *in vitro*. Se concluye que las poblaciones espontáneas de *G. latoramosum* y *G. bigeminum* se diferencian en su caracterización morfológica y colorimétrica. La diferenciación solo se manifiesta en la descendencia de *G. latoramosum* a nivel morfológico pero no a nivel colorimétrico. Es posible producir plantas de *G. latoramosum* por semillas pretratadas con peróxido de hidrógeno al 40 % por una hora para ruptura de dormición y obtener 60% PG. También obtener altas tasas de multiplicación por rizomas *in vitro*. Para cultivarla en jardines tintóreos necesitan un sombreo del 30 % para obtener mayor crecimiento y supervivencia. *G. latoramosum* produce en cultivo de 2 años raíces con un peso fresco de 4 g y un rendimiento del 45% de peso seco siendo estos tintes de buena solidez a la luz y al lavado. *Galium bigeminum* presentó mayor producción de raíces con un rendimiento medio de 21g de PFPR, pero con 20% de materia seca.

PALABRAS CLAVE

Tintes naturales, caracterización morfológica y química, antraquinonas, condiciones de cultivo, rizoma, pigmentos, reproducción sexual y asexual.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to characterize wild populations of *Galium spp* for its domestication and culture in dyeing gardens. The working material were two species of the *Galium* genus: *G. latoramosum* Clos and *G. bigeminum* Griseb. The spontaneously growing mother plants and their offspring were characterized morphologically under controlled conditions of 3 populations of *G. latoramosum* and 3 of *G. bigeminum*. The dyeing capacity and colorimetric characterization of the three species studied were evaluated. The yield and quality of the dye organ were estimated in field culture and in controlled conditions for *G. latoramosum* and *G. bigeminum*. A staining method was adjusted to evaluate the staining quality for the three species. The chemical compounds with dyeing properties were determined only for *G. latoramosum* and in order to start their domestication, morphoanatomical studies were carried out, as well as the dormant rupture of the seeds of the spontaneously growing populations and records of phenological stages under culture conditions. Evaluate their behavior under 3 levels of nursery shade and in vitro multiplication. It is concluded that the spontaneous populations of *G. latoramosum* and *G. bigeminum* differ in their morphological and colorimetric characterization. The differentiation only manifests itself in the offspring of *G. latoramosum* at the morphological level but not at the colorimetric level. It is possible to produce plants of *G. latoramosum* by seeds pretreated with 40% hydrogen peroxide for one hour to break dormancy and obtain 60% PG. Also obtain high rates of multiplication by in vitro rhizomes. To grow it in tintóreos gardens they need a shade of 30% to obtain greater growth and survival. *G. latoramosum* produces 2-year-old roots with a fresh weight of 4 g and a yield of 45% of dry weight, these dyes being good in light fastness and washing. *Galium bigeminum* showed higher root production with an average yield of 21g of PFPR, but with 20% of dry matter.

KEY WORDS

Dyeing plants, morphological characterization, *Galium latoramosum*, *Galium bigeminum*, anthraquinones, culture conditions, rhizome, pigments, and asexual reproduction.

INDICE GENERAL

CAPITULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
<i>El problema general</i>	1
<i>Los tintes en la naturaleza</i>	3
<i>La familia Rubiaceae</i>	5
<i>El género Galium</i>	6
<i>Caracterización geográfica de las zonas de recolección</i>	14
<i>El problema particular</i>	15
<i>Caracterización morfológica</i>	16
<i>Domesticación</i>	18
<i>Caracterización química</i>	22
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
CAPÍTULO 2	28
MATERIALES Y MÉTODOS	28
<i>Muestreo y recolección</i>	30
<i>Caracterización de las zonas de colecta</i>	31
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y QUÍMICA	37
<i>Caracterización morfológica de las poblaciones de crecimiento espontáneo de G. latoramosum y G. bigeminum en los bosques de las Sierras de Córdoba</i>	37
<i>Identificación de las estructuras morfo-anatómicas de los órganos tintóreos de G. latoramosum.</i>	37
<i>Caracterización morfológica de plantas madres</i>	38

<i>Plantas madre de G. Latoramosum</i>	38
<i>Plantas madre de G. bigeminum</i>	42
<i>Caracterización morfológica de la descendencia de Galium latoramosum</i>	44
<i>Comparación de las asociaciones entre variables morfológicas de las madres y de las hijas por población de Galium latoramosum</i>	45
<i>Caracterización colorimétrica de poblaciones de plantas madre de G latoramosum y su descendencia y de poblaciones de G. bigeminum</i>	46
<i>Ajuste del método de tinción</i>	46
<i>Caracterización Colorimétrica</i>	49
<i>Estimación de la producción y calidad de los órganos tintóreos de G. latoramosum y G. bigeminum</i> ..	52
<i>De la descendencia de G.latoramosum en condiciones de cultivo</i>	55
<i>Determinación de las propiedades fisicoquímicas de las fibras teñidas con tintes extraídos de Galium spp. mediante la aplicación de pruebas de solidez</i>	56
<i>Solidez al lavado doméstico y comercial</i>	56
<i>Solidez al frote</i>	57
<i>Solidez al sudor</i>	57
<i>Solidez a la luz</i>	58
<i>Coordenadas de color/Pasa-Falla</i>	58
<i>Identificación de los compuestos químicos responsables de las propiedades tintóreas en G. latoramosum</i>	59
<i>Metodologías de extracción</i>	65
<i>Identificación de pigmentos antraquinónicos por HPLC- DAD-ESI-QTOF</i>	73
DOMESTICACIÓN	75
<i>Registro de los estadios fenológicos durante la etapa reproductiva de Galium latoramosum en condiciones de cultivo</i>	75
<i>Evaluación de la viabilidad de las semillas de Galium latoramosum de las poblaciones de crecimiento espontáneo</i>	75
<i>Evaluación del comportamiento germinativo y efecto de los tratamientos pregerminativos para ruptura de dormición</i>	75

<i>Tipificación de la especie G. latoramosum según su germinación</i>	77
<i>Categorización de la calidad de las semillas según su porcentaje de germinación</i>	77
<i>Multiplicación in vitro de poblaciones de Galium latoramosum</i>	79
<i>Evaluación del comportamiento de G. latoramosum bajo distintos niveles de sombreo Jardín Tintóreo de Villa General Belgrano (Calamuchita).</i>	82
<i>Ensayo de sombreo de G. latoramosum en el VFE.</i>	83
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	84
<i>Comparación de las asociaciones entre variables morfológicas de las madres y de las hijas por población de Galium latoramosum.</i>	86
CAPÍTULO 3	88
RESULTADOS	88
<i>Caracterización morfológica y química</i>	88
<i>Caracterización morfológica de las poblaciones de crecimiento espontáneo de G. latoramosum y G. bigeminum en los bosques de las Sierras de Córdoba</i>	88
<i>Caracterización morfológica de plantas madres</i>	91
<i>Plantas madre de Galium latoramosum.</i>	91
<i>Plantas madre de Galium bigeminum.</i>	94
<i>Caracterización morfológica de la descendencia de G. latoramosum.</i>	98
<i>Comparación de las asociaciones entre variables morfológicas de las madres y de las hijas por población de Galium latoramosum</i>	100
<i>Caracterización colorimétrica de poblaciones de plantas madre de G latoramosum y su descendencia y de poblaciones de G. bigeminum.</i>	104
<i>Ajuste del método de tinción</i>	104
<i>Protocolo de tinción estandarizado. Luego de los ensayos realizados, para ajustar el método de tinción, se determinó que el mejor método para teñir era el siguiente:</i>	107
<i>Caracterización Colorimétrica</i>	107
<i>Estimación de la producción y calidad de los órganos tintóreos de G. latoramosum y G. bigeminum</i>	111
<i>De plantas madres de Galium bigeminum</i>	114
<i>De la descendencia de G.latoramosum en condiciones de cultivo.</i>	117

<i>Determinación de las propiedades fisicoquímicas de las fibras teñidas con tintes extraídos de Galium spp. mediante la aplicación de pruebas de solidez.....</i>	120
<i>Solidez al lavado doméstico y comercial.</i>	120
<i>Solidez al frote.</i>	121
<i>Solidez al sudor.</i>	122
<i>Solidez a la luz.</i>	123
<i>Identificación de los compuestos químicos responsables de las propiedades tintóreas de G. latoramosum.....</i>	124
<i>Análisis químico cualitativo del extracto con mayor capacidad tintórea</i>	128
<i>Identificación de pigmentos antraquinónicos por HPLC- DAD-ESI-QTOF. S.....</i>	131
DOMESTICACIÓN	137
<i>Registro de los estadios fenológicos reproductivos en condiciones de cultivo</i>	137
<i>De G.latoramosum</i>	140
<i>De G. bigeminum.....</i>	140
<i>Evaluación de la viabilidad de las semillas de Galium latoramosum de las poblaciones de crecimiento espontáneo.....</i>	142
<i>Evaluación del comportamiento germinativo y efecto de los tratamientos pregerminativos para ruptura de dormición</i>	142
<i>Tipificación de G. latoramosum según su germinación.....</i>	149
<i>Categorización de la calidad de las semillas según su porcentaje de germinación.</i>	149
<i>Multiplicación in vitro de poblaciones de Galium latoramosum</i>	150
<i>Evaluación del comportamiento de G. latoramosum bajo distintos niveles de sombreo Jardín Tintóreo de Villa General Belgrano (Calamuchita).</i>	153
<i>Ensayo de sombreo de G. latoramosum en el VFE.....</i>	155
CAPITULO 4	158
DISCUSIÓN	158
<i>Caracterización Morfológica Y Química</i>	158
<i>Caracterización morfológica de las poblaciones de crecimiento espontáneo de G. latoramosum y G. bigeminum en los bosques de las Sierras de Córdoba</i>	160

<i>Plantas madres de G. latoramosum</i>	160
<i>Plantas madre de G. bigeminum</i>	161
<i>Caracterización morfológica de la descendencia de Galium latoramosum en condiciones de cultivo</i>	162
<i>Comparación de las asociaciones entre variables morfológicas de las madres y de las hijas por población de Galium latoramosum</i>	162
<i>Caracterización colorimétrica de poblaciones de plantas madre de G latoramosum y su descendencia, y de poblaciones de G. bigeminum</i>	164
<i>Ajuste de la metodología de tinción</i>	164
<i>Caracterizacion colorimetrica de plantas madre de poblaciones de G. latoramosum y su descendencia</i>	165
<i>Caracterizacion colorimetrica de poblaciones de G. bigeminum</i>	166
<i>Caracterizacion colorimetrica de poblaciones producidas in vitro de G. latoramosum</i>	167
<i>Estimación de la producción y calidad de los órganos tintóreos de G. latoramosum y G. bigeminum</i>	167
<i>Determinación de las propiedades fisicoquímicas de las fibras teñidas con tintes extraídos de Galium spp. mediante la aplicación de pruebas de solidez</i>	169
<i>Identificación de los compuestos químicos responsables de las propiedades tintóreas en G. latoramosum</i>	170
<i>Registro de los estadios fenológicos durante la etapa reproductiva en condiciones de cultivo de Galium latoramosum y G. bigeminum</i>	173
<i>Evaluación de la viabilidad de las semillas de Galium latoramosum de las poblaciones de crecimiento espontáneo</i>	174
<i>Multiplicación in vitro de poblaciones de Galium latoramosum</i>	176
<i>Evaluación del comportamiento de G. latoramosum bajo distintos niveles de sombreo</i>	177
CAPITULO 5	178
CONCLUSIÓN	178
LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACION	182
BIBLIOGRAFÍA CITADA	182

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Localización, características climáticas de las zonas de crecimiento y número de los ejemplares de <i>Galium latoramosum</i> colectados en distintas localidades de las sierras de Córdoba, Argentina	28
Tabla 2.2. Localización, características climáticas de las zonas de crecimiento y número de los ejemplares de <i>Galium bigeminum</i> en distintas localidades de las sierras de Córdoba, Argentina.....	29
Tabla 2. 3. Caracteres medidos para la descendencia de <i>G. latoramosum</i> y sus respectivas abreviaturas	45
Tabla 2. 4. Notación utilizada para representar los caracteres de producción y calidad de órganos tintóreos en <i>G. latoramosum</i>	54
Tabla 2. 5. Notación utilizada para representar los caracteres de producción y calidad de órganos tintóreos en <i>G. bigeminum</i>	55
Tabla 2. 6. Criterios de evaluación de las diferentes solideces.....	58
Tabla 2. 7. . Descripción de ensayos para diferenciar antocianinas de betacianinas en raíces de <i>G. latoramosum</i>	62
Tabla 2. 8. Descripción del análisis químico de los extractos obtenidos	70
Tabla 2. 9. Gradiente de elusión de la columna de exclusión.....	71
Tabla 2.10. Ensayos de germinación de semillas <i>G. latoramosum</i> de 3 procedencias.....	77
Tabla 2. 11. Irradiancia ($\mu\text{moles. m}^2\text{-s}^{-1}$) registrada bajo sol y sombra a diferentes horas en Jardín Tintóreo de Villa General Belgrano	83
Tabla 2. 12. Irradancia ($\mu\text{moles m}^2\text{s}^{-1}$) registrada bajo los distintos niveles de sombreo en el invernadero del VFE a diferentes horas	84
Tabla 3. 1. Medidas resúmenes de las características morfo-métricas de plántulas de <i>G. latoramosum</i>	89
Tabla 3.2. Caracteres morfológicos de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i> , analizado con MANOVA y método de comparación a posteriori Hotelling	93

Tabla 3.3. Caracteres morfológicos de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i> , analizado con Kruskal Wallis a través de la prueba de comparaciones múltiples.....	94
Tabla 3. 4. Caracteres morfológicos de plantas madre de tres poblaciones de <i>G. bigeminum</i> analizados con MANOVA y método de comparación a posteriori Hotelling ...	97
Tabla 3. 5. Caracteres morfológicos de plantas madre de tres poblaciones de <i>G. bigeminum</i> analizados con Kruskal Wallis a través de la prueba de comparaciones múltiples	97
Tabla 3.6. Caracteres morfológicos de las tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i> analizados con MANOVA y método de comparación a posteriori Hotelling	101
Tabla 3. 7. Caracteres morfológicos de la descendencia de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i> analizados con Kruskal Wallis a través de la prueba de comparaciones múltiples.....	101
Tabla 3. 8. Coeficientes de correlación canónica (R), la proporción de la varianza total explicada por cada variable canónica (R ₂) y niveles de probabilidad asociado (p-valor) para variable canónica por población	102
Tabla 3. 9. Variables canónicas (L) para cada Población de <i>Galium latoramosum</i> de los caracteres de las madres y de los hijos	103
Tabla 3.10. Parámetros de color obtenidos en los distintos tratamientos de desmenuzado del material vegetal	105
Tabla 3. 11. Caracteres colorimétricos de plantas madre de <i>G. latoramosum</i>	108
Tabla 3. 12. Caracteres colorimétricos de descendencia de <i>G. latoramosum</i>	108
Tabla 3. 13. Caracteres colorimétricos de plantas madre de <i>G. bigeminum</i>	109
Tabla 3. 14. Caracteres colorimétricos de plantas in vitro de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i> , analizado mediante Kruskal Wallis.	109
Tabla 3. 15. Caracteres colorimétricos de plantas in vitro de <i>G. latoramosum</i> , analizado con MANOVA (MULTIVARIADO).....	110
Tabla 3. 16. Caracteres morfológicos y colorimétrico de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i> analizado con MANOVA	113
Tabla 3. 17. Caracteres morfológicos y colorimétricos de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i> analizado con Kruskal Wallis	114
Tabla 3. 18. Caracteres morfológicos y colorimétricos de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i> analizado mediante ANAVA	114

Tabla 3. 19. Caracteres morfológicos y colorimétricos de tres poblaciones de <i>G. bigeminum</i> analizado con MANOVA (multivariado).....	116
Tabla 3. 20. Caracteres morfológicos y colorimétricos de tres poblaciones de <i>G. bigeminum</i> analizado mediante Kruskal Wallis.....	116
Tabla 3. 21. Caracteres morfológicos y colorimétricos de la descendencia de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i> analizados con MANOVA y método de comparación a posteriori Hotelling.....	119
Tabla 3. 22. Caracteres morfológicos y colorimétricos de la descendencia de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i> analizados con Kruskal Wallis a través de la prueba de comparaciones múltiples.....	120
Tabla 3. 23. Solidez al lavado doméstico y comercial de tres especies del género <i>Galium spp.</i>	121
Tabla 3. 24. Solidez al frote de tres especies del género <i>Galium spp.</i>	122
Tabla 3. 25. Solidez al sudor en medio ácido de tres especies del género <i>Galium spp.</i>	122
Tabla.3. 26. Solidez al sudor en medio básico de tres especies del género <i>Galium spp.</i> ..	123
Tabla 3. 27. Solidez a la luz de tres especies del género <i>Galium spp.</i>	123
Tabla 3. 28. Coordenadas de color de tres especies del género <i>Galium spp.</i>	124
Tabla 3.29. Compuestos químicos identificados en material fresco de <i>G. latoramosum</i> ..	125
Tabla 3. 30. Extractos obtenidos con dos métodos de extracción a baja escala.	126
Tabla 3. 31. Gradiente de elusión y alícuotas obtenidas del extracto Ben-C sometido a CC de exclusión.	128
Tabla 3. 32. Fracciones resultantes de la CC de exclusión del extracto Ben-C según análisis por CCD de las alícuotas obtenidas. Color observado en las lanas teñidas por método ajustado de tinción con cada alícuota.....	129
Tabla 3. 33. Antraquinonas identificadas y sus respectivas estructuras químicas.....	133
Tabla 3. 34. Antraquinonas identificadas en fracciones de extracto bencénico obtenido de raíces de <i>G. latoramosum</i> , mediante HPLC-DAD-ESI-QTOF	136
Tabla 3. 35. Comparación entre plántulas normales en laboratorio de semillas e invernadero a 72 días desde la siembra.....	146
Tabla 3.36. Semillas germinadas de <i>G. latoramosum</i> de La Cumbre bajo distintos tratamientos pregerminativos sembradas en Laboratorio de Semillas.....	148

Tabla 3.37. Plántulas normales de <i>G. latoramosum</i> de La Cumbre bajo distintos tratamientos pregerminativos sembradas en invernadero del VFE.....	149
Tabla 3. 38. Altura, diámetro, cobertura y sobrevivencia de <i>G. latoramosum</i> en el JT Calamuchita a distintas exposiciones.	153
Tabla 3. 39. Medias de altura, diámetro, cobertura y sobrevivencia de <i>G. bigeminum</i> en el JTVGB	154
Tabla 3. 40. Altura, diámetro, cobertura y sobrevivencia de <i>G. richardianum</i> en el JTVGB a distintas exposiciones.....	155
Tabla 3. 41. Supervivencia (%) de <i>G. latoramosum</i> bajo tres niveles de sombreado.	156
Tabla 3. 42. Crecimiento de plantines de <i>G. latoramosum</i> bajo diferentes niveles de sombreado.....	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1. Morfología de la parte aérea de <i>Galium aparine</i> . Otto Wilhelm Thomé: " Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz " (Thomé 1903).....	8
Figura 2. 1. Regiones fitogeográficas de Córdoba donde se aprecia el Bosque serrano Fuente: Luti <i>et al.</i> 1979. Vegetación. En: Geografía Física de la Provincia de Córdoba.....	32
Figura 2. 2. Detalle de la ubicación geográfica de las 6 zonas estudiadas.	33
Figura 2. 3. <i>Galium latoramosum</i> . a- Planta entera. b- Detalle de raíces de dos poblaciones.	38
Figura 2.4. Morfología de <i>G. bigeminum</i> . a- Planta entera descalzada b-Detalle de la abundante masa radicular de coloración rojiza.....	42
Figura 2.5. Muestras de lana teñida correspondientes a un individuo de <i>G. latoramosum</i> de la población de Ongamira, preparados para su medición en colorímetro.....	50
Figura 2.6. a) Espacio de color CIE L*C*H. b) Espectrofotómetro de superficie (Minolta 508d, EUA).....	51
Figura 2. 7. Tonos correspondientes a los distintos ángulos de matiz o tono son, expresados en grados sexagesimales.	52
Figura 2. 8. Marcha analítica de raíz de <i>Galium latoramosum</i> para su estudio químico preliminar. Fuente: Rondina y Coussio, 1969.	60
Figura 2. 9. Esquema de la metodología de extracción A: un extracto hidroalcohólico original, al cual se elimina previamente el contenido alcohólico, se particiona con solventes de polaridad creciente.	65
Figura 2. 10. Esquema de la metodología de extracción B: El material vegetal es extraído con solventes de polaridad creciente, aplicando maceración en una ampolla de decantación.	67
Figura 2. 11. Esquema de extracción a gran escala, aplicando la metodología de extracción B con tres solventes: benceno, acetato de etilo y etanol.....	69
Figura 2. 12. Sistema de elución de la fase móvil para HPLC –MS rampa <i>G. latoramosum</i>	74

Figura 2. 13. Plantas micropropagadas in vitro. a- Detalle de raíces b- Detalles de esquejes de 4 días de introducidos.	82
Figura 3. 1. Estructuras subterráneas de <i>G. latoramosum</i> : a. Aspecto general, b. Primordios de raíces y c. Detalle de corona.	90
Figura 3. 2. Sección transversal del rizoma adulto de <i>G. latoramosum</i> : a. Rizoma con peridermis exfoliada, b. Detalle de gránulos de almidón en la corteza y c. Corteza exhibiendo abundantes rafidios.	90
Figura 3. 3. Ordenamiento bidimensional de 22 caracteres morfológicos de plantas madre pertenecientes a 3 poblaciones de <i>G. latoramosum</i> , en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2.	91
Figura 3. 4. Dendrograma obtenido con el método UPGMA, basados en la distancia euclídea entre los individuos representados por todos los caracteres morfológicos de parte aérea, raíces y hojas de plantas madre de 3 poblaciones de <i>G. latoramosum</i>	93
Figura 3. 5. Ordenamiento bidimensional de 12 caracteres morfológicos de plantas madre pertenecientes a 3 poblaciones de <i>G. bigeminum</i> , en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2. Población: Biale Massé=BM, PO=Pampa de Olaen y LG= Los Gigantes.	95
Figura 3. 6. Dendrograma obtenido con el método UPGMA, basados en la distancia euclídea entre los individuos representados por todos los caracteres morfológicos de parte aérea y raíces de plantas madres de 3 poblaciones de <i>G. bigeminum</i>	96
Figura 3. 7. Ordenamiento bidimensional de 11 caracteres morfológicos de la descendencia de <i>G. latoramosum</i> , de 3 poblaciones diferentes, en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2	98
Figura 3. 8. Dendrograma obtenido con el método UPGMA, basados en la distancia euclídea entre plantas de la descendencia de 3 poblaciones de <i>G. latoramosum</i> representados por todos los caracteres morfológicos de parte aérea.	100
Figura 3. 9. . Ordenamiento bidimensional de 10 caracteres de color de plantas pertenecientes a 3 poblaciones de <i>G. latoramosum</i> obtenidas in vitro, en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2.	110
Figura 3. 10. Ordenamiento bidimensional de 12 caracteres de color de plantas madre pertenecientes a 3 poblaciones de <i>G. latoramosum</i> , en base a los 2 primeros componentes principales (CP1 y CP2).	112

Figura 3. 11. Ordenamiento bidimensional de 16 caracteres morfológicos y colorimétricos de plantas madre pertenecientes a 3 poblaciones de <i>G. bigeminum</i> , en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2.....	115
Figura 3. 12. Ordenamiento bidimensional de 14 caracteres morfológicos de la descendencia de <i>G. latoramosum</i> , de 3 poblaciones diferentes, en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2. Población: ONG=Ongamira, LE=La Estancita, LC= La Cumbre	117
Figura 3. 13. Dendrograma obtenido con el método UPGMA, basados en la distancia euclídea entre plantas de la descendencia de 3 poblaciones de <i>G. latoramosum</i> representados por todos los caracteres morfológicos de parte aérea, raíces y color.	118
Figura 3. 14. Lanas teñidas con los extractos obtenidos mediante la metodología B a gran escala. a) Extracto Ben-C, b) Extracto AcOEt-C y c) extracto EtOH-C	127
Figura 3. 15. Capacidad tintórea de cada una de las alícuotas obtenidas de la CC del Ext. Bencénico C (cromatografía de exclusión con LH-20) en sustrato lana, mediante método de tinción ajustado.	130
Figura 3. 16. Análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF de las fracciones de <i>Galium latoramosum</i> obtenidas a partir del extracto bencénico.....	132
Figura 3.17. Estadios fenológicos de <i>G. latoramosum</i> . a. Floración (F), b. Fruto cuajado (FC), c. Fruto verde en crecimiento (FVC), d. Fruto cremoso (FCr), e. Fruto madurez temprana (FMT) y f. Fruto completamente Maduro (FCM).....	138
Figura 3. 18. Niveles de floración (%) a través del tiempo el tiempo de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i>	139
Figura 3. 19. Niveles de formación de frutos (%) de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i>	139
Figura 3. 20. Evolución del diámetro (mm) del fruto a función del tiempo de tres poblaciones de <i>G. latoramosum</i>	140
Figura 3. 21. Estadios fenológicos de <i>G. bigeminum</i> a. Floración (F), b. Fruto cuajado (FC), c. Fruto cremoso en crecimiento (FCC), d. Fruto madurez temprana (FMT).....	141
Figura 3. 22. Fenología de la floración en <i>Galium bigeminum</i> .a) fecha de inicio de la floración para las 3 poblaciones en estudio. b) duración media de la floración en días	142
Figura 3. 23. Porcentaje de semillas germinadas (%) de <i>Galium latoramosum</i> en diferentes fechas de conteo del EI realizado en LS, en sustrato papel. Referencias. T1:	

testigo T2: calor más estratificación frío húmedo T3: calor T4: estratificación frío- húmedo.	143
Figura 3. 24. Porcentaje de plántulas normales (%) de <i>Galium latoramosum</i> en diferentes fechas de conteo del EI realizado en LS, sustrato papel. Referencias. T1: Testigo. T2: calor más estratificación frío húmedo. T3: calor T4: estratificación frío- húmedo.	143
Figura 3. 25. Porcentaje de plántulas anormales (%) de <i>Galium latoramosum</i> en diferentes fechas de conteo del EI realizado en el LS	144
Figura 3.26. Porcentaje de semillas germinadas (%) de <i>Galium latoramosum</i> en diferentes fechas de conteos del EI realizado en VFE.....	145
Figura 3. 27. Porcentaje de semillas germinadas (%) de <i>Galium latoramosum</i> en diferentes fechas de conteo del EII realizado en LS.....	147
Figura 3. 28. Porcentaje de plántulas normales (%) de <i>G. latoramosum</i> en distintas fechas de conteo del EII realizado bajo condiciones controladas (LS).....	147
Figura 3. 29. Porcentaje de contaminación durante la introducción “ <i>in vitro</i> ” de segmentos nodales de plantas madre seleccionadas de 3 poblaciones de <i>G. latoramosum</i>	150
Figura 3. 30. Tasa de Multiplicación “ <i>in vitro</i> ” de <i>Galium latoramosum</i> según tres repique sucesivos.	151
Figura 3. 31. Porcentaje de formación de raíces en sucesivos repiques durante la multiplicación “ <i>in vitro</i> ”	152
Figura 3. 32. . Microplantas de <i>G. latoramosum</i> . a- Detalle de la abundante masa radicular rojiza b- Explanto que formó un callo también con la coloración típica de la especie.....	153

LISTADO DE ABREVIATURAS

AATCC.....	American Association of Textile Chemist and Colorist
ACC.....	Análisis multivariado de correlaciones canónicas
AcOEt.....	Acetato de Etilo
AcOEt-MeOH-H ₂ O.....	Acetato de Etilo- Metanol-agua
ACOR.....	Herbario (Index Herbariorum) FCA- UNC
AFOL.....	Ancho Foliar
AIA.....	Ácido Indol acético
ANA.....	Ácido Naftalen Acético
ANAVA.....	Análisis de la Varianza
ANG.....	Ángulo
APA.....	Ancho de la parte aérea
APR.....	Ancho de la parte radicular
APREC.....	área del ápice folilúlo/área del rectángulo que del ápice
APTOT.....	Superficie del ápice dividido sup. total foliolulo
AQs.....	Antraquinonas
ARFOL.....	Área foliar
ATR.....	Ancho total de raíces
BM.....	Bialet Massé
C*.....	Color (raíz a^2+b^2)
C.....	Corona
Ca.....	Cambium
CCF.....	Cromatografía en capa fina analítica
CI.....	Name Color Index Name
CIELCH.....	Espacio de color
Cl ₃ Fe.....	Cloruro de hierro

Co.....	Corteza
CP ₁	Componente principal 1
CP ₂	Componente principal 2
DB.....	Diámetro a la base
DTI.....	Dámetro del tallo inicial
DTSP.....	Diámetro del tallo secundario principal
E.....	Estolón
Ep.....	Epidermis
EtOH-H ₂ O.....	Etanol –agua
FCA.....	Facultad de Ciencias Agropecuarias
Fd.....	Felodermis
Fe.....	Felógeno
FM.....	Fases móviles
Fp.....	Floema primario
Fs.....	Floema secundario
Ga.....	Gránulos de almidón
GPS.....	Posicionador geográfico
h*.....	matiz o tono (Artang b/a) en grados
H ₂ SO ₄	Acido sulfúrico
HAQN.....	hidroxiantraquinona
HCL.....	Ácido Clorhídrico
HPLC-MS.....	High Performance Liquid Cromatography-Mass Spectrometry
HR (%).....	Porcentaje de Humedad Relativa
I ₂	Iodo molecular
IS.....	Índice de supervivencia
ISTA.....	Asociación Internacional de Pruebas de Semillas
JT.....	Jardín tintóreo

KI.....	Yoduro de potasio (Lugol)
L*.....	Luminosidad
LB.....	Laboratorio de Biotecnología
LC.....	La Cumbre
LE.....	La Estancita
LENT ₁	Largo de entrenudos del tallo primario
LENTS.....	Largo de entre nudos del tallo secundario
LFOL.....	Largo foliar
LG.....	Los Gigantes
LH-20.....	Cromatografía en columna Sephadex
Lp.....	Lucidina primeverosido
LPA.....	Largo de la parte aérea
LPR.....	Largo de la parte radicular
LT ₁	Largo del tallo primario principal
LTI.....	Largo total inicial
LTR.....	Largo total de raíces
LTTS.....	Largo total del tallo secundario
<u>m/z</u>	Relación masa-carga
MANOVA.....	Análisis de la varianza multivariado
Md.....	Médula
MeOH.....	Metano
Mm.....	Milímetros
MS.....	Murashigge and Skoog
Msnm.....	Metros sobre el nivel del mar
N.....	Nudo
NENT ₁	Nº de entrenudos del tallo primario principal
NENTS.....	Nº de entre nudos del tallo secundario

NH ₄	Ión amonio
Nm.....	Nanómetros
NR<.....	Número de raíces menores a 1 mm de diámetro
NR>.....	Número de raíces mayores a 1 mm de diámetro
NT1.....	Número de tallos primarios
NTI.....	Número de tallos iniciales
NTS.....	Número de tallos secundarios
OHAQs.....	Hidroxiantraquinonas
ONG.....	Ongamira
PA/PR.....	F Relación PA/PR peso fresco
PA/PR.....	S Relación entre PA/PR peso seco
Pe.....	Peridermis exfoliada
PFNM.....	Productos Forestales no madereros
PFPA.....	Peso Fresco de la Parte Aérea
PFPR.....	Peso Fresco de la parte radicular
PFR.....	Peso Fresco de raíces
PG.....	Poder germinativo
Pi.....	Peridermis intacta
PM.....	Peso molecular
PO.....	Pampa de Olaen
pp.....	Precipitación
PSPA.....	Peso seco de la parte Aérea
PSPR.....	Peso seco de la parte radicular
PSR.....	Peso seco de raíces
R ²	coeficientes de correlación al cuadrado
Ra.....	Rizoma adulto
Rad.....	Raíces adventicias

Rdf.....	Radio floemático
Rf.....	Rafidios
Rj.....	Rizoma joven
S*.....	C/L
S.....	h y C
S.....	súber
TVM.....	Tasa de velocidad de multiplicación
UNC.....	Universidad Nacional de Córdoba
UV.....	Ultra violeta
VFE.....	Vivero Forestal Educativo
Vp.....	Vaina Parenquimática
Xip.....	Xilema Primario
Xis.....	xilema secundario
Yt.....	yema terminal

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

El Problema general

Los bosques albergan el 70 % de los animales y plantas del mundo, proveen componentes esenciales como madera, medicamentos, alimentos, agua, trabajo y reducen la concentración de gases de efecto invernadero en la atmósfera al absorber el dióxido de carbono. Apenas 5 % de la flora mundial fue estudiada hasta hoy y solamente el 1 % es utilizada como materia prima, con diversos beneficios científico/técnicos. La biodiversidad de flora latinoamericana es un patrimonio químico inexplorado de colorantes, medicinas, alimentos, fertilizantes, pesticidas, cosméticos, solventes, levaduras, textiles, plásticos, celulosa, óleos y genes en número casi infinito, también brinda innumerables servicios fundamentales para la vida humana y el equilibrio de las condiciones de habitabilidad en el planeta (Cano Morales et al, 2006).

En la década del 40, Argentina disponía de más de 2 hectáreas de bosque nativo por persona, mientras que en la actualidad la superficie boscosa es inferior a 1 hectárea per cápita (Montenegro et al. 2004).

A principios del siglo 20, la provincia de Córdoba contaba con el 71 % de su superficie cubierta con bosque nativo (Comisión de Ordenamiento Territorial del Bosque Nativo, 2010). Actualmente, debido a la alta tasa de deforestación (Cabido y Zak, 2010), el porcentaje de superficie provincial cubierta por bosque se encuentra por debajo del 10

%, lo cual redundaría en una grave situación socio-ambiental (Díaz, 2008; Comisión de Ordenamiento Territorial del Bosque Nativo, 2010).

Este fenómeno de pérdida de masa boscosa es reflejo y consecuencia de paradigmas de un desarrollo no sustentable (Ensabella, 2008; Defensor del Pueblo de la Nación, 2011).

El uso múltiple del bosque a través de los productos forestales no madereros (PFNM), es un recurso promisorio para aprovechar su potencial, contribuir al desarrollo económico, la creación de empleo e ingresos y para mejorar el bienestar de la población rural de una manera sostenible (Resico y Kasulin, 1998; Resico, 2001). Entre los PFNM que merecen atención se encuentran las plantas tintóreas (Stramigioli, 2007). Estas son aquellas obtenidas a partir de especies vegetales y algunos insectos, los cuales pueden ser considerados biorecursos renovables, sostenibles e inocuos que presentan en sus diferentes órganos altas concentraciones de principios colorantes como por ejemplo *Rubia tinctorum* L., *Anchusa tinctoria* L., *Curcuma longa* L. e *Indigofera tinctoria* L. (Stramigioli, 2007).

Los artesanos tradicionalmente han tomado los tintes del ambiente que los rodea, de allí que sus producciones se asocian a los colores y formas de su territorio. Según Erdmann Gormsen (1991), la cultura local es *“la totalidad de las formas de vida típicas de un pueblo en un área, histórica y espacialmente determinada, incluyendo creencias, valores, normas de comportamiento y la implementación material del medio ambiente”*. Es así como la artesanía, al ser realizada a partir de materias primas naturales obtenidas localmente, representan la interacción de un grupo con su medio y expresa por lo tanto su identidad como parte de una región.

Un aspecto importante dentro de los procesos de producción de artesanías basadas en recursos vegetales debe ser el uso sustentable de los mismos (Cunningham, 1987). La producción de artesanías puede resultar en una sobreexplotación de las plantas utilizadas,

debido a que en general existe un desconocimiento sobre las especies que se emplean (Fleuret, 1980) y en específico, como lo reporta Cunningham (1987) sobre las plantas tintóreas, las cuales muestran una especial vulnerabilidad a la sobreexplotación.

El proceso de destrucción de los bosques nativos priva a los pobladores de las zonas rurales de la posibilidad de servirse de los beneficios del bosque. Una solución a este problema lo constituye la creación de Jardines con especies tintóreas. Así en el marco del proyecto titulado “Diseño de tecnología e instalación de jardines con especies tintóreas del bosque serrano” (SECYT-UNC. 05/G459), se instaló un jardín tintóreo ubicado en la Pampa de Oláen (Provincia de Córdoba), para que los artesanos de la lana tengan disponible la materia prima y puedan organizarse en cooperativas de trabajo.

Los tintes en la naturaleza

El empleo del color ha acompañado al hombre a lo largo de la historia en sus manifestaciones artísticas, religiosas y en su vestimenta. Treinta y cinco mil años antes del nacimiento de Cristo, el arte paleolítico utilizaba el rojo, (obtenido sobre todo a partir de la tierra color ocre rojizo), color que se impuso porque remitía a dos elementos omnipresentes en toda su historia: el fuego y la sangre (Trueba, 2008).

Desde la prehistoria hasta la mitad del siglo XIX, el hombre ha teñido todo lo que le rodea, tal es el caso de algunas prendas encontradas en la India, China y Sudamérica, que datan de 4000 a 3000 A.C., siendo hasta hoy, las señales más antiguas sobre el uso de tintes para colorear textiles con plantas (Dean, 1999, Guerrero Maldonado, 2008).

Desde la antigüedad los colores más difíciles de obtener a partir de la naturaleza han sido el rojo y el azul. El color rojo fue un color admirado y se le confiaban los atributos del

poder, es decir, los de la religión y la guerra. Evidentemente se destacó porque rompía con el entorno, puesto que en la naturaleza apenas está presente (Marzocca, 2005).

Gracias al descubrimiento de diversos tintes extraídos de plantas y animales se originó la industria de la fabricación de colorantes, lo cual impulsó a la industria de las telas. Entre muchos otros, el índigo (extraído de *Indigofera tinctoria* -Familia *Fabaceae*) y la alizarina (extraída de *Rubia tinctorum*- Familia *Rubiaceae*), fueron utilizados ampliamente hasta mediados del siglo XIX, en textiles y pieles. El descubrimiento de la mauveína, sintetizada por primera vez en 1856 por William Perkin, marcó el inicio de la industria de los colorantes sintéticos (Devore y Muñoz, 1969; Martínez, 2012).

Existe constancia del uso de sustancias tintoreas en *Rubiaceae*, que datan del 2500 A.C, hallados en el ropaje de momias de un pueblo egipcio, habiéndose utilizado la raíz de *Rubia tinctoria* Linn para obtener colores rojos. Esta misma especie se utilizaba para ocasiones ceremoniales y para los uniformes de guerra de los espartanos (Guerrero Maldonado, 2008).

A lo largo de los siglos, los tintoreros de origen indio y turco fueron refinando una compleja técnica que combinaba las raíces de la rubia con sangre de becerro y excremento de oveja, para crear un rojo brillante que fue conocido como rojo turco (Johnson , 2013).

En Europa, *Rubia tinctoria* fue la planta de mayor importancia económica, convirtiéndose en el símbolo de riqueza de Holanda en los siglos XV-XVII y llevando a Francia a ser el primer productor europeo en 1782, hasta que la revolución francesa arruinó a muchos productores (Cedano y Villaseñor, 2006).

La familia *Rubiaceae*

La familia *Rubiaceae*, es la cuarta familia de plantas vasculares con mayor número de especies. (Steyermark, 1974). Comprende 650 géneros y 13.000 especies (Delprete, *et al* 2002, Delprete, *et al* 2004). Está subdividida en tres subfamilias: *Rubioideae*, *Cinchonoidea* e *Ixoroideae*. La diversidad de la familia todavía no está totalmente explorada ni para la ciencia, ni para el beneficio social de la humanidad (Borhidi, 2012). Los integrantes de esta familia se constituyen en árboles, arbustos, sufrútices, hierbas, enredaderas o lianas; de hábitos terrestres o raras veces epífitas, algunas con rafidios; son plantas generalmente hermafroditas, dioicas o poligamodioicas. (Delprete *et al*, 2002).

Es una familia de distribución muy amplia (cosmopolita), concentrada en regiones tropicales y subtropicales. (Delprete *et al*, 2002). En Argentina se encuentran 41 géneros y 123 especies, de las cuales 11 especies son endémicas (Zuloaga y Morrone, 1999).

Esta familia está constituida por plantas llamadas normalmente de la rubia, galio blanco o familia del café. Varias especies de esta familia que han sido cultivadas por su importancia económica, una de ellas es el café (*Coffea arabica*, *C. liberica*, *C. stenophylla*). En Europa está en vías de abandono el uso del cuajaleche (*Galium verum*), que se utilizaba para cuajar la leche, y algo parecido está pasando con *Rubia tinctoria*, de la cual hace tiempo se utilizaba el pigmento rojo de las raíces en las tintorerías (Delprete *et al.*, 2004).

Al ser una extensa familia, con muchos géneros y especies, presenta una gran diversidad de compuestos químicos. Entre los metabolitos secundarios, se caracteriza por poseer iridoides y seco iridoides glicósidos, terpenos, alcaloides carbolínicos, indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos y benzilisoquinolínicos; y una gran variedad de polifenoles (Núñez Montoya, 2002). Entre los polifenoles se pueden encontrar: acetofenonas,

cromonas, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas, catequinas, antraquinonas (AQs), naftoquinonas y quinonas (Nuñez Montoya, 2002).

En las especies tintóreas de esta familia, los metabolitos secundarios informados como los responsables de la tinción son las AQs, que constituyen el grupo más numeroso de las quinonas naturales, siendo la base y fuente de una importante cantidad de colorantes. (Bechtold, 2009). La producción de estos metabolitos secundarios esta relacionada con condiciones ambientales adversas, como por ejemplo la falta de nutrientes y déficit de agua, que pueden hacer que aumente la síntesis de sustancias de defensa, basadas en carbono, perteneciente al metabolismo secundario. La confirmación de este balance carbono/ nutrientes, ha sido encontrada en especies que se desarrollan en lugares con baja disponibilidad de nutrientes o agua, en las que se produce un aumento de la concentración de taninos, ligninas, fenoles (Masa, 2011).

Una de las especies más estudiadas por poseer este tipo de pigmentos quinónicos es *Rubia Tinctorum*, se ha informado que se extrajeron un total de más de 35 compuestos antraquinónicos de sus raíces (Caro 2012). Esta especie crece en la región Mediterránea de forma espontánea (Tresserras, 2000) y ha sido cultivada en Europa desde la Edad Media, tanto por sus usos medicinales como por sus propiedades tintóreas. Su poder tintóreo se debe al alto contenido de alizarina (HAQS) presente en sus raíces (Tresserras, 2000). El contenido del colorante de di- y tri hidroxí antraquinona-glucósidos representa entre el 2 al 3,5 % del peso seco (Izhazi, 2002).

El género *Galium*

Dentro de la familia *Rubiaceas* se destaca el género *Galium*, perteneciente a la Subfamilia *Rubioideae* y a la Tribu *Rubieae*.

Galium es un género de plantas herbáceas anuales y perennes, constituido por 400 especies aproximadamente, distribuidas principalmente en las regiones templadas del mundo (Flores Almería, 2009). En América del Sur se encuentra principalmente a lo largo de la cordillera de los Andes (Bacigalupo, 1993).

Son hierbas de tallos cuadrangulares (Figura 1. 1), flores pequeñas, hermafroditas o unisexuales, polígamas o dioicas. Cáliz nulo. Estambres 4. Hojas en verticilos de (3) 4-8(-10), sésiles a subsésiles, isofilas, enteras o rara vez ásperas hasta denticuladas en los márgenes, sin domacios, 1-3-nervias, frecuentemente con grupos de células glandulares sobre todo hacia el ápice en el envés. Inflorescencias terminales o axilares, paniculadas a cimosas y bracteadas o las flores solitarias. Flores pediceladas o sésiles e involucradas, homostilas; limbo calicino diminuto o ausente, sin calicofilos; corola rotácea a campanulada o urceolada, blanca, amarillenta, verdosa, rosada a roja, glabra en el interior, glabra a puberulenta en el exterior, a veces con grupos de células glandulares hacia el ápice. Ovario 2-locular, los óvulos 1 por lóculo, basales. Frutos en esquizocarpos, dídimos o subglobosos, secos o carnosos, los mericarpos 2 o frecuentemente con 1 de éstos abortivo. Semillas elipsoidales, pegadas a la pared del fruto (Bacigalupo, 1993, citado de Forzza, 2010).



Figura 1. 1. Morfología de la parte aérea de *Galium aparine*. Otto Wilhelm Thomé: "Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz" (Thomé 1903)

Dentro del género, *Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb. es una especie de alto valor cultural en ciertas regiones de México y de Perú. Según el testimonio de los artesanos de la localidad Soledad Atzompa, Veracruz (México), es la que tiene mayor antigüedad de uso, lo cual le otorga un valor cultural especial para las tejedoras de dicha localidad (Trueba, 2008).

Galium hypocarpium se encontró documentada como una planta tintórea de gran aprecio entre otras culturas precolombinas del continente americano, como los Paracas y los Nazcas de Perú (Antúnez y Kay, 1989; Campos, 1998; Ortiz, 1968), significando un patrimonio cultural semejante entre éstas y la cultura náhuatl, de la región Zongólica de México (Campos, 1998).

Órganos subterráneos en el género. Algunos autores reportaron la presencia de raíces tintóreas dentro del género *Galium*, otros la presencia de estolones o rizomas en especies del género. Dempster (1990) y Bacigalupo (1993) mencionan que algunas tribus indígenas usaban las raíces del género *Galium* como tintóreas. *Galium latoramosum*, “raíz de teñir”, especie presente en Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay (Zuloaga *et al.*, 1999), ha sido utilizada desde la antigüedad para teñir en la gama del rojo y rosado (Trillo, 2004). Dempster (1990) y Roquero (2008) describieron a las raíces de las especies sudamericanas del género *Galium* como fibrosas y de color rojo intenso, de igual manera que Bacigalupo (1993) lo hace para *G. latoramosum*.

Asimismo, se citó la presencia de rizomas y/o estolones en varias especies del género (Ortega-Olivencia y Devesa, 2004; López Udías *et al.*, 2004) y una pequeña corona que enraíza en los nudos tanto en *G. quichense* (Dempster, 1990) como en *G. mollugo* L. (Mersereau y Di Tommaso, 2003). Para *G. odoratum* (L.) Scop., hierba perenne que crece en bosques caducifolios europeos, se citó la presencia de rizomas rastreros, que sirven como principal forma de dispersión de la especie (Lambinon *et al.*, 2004). Hasta el momento no hay registros en las especies en estudio de esta tesis, que aseguren el tipo de órganos subterráneos que estas presentan, ya que en general se habla de raíces, pero no se cita la existencia de rizomas / o estolones, dato que será de suma importancia conocer, pues al tener bajo poder germinativo, estos órganos servirán para la reproducción agámica.

La presencia de rizomas y su condición de perenne fueron descritos en *Galium crespianum* Rodr. por Torres *et al.* (2001), mientras que Trueba Sánchez (2009) y Hemcinschi *et al.* (2008), no lograron precisar el tipo de estructura que persiste como reservorio de yemas en *Galium hypocarpium* (L) Endl. Ex.Griseb.

Importancia y usos del género. Desde tiempos precolombinos muchas especies de este género fueron mencionadas en la literatura como fuente de tintes rojos, como es el caso de la cultura Paracas, cuyos mantos rojos fueron teñidos con estas raíces (Burger, 2009).

Numerosas especies del género presentan propiedades tintóreas similares a las que posee *Rubia tinctorum* L., como *Galium aparine* L. y *Galium verum* L. (Tresserras, 2000).

Además muchas de ellas, se han empleado con frecuencia en la medicina popular de distintas culturas (Bolívar, 2011). Se ha encontrado actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antiinflamatoria en *Galium mexicanum* Kunth (Bolívar, 2011). En la actualidad, se ha conseguido caracterizar y aislar algunos de los iridoides responsables de su actividad. A partir de 19 especies europeas de *Galium*, se aislaron 24 compuestos: 16 glucósidos iridoides, 2 glucósidos de seco iridoides y 6 saponinas triterpenoidales, responsables de las propiedades benéficas a la salud (Mitova, 2002).

También se ha registrado el uso de *G. aparine* como insecticida, por la actividad anti alimentaria que genera en el gusano cortador común (*Spodoptera litura*), debido a la presencia de la antraquinona aldehído nordamnacanthal (1,3-dihidroxi-antraquinona-2-al) identificada en dicha especie (Morimoto, 2002). Así mismo *Galium melanantherum* ha sido investigado por su actividad contra las hormigas (*Crematogaster scutellaris*) y las termitas (*Kaloterms flavicollis*) (Tzakou, 2007). *Galium verum* presenta una importante actividad antiviral (Mavi, 2004).

Las especies *Galium latoramosum* y *Galium bigeminum*, ambas silvestres, tienen una amplia distribución en las sierras de Córdoba y existen indicios de que fueron utilizadas como tintóreas y medicinales por los pueblos originarios y pobladores rurales (Trillo, 2004). Los colores obtenidos a partir de estas especies abarcan toda la gama de rojos y rosados (Trillo, 2004) y se muestran muy resistentes a la luz y al lavado. En la actualidad, los artesanos de la lana utilizan estas especies para obtener sus tintes, con el alto riesgo de diezmar las poblaciones naturales, ya que al no ser una especie cultivada y ser las raíces el órgano más utilizado (Bobone y González, 2009), su utilización implica la destrucción de la planta.

Galium latoramosum popularmente conocida como “chipe-chape”, “pega-pega”, “raíz de teñir” o simplemente “raíz”, es una hierba o subarbusto, de aspecto grácil (Figura 1.2 y Figura 1.3 a). Sus tallos son verdes y delgados, de sección cuadrangular, trepadores y apoyantes, muy ásperos al tacto. Las hojas son diminutas, de hasta 15 mm de largo, y se disponen de a cuatro en cada nudo. Las flores son pequeñas, agrupadas en densos racimos blanco-amarillentos. Los frutos son bayas esféricas, blanquecinas, de unos 3-4 mm de diámetro, de sabor dulzón. Su raíz tiene uso tintóreo y también se la utiliza en medicina tradicional, como inductora de aborto y anticonceptiva (Mugas *et al.* 2015). La especie se distribuye en el norte y centro de Argentina, se ha identificado su presencia en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, Misiones, Santa Fé, San Luis y Tucumán, es relativamente abundante en los bosques serranos (Trillo, 2004). La distribución en cuanto a metros sobre el nivel del mar es muy amplia, hayándose desde los 0-4000 m.s.n.m. Generalmente se la encuentra protegida bajo otras especies nativas con espinas como *Ziziphus mistol* (mistol), *Condalia buxifolia* (piquillín de la sierra grande), *Celtis ehrenbergiana* (tala), *Zanthoxylum coco* (coco), entre otras (Joseau, com. pers). En la Figura 1.3.b se aprecian las raíces del color rojo anaranjado que las caracteriza.

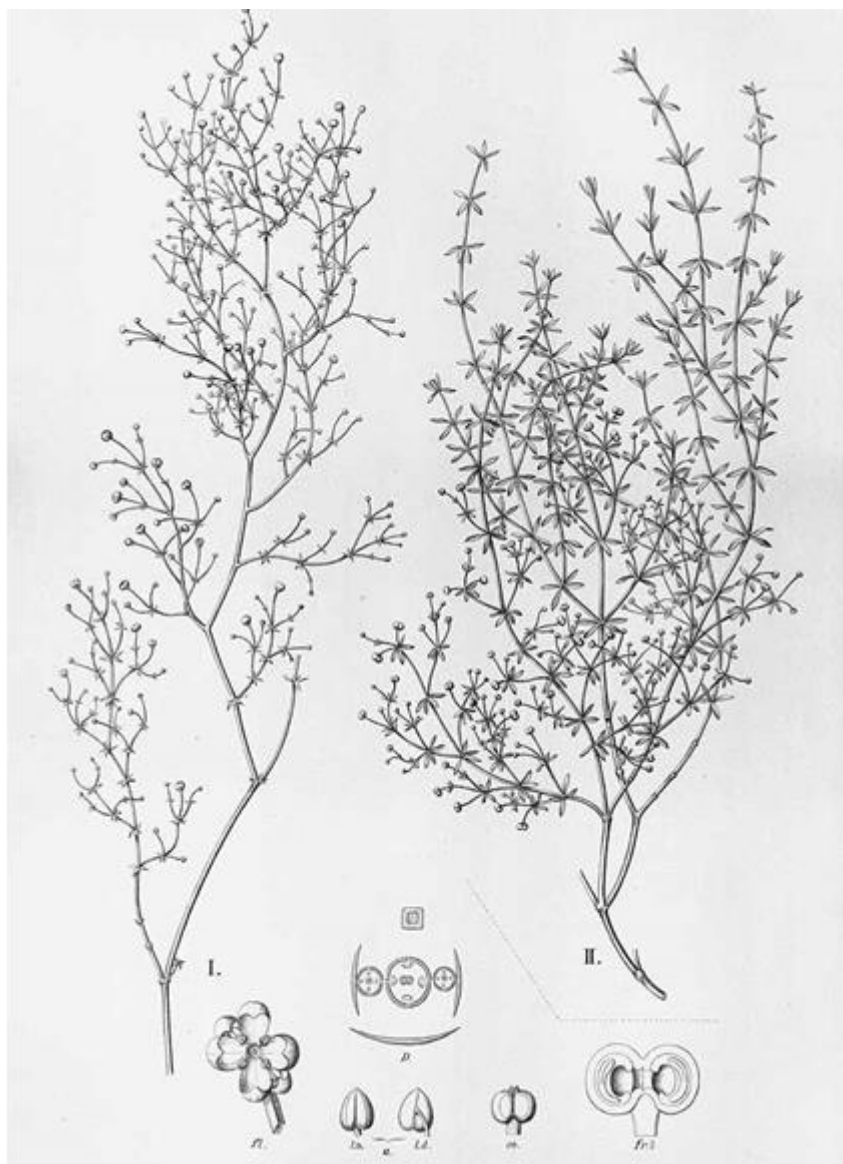


Figura 1.2. *Galium latoramosum* Clos. I y II. Parte aérea. Fr: Corte transversal del Fruto. Fl: Corte transversal de la flor.

Fuente: Instituto de botánica Darwinion, 2018.



Figura 1.3. . a. Ejemplar de *Galium latoramosum* cultivado en vivero. b. Detalle del sistema radicular con su coloración roja característica

Galium bigeminum Griseb. También conocida como *Relbunium bigeminum*. Se ha reportado su presencia en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos San Luis, con una distribución desde los 0- 1500 m.s.n.m. Es una hierba anual, bianual o a veces perenne, de tallos débiles, rastreros o apoyantes, glabros o con pelos generalmente retrorsos sobre los ángulos y a veces también en las caras de éstos; posee un anillo de pelos retrorsos en cada nudo foliar e involucre floral rodeando la inserción de las hojas, estípulas y brácteas. Hojas oblongas, menos frecuente linear-oblongas o elípticas, obtusas, diminutamente apiculadas, de 6-18 mm long. x 1,5 - 6 mm lat., glabras o con escasos pelos ásperos sobre el margen, raro sobre el nervio central. Pedúnculos unifloros, 1-3 en cada axilar foliar, más cortos que las brácteas, a veces mayores. Flor rodeada por 2-4 brácteas, 2 mayores y 1-2 menores o ausentes. Corola glabra amarillenta. Fruto glabro, blanco, carnoso, liso, algo rugoso en herbario, de 1,5-2,2 mm long. x 2,5 mm lat., bigloboso, comprimido lateralmente, separándose en dos mericarpos al desecarse, pericarpo adosado a la semilla. Semilla con suave fosita en la cara ventral. En cuanto a su uso, se la cita como antihemorroidal (Dempster, 1990). El área de distribución de la especie abarca el centro de

Argentina, sur de Brasil y Uruguay. En la Figura 1. 4 se observa un ejemplar de esta especie proveniente de la Pampa de Oláen.



Figura 1. 4. *Galium bigeminum* Griseb, ejemplar proveniente de la Pampa de Oláen

Caracterización geográfica de las zonas de recolección

Históricamente la vegetación de las Sierras de Córdoba ha sido dividida en tres pisos o cinturones altitudinales de vegetación (Luti *et al.*, 1979). El primero de ellos es el Bosque Serrano, que se ubica entre 500 y 1.300 m.s.m., encontrándose principalmente en valles, quebradas y laderas escarpadas. Por arriba del bosque serrano, se encuentra el piso de

Romerillar o Matorral Serrano, entre los 1.300 y 1.700 m.s.m. y en la parte superior, se ubica el piso de los pastizales y bosques de altura.

La vegetación característica de este distrito es un bosque xerófilo a subxerófilo dominado por *Schinopsis marginata* Engl. y *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl., formando bosques más o menos densos y puros en los faldeos más húmedos y frescos, predominando en la ladera Sur y Sureste. El otro elemento principal del Bosque Serrano es *Zanthoxylum coco* que presenta crecimiento aislado, llegando a las mayores alturas de este piso.

El problema particular

La producción de artesanías puede resultar en una sobreexplotación de las plantas utilizadas, en especial las plantas tintóreas, ya que muestran una especial vulnerabilidad a la sobreexplotación, por lo que resulta de mucha importancia domesticar dichas especies para hacer un uso sustentable de las mismas a través de su cultivo (Cunningham, 1987).

En el caso de las especies del género *Galium* spp, implica la destrucción de la planta, ya que los órganos utilizados son las raíces (Bobone y González, 2009). Al ser la extracción del tinte un método destructivo, es importante realizar cultivos para luego hacer un uso sustentable de dichos órganos tintóreos.

El manejo tradicional de especies tintóreas para la elaboración de productos artesanales es el resultado de un conocimiento que fue adquirido desde hace muchos años y transmitido a través de generaciones. La reducción de áreas de crecimiento natural de estas especies implica la disminución en la disponibilidad de materias primas para la elaboración de productos tradicionales y a su vez con el tiempo se va perdiendo también parte del conocimiento tradicional sobre tintes naturales. Siva (2007) asegura que no existe suficiente información sobre las plantas tintóreas y su uso. Por esto, que es necesario

realizar una documentación adecuada de las técnicas y conocimiento desarrollados por distintas culturas sobre la utilización de las plantas, (Mahanta y Tiwari 2005).

Caracterización morfológica

Entre las especies que producen tonalidades en la gama del rojo, se incluyeron en el jardín tintóreo de la Pampa de Oláen *Galium latoramosum*, “raíz de teñir” (Trillo, 2004), *Galium richardianum*. ssp. *richardianum*,” raíz para flujo” y *Galium bigeminum*, que crece en la Pampa de Oláen (Bobone y González, 2009). Sin embargo, nuestro equipo de trabajo ha identificado poblaciones de *Galium* en varias regiones de Córdoba (Joseau, com. pers.). También se incluyeron en el Vivero Forestal Educativo (VFE) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de Córdoba (FCA-UNC) plantas de *G. latoramosum* y de *G. bigeminum*, pertenecientes a 6 poblaciones diferentes de las sierras de Córdoba, Argentina. Al momento se desconoce si existen diferencias en adaptación y crecimiento de las distintas poblaciones en vivero y a campo. Para ello se caracterizó morfológicamente a las poblaciones de crecimiento espontáneo y a la descendencia en condiciones de cultivo. Tampoco se conoce si la capacidad tintórea de estas especies, en cuanto a producción de raíces y concentración del tinte es independiente de la zona de origen.

Al momento de plantear esta tesis, se desconocía el tipo de estructuras morfológicas subterráneas que poseían las especies en estudio. Es decir no existían estudios que indicaran si *G. latoramosum* y/ o *G. bigeminum*, poseían estolones y / o rizomas además de raíces, dato importante a la hora de conocer las diferentes formas de reproducción de ambas especies.

En cambio, si existen datos para otra especie del género que ha sido recientemente estudiada en Europa: *Galium odoratum*, donde Lambinon *et al.* (2004) comunican que dicha especie posee un rizoma rastrero. Otros autores señalan que *G. odoratum* en

condiciones naturales, se propaga en su gran mayoría, por reproducción asexual, es decir clonal (Petersen y Philipp 2001). Al momento del inicio de esta tesis tampoco se conocía si los diámetros de las raíces o si la edad de éstas, influyen en la cantidad y calidad del tinte, en cambio sí se han encontrado datos interesantes al respecto para *Rubia tinctorum*. En cuanto a los diámetros de las raíces, Grieve (2018) detalla que: “*la raíz principal y las laterales se secan por separado ya que sus productos se consideran diferentes, siendo el de la raíz principal mejor*”. Otro dato interesante es que al tercer año las raíces incrementan un 70 % su diámetro (Rahman, 2013).

Hasta el momento, no se conoce la anatomía de la raíz de *G. latoramosum*, por lo cual es importante estudiarla, para conocer dónde están alojados los pigmentos. Rahman en el año 2013 cita para *Rubia tinctorum*: “*las raíces están cubiertas con una corteza negruzca, debajo de la cual son rojizas, con una médula amarilla pálida. Esas diferencias tienen repercusión en la industria, ya que, en Francia, después del secado en hornos, la capa exterior se trilla y se pulveriza y se envasa por separado como un producto inferior llamado madder comercial. Las raíces despojadas se vuelven a secar, se pulverizan y se muelen tres veces, el producto final es de mayor calidad*”.

Es necesario determinar los estados fenológicos de *G. latoramosum*, en condiciones de cultivo para, en un futuro, poder relacionar los estadios fenológicos con la producción de órganos subterráneos, cantidad y calidad del tinte. Al respecto, para *G. odoratum* se cita que el contenido de AQs en el rizoma varió en las diferentes etapas fenológicas del cultivo. Se registró una disminución del contenido total de colorante, y de alizarina y purpurina durante el período de floración y una acumulación neta en la etapa de amarilleo de la hoja (Boussadia, 2015).

Domesticación

Desde hace miles de años el hombre ha aprendido a tomar de la naturaleza los recursos que le son favorables. Una manera de aprovechar estos recursos es a través de la domesticación, que ha sido definida como una manipulación activa en el ciclo de vida de las plantas por parte de los humanos para que las generaciones siguientes de plantas sean de mayor utilidad para el hombre.

La domesticación de los recursos naturales nativos es un elemento básico para emprender iniciativas de desarrollo agroindustrial, que buscan fortalecer el valor agregado de la materia prima. A su vez contribuye a recuperar la diversidad vegetal útil mediante: la disminución del extractivismo (práctica que conduce a la pérdida de recursos naturales), promueve la conservación del medio ambiente y asegura el suministro de materia prima de calidad (producida en sistemas de mayor sustentabilidad) y el abastecimiento de los volúmenes de materia prima requeridos en un proceso de industrialización que requiere grandes volúmenes. A su vez, permite una estandarización en el contenido de ingredientes activos y poblaciones homogéneas de plantas necesarias para su producción, procesamiento y utilización. (Davies, 2004).

Cultivo y propagación. Si bien *G. latoramosum* posee estolones y rizomas que permiten una reproducción asexual (Rojas *et al.*, 2016), la propagación por semillas aporta a la variabilidad genética de la especie y a la conservación del germoplasma vegetal. Así Bobone *et al.* (2009) estudiando la calidad de la semilla de *G. latoramosum*, llegaron a la conclusión que la misma posee dormición, puesto que la germinación fue baja (PG=37 %).

La calidad física de las semillas, comprende entre otros aspectos la proporción de semillas llenas y bien desarrolladas, no infestadas por insectos o no afectadas por otro tipo de daño (Gold *et al.*, 2004). Por otra parte, se encuentran las semillas vacías, definidas por

ISTA (2009) como aquellas que están completamente vacías o que contienen solamente algo de tejido residual. Las semillas y frutos de la mayoría de las especies silvestres muestran heterogeneidad en el período de maduración (ENSCONET, 2009). Así, Kolb y Lindhorst (2006), citan para *G. odoratum* especie nativa de los bosques de Bélgica, que la producción de semillas por población individual es baja. Con respecto a la viabilidad y vigor de dichas semillas, citan que éstas tardan en germinar, llegando a demorar hasta 200 días (Reppert, 1985). Resultados similares fueron reportados por Rojas (2015) para *G. latoramosum*, quien observó/determinó un poder germinativo de 60 % en 34 días colocando las semillas en peróxido de hidrógeno al 40 % por una hora.

El porcentaje de germinación (% plántulas normales) evaluado a través del ensayo de germinación estándar, es un buen estimador de la calidad fisiológica de la semilla (ISTA 2009). Siguiendo la categorización establecida por De La Fuente *et al.* (2011) para especies nativas, en cuanto a su porcentaje de germinación (PG), se clasifica desde calidad alta (superior a 80 %) como por ejemplo la especie *Alibertia patinoi* (Escobar y Torres, 2013) a medianamente alta (60-80 %), pasando por calidad media (40-60 %) a medianamente baja (20-40 %). También hay especies que pueden variar mucho su porcentaje de germinación, como la semilla de una *Rubiaceae* ya domesticada *Coffea arabica* (González Vega *et al.*, 2015).

Esta variación puede estar relacionada a la dormición de las semillas que produce un retardo o ausencia en la germinación, por ende, metodologías para superar la dormición son necesarias. El origen de la semilla es un factor incidente en la dormición y el tiempo en que permanecen dormidas varía entre especies (Joseau *et al.*, 2013).

Estudios sobre tratamientos pre - germinativos de la semilla de *G. latoramosum*, serán enriquecedores para mejorar los índices de poder germinativo y así aportar datos que sirvan para futuras tareas de domesticación de la especie.

También es necesario conocer las características que favorecen la adaptación y crecimiento de estas especies, para poder domesticarlas. En cuanto a requerimientos edafoclimáticos, no hay información para las especies en estudio, pero sí hay registros sobre *Rubia tintórea* donde se afirma que produce raíces, con mejores tintes cuando se le adiciona cal al suelo durante el invierno (Fraile de Pablo, 2008). Expertos agrónomos reportaron que el mejor terreno para el cultivo de la rubia debía contener 40 % de cal, 27 % de arcilla, 26 % de sílice y 5 % de *humus*; para su abonado, aunque es una planta poco esquilante, se consideró bueno el estiércol añejo de ganado mayor (Río Martínez, 2013). Tampoco se conoce el momento óptimo de corte para obtener tintes de calidad.

Los conocimientos básicos para obtener el mejor método de cultivo y manejo de las especies de *Galium* para su domesticación en jardines tintóreos, serán un valioso aporte para un aprovechamiento sustentable de los recursos tintóreos.

En cuanto a sus necesidades lumínicas, si bien no hay registros para *G. latoramosum* y *G. bigeminum*, se ha encontrado información sobre *Rubia tinctorum* para la cual se indica que es poco exigente, pudiendo situarse en un lugar con semi-sombra o con exposición directa al sol indistintamente (Guillén, 2013). Para *G. odoratum*, Lambinon *et al.* (2004) informan que crece en bosques sombreados caducifolios europeos, principalmente donde predominan las hayas.

Ya que la obtención de los órganos subterráneos para obtener el tinte es un método destructivo y debido a que la especie posee bajo poder germinativo, es necesario conocer la capacidad de reproducción *in vitro* de *G. latoramosum*, para subsanar las dificultades de reproducción sexual y de esta manera poder obtener raíces de forma más rápida y también para futuros estudios de producción de AQs mediante cultivos celulares.

Se estima que el obtener colorantes naturales puros puede costar de 30 a 100 veces más que el producir colorantes sintéticos certificados, reduciendo con ello las posibilidades de explotación de estas fuentes naturales, sin embargo, las estrategias biotecnológicas en la producción de colorantes naturales que se han desarrollado en los últimos años son de gran importancia y podrían otorgar una serie de ventajas, entre ellas, las económicas. (Cano Morales *et al.*, 2008). Es por ello que es importante conocer en primera medida como es el comportamiento *in vitro* de *Galium latoramosum*.

La micropropagación, es un sistema de propagación asexual, que a partir de un segmento de una planta madre, da como resultado la propagación masiva de plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. Esta característica en donde a partir de una célula, se genera una planta, se llama “totipotencialidad”. Otras ventajas que se pueden citar es que se obtienen plantas de alto registro fitosanitario, ya que, al someter al tejido vegetal a este sistema de cultivo, se eliminan totalmente las enfermedades de tipo bacteriano y fúngico y en algunas ocasiones las de tipo viral. En algunos casos, es posible acortar los tiempos de producción de las plantas, permitiendo tener, en periodos y espacios relativamente pequeños un gran número de plantas (Salgado Garciglia, 2018).

Los cultivos celulares, han demostrado ser especialmente valiosos en estudios para determinar la ruta biosintética de las AQs. La composición del medio, en especial los reguladores de crecimiento presentes, se ha encontrado que ejercen efectos importantes en la síntesis de antraquinonas. El contenido de antraquinonas, encontrado en los cultivos celulares de plantas *in vitro* es algo inferior al de plantas *in vivo*. La composición de antraquinonas *in vitro*, también puede diferir de las que producen las raíces *in vivo*; sin embargo, debido al rápido crecimiento de las suspensiones celulares, es mayor la productividad a lo largo del sistema (Rahaman, 2013).

Una gran cantidad de producción de antraquinonas fue encontrada en medio Murashigge and Skoog (MS), suplementada con 5 μ M de AIA 3% de sacarosa, mientras que la adición de Kinetina (citoquinina) no tuvo efecto. Reportaron que mayores concentraciones de sacarosa (6-19 %) inhibieron el crecimiento en presencia de fitohormonas (5 μ M AIA y 5 μ M ANA). En medios libres de fitohormonas y con 12 % de sacarosa, se observaron máximos en el crecimiento y rendimiento de Antraquinonas (Rahaman, 2013). Este autor también cita, que éstas se formaron en cultivos celulares de *Rubia* cuando se utilizó la fitohormona 2, 4, D a diferencia de lo observado en *Morindona* spp. Kino-Oka *et al* (2001) encontraron que el cultivo celular crece mucho más lento en medios con glucosa que en fructosa.

Caracterización química

Las AQs son metabolitos secundarios que se han utilizado tradicionalmente como colorantes en la industria y también se registran usos medicinales, como por ejemplo laxantes (Gibaja, 1998). Pueden hallarse en la corteza y la raíz de los diversos géneros y especies de las familias *Rubiaceas*, *Rhamnaceas*, *Poligonaceas*, *Leguminosas*, *Liliaceas*, *Escrofulariaceas* y *Verbenaceas*, en los líquenes, hongos y en los insectos tintóreos de la familia de los Cócidos (Marcano, 2002). La característica de los pigmentos quinónicos es su color que va del amarillo pasando por el anaranjado, el rojo y hasta el negro (Bechtold, 2009).

Los principales compuestos colorantes HAQN de plantas de la familia *Rubiaceae* hallados en los géneros *Rubia* spp., *Galium* spp., *Morinda* spp., *Hypericum* spp., *Polygonum* spp. y *Cinchona* spp.) son alizarina (amarilla a roja), pseudopurpurina (naranja), purpurina (rojo oscuro), lucidin-3-*O*-primeverosida (rojo), ácido ruberitrínico (dorado -amarillo), nordamnacanthal (naranja) y munjistin (naranja-rojo).

Durante las últimas décadas, se ha observado un aumento en el interés por los colorantes naturales, debido a que presentan menores efectos nocivos sobre la salud humana; dentro de éstos, las hidroxiantraquinonas (OH-AQs), se encuentran ampliamente presentes en la naturaleza y están ganando creciente interés en la industria textil, alimentaria y cosmética (Caro *et al.*, 2012). Mugas *et al* (2015) purificaron varias antraquinonas, entre ellas una OH-AQs denominada *Lucidina primeverosido* (Lp), a partir de *G. latoramosum*. También hay antecedentes en *G. odoratum* (anteriormente *Asperula odorata*), donde se identificaron hasta once pigmentos antraquinónicos en las raíces, mientras que ninguna se pudo detectar en las partes verdes (Boussadia, 2015). Es necesario conocer los compuestos químicos responsables de las propiedades tintóreas de *G. latoramosum*.

Galium hypocarpium, “coral”, potencialmente cultivable, es una especie ampliamente distribuida en la región andina. Si bien produce poca biomasa de raíces, posee colorantes de alta afinidad con la lana. *Relbunium ciliatum* “antanco” en Perú, también usada para teñir lana mordentada con sulfato de aluminio de marrón-rojizo, contiene pigmentos antraquinónicos purpurina y munjistina. Pese a que existen numerosas especies de la familia *Rubiáceas* con las que es posible obtener la gama del rojo, sólo un número limitado de ellos tiene registro en el International Color Index, texto de referencia que busca unificar los nombres de las moléculas colorantes entre productores y consumidores de todo el mundo y registra los materiales colorantes validados, mediante un código numeral llamado Color Index Number (CI Number), que relaciona la clase química y un nombre internacional llamado Color Index Name (CI Name), el cual relaciona su uso (González Mina *et al.* 2004).

El color es una importante cualidad de los materiales y su percepción aporta datos sobre su calidad y estado de conservación, además es el primer parámetro evaluado por el consumidor y es crítico en la aceptación o rechazo de los productos (León *et al.*, 2006). La

mayoría de los colorantes naturales presentan baja estabilidad a la acción de la luz (en cuanto los comparamos con los tintes sintéticos) (Padfield, 1966).

Para lograr una adecuada caracterización de los colores se desarrollaron sistemas de medida que emplean "espacios de color" y "coordenadas de color" y permiten la especificación completa en el espacio tridimensional. En el espacio de color CIELAB (Figura 2. 6) el parámetro L^* representa la luminosidad del material y su valor varía en un rango de 0 que corresponde al color negro y 100 al blanco, a^* (varía de verde a rojo) y b^* (varía de azul a amarillo) con valores entre -120 y 120 para ambos casos y que representan las coordenadas cromáticas de este espacio. (Agudelo Laverde, 2012).

Las normas AATCC (American Association of Textile Chemists and Colorist) regulan las pruebas que se le hacen a las fibras, ya sea la decoloración, encogimiento, acidez u otros, en ellas se describe el procedimiento de cada prueba de solidez y como se determinan y evalúan las propiedades fisicoquímicas del tinte en las fibras teñidas. Para que un colorante sea considerado industrial debe cumplir una serie de propiedades imprescindibles, estas propiedades se miden mediante ensayos de solidez. (Matt *et al*, 2011; Sanz Tejedor, 2018).

Con respecto al rendimiento del órgano tintóreo y de los tintes en sí, hay poca información al respecto, pero para *Galium odoratum* se estima que el crecimiento de la raíz varía entre 20-40 cm / año pudiendo llegar a 1 metro / año (Petersen y Philipp 2001).

Para *Rubia tintórea*, en cuanto al rendimiento, en Inglaterra se reportan que en 0,005 m³ de tierra se pueden cosechar 850 gramos de raíces frescas (Roberts, 2009). Por otra parte, en Italia, hallaron que las producciones de alizarina extraídas de las raíces de una hectárea de *Rubia* de 30 meses de edad que crecen en una hectárea eran suficientes para teñir 16 toneladas de telas (González Mina *et al.*, 2004). Bobone y González (2009)

encontraron que son necesarios 5 g de raíz de *Galium latoramosum* o de *G. richardianum* para teñir de rosa 100 g de lana mordentada. Roberts (2009) asegura que los 850 gramos de raíces frescas producen alrededor de 110-120 gramos de raíces secas, es decir que el rendimiento sería de un 15 % de materia seca aproximadamente.

Con respecto a la época de cosecha, se ha informado para *Rubia*, que la edad mínima para la cosecha es de tres años, pero la mejor edad es de cinco años, cuando las raíces son gruesas. Las plantas de quince años producen raíces que tienen una pulgada de diámetro (Fraile de Pablo, 2008). Es necesario estimar la producción y calidad del tinte del órgano utilizado con fines tintóreos.

HIPÓTESIS

- Las poblaciones de crecimiento espontáneo del género *Galium latoramosum* y *Galium bigeminum* dispersas en las Sierras de Córdoba, se diferencian en sus caracteres morfológicos y químicos y en la interacción entre ambos.
- Las poblaciones de crecimiento espontáneo de *Galium latoramosum*, dispersas en las Sierras de Córdoba y cultivadas en vivero difieren en su adaptación y crecimiento según el grado de sombreo.
- Las semillas de las especies de *Galium latoramosum* sobre las cuales se aplicaron tratamientos pregerminativos tienen mayor poder germinativo.
- El rendimiento de los órganos subterráneos tintóreos y la concentración y calidad del tinte varían en las diferentes poblaciones de *G. latoramosum* y *G. bigeminum*.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar poblaciones silvestres del género *Galium*. para contribuir a su domesticación para su conservación y uso.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológicamente poblaciones de *Galium latoramosum* y *Galium bigeminum* de crecimiento espontáneo en las Sierras de Córdoba.
- Caracterizar morfológicamente a la descendencia de *Galium latoramosum* en condiciones de cultivo.
- Caracterizar colorimétricamente poblaciones de plantas madre y su descendencia de *G. latoramosum* y poblaciones de *G. bigeminum*
- Estimar la producción y calidad de los órganos tintóreos de *G. latoramosum* y *G. bigeminum*
- Determinar las propiedades fisicoquímicas de las fibras teñidas con tintes extraídos de las especies en estudio mediante la aplicación de pruebas de solidez.
- Identificar los compuestos químicos responsables de las propiedades tintóreas de *G. latoramosum*.

- Registrar los estadios fenológicos durante la etapa reproductiva en condiciones de cultivo de *Galium latoramosum*.
- Evaluar la viabilidad de las semillas de *Galium latoramosum* de crecimiento espontáneo.
- Multiplicar *in vitro* ejemplares de *G. latoramosum*.
- Evaluar el comportamiento de *G. latoramosum* bajo distintos niveles de sombreo.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se efectuó con material perteneciente a poblaciones de dos especies del género *Galium*: 3 poblaciones de *G. latoramosum* y 3 poblaciones de *G. bigeminum*. Todas las poblaciones pertenecientes a la provincia de Córdoba, Argentina.

En la Tabla 2.1 y Tabla 2.2, se muestran las principales características climáticas de las zonas de recolección y el número de ejemplares recolectados.

Tabla 2.1. Localización, características climáticas de las zonas de crecimiento y número de los ejemplares de *Galium latoramosum* colectados en distintas localidades de las sierras de Córdoba, Argentina

Zona	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Nº de Individuos (n)	pp media anual (mm)	Temperatura media mes Más cálido		Más frío
Zona 1								
La Estancita	31°06'42.8"	64°21'32.6"	679	30	693	22,1	9,1	
Zona 2								
La Cumbre	30°59'51"	64°28'32"	1.142	30	667	21,6	10,2	
Zona 3								
Ongamira	30°76'66"	64°43'33"	1.220	50	611	19,7	9,1	

Referencia: pp. Precipitación

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de De Fina, 1976 y del Servicio Meteorológico Nacional

Tabla 2.2. Localización, características climáticas de las zonas de crecimiento y número de los ejemplares de *Galium bigeminum* en distintas localidades de las sierras de Córdoba, Argentina.

Zona	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Nº de Individuos n	Pp media anual (mm)	Temperatura media mes(°C) más cálido más frío	
Zona 4							
Los Gigantes	31°20'14	64°53'14,6"	867	50	695	22,7	10,1
Zona 5							
Bialet Massé	31°15'00"	64°28'59"	653	10	684	23,5	10,3
Zona 6							
Pampa de Olaen	31° 5'2.09"S	64°30'7.41"	1150	20	667	20,6	8,5

Referencia: pp. Precipitación

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de De Fina, 1976 y del Servicio Meteorológico Nacional

Se registró además la variable “periodo libre de heladas”, es decir, el periodo continuo más largo de temperaturas sin heladas (≥ 0 °C) del año. En La Cumbre normalmente dura 234 días, desde aproximadamente el 17 de septiembre hasta aproximadamente el 8 de mayo. Dicho periodo en La Estancita es más prolongado, dura 274 días, desde aproximadamente el 4 de septiembre hasta aproximadamente el 4 de junio (Weatherspark.com, 2019). En Ongamira dura 249 días, desde aproximadamente el 10 de septiembre hasta el 16 de mayo, es decir intermedio entre La Cumbre y La Estancita.

Muestreo y recolección. Dentro de cada población se tomaron al azar entre 10 a 15 plantas (plantas madre). Se midió diámetro a la base, altura, exposición y vegetación acompañante de cada una de las plantas madre, así como estado sanitario. De cada planta madre se herborizaron tallos con cuerpos fructíferos para la medición de caracteres morfológicos conforme a las metodologías citadas por Molinero (1986), Matteucci y Colma (1982) y Passera (1986). Además, se recolectó una porción de raíz para la extracción del tinte, cuidando de no dañar la integridad de cada ejemplar, y cuerpos fructíferos para la determinación de la calidad de la semilla y producción de plantines en el Vivero Forestal Educativo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNC (VFE-FCA-UNC). Se extrajeron tres ejemplares (plantas hijas) muy cercanos a la planta madre escogida para introducirlos en vivero a fin de considerarlos representativos de cada planta madre, dichos ejemplares fueron nombrados con números consecutivos. La recolección se realizó entre los meses de diciembre a marzo. Cabe aclarar que todas las zonas muestreadas están en peligro de extinción debido a la ocurrencia de incendios y/o a los desmontes por la urbanización. (Cabido y Zak, 2010).

Identificación taxonómica. La identificación se realizó mediante las claves de Dempster, L. T. (1982) y Cabrera, A. L. (1993). La corroboración y actualización del nombre científico se realizó on line mediante el Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur de Zuloaga, F. O. & O. Morrone. Las porciones de ramas con hojas y flores fueron incorporadas al Herbario ACOR de FCA- UNC, indexado en el *Index Herbariorum*.

Procesamiento y acondicionamiento del material cosechado. Las plantas hijas que se recolectaron fueron llevadas al Vivero Forestal Educativo de la FCA. Se colocaron en envases soplados de 10 litros, con un sustrato de tierra y arena en una proporción 3-1. Se

colocaron en el umbráculo del VFE debajo de media sombra (60 %) y se regaron por riego de aspersión cada vez que fuera requerido.

Los frutos fueron limpiados y secados a la sombra sobre papel de diario, para impedir ataque de hongos. Luego fueron identificados y colocados en frascos plásticos herméticos y conservados en heladera.

Caracterización de las zonas de colecta. Desde el punto de vista fitogeográfico pertenecen al bosque serrano (Figura 2. 1). En dicha figura se muestra la ubicación geográfica de las 6 zonas donde se realizó la recolección de ejemplares. Los datos de ubicación fueron registrados por medio de un posicionador geográfico (GPS). Las poblaciones de *G.latoramosum* y de *G. bigeminum* de crecimiento espontáneo que se encuentran en seis ubicaciones, de las sierras de Córdoba, tanto en el Valle de Punilla, Valle de Calamuchita y Sierras Chicas fueron seleccionadas en base a estudios previos (Joseau et al., 2008, 2009).



Figura 2. 1. Regiones fitogeográficas de Córdoba donde se aprecia el Bosque serrano
 Fuente: Luti *et al.* 1979. Vegetación. En: Geografía Física de la Provincia de Córdoba.

Las 6 zonas de este trabajo se presentan en Figura 2.2 y se establecen como las poblaciones en estudio, todas pertenecientes a la región fitogeográfica del Bosque Serrano. En las zonas 1, 2 y 3 se recolectaron ejemplares de *Galium latoramosum*, en cambio en las zonas de estudio 4, 5 y 6 ejemplares de *Galium bigeminum*. Se brinda la siguiente descripción de cada zona que surge a partir de la bibliografía consultada y de los datos recabados al momento de la recolección de las plantas. Dicha información tiene el único fin de describir como se encontraba cada zona al momento del muestreo.

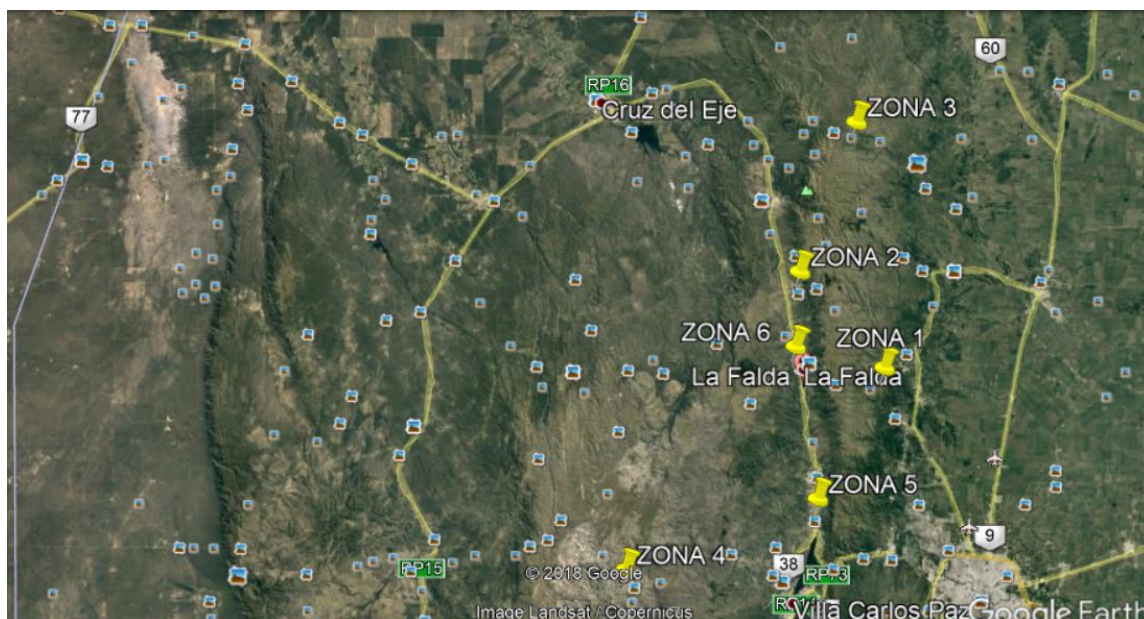


Figura 2. 2. Detalle de la ubicación geográfica de las 6 zonas estudiadas.

Referencia. Zona 1: La Estancita, Zona 2: La Cumbre, Zona 3: Ongamira y Zona 4: Los Gigantes, Zona 5: Biale Massé y Zona 6: Pampa de Olaen. Fuente: Google Earth.

Zona 1- La Estancita. Esta ubicada en el departamento Colón. La altitud es de 680 m.s.n.m La precipitación media anual ronda los 693 mm (Tabla 2.1). Se trata de una zona parcialmente desmontada, en donde las especies arbóreas predominantes fueron las propias de un bosque xerófilo a subxerófilo con predominio de *Lithraea molleoides* al igual que lo describió Cabrera (1976), también acompañaron especies como moradillo, sombra de toro, piquillín, cola de zorro, *Euphorbiáceas*, *Apocináceas*, *Poáceas*, *Eupatorium* spp.; las especies arbustivas más predominantes fueron jarilla (*Larrea divaricata*) y duraznillo negro (*Cestrum parqui*). También se encontró zarzamora (*Rubus fruticosus*), por debajo de la cual se observó el crecimiento de numerosos ejemplares de *Galium latoramosum*. En todos los casos *G. latoramosum* se encontró en los lugares más sombríos, debajo de árboles y arbustos generalmente con espinas.

Zona 2-La Cumbre. Pertenece al departamento Punilla. Se encuentra situada a 1.142 m.s.n.m y recibe aproximadamente 667 mm anuales de precipitaciones. Las plantas recolectadas en esta zona se disponían junto a especies nativas y gran cantidad de exóticas ornamentales. En general, estuvieron más expuestas al sol que en la zona 1. Las especies arbóreas acompañantes predominantes fueron molle (*Schinus molle*), tala (*Celtis erhenbergiana*) y castaños (*Castanea sativa*).

Zona 3- Ongamira: Pequeño paraje situado al norte del Valle de Punilla, Córdoba, Argentina. Se encuentra a una altitud de 1.220 m.s.n.m. Tiene suelos de areniscas triásicas de color rojizo, provenientes de los Cerros que han sido erosionados por la acción del viento y la lluvia. Su clima es templado serrano, siendo la orografía un factor fuertemente modificador de las condiciones meteorológicas. Las temperaturas medias del mes más cálido son de 19,7 °C y las del mes más frío de 9,1 °C. Sufre heladas de mayo a septiembre y ocasionales nevadas. Presenta un promedio pluvial de 611 mm anuales, con un máximo en primavera y verano. La sequía invernal es prolongada y puede llegar a ser crítica en septiembre-octubre. El viento dominante proviene del cuadrante norte y le siguen los del este, sudeste y noreste. Junio y julio son los meses de calma máxima y octubre y noviembre, los más ventosos.

De las zonas estudiadas, en esta fue donde se encontraron las plantas más grandes y de mayor edad de *G. latoramosum*. Por lo general se las encontró con mayor grado de exposición al sol que en las 2 zonas anteriormente descritas. La vegetación acompañante fue Chilca (*Flourensia oolepis*), Romerillo (*Heterotalamus alienus*), Retamilla (*Colletia spinosissima*), Carqueja (*Baccharis crispa*), Poleo (*Lippia turbinata*), Palo amarillo (*Aloysia gratissima*), Amor seco (*Bidens subalternans*), Altamisa (*Ambrosia tenuifolia*), Romerito (*Baccharis buniifolium*), Peperina (*Mintostachys mollis*), Abrojo (*Xanthium spinosum*), Chinchilla (*Tagetes minuta*), Molle de beber (*Lithraea molleoides*), Coco (*Xanthoxylum coco*), Tala (*Celtis tala*), Tala pispá (*Celtis pallida*), Aromito (*Vachellia*

caven), Algarrobo blanco (*Prosopis chilensis*), Algarrobo negro (*Prosopis nigra*), Tramontana (*Ephedra triandra*), Pingo – pingo (*Ephedra americana*), Pastizales de *Chloris*, *Aristida*, *Bouteloa*, *Setaria*, *Pappophorum* y *Cortadera selloana*.

Zona 4- Los Gigantes. Es el nombre que recibe un sistema montañoso ubicado en la región centro-oeste de la provincia de Córdoba; posee un desarrollo altitudinal de mayor a menor, en sentido norte-sur, y se encuentra dentro de las denominadas Sierras Grandes. Es el límite norte de la Pampa de Achala, a la cual pertenece, y junto a ella conforman las conocidas localmente como Altas Cumbres. Presenta una altura sobre el nivel del mar de 867 m.s.n.m. Posee un régimen pluviométrico promedio de 700 mm anuales, tanto en forma líquida (lluvia /neblina), como sólida (nieve). Hidrográficamente, la región es divisoria de aguas de dos grandes cuencas hidrográficas: la margen oriental tributa a la Mar Chiquita, y la occidental a las Salinas Grandes. La región se destaca por la gran amplitud térmica entre estaciones y el día y la noche, haciendo propicio el crecimiento de especies tales como el Tabaquillo (*Polylepis australis*), helechos, romerillo (*Bidens pilosa*), peperina (*Minthostachys verticillata*) Barba de piedra (*Usnea hieronymi*), molle (*Lithraea molleoides*) y pajonales de altura. Se encontró una población muy grande de *G. bigeminum*, a orillas del río San Guillermo. Es interesante destacar que todas las plantas allí recolectadas, se encontraban creciendo sobre la arena de las orillas de dicho río, el cual crece muy asiduamente y las plantas quedan completamente sumergidas bajo el agua, pero eso no les impide seguir viviendo.

Zona 5-Bialet Massé. Es una localidad situada en el centro del departamento Punilla, provincia de Córdoba. Se encuentra en la peri-llanura occidental del sur del Valle de Punilla, al oeste el río Cosquín prácticamente separa a la parte urbanizada de un ramal de la Sierras Chicas, precisamente la acción erosiva del citado río sobre las laderas de las Sierras Chicas ha creado un llamativo precipicio conocido (por su aspecto) como "*Labios de indio*" o "*Barrancas Coloradas*" y, por abundar en esas "barrancas" los loros

barranqueros también conocida esa zona como "Las Loreras". Se encuentra a 653 m.s.n.m. La flora característica de la zona, está conformada por: Horco quebracho (*Schinopsis haenkeana*), molle de beber (*Lithraea molleoides*), chañar (*Geoffroea decorticans*), Mistol (*Ziziphus mistol*), Sauces criollos (*Salix humboldtiana*), Tala (*Celtis tala*), así como Tunas (*Opuntia ficus-indica*) y pequeñas cactáceas.

Zona 6- Pampa de Oláen. Se encuentra en el Valle de Punilla, a 71 km de la Ciudad de Córdoba Capital. El predio dónde se realizó la recolección pertenece a la Fundación San Roque, dónde la Cooperativa Pampa de Olaen desarrolla sus actividades en convenio con la municipalidad de La Falda, Córdoba; el lugar se encuentra a 1.150 m.s.n.m., y las precipitaciones aproximadas anuales que se registran son de 667 mm; en dicho predio se instaló un jardín tintóreo con numerosas especies tanto arbóreas, como arbustivas y herbáceas, con el fin de que los artesanos de la lana puedan utilizarlas para darle valor agregado a sus prendas. Las especies arbóreas que se incorporaron fueron: Tala (*Celtis erhenbergiana*), Mato (*Myrcianthes cisplatensis*), Mistol (*Ziziphus mistol*), Aguariay (*Schinus molle*), manzano del campo (*Rupretchia apetala*), y las especies herbáceas fueron *Indigofera kurtzii*, *G. latoramosum* y *geranio core-core*, como arbustivas se incorporaron Piquillin (*Condalia microphylla*) y moradillo (*Schinus fasciculatus*). Antes de la plantación se encontró una población importante de *G. bigeminum*.

Para las poblaciones de *G. latoramosum* se hicieron los siguientes ensayos: análisis de semillas, propagación in vitro, cultivo bajo sombra, fenología de la etapa reproductiva y caracterización química. La caracterización morfológica, taxonómica, la evaluación de la capacidad tintórea y la estimación de la producción y calidad de los órganos tintóreos se realizaron con ejemplares pertenecientes a las 3 poblaciones de *G. latoramosum* y 3 poblaciones de *G. bigeminum*.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y QUÍMICA

Caracterización morfológica de las poblaciones de crecimiento espontáneo de *G. latoramosum* y *G. bigeminum* en los bosques de las Sierras de Córdoba

La caracterización morfológica de planta entera (parte aérea y de órganos subterráneos) se hizo para *G. latoramosum* y para *G. bigeminum*. Además se realizó un estudio anatómico, es decir una caracterización microscópica de los órganos subterráneos solo para la especie *G. latoramosum*.

Identificación de las estructuras morfo-anatómicas de los órganos tintóreos de *G. latoramosum*. Se trabajó con 3 individuos obtenidos al azar de *G. latoramosum* de cada población; ubicados en el Vivero Forestal Educativo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (VFE-FCA), que fueron acondicionados en macetas de 4 litros. Los especímenes estudiados fueron de tres poblaciones: La Estancita, Ongamira y La Cumbre.

Para la caracterización botánica macroscópica (estudio morfométrico), se midieron diámetro y longitud de estructuras radiculares con calibre electrónico tipo Essex y se tomaron fotografías con cámara Nikon Coolpix. En la Figura 2.3 se aprecian 2 ejemplares de *G. latoramosum*, luego de ser descalzados y lavados, previa medición.

La caracterización botánica microscópica (estudio anatómico) se realizó mediante cortes transversales de los órganos subterráneos. En algunos de los cortes no se emplearon colorantes para no enmascarar los pigmentos naturales de la especie. En otros cortes se utilizó una disolución de yodo molecular (I₂) y yoduro de potasio (KI) (Lugol), en una concentración de 150 mg/ml, para determinar la presencia de los gránulos de almidón. Las mediciones se realizaron en microscopio binocular marca Zeiss aumentos 10x y 40x y para

sacar fotos un microscopio Nikon trilocular con la ayuda de un micrómetro de ocular. En ningún caso se realizó inmersión. Se registraron las estructuras con cámara Nikon Coolpix unida a dicho microscopio.

Caracterización morfológica de plantas madres. De las plantas madres de *G. latoramosum* y de *G. bigeminum* introducidas en vivero, se tomaron al azar de cada población 10 individuos representativos por especie y se midieron los caracteres morfológicos.

Plantas madre de *G. latoramosum*. Se establecieron 28 caracteres para *G. latoramosum*, diferenciándose en caracteres de parte aérea y de parte radicular. Dentro de los caracteres de parte aérea se diferencian los caracteres de hojas. La Tabla 2.3 presenta la nominación de dichos caracteres y su abreviatura.



Figura 2. 3. *Galium latoramosum*. a- Planta entera. b- Detalle de raíces de dos poblaciones.

Caracteres de hoja. Sobre 5 hojas, se midieron las siguientes variables: largo foliar (mm), ancho foliar (mm) y la relación área del ápice del foliolúlo/área del rectángulo que contiene al ápice (mm). Se cuidó que todas las hojas seleccionadas estuvieran en la parte media de

los tallos seleccionados. En general se seleccionaban hojas a partir del 3 entrenudo comenzando desde la base del tallo. Dicha selección se debió a que la especie tiende a perder las hojas de los extremos de los tallos. Para esto se utilizó el programa Hoja 3.X (Verga, 2010). Dicho programa tiene por objeto generar tablas de mediciones morfológicas utilizando las hojas escaneadas y realizando las mediciones con una unidad patrón de 1 cm² (1 x 1 cm). APREC, proviene de dividir la superficie del ápice por el rectángulo que la incluye; y APTOT que se calcula dividiendo la superficie del ápice por la superficie total del foliolulo.

Caracteres de parte aérea. Los caracteres medidos fueron 15 y se detallan a continuación:

Diámetro a la base (DB) (mm): Se midió el diámetro del cuello de la planta utilizando para ello un calibre digital.

Número de tallos primarios (NT1): Se contabilizó la totalidad de tallos primarios, es decir, los que salían del cuello de la planta

Largo del tallo primario principal (LT1) (cm): con cinta métrica se midió la extensión del tallo primario principal, es decir el de mayor longitud.

Número de entrenudos del tallo primario principal (NENT1): Se contabilizó la cantidad de entrenudos del tallo primario principal

Largo de entrenudos del tallo primario (LENT1) (cm): Se midió con regla el cuarto entrenudo comenzando desde a base.

Número de tallos secundarios (NTS): se consideraron tallos secundarios aquellos que nacían de un tallo primario

Diámetro del tallo secundario principal (DT2) (mm): Se midió el diámetro del tallo secundario más largo, con calibre digital.

Largo de entre nudos del tallo secundario (LENT2) (cm): Se midió con regla el cuarto entrenudo comenzando desde la base del tallo secundario principal.

Número de entre nudos del tallo secundario (NENT2): Se contó el número de entrenudos en el tallo secundario principal.

Largo total del tallo secundario (LT2) Se midió con regla el largo del tallo secundario principal.

Largo de la parte aérea (LPA) (cm): Con cinta métrica se midió el largo total de la planta

Ancho de la parte aérea (APA) (cm): Con cinta métrica se midió el ancho ocupado por la planta

Peso fresco de la parte aérea (PFPR) (gr): Se separó cuidadosamente la parte aérea de la parte radicular, y se pesó en balanza digital.

Peso seco de la parte aérea (PSPA) (gr): La parte aérea, ya pesada, se llevó a estufa a 30°C hasta obtener peso constante.

Relación PA/PR peso fresco (PA/PR F) (gr): Se obtuvo la relación de peso fresco entre parte aérea y parte radicular.

Relación entre PA/PR peso seco (PA/PR S) (gr): Se calculó la relación de peso seco entre parte aérea y parte radicular.

Caracteres de parte radicular. Como el pigmento se extrae de los órganos subterráneos, se midieron los caracteres de dichos órganos. Para medir dichos caracteres fue necesario descalzar todas las plantas, lavar cuidadosamente sus raíces y proceder a medir los siguientes caracteres.

Largo de la parte radicular (LPR) (cm): Se midió, el largo total ocupado por raíces.

Ancho de la parte radicular (APR) (cm): Se midió con cinta métrica el ancho total ocupado por la parte radicular.

Número de raíces mayores a 1 mm de diámetro (NR>1mm): Con calibre digital se seleccionaron contaron aquellas raíces que median menos de 1 mm de diámetro.

Número de raíces menores a 1 mm de diámetro (NR<1mm): Con ayuda del calibre digital se seleccionaron las raíces que median más de 1 mm de diámetro, y se las contaron.

Peso fresco de la parte radicular (PFPR) (gr): Se separó cuidadosamente la parte radicular de la aérea y se pesó, con balanza digital.

Peso seco de la parte radicular (PSPR) (gr): La parte radicular se llevó a estufa a 30 °C hasta peso constante y se pesó en balanza digital.

Plantas madre de *G. bigeminum*. Para esta especie no se midieron los caracteres de hojas porque se observó que no era un caracterer relevante para diferenciar poblaciones, en cambio para *Galium latoramosum* sí, se observo que cambiaba el tamaño de las hojas según las distintas poblaciones. Los caracteres distintivos de *G. bigeminum* que no se encontraban en *G.latoramosum* fueron: presencia de corona, porcentaje de rebrotes nuevos (%RN), porcentaje de partes marrones o muertas (% PM), porcentaje de color morado (%CM) y rebrotes en partes moradas (% RPM). En Figura 2.4 se observa uno de los ejemplares medidos de *G. bigeminum* con sus características órganos subterráneos, y en la se aprecian los caracteres y sus respectivas abreviaturas.



Figura 2.4. Morfología de *G. bigeminum*. a- Planta entera descalzada b-Detalle de la abundante masa radicular de coloración rojiza

Caracteres de parte aérea. Los caracteres medidos fueron 13 y se detallan a continuación.

Diámetro a la base (DB) Se midió a la altura del cuello de la planta con calibre digital.

Largo del tallo primario principal (LT1) Se midió con cinta métrica la extensión del tallo primario principal, es decir el de mayor longitud.

Números de entrenudos del tallo primario principal (NENT1): Se contabilizó la cantidad de entrenudos del tallo primario principal

Número de tallos secundarios (NTS): Se contaron la totalidad de los tallos secundarios, es decirlos que nacían de un tallo primario.

Largo total del tallo secundario (LTTS): Con regla se midió el largo del tallo secundario principal.

Largo de entre nudos del tallo secundario (LENTS): Se midió con regla el cuarto entrenudo comenzando desde a base del tallo secundario

Diámetro del tallo secundario principal (DTS): Al tallo secundario más largo se midió el diámetro.

Porcentaje de rebrotes nuevos (%RN): Se contabilizó los rebrotes en una escala del 1 al 100 %.

Porcentaje de partes marrones o muertas (% PM): En una escala del 1 al 100 %.

Porcentaje de color morado (%CM): En una escala del 1 al 100 %.

Rebrotes en partes moradas (% RPM): En una escala del 1 al al 100 %.

Peso fresco de la parte aérea (PFPA): Se separó cuidadosamente la parte aérea de la parte radicular, y se pesó en balanza digital la parte aérea

Peso seco de la parte aérea (PSPA): Se llevó a estufa a 30 °C hasta obtener peso constante.

Caracteres de parte radicular. Para medir dichos caracteres fue necesario descalzar todas las plantas, lavar cuidadosamente sus raíces y proceder a medir los siguientes caracteres:

Largo de la parte radicular (LPR): Se midió con centímetro el largo total ocupado por raíces.

Ancho de la parte radicular (APR): Se midió con cinta métrica el ancho total ocupado por la parte radicular.

Número de raíces mayores a 1 mm de diámetro (NR>): Con ayuda del calibre digital se seleccionaron las raíces que median más de 1 mm de diámetro, y se procedió a contarlas.

Número de raíces menores a 1 mm de diámetro (NR<): Con ayuda del calibre digital se fueron seleccionando aquellas raíces que median menos de 1 mm de diámetro, y se procedió a contarlas.

Diámetro de la corona (DC): Se midió con calibre digital el diámetro de la corona.

Pelos radiculares (%PR): Se estimó la cantidad de pelos radiculares y se expresó en porcentaje.

Peso fresco de la parte radicular (PFPR): Se separó cuidadosamente la parte radicular de la parte aérea y se procedió a pesarla con balanza digital.

Peso seco de la parte radicular (PSPR): La parte radicular se llevó a estufa a 30 °C hasta peso constante y se pesó en balanza digital.

Relación PA/PR peso fresco (PA/PR F): Se obtuvo la relación de peso fresco entre parte aérea y parte radicular.

Relación entre PA/PR peso seco (PA/PR S): Se obtuvo la relación de peso seco entre parte aérea y parte radicular.

Caracterización morfológica de la descendencia de *Galium lataramosum*

De las plantas madres de las 3 poblaciones de *G. lataramosum* mantenidas en VFE, se cosecharon semillas y de las plantas nacidas (plantas hijas) se midieron caracteres morfológicos a los doce meses de edad. Dichas plantas procedieron de un ensayo de viabilidad realizado en VFE. Se sembraron en envases de polietileno cristal (100 µm) sin fondo, de 15 cm de longitud, 6 cm de diámetro. Se utilizó como sustrato una mezcla de tierra con arena en una relación 3:1. Se tomaron al azar 10 individuos de cada población y se midieron caracteres morfológicos de parte aérea y de parte radicular, que se encuentran detallados en Tabla 2. 3.

Tabla 2. 3. Caracteres medidos para la descendencia de *G. latoramosum* y sus respectivas abreviaturas

Caracteres			
Parte aérea	Notación	Raíz	Notación
Diámetro a la base	DB	Ancho de la parte radicular	APR
Número de tallos primarios	NT1	Largo de la parte radicular	LPR
Largo de tallo primario	LT1	Peso fresco de la parte radicular	PFPR
Largo de entrenudo de tallo primario	LENT1	Peso seco de la parte radicular	PSPR
Número de entrenudo de tallo primario	NENT1		
Número de tallos secundarios	NT2		
Diámetro de tallo secundario	DT2		
Largo de entrenudo de tallo secundario	LENT2		
Número de entrenudo de tallo secundario	NENT2		
Largo de tallo secundario	LT2		

Comparación de las asociaciones entre variables morfológicas de las madres y de las hijas por población de *Galium latoramosum*

Las relaciones entre las variables morfológicas de las madres y la descendencia pudieron ser establecidas por medio del análisis multivariado de correlaciones canónicas (ACC) (Hotelling, 1936). Este análisis se utiliza para establecer la relación lineal entre dos grupos de variables métricas, unas consideradas como independientes y otras como

dependientes. Es decir que el ACC aborda la asociación entre dos conjuntos o grupos de variables, identificando y cuantificando dicha asociación (InfoStat, 2016). Las combinaciones lineales de un par se denominan variables canónicas y a la correlación entre dichos pares se la llama correlación canónica. Los coeficientes de correlación al cuadrado (R^2) representan la proporción de la varianza total explicada por cada variable canónica.

Caracterización colorimétrica de poblaciones de plantas madre de *G. latoramosum* y su descendencia y de poblaciones de *G. bigeminum*

Ajuste del método de tinción. La puesta a punto del método de tinción se llevó a cabo utilizando órganos tintóreos [raíces, rizomas y estolones (Rojas *et al*, 2016)], completamente limpios, de individuos pertenecientes a la especie *G. latoramosum*, provenientes del VFE tomando como referencia las técnicas descritas por Bobone *et al* (2009). Se eligió *G. latoramosum* ya que se disponía de mayor cantidad de material vegetal de esta especie. Para determinar la metodología más eficiente se probaron diferentes variables. Cada uno de los tratamientos se llevó a cabo por triplicado. Luego la metodología ajustada de tinción se utilizó para teñir con las otras 2 especies utilizadas en esta tesis.

Preparación de la lana. Se utilizó como sustrato de tinción lana de oveja, previamente mordentada con alumbre y crémor tártaro. El mordentado es un procedimiento muy importante porque de él depende que los colores sean firmes y resistentes. Los mordientes como el alumbre o crémor tártaro son utilizados para aumentar la afinidad de las fibras con los colorantes (Lopez Lopez, 2013).

Se disolvieron en 3 litros de agua tibia, 20 gr de alumbre y 10 gr de crémor tártaro por cada 100 gr de lana a teñir (Stramigioli, 2007). Luego se sumergió la lana (previamente humedecida en agua) en el mordiente y se llevó a una temperatura entre 80-90° C durante una hora, removiendo las madejas de lana a intervalos de diez minutos. Posteriormente, se

dejó enfriar durante una noche y al día siguiente se retiró la lana del baño y se enjuagó con abundante agua para eliminar los excesos de mordiente que pudiesen haber quedado (Stramigioli, 2007). A continuación se describen los 8 ensayos que se llevaron a cabo para ajustar el método de tinción que se usara en todos los ensayos de la tesis.

Ensayo 1. Desmenuzado del material. En este ensayo se evaluó la mejor forma de desmenuzar el material vegetal para permitir la liberación de los pigmentos que están contenidos en los órganos subterráneos. Utilizando muestras de cinco gramos de raíces se probaron cuatro formas de desmenuzar el material: T₁- desmenuzado manual, T₂- desmenuzado con mortero, T₃- desmenuzado con molinillo de café. T₄- desmenuzado con licuadora, en este caso se colocaron las raíces junto con 100 cm³ de agua corriente dentro del vaso de la licuadora durante 5 minutos a máxima velocidad.

Una vez obtenido el material desmenuzado, se lo bolsa de muselina y luego se introdujo la bolsa dentro de un vaso de precipitado con 300 cm³ de agua y cinco gramos de lana de oveja, previamente mordentada y humedecida. Se colocó en el vaso de precipitado a fuego directo durante 45 minutos, cuidando que la temperatura nunca sobrepasara los 90 °C y revolviendo regularmente con varilla de vidrio.

Ensayo 2. Evaluación del pH Con el objetivo de determinar el efecto del pH sobre el teñido, se probaron tres soluciones con pH diferentes:

T₁- Solución de tinte testigo: El material vegetal fue licuado con 300 cm³ de agua destilada durante 5 minutos, luego se sumergió la muestra de lana a teñir y se llevó a fuego directo junto con durante 45 minutos, cuidando de que la solución no llegue al punto de ebullición. El pH de la solución se estabilizó en 7,4. T₂- Solución del tinte en agua destilada adicionada con 2 gotas de ácido oxálico hasta disminuir el pH de la solución a

2,3. T₃- solución del tinte en agua destilada adicionado con 6 gotas de carbonato de sodio hasta llegar a pH a 10.

Ensayo 3. Evaluación del tiempo de cocción Para evaluar el efecto del tiempo de cocción sobre la tinción se utilizó el T₁ del ensayo 2, es decir el testigo, pues aportó los mejores resultados. Se trabajó con pH neutro (7,4), es decir el propio de la solución acuosa. Se realizó una decocción, se colocó la solución obtenida en el T₄ del ensayo 1, es decir la que se obtuvo por licuado, en un vaso precipitado, a su vez los restos de material vegetal que no lograron ser completamente licuados se colocaron dentro de una bolsa de muselina y ésta dentro de la decocción. Se adicionaron 5 g de lana mordentada y se llevó a fuego directo durante T₁:15 min, T₂:35 min, T₃: 45 min, T₄: 55 min, T₅:75min.y T₆: 95 min, en todos los casos cuidando que la temperatura nunca sobrepasara los 90 °C. Luego se analizó visualmente y mediante colorímetro utilizando la escala L*, a* y b* con un espectrofotómetro de superficie (Minolta 508d, EUA).

Ensayo 4. Evaluación de la temperatura de decocción Con el fin de determinar la temperatura óptima para el teñido se probaron 4 diferentes temperaturas. Se utilizó la técnica del ensayo 2. El pH fue el de la solución acuosa (7,4), que arrojó el mejor resultado en el ensayo 2. Se colocó el preparado en vaso precipitado, se adicionaron 5 g de lana mordentada y se llevó a fuego directo durante 45 minutos. Los tratamientos fueron: T₁ la temperatura permaneció a 50 °C, en el segundo T₂ a 70 °C, T₃ a 90 °C y T₄:100 °C. La temperatura se controló con termómetro de alcohol y se mantuvo constante con el agregado de agua a temperatura ambiente.

Ensayo 5. Evaluación del efecto del diámetro de órganos subterráneos en el teñido. Se realizaron 2 tratamientos, ambos usando licuadora, pH neutro, 90 °C de temperatura, 45 minutos de decocción y proporción raíz/lana 1:1. Se hicieron 2 tratamientos en el T₁- se

seleccionaron 5 g de raíces de diámetros mayores a 1 mm y en el T₂ 5 g de raíces con diámetros menores a 1 mm. Se procedió según lo explicado anteriormente.

Ensayo 6. Evaluación del tiempo de licuado Con el objetivo de determinar el tiempo más adecuado de licuado del material vegetal, se hicieron 3 tratamientos: T₁: 2 min, T₂: 5 min y T₃: 7 minutos. Se trabajó con pH neutro a 90 °C durante 45 minutos. Se trabajó con pH neutro a 90°C durante 45 minutos.

Ensayo 7. Determinación de la mejor proporción raíz / lana Debido a que el material tintóreo se encuentra en las raíces y que el método utilizado para teñir es destructivo, se procedió a determinar cuál es la menor proporción de raíces, con respecto a la cantidad de lana, con la que se logrará obtener la tonalidad más firme e intensa. Para esto se probaron tres proporciones diferentes: T₁:1 parte de raíz /1 parte de lana T₂:2 partes de raíz /1 parte de lana y T₃:3 partes de raíz / 1 parte de lana.

Ensayo 8. Determinación del tipo de agua a utilizar Se realizaron 2 tratamientos T₁. Agua destilada, T₂. Agua del corriente de red. El procedimiento fue el mismo detallado en cada uno de los ensayos anteriores.

CARACTERIZACIÓN COLORIMÉTRICA

Para caracterizar colorimétricamente, las diferentes poblaciones, tanto de *G. latoramosum* como de *G. bigeminum*, de plantas madre, como de su descendencia, cultivadas en vivero o *in vitro*, se procedió a teñir porciones de lana, (con la metodología de tinción que mejor resultó del punto anterior), en todos los casos realizando los ensayos por triplicado.

Debido a que no todas las plantas producen la misma cantidad de raíces, y teniendo en cuenta que ello era una limitante, se corroboró, cuál era la superficie mínima factible de ser medida por el lector del espectrofotómetro de superficie (Minolta 508d, EUA).

Para lograr muestras que sean factibles de ser medidas con el espectrofotómetro, se cubrieron cartones de 3,5 x 7,5 cm (26,25 cm² de superficie) (Figura 2.5), con las lanas previamente teñidas para generar una superficie completamente lisa y homogénea. Las determinaciones se realizaron por triplicado.



Figura 2.5. Muestras de lana teñida correspondientes a un individuo de *G. latoramosum* de la población de Ongamira, preparados para su medición en colorímetro.

Caracteres cromáticos. Se utilizó el sistema CIELCH (Figura 2.6 a) que permite evaluar los atributos del color, identificar inconsistencias, y expresar de forma precisa sus descubrimientos en términos numéricos (Agudelo Laverde, 2012). El espectrofotómetro de superficie (Minolta 508d, EUA) (Figura 2. 6 b) utiliza la escala L*, a* y b* y de esta manera determina el color de las diferentes muestras. También se calcularon 3 índices E_{c1} , E_{c2} , E_{c3} (S, h, C) a partir de los 3 parámetros medidos con el espectrofotómetro de

superficie (Minolta 508d, EUA). En este espacio de color, L^* indica luminosidad, C^* representa croma o saturación, y h^* es el ángulo de matiz. El valor de color C^* es la distancia desde el eje de luminosidad (L^*) y comienza a 0 en el centro. El ángulo de matiz comienza en el eje $+a^*$ y es expresado en grados (ej. 0° es $+a^*$, o rojo, y 90° es $+b$, o amarillo) (Figura 2.8 a).

L^* = luminosidad

a^* = representa la variación de verde a rojo

b^* = representa la variación de azul a amarillo.

$S^* = C/L$ [Ec. 2]:

$h^* = \text{matiz o tono (Arcotangente } b/a) \text{ en grados [Ec. 3]:}$

$C^* = \text{color } (\sqrt{a^2+b^2})$ [Ec. 4]:

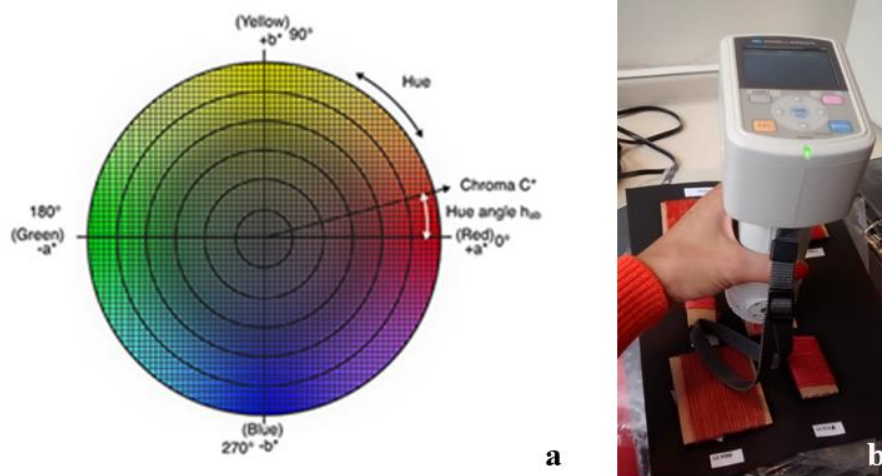


Figura 2.6. a) Espacio de color CIE L^*C^*H . b) Espectrofotómetro de superficie (Minolta 508d, EUA).



Figura 2. 7. Tonos correspondientes a los distintos ángulos de matiz o tono son, expresados en grados sexagesimales.

El parámetro H representa el tono o matiz, en definitiva el color propiamente dicho. Es una de las propiedades o cualidades fundamentales en la propiedad de un color. Es el estado puro del color, sin el blanco o negro agregados, y es un atributo asociado con la longitud de onda dominante en la mezcla de las ondas luminosas. Dicho parámetro es el que permitirá comparar en esta tesis de manera más precisa cuan cercano es el color de cada muestra al rojo puro (sin el blanco o negro agregado) (Valero Muñoz, 2011). Los tonos correspondientes a los distintos ángulos de matiz o tono son los que se observan en la Figura 2. 7.

Estimación de la producción y calidad de los órganos tintóreos de *G. latoramosum* y *G. bigeminum*

En este punto se relaciono la producción del órgano tintóreo (peso seco y fresco de raíces) con la calidad del tinte, medida en la escala CIELCH. Ambos parámetros fueron explicados en los insisos anteriores. Para proceder a teñir cada porción de lana proveniente de cada una de las plantas que se analizaron se siguió el protocolo propuesto, detallado en “*Estandarización del método de tinción*” (resultados).

Se evaluaron 10 plantas madres de cada una de las 3 poblaciones estudiadas de *G. latoramosum*, 10 plantas madres de cada una de las 3 poblaciones de *G. bigeminum* y 10 plantas hijas (descendencia) de las 3 poblaciones estudiadas de *G. latoramosum*.

Los caracteres de rendimiento de órganos subterráneos y los caracteres colorimétricos medidos están detallados en las Tabla 2. 4 y Tabla 2. 5. En la Tabla 2. 3 se observan los caracteres medidos para determinar el rendimiento y la calidad del tinte en la descendencia.

La calidad del tinte se midió como se explicó en el punto anterior con un espectrofotómetro de superficie Minolta 508d, EUA.

La correlación entre ambos caracteres se evaluó estadísticamente mediante análisis de componentes principales, análisis de conglomerados y manova.

Tabla 2. 4. Notación utilizada para representar los caracteres de producción y calidad de órganos tintóreos en *G. latoramosum*

Caracteres			
Raíz	Notación	Colorimétricos	Notación
Largo de la parte radicular	LPR	luminosidad	L*
Ancho de la parte radicular	APR	color	C*
Número de raíces mayores a 1 mm de diámetro	NR> 1mm	matiz	h*
Número de raíces menores a 1 mm de diámetro	NR< 1mm	S*	C/L
Peso fresco de la parte radicular	PFPR	coordenadas rojo/verde (+a indica rojo, -a indica verde)	a*
Peso seco de la parte radicular	PSPR	coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul)	b*

Tabla 2. 5. Notación utilizada para representar los caracteres de producción y calidad de órganos tintóreos en *G. bigeminum*

Caracteres			
Raíz	Notación	Colorimétricos	Notación
Largo de la parte radicular	LPR	luminosidad	L*
Ancho de la parte radicular	APR	color	C*
Número de raíces mayores a 1 mm de diámetro	NR> 1mm	matiz	h*
Número de raíces menores a 1 mm de diámetro	NR< 1mm	S*	C/L
Peso fresco de la parte radicular	PFPR	coordenadas rojo/verde(+a indica rojo, -a indica verde)	a*
Peso seco de la parte radicular	PSPR	coordenadas amarillo/azul(+b indica amarillo, -b indica azul)	b*
Diámetro de la corona	DC		
% pelos radiculares	%PR		

De la descendencia de *G.latoramosum* en condiciones de cultivo

A la descendencia de *G. latoramosum*, es decir plantas hijas obtenidas de semillas de plantas madres de cada una de las 3 poblaciones de *G. Latoramosum*, se le midieron 21 caracteres morfológicos y colorimétricos. Los caracteres colorimétricos (Tabla 2.4 y 2.5), fueron los mismos para las plantas madres de *G. bigeminum* y de *G. latoramosum* y para la descendencia de esta ultima especie, y a su vez los mismos que se midieron para las plantas de *G. latoramosum* obtenidas in vitro.

Determinación de las propiedades fisicoquímicas de las fibras teñidas con tintes extraídos de *Galium* spp. mediante la aplicación de pruebas de solidez

Se denomina “Solidez” a la resistencia que presenta el textil teñido a cada uno de los agentes que son capaces de modificar su color original (cambio de color) y/o originar un manchado sobre un testigo blanco (transferencia de color). Las normas AATCC (American Association of Textile Chemists and Colorist) regulan las pruebas que se le hacen a las fibras en ellas se describe el procedimiento de cada prueba de solidez y como se determinan y evalúan las propiedades fisicoquímicas del tinte en las fibras teñidas.

Se enviaron a analizar al laboratorio INTI Textiles Buenos Aires, Argentina, laboratorio de ensayo acreditado por el OAA con acreditación N° LE 007, 3 muestras *MI G. bigeminum* y M3 *G. latoramosum*, además se sumó una tercer especie perteneciente al género *G. richardianum* la que se denominó M2 y se la usó de forma comparativa, ya que en un comienzo se pensaban hacer más ensayos con esta especie, pero debido a que es anual y produce muy poca masa radicular, solo se la usó para este ensayo de solidez, ya que demandaba poco material pues las muestras eran muy pequeñas. Dichas muestras fueron todas elaboradas siguiendo el protocolo propuesto, detallado en “Estandarización del método de tinción” (resultados). Metodología ajustada de tinción con fibra de lana de oveja previamente mordentada, como se cita en .Los resultados de las solidez de los textiles son valorados en cambio de color y transferencia de color y se ejecuta empleando escalas de grises estandarizadas por American Association of Textile Chemist and Colorist (AATCC).

Solidez al lavado doméstico y comercial. Prueba determinativa de la resistencia presentada por el género teñido a la operación de lavado en sus distintas condiciones prácticas: Simula 05 lavados sea comercial o casero de las prendas de vestir lo cual genera pérdida de color del tejido y los cambios superficiales generados por la solución de detergente y la acción abrasiva de los lavados típicos a mano o domésticos sin cloro,

mediante un ensayo de 45 minutos. La acción abrasiva se da por los efectos de fricción del tejido contra el recipiente de lavado, la baja relación de baño y el impacto de las esferas de acero en el tejido.

El cambio de color se refiere a la muestra original comparada con la muestra lavada, en una escala que va del 1 al 5, siendo cinco cuando la fibra no sufrió alteración del color durante el lavado, y siendo 1 cuando sufrió el máximo de alteración (Tabla 2. 6). En este mismo ensayo se evaluó además la transferencia de color hacia otras prendas testigos, confeccionadas con otras fibras de color blanco. La escala va del 1 al 5. Correspondiendo el número 1 a la máxima transferencia de color, es decir, que mancha a las otras prendas y siendo 5 que no transfiere nada de color al lavarse. Las fibras que se utilizan como testigo para evaluar la transferencia del color son: acetato, algodón, poliamida, poliéster, acrílico y lana. Los mejores colorantes son los que no transfieren a ningún testigo. La prueba se realizó bajo la norma IRAM-AAQCT B 13550:2011 Ensayo A1S. Detergente E.C.E. (Norma IRAM, 2008).

Solidez al frote. La solidez al frote en seco y en húmedo. En este ensayo se verifica que el colorante no migre por frote a otra prenda (durante el uso). El resultado se informa en una escala que va del 1 al 5 (Tabla 2. 6). Método de ensayo: NORMA: IRAM-AAQCT B 13519:2009. Dispositivo de frote: cilindro. Pick up: 100 %. Tiempo de acondicionamiento de tejidos testigos y muestra: mayor a 5 horas. (Norma IRAM, 2008).

Solidez al sudor. La solidez al sudor, tanto ácido como básico. Se evaluó el cambio de color y la transferencia hacia otras fibras (acetato, algodón, poliamida, poliéster, acrílico y lana.). La escala de evaluación fue del 1 al 5 (Tabla 2. 6). Método de ensayo: norma: IRAM-MOCT B 13533:1997 (Norma IRAM, 2008).

Solidez a la luz. Prueba que determina el grado de resistencia a la degradación por la luz de un colorante determinado sobre el tejido, hilo o fibra, refiriendo el resultado de las pruebas a una escala con un patrón conocido; de 1 a 8 en el que 1 representa el grado más bajo (mayor sensibilidad a la luz) y el 8 el más alto (mayor resistencia). Se expone una porción de la muestra de fibra a la luz solar directa mientras que la otra porción se mantiene cubierta, esto durante un periodo de 24 horas. Método de ensayo: IRAM-AAQCT B 13529:1997. Temperatura de panel negro: 60 ± 1 °C. Temperatura de cámara: 35 ± 2 °C. HR: 30 ± 5 %. Irradiancia (300-400 nm): 60 W/m². La solidez a la luz es evaluada con escala de azules que va del 1 al 8. Siendo 8 el mejor valor y 1 el peor (Norma IRAM, 2008).

Coordenadas de color/Pasa-Falla. Método de Ensayo: Equipo: espectrofotómetro Modelo 650 de Datacolor. Características: doble haz; geometría: d/8'. Condiciones de calibración; especularidad: incluida, UV: incluido, abertura: 30 mm. Número de mediciones por muestra: 6.

Tabla 2. 6. Criterios de evaluación de las diferentes solidez

Para la solidez a la luz	Para los demás caracteres de solidez
1 = Escasa	1 = Escasa
3 = Regular	2 = Regular
5 = Buena	3 = Buena
7 = Muy buena	4 = Muy buena
8 = Excelente	5 = Excelente

Identificación de los compuestos químicos responsables de las propiedades tintóreas en *G. latoramosum*

Para identificar los compuestos químicos responsables de las propiedades tintóreas de esta especie, en primera instancia se obtuvo un extracto madre a partir del material vegetal, el cual fue particionado para realizar una primera separación de los compuestos químicos en sub-extractos (Figura 2.8). Se detectaron grupos o familias de compuestos químicos, mediante la aplicación de reacciones químicas de coloración y ensayos cromatográficos simples.

El material vegetal (10 g) se maceró con EtOH-H₂O (1:1) hasta agotamiento (Figura. 2.8). Una vez filtrado, dos alícuotas del extracto hidroalcohólico (filtrado I) se usaron para identificar las siguientes familias de compuestos químicos: taninos y proantocianidinas. El extracto restante se sometió a evaporación a presión reducida, a fin de eliminar el contenido alcohólico. Al eliminar el EtOH, se obtuvo el extracto acuoso I, de éste, se tomaron diferentes alícuotas para llevar a cabo la identificación de: hidratos de carbono, antocianinas, betacianinas, saponinas, asperulósido, flavonoides sulfatados, flavonoides glicósidos, antraquinonas glicósidos. Siguiendo la marcha analítica, del extracto acuoso I remanente se tomaron tres alícuotas de mayor volúmen que se particionaron, según se detalla en la Fig.2.9 para determinar la presencia de otros metabolitos secundarios tales como (antraquinonas glicósido y aglicones, flavonoides glicósidos y aglicones, fitoesteroides, alcaloides 3^{rios} y alcaloides 4^{rios}) (Núñez Montoya, 2002; Rondina y Coussio, 1969). La Figura 2.8 describe los ensayos químicos para identificación de distintos principios activos.

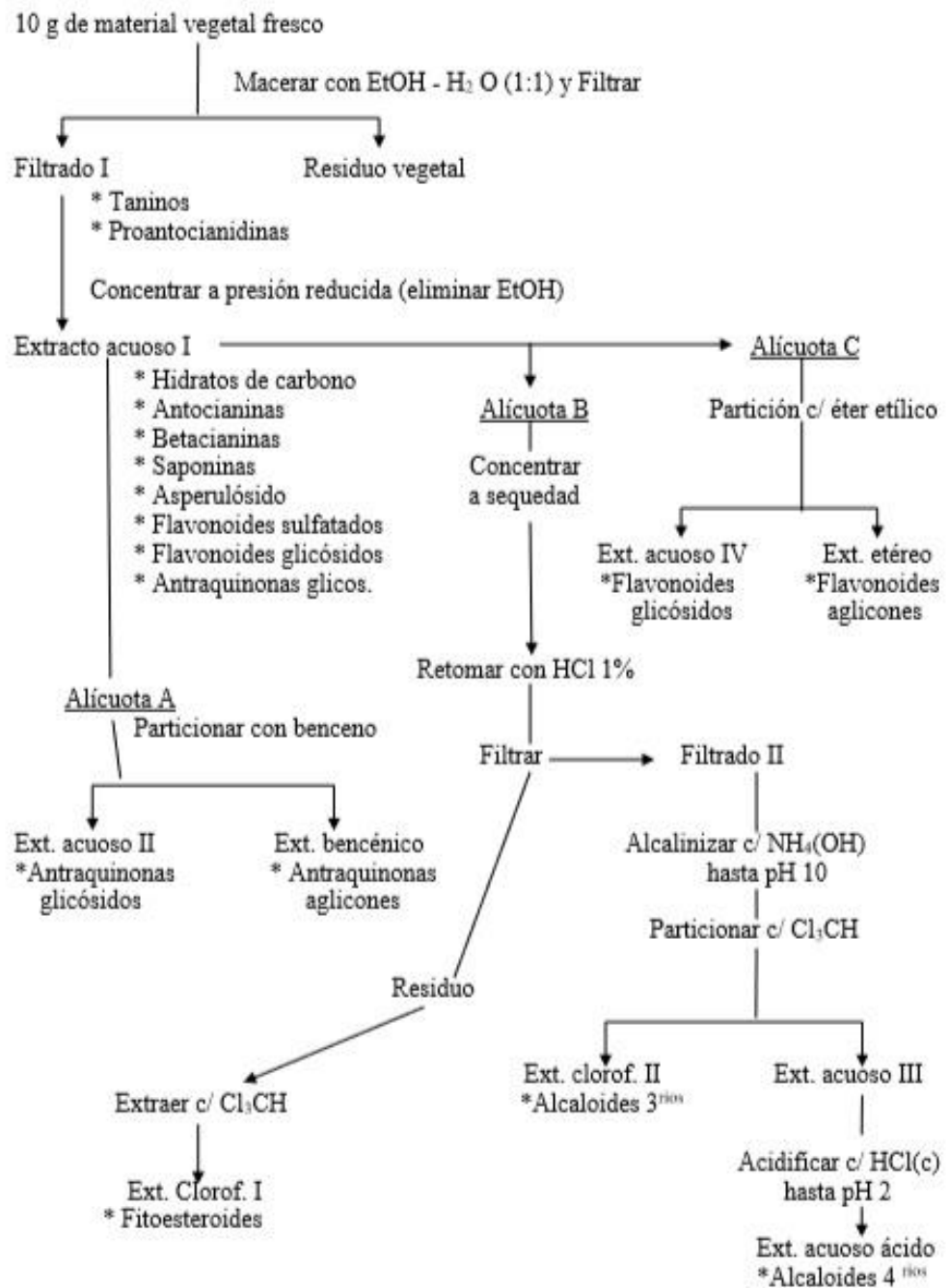


Figura 2. 8. Marcha analítica de raíz de *Galium latoramosum* para su estudio químico preliminar. Fuente: Rondina y Coussio, 1969.

El extracto obtenido a partir del material vegetal como se indica en la Figura 2.8 sufre una serie de procesos, realizándose en distintos estadios de esta marcha analítica las reacciones de identificación que caracterizan a diferentes familias de compuestos químicos (Rondina y Coussio, 1969). Para ello se establecieron los siguientes ensayos:

Ensayo para taninos. A 0,5 ml del filtrado I se agregaron 5 gotas de Cl_3Fe 1 %. La reacción se considera positiva si aparece coloración verde, azul o marrón. (Harborne, 1984).

Ensayo para proantocianidinas. A 1 ml del filtrado I se le agregó HCl(c) hasta pH 2 y se calentó a la llama. La reacción se consideró positiva si viraba a coloración a rojiza, con agregado de alcohol amílico o N-ButOH esta coloración pasa a la fracción alcohólica (Harborne, 1984).

Ensayo para hidratos de carbono reductores. Al extracto acuoso II (2 ml) se le agregaron 3 gotas de reactivo de Molich y luego, se vertió por las paredes del tubo $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{c})$ de manera cuidadosa para formar dos fases. Se considera positiva si el límite entre las dos fases es de color rojo (Evans, 1991).

Ensayo para antocianinas y betacianinas. Al extracto acuoso II se le realizaron los siguientes test para diferenciar estos dos tipos de estructuras (Tabla 2. 7) (Harborne, 1984). Si bien ambas presentan la misma coloración, son químicamente diferentes. Los primeros son derivados fenólicos y los segundos, derivados nitrogenados (Tabla 2. 7).

Ensayo para saponinas. A 2 ml del extracto acuoso II se le añadieron 3 ml de agua, se agitó vigorosamente y se dejó reposar 5 minutos. Si la espuma permanece, la reacción es positiva (World Health Organization, 1992).

Ensayo para asperulósido. Al extracto acuoso (II) de interés se le agregaron 5 gotas de HCl (c) y se calentó a la llama durante 3 minutos aproximadamente. La reacción se consideró positiva si aparecía una coloración verde con un precipitado oscuro (negro) (Briggs y Nicholls, 1954).

Tabla 2. 7. . Descripción de ensayos para diferenciar antocianinas de betacianinas en raíces de *G. latoramosum*

Test	Respuesta de antocianinas	Respuesta de betacianinas
Calentar con HCl 2M durante 5' a 100 °C	Color rojo que es extraído con alcohol amílico	Color rojo que se desvanece con el tiempo.
Agregar NH ₄ (OH) en gotas	Cambia de rojo a azul/verde	Cambia a amarillo
Cromat. en papel en HCl 1%	Rf de bajos a intermedios	Rf altos
CP en BAW (4:1:5)	Rf medios (10-40)	Rf muy bajos (00-10)
Electroforesis (10 mV) con papel Whatman n° 1 y buffer pH 2	Migra al cátodo	Migra al ánodo
Espectro visible en MeOH - HCl 340 a 600 nm	Máximo en el rango 505-535 nm	Máximo en el rango 532-554 nm

Ensayo para flavonoides sulfatados. Se agregaron 8 gotas de HCl(c) al extracto acuoso II y se calentó a baño maría durante 30 minutos, se dejó enfriar y se le adicionó una solución acuosa de Cl₂Ba. Se considera positiva si aparece un precipitado blanco (Markham, 1982).

Ensayo para flavonoides: Ensayo de Shinoda (A) *Glicósidos:* al extracto acuoso de interés (2 ml) se le añadieron 8 gotas de HCl(c) y limaduras de Mg. Si aparece una coloración roja que pasa al n-ButOH cuando éste es agregado (0,5 ml), se considera positiva la reacción

(Geissman, 1962) y (B) *Aglicones*: se concentró el extracto etéreo V a sequedad y se retomó con 2 ml de agua destilada y se procedió como se describió en el inciso anterior.

Ensayo para antraquinonas: Reacción de Bortraëger(A) *Aglicones (Reacción de Bortraëger directa)*: a 1 ml del extracto bencénico de interés (XIII) se le agregó 1 ml de KOH 10 % o NH₄ (OH). La reacción es positiva si aparece una coloración rosa – roja (Wagner *et al.*, 1984). (B) *Glicósidos (Reacción de Bortraëger indirecta)*: al extracto acuoso de interés (2 ml) se le agregaron 5 gotas de HCl (c) y se colocó a baño maría durante 60 minutos con el fin de hidrolizar los glicósidos. Se enfrió y se extrajo con benceno (Inoue *et al.*, 1981). A 1 ml de benceno se añadió 1 ml de KOH 10 % o NH₄ (OH). La reacción se considera positiva cuando aparece coloración rosa - roja en la fase inferior.

Ensayo para alcaloides. Con el extracto clorofórmico VIII y el extracto acuoso ácido X se realizaron pruebas de toque en una placa de sílica gel y luego, se agregó una gota de reactivo de Dragendorff. Se considera positiva si aparece una coloración rojo ladrillo (Harborne, 1984).

Ensayo para fitosteroides: Ensayo de Lieberman – Burchard. A 1 ml del extracto clorofórmico (filtrado XI) se le agregó igual volumen de anhídrido acético y 5 gotas de H₂SO₄(c). La reacción es positiva cuando aparece una coloración verde azulada (Stahl, 1969).

La abundancia relativa de los compuestos químicos identificados se llevó a cabo mediante reacciones de coloración. La abundancia relativa es una medida subjetiva dada por la intensidad del color generada en cada reacción.

Selección de métodos de extracción y análisis químico de los extractos obtenidos. Se probaron dos metodologías de extracción a baja escala, a fin de determinar cuál era la más adecuada para obtener la mayor cantidad de pigmentos.

Metodologías de extracción.

Metodología A: El material vegetal (2 g) seco y triturado se extrajo con EtOH-H₂O (1:1) mediante maceración con agitación esporádica hasta agotamiento (5ml 5 veces). El extracto hidroalcohólico fue concentrado a presión reducida para eliminar el EtOH. El extracto acuoso obtenido se particionó en ampolla de decantación con solventes de polaridad creciente (1 ml 5 veces): Benceno (Ben A), cloroformo (Cl₃CH A), éter etílico (Éter A), acetato de etilo (AcOEt A), quedando un extracto acuoso remanente final (Aq A) (Figura 2. 9).

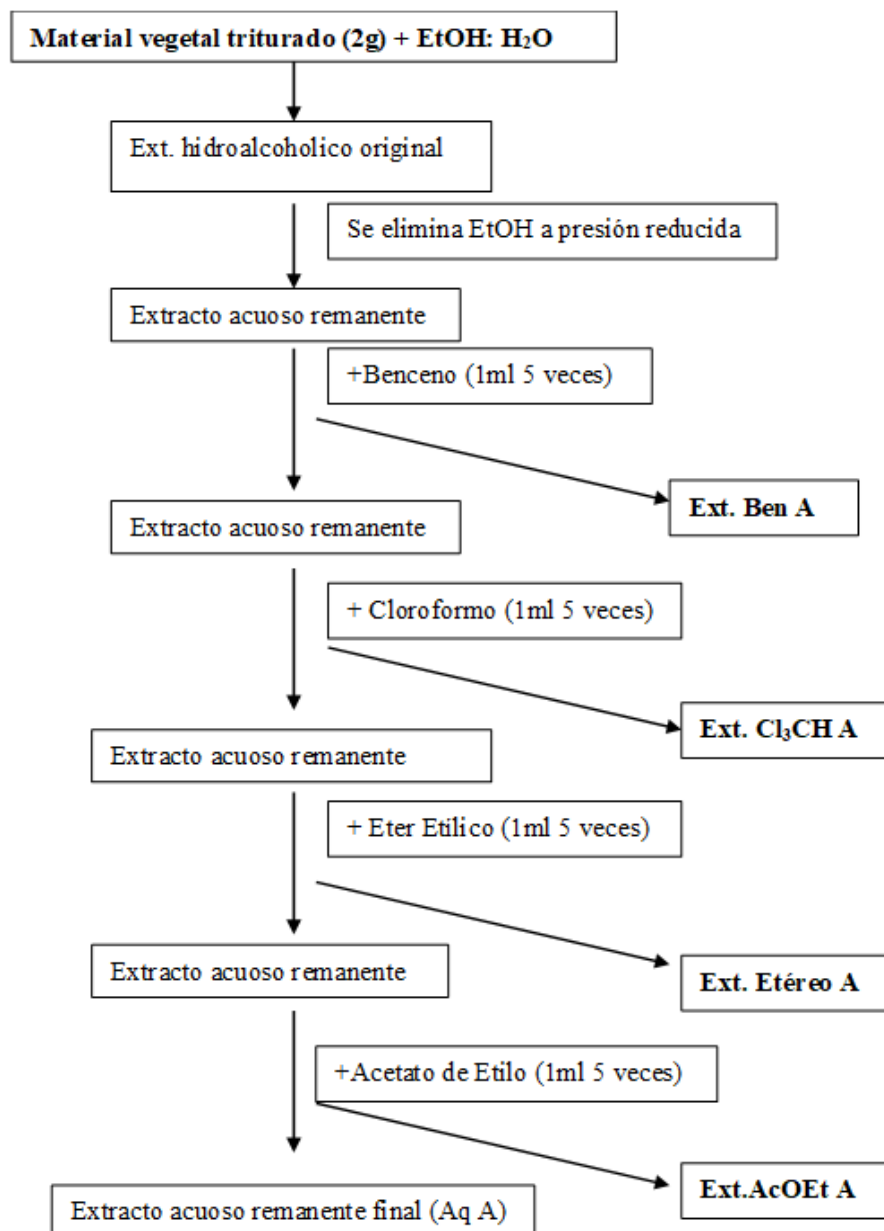


Figura 2. 9. Esquema de la metodología de extracción A: un extracto hidroalcoholico original, al cual se elimina previamente el contenido alcohólico, se particiona con solventes de polaridad creciente.

Métodología B: El material vegetal seco y triturado (2 g) se extrajo con solventes de polaridad creciente hasta agotamiento, dejando macerar en una ampolla de decantación con agitación esporádica. (Figura 2. 10).

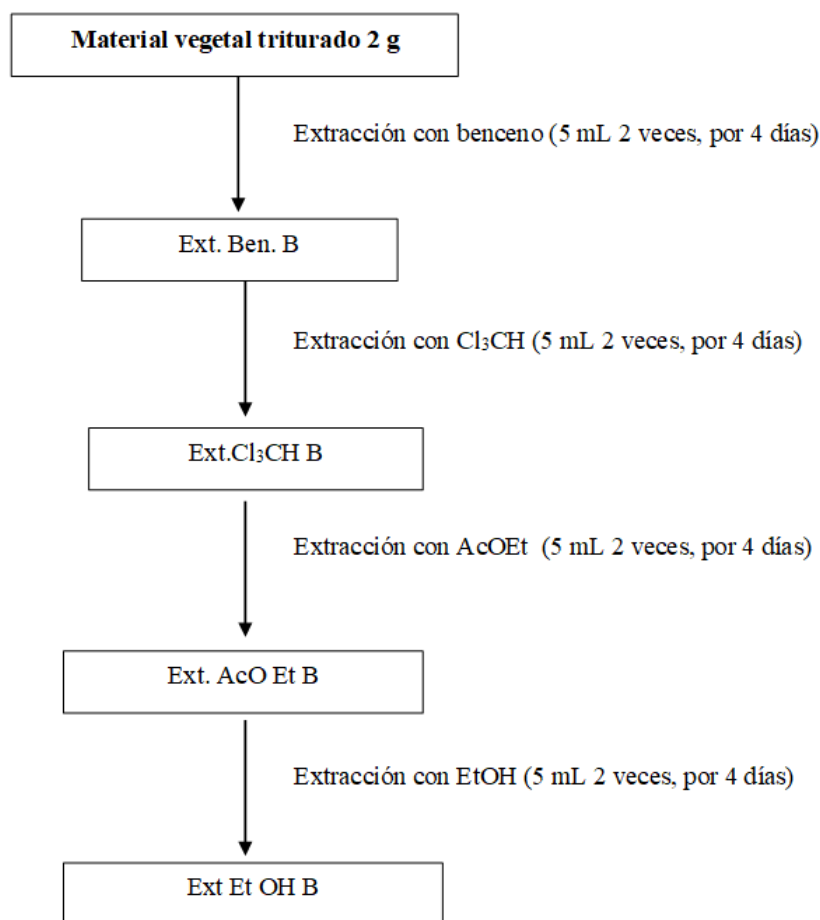


Figura 2. 10. Esquema de la metodología de extracción B: El material vegetal es extraído con solventes de polaridad creciente, aplicando maceración en una ampolla de decantación.

EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL A GRAN ESCALA. Se utilizó 90 g de material vegetal seco (raíces, rizomas y estolones) procedentes de Ongamira (Provincia. de Córdoba) cosechados en invierno (julio). Antes de comenzar el proceso de extracción se molió el material vegetal previamente seco en un molino con malla n° 6.

Se aplicó la metodología de extracción B, pero utilizando un aparato Soxhlet que permite extraer mayor cantidad de material vegetal, utilizar el mismo volumen de solvente

y es más rápido para agotar el Material Vegetal que una maceración. En este caso, se usaron 3 solventes de polaridad creciente: benceno, AcOEt y EtOH (Fig.2.11), eliminándose el Cl_3CH porque extrae similares compuestos que el benceno. Dicha selección estuvo determinada por la naturaleza fisicoquímica de los metabolitos que se quieren aislar y por la restricción de que ninguno (método y disolvente) debe producir alteraciones en ellos. Es por ello que la última extracción con EtOH se realizó mediante una maceración, debido a que se observó que el calentamiento con el aparato Soxhlet producía un cambio en el color del extracto; de esta manera, se evitó que el calor pudiera alterar la composición química de este extracto

Preparación de extractos para identificación de los principales pigmentos

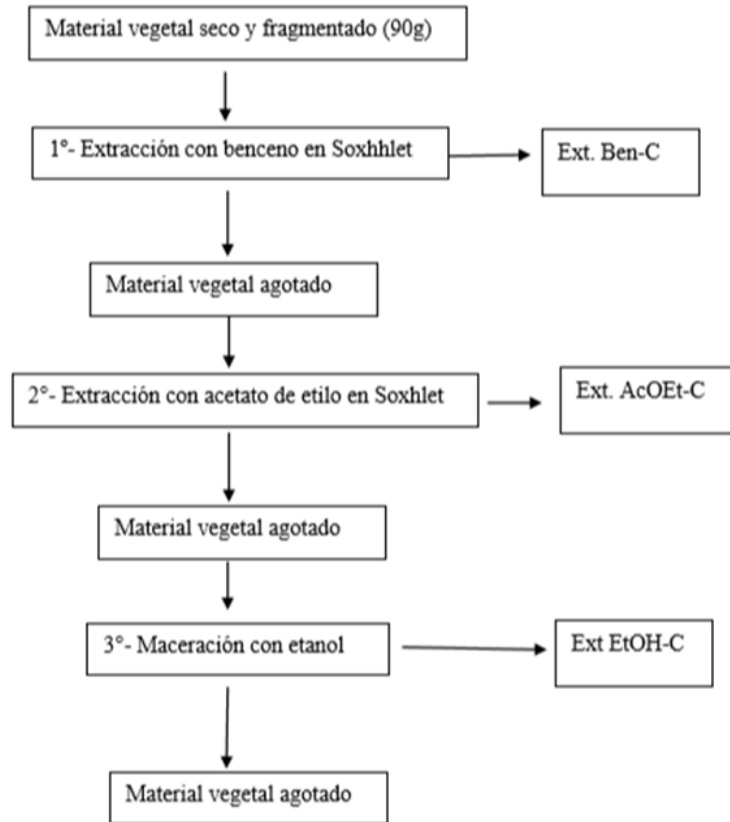


Figura 2. 11. Esquema de extracción a gran escala, aplicando la metodología de extracción B con tres solventes: benceno, acetato de etilo y etanol

ANÁLISIS QUÍMICO CUALITATIVO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

Para determinar el contenido de derivados antraquinónicos y flavonoideos en los extractos obtenidos, se efectuó una cromatografía de capa fina analítica (CCF). Los extractos secos se disolvieron usando los solventes correspondientes a cada extracto (Benceno, Cl_3CH , AcOEt y EtOH). Se usaron diferentes fases móviles (FM), usualmente usadas para la separación cromatográfica de estas dos familias de compuestos químicos (Tabla 2. 8).

Tabla 2. 8. Descripción del análisis químico de los extractos obtenidos

	Antraquinonas	Flavonoides
Fase estacionaria	Cromatofolios de sílica gel sin fluorescencia (Merck, país)	Cromatofolios de sílica gel con fluorescencia (Merck, país)
Fases móviles	1) Benceno-AcOEt (8:2), 2) Benceno- AcOEt (1:1), 3) Benceno-Acetona (5,8:4,2), 4) AcOEt- Acetona (1:1) y 5) AcOEt-MeOH-H2O (100:13,5:10)	a) AcOEt–AcFo–AcH–H2O (100:11:11:27), b) Cl3CH–Acetona–AcFo (75:16,5:8.5), c) Cl3CH–Acetona (60:40), d) ButOH–AcH–H2O (4:1:5) y e) Cl3CH.
Reveladores	a) Luz UV en ausencia y presencia de vapores de NH3 b) KOH al 10 % en EtOH (Wagner et al, 1984), c) H2SO4+Calor d) Cl3Fe.	a) Luz UV y seguidamente, con vapores de NH3 bajo lámpara UV, b) H2SO4+Calor, y c) Cl3Fe.

Referencias: Acetato de Etilo: AcOEt, ácido fórmico: AcFo, Ácido Acético: AcH, butanol: ButOH

Separación de los pigmentos por cromatografía de exclusión. El principio de este tipo de cromatografía es la permeación, en donde los compuestos se separan de acuerdo con el tamaño de sus moléculas, en definitiva, su peso molecular (PM). En una primera instancia salen los compuestos cuyas moléculas posee mayor PM y luego, las de menor PM. Se usó como fase estacionaria (FE) LH-20 (Sephadex R LH-20, Sigma, Suecia) y un gradiente de elución que se muestra en la Tabla 2. 9.

Tabla 2. 9. Gradiente de elusión de la columna de exclusión.

Fase móvil	Proporción
Ben/ACoET	10-0
	8-2
	1-1
	2-8
	0-10
ACoET/EToH	8-2
	1-1
	2-8
	0-10
	100-13,5-10
ACoET/MEoH/H ₂ O	100-20-15
EToH/H ₂ O	90-10

Cada una de las alícuotas obtenidas se concentró a presión reducida en un rotovapor. Se testearon por CCD en sílica gel sin fluorescencia; usando 3 FM diferentes:

- 1) AcOEt-MeOH-H₂O (100:13,5:10),
- 2) Benceno-AcOEt (1:1)
- 3) Hexano-AcOEt-Ac. Fórmico (15:25:1)

Se revelaron con luz UV, en presencia y ausencia de vapores de NH₃; y posteriormente, se revelaron con KOH al 10 %.

Capacidad tintórea de los extractos y/o fracciones. Porciones de 5 cm de lana de oveja mordentada con alumbre se sumergieron en el extracto o fracción de interés durante 15 min a T° ambiente, a la vez otra porción fue calentada a ebullición durante 15 min. Posteriormente, se enjuagaron y se dejaron secar a T° ambiente. La muestra al ser tan pequeña se evaluó visualmente.

Identificación de pigmentos antraquinónicos por HPLC- DAD-ESI-QTOF

Análisis de Hplc-Ms de muestras provenientes de la columna de cromatografía de exclusión, eluidas con benceno a partir de los extractos de *G. lataramosum*. Los parámetros usados para la identificación de AQs fueron: tiempo de retención (t_R) del cromatograma HPLC, el perfil del espectro UV-Vis y los rompimientos masa/masa (MS^n) del espectro HRMS.

Muestras: Las muestras utilizadas para este análisis surgen de la cromatografía en columna de exclusión, todas fracciones de columna de benceno de *G. latoramosum*: Fr 4, Fr7, Fr 11 y Fr12.

La capacidad tintórea de las 14 fracciones obtenidas del extracto Ben-C purificado por cromatografía de exclusión y agrupadas por semejanzas de perfiles de CCD, separadas mediante CC con gel filtrante (Sephadex LH-20), permitieron separar los pigmentos rojos (alícuotas 1-6) de los amarillos (alí.7-15), predominando los naranja amarrados en las alícuotas 16-19 y los rosados en la alícuotas 20-24. De allí es que se obtuvieron 4 fracciones según capacidad tintórea.

El listado de muestras es el siguiente:

1. Blanco MeOH
2. Fracción 4, corresponde a la alícuota 4 (corresponde a los rojos)
2. Fracción 7, corresponde a la alícuota 10 (corresponde a amarillos)

3. Fracción 11, corresponde a la alícuota 18-19 (marrones- anaranjados)

4. Fracción 12, corresponde a la alícuota 20-22 (rosados)

Volumen de inyección: 40 μ L

Temperatura de inyector: 22 °C

Preparación de soluciones a inyectar:

Se disolvió en 2 ml de MeOH-HPLC con ayuda de sonicador. Se trasvasó 1 ml a tubo eppendorf, se centrifugó y luego se trasvasó a otro eppendorf.

Equipo: Cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Series system (Agilent, EEUU), con bomba de gradiente (Agilent G1312B SL Binary), desgasificador de solventes (Agilent G1379 B) e inyector automático (Agilent G1367 D SL + WP). Conectado a un detector UV-Vis-DAD (Agilent G1315 C Satarlight), asociado a un espectrómetro de masa que posee una interfaz de ESI y un analizador de tiempo de vuelo MicrOTOF Q II (BrukerDaltonics, USA) utilizado en modo espectroscopía de masa (del inglés MS: Mass Spectrometer) y MSⁿ.

Columna: Microsorb-MV 100-5 C18 250 x 4,6mm, Agilent. “VALIDACIÓN AQ” (sólo ACN), con pre-columna.

Temperatura: Trabaja a temperatura ambiente (22°C +/-1)

Fase móvil: A: Ácido Fórmico 0,16M (solución de ácido fórmico en agua mili Q) y

B: Acetonitrilo 0,16M (solución de ácido fórmico en acetonitrilo grado HPLC).Flujo: 0,4 mL/min (Figura2.12).

Presión de columna estabilizada al inicio: 68 °C

Detectores. Se usaron dos detectores: El 1) DAD y el 2) ESI-QTOF.

1) Detector DAD: La λ de detección se fijó a 269 y 410 nm. Entre 200 y 800 nm.

2) Detector ESI-QTOF: Nombre de programa: SusyAQ-neg-msms10.

Se usó N₂ como gas nebulizador de secado y argón como gas de colisión, ambos a 4,0 bar, 8,0 L/min respectivamente, 180°C y 4500 V de tensión capilar. Los espectros de masas se

registraron en modo de iones negativos (50 a 1000 m/z), y la detección de MSn se programó para detectar los tres iones más abundantes con una energía de colisión de 10,0 eV (Tranfer time: 50 – Collision RF: 300 – Pre pulse storage: 1 μ s).

Rampa: *Galium latoramosum*

□

Tiempo (min)	% B
0	0
15	42
30	42
32	57
40	57
41	70
48	70
49	80
56	80
57	100
88	100
90	0

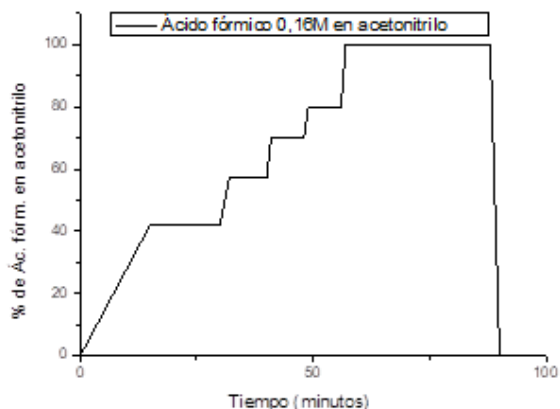


Figura 2. 12. Sistema de elución de la fase móvil para HPLC –MS rampa *G. latoramosum*.

Calibrante interno: Solución de formiato de sodio concentración 40 mM, disuelto en una mezcla isopropanol (IsopOH)-H₂O 50:50, la cual se inyectora entre 88-89 min. Volúmen calibrante: 40 μ L (loop 20 μ L).

Los softwares para adquisición y procesamiento de espectros fueron: Compass Version 3.1 y Data Analysis Version 4.1, respectivamente (Bruker Daltonics GmbH, EE. UU.).

DOMESTICACIÓN

Registro de los estadios fenológicos durante la etapa reproductiva de *Galium latoramosum* en condiciones de cultivo

Se seleccionaron 10 plantas de cada población de *G. latoramosum* que se encontraban en VFE. Se eligieron tallos que fueron delimitados por pequeñas marcas realizadas con pintura en la base de cada tallo, en estos se registró el inicio de floración e inicio de formación de fruto y evolución del diámetro del fruto. Los registros se tomaron cada 4 días, durante un periodo de 55 días. El diámetro de los frutos se midió con calibre digital.

Evaluación de la viabilidad de las semillas de *Galium latoramosum* de las poblaciones de crecimiento espontáneo

Evaluación del comportamiento germinativo y efecto de los tratamientos pregerminativos para ruptura de dormición. Se efectuaron 2 ensayos. El Ensayo I (E I) se hizo para evaluar la ruptura de dormición en condiciones de laboratorio y en vivero, y el Ensayo II (E II), se efectuó en Laboratorio de Semillas (LS) de la FCA-UNC cambiando el sustrato de siembra dado que se detectó un efecto fitotóxico en el sustrato papel. Este último ensayo también se realizó para probar la eficacia de otros tratamientos pregerminativos mejores a los realizados en el E I, de manera de poder aumentar los porcentajes de germinación (PG) y así incrementar la tasa de producción de plantines de calidad.

Ensayo I. Se efectuaron 4 repeticiones de 10 semillas cada una en 4 diferentes tratamientos repetidos tanto en LS como en Vivero Forestal Educativo (VFE-FCA). Es decir se utilizaron 320 semillas en total. En el laboratorio de semillas (LS) se sembraron en bandejas plásticas sobre papel húmedecido y se ubicaron en cámara de germinación con alternancia de temperatura $20 \leq 30$ °C y con un fotoperiodo de 16 h (luz)-8 h (oscuridad). El tiempo de exposición en cámara de los ensayos fue hasta que no se observó más germinación. En el LS estuvieron 119 días y en VFE 93 días. Para superar una eventual dormición física y/o fisiológica se efectuaron diversos tratamientos pregerminativos (Tabla 2.100), siguiendo las especificaciones de ISTA (2012) para otros géneros ya que dicho género no se encuentra dentro de las normas ISTA. En VFE, se usó sustrato formado por 3 partes de tierra y 1 parte de arena y se sembraron en bandejas múltiples suecas cubiertas por una bolsa de nylon para mantener la humedad. Las semillas provenían de Ongamira, Córdoba Argentina (Lat.S $30^{\circ}76'66''$, Long.O. $64^{\circ}43'33''$).

Ensayo II. Se utilizaron 320 semillas en total, 4 repeticiones de 10 semillas cada una, en 4 diferentes tratamientos tanto en LS como en invernadero del VFE. En LS, en vez de realizar la siembra sobre toallas de papel Valot, dada una supuesta fitotoxicidad, se sembraron en bandejas múltiples suecas con un sustrato formado por 3 partes de tierra y una de arena. Para la germinación en LS, se acondicionaron en la cámara de $20 \leq 30$ °C con fotoperiodo de 16 h (L) - 8 h (O). El tiempo de exposición en cámara de los ensayos fue hasta que no se observó más germinación. Tanto en LS como en VFE estuvieron 44 días. Para superar una eventual dormición física y/o fisiológica se efectuaron diversos tratamientos que se aprecian en detalle en la Tabla 2.12, la estratificación frío húmeda se realizó entre papel (doble hoja de papel tisú Valot). En VFE se sembraron en bandejas suecas con un sustrato formado por 3 partes de tierra y una de arena. Las semillas fueron recolectadas en la localidad de La Cumbre, departamento Punilla, Córdoba Argentina (Lat. $S30^{\circ}59'51,3''$; Long O $64^{\circ} 28'32''$). En todos los casos se sembraron semillas con pericarpio pues es muy complicada la extracción de este sin lastimar el embrión.

Tabla 2.10. Ensayos de germinación de semillas *G. latoramosum* de 3 procedencias

Ensayos	Tratamientos pregerminativos				Origen de la semilla
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	
I	Testigo	Calor por 7 días estufa a 30 °C más estratificación frío húmedo por 19 días en heladera, previo humedecimiento por 1 h	Calor por 7 días, estufa a 30°C.	Estratificación frío-húmeda, 19 días en heladera).	Ongamira (Lat.S 30°76'66" Long.O. 64°43'33")
II	Estratificación frío-húmeda por 30 días	Estratificación frío-húmeda por 10 días más peróxido de hidrógeno al 40% por una hora	Una hora en peróxido de hidrógeno al 40%.	Testigo	La Cumbre (Lat. S30°59'51,3"; Long O 64° 28'32")

Tipificación de la especie *G. latoramosum* según su germinación. Mediante el seguimiento del proceso germinativo y criterios aplicados en ISTA (2012) para especies con comportamiento de germinación semejantes a *G. latoramosum*, se tipificó la germinación presentada por esta especie. Las plántulas normales se caracterizaron morfológicamente de acuerdo con criterios y definiciones de ISTA (2009).

Para todos los ensayos se establecieron las siguientes variables: semillas germinadas (%), plántulas normales (%) y plántulas anormales (%), en diferentes fechas de conteo.

Categorización de la calidad de las semillas según su porcentaje de germinación. Las semillas de *Galium latoramosum* se categorizaron según su porcentaje de germinación de

acuerdo a la clasificación establecida en especies nativas por De La Fuente *et al.* (2011). El análisis estadístico se efectuó mediante un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis para la variable porcentaje de plántulas normales, semillas germinadas y plántulas anormales. Se trazó una curva de germinación en función del tiempo y se estableció la duración del ensayo observando el momento en que la curva se estabiliza. El programa utilizado fue InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

Peso de mil semillas. Las semillas antes de someterse al pesado fueron secadas en ambiente fresco y seco. Se expresa normalmente como el peso de 1 000 semillas puras. Las reglas ISTA (2009) prescribe ocho réplicas de 100 semillas cada una, con las que se puede calcular la desviación típica y el coeficiente de variación, así como la media. Si el coeficiente de variación es inferior a cuatro, entonces se acepta la media, pero si es superior se prescriben otras ocho réplicas, se calcula una nueva desviación típica, ahora respecto de las 16 réplicas, y antes de calcular la media final de la muestra se descartan las réplicas que se alejen de la media en un valor superior al doble de la desviación típica.

El peso de 1 000 semillas puras puede convertirse en semillas por gramo o por kilogramo de la manera siguiente:

$$\text{N}^\circ \text{ de semillas por kilogramo: } \frac{\text{N}^\circ \text{ de semillas que contiene la muestra} \times 100}{\text{Peso de la muestra en gramos}}$$

Multiplicación *in vitro* de poblaciones de *Galium latoramosum*

Para subsanar las dificultades de reproducción sexual de *G. latoramosum*, se decidió ensayar la multiplicación vegetativa de *G. latoramosum in vitro*, y de esta manera acelerar el proceso para la obtención de raíces.

Los ensayos de micropropagación se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología (L.B) de la FCA-UNC adaptando protocolos ya utilizados en la propagación *in vitro* (Bima *et al.*, 2006; Rodriguez Reartes *et al.*, 2007, 2009). Se realizaron 2 ensayos:

Ensayo I (E_I): Se trabajó con plantas madres de *Galium latoramosum* procedentes de campo, de las 3 poblaciones estudiadas en esta tesis La Cumbre(LC), Ongamira (ONG), La Estancita (LE). Dichas plantas se seleccionaron por presentar las mejores características fenotípicas como: número de brotes, vigor, ausencia de enfermedades, tamaño, crecimiento, desarrollo, entre otros. De cada una de estas plantas madres se extrajeron segmentos nodales, de 2 cm aproximadamente, con al menos una yema, y sin hojas.

Para dicho ensayo solo se evaluó porcentaje de contaminación a los 7, 15, 30 y 45 días.

Ensayo II (E_{II}): Para este ensayo no se evaluaron poblaciones, sólo se trabajó con una planta madre de *G. latoramosum* seleccionada, por sus características fenotípicas, a esta, se le extrajeron rizomas que fueron colocados en bandejas con vermiculita en cámara de cría. Cuando emitieron brotes, se cortaron y se introdujeron *in vitro* bajo cámara de flujo laminar. Los segmentos nodales tuvieron 2 cm de longitud. Bima (2012).

Para dicho ensayo se evaluó:

-Porcentaje de segmentos nodales contaminados (%PC) a los 7, 15,30 y 45 días.

-TM: La tasa de multiplicación se calcula como el número de segmentos nodales obtenidos al final del ciclo sobre el número de segmentos nodales introducidos al ciclo de multiplicación, evaluados en 3 repiques a los 30, 60 y 105 días.

-Porcentaje de formación de raíces (% PFR). Se consideró N° de plantas con raíces/ N° de plantas sin raíces por 100, evaluado en los 3 repiques a los 30, 60 y 105 días.

En el E_I solo hubo 2 fases: Desinfección e introducción, fase I y II respectivamente. El E_{II}, en cambio, comprendió 4 fases: Fase 0, I desinfección, II Introducción y III Multiplicación.

Fase 0. Se colocaron rizomas de 4 cm de longitud, de *Galium latoramosum*, previamente desinfectados (como se indica en la fase I) en bandejas plásticas transparentes con vermiculita autoclavada y se incubaron en cámara de cría a una temperatura de 23° C +/- 2°C y un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad. Transcurridos 60 días, de los nuevos brotes, se obtuvieron segmentos nodales para su desinfección e introducción *in vitro*.

Fase I: Desinfección. Esta fase fue la misma para ambos ensayos. En esta etapa se ajustó la metodología para optimizar el establecimiento del cultivo *in vitro* a través de la desinfección del material donante. Para la desinfección, se sumergieron los segmentos nodales en alcohol 70° durante 60 segundos; luego, en cámara de flujo laminar pasaron a una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% de principio activo con una gota de Twin 80 donde permanecieron en agitación por 25 min. Finalmente, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril.

Fase II. Introducción o establecimiento *in vitro*: en ambos casos, ya sea E_I y E_{II}, los segmentos nodales desinfectados en la fase I fueron introducidos *in vitro* en tubos de ensayo con 10 ml de medio de cultivo. Previamente se eliminaron los extremos oxidados.

Los explantes se incubaron a una temperatura de 23 °C, y, 16/8 h luz/oscuridad por 30 días.

El medio de cultivo utilizado fue MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado con ácido ascórbico y cítrico (100 mg.l⁻¹ de cada uno) y 0,01 mg.l⁻¹ de ácido naftalén acético, 30 g.l⁻¹ de sacarosa y 8 g.l⁻¹ de agar- agar, ajustando el pH entre 5,6-5,7. Se fraccionó en tubos de ensayo con 10ml de medio de cultivo., luego se autoclavaron a 121 °C y 1 atm. de presión por 20 min.

Los segmentos nodales se sembraron en el medio antes descrito, colocando en dicho medio un tercio de su longitud, y conservando la polaridad. Se colocó un explante por tubo, con un total de 25 explantes por población para el EI, y 10 explantes totales para el EII. Se selló la boca del tubo con polietileno termocontraible. Finalmente, los cultivos se incubaron en la cámara de cría, a una temperatura de 23 +/-2°C, y un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (Figura 2.14).

Fase III. Multiplicación: Consistió en el repique de los explantes desarrollados en la etapa de establecimiento. Se realizó cada 45 días. Los segmentos nodales fueron también de 2 cm aproximadamente. Al final de esto se registraron los %PC (porcentajes de contaminación), TM (Tasa de multiplicación) y %FR (porcentaje de formación de raíces). Se utilizó el mismo medio de cultivo que en la fase II. En esta fase se realizaron 3 repiques.

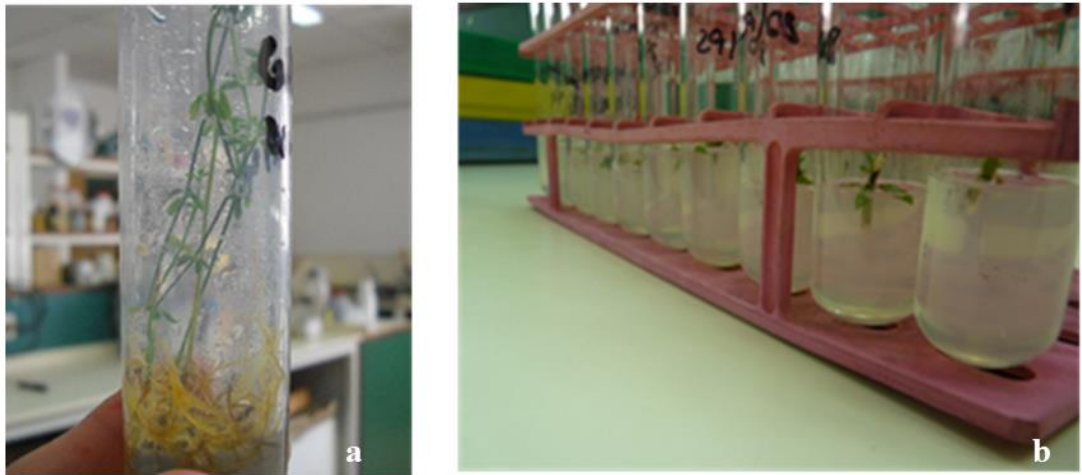


Figura 2. 13. Plantas micropropagadas in vitro. a- Detalle de raíces b- Detalles de esquejes de 4 días de introducidos.

Evaluación del comportamiento de *G. latoramosum* bajo distintos niveles de sombreado Jardín Tintóreo de Villa General Belgrano (Calamuchita).

Se instaló un ensayo en dicho lugar, para evaluar el comportamiento de *G. latoramosum*, *G. bigeminum* y *G. richardianum* bajo distintos niveles de sombreado. El objetivo de este ensayo al realizarse a campo fue simular las condiciones de crecimiento más parecidas a su estado silvestre. Para el caso de *G. latoramosum* y *G. richardianum* se realizaron dos exposiciones: al sol y a la sombra de especies arbóreas (molle y algarrobo). Se midieron como variables: el diámetro y la altura a los 288 días desde la plantación y la sobrevivencia a los 33 y a los 288 días desde la plantación. Se midió la cobertura en dirección N-S y E-O. Aunque no se hizo un análisis estadístico para comparar entre estas variables.

Se realizó un diseño con distribución completamente al azar. Se registraron los valores de radiación a diferentes horarios apuntando siempre hacia el oeste. *G. bigeminum* no fue colocada al sol porque se disponía de pocos plantines. En la Tabla 2. 11 se observan los valores de irradiancia registrados en dicho ensayo.

Tabla 2. 11. Irradiancia ($\mu\text{moles. m}^2\text{-s}^{-1}$) registrada bajo sol y sombra a diferentes horas en Jardín Tintóreo de Villa General Belgrano

Horario	11:04	12:00	13:05	14:40	14:55	16:30
Exposición						
Pleno sol	1948	2112	2179	2010	2010	1540
Sombra de moradillo	367	146	347	780	370	380
Sombra de molle y algarrobo	220	177	141	450	450	350

Ensayo de sombreo de *G. latoramosum* en el VFE. Se instaló en el invernadero del VFE, un ensayo en 6 bloques completamente aleatorizado, con tres diferentes niveles de sombreo: sombra al 50 %, sombra al 80 % y un testigo que contó sólo con la sombra del techo del invernadero (chapas de fibra de vidrio) y se consideró que tenía un 30% de sombreo. Cada uno de los bloques contó con plántulas de *G. latoramosum*, provenientes de 3 poblaciones diferentes. El objetivo fue evaluar el comportamiento de las diferentes poblaciones ante diferentes niveles de sombreo. Las poblaciones introducidas en dicho ensayo fueron La Estancita (Lat.31°06'42,8"S; 64°21'32,6"W) Ongamira (Lat. 30°76'66"S; Long. 64°43'33"W) y La Cumbre (Lat.30°59'42,8"S; Long.64°21'32,6"W), todas localidades de la provincia de Córdoba. El ensayo se estableció el 24 de noviembre de que 2015. En la Tabla 2. 122 se muestran los valores de irradiancia ($\mu\text{ moles m}^2\text{.s}^{-1}$) registrada bajo los distintos niveles de sombreo en el invernadero del VFE a diferentes horas del día.

Tabla 2. 12. Irradancia ($\mu\text{moles m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) registrada bajo los distintos niveles de sombreado en el invernadero del VFE a diferentes horas

Horario \ Exposición	12:00	13:00	14:00	17:00
	Pleno sol	1672	1735	1650
Testigo(30 % sombra)	624	780	710	674
50% sombra	220	251	240	184
80% sombra	85	122	95	83

Al inicio del ensayo se midieron los caracteres morfológicos de las plántulas: Largo total inicial (LTI); diámetro del tallo inicial (DTI); número de tallos iniciales (NTI). En los meses sucesivos se valoró sólo supervivencia. Luego de 5 meses se evaluó el crecimiento en función del aumento de LTI, del DTI y de NTI. Además, se descalzaron las plantas para evaluar rendimiento de raíces, largo total de raíces (LTR), ancho total de raíces (ATR), peso fresco de raíces (PFR), peso seco de raíces (PSR). Para evaluar la capacidad tintórea de dichas raíces se tiñeron lanas utilizando la metodología ajustada que se detalla en toda la tesis.

ANALISIS ESTADISTICO

Se efectuaron Análisis multivariado de tipo exploratorio y confirmatorio según las variables analizadas para varios ensayos de esta tesis. El programa utilizado fue InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2016).

Análisis exploratorio

Análisis de componentes principales (ACP). Dicho análisis se realizó a los caracteres morfológicos establecidos para las plantas madre de *G. latoramosum* (Tabla 2. 4), para las plantas madre de *G. bigeminum* (caracteres de raíz y de tallo -Tabla 2. 5 y a la descendencia de *G. latoramosum* (Tabla 2. 3). También para analizar los caracteres colorimétricos de plantas madre e hijas de *G. latoramosum*, y para los caracteres colorimétricos de plantas madre de *G. bigeminum*.

Análisis de conglomerados Dicho análisis se utilizó en las plantas madre tanto de *G. latoramosum* como de *G. bigeminum* para la separación de poblaciones en función de las variables morfológicas. También se realizó este análisis para el análisis morfológico de la descendencia de *G. latoramosum*. Se utilizó la distancia Euclídea y se procedió a agruparlos siguiendo el método de agrupamientos UPGMA.

ANAVA y ANOVA. Se efectuaron los supuestos de análisis de varianza para confirmar que se cumplieran los supuestos del ANAVA a cada variable en forma individual. El estudio confirmatorio para aquellas variables que cumplieron con los supuestos de ANAVA se hizo con el MANOVA (análisis de la varianza multivariado). Cuando las variables no cumplieran con los supuestos de la VARIANZA se le efectuó un análisis de la varianza no paramétrica Kruscall Wallis.

MANOVA. Mediante este análisis se analizaron 13 caracteres morfológicos para *G. latoramosum* (LT1; LENT1; NTS; DTSP; LENTS; NENTS; LTTS; AFOL, ARFOL; APA; PSPA; PA/PRF; LFOL) y 7 para *G. bigeminum* (DB; PFPA; PSPA; APR; NR<; PFPR; PSPR).

Kruscall Wallis. Aquellas variables que no cumplieron los supuestos de la normalidad se evaluaron como variables no paramétricas, mediante Kruscall Wallis. El ANAVA propuesto por Kruskal y Wallis (1952) permite comparar las esperanzas de 2 o más distribuciones sin necesidad de realizar el supuesto de que los términos de error se distribuyen normalmente. Se realizó para analizar caracteres morfológicos de plantas madre de *G. latoramosum*, los caracteres fueron los siguientes: NENT1; APREC; LPA; APR; NR>; NR<; PFPR; PSPR; PA/PRS. Para plantas madre de *G. bigeminum* los caracteres analizados mediante esta prueba fueron: %PR; %RN; %PM; %CM, %RPM; PA/PRF; PA/PRS; LT2P. En cambio, los caracteres morfológicos de la descendencia que se analizaron por este método fueron: LENT2, NT2 y LENT1.

Para el análisis de los caracteres morfológicos y colorimétricos de 3 poblaciones de *G. latoramosum* se analizaron los siguientes 6 caracteres mediante Kruscall Wallis: PA/PR F; LPR; C; PSPR; APR; PA/PR S. Para *G. bigeminum* en cambio se analizaron 4 caracteres morfológicos y colorimétricos mediante este método. H; PA/PRF; PA/PRS y S.

Comparación de las asociaciones entre variables morfológicas de las madres y de las hijas por población de Galium latoramosum.

Para establecer dicha relación entre madres e hijas se procedió al análisis de correlaciones canónicas (ACC).

Análisis de correlaciones canónicas (ACC). Para establecer las relaciones morfológicas entre plantas madre y la descendencia de *G. latoramosum*, (plantas madre e hijas) se procedió a dicho análisis. Es un análisis multivariado de correlaciones canónicas (ACC) (Hotelling, 1936). Las variables de las plantas madres fueron DB, NT1, LT1, LENT2, NT2, DT2, LENT2, NENT2, LTT2, LPR y PSPR. Las variables canónicas de las plantas hijas fueron: DB, NT1, LT1; NT2, DT2, NENT2, LTT2, LPR, PSPR.

Regresión lineal. Para estimar la producción y calidad de los órganos tintóreos de *G. latoramosum*, se logró establecer una relación lineal entre la variable colorimétrica “a” y el largo de la parte radicular (LPR).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y QUÍMICA

Caracterización morfológica de las poblaciones de crecimiento espontáneo de *G. latoramosum* y *G. bigeminum* en los bosques de las Sierras de Córdoba

Identificación de las estructuras morfo-anatómicas de los órganos tintóreos de G. latoramosum. Se observó la presencia de estolones (Figura 3. 1a), rojizos, no reservantes de estructura secundaria con peridermis que se desprende con facilidad, y a partir de los cuales, se originan nuevos rizomas (Figura 3. 1b), siendo estos, tallos reservantes de color amarillo con epidermis. La mayor parte de los rizomas se encontraron a poca profundidad del suelo (5 a 10 cm). Esta especie en su estadio vegetativo creció por medio de rizomas y estolones que se produjeron durante todo el año en condiciones de vivero. Los estolones se pueden diferenciar claramente de los rizomas por presentar estos últimos el mayor diámetro (de hasta 3,6 mm) y por el tipo de crecimiento dado que, los estolones, después de un alargamiento horizontal, tienden a presentar gravitropismo negativo. También se observó una corona en los ejemplares de mayor edad. Esta estructura, de color marrón, presentó yemas axilares a partir de las cuales se originaron rizomas. La Tabla 3. 1 se muestran un resumen de las características morfo-métricas de plántulas de *G. latoramosum*.

Tabla 3. 1. Medidas resúmenes de las características morfo-métricas de plántulas de *G. latoramosum*

Población	Longitud	Diámetro	Cantidad de estolones	Diámetro
	(cm)	(mm)	n	(mm)
La Estancita				
N	4,83	1,84	1	0,29
Mínimo	0,76	1,26	0	0,00
Máximo	4,00	2,37	3	0,88
La Cumbre				
N	7,00	1,96	2	0,89
Mínimo	6,00	1,84	1	0,86
Máximo	8,00	2,19	4	0,93
Ongamira				
N	6,50	0,49	4	0,43
Mínimo	0,00	0,00	0	0,00
Máximo	19,5	1,84	12	0,75

Referencia: N= cantidad de ejemplares

En la caracterización botánica microscópica (estudio anatómico) se encontraron pigmentos en la corteza, floema y médula de los dos tipos de tallos estudiados y en el floema de las raíces. La presencia de rafidios (Figura 3. 1a), carácter distintivo de la familia, se observó juntamente con otros tipos de cristales de oxalato de calcio en forma de prismas. Los granos de almidón se encontraron en la raíz y rizomas jóvenes y se caracterizaron por estar formados por pequeñas partículas elementales que se unen

formando una unidad de mayor tamaño 15 μm de longitud promedio (Figura 3. 2b). La raíz en sección transversal presentó peridermis, parénquima cortical con varias capas de células y numerosos granos de almidón y rafidios de oxalato de calcio.

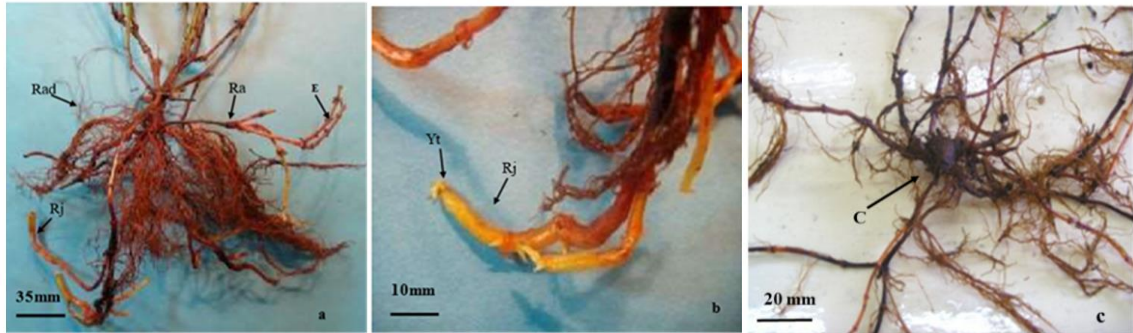


Figura 3. 1. Estructuras subterráneas de *G. latoramosum*: a. Aspecto general, b. Primordios de raíces y c. Detalle de corona.

Referencias. Ra=rizoma adulto; Rad=raíces adventicias; Rj=rizoma joven; E= estolón; Yt= yema terminal;; C= corona;

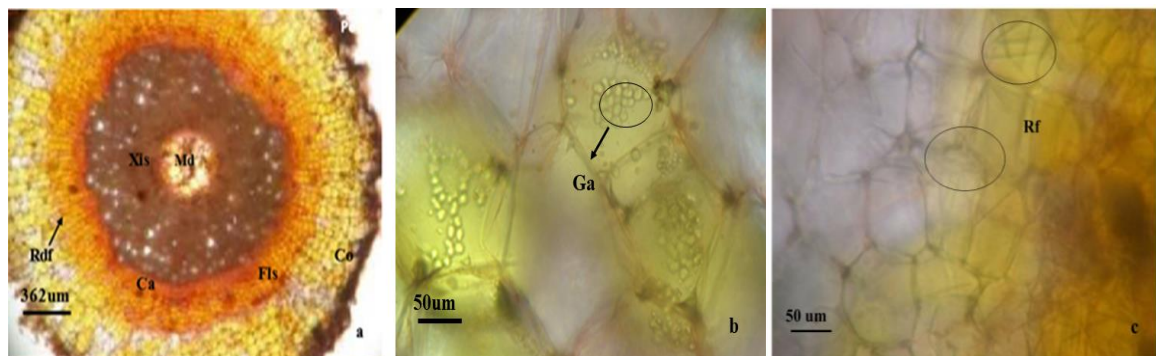


Figura 3. 2. Sección transversal del rizoma adulto de *G. latoramosum*: a. Rizoma con peridermis exfoliada, b. Detalle de gránulos de almidón en la corteza y c. Corteza exhibiendo abundantes rafidios.

Referencias: a. Md=medula; Xis= xilema secundario; Ca= cambium; Co= corteza; Fls= floema secundario; Rf= rafidios; Rdf. radio floematico; Co= corteza; Ga= gránulos de almidón.

Caracterización morfológica de plantas madres

Las poblaciones analizadas fueron tres para el análisis morfológico de *G. latoramosum* y tres para *G. bigeminum* tanto a nivel de plantas madre como para la descendencia en condiciones de cultivo.

Plantas madre de *Galium latoramosum*. De los 28 caracteres analizados, el ACP logró reducir la cantidad de variables por el grado de participación a 22 caracteres.

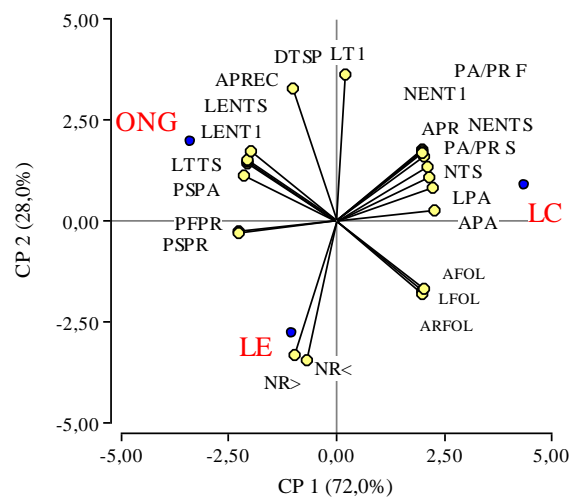


Figura 3. 3. Ordenamiento bidimensional de 22 caracteres morfológicos de plantas madre pertenecientes a 3 poblaciones de *G. latoramosum*, en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2.

Referencias: Población: ONG=Ongamira, LE=La Estancita, LC= La Cumbre.

El análisis de componentes principales (ACP) de 22 caracteres morfológicos de plantas madre de *G. latoramosum* quedó definido por dos componentes principales que explican el 100 % de la variación observada. Así el componente principal 1 (CP1), explicó

un 72 % de la variación y logró separar la población de La Cumbre (LC) de la de Ongamira (ONG) y la Estancita (LE). (Figura 3. 3).

Las plantas madre de la población de La Cumbre se separaron ($p < 0,05$) de las otras dos poblaciones por poseer mayor longitud de la parte aérea en sentido horizontal (APA), mayor relación entre el peso seco de la parte aérea y de la parte radicular (PA/PR S), mayor número de entrenudos del tallo primario (NENT1), mayor relación entre el peso fresco de la parte aérea y de la parte radicular (PA/PR F).

La CP2 separó la población de LE, de las otras 2 poblaciones. Las variables, número de raíces de mayor diámetro (NR $>$) y número de raíces de menor diámetro (NR $<$) fueron las responsables de dicha separación, dado que las plantas de LE presentaron el mayor número para ambos caracteres a un nivel no significativo ($P > 0,05$) si bien mostraron una tendencia (Tabla 3.3). La población de ONG se caracterizó por presentar mayor peso seco de la parte aérea (PSPA) ($P < 0,05$), mayor longitud de entrenudos de tallos secundario (LENTS) ($P < 0,05$), mayor longitud de entrenudos del tallo primario (LENT1) ($P < 0,05$) y mayor longitud total de tallos secundarios (LTTS) ($P < 0,05$).

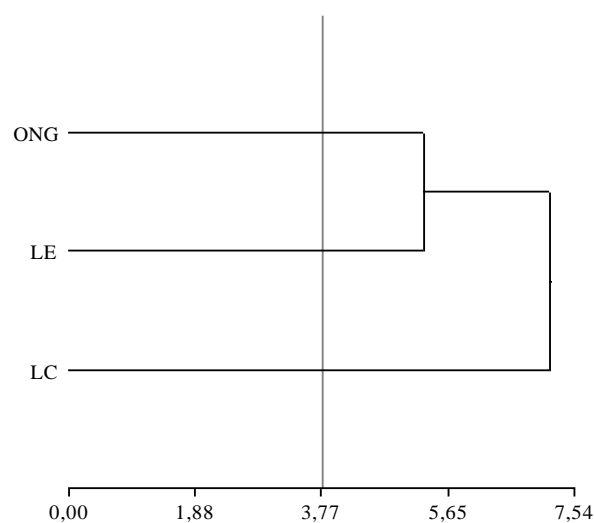


Figura 3. 4. Dendrograma obtenido con el método UPGMA, basados en la distancia euclídea entre los individuos representados por todos los caracteres morfológicos de parte aérea, raíces y hojas de plantas madre de 3 poblaciones de *G. latoramosum*

La Figura 3. 4 muestra el dendrograma obtenido con la matriz de distancia euclídea de 22 caracteres morfológicos medidos en plantas madre de *Galium latoramosum* de 3 poblaciones de la provincia de Córdoba: Ongamira (ONG), La Cumbre (LC) y La Estancita (LE) con una correlación cofenética de 0,854. A un nivel de distancia euclídea de 3,77, se observa que se forman tres grupos de igual manera a lo observado en el ACP (Figura 3. 4). El análisis multivariado (Tabla 3.2) confirma la diferencia observada en las 3 poblaciones para las 13 variables paramétricas participantes del ACP (Tabla 3.3). De las restantes 9 variables no paramétricas participantes del ACP sólo 4 mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) para las 3 poblaciones (NENT1 y APREC) y 3 para diferenciar LC de las otras 2 poblaciones (PFPR, PSPR y PA/PRS) (Tabla 3.3).

Tabla 3.2. Caracteres morfológicos de tres poblaciones de *G. latoramosum*, analizado con MANOVA y método de comparación a posteriori Hotelling

POB	LT1	LENT1	NTS	DTSP	LENTS	NENTS	LTTS	AFOL	ARFOL	APA	PSPA	PA/PRF	LFOL	
LE	27,65	2,74	3,91	0,57	1,73	5,18	11,16	0,17	0,09	21,36	1,00	0,63	0,65	B
LC	39,33	2,30	4,00	0,62	1,29	5,64	8,99	0,19	0,11	36,45	0,92	1,69	0,72	C
ONG	41,19	3,58	3,91	0,70	2,59	5,27	15,89	0,09	0,04	16,55	1,11	0,83	0,45	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 3.3. Caracteres morfológicos de tres poblaciones de *G. latoramosum*, analizado con Kruskal Wallis a través de la prueba de comparaciones múltiples

POB	NENT1	APREC	LPA	APR	NR>	NR<	PFPR	PSPR	PA/PRS									
LE	11,91	C	0,76	C	29,55	A	12,6	A	1,45	A	6,45	A	3,26	A	1,49	A	0,78	B
LC	21,36	A	0,8	B	40,09	A	18,4	A	0,73	A	3,73	A	1,54	B	0,55	B	1,95	A
ONG	13,64	B	0,87	A	28,91	A	13,3	A	0,82	A	4,09	A	3,86	A	1,78	A	0,88	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Plantas madre de *Galium bigeminum*. De los 23 caracteres analizados, el ACP logró reducir la cantidad de variables por el grado de participación a 12 caracteres y quedó definido por dos componentes principales que explicaron el 100 % de la variación observada. Así el componente principal 1 (CP1), explicó un 76,9 % de la variación y logró separar la población de Biale Massé (BM) de Pampa de Plaen PO y Los Gigantes (LG), la componente principal 2 (CP2) explicó un 23,1 % de la variación observada (Figura 3. 5).

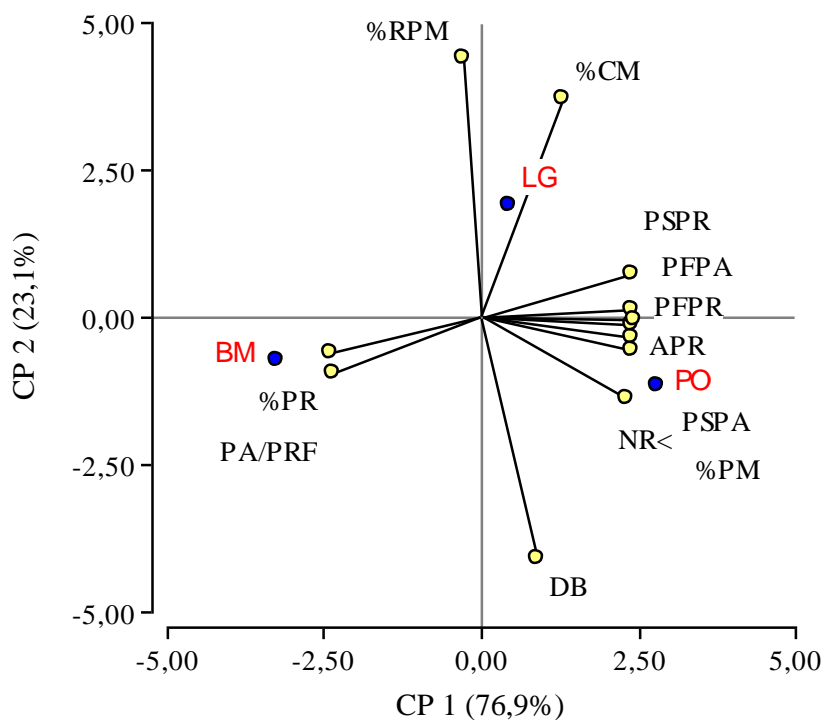


Figura 3. 5. Ordenamiento bidimensional de 12 caracteres morfológicos de plantas madre pertenecientes a 3 poblaciones de *G. bigeminum*, en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2. Población: Biale Massé=BM, PO=Pampa de Olaen y LG= Los Gigantes.

La población de BM se separó ($p < 0,05$) de las otras dos poblaciones porque las plantas poseyeron mayor porcentaje de pelos radicales (%PR), y mayor relación entre el peso fresco de la parte aérea con la parte radicular (PA/PRF) (Figura 3.5).

La CP2 separó la población de LG, de las otras dos poblaciones. Las variables porcentaje de rebrotes en partes moradas (%RPM) y porcentaje de color morado (%CM), fueron las responsables de separar ($p > 0,05$) Los Gigantes (LG) de las otras 2 poblaciones, dado que las plantas madre de esta población presentaron el mayor número para ambos caracteres demostrando una tendencia. La población de PO se caracterizó por presentar los

mayores valores ($p < 0,05$) en las variables peso seco de la parte aérea (PSPA), número de raíces mayores a 1 mm de diámetro (NR>), ancho de la parte radicular (APR) y peso fresco de la parte radicular (PFPR).

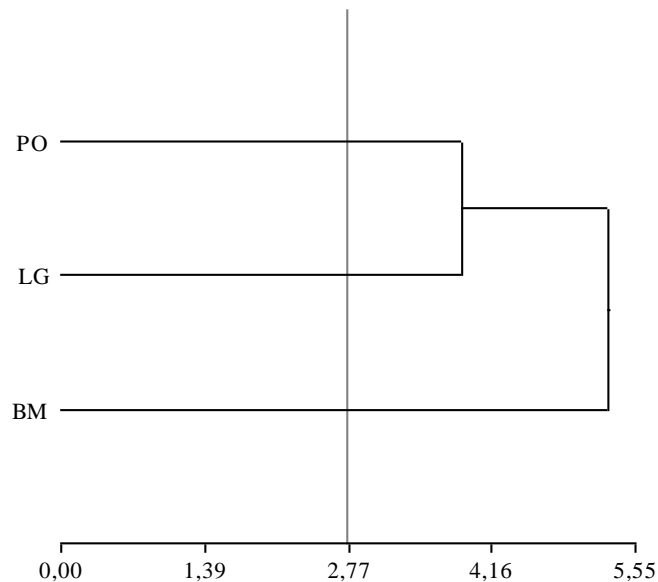


Figura 3. 6. Dendrograma obtenido con el método UPGMA, basados en la distancia euclídea entre los individuos representados por todos los caracteres morfológicos de parte aérea y raíces de plantas madres de 3 poblaciones de *G. bigeminum*.

Referencias: Población: BM=Bialet Massé, PO=Pampa de Olaen y LG= Los Gigantes.

La Figura 3. 6 muestra el dendrograma obtenido con la matriz de distancia euclídea de 12 caracteres morfológicos obtenidos de plantas madres de *G. bigeminum* de 3 poblaciones de la provincia de Córdoba: Bialet Massé (BM), Pampa de Olaen (PO) y Los Gigantes (LG) con una correlación cofenética de 0,734. A un nivel de distancia euclídea de 2,77, se observa que se formaron tres grupos de igual manera a lo observado en el ACP

(Figura 3. 6). El análisis multivariado confirma la diferencia observada en las 3 poblaciones para las 7 variables paramétricas participantes del ACP (Tabla 3. 4).

En el análisis de la varianza no paramétrico (Kruskal Wallis) solo 3 variables mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$), mostrando la población de Bialeto Massé, los valores más altos de %PR y LT2P, y la población de Pampa de Olaen los más altos para % RN.

Tabla 3. 4. Caracteres morfológicos de plantas madre de tres poblaciones de *G. bigeminum* analizados con MANOVA y método de comparación a posteriori Hotelling

POB.	DB	PFPA	PSPA	APR	NR<	PFPR	PSPR	
LG	1,16	18,30	5,00	16,50	9,20	14,29	2,91	B
BM	1,33	4,60	1,29	10,66	5,60	4,16	0,57	C
PO	1,49	26,16	8,78	20,7	16,40	21,11	3,65	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 3. 5. Caracteres morfológicos de plantas madre de tres poblaciones de *G. bigeminum* analizados con Kruskal Wallis a través de la prueba de comparaciones múltiples

POB	%PR	%RN	%PM	%CM	%RPM	PA/PRF	PA/PRS	LT2P
LG	2,00 B	5,50 B	20,50 A	52,50 A	68,00 A	1,56 A	2,04 A	16,00 B
BM	3,70 A	10,00 B	11,50 A	31,00 A	47,00 A	2,17 A	4,05 A	36,95 A
PO	1,60 B	27,50 A	28,10 A	40,30 A	40,00 A	1,34 A	2,79 A	12,84 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Caracterización morfológica de la descendencia de *G. latoramosum*. De los 15 caracteres morfológicos analizados de la descendencia de *G. latoramosum* en cultivo, el ACP logró reducir la cantidad de variables, por el grado de participación, a 11 caracteres.

El ACP de 15 caracteres morfológicos de individuos pertenecientes a la descendencia de *G. latoramosum* en condiciones de cultivo, quedó definido por dos componentes principales que explican el 100 % de la variación observada. Así el componente principal 1 (CP1), explicó un 67,3 % de la variación y logró separar la población de La Estancita (LE) de la de ONG, mientras que la población de La Cumbre (LC) quedó en el medio de las otras 2 poblaciones. (Figura 3.7).

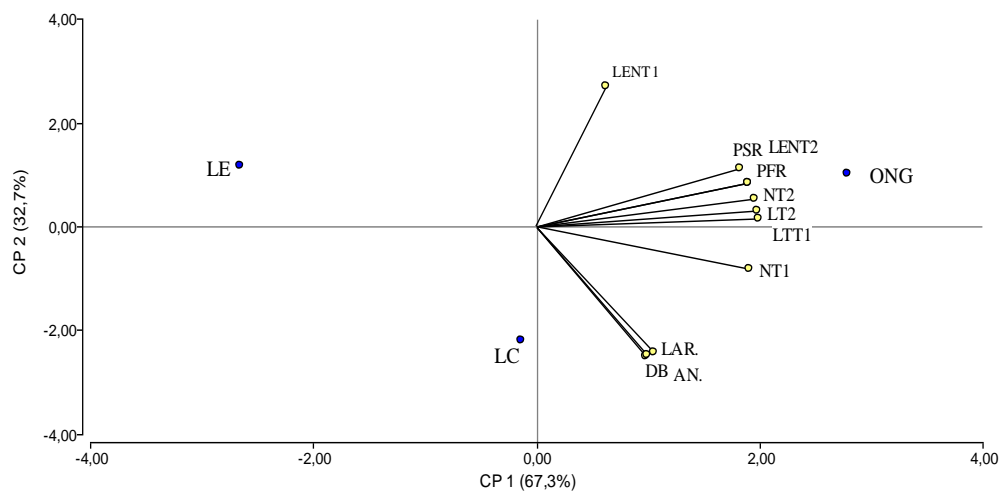


Figura 3. 7. Ordenamiento bidimensional de 11 caracteres morfológicos de la descendencia de *G. latoramosum*, de 3 poblaciones diferentes, en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2

Referencias Población: ONG=Ongamira, LE=La Estancita, LC= La Cumbre.

Las plantas de la población de ONG se separaron de las otras poblaciones por poseer mayores valores ($P < 0,05$) en los caracteres (Tabla 3.6 y Tabla 3. 7): peso seco radicular (PSR), largo de entre nudos tallo secundario (LENT2), peso fresco radicular (PFR), número de tallos secundarios (NT2), largo del tallo secundario (LT2) y número de tallos primarios (NT1).

La población de LE se caracterizó por presentar los menores valores ($P < 0,05$) de todas las variables analizadas, en cambio la población de ONG, presentó los mayores valores de todas las variables analizadas (Tabla 3.6 y Tabla 3. 7).

La CP2 separó la población de LC, de las otras 2 poblaciones. Las variables diámetro a la base (DB), largo de la parte radicular (LAR) y ancho de la parte radicular (AN), fueron los responsables de separar LC de las otras poblaciones, dado que los individuos de la descendencia de esta población presentaron los mayores ($P < 0,05$) valores para dichos caracteres. La componente principal 2 (CP2) contribuyó con un 32,7 % de la variación observada (Figura 3.8).

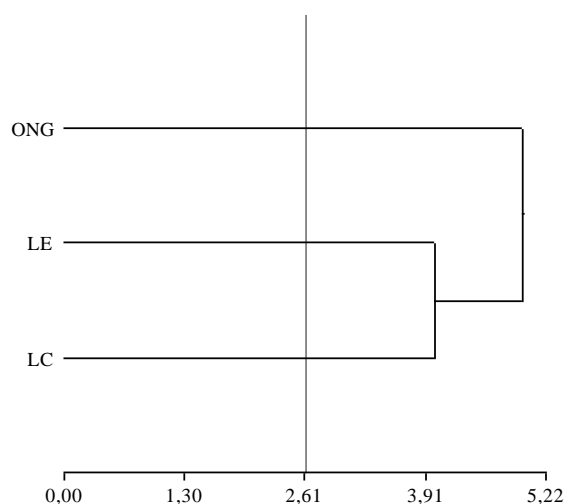


Figura 3. 8. Dendrograma obtenido con el método UPGMA, basados en la distancia euclídea entre plantas de la descendencia de 3 poblaciones de *G. latoramosum* representados por todos los caracteres morfológicos de parte aérea.

La Figura 3. 8 muestra el dendrograma obtenido con la matriz de distancia euclídea de 11 caracteres morfológicos obtenidos de la descendencia de plantas madres de *Galium latoramosum*, de 3 poblaciones de la provincia de Córdoba: Ongamira (ONG), La Cumbre (LC) y La Estancita (LE) con una correlación cofenética de 0,715. A un nivel de distancia euclídea de 2,61, se observa que se forman tres grupos de igual manera a lo observado en el ACP (Figura 3. 8). El análisis multivariado confirma las diferencias observadas en las 3 poblaciones para las 9 variables paramétricas participantes del ACP (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Caracteres morfológicos de las tres poblaciones de *G. latoramosum* analizados con MANOVA y método de comparación a posteriori Hotelling

Pob	DB	LTT1	DT2	LT2	AN	LAR	NT1	COR	NENT1	NENT2	PSPR	
LE	1,41	36,61	0,41	5,7	17,91	16,18	4,36	2,49	13,64	3,82	0,94	B
LC	2,12	38,09	0,34	8,65	32,45	29,73	6,18	4,89	15,91	3,64	0,96	A
ONG	1,79	40,65	0,57	12,85	25,73	23,82	6,91	3,37	15,18	4,91	1,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la Tabla 3. 7 se observa que ninguna variable mostró diferencias significativas ($P < 0,05$), siendo la población de Ongamira la que mayores valores presentó para LENT2, NT2, LENT1.

Tabla 3. 7. Caracteres morfológicos de la descendencia de tres poblaciones de *G. latoramosum* analizados con Kruskal Wallis a través de la prueba de comparaciones múltiples

POB.	LENT2	NT2	LENT1	
LE	1,30	1,64	2,79	A
LC	1,35	2,09	2,16	A
ONG	1,96	3,18	3,04	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Comparación de las asociaciones entre variables morfológicas de las madres y de las hijas por población de *Galium latoramosum*

Todas las poblaciones establecieron asociaciones entre los grupos de variables de las madres y de los hijos con una sola variable canónica (L). En la Tabla 3. 8 se presentan los coeficientes de correlación canónica (R), la proporción de la varianza total explicada por

cada par de variables canónicas (R^2) y los niveles de probabilidad asociados (p-valor) obtenidos en este análisis con significancia estadística ($P < 0,001$) para variables canónicas por población.

Tabla 3. 8. Coeficientes de correlación canónica (R), la proporción de la varianza total explicada por cada variable canónica (R_2) y niveles de probabilidad asociado (p-valor) para variable canónica por población

Población	Ongamira	La Cumbre	La Estancita
L	1	1	1
R	1	1	1
R^2	1	1	1
p-valor *	0,000009	0,0000041	$1,10 \times 10^{-12}$

* Probabilidad $< 0,001$ de p-valor es significativa

Cada población explicó la variabilidad para cada eje con altos valores de R^2 (Tabla 3. 8). Cabe destacar que las combinaciones lineales con máxima correlación para cada eje (L) resultaron de diferentes combinaciones de variables canónicas tanto para el primer conjunto (variables morfológicas de las madres) como para el segundo conjunto (variables morfológicas de las hijas) (Tabla 3. 9).

En la población de La Cumbre, el eje canónico L presentó a las variables canónicas diámetro a la base (DB), longitud de los entrenudos del tallo primario (LENT1) y longitud de tallos secundarios (LT2) asociadas inversamente a la variable longitud del tallo primario (LT1) en el conjunto de variables de las madres, se correlacionaron con el número de tallos secundarios (NT2) y el diámetro a la base (DB), en forma inversa al número de tallos primarios y al peso seco de raíces de las plantas hijas.

Se puede decir que para los 3 grupos morfológicos (3 poblaciones) en el conjunto de las madres, tuvieron más peso los caracteres de tallo que de raíz.

Tabla 3. 9. Variables canónicas (L) para cada Población de *Galium latoramosum* de los caracteres de las madres y de los hijos

Conjunto	Población	La Estancita	La Cumbre	Ongamira	
	L	1	1	1	
	Caracter				
Madres	de tallo	DB		-0,99	
		NT1	-3,66		
		LT1	-0,71	1,51	
		LENT1	6,17	-0,55	-0,85
		NT2			
	de raíz	DT2			
		LENT2			
		NENT2	1,70		
		LTT2		-0,99	0,11
		LPR			
Hijas	de tallo	PSPR	1,88		1,09
		DB		2,01	
		NT1	-0,10	-1,43	-0,38
		LT1	-0,19		-2,29
		NTS		0,48	-0,88
	de raíz	DTS			
		NENTS			
		LTTS	0,16		
		LPR			
		PSPR	-3,80	-0,98	2,21

En el caso de la Población de Ongamira se observó que la variabilidad de la longitud de los entrenudos de los tallos primarios (LENT1) y su asociación inversa con la longitud de los tallos secundarios (LTT2) y el peso seco de la parte radicular (PSPR) a nivel de las madres, se correlacionó significativamente con el patrón de relación inversa entre el número de tallo primarios (NT1), la longitud de los tallos primarios (LT1), y el número de tallos secundarios (NT2), *versus* el peso seco de las raíces (PSPR) . Se podría inferir para esta población que madres que posean una longitud de entrenudos de los tallos primarios más cortos (LENT1), con mayor Longitud de tallos secundarios (LTT2) y mayor peso seco de raíces (PSPR) se corresponderán con hijos que tengan menor Longitud de tallos primarios LT1 y menor número de ambos tipos de tallos (NT1 Y NT2) con mayor peso seco de raíz (PSPR).

Para la población de La Estancita (LE), el eje canónico L, presento a las variables canónicas número de tallos primarios (NT1) y largo de tallos primarios (LT1) asociadas inversamente a longitud de los entrenudos de los tallos primarios (LENT1), número de entre nudos del tallo secundario (NENT2), y peso seco de la parte radicular (PSPR), para el conjunto de variables de las plantas madre. A su vez se correlacionan significativamente ($p < 0,05$), con el patrón de relación inversa que existe con número de tallos primarios (NT1), largo de tallo primario (LT1) y peso seco de la parte radicular (PSPR) y se relacionan positivamente con la variable canónica (LTTS).

Caracterización colorimétrica de poblaciones de plantas madre de *G. latoramosum* y su descendencia y de poblaciones de *G. bigeminum*

Ajuste del método de tinción. El ajuste de la metodología se realizó con *G. latoramosum* ya que fue la primer especie que se comenzó a coleccionar, de la cual se obtuvieron la mayor cantidad de individuos, luego se aplicó a *Galium bigeminum*.

Ensayo 1. Desmenuzado del material El mejor resultado se obtuvo con el T₄, es decir cuando el material vegetal fue desmenuzado en licuadora con 100 cm³ de agua, luego los restos de dicho material vegetal ya desmenuzado se colocaron en bolsa de muselina dentro de un vaso de precipitado conjuntamente con el líquido resultante hasta completar con agua los 300 cm³. Se tiñeron 5 gramos de lana de oveja, previamente mordentada y colocada por 45 minutos en fuego a 90 °C. Con dicho método de desmenuzado se obtuvieron las tonalidades más intensas. (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Parámetros de color obtenidos en los distintos tratamientos de desmenuzado del material vegetal

Tratamiento	L	a	b	c	s	H
1	54,90	22,13	16,09	27,39	0,50	36,11
2	41,91	27,97	21,43	35,24	0,84	37,26
3	34,14	34,61	25,11	42,77	1,25	36,11
4	34,48	39,95	29,77	49,83	1,45	36,68

Referencias: Desmenuzado del material vegetal: T₁-Manual T₂- Con mortero. T₃. Con molinillo de café. T₄- Con licuadora. Parámetros de color L, a, b, c, s y H.

Ensayo 2. Evaluación del pH La solución acuosa obtenida en el ensayo 2 (T₄), sin el agregado de ninguna sustancia para modificar el pH, presentó un pH 7,4 (T₁, testigo) y fue la que brindó una coloración más intensa dentro de la gama del rojo, en comparación con aquellas más ácidas, T₂ o más básicas T₃.

Ensayo 3. Evaluación del tiempo de cocción. El que logro agotar el pigmento de la solución acuosa fue el T₃ (45 minutos), mayores tiempos de decocción no lograron obtener colores más rojos, ya que 45 minutos bastaron para agotar el remanente de colorante rojo presente en la solución acuosa.

Ensayo 4. Evaluación de la temperatura de decocción El mejor tratamiento fue el T3 con una temperatura de decocción de 90°C, obteniendo la solución acuosa con el T4 del ensayo 1 y con pH neutro, cocinando por 45 minutos. Si bien entre el T3 y el T4 no hubo diferencias de coloración, en el T4 la calidad de la lana se vio afectada cuando la temperatura se elevó hasta 100 ° C.

Ensayo 5. Evaluación del efecto del diámetro de órganos subterráneos en el teñido. No hubo diferencias de coloración entre el T1 y el T2, es decir que el diámetro de los órganos subterráneos tintóreos no influyó en la coloración. El proceso de tinción utilizado fue el T4 del Ensayo 1, con un pH de 7,4, con cocción de 45 minutos a una temperatura de 90°C.

Ensayo 6. Evaluación del tiempo de licuado El mejor resultado se obtuvo con el T2, es decir licuando por 5 minutos. Licuando 7 minutos se obtiene el mismo color que con 5 minutos. Por lo que se fija como tiempo de licuado los 5 minutos.

Ensayo 7. Determinación de la mejor proporción raíz / lana El mejor color se obtuvo con el T1 (raíz / lana= 1:1). El T2 (raíz / lana= 2:1) fue similar, pero teniendo en cuenta que es un método destructivo no se justifica utilizar más proporción de raíces. El T3 (raíz / lana= 1:2) resultó en colores menos intensos en la gama de los rosados.

Ensayo 8. Determinación del tipo de agua a utilizar La coloración obtenida fue similar en ambos tratamientos ensayados (T1. Agua destilada, T2 Agua del corriente de red).

De todos los ensayos realizados surgió el mejor protocolo de tinción que se utilizó para teñir todas las muestras, ya sean de *G. latoramosum*, como *G. bigeminum*.

Protocolo de tinción estandarizado. Luego de los ensayos realizados, para ajustar el método de tinción, se determinó que el mejor método para teñir era el siguiente:

Utilizar todo el material tintóreo (raíces y rizomas) sin discriminar el diámetro de estos. Lavarlos muy bien para que no queden restos de tierra. Secar para luego pesar dicho material vegetal en balanza digital. Utilizar la relación raíz/lana de 1:1. Colocar en licuadora con agua corriente, cantidad necesaria para cubrir las raíces, licuar durante 5 minutos. Colocar los restos de material tintóreo dentro de una bolsa de muselina y colocar la solución acuosa resultante, del licuado, junto con la bolsa de muselina, dentro de un recipiente apto para llevar al fuego. Introducir la lana mordentada dentro del recipiente y llevar al fuego durante 45 minutos, controlando con un termómetro, que la temperatura no supere los 90°C, para ello se deberá ir agregando agua, para evitar que llegue al hervor. Luego enjuagar la lana y dejar secar. Dicha metodología, fue la utilizada en todas las muestras de esta tesis, para luego, proceder a medir las características cromáticas.

CARACTERIZACIÓN COLORIMÉTRICA

En cuanto a los caracteres colorimétricos, de las plantas madres de *G. latoramosum* se observa en la Tabla 3. 11 que hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) para la población de LC, ya que presentó los mayores valores para los caracteres colorimétricos L (luminosidad), b (coordenadas amarillo/azúl, a mayores valores de b, se observa más amarillo), C (saturación) y principalmente H (ángulo de matiz tono), que cuanto más cerca de 45° representa colores más rojos, ya que en la escala de H 45° representa rojo fuerte (Figura 2.7). Asimismo, presentó el menor valor para S, lo que indica menor relación entre color y luminosidad o sea tiene mayor luminosidad.

Tabla 3. 11. Caracteres colorimétricos de plantas madre de *G. latoramosum*.

POB.	L		a		b		C		S		H	
LC	38,20	A	35,47	A	30,77	A	47,05	A	1,25	B	40,70	A
LE	30,89	B	34,62	A	25,72	B	43,13	B	1,40	A	36,68	B
ONG	37,27	B	35,30	A	29,07	B	45,79	B	1,23	A	39,55	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

La descendencia de *G. latoramosum* no se diferenció entre poblaciones al momento de ser evaluada, aunque como se observa en la Tabla 3. 11, si hubo una tendencia en la que la población de LC, nuevamente presentó valores más cercanos a 45° para la variable H, es decir más próximos al tono rojo (p>0,05).

Tabla 3. 12. Caracteres colorimétricos de descendencia de *G. latoramosum*.

POB.	L		a		b		C		S		H	
LC V	38,48	A	34,21	A	27,85	A	44,22	A	1,17	A	39,98	A
LE V	36,04	A	34,59	B	24,91	A	42,69	A	1,21	A	35,54	A
ONG V	38,52	A	36,91	A	27,06	A	45,85	A	1,19	A	36,11	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Los mismos caracteres colorimétricos tanto de plantas madre como de la descendencia que fueron medidos para *G. latoramosum* se midieron para *G. bigeminum*, los resultados se observan en la Tabla 3. 13 y Tabla 3. 14.

Tabla 3. 13. Caracteres colorimétricos de plantas madre de *G. bigeminum*.

POB.	L		a		b		c		s		H	
BM	43,91	A	33,53	A	22,54	B	40,44	A	0,95	A	33,82	B
LG	43,71	A	33,67	A	23,53	B	41,14	A	0,96	A	35,54	B
PO	40,79	A	33,74	A	27,24	A	43,4	A	1,09	A	39,98	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Para *G. bigeminum*, hubo diferencias significativas en el parámetro de tono angular (H) ($p < 0,05$) y la población de Pampa de Olaen tuvo los valores más altos para ese parámetro, es decir los valores más próximos al rojo.

Tabla 3. 14. Caracteres colorimétricos de plantas in vitro de tres poblaciones de *G. latoramosum*, analizado mediante Kruskal Wallis.

POB.	a	C
LC	37,03 A	44,84 A
LE	33,52 C	40,86 C
ONG	34,10 B	41,56 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 3. 15. Caracteres colorimetricos de plantas in vitro de *G. latoramosum*, analizado con MANOVA (MULTIVARIADO)

POB.	L	b	s	H	
LC	37,03	25,3	1,22	34,39	C
LE	39,15	23,3	1,07	35,00	A
ONG	39,57	23,7	1,00	35,00	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

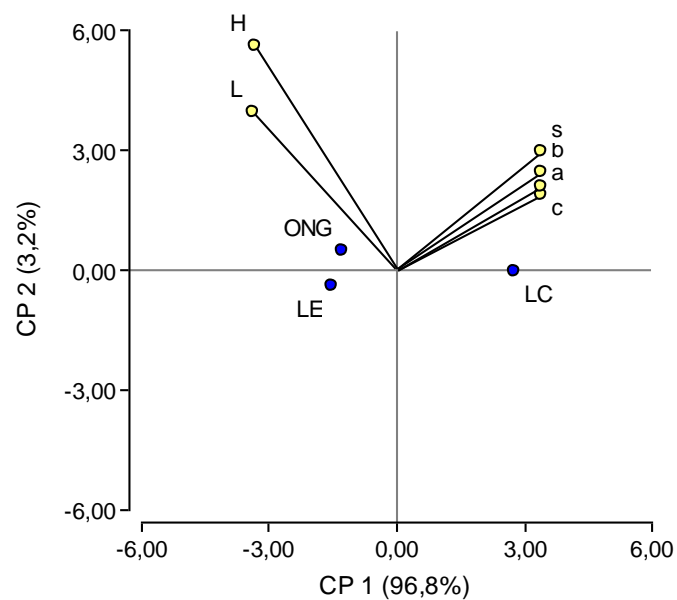


Figura 3. 9. . Ordenamiento bidimensional de 10 caracteres de color de plantas pertenecientes a 3 poblaciones de *G. latoramosum* obtenidas in vitro, en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2.

El análisis de componentes principales (ACP) de 6 caracteres colorimétricos de plantas *in vitro* de *G. latoramosum*, quedó definido por dos componentes principales que

explicaron el 100 % de la variación observada. Así el componente principal 1 (CP1), explicó el 97 % de la variación observada y separó la población de La Cumbre (LC) de ONG y LE, la componente principal 2 (CP2) explicó el 3 % restante de la variación observada (Figura 3. 9).

Las plantas de la población de La Cumbre se separaron de las otras poblaciones por poseer mayores valores de los parámetros S, b, a y C, tal como se puede observar en la Tabla 3. 17 y Tabla 3. 16 de los análisis de Kruscal Wallis y MANOVA respectivamente.

La CP2 separó la población de ONG, de las otras 2 poblaciones. Las variables L y H fueron las responsables de separar Ongamira de las otras poblaciones, dado que las plantas *in vitro* de esta población presentaron los valores más bajos ($P < 0,05$) para ambos caracteres, tal como se observa en el MANOVA (Tabla 3.16).

Estimación de la producción y calidad de los órganos tintóreos de *G. latoramosum* y *G. bigeminum*

De plantas madre de *Galium latoramosum*. Se estableció una relación lineal entre la variable colorimétrica “a” (parámetro de la escala CIELCH, en la tonalidad de los rojos) y el largo de la parte radicular (LPR) ($p < 0,001$), con un coeficiente de regresión $R = 0,95$ para *G. latoramosum*. El modelo ajustado fue: $a = 5,1 - 4,6 \times 10^{-3} * LPR - 2,98 * S$.

No se encontraron otros modelos que establezcan relación entre producción y calidad del órgano subterráneo para esta especie, ni para *G. bigeminum*.

De las 16 variables analizadas (colorimétricas y de rendimiento) a las plantas madre de *G. latoramosum* de 3 poblaciones, el ACP logró reducirlas por el grado de participación en 12 variables (Tabla 3. 11).

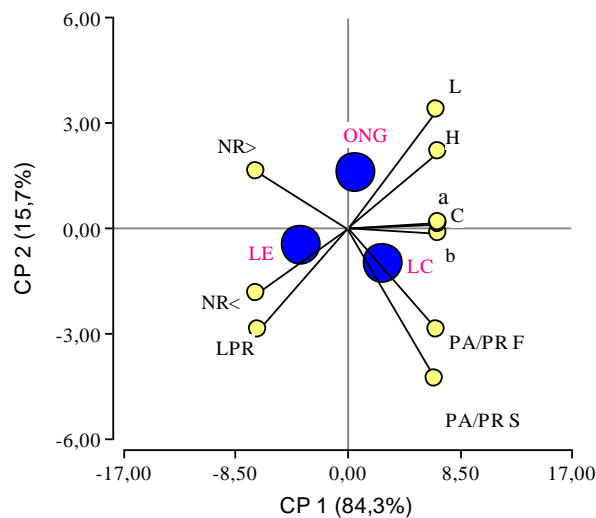


Figura 3. 10. Ordenamiento bidimensional de 12 caracteres de color de plantas madre pertenecientes a 3 poblaciones de *G. latoramosum*, en base a los 2 primeros componentes principales (CP1 y CP2).

El análisis de componentes principales (ACP) de 16 caracteres colorimétricos y morfológicos de plantas madre de *G. latoramosum* quedó definido por dos componentes principales que explican el 100 % de la variación observada. Así el componente principal 1 (CP1) explicó un 84 % de la variación y logró separar la población de La Estancita (LE) de ONG y LC, mientras que la componente principal 2 (CP2) explicó un 16 % de la variación observada (Figura 3. 11).

Las plantas de la población de La Estancita se separaron de las otras poblaciones por poseer mayor cantidad de raíces de diámetro menor a 1 mm y mayor longitud de la parte radicular en sentido vertical (LPR), y por poseer los menores valores de H y L.

La CP2 separó la población de ONG, de las otras 2 poblaciones. Las variables L y H fueron las responsables de separar Ongamira de las otras poblaciones, dado que las plantas madre de esta población presentaron altos valores para ambos caracteres, si bien estas variables no fueron significativas ($P < 0,05$) aunque mostraron una tendencia, como lo muestra el análisis de la varianza (Tabla 3. 18). ONG, realmente se caracterizo por poseer mayores valores para PFPR y PSPR.

Tabla 3. 16. Caracteres morfológicos y colorimétrico de tres poblaciones de *G. latoramosum* analizado con MANOVA

POB.	PFPA	PSPA	NR>	NR<	PFPR	L	a	b	S	H	
ONG	1,94	1,11	0,82	4,09	3,91	37,27	35,30	29,07	1,23	39,55	A
LE	1,55	0,94	1,45	8,27	3,86	30,89	34,62	25,72	1,40	36,68	B
LC	1,61	0,63	0,36	2,91	1,44	38,20	35,47	30,77	1,25	40,70	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la Tabla 3.17 se observa que la población de La Cumbre obtuvo los valores más altos para la relación PA/PR seco y para el parámetro de color C, que se relaciona con los rojos también en la Tabla 3. 196 se ve que LC tuvo el valor de H mayor, es decir con un valor más cercano al rojo (si bien las 3 poblaciones fueron rojas).

Tabla 3. 17. Caracteres morfológicos y colorimétricos de tres poblaciones de *G. latoramosum* analizado con Kruskal Wallis

Pob.	PA/PR F		LPR		C		PSPR		APR		PA/PR S	
LC	1,28	A	23,73	A	47,05	A	0,52	B	12,00	A	1,24	A
LE	0,37	B	30,09	A	43,13	B	1,72	A	13,00	A	0,60	C
ONG	0,83	B	24,73	A	45,79	A	1,78	A	13,27	A	0,88	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 3. 18. Caracteres morfológicos y colorimétricos de tres poblaciones de *G. latoramosum* analizado mediante ANAVA

POB.	PFPA		PSPA		NR>		NR<		PFPR		L		a		b		S		H	
LE	1,55	A	0,94	A	1,45	A	8,3	A	3,86	A	30,89	B	34,62	A	25,72	B	1,40	A	36,68	B
LC	1,61	A	0,63	A	0,36	B	2,9	B	1,44	B	38,20	A	35,47	A	30,77	A	1,25	B	40,70	A
ONG	1,94	A	1,11	A	0,82	B	4,1	B	3,91	A	37,27	A	35,30	A	29,07	A	1,23	B	39,55	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De plantas madres de *Galium bigeminum*

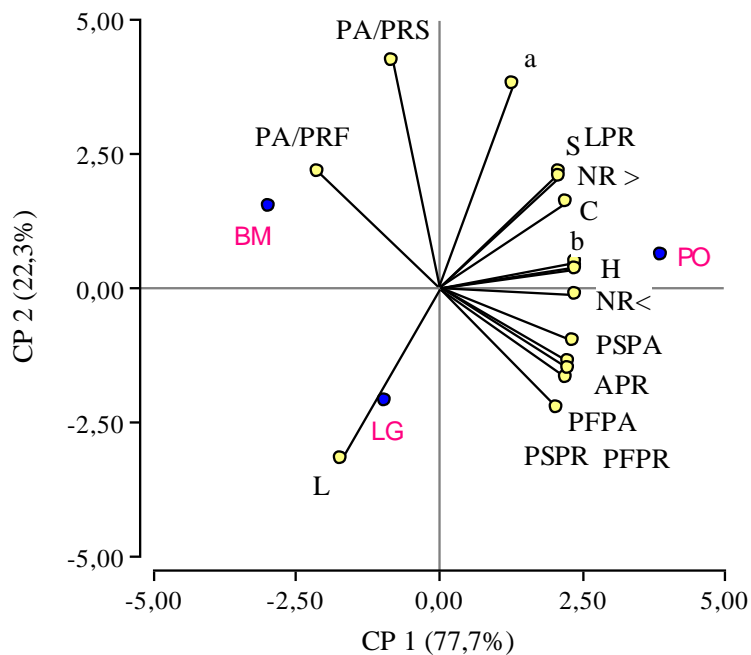


Figura 3. 11. Ordenamiento bidimensional de 16 caracteres morfológicos y colorimétricos de plantas madre pertenecientes a 3 poblaciones de *G. bigeminum*, en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2

De los 18 caracteres colorimétricos y morfológicos analizados de plantas madre de *G. bigeminum*, el ACP logró reducir la cantidad de variables por el grado de participación a 16 caracteres. Dicho ACP quedó definido por dos componentes principales que explican el 100 % de la variación observada. Así el componente principal 1 (CP1), explicó un 78 % de la variación y logró separar la población de La Pampa de Olaen (PO) de Biolet Massé (BM) y Los Gigantes (LG), la componente principal 2 (CP2) explica un 22 % de la variación observada (Figura 3. 11).

Las plantas de la población de PO se separaron de las otras poblaciones por poseer los mayores valores de todos los caracteres excepto de la relación PA/PR tanto de peso

seco como de peso fresco y la variable L, tal como lo demuestra el análisis MANOVA donde se observan diferencias significativas para las 3 poblaciones ($P < 0,05$)

La CP2 separó la población de LG, de las otras 2 poblaciones. La variable L fue la responsable de separar LG de las otras poblaciones, dado que las plantas madre de esta población presentaron mayor valor para este carácter, si bien estas variables no fueron significativas ($P < 0,05$) aunque mostraron una tendencia (Tabla 3. 19).

El MANOVA muestra que las 3 poblaciones presentan diferencias significativas en cuanto a sus variables.

Tabla 3. 19. Caracteres morfológicos y colorimétricos de tres poblaciones de *G. bigeminum* analizado con MANOVA (multivariado)

POB.	PFPA	PSPA	LPR	APR	NR >	NR <	PFPR	PSPR	L	a	b	C	H	
PO	26,16	8,78	31,2	20,70	10,9	16,4	21,11	3,65	40,95	33,95	27,16	43,51	0,68	A
LG	18,30	5,00	21,0	16,50	2,00	9,20	14,29	2,91	43,23	33,87	23,73	41,41	0,61	B
BM	4,870	1,33	23,2	10,91	2,70	5,80	4,34	0,60	42,15	33,92	22,80	40,91	0,59	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 3. 20. Caracteres morfológicos y colorimétricos de tres poblaciones de *G. bigeminum* analizado mediante Kruskal Wallis.

POB.	H	PA/PRF	PA/PRS	S				
BM	0,59	A	2,17	A	3,70	A	0,99	A
LG	0,61	A	1,56	A	2,04	A	0,97	A
PO	0,68	B	1,34	A	2,79	A	1,08	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Para los caracteres analizados por Kruskal Wallis no se registraron diferencias significativas ($p > 0,05$). (Tabla 3. 20).

De la descendencia de *G.latoramosum* en condiciones de cultivo. De los 21 caracteres morfológicos y colorimétricos analizados de la descendencia de *G. latoramosum* en cultivo, el ACP logró reducir la cantidad de variables, por el grado de participación, a 14 caracteres.

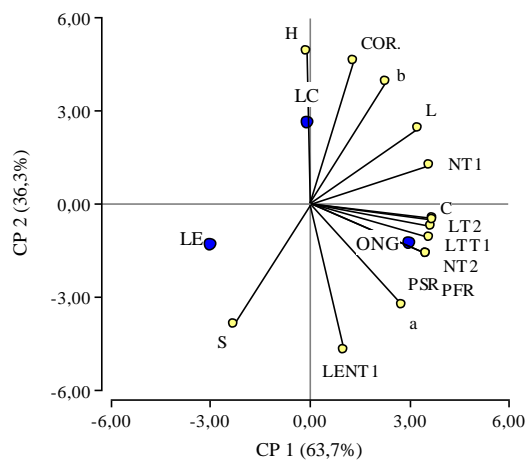


Figura 3. 12. Ordenamiento bidimensional de 14 caracteres morfológicos de la descendencia de *G. latoramosum*, de 3 poblaciones diferentes, en base a los 2 primeros componentes principales CP1 y CP2. Población: ONG=Ongamira, LE=La Estancita, LC=La Cumbre

El ACP de 21 caracteres morfológicos de individuos pertenecientes a la descendencia de *G. latoramosum* en condiciones de cultivo, quedó definido por dos componentes principales que explican el 100 % de la variación observada. Así el componente principal 1 (CP1), explicó un 63,7 % de la variación y logró separar la población de La Estancita (LE) de ONG, mientras que la población de La Cumbre (LC) quedó en el medio de las otras 2

poblaciones. La componente principal 2 (CP2) contribuyó con un 36,3 % de la variación observada (Figura 3. 12).

Las plantas de la población de ONG se separaron de las otras poblaciones por poseer mayores valores ($P < 0,05$) en los caracteres (Tabla 3. 21 y Tabla 3. 22): C (color), a (coordenadas rojo/verde = mayores valores de “a” indican rojo), longitud tallo secundario (LT2), largo tallo primario (LTT1), número de tallos secundarios (NT2), peso seco de los órganos subterráneos y luminosidad (PSR y L).

La CP2 separó la población de LC, de las otras 2 poblaciones. Las variables COR, H y b fueron los responsables de separar LC de las otras poblaciones, dado que los individuos de la descendencia de esta población presentaron los mayores ($P < 0,05$) valores para dichos caracteres. La población de LE se caracterizó por presentar los menores valores ($P < 0,05$) excepto para la variable colorimétrica S (Tabla 3. 21 y Tabla 3. 22).

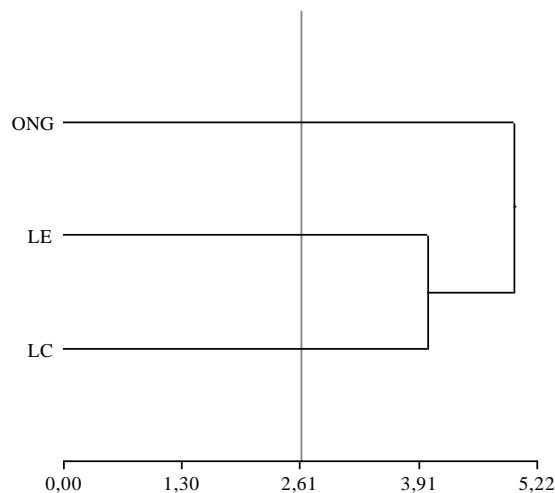


Figura 3. 13. Dendrograma obtenido con el método UPGMA, basados en la distancia euclídea entre plantas de la descendencia de 3 poblaciones de *G. latoramosum* representados por todos los caracteres morfológicos de parte aérea, raíces y color.

La Figura 3. 13 muestra el dendrograma obtenido con la matriz de distancia euclídea de 14 caracteres morfológicos obtenidos de la descendencia de plantas madre de *Galium latoramosum*, de 3 poblaciones de la provincia de Córdoba: Ongamira (ONG), La Cumbre (LC) y La Estancita (LE) con una correlación cofenética de 0,715. A un nivel de distancia euclídea de 2,61 se observa que se forman tres grupos de igual manera a lo observado en el ACP (Figura 3. 13). El análisis multivariado confirma las diferencias observadas en las 3 poblaciones para las 9 variables paramétricas participantes del ACP (Tabla 3. 21).

En la Tabla 3. 21 se observa que sólo 2 variables mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$), siendo la población de La Cumbre la que mayores valores presentó para H y COR (Corona).

Tabla 3. 21. Caracteres morfológicos y colorimétricos de la descendencia de tres poblaciones de *G. latoramosum* analizados con MANOVA y método de comparación a posteriori Hotelling

POB.	NT1	LTT1	LT2	L	C	a	b	S	PSR	
LE	4,36	36,61	5,7	35,5	43,18	34,79	25,46	1,24	0,94	B
ONG	6,91	40,65	12,85	38,56	45,8	36,94	26,95	1,19	1,04	A
LC	6,18	38,09	8,65	38,48	44,22	34,21	27,85	1,17	0,96	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 3. 22. Caracteres morfológicos y colorimétricos de la descendencia de tres poblaciones de *G. latoramosum* analizados con Kruskal Wallis a través de la prueba de comparaciones múltiples.

POB.	LENT1		NT2		H		COR	
LC	2,16	A	2,09	A	0,68	A	4,89	A
LE	2,79	A	1,64	A	0,63	B	2,49	B
ONG	3,04	A	3,18	A	0,63	B	3,37	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Determinación de las propiedades fisicoquímicas de las fibras teñidas con tintes extraídos de *Galium* spp. mediante la aplicación de pruebas de solidez

Las propiedades fisicoquímicas de las fibras teñidas se presentan a través de los resultados de ensayos de solidez al lavado, al frote, al sudor, a la luz para *G. latoramosum*, *G. bigeminum* y *G. richardianum*. Los valores de solidez evaluados en escala de grises van del 1 al 5, siendo 5 el mejor valor y 1 el peor. Para el caso de la solidez a la luz la escala va del 1 al 8. También se brinda las coordenadas del color para cada especie.

Solidez al lavado doméstico y comercial. La Tabla 3. 23 presenta los resultados de este ensayo efectuado por el INTI bajo Normas IRAM de *Galium latoramosum*, *G. bigeminum* y *G. richardianum*. No hubo prácticamente diferencias entre especies, se comportaron todas muy bien respondiendo entre 4 y 5 para el cambio de color y para las transferencias a otras telas también se comportaron muy bien, obteniéndose en todos los casos resultados entre 4-5. (Escala del 1 al 5 siendo 5 mejor resultado).

Tabla 3. 23. Solidez al lavado doméstico y comercial de tres especies del género *Galium spp.*

Muestras	Cambio de color	Transferencias					
		acetato	algodón	poliamida	poliéster	acrílico	lana
M1	4*	4-5	4-5	4-5	4-5	4-5	4-5
M2	4-5	4-5	4-5	4-5	4-5	4-5	4-5
M3	4-5	4-5	4-5	4-5	4-5	4-5	4-5

*Vira al rojo. Referencias: M1: *G. bigeminum*, M2: *G. richardianum* y M3: *G. latoramosum*. Método de ensayo: Norma: IRAM-AAQCT B 13550:201. Ensayo A1S. Detergente E.C.E.

Solidez al frote. La Tabla 3. 24 muestra los resultados de este ensayo efectuado por el INTI bajo Normas IRAM. No hubo prácticamente diferencias entre las 3 especies. Para el frote seco se comportaron igual las 3 especies, obteniendo una valoración regular (2) y para frote húmedo levemente mejor *G. richardianum*, que obtuvo una valoración regular, en cambio las otras 2 especies obtuvieron valores entre escaso y regular ante el frote húmedo.

Tabla 3. 24. Solidez al frote de tres especies del género *Galium spp.*

Muestras	Especies	Seco	Húmedo
M1	<i>G. bigeminum</i>	2	1-2
M2	<i>G. richardianum</i>	2	2
M3	<i>G. latoramosum</i>	2	1-2

Método de ensayo: NORMA: IRAM- aaqct B 13519:2009. Dispositivo de frote: cilindro. Pick up: 100 %. Tiempo de acondicionamiento de tejidos testigos y muestra: mayor a 5 h

Solidez al sudor. Los resultados de la solidez al sudor se presentan en la Tabla 3.25 en medio ácido y en la Tabla.3. 26 en medio básico realizado por el INTI bajo Normas IRAM a tres especies de *Galium spp.* Con respecto al cambio de color y la solidez al sudor en medio ácido se comportaron las 3 especies iguales, obteniendo muy buenos resultados (4-5). Lo que no fue muy positivo fue la transferencia a las poliamidas y a lana, donde se obtuvieron valores entre 1 y 2. Para la transferencia al acrílico se obtuvieron los mejores resultados, para las 3 especies, es decir que hubo menor migración del colorante hacia prendas de acrílico. El comportamiento del colorante fue muy similar en sudor en medio básico que en medio ácido. Aunque hubo algunas diferencias, como que por ejemplo *G latoramosum* se comportó un poco mejor para la Solidez al sudor en medio básico en la transferencia al sustrato lana, pero en poliéster fue al revés. (Tabla 3. 25)

Tabla 3. 25. Solidez al sudor en medio ácido de tres especies del género *Galium spp.*

Muestras	Cambio de color	Transferencias/					
		acetato	algodón	poliamida	poliéster	acrílico	lana
M1	4-5	3	3-4	2	4	4-5	2
M2	4-5	3	3-4	2	4	4-5	2
M3	4-5	2-3	3	1-2	4	4-5	1-2

Referencias: M1: *G. bigeminum*, M2: *G. richardianum* y M3: *G. latoramosum*

Tabla.3. 26. Solidez al sudor en medio básico de tres especies del género *Galium spp.*

Muestras	Cambio de color	Transferencias/					
		acetato	algodón	poliamida	poliéster	acrílico	lana
M1	4-5	3-4	3-4	2	3-4	4	2-3
M2	4-5	3-4	3-4	2	3-4	4	2-3
M3	4-5	3	3-4	2	3-4	4	2

Referencias: M1: *G. bigeminum*, M2: *G. richardianum* y M3: *G. latoramosum*. Método de ensayo: NORMA: IRAM-MOCT B 13533:1997

Solidez a la luz. Los resultados de la solidez a la luz presentados en la Tabla 3. 27 realizados por el INTI bajo Normas IRAM a tres especies de *Galium* en estudio demuestran que *G. latoramosum* es el más sólido frente a la luz seguido por *G. richardianum*.

Tabla 3. 27. Solidez a la luz de tres especies del género *Galium spp.*

Muestras	Especies	Índice	Húmedo
M1	<i>G. bigeminum</i>	4	1-2
M2	<i>G. richardianum</i>	5-6	2
M3	<i>G. latoramosum</i>	6	1-2

Método de ensayo: IRAM-AAQCT B 13529:1997. Temperatura de panel negro: 60±1 °C. Temperatura de cámara: 35±2 °C. HR: 30±5%. Irradiancia (300-400 nm): 60 W/m². La solidez a la luz es evaluada con escala de azules que va del 1 al 8. Siendo 8 el mejor valor y 1 el peor.

Caracteres colorimétricos. La Tabla 3. 28 compara el espacio de color CIELCH, para las 3 especies de *Galium* (*G. latoramosum*, *G. bigeminum* y *G. richardianum*). El color queda definido por los valores presentados en las tres coordenadas del color.

Tabla 3. 28. Coordenadas de color de tres especies del género *Galium spp.*

Muestras	Especies	Coordenadas de color		
		L*	a*	b*
M1	<i>G. bigeminum</i>	33,26	35,67	27,69
M2	<i>G. richardianum</i>	36,13	34,30	28,04
M3	<i>G. latoramosum</i>	31,72	34,73	21,27

Método de ensayo: Equipo: Espectrofotómetro Modelo 650 de Datacolor. Características: doble haz; geometral: d/8'. Condiciones de calibración; especularidad: incluida, UV: incluido, abertura: 30 mm. Número de mediciones por muestra: 6.

Identificación de los compuestos químicos responsables de las propiedades tintóreas de *G. latoramosum*

Estudio químico preliminar. En la Tabla 3.29 se presentan los compuestos químicos identificados en *G. latoramosum* a través de la marcha química sobre material vegetal fresco. De dicha tabla se desprende que los compuestos químicos que esta especie presentó en abundancia fueron taninos y antraquinonas (AQ) glicósiladas, y en menor medida saponinas, hidratos de carbono, flavonoides glicósidos y AQ aglicones. Es importante destacar que dio positivo la reacción de coloración específica para Asperulósido.

Tabla 3.29. Compuestos químicos identificados en material fresco de *G. latoramosum*

Compuestos químicos	Raíces
Taninos	+++
Proantocianidinas	-
Antocianinas	-
Betacianinas	-
Hidratos de carbono	+
Saponinas	+
Flavonoides sulfatados	-
Flavonoides aglicones	-
Flavonoides glicósidos	+
Antraquinonas aglicones	+
Antraquinonas glicósidos	+++
Fitoesteroides	-
Alcaloides 1 ^{ros} , 2 ^{ros} y 3 ^{ros}	-
Alcaloides 4 ^{ros}	-
Iridoides (asperulósido)	+

Referencia: + Reacción positiva, - Reacción negativa, +/- Reacción débil. Abundancia relativa: +++ Muy abundante, ++ Abundante, + Poco abundante

Como se explicó en materiales y métodos, la identificación de estas familias de compuestos se llevo a cabo mediante reacciones de coloración, la abundancia relativa es una medida subjetiva dada por la intensidad de color generado en cada reacción.

Selección de metodología de extracción y análisis químico de los extractos obtenidos.

La Tabla 3. 30 muestra los diferentes extractos obtenidos mediante dos metodologías de extracción.

Tabla 3. 30. Extractos obtenidos con dos métodos de extracción a baja escala.

Extractos obtenidos mediante dos metodologías de extracción a baja escala	
Métodología A: El ext.madre es particionado con solventes de polaridad creciente.	Métodología B: el material vegetal es extraído sucesivamente con solventes de polaridad creciente
Ext. de benceno (Ben-A), Ext.de cloroformo (Cl ₃ CH-A), Ext. de éter etílico (Étereo-A), Ext. de acetato de etilo (AcOEt-A), Ext.acuoso remanente final(Aq-A)	Ext. de benceno (Ben-B), Ext. de cloroformo (Cl ₃ CH-B), Ext. de acetato de etilo (AcOEt-B), Ext. de etanol (EtOH-B)

La Cromatografía en Capa Delgada (CCD) determinó que en la metodología A, la mayoría de los pigmentos rojos quedan en el extracto de AcOEt y acuoso remanente final (AcOEt-A y Aq-A), los cuales se visualizan como manchas rojas bajo luz visible. Sin embargo, los pigmentos de color rojo fueron extraídos mejor con el metodología B, siendo el patrón cromatográfico del extracto bencénico (Ben - B) similar al extracto clorofórmico (Cl₃CH-B). Además, se observó que las manchas de color rojo adquirirían una coloración rojiza de mayor intensidad al ser revelada con vapores de KOH (10%), lo cual es característico para AQs. Esto no estaría indicando la presencia de estos pigmentos.

En función de estos resultados, se decidió aplicar la metodología de extracción B, pero a mayor escala y eliminando la extracción con cloroformo, ya que este solvente extrae lo mismo que el benceno. Además, la maceración en ampolla de decantación fue reemplazada por un aparato Soxhlet que permitió utilizar mayor cantidad de material

vegetal (90 g), además que presenta ciertas ventajas sobre la maceración: utiliza el mismo volumen de solvente, el MV se agota en menor tiempo y no necesita filtración.

Obtención de un extracto rico en pigmentos antraquinónicos. Al aplicar la metodología B a gran escala, se obtuvieron tres extractos: Ben-C, AcOEt-C y EtOH-C. Dichos extractos se ensayaron en cuanto a su capacidad tintórea, y el ensayo reveló que el extracto Ben-C exhibe mayor capacidad tintórea, como se observa en la Figura 3. 14.

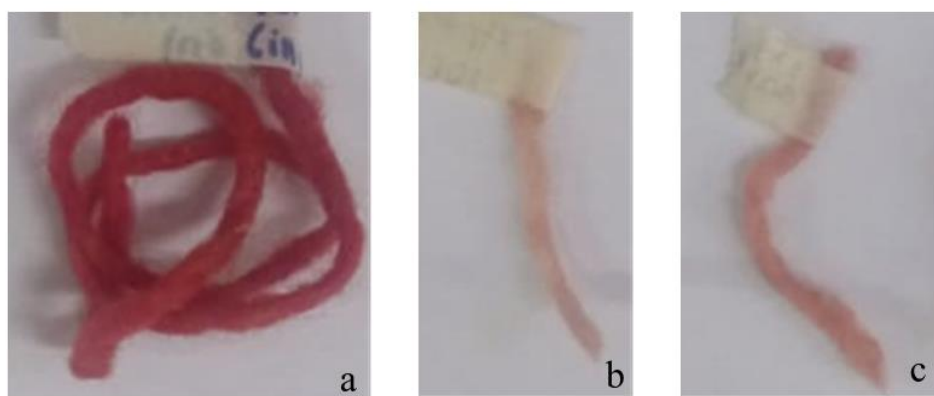


Figura 3. 14. Lanas teñidas con los extractos obtenidos mediante la metodología B a gran escala. a) Extracto Ben-C, b) Extracto AcOEt-C y c) extracto EtOH-C

El análisis de estos tres extractos por CCD, usando las FM características para AQs y flavonoides, estableció que la mayoría de los derivados antraquinónicos se encontraban en el extracto Ben-C y por lo tanto se eligió para la identificación de los pigmentos responsables de la capacidad tintórea de *G. latoramosum*.

ANÁLISIS QUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO CON MAYOR CAPACIDAD TINTÓREA

El extracto Ben-C se sometió a una cromatografía de exclusión (LH-20) con el fin de obtener los pigmentos en forma separada.

La Tabla 3. 31 presenta el gradiente de elución aplicado en la cromatografía en columna (CC) de exclusión del extracto Ben-C.

Tabla 3. 31. Gradiente de elución y alícuotas obtenidas del extracto Ben-C sometido a CC de exclusión.

Fase móvil	Proporción	Volumen (ml)	Alícuotas
Benceno	100	200	1-7
Ben-AcOEt	80-20	50	8
	50-50	50	9-10
	20-80	50	11-12
AcOEt	100	50	13-14
AcOEt- EtOH	80-20	50	15-16
	50-50	50	17-18
	20-80	50	19-20
EtOH	100	50	21-22
AcOEt /Me OH/H ₂ O	100-13,5-10	50	23-24

En primera instancia, se aplicó un gradiente de polaridad creciente, comenzando con benceno y siguiendo con AcOEt y EtOH. Como se visualizaba la fase estacionaria coloreada, se estimó que quedaban algunos pigmentos retenidos. Por esta razón, se probó otra fase móvil a fin de lograr la elución de todos los pigmentos. Esta fase mejoró la elución de la columna, ya que la fase estacionaria quedó levemente rosada.

Mediante el análisis de cada alícuota por CCD se pudieron agrupar según las semejanzas en el patrón cromatográfico observado. Así, las 24 alícuotas fueron agrupadas en 14 fracciones (Fr) (Tabla 3. 32).

Tabla 3. 32. Fracciones resultantes de la CC de exclusión del extracto Ben-C según análisis por CCD de las alícuotas obtenidas. Color observado en las lanas teñidas por método ajustado de tinción con cada alícuota.

Fracción	Alícuotas	Color de tinción
1	1	Gr-1: rojos
2	2	
3	3	
4	4	
5	5-6	
6	7-9	Gr-2: amarillos
7	10-12	
8	13-15	
9	16	Gr-3: Naranjas
10	17	
11	18-19	
12	20-22	Gr-4: rosados
13	23	
14	24	

A su vez, se evaluó la capacidad para teñir lanas de las 24 alícuotas obtenidas del extracto Ben-C. En la Figura 3. 15 se puede observar el color y la intensidad con que se tiñe la lana con cada alícuota obtenida. Se deduce que la CC de exclusión permitió separar los pigmentos rojos que predominan en las alícuotas 1 a 6 (Ali-1-6) de los amarillos (Ali-7-15), predominando los naranja-amarronados en las Ali-16-19 y los rosados en las Ali-20-24. Así, según la capacidad para teñir lana con diferentes colores, se obtuvieron 4 grupos de fracciones (Tabla 3. 32).

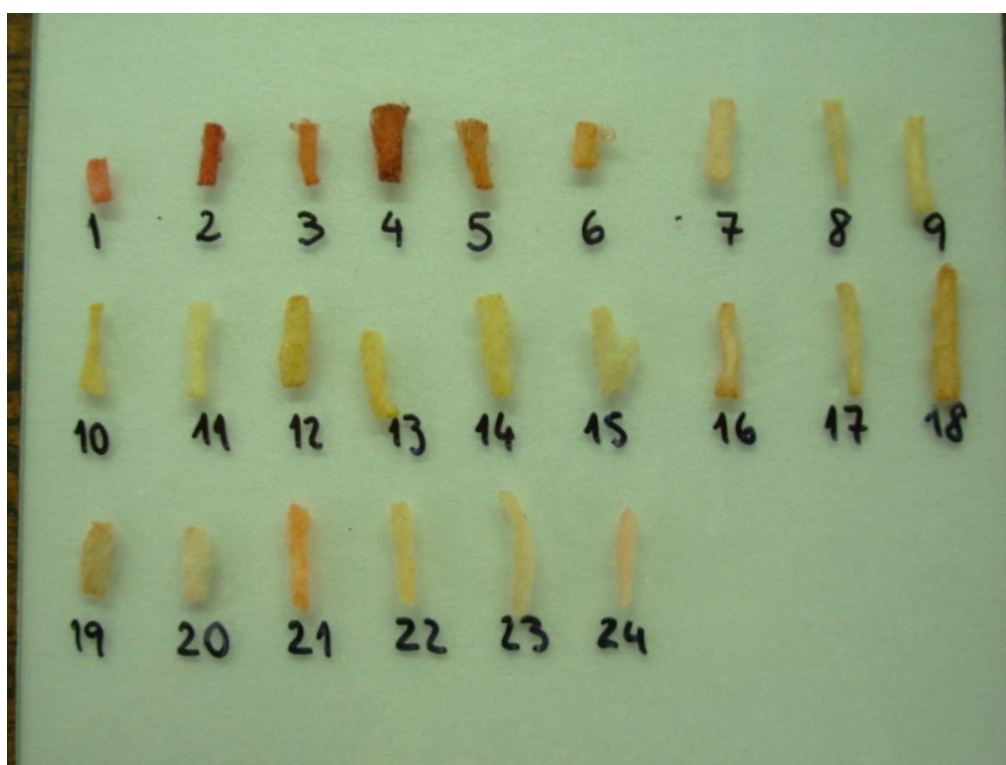


Figura 3. 15. Capacidad tintórea de cada una de las alícuotas obtenidas de la CC del Ext. Bencénico C (cromtografía de exclusión con LH-20) en sustrato lana, mediante método de tinción ajustado.

Se trató de purificar los pigmentos mayoritarios presentes en las 14 fracciones obtenidas de la CC, mediante CCD preparativa (CCDp), usando como fase estacionaria sílica gel (adsorción) o celulosa (partición). Lamentablemente, las manchas reveladas eran difíciles de extraer a partir de ambas fases estacionarias. Se podría inferir que estos pigmentos poseen un gran poder de fijación en distintas superficies (sílica, celulosa, lana), condición favorable si se desea un pigmento que permanezca en la superficie teñida; pero esta característica dificulta su purificación por CCDp. Al quedar retenidos en las fases estacionarias, la cantidad de cada pigmento purificado es pequeña, ya que una importante cantidad queda retenida. Esto dificulta la obtención de cantidades suficiente de compuesto puro para realizar su identificación por técnicas como RMN, IR, EM, UV-Vis.

En función de estos resultados, se decidió identificar los pigmentos en el extracto con mayor poder de tinción, mediante el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC: High Performance Liquid Chromatography-), con un detector de arreglo de diodos (DAD) y adosada a un detector de triple cuadrupolo de tiempo de vuelo (QTOF) (HPLC-DAD-ESI-QTOF)

Identificación de pigmentos antraquinónicos por HPLC- DAD-ESI-QTOF. Se eligieron para analizar 4 fracciones que eran representativas de cada uno de los colores de tinción: Fr-4, Fr-7, Fr-11 y Fr-12. Los cromatogramas obtenidos de estas 4 fracciones se muestran en la Figura 3.16.

En la Tabla 3. 33 se observan las estructuras químicas de las AQs identificadas, esto permite interpretar su comportamiento en el HPLC-MS.

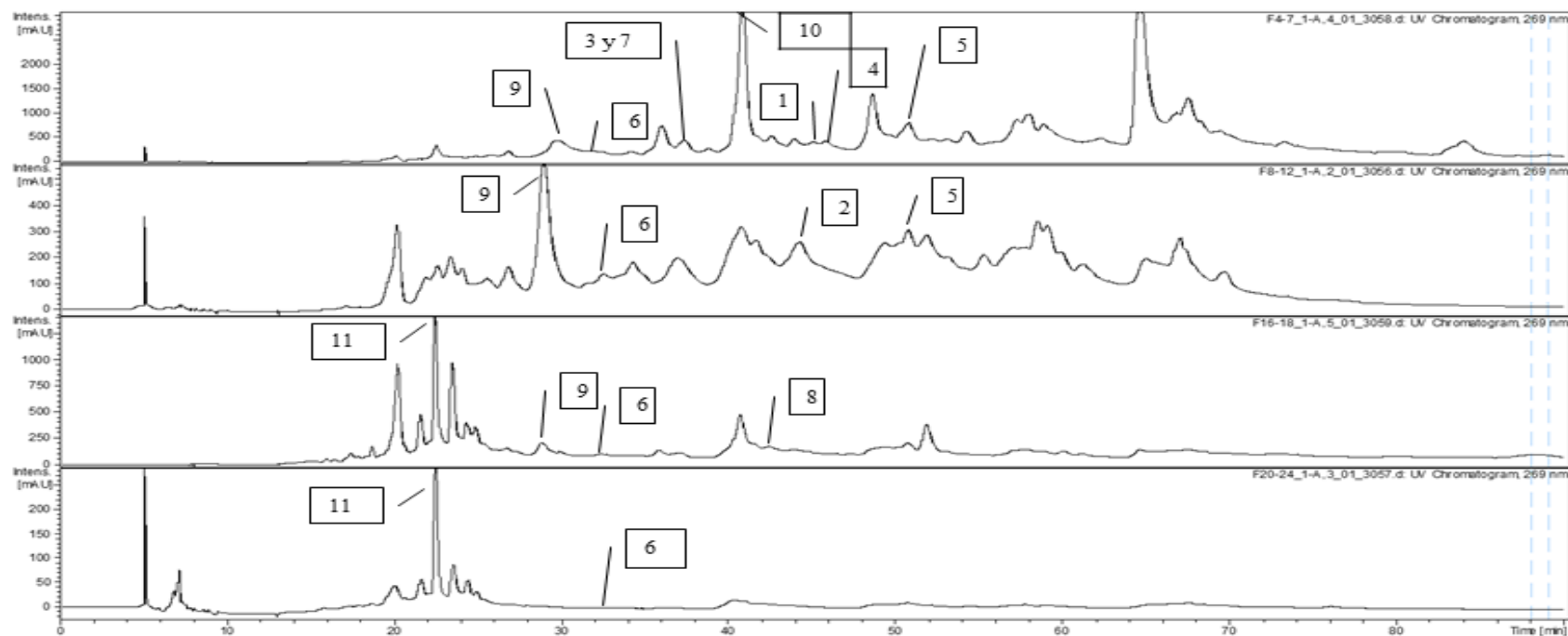
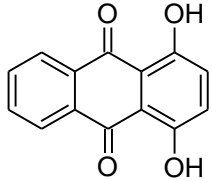
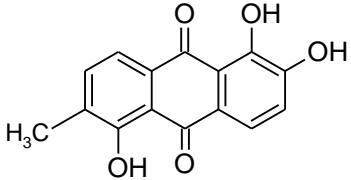
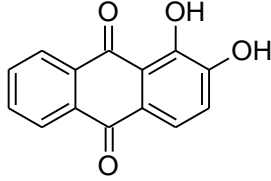
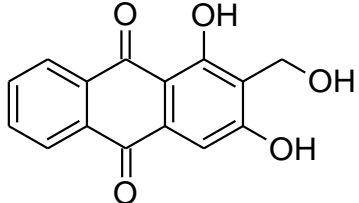
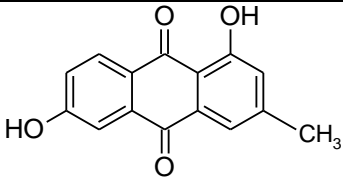
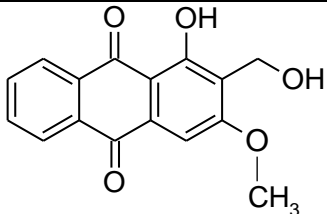
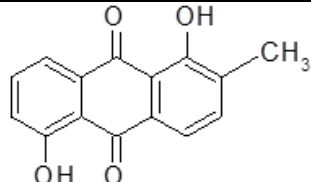
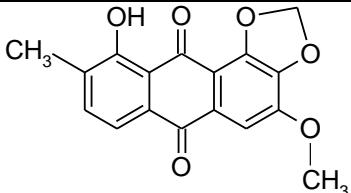
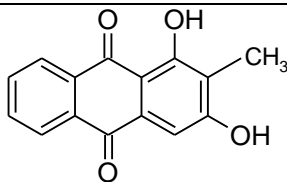
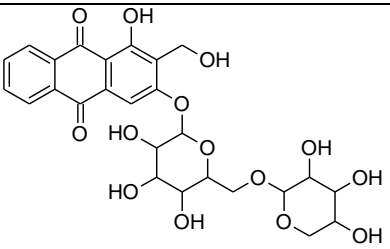
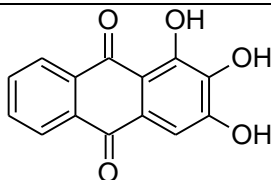


Figura 3. 16. Análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF de las fracciones de *Galium latoramosum* obtenidas a partir del extracto bencénico.

Referencias: de arriba abajo se muestra fracción 4; 7; 11 y 12. Aq: 1- Quinizarina.2- Alizarina.3- Fomarina .4-1,5-dihidroxi-2-metil antraquinona. 5- Rubiadina. 6- Antragallol.7- Morindona .8- Lucidina. 9- 3-metil éter de lucidina.10- 8-hidroxi-3-metoxi-7-metil 1,2 metilenedioxy AQ.11-Lucidina primeverósido

Tabla 3. 33. Antraquinonas identificadas y sus respectivas estructuras químicas.

Aqs identificadas	Estructura Química	Aqs identificadas	Estructura Química
Quinizarina (1,4-dihidroxi antraquinona)		Morindona (6-metil-1,2,5-trihidroxi antraquinona)	
Alizarina (1,2-dihidroxi antraquinona)		Lucidina. (2-hidroximetil-1,3-dihidroxi antraquinona)	
Fomarina (3-metil-1,6-di hidroxi antraquinona)		3-metil éter de lucidina	
1,5-dihidroxi-2-metil antraquinona		8-hidroxi-3-metoxi-7-metil 1,2-metilenedioxi antraquinona	
Rubiadina (2-metil-1,3 dihidroxi antraquinona)		Lucidina primaverosid o	
Antragallool (1,2,3-trihidroxi antraquinona)			

En la Figura 3. 16 se muestran los patrones cromatográficos de las 4 fracciones analizadas por HPLC-DAD-ESI-QTOF. Se observa que la Fr-4 es la que mayor cantidad de AQs con mayor tR tuvo y que además, presenta un perfil cromatográfico similar al de la Fr-7; en cambio en las otras 2 fracciones (Fr-11 y Fr-12) predominan AQs con menor tR, que corresponden como se observa en la Figura 3. 15 a la gama de los marrones y rosados.

Se observa que la Fr-4 posee mayor número de derivados antraquinónicos, ya que se identificaron 8 AQs. La Fr-7 presenta un perfil cromatográfico similar a la Fr-4, pero está 5 veces más diluida. Por lo tanto, la Fr-4 es más rica en número de AQs y cantidad de las mismas. Las Fr-11 y Fr-12 se diferencian de las fracciones anteriores, pero presentan un perfil cromatográfico similar entre ellas, estando la Fr-12, 3 veces más diluida que la Fr-11.

Teniendo en cuenta que la FE es no polar (C-18 ver materiales y métodos) y la FM es polar (Acetonitrilo-Ácido Fórmico), los compuestos no polares quedan más retenido, presentando tR mas altos y los compuesto polares eluyen primero, presentando tR mas bajos.

Como la Fr-4 y Fr-7 corresponden a alícuotas eluidas de la columna con benceno y benceno-AcOet respectivamente, en estas fracciones predominan los compuestos no polares con alto tR, como por ejemplo. Rubiadina, una AQ agliconanda, con características apolares (Tabla 3.33). En cambio, en las Fr-11 y Fr-12 predominan los compuestos polares (con bajo tR), en ambas fracciones 11 y 12, se detectó, Lucidina Primaveraosido (AQ glicosilada) que por su estructura química (presencia del azúcar primaveraosa), le confiere características polares a dicha molécula. Ambas alícuotas fueron eluidas con AcOEt-EtOH y EtOH, respectivamente; disolventes que tiene mayor afinidad por compuestos polares.

La Fr. 4 fue la que mayor contenido de antraquinonas tuvo. Presentó 8 antraquinonas de las 11 encontradas en total. La única AQ encontrada en todas las fracciones fue Antragallol. En la Figura 3. 16 se puede apreciar que la fracción 4 concentra las coloraciones con mayor predominio de rojo. A medida que se avanza a las otras tres fracciones (7, 11 y 12) se observa que disminuye el contenido de AQs y también la coloración roja, en la fracción 7 predominan los amarillos, seguramente se deba a la presencia de alizarina y rubiadina. En la Fracción 11 predominan, según la observación visual de las porciones de lana teñidas, los colores naranjas, y las AQs encontradas en dichas porciones corresponden a coloraciones naranjas y rojas. En el caso de 3 metil éter de Lucidina no se sabe a qué coloración corresponde (no reportado). Por último, la fracción 12, según la observación visual corresponde a la coloración de los rosados, en dicha fracción estuvieron presentes solo las siguientes antraquinonas: Antragallol y Lucidina primaverosido.

Tabla 3. 34. Antraquinonas identificadas en fracciones de extracto bencénico obtenido de raíces de *G. latoramosum*, mediante HPLC-DAD-ESI-QTOF

Antraquinona	Datos de compuestos testigos				[M-1] (m/z) experimental	Identificación de AQs en fracciones Error (ppm) [msigma]				
	[M-1] (m/z)	t _R (min)	Fragmentos MS/MS (m/z)	UV-Vis (nm)		4	7	11	12	Color visible
Quinizarina	239,0360	45,0 ± 0,2	211, 195	264, 284, 315,5 (sh), 335 (sh), 426 (sh) (6)	239,0350	4,2 [24,6]				
Alizarina	239,0342	44,5 ± 0,2	211, 195	266, 282,5, 354 (1)	239,0350		3,3 [11,9]			
Fomarina	253,0516	37,5 ± 0,2	238, 210	269, 283 (sh), 320 (sh) y 376,5 (sh) (1)	253,0506	3,9 [14,5]				
1,5-dihidroxi-2-metil antraquinona	253,0509	45,7 ± 0,2	225	288, 333,5 (sh) y 428,5 (2)	253,0506	1,2 [35,8]				*N.R
Rubiadina	253,0515	50,6 ± 0,2	225	247, 280, 333, 403 (sh) (5)	253,0506	3,5 [22,4]	4,1 [19,5]			
Antragallool	255,0296	32,3 ± 0,2	227, 210, 185	260, 288, 406, 5 (sh) (6)	255,0299	1,2 [31,0]	0,2 [7,6]	3,3 [13,3]	10,7 [19,1]	
Morindona	269,0447	37,1 ± 0,2	251, 223, 195	274, 326 (sh) y 379 (sh) (6)	269,0455	3,0 [19,6]				
Lucidina	269,0469	42,4 ± 0,4	251, 225	278, 330 (sh), 411 (sh) (3)	269,0455			5,1 [12,8]		
3-metil éter de lucidina	283,0595	28,9 ± 0,4	268, 253, 239, 210, 185	260, 287, 324 (sh) y 414,5 (sh) (2)	283,0612	5,9 [20,4]	11,4 [11,6]	6,4 [24,2]		*N.R
8-hidroxi-3-metoxi-7- metil 1,2 metilenedioxy AQ	311,0547	40,9 ± 0,3	268, 238	244, 271, 296, 328,5 (sh) (2)	311,0561	4,4 [11,9]				*N.R
Lucidina primeverósido	563,1740	22,6 ± 0,3	357, 269	267, 318 (sh), 405 (1)	563,1406			8,0 [9,4]	1,9 [21,2]	

Datos UV-Vis coincidente con bibliografía: (1) Cuoco *et al.*, 2011. (2) Koyoma *et al.*, 1991. (3) Wijnsma y Verpoorte, 1986. (4) Zoran *et al.*, 2013. (5) Núñez Montoya, Tesis Doctoral, 2002. (6) Caro *et al.*, 2012.* N.R: No reportado.

Domesticación

Registro de los estadios fenológicos reproductivos en condiciones de cultivo

De Galium latoramosum. En la Figura 3.17 se observa la evolución de la formación de frutos en un ejemplar de *G. latoramosum* desde fruto cuajado (FC) hasta fruto completamente maduro (FCM).

Las 3 poblaciones estudiadas presentaron floración escalonada, siendo la población de La Estancita la primera que entró en floración, luego Ongamira y por último La Cumbre. Los estadios fenológicos registrados fueron 6 para todas las poblaciones evaluadas en condiciones de cultivo (Figura 3.17): 1) Floración (FL): desde que la flor está abierta, con sus partes reproductivas visibles hasta cuando se observó la caída de corolas y las flores más tardías terminan de abrir sus corolas; 2) Fruto cuajado (FC): ocurre desde que se detectó un fruto nuevo con el ovario levemente hinchado, 3) Fruto verde en crecimiento (FV): inicia cuando el fruto ya formado, presentó forma redondeada y color verde grisáceo y consistencia dura, 4) Fruto cremoso (FC); desde que se observaron bayas tornándose de un color verde grisáceo a verde cremoso, poseyendo mayor tamaño y consistencia más blanda por mayor porcentaje de agua, 5) Fruto en madurez temprana (FMT): cuando tuvo prácticamente el tamaño de cosecha pero aún no se puede ver la semilla en su interior y 6) Fruto completamente maduro (FCM), cuando ya adquirió una forma globosa de color blanquecino translúcido que permite ver perfectamente la semilla en su interior de color negruzco. Entre la semilla y el epicarpio hay un espacio que cuando comienza a perder humedad hace que el epicarpio quede adherido a la semilla. El momento óptimo de cosecha es FCM.

En la Figura 3. 18 se observa los niveles de floración expresados en porcentaje a través del tiempo para las tres poblaciones de *G. latoramosum*, siendo La Estancita la población que entró en floración antes que las otras 2 poblaciones. El máximo de floración de la población de La Cumbre se concentró el 9 de diciembre y terminaron de florecer el 15 de diciembre. La floración de la mayoría de las plantas de Ongamira se concentró entre el 18 y el 27 de noviembre, aunque un 20 % aproximadamente terminó de florecer a mediados de diciembre.



Figura 3.17. Estadios fenológicos de *G. latoramosum*. a. Floración (F), b. Fruto cuajado (FC), c. Fruto verde en crecimiento (FVC), d. Fruto cremoso (FCr), e. Fruto madurez temprana (FMT) y f. Fruto completamente Maduro (FCM).

En la Figura 3. 19 se observan los niveles de formación de frutos (%) para las 3 poblaciones y se puede apreciar que fueron muy similares las 3 poblaciones. La población de La Estancita fue la primera en tener todos los frutos maduros, (9 de diciembre), luego siguió en el tiempo la población de Ongamira y por último la población de La Cumbre.

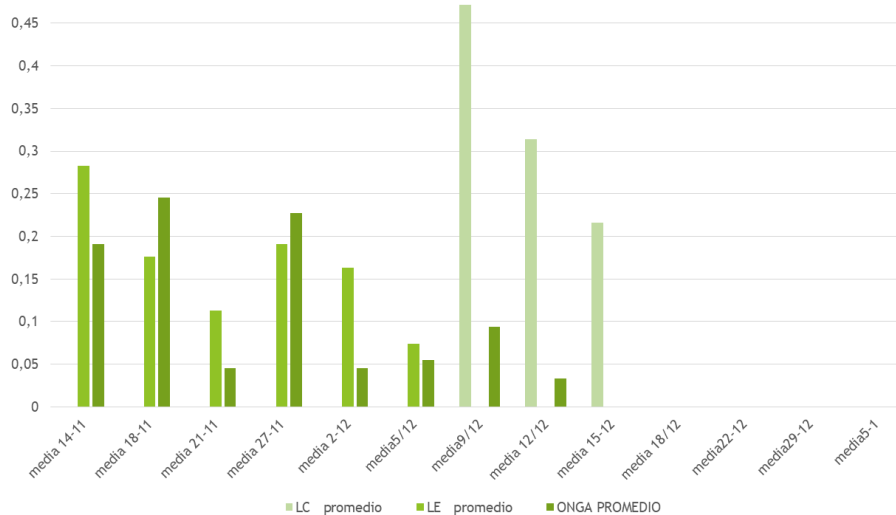


Figura 3. 18. Niveles de floración (%) a través del tiempo el tiempo de tres poblaciones de *G. latoramosum*

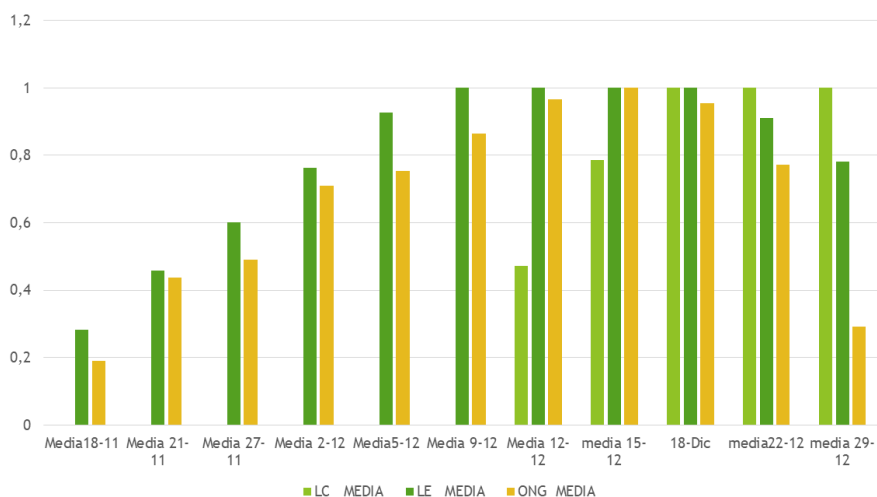


Figura 3. 19. Niveles de formación de frutos (%) de tres poblaciones de *G. latoramosum*.

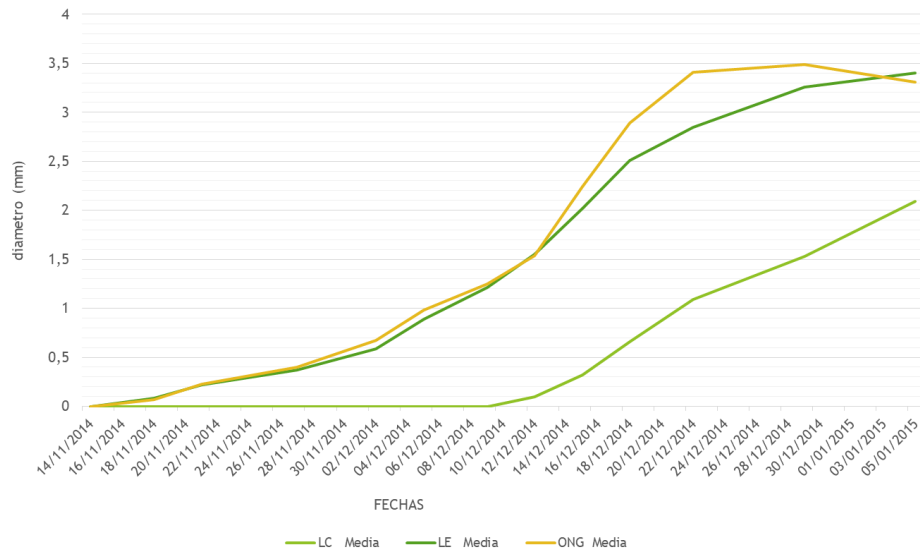


Figura 3. 20. Evolución del diámetro (mm) del fruto a función del tiempo de tres poblaciones de *G. latoramosum*.

En la Figura 3. 20 se observa la evolución del diámetro del fruto en función del tiempo. La población de Ongamira se caracterizó por tener frutos de mayor diámetro, los cuáles alcanzaron diámetros de 3,5 mm entre el 20 de diciembre y el 30 de diciembre. La población de LE se comportó hasta el 14 de diciembre de manera similar, pero luego el desarrollo del fruto fue más lento, es decir que alcanzó los mayores valores de diámetro el 5 de enero. Con respecto a LC, el desarrollo del fruto fue más lento que en las otras 2 poblaciones, teniendo diámetros finales menores, es decir alcanzó 2 mm al 5 de enero.

De *G. bigeminum* Las 3 poblaciones estudiadas presentaron floración escalonada, siendo la población de Biale Massé la primera que entró en floración, luego Los Gigantes y por último Pampa de Olaen. Los estadios fenológicos registrados fueron 5 para todas las poblaciones evaluadas en condiciones de cultivo.

- 1) Floración (FL): desde que la flor está abierta, con sus partes reproductivas visibles hasta cuando se observó la caída de corolas y las flores más tardías terminan de abrir sus corolas;
- 2) Fruto cuajado (FC): ocurre desde que se detectó un fruto nuevo con el ovario levemente hinchado.
- 3) Fruto cremoso en crecimiento (FCC): inicia cuando el fruto ya formado,

presenta forma aplanada, levemente redondeada, de color blanco cremoso y consistencia dura. 4) Fruto en madurez temprana (FMT): bayas tornándose a color blanco violáceo con mayor tamaño que el estadio anterior, pero de consistencia más blanda, por mayor porcentaje de agua. 5) Fruto completamente maduro (FCM), cuando ya adquirió una forma más redondeada, de color blanco violáceo brillante, que no permite ver la semilla en su interior, excepto que se realice un corte, pero sí se puede apreciar presionando con los dedos por la dureza de la semilla en su interior. Entre la semilla y el epicarpio no hay prácticamente espacio, es decir que el epicarpio está adherido a la semilla. El momento óptimo de cosecha es FCM.

En la Figura 3. 21 se observan algunos de los estadios de la fenología reproductiva de *G. bigeminum*.



Figura 3. 21. Estadios fenológicos de *G. bigeminum* a. Floración (F), b. Fruto cuajado (FC), c. Fruto cremoso en crecimiento (FCC), d. Fruto madurez temprana (FMT)

Para las 3 poblaciones de *G. bigeminum* en estudio la floración fue escalonada, coexistiendo flores con frutos, durante un largo periodo, que comenzó en marzo y terminó a fines de junio. La población que presentó una floración más larga fue la Biale Masse, luego le siguió Los Gigantes y por último la de Pampa de Olaen. En cuanto a la duración de la floración (Figura 3. 22) se observa que la de mayor duración fue la de B. Massé, seguida por la Pampa de Olaen y por último la duración más corta la presentó la población de Los Gigantes.

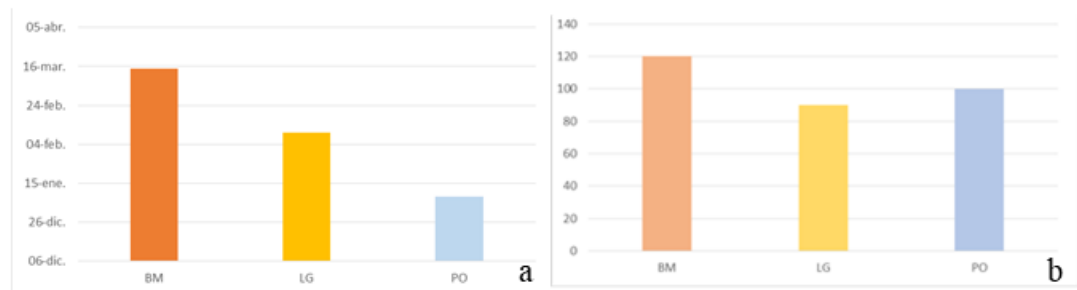


Figura 3. 22. Fenología de la floración en *Galium bigeminum* .a) fecha de inicio de la floración para las 3 poblaciones en estudio. b) duración media de la floración en días

Evaluación de la viabilidad de las semillas de *Galium latoramosum* de las poblaciones de crecimiento espontáneo

Evaluación del comportamiento germinativo y efecto de los tratamientos pregerminativos para ruptura de dormición. Ensayo I. Realizado en LS. La Figura 3. 23 muestra que el testigo (T_1) tuvo mayor porcentaje de semillas germinadas (25 %) estabilizándose la curva a los 107 días desde la siembra, mientras que los otros 3 tratamientos se estabilizaron a los 86 días, si bien estos valores no fueron significativos ($P > 0,05$). En cuanto al porcentaje de plántulas normales no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos (Figura 3. 24).

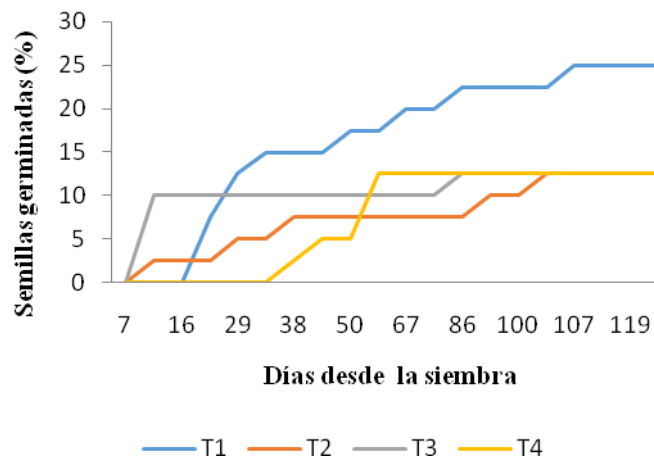


Figura 3. 23. Porcentaje de semillas germinadas (%) de *Galium latoramosum* en diferentes fechas de conteo del EI realizado en LS, en sustrato papel. Referencias. T1: testigo T2: calor más estratificación frío húmedo T3: calor T4: estratificación frío-húmedo.

Si bien la curva de germinación (Figura 3. 23) se estabiliza a los 107 días, en la Figura 3. 24, se aprecia que el porcentaje de plántulas normales (%) se estabiliza a los 86 días, es decir que las semillas que siguieron germinando luego de los 86 días comenzaron a dar plántulas anormales, eso se debe a que las plántulas no sobrevivieron en papel.

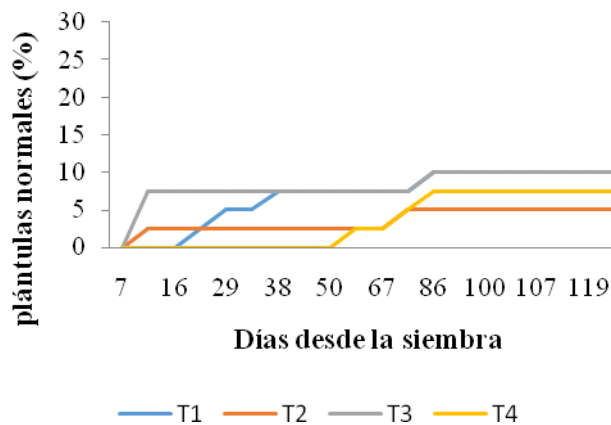


Figura 3. 24. Porcentaje de plántulas normales (%) de *Galium latoramosum* en diferentes fechas de conteo del EI realizado en LS, sustrato papel. Referencias. T1: Testigo. T2: calor más estratificación frío húmedo. T3: calor T4: estratificación frío-húmedo.

En la Figura 3. 25, se aprecia que el porcentaje de plántulas anormales fue máximo tanto en T₄ (estratificación frío- húmedo por 19 días a 4 °C) como en el testigo, si bien estos valores no fueron significativos en ninguna fecha de conteo ($P>0,05$), también se puede observar que el T₃ fue el primer tratamiento en el tiempo en presentar plántulas anormales.

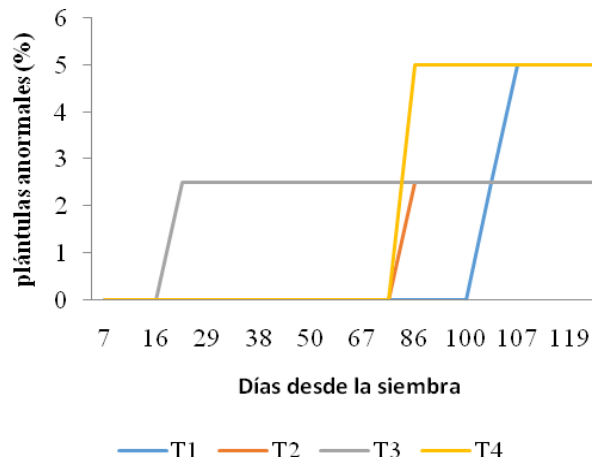


Figura 3. 25. Porcentaje de plántulas anormales (%) de *Galium latoramosum* en diferentes fechas de conteo del EI realizado en el LS

Referencias. T₁:testigo T₂: calor más estratificación frío húmedo T₃: calor T₄: estratificación frío húmedo

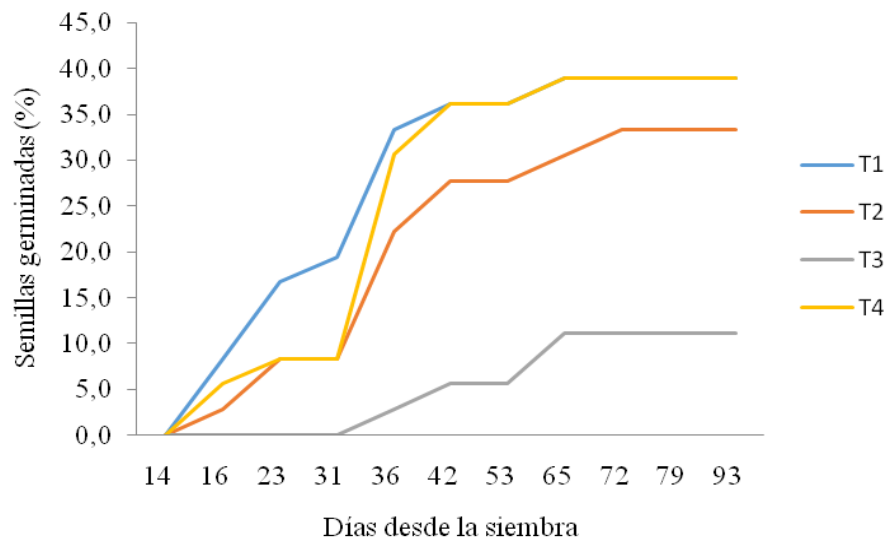


Figura 3.26. Porcentaje de semillas germinadas (%) de *Galium latoramosum* en diferentes fechas de conteos del EI realizado en VFE

Si se compara las plántulas normales en LS (Figura 3. 24) con las plántulas normales en VFE (Figura 3.26) se observa que el porcentaje de germinación fue mayor en el ensayo realizado en VFE (Figura 3.26) (40 contra 25 %). *Galium latoramosum* se adaptó mejor a siembras sobre sustrato suelo que entre papel. La Tabla 3. 35 muestra dichas diferencias a los 72 días desde la siembra, siendo el comportamiento del testigo semejante a los tratamientos 2 y 4. Algunos de los factores (sustrato, temperatura, luz) deberán ser modificados en laboratorio, dado que la germinación fue superior en invernadero ($P < 0,05$).

Tabla 3. 35. Comparación entre plántulas normales en laboratorio de semillas e invernadero a 72 días desde la siembra

Tratamiento	Laboratorio de Semillas	Invernadero
1	8A	39 C
2	3A	33 C
3	8A	11 B
4	3A	39 C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (T1: testigo)

Ensayo II. La Figura 3. 27 muestra la evolución de la germinación (%) a través del tiempo realizado en Laboratorio de Semillas. El tratamiento más eficaz ($P < 0,05$) para lograr la germinación de la semilla de *G. latoramosum* fue el remojo por una hora en peróxido de hidrógeno al 40 % por una hora. El testigo se mantuvo en valores bajos hasta el día 21 desde la siembra, donde comienza a germinar. El testigo y tratamiento frío-húmedo + peróxido de hidrógeno superaron ($P < 0,05$) al tratamiento frío-húmedo. La acción combinada de frío húmedo más peróxido de hidrogeno resultaron en valores absolutos inferiores al testigo ($P < 0,05$).

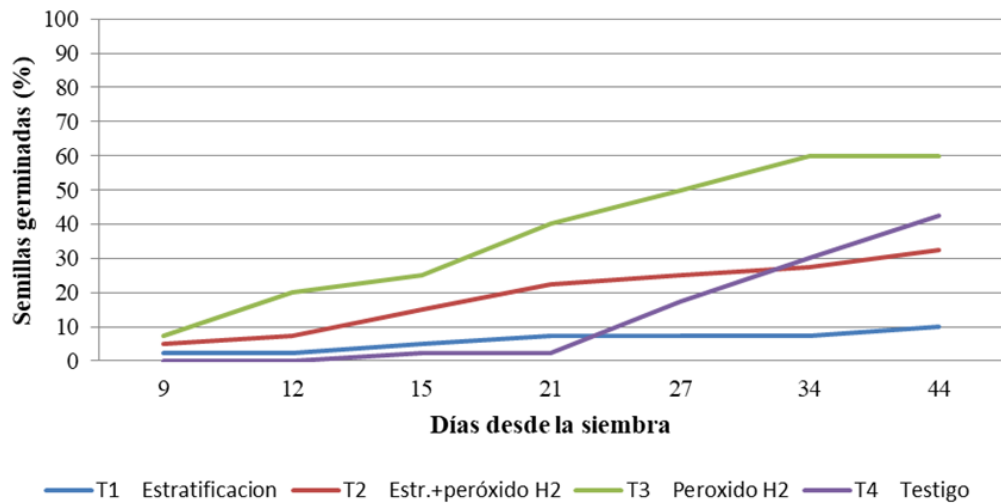


Figura 3. 27. Porcentaje de semillas germinadas (%) de *Galium latoramosum* en diferentes fechas de conteo del EII realizado en LS

En la Figura 3. 28 se observa el % de PN, que comparado con el PG (%) siguió el mismo patrón., la única diferencia observada es que para el T₃, a partir del día 34, disminuyó levemente el %PN.

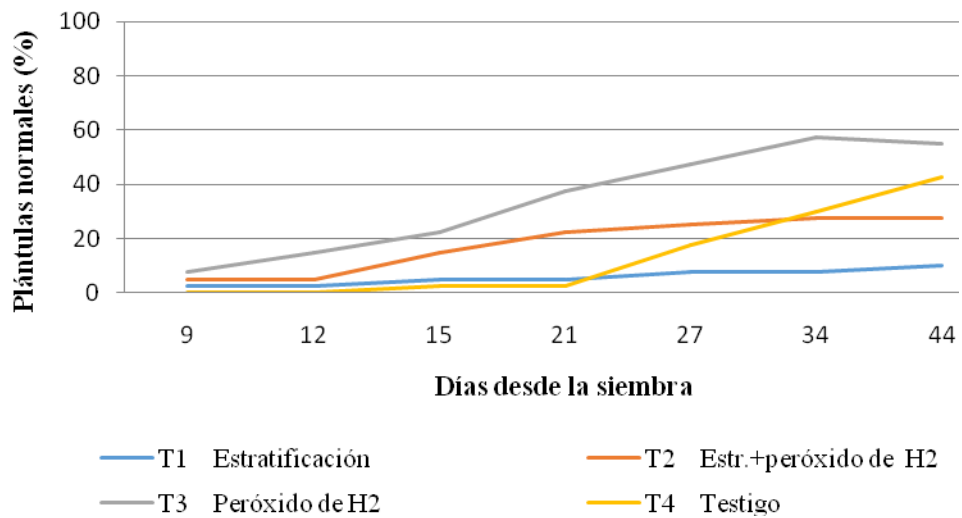


Figura 3. 28. Porcentaje de plántulas normales (%) de *G. latoramosum* en distintas fechas de conteo del EII realizado bajo condiciones controladas (LS)

La Tabla 3.36 muestra los resultados de las semillas germinadas de *G. latoramosum* a lo largo del tiempo, sembradas en LS. Se aprecia que el T₃, es decir en el que se colocaron las semillas una hora en peróxido de hidrógeno al 40 %, produjo las germinaciones más rápidas y el mayor PG % (P <0,05). Es para destacar que los otros 2 tratamietos T₁ (estratificación frío-húmedo por 30 días) y T₂- (estratificación -frío-húmedo por 10 días +peróxido de hidrógeno al 40% por una hora) fueron inferiores que el testigo. La Tabla 3.37 muestra los resultados del E₂ pero realizado en invernadero del VFE. Se aprecia que en general los tratamientos en VFE se comportaron de igual forma que en LS, observándose que el máximo PG logrado fue en el T₃, si bien en VFE el máximo PG fue de 55 % contra 60 % logrado bajo condiciones controladas, esos valores no fueron significativos (P>0,05).

Tabla 3.36. Semillas germinadas de *G. latoramosum* de La Cumbre bajo distintos tratamientos pregerminativos sembradas en Laboratorio de Semillas

TRATAMIENTO	Semillas germinadas							
	Días desde la siembra							
	6	9	12	15	21	27	34	44
T ₁Estratificación frío húmedo	0 A	3 A	3 A	5 A	8 A	8 A	8 A	10 A
T ₂Estratificación + Peróxido de H ₂	0 A	5 A	8 A	15 a	23 A	25 A	28 B	32 B
T ₃Peróxido de H ₂	0 A	8 A	20 A	25 A	40 C	50 A	60 C	60 C
T ₄Testigo	0 A	0 A	0 A	3 A	3 A	18 A	30 B	43 B

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0,05)

Tabla 3.37. Plántulas normales de *G. latoramosum* de La Cumbre bajo distintos tratamientos pregerminativos sembradas en invernadero del VFE

TRATAMIENTO	Plántulas normales							
	Días desde la siembra							
	6	9	12	15	21	27	34	44
T ₁ Estratificación frío húmedo	0 A	3 A	3 A	5 A	5 A	8 A	8 A	10 A
T ₂ Estratificación + Peróxido de H ₂	0 A	5 A	5 A	15 A	22B	25B	28 B	28 B
T ₃ Peróxido de H ₂	0 A	15 A	15 A	23 A	38 C	50C	55 C	55 C
T ₄ Testigo	0 A	0 A	0 A	3 A	3 A	18B	30 B	40 B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Peso de mil semillas. Las mil semillas provenientes de la población de Ongamira pesaron 0,59 gramos, es decir que representan 1.694.915 semillas por kilo.

Tipificación de *G. latoramosum* según su germinación. En la Figura 3.29 a se observa la evolución de las semillas germinadas en LS. Dado el proceso germinativo y el desarrollo de las plántulas en el tiempo se incluye a la especie *Galium latoramosum* en el Grupo A.2.1.1.1 que significa A: Especies agrícolas cultivadas, si bien no se cultiva aún es potencialmente cultivable, 2: Dicotiledónea, 1: Germinación epigea, 1: Sin elongación del epicótilo durante el período de ensayo, 1: Raíz primaria esencial. En Tabla 3. 38 b. se aprecia una plantula normal de 10 días, desarrollándose en VFE.

Categorización de la calidad de las semillas según su porcentaje de germinación. El porcentaje de germinación obtenido en *G. latoramosum*, procedente de La Cumbre, fue del 60 %, por ende, se categorizó la especie de dicha procedencia de calidad medianamente alta y la germinación se estabilizó a los 34 días, por lo que se puede considerar como fecha final del ensayo. En el EI, procedente de Ongamira donde el valor más alto fue de 40% se categorizó de calidad media, estabilizándose a los 42 días del ensayo.

Multiplicación *in vitro* de poblaciones de *Galium latoramosum*

Ensayo I. En la Figura 3.29 se observa el porcentaje de contaminación de las 3 poblaciones a lo largo de los 45 días en que se evaluó el ensayo. La población de Ongamira (ONG) fue la que presentó menor porcentaje de contaminación, pero en general las 3 poblaciones presentaron valores muy altos, entre 80 y 100% al finalizar el conteo del ensayo.

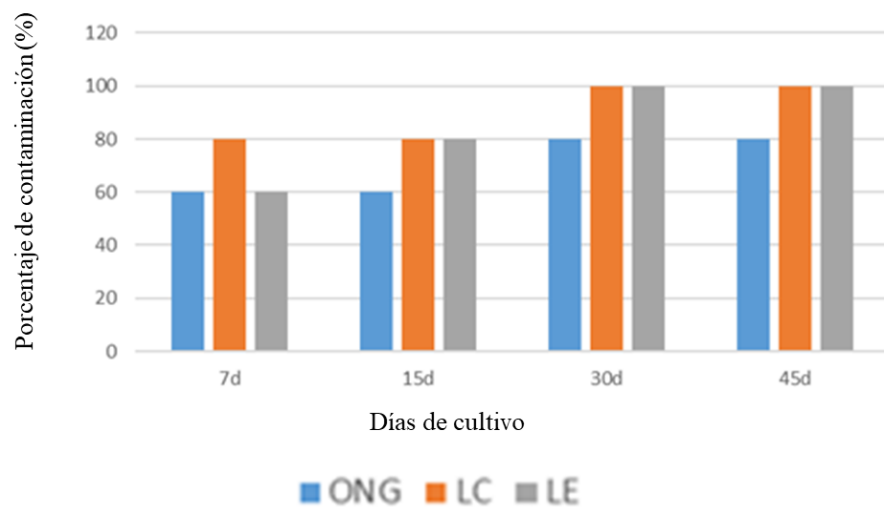


Figura 3. 29. Porcentaje de contaminación durante la introducción “*in vitro*” de segmentos nodales de plantas madre seleccionadas de 3 poblaciones de *G. latoramosum*

Ensayo II. En la Figura 3.30 se muestran los porcentajes de contaminación, que, en general, fueron bajos, en el último repique hubo 4,83% de contaminación. En la Figura 3.31 se observa la tasa multiplicación (TM), de la cual se desprende que aumentó en cada repique. Se partió de 10 explantos y al terminar el 1° repique se obtuvieron 50 explantos. En el 2° repique se partió de 50 explantos y se obtuvieron 350 explantos y de esos se repicaron y se obtuvieron 3200 explantos a lo largo de 105 días.

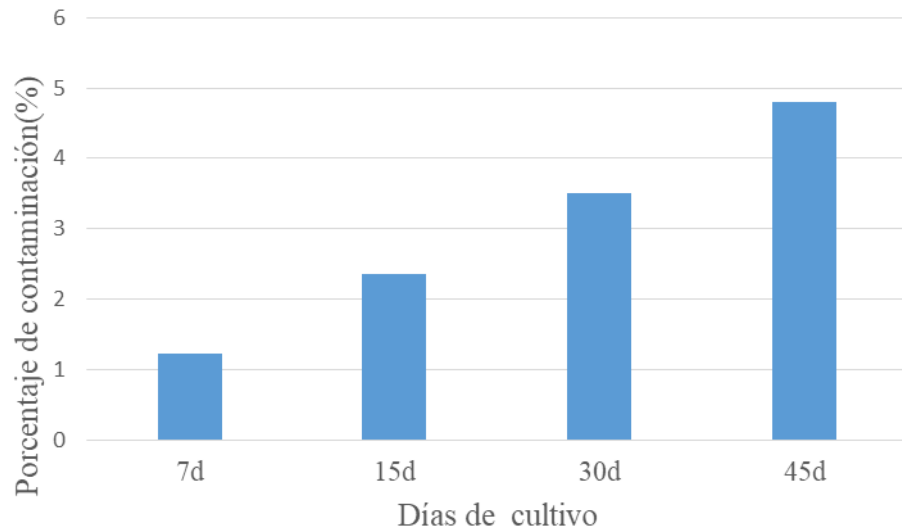


Figura 3.30. Porcentaje de contaminación (PC%) en la fase de introducción del EII a los 7,15, 30 y 45 días desde la siembra respectivamente.

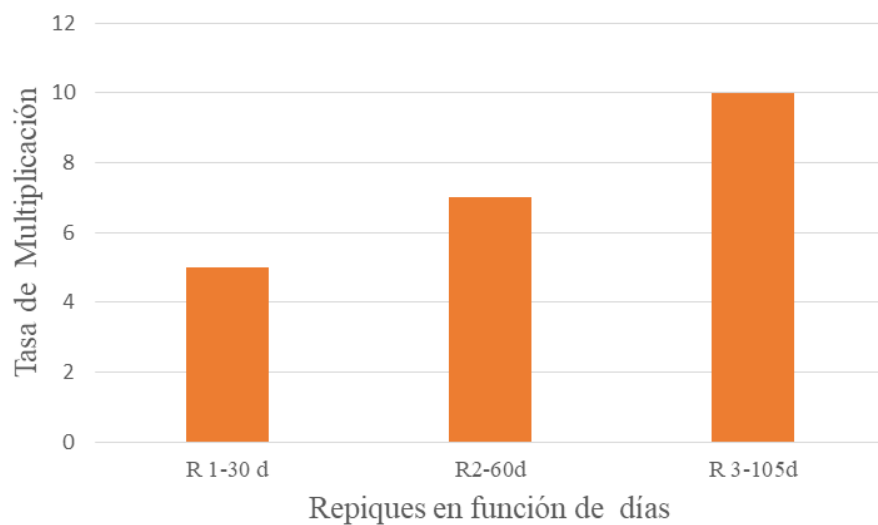


Figura 3. 30. Tasa de Multiplicación “*in vitro*” de *Galium latoramosum* según tres repique sucesivos.

En la Figura 3.32 se muestran los resultados del porcentaje de formación de raíces, en cada uno de los repiques. Se aprecia que dicho porcentaje fue en aumento, alcanzando un 82% en el último repique. Hubo explantos que no formaron raíces pero que formaron

callos, si bien esto no fue contabilizado si se observó en todos los repiques la presencia de callos (Figura 3.32)

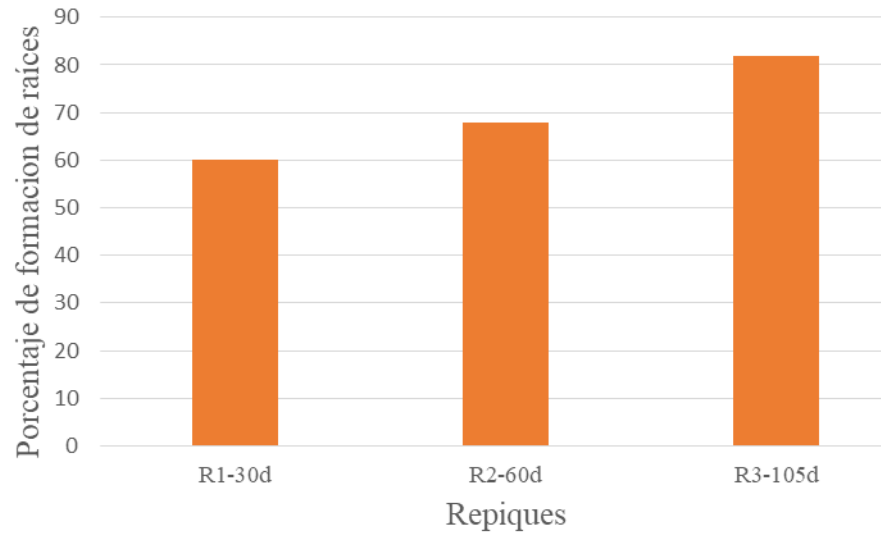


Figura 3. 31. Porcentaje de formación de raíces en sucesivos repiques durante la multiplicación “*in vitro*”

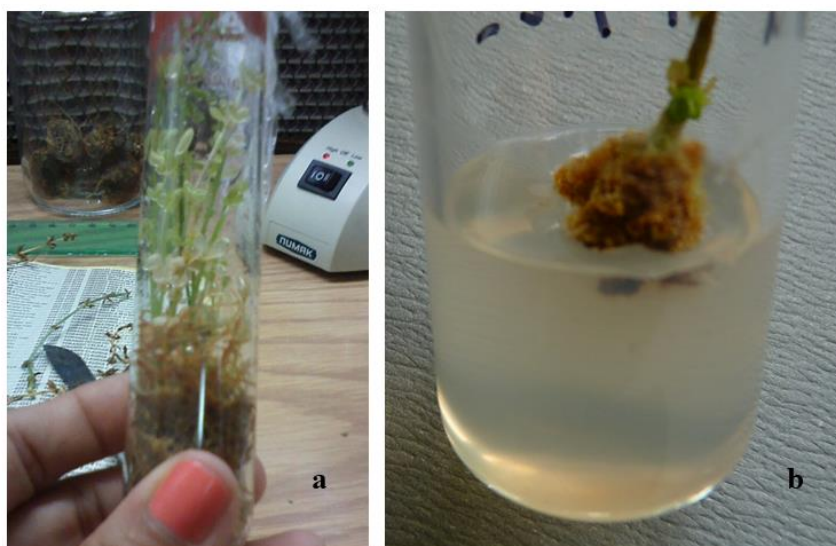


Figura 3. 32. . Microplantas de *G. latoramosum*. a- Detalle de la abundante masa radicular rojiza b- Explanto que formó un callo también con la coloración típica de la especie.

Evaluación del comportamiento de *G. latoramosum* bajo distintos niveles de sombreo en Jardín Tintóreo de Villa General Belgrano (Calamuchita).

Galium latoramosum tuvo mejor comportamiento a la sombra que al ser expuesta al sol como puede observarse en la Tabla 3. 387. Ya desde los 33 días desde la plantación se produjo una disminución acentuada de la sobrevivencia de plantines colocados en el JT. Esta sobrevivencia se mantuvo a los 288 días, sin embargo, las que estuvieron expuestas al sol sobrevivieron sin crecer. En cuanto a la cobertura, tienden a crecer más en la dirección N-S que en la dirección E-O.

G. bigeminum creció en relación a sus valores iniciales (altura= 27,17 cm y diámetro=1,36 mm) y tuvo una buena sobrevivencia a la sombra. También tuvo una tendencia a crecer más en la dirección N-S (Tabla 3. 38).

Tabla 3. 38. Altura, diámetro, cobertura y sobrevivencia de *G. latoramosum* en el JT Calamuchita a distintas exposiciones.

Exposición	Sobrevivencia	Altura	Diámetro	Cobertura		Supervivencia
	(%)	(cm)	(mm)	N-S (cm)	E-O (cm)	(%)
Edad (días)	35	288	288	288	288	288
Sol	33 A	9,50 A	1,62 A	4,00 A	1,50 A	33 A
Sombra	93 B	35,07 B	3,24 B	43,79 B	36,86 B	93 B

Tabla 3. 39. Medias de altura, diámetro, cobertura y supervivencia de *G. bigeminum* en el JTVGB

Exposición	Sobrevivencia	Altura	Diámetro	Cobertura		Supervivencia
	(%)	(cm)	(mm)	N-S (cm)	E-O (cm)	(%)
Sol	52	30	3,26	31,2	20,8	52
Sombra	86	44	6,65	67,33	45,83	86

Tabla 3. 40. Altura, diámetro, cobertura y sobrevivencia de *G. richardianum* en el JTVGB a distintas exposiciones.

Exposición	Sobrevivencia	Altura	Diámetro	Cobertura		Sobrevivencia
	(%)	(cm)	(mm)	N-S (cm)	E-O (cm)	(%)
Edad (días)	35	288	288	288	288	288
Sol	94 A	38,47A	4,42A	8,67 A	4,87 A	94 A
Sombra	60 B	12,00 B	1,06 B	2,00 A	1,33 A	60 B

En lo que respecta a *G. richardianum* esta especie se comportó mejor al sol en valores de altura y diámetro, y no presentó diferencias en cuanto a valores de cobertura ni tendencia en el crecimiento (Tabla 3. 40).

Ensayo de sombreado de *G. latoramosum* en el VFE. En la Tabla 3. 41 se puede observar la supervivencia de los plantines de *Galium latoramosum* a diferentes niveles de sombreado. Se observa que hasta los 74 días desde la siembra no hubo diferencias significativas entre poblaciones para cada uno de los tratamientos ($p > 0,05$), pero si hay una tendencia de que, a los 74 días, si bien, no hay diferencias significativas entre poblaciones, sí se observa que, en el tratamiento de 50 % de sombra, ya comienza a aumentar la mortandad. A partir de los 90 días se aprecia una disminución significativa en la sobrevivencia para el tratamiento con 80 % de sombra, donde la población de Ongamira tuvo los valores más bajos de sobrevivencia teniendo solo un 44 %, en general a partir de los 90 días desde la siembra se observaron diferencias significativas entre poblaciones y diferencias entre tratamientos. Si bien, la evaluación se realizó hasta los 190 días desde la siembra, los valores de supervivencia se estabilizaron el día 160, donde la supervivencia en el tratamiento del 80 % de sombreado fue muy baja (11 %) comportándose igual ONG y LE, contra LC que presentó una supervivencia del 44 %. Para el testigo la supervivencia fue mucho mayor,

del 100% para LE y ONG, y del 89 % para LC. Para el tratamiento del 50 % de sombreo fueron más marcadas las diferencias entre poblaciones, presentando LE, LC y ONG porcentajes de supervivencia, al final del ensayo, del 100, 56 y 33%, respectivamente.

Tabla 3. 41. Supervivencia (%) de *G. latoramosum* bajo tres niveles de sombreo.

Sombreo (%)	Pob.	Días desde la siembra															
		30	74	90	104	124	160	179	190	30	74	90	104	124	160	179	190
30	LC	100	A	89	A	89	B	89	B	89	B	89	B	89	B	89	B
30	LE	100	A	100	A	100	B	100	A	100	A	100	A	100	A	100	A
30	ONG	100	A	100	A	100	C	100	A	100	A	100	A	100	A	100	A
50	LC	100	A	89	A	100	B	56	C	56	C	56	C	56	C	56	C
50	LE	100	A	100	A	100	C	100	A	100	A	100	A	100	A	100	A
50	ONG	89	A	67	A	56	B	56	C	44	D	44	D	33	E	33	E
80	LC	100	A	78	A	56	A	44	D	44	D	44	D	44	D	44	D
80	LE	89	A	78	A	56	A	33	E	22	E	11	F	11	F	11	F
80	ONG	78	A	56	A	44	B	44	D	22	E	11	F	11	F	11	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la Tabla 3. 42 se muestra como fue la evolución del crecimiento de los plantines introducidos al ensayo de sombreo luego de 5 meses. Las primeras columnas muestran altura final (HF), diámetro final (DF), número tallos finales (NTF), y las últimas 2 columnas muestran el crecimiento total en altura (CH) (crecimiento final-crecimiento inicial) y el crecimiento total en diámetro (CD) (diámetro final – diámetro inicial). Se observa que los mayores valores de crecimiento en altura y en diámetro, se registraron en el testigo, que corresponde a la sombra del 30 %, a su vez en CD no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre poblaciones, en cambio para CH sí, presentando los mayores crecimientos la población de LC.

Las plantas que presentaron el mayor crecimiento en altura con el máximo porcentaje de sombreo (80 % de sombra) fueron las de ONG, en cambio para el crecimiento en diámetro no se registraron diferencias significativas entre poblaciones ($P > 0,05$). En general se puede observar que la especie, más allá de la población no soporta valores mayores de sombreo que del 50 % y que se comporta mejor tanto en sobrevivencia como en crecimiento con valores próximos al 30 % de sombra, que en este caso correspondió al testigo.

Tabla 3. 42. Crecimiento de plantines de *G. latoramosum* bajo diferentes niveles de sombreo.

Sombreo (%)	Pob.	HF		DF		NTF		CH		CD	
30	LC	81,0	D	2,43	D	8,60	E	28,3	G	0,65	C
30	LE	66,8	B	4,23	B	11,0	C	6,83	F	1,05	C
30	ONG	42,0	E	2,00	E	4,30	F	7,50	F	0,56	C
50	LC	28,1	E	1,13	F	3,50	F	8,60	E	0,27	C
50	LE	53,4	F	2,48	F	6,60	G	11,1	D	0,50	B
50	ONG	15,5	F	0,59	F	1,90	G	5,03	C	0,11	A
80	LC	7,17	A	0,36	B	0,70	B	0,17	C	0,08	A
80	LE	0,00	A	0,00	A	0,00	A	0,00	B	0,00	A
80	ONG	4,22	C	0,28	C	0,30	D	0,22	A	0,03	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Referencias: HF: Altura final, DF: Diámetro final, NTF: Número tallos finales, CH: Crecimiento total en altura, CD: Crecimiento total en diámetro.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y QUÍMICA

Identificación de las estructuras morfo-anatómicas de los órganos tintóreos de *G. latoramosum*. Mediante los estudios anatómicos se comprobó que *Galium latoramosum* presenta tallos subterráneos que corresponden a rizomas y estolones, algo hasta el momento nunca antes descrito para esta especie, lo cual es importante ya que como *G. latoramosum* tiene bajo poder de germinativo, esto permitirá reproducir la especie de forma agámica mediante dichos tallos subterráneos. Torres *et al.* (2001) y López Udias *et al.* (2004) observaron rizomas y estolones pero en otras especies del género. Bacigalupo (1993) definió a las raíces de *G. latoramosum* como fibrosas, lo mismo que lo observado en este trabajo, pero no refirió a la existencia de tallos subterráneos. Muchos trabajos relatan la presencia de colorantes en raíces en general, sin discriminar si dichos órganos subterráneos, además de raíces, son rizomas o estolones. La mayor parte de los rizomas se encontraron a poca profundidad del suelo (5 a 10 cm), similar a lo observado por Mersereau y Di Tommaso (2003). Las reservas constituyen una fuente importante de carbohidratos que permitirán la brotación luego de sobrepasar el estrés ambiental provocado por la estación fría y seca en suelos francos donde crece *G. latoramosum*. Para esta especie, las reservas se localizaron en la corteza de rizomas jóvenes y raíces. En su estadio vegetativo crece por medio de rizomas y estolones que se producen durante todo el año en condiciones de vivero, aunque para *Galium odoratum* Boussadia *et al.* (2015) hayan observado una nueva emisión de rizoma solo al final del invierno.

La estructura anatómica de los tallos subterráneos de *Galium latoramosum* descrita en esta investigación coincide con la observada por Holm (1907), Torres *et al.* (2001), Mersereau y Di Tommaso (2003) y Hemcinschi *et al.* (2008) en otras especies del género.

En el xilema secundario se encontraron radios uni y biseriados, también mencionado por Hemcinschi *et al.* (2008). En el rizoma joven, células aisladas de la corteza presentaron rafidios tal como lo mencionaron Holm (1907) y Hemcinschi *et al.* (2008) en otras especies del género.

En cuanto a los granos de almidón estuvieron presentes en raíz y rizomas jóvenes y se caracterizaron por estar formados por pequeñas partículas elementales que se unen formando una unidad de mayor tamaño. Hart (2011) determinó que en *Galium aparine* los granos de almidón son esféricos de 15 μm de longitud promedio de superficie lisa e hilum ausente, probablemente esta descripción corresponde a las unidades elementales observadas en *G. latoramosum*. La ausencia de granos de almidón en el rizoma adulto durante el invierno puede deberse a que la planta los utilizó en la formación de nuevos rizomas y estolones. Según Le Duc *et al.* (2003) el contenido de reservas en el rizoma fluctúa a lo largo del año siendo la máxima acumulación a principio de otoño.

Angelini *et al.* (1997), demostraron que el contenido total de alizarina en *Rubia tinctorum* se localiza en gran parte en la corteza de raíz, en cambio *G. latoramosum* presentó pigmentos rojos no solo en la corteza sino también en floema y médula de rizomas adultos y jóvenes y en la corteza y floema de las raíces adventicias. Al respecto Boussadia, *et al.* (2015), creen para *Galium odoratum*, que el aumento del colorante con la edad del rizoma podría estar relacionado con el aumento del volumen de la corteza.

También, se observó en plantas adultas de las tres poblaciones la presencia de una estructura denominada corona de diámetro variable, siendo las más grandes de 12 cm aproximadamente. Mersereau y Di Tommaso (2003) registraron en *G. mollugo* coronas de

hasta 20 cm, a partir de la cual se producen nuevos tallos subterráneos (rizomas) en la primavera siguiente.

Caracterización morfológica de las poblaciones de crecimiento espontáneo de *G. latoramosum* y *G. bigeminum* en los bosques de las Sierras de Córdoba

Plantas madres de *G. latoramosum*. Con respecto a la caracterización morfológica de *G. latoramosum* se observaron diferencias entre poblaciones. Las tres poblaciones se diferenciaron en cuanto a los caracteres morfológicos de la parte aérea, y en cuanto a la morfología radicular también, los ejemplares de La Estancita presentaron mayor número de raíces, mientras que los de Ongamira fueron de mayor peso de órganos subterráneos.

Las 3 poblaciones de *Galium latoramosum* lograron diferenciarse, ya que mostraron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$). Las plantas madres de la población de La Cumbre se separaron de las otras plantas madres de poblaciones restantes por poseer mayor longitud de la parte aérea en sentido horizontal (APA), mayor relación entre el peso seco de la parte aérea y de los órganos subterráneos (PA/PR S), mayor número de entrenudos del tallo primario, mayor relación entre el peso fresco de la parte aérea y de la parte radicular (órganos subterráneos) (PA/PR F). Las plantas madres de *G. latoramosum* de LE presentaron los mayores valores de las variables número de raíces de mayor diámetro (NR $>$) y número de raíces de menor diámetro (NR $<$) si bien fue en un nivel no significativo ($P > 0,05$), de todas maneras mostraron una tendencia. La población de ONG se caracterizó por presentar mayor peso seco de la parte aérea (PSPA) ($P < 0,05$); mayor longitud de entrenudos de tallos secundario. (LENTS) ($P < 0,05$), mayor longitud de entrenudos del tallo primario (LENT1) ($P < 0,05$) y mayor longitud total de tallos secundarios (LTTS) ($P < 0,05$). Pero con respecto al crecimiento de las raíces (órganos subterráneos), no hubo diferencias significativas entre poblaciones en cuanto al largo de estas. Las plantas de *G. latoramosum* presentaron una media de 27 cm de largo, pero es necesario tener en cuenta que dichas plantas tenían 2 años de cultivo en contenedores

(macetas), y que muchos pueden ser los factores que hayan interferido en su crecimiento. Datos experimentales en *G. odoratum* aseguran que los rizomas crecieron en condiciones controladas, 8,2 mm por día. El sustrato que usaron para dicha especie se formuló a base de turba, con un 20% de materia orgánica, y fertilizante NPK 12-14-24 a 0.7 kg / m³, en cambio el sustrato utilizado en este trabajo de tesis estuvo formado por 3 partes de tierra negra y una parte de arena, con un 5% de materia orgánica y no se le agregó ningún tipo de fertilizante (Boussadia, *et al.* 2015). Todo ello puede influir en el crecimiento de los órganos subterráneos. Será necesario realizar ensayos donde se prueben diferentes tipos de sustratos con el agregado de algún tipo de fertilizante para ver la respuesta del crecimiento de los órganos subterráneos.

Plantas madre de *G. bigeminum*. Las poblaciones de *G. bigeminum* también lograron separarse en función de sus caracteres morfológicos. BM tuvo mayor %PR, mayor relación PA/PR F, y de LT2P. PO (Pampa de Olaen), presentó plantas más grandes de mayor tamaño tanto parte aérea como radicular (PSPA, APR, NR<, PFPR y PSPR). Las plantas de LG presentaron mayores valores para %CM (porcentaje de color morado), %RPM (rebrotos en parte morada).

Con respecto al análisis poblacional y el efecto que puede tener el ambiente en el crecimiento de una misma especie, Boussadia, *et al.* (2015), estudiaron el efecto de distintas poblaciones de *G. odoratum* y llegaron a la conclusión de que hubo diferencias solo en el contenido del tinte en función de las distintas poblaciones, pero no así en los caracteres morfológicos estudiados por ellos. También vieron que dichas diferencias en el contenido del tinte no se observaron cuando se cultivaron en condiciones controladas. Por lo que opinan que dichas discrepancias se deben a las condiciones edafo- climáticas y no a la genética propia de cada población.

Caracterización morfológica de la descendencia de *Galium latoramosum* en condiciones de cultivo

En cuanto a la caracterización de la descendencia de *G. latoramosum*, se observó que hubo diferencias entre las 3 poblaciones, en general se volvió a repetir (al igual que en plantas madres) que la población de ONG se destacó por presentar plantas con mayor tamaño de la parte aérea, es decir mayor valor en los siguientes caracteres :LTT1,LT2,NT1, LENT2,NT2 (ver significado de abreviaturas en Tabla 2.5), LC se caracterizó por presentar plantas con mayores DB,y mayor largo y ancho de la parte radicular, ambas variables un tanto subjetivas, ya que dependieron mucho de la disposición en que se ubicaran las raíces sobre la mesada que se utilizaba para tomar las mediciones. Un parámetro más interesante y que realmente influyó en el rendimiento fue el PSPR (peso seco de los órganos subterráneos), que en este caso los mayores valores de PSPR, los presentó la población de ONG. En este sentido, se puede decir que la población de ONG, tanto plantas madres, como la descendencia se caracterizaron por presentar plantas de mayor tamaño, y con mayor PSPR. Las plantas madres de LE presentaron solo mayor cantidad de raíces de menor diámetro, pero esto no influyó en el peso de los órganos subterráneos. Con respecto a la descendencia de esta misma población, presentó los menores valores para todas las variables analizadas. Tanto para las plantas silvestres como cultivadas, la población de Ongamira presentó el mayor peso seco de la parte radicular. Similar a lo observado por Boussadia *et al.* (2015) en *G. odoratum*, que registraron que las variaciones tanto en concentraciones del colorante como en caracteres morfológicos, dependieron de la ubicación geográfica de la planta, ya que tales diferencias entre poblaciones no se observaron cuando las plantas crecieron en un ambiente controlado. Es decir que las diferencias se debieron más que nada a factores edafoclimáticos.

Comparación de las asociaciones entre variables morfológicas de las madres y de las hijas por población de *Galium latoramosum*. El objetivo es estudiar las asociaciones existentes entre caracteres morfológicos de madres y caracteres morfológicos de las hijas por población, independientemente de las otras. Es decir hay 3 conjuntos, uno formado por caracteres morfológicos de las madres e hijas de la población de La Estancita, el otro

formado por dichos caracteres de madres e hijas de la población de La Cumbre y el tercero por caracteres de plantas madres e hijas de la población de Ongamira.

De esta manera se podrá inferir que variables morfológicas se podrán seleccionar en las plantas madres, que tengan alta correlación con las variables de las plantas hijas relacionadas con el rendimiento o con el carácter que se desee buscar. Esto tendrá utilidad al momento de seleccionar plantas madres para cosechar semillas por ejemplo.

Todas las poblaciones establecieron asociaciones entre los grupos de variables de las madres y de los hijos con una sola variable canónica (L).

Cada población explicó la variabilidad para cada eje con altos valores de R^2 . Para la población de La Cumbre (LC), las plantas madre que tengan tallos primarios más largos, pero con menores DB y entrenudos del tallo primario y tallos secundarios más cortos, tendrán hijas con mayores diámetros a la base y más cantidad de tallos secundarios pero con menor peso seco de la parte radicular (PSPR). Es decir que la variabilidad encontrada en las madres está fuertemente asociada con la variabilidad encontrada en las hijas.

Se puede decir que para los 3 grupos morfológicos (3 poblaciones) en el conjunto de las madres tuvieron más peso los caracteres de tallo que de raíz.

En el caso de la Población de Ongamira, se podría inferir que madres que posean una longitud de entrenudos de los tallos primarios más cortos (LNT1), con mayor Longitud de tallos secundarios (LTT2) y mayor peso seco de raíces (PSPR) se corresponderán con hijos que tengan menor longitud de tallos primarios (LT1) y menor número de ambos tipos de tallos (NT1 Y NT2) con mayor peso seco de raíz (PSPR).

En la población de La Estancita, para tener mayor peso seco de la raíz en los hijos, se deberán buscar plantas madre de mayor longitud de tallos primarios (LT1) y con mayor

cantidad de tallos primarios, ya que estas variables parecen tener comportamiento inverso en el conjunto de las madres y de las hijas en relación al PSPR.

Caracterización colorimétrica de poblaciones de plantas madre de *G. latoramosum* y su descendencia, y de poblaciones de *G. bigeminum*

Ajuste de la metodología de tinción. En los ajustes de la metodología de tinción, se obtuvo que el mejor método para desmenuzar el material vegetal fue el uso de licuadora, ya que logró extraer la mayor cantidad de los pigmentos contenidos en la corteza, floema y médula. Algo similar, obtuvo Roberts (2009), para *Rubia tinctorum*, que cuando reporta el método de tinción con calor, previamente licua las raíces de *Rubia tinctorum*. Por otra parte, Bobone *et al* (2009) aseguran haber probado el desmenuzado del material vegetal de *G. latoramosum* con mortero y haber obtenido colores en la gama de los rosados, no rojos, es decir que con ese método se liberaban menos pigmentos.

Con respecto al tiempo de decocción, se obtuvo que con 45 minutos se logra agotar el pigmento de la solución acuosa, en cambio Bobone *et al.*(2009) reporta, para *G. latoramosum*, un tiempo de 1,5 horas. Roberts (2009), para *Rubia tinctorum*, registró como el mejor tiempo de decocción 2 horas. Con respecto a la temperatura en este trabajo se logró agotar el pigmento de la solución acuosa con 90 °C, y los rojos no sufrieron ningún tipo de modificación, en cambio Roberts (2009), dice haber mantenido la temperatura por debajo de 80 ° C, ya que el calor intenso puede destruir los colores rojos. Con respecto al pH de la solución acuosa, con el que se lograron los rojos más fuertes y firmes fue con el testigo, es decir pH 7,4 (T₁, testigo) fue el que mejor coloración obtuvo en las tonalidades de rojo intenso, en cambio para *Rubia tinctorum* Roberts (2009) agrega la tiza disuelta a la solución del tinte para que el pH se vuelva más básico (pH 10) y de esa manera registra los colores rojos más intensos.

En cuanto a los diámetros de las raíces (órganos subterráneos), en los ensayos realizados, no se detectaron cambios en la coloración al utilizar raíces finas o gruesas en el proceso de tinción. Al respecto, Trillo y Demaio (2007) para la misma especie, aseguran

haber usado en el proceso de tinción solo raíces leñosas de más de 5 mm de diámetro, aunque no expliquen el porqué de dicha elección. Para la especie *Rubia Tinctorum*, son varios los autores que aseguran que el diámetro de las raíces influye en el poder tintóreo. En relación a esto, Grieve (2018) dice que, la raíz principal y las laterales se secan por separado ya que sus productos se consideran diferentes, siendo el de la raíz principal mejor. Al respecto hay otros datos que hablan sobre la relación de la edad con el diámetro y el poder tintóreo, siendo las raíces de mayor diámetro las que concentran más colorante. (Rahman, 2013). Boussadia *et al.* (2015) encontraron en plantas de *G. odoratum* que el contenido de colorante de antraquinona, varía con la edad de los rizomas y por lo tanto con el diámetro de estos, ellos registraron contenidos tres veces mayor para los rizomas mayores de 3 años en comparación con el rizoma de 1 mes de edad. Si bien no fue objeto de esta tesis conocer el poder tintoreo en función de la edad, sería interesante probar en un futuro como influye la edad del órgano subterráneo para conocer el momento óptimo de cosecha. Fraile (2008) encontró para *Rubia tinctorum*, que la edad mínima para la cosecha es de tres años, pero la mejor edad es de cinco años, cuando las raíces son gruesas. *Galium bigeminum* se comportó de la misma manera que *G. latoramosum*, en cuanto a tipo de desmenuzamiento del material vegetal, tiempo de licuado, tiempo temperatura de decocción y relación raíz/ lana. Hintermeister, *et al* (2010) colocando en remojo por 24 horas las raíces de *G. bigeminum*, y luego calentando la solución acuosa a 50°C por media hora, obtuvo un color rosado claro en el testigo y cuando mordentaron la lana con ácido oxálico lograron un naranja suave, colores muy diferentes a los obtenidos en este trabajo con la metodología ajustada de tinción donde se obtuvieron colores más consistentes y fuertes dentro de la gama de los rojos.

Caracterización colorimétrica de plantas madre de poblaciones de *G. latoramosum* y su descendencia. En general los valores de los caracteres colorimétricos fueron mayores para la población de La Cumbre, incluso para la variable H (ángulo o Matíz) cuyos valores fueron los más próximos a 45°, es decir correspondientes a la tonalidad rojo fuerte.

Con respecto a la descendencia de *G. latoramosum* no hubo diferencias significativas entre poblaciones al momento de ser evaluada, aunque sí hubo una tendencia en la que la

población de LC, nuevamente presentó valores más cercanos a 45° para la variable H, ($p>0,05$). Al ser los pigmentos metabolitos secundarios, es lícito destacar que dicha población es la que presenta mayor cantidad de días por debajo de los 0 °C, o, dicho de otra manera, presenta menor cantidad de días libre de heladas (Weatherspark.com, 2019), comparado con las otras 2 poblaciones analizadas en esta tesis. Se sabe que la producción de metabolitos secundarios se ve aumentada con situaciones climáticas adversas o que generen cierto grado de estrés en las plantas (Masa, 2011), esa podría ser una de las razones por la cual los individuos de la población de La Cumbre, presentaron mayor contenido de metabolitos secundarios reflejados en mayores índices de color.

Caracterización colorimétrica de poblaciones de *G. bigeminum*. Para esta especie hubo diferencias significativas entre poblaciones ($p<0,05$) solo para dos caracteres colorimétricos; “b” y “H”. Ambos parámetros estuvieron más representados en la población de Pampa de Olaen. El parámetro H es el responsable del tono angular, es decir valores más altos corresponden a tonalidades en la gama del rojo. Otro parámetro importante es el C que representa saturación, que si bien no hubo diferencias significativas entre poblaciones ($p>0,05$) mostró una tendencia más alta que en las otras 2 poblaciones. Esto podría deberse a que la población de la Pampa de Olaen se encuentra a mayor altitud y registra las temperaturas más bajas, tanto del mes más frío como del mes más cálido, y que la producción del metabolito secundario responsable del color (antraquinonas) se vea más favorecida por las bajas temperaturas. Algo similar encontraron Boussadia *et al.* (2015), para *Galium odoratum*, que aseguran que la población natural que más antraquinonas tuvo fue la del lugar donde más bajas temperaturas se registraron. Para *G.album*, Hemcinschi *et al.*, 2010, revelaron la existencia de importantes variaciones químicas entre las siete diferentes poblaciones que estudiaron, (todas regiones de Europa), dichas variaciones fueron detectadas mediante espectrofotometría y HPLC . Mientras tanto, el momento de la cosecha dentro del ciclo vegetativo juega un papel importante para la calidad adicional del producto.

Caracterización colorimétrica de poblaciones producidas in vitro de *G. latoramosum*.

Las plantas producidas in vitro, mostraron diferencias significativas para los caracteres “a” , S, b y C, mostrando los mayores valores las plantas pertenecientes a la población de La Cumbre. En cambio el carácter L, responsable de la luminosidad, y H responsable del tono angular lo tuvo más alto la población de Ongamira. De todas maneras si se comparan las tonalidades de los colorantes de las plantas producidas in vitro con respecto a las plantas cultivadas en sustrato suelo, los rojos obtenidos por las plantas in vitro son de menor intensidad. Si bien no fue objetivo de esta tesis cuantificar las antraquinonas en las plantas producidas in vitro, hay trabajos realizados en *Rubia tinctorum*, donde aseguran haber mejorado la producción de metabolitos secundarios en cultivos de raíces pilosas luego de infectarlas con *Agrobacterium rhizogenes*, produciendo altas cantidades de metabolitos secundarios a altas tasas de crecimiento además que el cultivo *in vitro* de plantas es una alternativa para la producción de productos farmacéuticos derivados de plantas en condiciones controladas y con bajo impacto ambiental (Perassolo *et al.*, 2017). Será interesante realizar diferentes ensayos con distintos medios de cultivo para obtener mayor concentración de las Aq deseadas.

Estimación de la producción y calidad de los órganos tintóreos de *G. latoramosum* y *G. bigeminum*

Las plantas de la población de La Estancita se separaron de las otras poblaciones por poseer mayor cantidad de raíces finas y mayor longitud de la parte radicular (LPR). La población de Ongamira presentó los mayores valores de peso seco de la parte radicular (PSPR), siendo la media 1,8 g, mientras que de peso fresco es de 4 g, por lo que tiene un rendimiento del 45 % de peso seco. En cambio los valores más altos para el carácter C (croma) lo tuvo la población de La Cumbre. Para *G. bigeminum*, el análisis multivariado confirma la diferencia observada en las 3 poblaciones tanto para los caracteres morfológicos como para los caracteres de rendimiento y color. La población de Pampa de Oláen presentó mayor rendimiento de los órganos subterráneos, con una media de pesos secos de los rizomas de 3,95 g. Dichos valores correspondieron a 20 gr de peso fresco, es decir que el rendimiento fue menor que el de *G. latoramosum*. Los órganos subterráneos de

G. latoramosum fueron más fibrosos y con menor contenido de agua que los de *G. bigeminum*. Valores similares registraron Ziegenhagen *et al.* (2003) para *G. odoratum*, quienes refieren haber encontrado valores de peso seco medio del rizoma de 2,75 g por planta, dicho valor proviene de plantas cosechadas en macetas. En cambio los valores informados para *Rubia tinctorum* varían desde 9 a 30 g/planta dependiendo del origen de las semillas (Angelini *et al.*, 1997). Los rendimientos de 30 g/planta de *Rubia tinctorum* se registraron para individuos cosechados después de 3 años de crecimiento en Turquía (Baydar y Karadogan, 2006).

Estas diferencias observadas en las distintas poblaciones para ambas especies se relacionan con lo observado por Boussadia *et al.* (2015) para *G. odoratum* que encontraron que el crecimiento y el contenido de antraquinonas varió dependiendo de la ubicación geográfica de la planta, tales diferencia entre poblaciones no fue observada cuando las plantas crecieron en un ambiente controlado. En Bélgica, para *G. odoratum* citan que el contenido de colorante de antraquinona del rizoma fue más alto en un medio ambiente controlado que en los rodales naturales, lo que sugiere un fuerte impacto del crecimiento bajo condiciones controladas sobre la biosíntesis de las antraquinonas (Boussadia *et al.*, 2015).

En cuanto a la calidad de los órganos tintóreos de la descendencia, expresada por los parámetros de color (espacio CIECH) no hubo diferencias entre poblaciones, pero si hubo una tendencia en donde la población de La Cumbre tuvo los valores de H mayores (es decir de un tono rojo más fuerte), aunque esas diferencias no fueron significativas. ($p \geq 0,05$). Lo mismo ocurrió para las plantas madres, en donde el mayor valor de H, lo presentó también la población de LC. Si bien no hay autores que registren estas características en alguna especie del género solo se puede informar que dentro del género Boussadia *et al.* (2015) llegaron a la conclusión en *G. odoratum*, que las variaciones en concentraciones del pigmento, dependieron de la ubicación geográfica de la planta, ya que tales diferencias entre poblaciones no se observaron cuando las plantas crecieron en un ambiente controlado. Es decir que las diferencias se debieron más que nada a factores edafo climáticos.

Determinación de las propiedades fisicoquímicas de las fibras teñidas con tintes extraídos de *Galium spp.* mediante la aplicación de pruebas de solidez

La mayoría de los colorantes naturales presentan baja estabilidad a la acción de la luz en comparación con los tintes sintéticos (Padfield, 1966). La escala para medir la solidez a la luz va del 1 al 8, siendo el 8 excelente y el 1 escaso. Los resultados de la solidez a la luz realizados por el INTI bajo Normas IRAM para las lanas teñidas con las tres especies de *Galium* en estudio demostraron que *G. latoramosum* es el más sólido frente a la luz seguido por *G. richardianum* y por último *Galium bigeminum*. La solidez a la luz para *G. latoramosum* dio 6, es decir muy buena. De todas maneras la bibliografía cita que en general los colorantes rojos (coquina, alizarina, laca) presentan solidez regulares entre 3-4 (Gupta, 1999), por lo que las especies de *Galium* aquí estudiadas presentaron mejores valores de solidez a la luz.

Con respecto a la solidez al lavado, algunos colorantes sufren cambios en el matiz generados por el lavado, causados por una ligera alcalinidad en los baños de lavado. Como una regla general, los tintes naturales poseen solidez moderadas al lavado, es decir un valor 2 en la escala del 1 al 5 (Graaff, 1993). Por lo que los valores obtenidos en este trabajo son promisorios ya que las 3 especies de *Galium* estudiadas presentaron una excelente solidez al lavado doméstico y comercial. No hubo prácticamente diferencias entre especies, se comportaron todas muy bien respondiendo entre 4 y 5 para el cambio de color y para las transferencias a otras telas también se comportaron muy bien, obteniéndose en todos los casos resultados entre 4-5. (Escala del 1 al 5 siendo 5 mejor resultado).

Con respecto a la Solidez al frote, si bien no hubo prácticamente diferencias entre las 3 especies, si se obtuvieron valores menores a los citados por otros autores para tintes naturales, ya que Mahale (2003), asegura que la mayoría de los colorantes naturales estudiados dan solidez al frote buenos (3 en la escala del 1 al 5) sin necesidad de ningún tratamiento adicional. Por ejemplo, el árbol de jaca, manjistha (*Rubia cordifolia*), sándalo

rojo (*Pterocarpus tinctorius*), caléndula, entre otras, presentan buenas solidez al frote (Samanta, 2011). También buenas solidez al frote (en seco y en húmedo) son obtenidas para la seda teñida con alicofa y otros colorantes naturales. En cambio, para el frote seco las 3 especies, se comportaron igual obteniendo una valoración regular (2) y para frote húmedo levemente mejor *G. richardianum*, en cambio las otras 2 especies obtuvieron valores entre escaso y regular ante el frote húmedo.

Con respecto al cambio de color y la solidez al sudor en medio ácido las 3 especies de *Galium* aquí estudiadas se comportaron de igual manera, obteniendo muy buenos resultados (4-5). Lo que no fue muy positivo fue la transferencia a las poliamidas y a lana, donde se obtuvieron valores entre 1 y 2. Para la transferencia al acrílico se obtuvieron los mejores resultados, para las 3 especies, es decir que hubo menor migración del colorante hacia prendas de acrílico. El comportamiento del colorante fue muy similar en sudor en medio básico que en medio ácido. Aunque hubo algunas diferencias, *G. latoramosum* se comportó un poco mejor para la Solidez al sudor en medio básico en la transferencia al sustrato lana, pero en poliéster fue al revés. Valores similares con respecto a la solidez al sudor son reportados por Fontalvo *et al.* (2014). Ellos evaluaron la solidez al sudor para muestras de seda teñidas con colorantes naturales certificados por la norma GOTS (Global Organic Textile Standard). Los colorantes evaluados fueron Tectilon® y Erionyl® de Huntsman y obtuvieron resultados semejantes y satisfactorios (4-5) para la evaluación del cambio de color para las muestras teñidas en la prueba de solidez al sudor, también se obtuvieron resultados adecuados para la transferencia del color con la solución de sudor ácido, mientras que en la solución alcalina la muestra teñida con el colorante Tectilon® presenta transferencia de color a los testigos de poliamida y lana.

Identificación de los compuestos químicos responsables de las propiedades tintóreas en *G. latoramosum*

En cuanto a la caracterización química de *G. latoramosum*, es importante destacar que dió positivo la reacción de coloración específica para Asperulósido, el cual es un

iridoide característico de la familia de las *Rubiáceas*, lo mismo que lo encontrado para *Rubia tinctorum* por Briggs y Nicholls, 1954.

Teniendo en cuenta que los flavonoides y AQs son reconocidos pigmentos naturales (Bechtold, 2009), los resultados de la marcha analítica determinaron que estos metabolitos secundarios son los responsables de la capacidad tintórea de esta especie vegetal y dentro de estas dos familias de compuestos químicos, serían los derivados antraquinónicos, los pigmentos más abundantes en *G. latoramosum*. Estos derivados antraquinónicos solo se encontraron en los órganos subterráneos y no se hallaron en las partes verdes de la planta, lo mismo afirman otros autores para *G. odoratum*. (Boussadia *et al.*, 2015).

Con respecto a la obtención de un extracto rico en pigmentos antraquinónicos se puede decir que de la cromatografía en columna (CC) de exclusión, a partir del extracto bencénico (Ben-C), se obtuvieron alícuotas según el gradiente de elución aplicado que tiñeron porciones de lana en una escala de colores que fue la siguiente Fracción 4-7- Colores rojos, Fracción 8-12 colores amarillos, fracción 16-18 colores naranjas y fracción 20-24 colores rosados. Mediante HPLC- MS se identificaron 11 antraquinonas. En la fracción 4-7 estuvieron presentes 8 de las 11 antraquinonas: Quinizarina, Fomarina, 1,5- di hidroxí- 2- metil antraquinona, Rubiadina, Antragallol, morindona, 3- metil éter de lucidina, 8- hidroxí, 3 - metoxi -7- metil y 1,2 - metilenedioxiantraquinona. En la fracción 8-12 Alizarina, Rubiadina, Antragallol y 3- metil éter de lucidina, en la fracción 16-18 Antragallol, Lucidina, 3- metil éter de Lucidina y Lucidina primaverosido, y por último en la fracción 20-24 sólo antragallol y Lucidina primaverosido. En *Galium odoratum*, Boussadia *et al.* (2015) también hallaron alizarina pero además registraron purpurina que en *G. latoramosum* no fue encontrada. Al respecto, Caro *et al.* (2012) estudiaron diferentes antraquinonas con propiedades colorantes y registraron los colores de cada una de ellas, reportaron que Lucidina primaverosido tiñe de rojo, en este estudio se encontró presente en las fracciones que tiñeron de naranja y rosados, con respecto a la Alizarina, reportaron que tiñe de amarillo y coincide con lo hallado en esta tesis, ya que se encontró en la fracción de los amarillos. También Caro *et al.* reportaron que Lucidina, aporta color rojo, y en este estudio se encontró en la fracción de los naranjas, pero en esa misma fracción se

encontraron Fomarina, y Rubiadina, que reportaron tñen de amarillo. En esta tesis se encontraron dichas Aq en la fracción 4-7, es decir en la que tñen de rojo, pero como en dicha fracción se encontraron presentes 8 antraquinonas, lo más probable es que el amarillo que aporta la fomarina este solapado con el rojo que aporta la morindona. Quinizarina y Antragalol se reportaron como naranjas. En general, Caro *et al.* (2012) aseguran que los principales compuestos colorantes de HAQN de plantas de la familia *Rubiaceae* (por ejemplo, *Rubia* spp., *Galium* spp., *Morinda* spp., *Hypericum* spp., *Polygonum* spp. y *Cinchona* spp.) son alizarina (amarillo a rojo), pseudopurpurina (naranja), purpurina (rojo oscuro), lucidin-3-O-primeveroside (rojo), ácido rubítrico (dorado -amarillo), nordamnacanthal (naranja) y munjistina (naranja-rojo).

Por otra parte, hubo 3 Aq identificadas en esta tesis de las cuales no hay reportes bibliográficos que digan a que color pertenecen. Dentro de la Familia *Rubiaceas*, *Rubia tinctorum* ha sido la más estudiada con respecto a la identificación de Aq. En la literatura, se ha informado que de las raíces de dicha especie se han extraído un total de más de 35 compuestos antraquinoides (Bechtold, 2009).

Para *Galium odoratum* se observó que el colorante de antraquinona varía en función de las diferentes clases de edad del rizoma, contenido tres veces mayor para los rizomas mayores de 3 años en comparación con el rizoma de 1 mes de edad. (Boussadia *et al.*, 2015).

Pero para *Rubia tinctorum*, lo observado por Baydar y Karadogan (2006) acerca del contenido de materia colorante con respecto al diámetro de la raíz, fue diferente, ya que ellos observaron un mayor contenido de colorante en raíces de menor diámetro (menos de 0,5 cm) correspondientes a raíces terciarias (3,02 %) que en raíces más grandes y viejas. De todas maneras, es difícil comparar estas 2 especies que crecen en el Hemisferio Norte, con las especies estudiadas en esta tesis, debido a las variaciones en el clima, la edad de la planta y al tipo de pigmentos que presentan.

DOMESTICACIÓN

Registro de los estadios fenológicos durante la etapa reproductiva en condiciones de cultivo de *G. latoramosum* y *G. bigeminum*.

Con respecto al registro de los estadios fenológicos durante la etapa reproductiva de *Galium latoramosum*, si bien no hay referencias que hablen de esto en las especies estudiadas, se han encontrado datos recientes interesantes en *G. odoratum*, sobre la relación que existe sobre la fenología y la presencia de antraquinonas. Para dicha especie estudios recientes citan que el contenido de antraquinona varió en el ciclo estacional. El perfil fitoquímico general muestra una disminución durante el período de floración y una acumulación neta en la etapa de amarilleo de la hoja (Boussadia *et al.*, 2015). Si bien no fue objetivo de esta tesis relacionar las etapas fenológicas con el contenido de antraquinonas, será muy interesante realizarlo en investigaciones futuras. Tanto para *G. bigeminum* como para *G. latoramosum*, se registraron 6 estadios fenológicos: floración (FL), fruto cuajado (FC), fruto verde en crecimiento (FV), fruto cremoso (FC), fruto en madurez temprana (FMT) y fruto completamente maduro (FCM). El momento óptimo de cosecha fue FCM, ya que cuando se lo cosechó en FMT, los porcentajes de germinación fueron más bajos aún y mediante cortes histológicos se observó que en FMT el embrión no estaba del todo desarrollado (Rojas *com. pers.*). Dichas etapas para las 2 especies estudiadas se registraron en forma escalonada en un período de tiempo que fue de 52 días, es decir desde el 14 noviembre hasta el 5 de enero.

Boussadia *et al.* (2015) encontraron que en condiciones naturales el colorante total es mínimo en la etapa de floración (0,42 %) y aumenta al final del ciclo estacional, cuando el contenido de colorante del rizoma es aproximadamente el doble que el del principio de la temporada (1,33 %). Por otra parte, otros autores como Baydar y Karadogan (2006) registran que para un campo de *Rubia tinctorum*, de 3 años de edad, el contenido del tinte varió durante el ciclo anual con un mínimo en marzo (2,16 %) y un máximo en agosto (3,25 %). Ellos, encuentran relación a estas modificaciones con las variaciones locales de la pluviometría y las temperaturas (Baydar y Karadogan , 2006). Estos autores consideran

que las moléculas de antraquinona participan en la barrera de defensa de las plantas contra hongos y bacterias por lo que se puede formular la hipótesis de que esta variación podría ser un mecanismo de adaptación para resistir a las condiciones húmedas de las temporadas adversas. (Kalyoncu *et al.*, 2006).

Evaluación de la viabilidad de las semillas de *Galium latoramosum* de las poblaciones de crecimiento espontáneo

Si bien *G.latoramosum* posee estolones y rizomas que permiten una reproducción asexual (Rojas *et al.*, 2016), la propagación por semillas aporta a la variabilidad genética de la especie y a la conservación del germoplasma vegetal, así Bobone *et al.* (2009), realizando ensayos de germinación estándar a semillas de *G. latoramosum*, con el método entre papel en cámara de germinación a 20<=>30 °C y fotoperiodo de 16 h (luz)-8 h (oscuridad) no obtuvo diferencias en valores de poder germinativo (PG) entre el testigo (PG=37 %) y la aplicación de nitrato de potasio al 0,2% como tratamiento para ruptura de dormición (PG=40 %).

A diferencia de lo encontrado por Bobone *et al.* (2009), en esta tesis se obtuvo como máximo valor de germinación un 60 % a los 34 días desde la siembra, dicho resultado se logró con el remojo de las semillas en peróxido de hidrógeno al 40 % por una hora, este difirió de los restantes tratamientos, y superó los máximos logrados en sustrato tierra en invernadero (40 %).

Con respecto al vigor de las semillas, el testigo se mantuvo en valores bajos hasta 21 días desde la siembra, donde comienza a germinar, lo que indica que necesita ese tiempo para lograr la germinación si no se le aplica un tratamiento pregerminativo. Bobone *et al.* (2009) tuvo similares resultados dado que las semillas comenzaron a germinar a los 25 días desde la siembra con un 23 % de germinación. Datos diferentes sobre el vigor de semillas del género *Galium* ha reportado Reppert (1985), quien habla de que la semilla de *G. odoratum* tarda 200 días en germinar. También se cita para dicha especie que, en condiciones naturales, la extensión de la población se da en gran parte por propagación

clonal ya que la reproducción por semillas por población individual es baja (Kolby Lindhorst, 2006). Dicha característica, encontrada en *G. odoratum*, con respecto al bajo poder germinativo, se relaciona a lo encontrado en este trabajo ,tanto de *G. latoramosum* como de *G. bigeminum*, esto puede deberse a la presencia de algún tipo de dormición, ya que las semillas si reciben un tratamiento pregerminativo logran aumentar su germinación y acortar los tiempos de germinación.

Por otra parte, uno de los tratamientos pre-germinativos que se hizo y que llamó la atención fue el de estratificación frío- húmedo, ya que los valores de dicho tratamiento fueron menores aún al testigo, este tipo de tratamiento tiende a imitar las condiciones naturales de muchas especies forestales del hemisferio norte que durante el invierno suelen quedar cubiertas por un colchón de hojas frío- húmedas (Felix Pérez, 2010). Balaguera *et al.* (2010) reportan que la estratificación fría aumenta la síntesis de giberelinas y disminuye la concentración de inhibidores de germinación en las semillas, como el ácido abscísico (ABA). La exposición al frío degrada el ABA presente en las semillas, lo que, a su vez, aumenta la relación GA3 /ABA para que ocurra la germinación . El tratamiento con el que se logró mayor germinación (PG=60%) fue en el que se sumergieron las semillas en Peróxido de Hidrógeno al 40 % por una hora. Este se utiliza en *Pinus* para cumplir una función similar a la estratificación frío-húmedo, tratamiento que se aplica cuando la dormición es por presencia de inhibidores de tipo endógena, pero equivale a diez días de tratamiento frío-húmedo (Joseau, com. Pers.). Por otra parte también Poulsen (1999) cita que el peróxido de hidrógeno además de desinfectar la semilla amplía las fases tempranas de germinación incrementando el nivel de oxígeno en el ambiente y por lo tanto estimulando la germinación.

Por otra parte, dicha estratificación también puede generar una imbibición brusca que genere algún tipo de daño metabólico o una disminución en la entrada de O₂ a la semilla (Ferreira *et al.*, 2001). Por lo que una exposición superior a 10 días podría ser perjudicial para la semilla de *G. latoramosum* que en los restantes tratamientos de mayor exposición a frío-húmedo disminuyó su germinación (PG=10%) por debajo de los niveles alcanzado por el testigo (PG=43 %). Para las semillas de esta especie, una exposición mayor a 10 días de

tratamiento frío-húmedo funcionaría como un test de vigor, disminuyendo su capacidad de germinación.

Con respecto al peso de mil semillas, hubo diferencias entre el encontrado en este trabajo (0,59 gramos), y el encontrado por Bobone (2009), en semillas provenientes del Dique la Quebrada, que fue de 1,8 g. Se puede suponer que las diferencias pueden estar dadas por el origen, como así también el momento de cosecha, dado que si se cosechan al momento de madurez temprana del fruto, poseen más agua y por ende son más pesadas pero con menor PG.

Así como para *G. odoratum* Boussadia *et al.* (2015) observaron que había diferencias significativas en la producción de tinte entre distintas poblaciones a campo, y que estas diferencias desaparecían al ser cultivadas bajo condiciones controladas, similar situación ocurrió para *G. bigeminum* y *G. latoramosum*, en las que las diferencias para los caracteres de color, en especial H que es el que más interesa en este estudio, desaparecieron al ser cultivadas en vivero. Seguramente las diferencias encontradas a campo se debían más a las condiciones edafo climáticas que a las poblaciones en sí mismas.

Multiplicación *in vitro* de poblaciones de *Galium latoramosum*

La desinfección de los explantos obtenidos de rizomas con alcohol 70°; más solución de hipoclorito de sodio al 15% de principio activo con una gota de Twin 80 por 25 min, mostró dar los menores valores de contaminación en *Galium latoramosum*. En cambio, para *Minthostachys mollis*, cita Ojeda (2004) que los mejores porcentajes de brotes sin contaminación los obtuvo con etanol 70% v/v. En cuanto al enraizamiento, se obtuvieron porcentajes muy altos sin diferenciar las porciones probadas, en cambio Ojeda (2004) cita para *Minthostachys mollis* que los mayores valores de enraizamiento se lograron con las estacas apicales, y que las raíces más gruesas y numerosas se observaron en el tratamiento de 40g/ l de azúcar en estacas uninodales. En esta tesis no se diferenció el medio de introducción del de multiplicación, no se utilizó ningún medio específico para la formación de raíces, el medio utilizado fue MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado con ácido

ascórbico y cítrico (100 mg.l⁻¹ de cada uno) y 0,01 mg.l⁻¹ de ácido naftalén acético, 30 g.l⁻¹ de sacarosa y 8 g.l⁻¹ de agar- agar, ajustando el pH entre 5,6-5,7, sin embargo, con el medio utilizado se obtuvo hasta un 79% de producción de raíces. Las auxinas en diferentes concentraciones inducen el enraizamiento cuando se incorporan en el medio que contiene 1/4 de sales de MS. Sin embargo, la mejor respuesta de enraizamiento para *Mentha piperita* L se observó en un medio que contenía 2.0 mg / l de IBA, donde se formaron raíces que medían 1.68 ± 0.32 cm (promedio) (Mehta *et.al.* 2012).

Evaluación del comportamiento de *G. latoramosum* bajo distintos niveles de sombreo

En cuanto a sus necesidades lumínicas, si bien no hay registros para *G. latoramosum* y *G. bigeminum*, la información encontrada para otras especies de la familia o del género coinciden con los datos hallados en este trabajo de tesis, es decir que crece mejor y sobrevive mejor a niveles de sombreo medios, aproximadamente de un 30 % de sombra, ya que sol pleno afecta seriamente su supervivencia y niveles muy altos de sombra (80 %) también provocan mortandad de plantas. La información encontrada para *Rubia tinctorum* dice, que es poco exigente en luz, pudiendo situarse en un lugar con semisombra o con exposición directa al sol indistintamente (Guillén, 2013). Para *G. odoratum*, Lambinon *et al.* (2004) informa que crece en sombreados bosques caducifolios europeos, principalmente donde predominan las hayas.

CAPITULO 5

CONCLUSIÓN

De la caracterización morfológica realizada a la especie *Galium latoramosum* se concluye que, los tallos subterráneos corresponden a rizomas y estolones, los cuales emiten raíces adventicias a partir de los nudos. Los pigmentos se localizan en la corteza, floema y médula de rizomas adultos y jóvenes y en la corteza y floema de las raíces adventicias.

En lo que respecta a los **caracteres morfológicos** propiamente dicho por los resultados obtenidos se llega a la conclusión que:

Los caracteres morfológicos de plantas madres de crecimiento espontáneo diferencian las tres poblaciones de *Galium latoramosum* estudiadas. La población de Ongamira presenta ejemplares de mayor peso radicular y caracteres morfológicos de mayor valor para muchos de los caracteres medidos de la parte aérea. La descendencia de la población de *Galium latoramosum* de Ongamira presenta igual comportamiento que las plantas madres para estos caracteres.

Con dichas conclusiones se acepta la hipótesis de que las poblaciones de crecimiento espontáneo de *Galium latoramosum* dispersas en las Sierras de Córdoba tienen un comportamiento diferente en cuanto a sus caracteres morfológicos.

Los caracteres morfológicos de plantas madres de crecimiento espontáneo diferencian las tres poblaciones de *Galium bigeminum* estudiadas. La población de Pampa de Olaen, presenta los mayores valores para la mayoría de los caracteres morfológicos registrados, y para peso seco de la parte radicular. Con esta conclusión se acepta la hipótesis de que las poblaciones de crecimiento espontáneo de *G. bigeminum* dispersas en

las Sierras de Córdoba tienen un comportamiento diferente en cuanto a sus caracteres morfológicos.

El análisis de correlaciones canónicas de los caracteres morfológicos de las madres y descendencia de poblaciones de *G. latoramosum* aseveran las diferencias encontradas dado que para cada población las asociaciones de las variables de las madres y los hijos son diferentes.

Desde el punto de vista químico, los caracteres colorimétricos diferencian las poblaciones de *Galium latoramosum* y *G. bigeminum*.

Para los tintes obtenidos de órganos subterráneos de las plantas madre de *G. latoramosum*, los mayores valores del parámetro H (matiz) son los de la población de La Cumbre y para *G. bigeminum* son los de la población de Pampa de Olaen. Se concluye que las especies estudiadas del género *Galium* presentaron buena solidez a la luz, siendo *G. latoramosum* el más sólido frente a la luz, seguido por *G. richardianum* y por último *G. bigeminum*. Con respecto a la solidez al lavado, las 3 especies de *Galium* estudiadas presentan una excelente solidez al lavado doméstico y comercial., se comportaron todas muy bien respondiendo entre 4 y 5 para el cambio de color, para las transferencias a otras telas también se comportaron muy bien, obteniéndose en todos los casos resultados entre 4-5. (Escala del 1 al 5 siendo 5 mejor resultado). En cambio, en cuanto a la solidez al frote seco, las 3 especies se comportaron igual obteniendo una valoración regular (2). Con respecto a la Solidez al sudor ácido y básico, se comportaron las tres especies igual, obteniéndose excelentes resultados (5), pero la transferencia a las poliamidas y a las lanas fue mala (1-2).

Los compuestos químicos que las raíces de *G.latoramosum* presentan en abundancia son taninos y 11 antraquinonas (AQ) glicósidos con propiedades tintóreas: 1- Quinizarina, 2- Alizarina, 3- Fomarina, 4-1,5-dihidroxi-2-metil antraquinona, 5- Rubiadina, 6- Antragallol.7- Morindona .8- Lucidina. 9- 3-metil éter de lucidina.10- 8-hidroxi-3-metoxi-

7-metil 1,2 metilenedioxi AQ.11-Lucidina primeverósido. Ocho de dichas antraquinonas dan tonalidades más rojas las otras abarcan la gama de los amarillos, naranjas y rosados.

De esta manera queda confirmada la hipótesis que “El rendimiento de los órganos subterráneos tintóreos, como la concentración y calidad del tinte serán variables en las diferentes poblaciones de *Galium latoramosum* y *Galium bigeminum*”.

Desde el punto de vista de la domesticación, el comportamiento germinativo de *Galium latoramosum*, incluye a dicho género en el Grupo A.2.1.1.1. A: Especies agrícolas cultivadas, 2: Dicotiledónea, 1: Germinación epigea, 1: Sin elongación del epicótilo durante el período de ensayo, 1: Raíz primaria esencial. La calidad fisiológica en *G. latoramosum* varía según su procedencia. Semillas provenientes de La Cumbre se categorizan en calidad medianamente alta, en cambio las semillas de Poblacion Ongamira se categorizan en calidad media. (40% de PG). Es posible producir plantas de *G. latoramosum* por semillas pretratadas con peróxido de hidrógeno al 40 % por una hora para ruptura de dormición y así lograr 60% de poder germinativo y acortar los tiempos de germinación, con lo anteriormente concluido se demuestra la hipótesis “Las semillas con tratamientos pregerminativos tendrán mayor poder germinativo y una germinación más rápida que aquellas a las que no se le aplique”.

Galium latoramosum también se adapta bien a la propagación clonal. Se estableció un protocolo eficiente para el establecimiento de explantes *in vitro*, que permitirá avanzar en otras técnicas como la producción de cultivos celulares, en suspensión para la producción *in vitro* de antraquinonas responsables del poder tintéreo. *G. latoramosum* presentó altas tasas de multiplicación. Resta ajustar la etapa de rusticación.

G. latoramosum produce cultivándose en macetas de 3 litros durante dos años, raíces con un peso fresco de 4 g y un rendimiento del 45 % de peso seco siendo estos tintes de buena solidez a la luz y al lavado. La especie *G. bigeminum* tiene mayor producción de

raíces que *G. latoramosum*, siendo la población de Pampa Olaen, la de mayor rendimiento, registrándose una media de PFPR de 21 g, con un rendimiento de peso seco del 20 %.

Para cultivar *G. latoramosum* en jardines tintóreos se necesita generar un sombreado del 30 %, para obtener valores óptimos de crecimiento y sobrevivencia. Por lo que con esto confirma la hipótesis “Las poblaciones de crecimiento espontáneo de *Galium latoramosum* dispersas en las Sierras de Córdoba y cultivadas en vivero diferirán en su adaptación y crecimiento según el grado de sombreado”.

Además, en este trabajo de tesis se logra ajustar la metodología de tinción realizando desmenuzado del material vegetal con licuadora, luego el tiempo de decocción se fija en 45 minutos no superando los 90° C y con la mejor proporción raíz- lana 1-1. El diámetro de las raíces no influye en el poder tintóreo. El tipo de agua tampoco influye por lo que se aconseja utilizar agua del grifo.

También se registra que *G. latoramosum* registra 6 estadios fenológicos 1) Floración (FL) 2) Fruto cuajado (FC) 3) Fruto verde en crecimiento (FV), 4) Fruto cremoso (FC) 5) Fruto en madurez temprana (FMT) 6) Fruto completamente maduro (FCM). El momento óptimo de cosecha es el de FCM. El tiempo medio en que se desarrollan estos 6 estadios es de 45-50 días aproximadamente.

Es decir, que, en la población de La Estancita, para tener mayor peso seco de la raíz en los hijos, se debería buscar plantas madre de mayor longitud de tallos primarios (LT1) y con menor cantidad de tallos primarios, ya que estas variables parecen tener comportamiento inverso en el conjunto de las madres y de las hijas en relación al PSPR.

LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACION

De los resultados de esta tesis, se desprenden futuras líneas de investigación, que permitirán completar los conocimientos sobre el cultivo de *G. latoramosum* y *G. bigeminum*.

- Será un importante aporte estudiar las variables que modulan la tasa de crecimiento de los órganos subterráneos y el contenido de antraquinona del rizoma de *G. latoramosum*.
- Relacionar la variación anual de antraquinonas, con las etapas fenológicas y / o si directamente está bajo control de las condiciones climáticas, esto es una pregunta para ser investigado en el futuro.
- Resta para futuras investigaciones cuantificar el contenido de antraquinonas en diferentes ensayos, de *Galium* spp que crece en las sierras de Córdoba.
- Si bien en esta tesis se comenzaron ensayos de producción de callos “*in vitro*”, pero no se terminaron, ya que no eran objeto de esta investigación, será una interesante línea de futuras investigaciones profundizar conocimientos en cuanto a la producción de antraquinonas en bioreactores, a través de cultivos celulares “*in vitro*”.
- Profundizar en los factores que inciden en el rendimiento de órganos tintóreos y/o AQ Evaluar diferentes ensayos de sustratos, fertilizantes y ampliar en las condiciones ambientales variables (por ej., condición hídrica y nutricional).

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Agudelo Laverde L. 2012. Interacciones agua-sólido en frutas liofilizadas y sus consecuencias sobre aspectos estructurales, atributos cromáticos y distribución espacial de la luz. Tesis Doctoral. Buenos Aires. Argentina. 214 pp.
- Andrada A. 2003. Flora utilizada por *Apis mellifera* L. en el sur del Caldenal (Provincia Fitogeográfica del Espinal). Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales. Buenos Aires. Argentina. 5 (2): 329-336.
- Antúnez de M. and Kay K. 1989. Peruvian Natural Dye Plants. Economic Botany, 43(2): 181-191.
- Angelini L., Pistelli L., Bellon I. P., Bertoli A. and Panconesi S. 1997. *Rubia tinctorum* a source of natural dyes: Agronomic evaluation, quantitative analysis of alizarin and industrial assays. Industrial crops and products. 6:303-311.
- Bacigalupo N, 1993. *Rubiaceae*. Flora de la Provincia de Jujuy. República Argentina. Parte IX. Cabrera A. INTA. (Ed) Buenos Aires, pp 375-438.
- Bacigalupo. N. 2009. Flora del Valle de Lerma. *Rubiaceae* Juss. Aportes Botánicos de Salta. Ser. Flora. Publicado en internet, disponible en www.unsa.edu.ar/biblio/herbario/flora/vol4/pdf/73%20rubiaceae.pdf. Activo Agosto 2016.
- Balaguera H., Morales E., Merchan P., 2011. El tamaño del cladodio y los niveles de auxina influyen en la propagación asexual de pitaya (*Selenicereus megalanthus* Haw.) Publicado en internet, disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/275256230>. Activo octubre 2018.
- Baydar H. and Karadogan T. 2006. Agronomic potential and industrial value of madder (*Rubia tinctorum*) as a dye crop. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 30:287-293.
- Bechtold T. 2009. Handbook of Natural Colorants. John Wiley & Sons (Ed). Chapter 10, pp 151-182.
- Bima P., Vargas L. y Ojeda M. 2006. *In vitro* propagation of peperina (*Minthostachys mollis*) (Kunth.) Griseb. Molecular Medicinal Chemistry. 11:3-5.
- Bobone A. y González P. 2009. Informe final Beca de Extensión “Desarrollo y difusión de metodologías de producción de plantas productoras del azul y el rojo y de la obtención de sus tinturas para el desarrollo sustentable”. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 78 pp.
- Bolívar P., Cruz-Paredes C., Hernández L., Juárez Z., Sánchez-Arreola E, Av-Gay Y, Bach H. 2011. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. Journal of Ethnopharmacology. 137 (1): 141-7.
- Borhidi, A. 2012. *Rubiáceas* de México. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungría, 580 pp.

- Boussadia O., Bertrand M., Aurore N. and Monique B. 2015. Anthraquinone dyestuff and growth of *Galium odoratum* rhizomes in relation to ecophysiological and ontogenic conditions. Belgium European Scientific Journal. vol.11, N°9.145-157.
- Briggs, L. and Nicholls G.1954 Chemotaxonomic studies in the Rubiaceae. Leaf flavonoids of New Zealand coprosmas. Journal of the Chemical Society, 3940.1-4773pp.
- Burger, R. 2009. The life and writings of Julio C. Tello: America's first indigenous archaeologist. University of Iowa Press. pp. 28- 38.
- Cabido, M y Zak, M. 2010. “Deforestación, agricultura y biodiversidad: Apuntes sobre el panorama global y la realidad de Córdoba.” Revista Hoy la Universidad - Ciencia. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. pp. 1-13.
- Cabrera, A. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. 2 ed. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. ACME, Buenos Aires.
- Cabrera, A. 1993. Flora de la Provincia de Jujuy. Colección Científica del I.N.T. A. Tomo 13. Buenos Aires, Argentina. 437 pp.
- Campos R., J. 1998. Productos forestales no madereros en Chile. Dirección de productos forestales. FAO, Santiago, Chile, pp.55-70.
- Cano Morales, M.2008. Evaluación de la capacidad de tinción de los tintes obtenidos de dos especies forestales guatemaltecas, en el proceso de teñido de fibras, lana y maguey. Tesis Magister. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.107pp.
- Caro, Y; Anamale, L; Fouillaud, M; Laurent, P; Petit, T; Dufosse, L. 2012. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. Natural products and bioprospecting. France. (5): 174-193.
- Cedano Maldonado, M. y Villaseñor Ibarra, L.2006. Colorantes orgánicos de hongos y líquenes. Scientia-CUCBA 8(2):141—161. (El artículo corresponde a la traducción del capítulo: Cedano Maldonado, M. and L. Villaseñor Ibarra, 2005. Organic Dyes from Fungi and Lichens. Chapter 16. pp 375—406. In: Deshmukh, S.K and M. K. Rai (Editors). Biodiversity of Fungi: Their Role in Human Life. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi).
- Comisión de Ordenamiento Territorial del Bosque Nativo. 2010. “Ley de Ordenamiento Territorial de Bosques Nativos de la Provincia de Córdoba, Fundamentos., Córdoba: Comisión de Ordenamiento Territorial del Bosque Nativo.”.Publicado en internet, disponible en: <http://www.leydebosquescordoba.com.ar/home/comunicados-antteriores/el-proyecto-de-ley-de-bosque-ya-tiene-estado-parlamentario>. Activo agosto 2018.
- Cunningham, A.B. 1987. Commercial craftwork: Balancing out human needs and resources. Journal of Economic Botany. 53: 259-266.
- Davies, P., Villamil J. y Ashfield R. 2004. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. 6. Fichas técnicas de cultivo. Serie 11. Uruguay. 227 p.

- De La Fuente; L. Lobos P. y Ginocchio R. 2011. Fitoestabilización de depósitos de Relaves en Chile. Guía N° 5. Propagación de especies vegetales nativas y endémicas. Tratamientos pregerminativos para guía de propagación de especies vegetales nativas y endémicas. CIMM, INIA, Intihuasi. Chile. 92 pp.
- Dean, J. 1999. Wild Color. Revised and Updated Edition: The Complete Guide to Making and Using Natural Dyes Watson-Guption Publications, New York. Estados Unidos. 144 pp.
- Defensor del Pueblo de la Nación. 2011. “Informe Especial sobre la Situación de la Ley Provincial de Ordenamiento Territorial de Bosques Nativos de la Provincia de Córdoba (Ley 9.814)”. Defensor del Pueblo de la Nación. Publicado en internet, disponible en: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/FCEFYN/article/view/11502>. Activo marzo 2019.
- Delprete, P, G. 2004. *Rubiáceas*. En Flowering Plants of the Neotropics. Smith, N, Mori, S, Henderson, A, Stevenson, D. W., & Helad, S. V editores. The New York Botanical Garden Published by Princeton University. Estados Unidos .563pp.
- Delprete, Rova J, Piero G., Andersson L, Albert V. 2002. A TrnL-F Cp DNA Sequence Study Of The Condamineae-Rondeletieae-Sipaneeae Complex With Implications On The Phylogeny Of The *Rubiaceae*. American Journal of Botany 89(1): 145–159. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.1.145>
- Dempster, L. 1990. The Genus Galium in South America. Allertonia. Vol. III N° 3: 211 – 258. National Tropical Botanical Garden. U.S.A. Disponible en: <http://www.ntbg.org/>. Activo junio 2019.
- Devore G, Muñoz Peña E. 1969. Química orgánica. Publicaciones Cultura S. A. México. Pp. 644-651.
- Di Rienzo, J. A.; F. Casanoves; M. G. Balzarini; L. González; M. Tablada y C.W. Robledo. 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Díaz, S. 2008. Apuntes para una propuesta de adaptación y mitigación del cambio climático global en la ciudad de Córdoba en el siglo XXI. En: Córdoba: Foro Ambiental Córdoba.15 pp.
- Ensabella, B. 2008. El deterioro de los ecosistemas del norte cordobés y los límites de las economías campesinas Mundo Agrario.Publicado en internet, disponible en: <http://www.mundoagrario.unlp.edu.ar>.http://www.fuentesmemoria.fahce.unlp.edu.ar/art_revistas/pr.3156/pr.3156.pdf.Activo junio 2019.
- ENSCONET. 2009. European Native Seed Conservation Network. Protocolos de conservación y recomendaciones. Royal Botanic Gardens (ed), Kew, England. 24 pp.
- Escobar Escobar, DF, y Torres G., AM.2013. Morfología, ecofisiología y germinación de semillas del árbol neotropical *Alibertia patinoi* (Rubiaceae). *Revista de biología tropical* 61 (2), 547+. Publicado en internet, disponible en: <https://link.galegroup.com/apps/doc/A344602320/AONE?u=googlescholar&sid=AONE&xid=4f350d50>. Activo junio 2019

- Evans, W.Ch. 1991 Tratado de Farmacognosia. Nueva Editorial Interamericana, Mexico. 846 pp.
- Ferreira, A. G.; B. Cassol; S. Taylor Da Rosa; T. Sales Da Silveira; A. Stival e A. Silva. 2001. Germinação de sementes de asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. Acta Botánica Brasilica 15(2): 231-242 pp.
- Fleuret, A. 1980. Non food uses of plants in Usambara. Journal Economic Botany. 34: 320-33.
- Flores de Almería. 2009. Joyas botánicas de Almería. *Galium ephedroides* Willk. Familia: Rubiáceas. Publicado en internet, disponible en: [http://www.floresdealmeria.com/joyas/galium-ephedroides .html](http://www.floresdealmeria.com/joyas/galium-ephedroides.html). Activo Julio 2019.
- Fontalvo S., González E., Álvarez L. González y Restrepo A. 2014. Estudio de la tintura de seda orgánica colombiana con colorantes certificados por la norma GOTS. Revista Investigaciones Aplicadas 37 – 44.pp. Publicado en internet, disponible en <http://revistas.upb.edu.co/index.php/investigacionesaplicadas>. Activo mayo 2019.
- Forzza, R. C. 2010. Lista d'especies Flora do Brasil. Publicado en internet, disponible en: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010>. Activo mayo 2019.
- Fraile de Pablo, A. 2008. A esa *rubia*, tan poco conocida y hoy casi olvidada. Revista La Villa. Cuéllar. España. Publicado en internet, disponible en: <http://admreportaje.blogspot.com/2018/11/auge-y-declive-de-la-rubia.html>. Activo mayo 2019.
- Geissman, A.T. 1962 *The Chemistry of Flavonoid Compounds*; Pergamon Press Inc., Oxford. 642 pp.
- Gibaja S. 1998. Pigmentos naturales quinónicos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos editorial. 277 pp.
- 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 110 pp.
- González Mina R.T., Rodríguez T. H.J. y Jiménez Lemos J. 2004. Informe final. Estudio nacional del mercado de tintes, colorantes y pigmentos naturales. Parte 2: Aspectos técnicos. Programa Biocomercio Sostenible. Instituto Alexander von Humboldt - Ministerio del Medio Ambiente. Calí. Colombia. 83 pp.
- González Vega, María E, Rosales Jenqui, Pedro, Castilla Valdés, Yanelis, Lacerra Espino, José Á, & Ferrer Viva, Merardo. 2015. Efecto del Bioenraizado como estimulante de la germinación y el desarrollo de plántulas de cafeto (*Coffea arabica* L.). *Cultivos Tropicales*. Publicado en internet, disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362015000100009&lng=es&tlng=es. Activo junio 2019.
- Gormsen, E. 1991. Artesanía, turismo e identidad regional en México. TRACE. 20-29 pp.
- Grieve, M. 2018. "A Modern Herbal". Disponible en: <https://botanical.com>. Activo junio

2019.

- Guerrero Maldonado, N. 2008. Uso y valoración de plantas medicinales y tintóreas presentes en Santiago del Estero, Argentina y Escuela politécnica de Madrid. Tesis fin de Carrera/Grado. 396 pp.
- Guillén, J.2013. *Rubia tinctorum*. Publicado en internet, disponible en <http://www.botanicayjardines.com/> Activo junio 2019.
- Graaff, Hofenk J H 1993. Conservation-Restoration of Church Textiles and Painted Flags. Hungary: s.n. 4th Internatioonal Restorer Seminar, Vol 2. 219-228.
- Harborne, J.B. 1984: Phytochemical Methods – A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Chapman and Hall editors. London. Publicado en internet, disponible en: <http://www.reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/>. Activo junio 2019.
- Hart, T. 2011.Evaluating the usefulness of phytoliths and starch grains found on survey artifacts.Journal of Archaeological Science. 38(12) : 3244-3253.
- Hintermeister, P; Sálmonsén, D. 2010. “Domesticación de plantas productoras del azul y el rojo, obtención de sus tinturas y difusión de estas metodologías para un desarrollo sustentable”. Informe Final de Beca SEU. UNC. Córdoba, Argentina. 32pp.
- Hemcinschi, A. Gales R.and Toma C.2008. Vegetative anatomy of two *Galium L.* species (*Rubiaceae*). Analele Științifice ale Universității “Al. I. Cuza” Biologie vegetală. 54(2): 30-37.
- Hemcinschi A, Gille E, Trifan A, Necula R, Stănescu U.2010. Contributions to the study of the chemical variability of some *Galium album* Mill. Populations harvested from wild flora in northern Moldavia. Revista medico-chirurgical a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi. 113(4):1280-4.
- Holm, T.1907. *Rubiaceae*: anatomical studies of North American representatives of *Cephalanthus*, *Oldenlandia*, *Houstonia*, *Mitchella*, *Diodia* and *Galium*. Botanical Gazette. 41(3):153-186.
- Hotelling, H. 1936. Relations between two sets of variables. biometrika, 28: 321-377.
- InfoStat. 2016. Infostat/Estudiantil. Grupo Infostat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
- Inoue, K.; Nayeshiro, H.; Inouye, H. and Zenk, M. 1981. *Phytochemistry*, **20**:1693.
- ISTA. 2009. International Rules for Seed Testing. Edition 2009/1. Zurich, Switzerland
- Izhazi, I. 2002. Emodin—a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants *New Phytologist*.155, 205–217.
- Johnson, 2013. Futuro Perfecto. Publicado en internet, disponible en <https://www.xatakaciencia.com/quimica/en-busca-del-color-rojo-y-de-como-un-grupo-de-personas-incentivado-por-premiums-logro-encontrarlo>. Activo mayo 2019.

- Joseau J., Bobone A., González P., Meehan A., Aráoz S., Camusso C., Hernández R., Rodríguez Reartes S., Pino N., Castillo N., Segura C., Ordoñez M. y Demaldé A. 2008. Desarrollo y difusión de metodologías de producción de plantas productoras del azul y el rojo y de la obtención de sus tinturas para el desarrollo sustentable. En: VII Jornadas Nacionales de Extensión Universitaria de Córdoba. Argentina.
- Joseau J., Bobone A., González P., Meehan A., Aráoz S., Camusso C., Hernández R., Rodríguez Reartes S., Pino N., Castillo N., Segura C., Ordoñez M. y Demaldé A. 2009. Desarrollo y difusión de metodologías de producción de plantas productoras del azul y el rojo y de la obtención de sus tinturas para el desarrollo sustentable. XIII. Congreso Forestal Mundial. Buenos Aires. Argentina
- Joseau M. J., Conles M. Y. y Verzino G. E. 2013. Conservación de Recursos Forestales nativos de Argentina. El cultivo de plantas leñosas en vivero y a campo. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina. 311 pp.
- Kalyoncu, F., Cetin, B. and Saglam, H. 2006. Antimicrobial activity of common madder (*Rubia tinctorum L.*). *Phytotherapy Research*. 20:490-492.
- Kino-Oka M, Nagatone H. and Taya M 2001. Characterization and application of plant hairy roots endowed with photosynthetic functions. En Scheper T (Ed.) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Vol. 72. Springer. Berlín, Alemania. pp: 183-21
- Kolb y Lindhorst. 2006. Fragmentación de bosques y éxito reproductivo de las plantas: un estudio de caso en cuatro hierbas perennes. *Ecología Vegetal*. Bremen, Alemania. 185 (2): 209-220
- Kruskal, W.H.; Wallis, W.A. 1952. Use of ranks on one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47: 583-621.
- Lambinon, J., Delvosalle, L., Duvigneaud, J. 2004. Nouvelle flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines (Pteridophytes Et Spermatophytes) Cinquième édition, Éditions du Patrimoine du Jardin botanique national de Belgique, 1167pp.
- Le Duc, M. Pakeman R. and Marrs, R. 2003. Changes in the rhizome system of bracken subjected to long-term experimental treatment, *Journal of Applied Ecology*. 40 :508-522.
- León, K., Mery, D., Pedeschi, F., León, J., 2006. Color measurement in L* a* b* units from RGB digital images. *Food research international*. 39: 1084-1091.
- López López J. 2013. Evaluación del proceso de aplicación y capacidad de tinción del colorante natural obtenido de las hojas del añil (*Indigófera Guatemalensis*) a partir de cuatro procedencias y mediante pruebas fisicoquímicas en fibras de lana y algodón a nivel laboratorio. Tesis de grado. Facultad de Ingeniería de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 163 pp.
- López S. Udias, G. Mateo Sanz and M. B. Crespo Villalba. 2004. Nuevo taxón del género *Galium L.* (Sect. *Leptogalium lange*) para el sistema Ibérico. *Flora Monteiberica*. 27: 47-53.

- Lifchitz. 1969. Plantas medicinales, guía práctica de botánica universal. Kier editores. San Diego, CA, Estados Unidos. 290 pp.
- Luti, R., Bertrán M, De Solís, M. Galera, N. Muller De Ferreira, M. Berzal, M. Nores, M.A. Herrera y Barrera, J. 1979. Vegetación en geografía física de la provincia de Córdoba. Vázquez, Miatello y Roque (eds.). Córdoba. Argentina. 469 pp.
- Mahale G, Sakshi R. y Sunanda R. 2003. Dye wool with *Tectona grandis* and solid color. Indian Journal Fibre and Textile Research. 28: 86.
- Mahanta, D., Tiwari, SC. 2005. Natural dye-yielding plants and indigenous knowledge on dye preparation in Arunachal Pradesh, northeast India. Current Science 88(9): 1474-1480.
- Marcano D. y Hasegawa, M. 2002. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, Venezuela. 588 pp.
- Markham, K.R. 1982: Techniques of Flavonoid Identification; Academic Press, London. 23 pp.
- Martínez Crovetto R. 2012. Los albores de la etnobotánica en la Argentina. Introducción a estudios etnobotánicos. Bonplandia (2): 101-107.
- Marzocca, A. 2005. Plantas exóticas colorantes o tintóreas cultivadas en la Argentina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Buenos Aires. 130 pp.
- Masa C. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. Badajoz. España. 216 pp.
- Matt T. Roberts, N. and Etherington T. 2011. Bookbinding and the Conservation of books. A Dictionary of Descriptive Terminology. Publicado en internet, disponible en <http://cool.conservation-us.org/don/dt/dt0781.html>. Activo mayo 2019.
- Matteuchi S. y Colma A. 1982. Metodología para el estudio de la vegetación. Monografía N° 22 OEA. Argentina. 169 pp.
- Mavi A, Terzi Z, Ozgen U, Yildirim A. and Coşkun M. 2004. Antioxidant properties of some medicinal plants: Prangos ferulacea (*Apiaceae*), *Sedum sempervivoides* (*Crassulaceae*), Malva neglecta (*Malvaceae*), Crucjata taurica (*Rubiaceae*), Rosa pimpinellifolia (*Rosaceae*), *Galium verum* subsp. Verum (*Rubiaceae*), Urtica dioica (*Urticaceae*). Biological & Pharmaceutical Bulletin. 27 (5): 702-5.
- Mehta, J., Naruka R., Sain, M., Sharma D. and Mirza, J. 2012. An efficient protocol for clonal micropropagation of *Mentha piperita* L. (*Pipperment*). Asian Journal of Plant Science and Research. 2 (4): 518-523.
- Mersereau D. and Tommaso A. 2003. The biology of Canadian weeds. *Galium mollugo* L, Canadian Journal of Plant Science. 83: 453-466.
- Miliani, C.; Romani, A.; Favaro, G. J. 2000. Efectos acidocrómicos en 1, 2-di- y 1, 2,4-tri-hidroxantraquinonas. Un estudio espectrofotométrico y fluorimétrico. Physical Organic Chemistry. 13: 141-150.
- Mitova MI, Anchev ME, Handjieva NV and Popov SS. 2002. Iridoid patterns in *Galium* L.

- and some phylogenetic considerations. *Z Naturforsch. Bulgaria* (3-4): 226-34.
- Molinero, H. 1986. Técnicas de determinación de biomasa en cinco especies de arbustos. En: taller de arbustos forrajeros para zonas áridas y semiáridas. SAASA. Bs. As. Argentina. 56 pp.
- Montenegro, C; Gasparri, I; Manghi, E; Stradal, M; Bono, J y Parmuch, M G 2004. "Informe Sobre Deforestación en Argentina", Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Dirección de Bosques, Unidad de Manejo del Sistema de Evaluación Forestal. Buenos Aires. Argentina. 8 pp.
- Morimoto M, Tanimoto K, Sakatani A and Komai K. 2002. Antifeedant activity of an anthraquinone aldehyde in *Galium aparine* L. against *Spodoptera litura* F. *Phytochemistry*. (2): 163-6.
- Mugas M, Königheim B, Rojas L, Aguilar J; Joseau M; Contigiani, M y Núñez Montoya S. 2015. Especie vegetal autóctona demuestra actividad antiviral in vitro. IMBIV, CONICET. Congreso Nacional de farmacognosia. Facultad de Ciencias. Químicas, Córdoba, Argentina.
- Mugas, M. 2018. Búsqueda de agentes antivirales a partir de plantas bioactivas argentinas: evaluación de antraquinonas naturales y semisintéticas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. 182 pp.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiological. Plants*. 15: 473- 497.
- NORMA IRAM- ISO 1005- 2008. Directrices para los planes de Calidad. -10-30
- Núñez Montoya, S. 2002. Metabolitos secundarios en *Heterophyllaea pustulata* Hook (*Rubiaceas*). Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 220 pp.
- Ojeda, M. 2004. Caracterización de poblaciones y avances en la domesticación de peperina (*Mintostachys mollis* (Kunth.) Griseb). Tesis doctoral, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina, 129 pp.
- Ortega-Olivencia A. y Devesa J 2004. Sobre el tratamiento de *Galium* L. (Rubiaceae) en Flora Iberica. *Acta Botánica Malacitana*. 29: 241-253.
- Ortiz, G., J. 1968. Plantas tintóreas de las zonas del desierto y la estepa septentrional chilenas. Editorial Museo de la Serena. Chile. 63 pp
- Padfield T. and Landi S. 1966. The Light-fastness of the natural dyes. *Studies in Conservation*. 161-96 pp.
- Passera C. 1986. Productividad de arbustos forrajeros. En: Taller de arbustos forrajeros para zonas áridas y Semiáridas. SAASA. Bs. As. Argentina. pp 2-9.
- Perassolo M; Cardillo A; Mugas M; Núñez Montoya Sc; Giulietti A; and Rodríguez Talou J. 2017. Enhancement of anthraquinone production and release by combination of culture medium selection and methyl jasmonate elicitation in hairy root cultures of *Rubia tinctorum*. *Industrial crops and products*. Amsterdam. 105 pp.

- Petersen, P.M. and Philipp, M. 2001. Implantation of forest plants in a wood on former arable land: a ten year experiment. *Flora*. 196: 286 - 291.
- Poulsen J.1999. Técnicas para la escarificación de Semillas Forestales. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Proyecto de semillas forestales.Turrialba. Costa Rica pp 33-60 .
- Rahman, A. 2013.Studies in Natural products Chemistry. University of Karachi, Pakistan. 40:112-8
- Reppert, B.Small E.1985. In Culinary herbs. National Research Council of Canada. Ontario. Canada
- Resico, C 2001.Análisis de información sobre productos forestales no madereros en Argentina. Proyecto: información y análisis para el manejo forestal sostenible: integrando esfuerzos nacionales e internacionales en 13 países tropicales en AméricaLatina. Republica de Chile
- Resico, C.; Kasulin, I. 1998. Productos no maderables de Argentina. *Bosques y Desarrollo*
- Río Martínez, B. 2013. La Rubia o Granza. Historia de la Agricultura antigua. Publicado en internet, disponible en <http://www.diariodelaltoaragon.es/NoticiasImprimir.aspx>. Activo junio 2019
- Roberts, T.2009.Natural Dyes.The Top 3 European Dye Plants.pulicado en internet, disponible en <http://www.wildcolours.co.uk>. Activo Julio 2019.
- Rodriguez Reartes S., Joseau J., Bima P.2009. Avances en la multiplicación *in vitro* de *Zanthoxylum coco* Gillies ex Hook. F y Arn. IV Jornadas Integradas de Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNC. Córdoba, Argentina. 258 pp.
- Rodriguez Reartes S., Tolocka P., Araoz S., Joseau J., Bima P., Hernández R., Meehan A., Segura C., Sercovich S., y Rojas L. 2007. Multiplicación sexual y asexual de *Rivinia humilis* L. III Jornadas Nacionales de Flora Nativa.
- Rojas L.; Pascualides A. L., Hernández R. Joseau J.2016. Morpho-Anatomical Study of the Underground and Dyeing Organs in *Galium latoramosum* Clos. (*Rubiaceae*). *IJGHC*. 5(3): 315-324
- Rojas, L. y Joseau J. 2015 .Determinación de la eficacia de tratamientos pregerminativos para la domesticación de *Galium latoramosum* Clos (*Rubiaceae*). Jornadas Forestales de Santiago del Estero. Argentina 43 pp.
- Rondina, R.V.D. y Coussio, J.D. 1969 *Rev. Inv. Agropecuarias* (INTA); serie 2: Biología y Producción, **6**: 351-366.
- Roquero A, 2008 Identification of red dyes in textiles from the Andean Region. Textile Society of America. 11Th Biennial Symposium. Honolulu, Hawaii, 11 pp.
- Salgado Garciglia R .2018. La propagación de plantas in vitro, un éxito biotecnológico. Saber más. Universidad michoacana de San Nicolás de Hidalgo.Publicado en internet, disponible en www.sabermas.umich.mx. Activo marzo 2019.

- Samanta A K, A Konae and Chaktaborti S. 2011. Dyeing of jute with tesu extract: Part 1 - Effects of different mordants and dyeing process variables. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*. 36 : 63-73 .
- Sanz Tejedor A. 2018. La industria de los colorantes y pigmentos.Publicado en internet, disponible en: <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-11.php>. Activo mayo 2019.
- Siva, R. 2007. Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current Science*. 92(7): 916-925.
- Stahl, E. 1969: *Thin Layer Chromatography – A Laboratory Handbook*, Springer-Verlag, New York. 245 pp.
- Steyermark, J.A. 1974. Rubiaceae. En: *Flora de Venezuela T. Lasser*, Ed. 9(1-3): 1-2070.
- Stramigioli C. 2007. Tintes Naturales. Las teleras santiagueñas.buenos Aires. Ed. Stramigioli .Buenos Aires. Argentina .192 pp
- Thomé, F. 1903.*Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, del, en Wort und Bild, para Schule und Haus; mit .Tafeln de Walter Müller. 463 pp.
- Torres, N.L. Sáez, M. Mus and Rosselló J. 2001. The taxonomy of *Galium crespianum* J.J. Rodr. (*Rubiaceae*), a Balearic Islands endemic revisited, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2001, 136: 313-322.
- Tresserras, J. 2000 El uso de plantas para el lavado y teñido de tejidos en época romana. *Complutum*.11: 245-252.
- Trillo, C. (2004). La especie del mes: *Galium latoramosum* (Hook. et Arn.) Clos. *Ecosistemas Argentinos*. Boletín n°2. Publicado en internet, disponible en: http://www.ecosistemasarg.org.ar/ea_bol_mar2004. Activo marzo 2019.
- Trillo, C.; Demaio, P. (2007). Tintes naturales: guía para el reconocimiento y uso de plantas tintóreas del centro de Argentina. Editorial Sezo. República Argentina.126 pp.
- Trueba Sanchez. 2009. Plantas Tintóreas De Soledad Atzompa Veracruz, México.Tesis doctoral. Veracruz, México. 76 pp.
- Tzakou O, Mylonas P, Vagias C and Petrakis P.2007.Iridoid glucosides with insecticidal activity from *Galium melanantherum*.*Z Naturforsch*. Athens, Greece.
- Valero Muñoz, A. 2011. Principios de color y holopintura. Editorial Club Universitario. 129 pp.
- Vázquez, 2012. Flores de la Estepa Patagónica: Guía para el reconocimiento de las principales especies de plantas vasculares de estepa.Buenos Aires. Argentina. 288 pp.
- Verga A. 2010.Programa Hoja manual de uso. Versión 3.X
- Wagner, H.; Blatt, S. and Zgainski, E.M. 1984. *Plant Drugs Analysis – A Thin LayerChromatography Atlas*; Springer-Verlag, Berlin. pp 267-286.

- Weatherspark.com.2019. Disponible en: <https://es.weatherspark.com/countries/AR/05>
Cedar Lake Ventures, Inc. 2500 Shadywood Rd Ste 510 United States. Activo
marzo 2019
- World Health Organization 1992: Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials;
WHO-PHARM-92559.
- Ziegenhagen, B., Bialozyt, V.K., Schulze, I., Ulrich, A., & Wulf, M., 2003. Spatial patterns
of maternal lineages and clones of *Galium odoratum* in a large ancient woodland:
Inferences about seedling recruitment. *Journal of Ecology*. 91: 579-586.
- Zuolaga, F y Morrone, O. 1999. Catálogo de las plantas vasculares de la República
Argentina. II. Dicotiledóneas. *Botanical. Missouri Botanic Garden*. 74:1269.