



**Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias
Agropecuarias Escuela para Graduados**



DOMESTICACIÓN Y GENERACIÓN DE UNA POBLACIÓN VARIABLE DE LA
ESPECIE MEDICINAL NATIVA *Baccharis crispa* Spreng.

Ana Guadalupe Chaves

Tesis

Para optar al Grado Académico de Doctora en Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2020

DOMESTICACIÓN Y GENERACIÓN DE UNA POBLACIÓN VARIABLE DE LA
ESPECIE MEDICINAL NATIVA *Baccharis crispa* Spreng.

Ana Guadalupe Chaves

Comisión Asesora de Tesis

Directora de Tesis: Dra. Marta S. Ojeda

Codirectora de Tesis: Dra. Marta S. Contigiani

Asesora de Tesis: Dra. Lorena E. Torres

Tribunal Examinador de Tesis

Dra. Lorena E. Torres

Dra. M. Paula Zunino

Dr. Fabian Giolitti

Presentación formal académica

2020

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

A la Dra. Marta Ojeda por el acompañamiento y apoyo recibido a lo largo de todo este tiempo de formación; por confiar en mí y alentarme a seguir creciendo como profesional y fundamentalmente gracias por todo el cariño recibido.

A la Dra Marta Contigiani, por el tiempo dedicado a esta tesis y a la rigurosidad de sus correcciones. Gracias por abrirme las puertas del Instituto de Virología José M.Vanella.

A la Dra. Lorena Torres, por sus valiosos aportes al trabajo realizado y el acompañamiento desde el inicio de este proceso, desde antes del Doctorado y más allá de lo profesional.

Al Tribunal Evaluador, por el tiempo dedicado en la lectura y corrección de esta Tesis.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNC y su Escuela para Graduados, a quienes debo mi formación.

A CONICET, SeCyT y el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba por el financiamiento recibido para la realización del trabajo.

A los Sres. Luis Lencina y Agustín Garayzabal, a la Ing. Agr. Paula Suárez Santillán y su familia., por haberme permitido realizar los primeros muestreos en sus campos y recolectar el material con el que llevé adelante el trabajo. A la familia Andrada, por recibirme con tanta cordialidad y cariño en cada viaje.

A la Dra. Brenda Konigheim y la Biól. Giuliana Lingua, gracias por las horas compartidas, sin ustedes parte de esta tesis no hubiera sido posible. A la Bioq. Florencia Martínez y el Bioq. Javier Aguilar por los consejos recibidos durante la realización de los ensayos, por su predisposición y amabilidad. Me hicieron sentir una más cuando iba al Instituto.

A la Dra. Susana Núñez Montoya, por el asesoramiento para la obtención de los extractos.

A la Dra. Angélica Rueda Calderón, por los consejos recibidos que me permitieron salvar mis dudas en la parte estadística y por el cariño recibido.

Al Ing. Agr. (Mgter.) César Agüero y la Ing. Agr. (Mgter.) Susana Aráoz, por la generosidad y la cordialidad con que fui recibida en el Laboratorio de Semillas de la UNC y por brindarme el espacio para los ensayos de multiplicación.

A Araceli Véliz, Ana Lopez, la Ing. Agr. Florencia Turco, el Ing. Agr. Francisco Italiano, el Ing. Agr. Christian Rothen, la Dra. Paula Brunetti, el Dr. Ricardo Zapata, el Ing. Agr. Ola Karlin por la valiosa colaboración recibida en distintas etapas de esta Tesis.

A mi mamá, por estar incondicionalmente siempre y a la hora que sea. Sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

Finalmente quiero agradecer a Francisco, Constanza y Josefina. Con su amor, acompañamiento y comprensión pude culminar esta etapa. Coco, mi compañera de cursos y ensayos, gracias.

Para Constanza y Josefina, ustedes mueven mi mundo.

RESUMEN

Baccharis crispa Spreng. es una especie medicinal nativa con demanda de mercado, empleada por sus propiedades hepáticas. El abastecimiento para el consumo y la comercialización se basa en la actividad extractiva a partir de poblaciones silvestres. Esta situación ha llevado a que especie se encuentre amenazada, por lo que contar con fuentes cultivadas para cubrir su demanda aliviaría la presión sobre las poblaciones silvestres. Por esta razón es necesario iniciar estudios de propagación, evaluación de germoplasma y domesticación para tender a su cultivo y realizar estudios multidisciplinarios relacionados con la utilidad potencial de la especie. En relación al uso potencial, el uso para el tratamiento de patologías virales es de importancia actual. El trabajo se desarrolló bajo la hipótesis que el germoplasma silvestre de *B. crispa* cuando es cultivado y evaluado en un mismo ambiente expresa diferencias morfológicas y agronómicas entre los individuos cultivados y éstos también responden de manera distinta a como lo hacen sus congéneres en la naturaleza. Se planteó como objetivo de esta tesis evaluar la variabilidad morfológica y la variabilidad en la bioactividad de poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* Spreng. y generar las metodologías para domesticar y conformar una población variable de la especie. El trabajo consistió en la descripción del ambiente de crecimiento de cuatro poblaciones silvestres de la provincia de Córdoba, la caracterización y la evaluación de variabilidad, entre y dentro de las poblaciones, considerando caracteres morfométricos y la capacidad antiviral de extractos orgánicos y acuosos. Se estudiaron las metodologías apropiadas para la multiplicación sexual y asexual, y se evaluó el comportamiento del germoplasma silvestre cuando es cultivado en un mismo ambiente. Se comprobó la existencia de variabilidad entre y dentro de las poblaciones al evaluar caracteres morfométricos y el potencial antiviral contra HSV-I y CHIKV. El germoplasma evaluado tuvo bajo porcentaje de germinación y de prendimiento de estacas, no presentó dormición y no perdió viabilidad en el tiempo. Se comprobó la existencia de variabilidad entre los individuos cultivados en un mismo ambiente, considerando caracteres morfométricos y agronómicos; y que el germoplasma cuando es cultivado responde de manera distinta a como lo hace en las poblaciones silvestres, considerando caracteres morfométricos. Por lo expuesto hasta aquí se concluye que se comprobó la hipótesis planteada en esta tesis, se demostró la existencia de variabilidad –morfométrica y en la capacidad antiviral- entre y dentro de las poblaciones silvestres, se generaron metodologías para la domesticación y se conformó una población variable de *B. crispa*.

Palabras Claves: plantas medicinales, domesticación, carqueja, actividad antiviral, cultivo.

ABSTRACT

Baccharis crispa Spreng. is a native medicinal species with market demand, used for its hepatic properties. The supply for consumption is based on the extraction activity from wild populations. This situation has led to this specie being threatened. It is necessary to initiate studies of propagation, evaluation of germplasm and domestication to tend to its cultivation and to contemplate multidisciplinary studies related to the potential usefulness of the species. In relation to the potential use, the use for the treatment of viral pathologies is of current importance. The work was carried out under the hypothesis that the wild germplasm of *B. crispa* when is cultivated and evaluated in the same environment, it expresses morphological and agronomic differences between the cultivated individuals, and they also respond differently to what their congeners do in nature. The objective of this thesis was to evaluate the morphological variability and the variability in the bioactivity of wild populations of *Baccharis crispa* Spreng. and to generate the methodologies to domesticate and conform a variable population of the species. The work consisted in the description of the growth environment of four wild populations in the province of Córdoba, the characterization and evaluation of variability, between and within populations, considering morphometric characters and the antiviral capacity of organic and aqueous extracts. Appropriate methodologies for sexual and asexual multiplication were studied, and the behavior of wild germplasm when grown in the same environment was evaluated. Variability between and within populations was tested by evaluating morphometric characters and antiviral potential against HSV-I and CHIKV. The germplasm evaluated had low germination and stake seeding rates, did not show dormancy and did not lose viability over time. It was verified the existence of variability among individuals cultivated in the same environment, considering morphometric and agronomic characteristics; and that germplasm when cultivated responds in a different way than it does in wild populations, considering morphometric characteristics. Therefore, it is concluded that the hypothesis raised in this thesis was verified, the existence of variability between and within wild populations was demonstrated, methodologies for domestication were generated and a variable population of *B. crispa* was formed.

Key words: medicinal plants, domestication, carqueja, antiviral activity, cultivation.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Capítulo 1. Introducción general	1
-Hipótesis	5
-Objetivo General	5
-Objetivos Específicos	5
-Bibliografía	6
Capítulo 2. Caracterización <i>in situ</i> y evaluación de la variabilidad para caracteres morfométricos de poblaciones silvestres de <i>B. crispa</i> .	10
-Introducción	10
-Materiales y Métodos	13
-Material Vegetal	13
-Caracterización Edafoclimática	15
-Caracteres Morfométricos	15
-Análisis Estadístico	17
-Resultados	18
-Discusión	24
-Conclusiones	26
-Bibliografía	27
Capítulo 3. Variabilidad en la actividad antiviral y virucida de extractos orgánicos y acuoso caliente obtenidos de poblaciones silvestres de <i>B. crispa</i>	29
-Introducción	29
-Materiales y Métodos	33
-Obtención de los Extractos	33
-Material Vegetal	33

-Extractos Orgánicos	33
-Extractos Acuosos	34
-Bioactividad <i>in vitro</i> : variabilidad para actividad antiviral y actividad virucida	35
-Línea Celular	35
-Muestras para Ensayos Biológicos	35
-Evaluación de la Citotoxicidad	36
-Cepas Virales Estudiadas	37
-Determinación del Título del Stock Viral	37
-Evaluación de la Actividad Antiviral <i>in vitro</i>	37
-Evaluación de la Actividad Virucida <i>in vitro</i>	38
-Análisis Estadístico	39
-Resultados	41
-Rendimiento de los Extractos	41
-Evaluación de la Citotoxicidad	42
-Determinación del Título del Sctok Viral	47
-Variabilidad en la Bioactividad <i>in vitro</i>	47
-Variabilidad entre Poblaciones en Actividad Antiviral y Virucida	47
-Variabilidad para Actividad Antiviral y Virucida dentro de cada población entre sus extractos	49
-Discusión	51
-Conclusiones	56
-Bibliografía	57
Capítulo 4. Propagación sexual y asexual de la especie <i>Baccharis crispa</i> Spreng.	61
-Introducción	61

-Materiales y Métodos	63
-Multiplicación Sexual	63
-Material Vegetal	63
-Determinación de Semillas Llenas	64
-Desinfección del Material	64
-Ensayos de Germinación	64
-Análisis Estadístico	66
-Multiplicación Asexual	66
-Material Vegetal	66
-Respuesta a Distintos Sustratos	67
-Respuesta a la aplicación de fitohormona de estacas apicales e internodales	67
-Análisis Estadístico	68
-Resultados	69
-Multiplicación Sexual	69
-Determinación de Semillas Llenas	69
-Ensayos de Germinación	70
-Multiplicación Asexual	75
-Discusión	77
-Conclusiones	80
-Multiplicación Sexual	80
-Multiplicación Asexual	81
-Bibliografía	82
Capítulo 5. Evaluación de la respuesta de germoplasma de poblaciones silvestres en un mismo ambiente de cultivo.	84
-Introducción	84

-Materiales y Métodos	86
-Siembra a Período de Rusticación	86
-Rusticación	87
-Trasplante a Cosecha	88
-Análisis Estadístico	89
-Resultados	90
-Inicio del Período de Rusticación	90
-Rusticación	93
-Trasplante a Cosecha	96
-Discusión	102
-Conclusiones	107
-Bibliografía	108
Capítulo 6. Conclusiones Generales	111
ANEXO I	117

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2.1. Resultados del análisis químico del suelo de las cuatro poblaciones de <i>B. crispera</i> evaluadas.	18
Tabla 2.2. Resultados del análisis físico del suelo de las cuatro poblaciones de <i>B. crispera</i> evaluadas.	18
Tabla 2.3. Registros climáticos, por departamento, donde crecen las poblaciones evaluadas	19
Tabla 2.4. Medidas resumen de cinco caracteres morfométricos medidos en poblaciones silvestres de <i>B. crispera</i> .	20
Tabla 3.1. Rendimiento (% p/p) de extractos orgánicos y acuoso caliente obtenidos de cuatro poblaciones silvestres de <i>Baccharis crispera</i> Spreng. de la provincia de Córdoba.	41
Tabla 3.2. Efectos citopáticos producidos por los extractos sobre monocapas de células Vero, observadas a las 24 y 48 h post-inoculación.	42
Tabla 3.3. Valores promedio de concentración citotóxica 50 (CC ₅₀) y de concentración citotóxica 10 (CC ₁₀) y variabilidad dentro y entre poblaciones para cada extracto sobre células Vero. Citotoxicidad obtenida por el método colorimétrico captación de RN.	46
Tabla 3.4. Variabilidad para actividad antiviral y virucida de extractos orgánicos y acuosos caliente, obtenidos de material vegetal recolectado de poblaciones silvestres de <i>Baccharis crispera</i> de la provincia de Córdoba, frente a HSV-I y CHIKV	48
Tabla 4.1. Porcentaje de plántulas normales (% PN) de <i>B. crispera</i> , obtenidas con semillas almacenadas por 6, 12 y 18 meses, en respuesta a diferentes tratamientos germinativos.	72
Tabla 4.2. Valores promedio de variables relativas al desarrollo de plántulas de <i>B. crispera</i> obtenidas en respuesta a cuatro tratamientos pre-germinativos.	74

Tabla 4.3. Resultados de un ensayo conducido para evaluar el prendimiento de estacas de distinta longitud de <i>B. crispa</i> en distintos sustratos.	75
Tabla 4.4. Resultados del ensayo conducido para evaluar el efecto de la aplicación de fitohormonas sobre el prendimiento de estacas apicales e internodales, de distinta longitud.	76
Tabla 5.1 -Medidas resumen de cuatro caracteres medidos en una nueva población de <i>B. crispa</i> generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres.	90
Tabla 5.2 -Medidas resumen de cuatro caracteres medidos en una nueva población de <i>B. crispa</i> generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres durante su rusticación.	93
Tabla 5.3. Medidas resumen de caracteres cuantitativos utilizados para la evaluación de germoplasma silvestre de <i>B. crispa</i> en un mismo ambiente.	99

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1. Ubicación de las poblaciones silvestres de <i>B. crisper</i> en la provincia de Córdoba, Argentina. A. -Ejemplar silvestre de <i>B. crisper</i> . 1: Altura; B. Detalle de la ramificación más alta del ejemplar A.- 2: longitud de 1 entrenudo; 3.a, 3.b y 3.c: ancho de ala a los 10 cm.	14
Figura 2.2. Sitios de muestreo de poblaciones silvestres de <i>B. crisper</i> . A-Villa del Parque; B-Puesto Pedernera; C-Tala Cañada y D-San Gerónimo.	14
Figura 2.3. A. -Ejemplar silvestre de <i>B. crisper</i> . 1: Altura; B. Detalle de la ramificación más alta del ejemplar A.- 2: longitud de 1 entrenudo; 3.a, 3.b y 3.c: ancho de ala a los 10 cm.	16
Figura 2.4. A-Inflorescencia femenina de <i>B. crisper</i> silvestre, 1-Longitud de inflorescencia femenina. B-Aquenio maduro de <i>B. crisper</i> .	17
Figura 2.5. Representación de la variabilidad, usando variables morfológicas, entre poblaciones silvestres de <i>B. crisper</i> , empleando ACP.	22
Figura 3.1. Esquema de un extractor Soxhlet.	34
Figura 3.2. Efectos citopáticos observados sobre células Vero. Figura A: Desprendimiento de la monocapa celular producido por los extractos EEtOH. Figura B: Retracción de las membranas celulares generado por los extractosECHCl ₃ . Figura C: Redondeamiento celular observado para los extractos EAc. Figura D: corresponde al control celular (CCe) (40 X).	42
Figura 3.3. Curvas de viabilidad celular obtenidas al evaluar el efecto de extractos orgánicos (clorofórmico y etanólico) y acuoso caliente, sobre células Vero, de cuatro poblaciones silvestres de <i>Baccharis crisper</i> Spreng. de la provincia de Córdoba, Argentina	44

Figura 3.3. (Continuación) Curvas de viabilidad celular obtenidas al evaluar el efecto de extractos orgánicos (clorofórmico y etanólico) y acuoso caliente, sobre células VERO, de cuatro poblaciones silvestres de <i>Baccharis crisper</i> Spreng. de la provincia de Córdoba, Argentina	45
Figura. 4.1. A. Aquenios maduros en inflorescencia femenina. B. Aquenios de <i>Baccharis crisper</i> Spreng. C y D. Plántulas normales de <i>B. crisper</i> .	63
Figura. 4.2. A y B. Estacas de <i>B. crisper</i> en bandejas al inicio del ensayo.	67
Figura. 4.3. A. Aquenio de <i>B. crisper</i> sin resto floral, B. Aquenio de <i>B. crisper</i> con resto floral (estilo-estigma).	69
Figura. 4.4. Proporción de semillas llenas sin restos de inflorescencia vs. semillas llenas con restos de inflorescencia.	70
Figura. 4.5. Respuesta germinativa (expresada como proporción de plántulas normales) de <i>B. crisper</i> frente a 6 tratamientos, empleando semillas recién recolectadas	71
Figura. 4.6. Proporción de plántulas normales, obtenidas al realizar ensayos de germinación con semillas almacenadas por distinto tiempo, obtenidas con el tratamiento testigo. (Testigo t0: 0 mes de almacenamiento; Testigo t1: 6 meses de almacenamiento, Testigo t2: 12 meses de almacenamiento y Testigo t3: 18 meses de almacenamiento).	73
Figura 5.1. Planta de <i>B. crisper</i> al momento del trasplante a bolsín de 0.3 L, a los cinco meses desde la siembra	86
Figura 5.2. Planta de <i>B. crisper</i> al momento del trasplante a bolsín de 2 L, a los 9 meses desde la siembra	87
Figura 5.3. Altura de planta (cm) de los individuos de la población de <i>B. crisper</i> , generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.	91

Figura 5.4. Ancho de ala (cm) de los individuos de la población de <i>B. crispera</i> , generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.	91
Figura 5.5. Número de ramificaciones de los individuos de la población de <i>B. crispera</i> , generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.	92
Figura 5.6. Número de estacas apicales obtenidas de los individuos de la población de <i>B. crispera</i> , generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.	92
Figura 5.7. Crecimiento en altura (cm) de los individuos de la población de <i>B. crispera</i> , generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres, al cabo de un mes en rusticación. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.	94
Figura 5.8. Crecimiento en altura (cm) de los individuos de la población de <i>B. crispera</i> , generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres, al cabo de seis meses en rusticación. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.	98
Figura 5.9. Número de ramificaciones de los individuos de la población de <i>B. crispera</i> , generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres, al cabo seis meses en rusticación. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.	95
Figura 5.10. Altura al trasplante de los individuos de la población de <i>B. crispera</i> , generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.	95
Figura 5.11. Plantas de <i>B. crispera</i> durante su rusticación, correspondientes a julio de 2018.	96

Figura 5.12. Parcela de <i>B. crispera</i> al momento de la cosecha, mayo de 2019.	97
Figura 5.13. Caracteres cualitativos diferenciales observados en plantas de <i>B. crispera</i> , provenientes de germoplasma silvestre, evaluadas en un mismo ambiente: A. borde de ala ondulado y B. borde de ala liso; C. planta con varios tallos desde la base y D. planta con un solo tallo principal; E. nervadura del tallo violáceo y F. nervadura del tallo verde pálido.	98
Figura 5.14. Rebrote de <i>B. crispera</i> generados desde rizomas.	99
Figura 5.15. Variabilidad entre individuos de <i>B. crispera</i> , según los dos primeros ejes de un Análisis de Componentes Principales, evaluados a través de caracteres cuantitativos discriminatorios.	101
Figura 5.16. A. Ejemplar silvestre, pie masculino, de <i>B. crispera</i> de la población San Gerónimo (marzo 2013). B. Ejemplar de <i>B. crispera</i> en parcela experimental (marzo 2018).	104

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AC	antes de Cristo
ACOR	acrónimo del Herbario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias - Universidad Nacional de Córdoba
ACP	análisis de componentes principales
ACV	Aciclovir
ADN	ácido desoxirribonucleico
AG ₃	ácido giberélico
ANA	ácido naftalén acético
ANAVA	análisis de la varianza
ARN	ácido ribonuceico
ATB	antibiótico
C	carbono
CC ₁₀	máxima concentración no citotóxica
cc ³	centímetros cúbicos
CC ₅₀	concentración citotóxica media
CCe	control celular
CE	conductividad eléctrica
cél	célula/s
Cext	control de extractos
CHCL ₃	cloroformo
CHIKV	virus chikungunya
cm	centímetro

CO ₂	dióxido de carbono
CP1	componente principal 1
CP2	componente principal 2
CV	coeficiente de variación
CVir	control viral
DE	desvío estándar
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
dS	decisiemens
EAc	extracto acuoso caliente
ECHCL ₃	extracto clorofórmico
ECP	efecto citopático
EEtOH	extracto etanólico
EqHSV	herpes virus equino
EtOH	etanol
FCA	Facultad de Ciencias Agropecuarias
FCM	Facultad de Ciencias Médicas
Fig.	figura
g	gramo/s
h	hora/s
HSV-I	virus herpes simple tipo I
HSV-II	virus herpes simple tipo II
I	inhibición

IBA	ácido indolbutírico
InViV	Instituto de Virología Dr. José María Vanella
L	litro/s
LABSA	Laboratorio de Suelos y Aguas
LASIDYS	Laboratorio de Análisis de Semillas, Investigación, Docencia y Servicio
m	metro/s
máx	máximo
MC	medio de crecimiento
MCNC	máxima concentración no citotóxica
MEM	medio esencial mínimo
mg	miligramo/s
min	minuto/s
Mín	Mínimo
mL	mililitro/s
mm	milímetro
MM	medio de mantenimiento
MO	materia orgánica
ms.nm	metros sobre el nivel del mar
N°	número
nm	nanómetro
NO ₃ K	nitrate de potasio
O	Oeste
OMS	Organización Mundial de la Salud

OPS	Organización Panamericana de la Salud
p/p	peso/peso
PBS	solución salina de fosfatos
PM	planta medicinal
PN	plántula normal
PP	población de Puesto Pedernera
ppm	partes por millón
PPMA	precipitación media anual
RCP-RT	transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa
RN	rojo neutro
S	sur
SFB	suero fetal bovino
SG	población de San Gerónimo
TC	población de Tala Cañada
UFP	unidad formadora de placas
UNC	Universidad Nacional de Córdoba
v/v	volumen/volumen
VC	viabilidad celular
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VP	población de Villa de Parque
vs.	versus
VSV	virus de la estomatitis vesicular
µg	microgramo

< menor

°C grados centígrados

INTRODUCCIÓN GENERAL

El consumo de plantas silvestres como medicina forma parte del conocimiento tradicional de distintas poblaciones humanas (Alonso y Desmarchelier, 2006, Juri *et al.*, 2012, Trajano Nunes y Albuquerque, 2018). El primer escrito sobre el uso de plantas medicinales tiene unos 4.000 años de antigüedad y corresponde a pequeñas tablas de arcilla realizadas por los sumerios (Rivero, 2019). Otros registros o evidencias del uso de estas plantas provienen del Código de Hammurabi, consistente en una serie de tabletas grabadas en 1.770 A.C. En ellas se menciona, entre muchas especies vegetales, a la menta (Guthrie, 1947).

Una planta medicinal puede ser definida como el vegetal que contiene principios activos de valor terapéutico y que, por esta razón, es susceptible de ser empleada con fines medicinales (Ratera y Ratera, 1980). La acción benéfica de estas plantas sobre un organismo enfermo se debe precisamente a que contienen metabolitos secundarios bioactivos, tales como terpenoides, esteroides, alcaloides, péptidos y proteínas, ácidos orgánicos, glucósidos, saponinas, mucílagos, resinas, taninos y aceites esenciales que son de gran importancia terapéutica (Dewick, 2002; Evans, 2009).

En la República Argentina, conjuntamente con la medicina convencional, coexiste un sistema de salud tradicional de amplia difusión basado en el uso de plantas medicinales (Martínez *et al.*, 2006, Arias Toledo, 2009). El abastecimiento para el consumo y la comercialización de especies medicinales se basa en la actividad extractiva a partir de poblaciones silvestres; mientras que el aprovisionamiento a través del cultivo representa una fracción menor del mismo. La recolección de las plantas medicinales a partir de su ambiente natural plantea problemas desde dos puntos de vista. En primer lugar, constituye un obstáculo para la estandarización de las drogas ya que las fuentes de variabilidad para

una misma especie medicinal son diversas y, pese a su importancia, en la mayor parte de los casos no se toman en cuenta a los fines terapéuticos a nivel de mercado. En segundo lugar, representa una marcada presión sobre los ecosistemas naturales, con aumento de la amenaza que pende sobre especies nativas cuyo equilibrio poblacional es cada vez más frágil. Llegando a generar casos de completa eliminación de poblaciones (Petenatti *et al.*, 2007; WHO, 2010).

En la provincia de Córdoba las familias más representativas de la flora medicinal son *Asteraceae*, *Lamiaceae*, y *Fabaceae* (Arias Toledo, 2009; Barboza *et al.*, 2006; Goleniowski *et al.*, 2006; Barboza *et al.*; 2009; Luján y Martínez, 2019). *Asteraceae* es la familia de plantas más numerosa de Argentina, con 227 géneros y alrededor de 1.400 especies nativas y adventicias (Katinas *et al.* 2007); posee además el mayor número de taxones nativos utilizados en medicina popular (más de 270 especies).

Entre las plantas de la familia *Asteraceae* oficiales de nuestro país, cuya monografía consta en la Farmacopea, se cuentan dos especies correspondientes al género *Baccharis*: *Baccharis crispa* Spreng. y *Baccharis articulata* L., ambas conocidas vulgarmente como carqueja (Del Vitto *et al.*, 2002).

Los estudios de especies del género *Baccharis* de uso medicinal tradicional en Latinoamérica señalan que presentan principalmente flavonoides, flavonas, diterpenos labdanos y clerodanos; metabolitos que les confiere actividad anti-inflamatoria, antioxidante, antifúngica, antileucémica, antiviral, espasmolítica y gastroprotectora (Martínez *et al.* 2011).

Particularmente las especies conocidas vulgarmente como “carqueja” o “carquejilla”, tienen aplicación en la forma de preparaciones fitoterápicas, medicamentos magistrales e incluso como especialidades farmacéuticas. Entre sus propiedades terapéuticas se mencionan como hepáticas, colagogo-coleréticas y diuréticas, en uso interno, mientras que externamente son aplicadas como antisépticas y vulnerarias (Pettenatti *et al.* 2007)

Baccharis crispa Spreng., “carqueja”, es un subarbusto rizomatoso, dioico, de 15 a 45 cm de altura, que posee ramas provistas de tres alas (de 2 a 6 mm de ancho) y hojas escamiformes, prontamente caducas. Las inflorescencias masculinas (capítulos estaminados) miden de 4,5 a 7,5 mm de longitud, mientras que las inflorescencias femeninas (capítulos pistilados) miden de 4 a 7 mm de longitud y poseen aquenios glabros 10 costados. (Ariza Espinar, 1973, 2005; Barboza *et al.*, 2006, Müller, 2006). Es una especie diploide, cuyo número cromosómico somático es de 18 (Vaio *et al.*, 2007). La distribución geográfica de esta especie abarca llanuras y sierras de Córdoba, San Luis, Catamarca, La Pampa, La Rioja, Río Negro, Chubut, San Juan, Mendoza, Buenos Aires, Santa Fe, Tucumán y Salta, Uruguay, Brasil, Paraguay, Bolivia y Perú (Ariza Espinar, 1973; Giuliano y Ariza Espinar, 1999; Giuliano, 2000; Ariza Espinar, 2005; Müller, 2006). Popularmente es utilizada como antiséptica, antirreumática, colagoga, diurética, hepática (Del Vitto *et al.*, 1997; Abad y Bermejo, 2007), para tratar trastornos de impotencia o fertilidad (Hieronymus, 1882, Sorarú y Bandoni, 1978) y como antioxidante (Roig, 2001). Posee actividad antibacteriana, antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana y antiviral (Palacios *et al.* 1983, Rodríguez *et al.*, 2007, Barboza *et al.*, 2009, Florão *et al.* 2012). Se encuentra inscripta como droga oficial en la Farmacopea Argentina, por sus propiedades digestivas, desde el año 1966. El uso de esta especie como digestiva, protectora hepática y antirreumática podría deberse al alto contenido (>1%) de ácidos cafeilquínicos, principalmente ácidos isoclorogénicos, que posee (Palacios *et al.*, 1999).

De las especies medicinales nativas con demanda de mercado, *B. crispa* es una planta de interés económico y social en la Argentina. El mercado se abastece de material recolectado de poblaciones silvestres de la especie; por lo que éstas presentan una alta tasa de extracción (Martínez, 2005; Martínez *et al.*, 2006; Arias Toledo, 2009; Barboza *et al.*, 2009; Hurrell and Puentes., 2013; Paván *et al.* 2017; Cantero *et al.*, 2019; Luján y Martínez, 2019). Es así que esta especie medicinal se encuentra amenazada y contar con fuentes cultivadas para cubrir su demanda aliviaría la presión sobre las poblaciones silvestres (Barboza *et al.*, 2009). Por esta razón, es necesario iniciar estudios de propagación, evaluación de germoplasma y domesticación de la especie para tender a su cultivo.

Existen tres categorías de especies silvestres, desde el punto de vista de su utilización actual y potencial: parientes de especies domesticadas, especies que se usan pero no están domesticadas y especies que pueden convertirse en domesticadas en alguna etapa futura (Frankel, 1977). De acuerdo con esta clasificación, *B. crispa* es una especie silvestre de uso medicinal tradicional, pero que aún no está domesticada.

Para lograr la domesticación de la carqueja, además de conocer la metodología más apropiada para su multiplicación, es importante evaluar germoplasma describiendo el lugar de origen, evaluar características morfológicas y extender la evaluación a estudios multidisciplinarios. Estos estudios deben tener la motivación común de estar relacionados con la utilización actual y potencial (Frankel, 1977). En relación al uso potencial de las especies medicinales, los tratamientos de patologías virales son de importancia actual. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) advierten que las enfermedades virales representan un gran reto para la Salud Pública (PAHO, 2013), ya que afectan a un gran número de individuos en cortos períodos de tiempo y son una de las principales causas de muerte en el mundo (Vahidnia *et al.*, 2017; Simoni *et al.*, 2018). Mundialmente se ha comenzado a buscar en las hierbas medicinales el tratamiento de las enfermedades virales, ya que son relativamente más accesibles, económicas y tienen menos posibilidades de toxicidad y resistencia (Akram *et al.*, 2018). Por estas razones el estudio del potencial antiviral de *B. crispa* es de importancia en el contexto actual.

Cuando se dispone de germoplasma silvestre y se desea lograr su domesticación, es necesario realizar la evaluación de dicho germoplasma en los ambientes naturales de crecimiento y en el ambiente donde se lleva a cabo la introducción a cultivo (Ojeda, 2004). Es importante esta evaluación, ya que no es posible cultivar sin que automáticamente se realicen cambios en la expresión de la información hereditaria del material que se cultiva. Las plantas de una especie silvestre puestas en cultivo responderán de manera distinta a como lo hacen en su ambiente natural de crecimiento (Cubero Salmerón, 2014).

HIPÓTESIS

Cuando germoplasma silvestre de *B. crisper* es cultivado y evaluado en un mismo ambiente se expresan diferencias morfológicas y agronómicas entre los individuos cultivados y éstos también responden de manera distinta a como lo hacen sus congéneres en la naturaleza.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la variabilidad morfológica y la variabilidad en la bioactividad de poblaciones silvestres de *Baccharis crisper* Spreng. y generar las metodologías para domesticar y conformar una población variable de la especie.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la existencia de variabilidad morfológica en poblaciones silvestres de *B. crisper*.
2. Evaluar la variabilidad en la bioactividad, actividad antiviral y virucida, de extractos orgánicos y acuoso caliente obtenidos de poblaciones silvestres de *B. crisper*
3. Realizar estudios de propagación sexual y agámica
4. Evaluar la respuesta de germoplasma proveniente de poblaciones silvestres en un mismo ambiente

BIBLIOGRAFÍA

- Abad M. J. y Bermejo P. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. ARKIVOC 2007 (vii) 76-96.
- Akram M., Mahmood Tahir I., Ali Shah S.M., Mahmood Z., Altaf A., Ahmad K., Munir N., Daniyal M., Nasir S. and Mehboob H. 2018. Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis and coxsackievirus: A systematic review. *Phytotherapy research* 32: 811-822.
- Alonso J. y Desmarchelier C. 2006. Plantas medicinales. Bases Científicas para su aplicación primaria de la salud. Corpus, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 748 pp.
- Arias Toledo B. 2009. Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8 (5): 389 – 401.
- Ariza Espinar L. 1973. Las especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central. *Boln. Acad. Nac. Ci. Córdoba* 50: 175-305.
- Ariza Espinar L. 2005. Pródromo de la flora fanerogámica de Argentina central. Familia *Asteraceae* Tribu *Asterae*. Museo Botánico. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 139 pp.
- Barboza G.E., Cantero J.J., Nuñez C.O. y Ariza Espinar L. 2006. Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina). Pteridofitas y Antofitas silvestres o naturalizadas. Gráficamente, Córdoba, Argentina, 1264 pp.
- Barboza G.E., Cantero J.J., Nuñez C., Pacciaroni A, Espinar L.A. 2009. Medicinal plants: a general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native argentine Flora. *Kurtziana* 34(1–2):7–365
- Cantero J.J., Nuñez C.O., Bernardello G., Amuchástegui A., Mulko J., Brandolín P., Palchetti M.V., Iparaguirre J., Virginil N. y Ariza Espinar L. 2019. Las plantas de interés económico de Argentina. UniRío. Río Cuarto, Argentina, 936 pp (e-book Isbn: 978-987-688-332-0)
- Cubero Salmerón J.I. 2014. Introducción a la mejora genética vegetal. 3ra Ed. Mundiprensa. Madrid, España 602 pp.
- Del Vitto L.A., Petenatti E.M. y Petenatti M.E. 1997. Recursos Herbolarios de San Luis (República Argentina) Primera Parte: Plantas Nativas. *Multequina* 6: 49-66.
- Del Vitto L.A., Petenatti E.M. y Petenatti M.E. 2002. Introducción a la Herboristería. Ser. Técn. Herbario UNSL. pp.10-61.
- Dewick P.M. 2002. Medicinal natural products, a biosynthetic approach. Wiley, New York, 507 pp.
- Evans W.C. 2009. Trease and Evans' Pharmacognosy. Saunders. London, 616 pp.
- Florão A., Budel J.M., Rocio Duarte M., Marcondes A., Ferreira Rodrigues R.A., Villa Nova Rodrigues M., Aimbiré de Moraes Santos C., Weffort-Santos A.M. 2012.

- Essential oils from *Baccharis* species (*Asteraceae*) have anti-inflammatory effects for human cells. *Journal of Essential Oil Research*, 24:6, 561-570.
- Frankel O.H. 1977. Natural variation and its conservación. En: Muhammed A., Aksel R., con Borstel R.C. (EDS). Genetic diversity un planta. Basic Life sciences. Springer, Boston PP 21-44.
- Giuliano D.A. y Ariza Espinar L. 1999. *Asteraceae*, Tribu Astereae, Subtribu Baccharinae. Catálogo de las plantas vasculares de la Argentina. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 74: 125-127.
- Giuliano D.A. 2000. *Asteraceae*, Tribu III. Astereae parte A, Subtribu c. Baccharinae. Flora fanerogámica argentina. Proflora/CONICET 66: 3-73.
- Goleniowski M.E, Bongiovanni G.A., Palacio L., Nuñez C.O. y Cantero J.J. 2006. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 107:324-341.
- Guthrie D. 1947. Historia de la Medicina. Salvat, Barcelona, España 558 pp.
- Hieronymus, J. 1882. Plantae diaphoricae, Florae argentinae. *Bol. Acad. Nac. Ci.* 4: 159-160.
- Hurrell J.A. and Puentes J.P. 2013. Medicinal and aromatic species of *Asteraceae* commercialized in the conurbation Buenos Aires-La Plata (Argentina). *Ethnobot. Conserv.* 2 (7): 1-40.
- Juri M.D., Montero Hagen L.N., Gimelfarb L.S., Ormeño M., Prósperi A. y Chiarini F. 2012. Usos de plantas medicinales y aromáticas silvestres. Chilecito-Famatina. UNDeC. La Rioja, Argentina. 54 pp.
- Katinas L., Gutiérrez D.C., Grossi, M.A. y Crisci, J.V. 2007. Panorama de la familia *Asteraceae* (= Compositae) en la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 42 (1-2): 113- 129.
- Luján M.C. y Martínez G.J. 2019. Etnobotánica médica urbana y periurbana de la ciudad de Córdoba (Argentina). *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 18 (2): 155 – 196.
- Martínez G.J. 2005. Recolección y Comercialización de Plantas Medicinales en el Departamento Santa María, Provincia de Córdoba, Argentina. *Acta Farm. Bonaerense* 24 (4): 575-84.
- Martínez G.J., Planchuelo A.M., Fuentes E. y Ojeda M. 2006. A numeric index to establish conservation priorities for medicinal plants in the Paravachasca Valley, Córdoba, Argentina. *Biodiversity and Conservation* 15:2458-2475.
- Martínez S., Mollinedo P., Mamani O., Almanza G y Terrazas E. 2011. Estudio *in vitro* de la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre *Candida albicans*. *Revista Boliviana de Química* 28 (1): 35-40
- Müller J. 2006. Systematic of *Baccharis* (Compositae-Asterae) in Bolivia, including an overview of the genus. *Systematic Botany Monographs*. Vol. 76: 1-341.
- Ojeda M.S. 2004. Caracterización de poblaciones y avances en la domesticación de peperina *Minthostachys mollis* (Kunt). Griseb. Tesis Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 134 pp.

- PAHO. 2013. Enfermedades virales. Publicado en internet. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7927:2013-enfermedades-virales&Itemid=39407&lang=en Activo julio 2020.
- Palacios P., Gutkind G., Rondina R.V.D., De Torres R. y Coussio J.D. 1983. Actividad Antimicrobiana de *Baccharis crisper* Sprengel («Carqueja», F. A.) y *Baccharis notoserigila* Gris. Acta Fami. Bonaerense 2 (1): 5-10.
- Palacios P.S., Wilson E.G. y Debenedetti S.L. 1999. Análisis por HPLC de ácidos cafeoilquínicos presentes en tres especies de *Baccharis*. Dominguezia 15(1): 39-46.
- Paván M.F., Furlan V., Caminos S. y Ojeda M.S. 2017. Las personas y las plantas medicinales en el noroeste de Córdoba, Argentina. Reconocimiento y valoración de los recursos naturales locales. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 16 (1): 78 – 87.
- Petenatti E.M., Petenatti M.E., Cifuentes D.A., Gianello J.C., Giordano O.S., Tonn C.E. y Del Vitto L.A. 2007. Medicamentos herbarios en el centro-oeste argentino. Caracterización y control de calidad de especies de «carquejas»: *Baccharis sagittalis* y *Baccharis triangularis* (Asteraceae). Lat. Am. J. Pharm. 26 (2): 200-207.
- Ratera E.L. y Ratera M.O. 1980. Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, 61-62 pp.
- Rivero A.M. 2019. Uso de plantas medicinales en la población de Berisso, su aplicación en los niños: conocimientos, prácticas y valores de la comunidad. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina, 155 pp.
- Rodríguez M.V., Martínez M.L., Ferrari S., Campagna M.N., Bandoni A., Gattuso S.J. y Gattuso M.A. 2007. Estudio morfoanatómico sobre poblaciones de *Baccharis microcephala* y su actividad antioxidante. Comparación con otras especies de *Baccharis*. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas Vol. 6 (5): 215-216.
- Roig F.A. 2001. Flora medicinal mendocina. Las plantas medicinales y aromáticas de la provincia de Mendoza (Argentina). Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina 303 pp.
- Simoni I.C., Aguiar B., Martineli de Araujo Navarro A., Martins Parreira R., Bittencourt Fernandes M.J., Frankland Sawaya A.C.H. and FÁvero O.A. 2018. *In vitro* antiviral activity of propolis and *Baccharis* sp. extracts on animal herpesviruses. Arq. Inst. Biol. 85:1-7.
- Sorarú S.B. y Bandoni A.L. 1978. Plantas de la medicina popular Argentina. Albatros, Buenos Aires, Argentina 153 pp.
- Trajano Nunes A. and Albuquerque U.P. 2018. South American biodiversity and its potential in medicinal and aromatic plants. En: Medicinal and aromatic plants of the world. Albuquerque, U.P., Umesh P. and Máthé A. (Ed.). Springer. (eBook) <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1552-0> pp.3-15.

- Vahidnia F., Stramer S., Kessler D., Shaz B., Leparc G. and Krysztof D. 2017. Recent viral infection in US blood donors and health-related quality of the life (HRQOL) Quality of life research 26 (2): 349-357.
- Vaio M., Mazzella C., Rodríguez M., López-Carro B., Porro V., Bonifacino M., Speranza P. y Folle G. 2007. Estudios citogenéticos y de contenido de ADN en especies de plantas medicinales: carquejas y marcelas. XII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Montevideo, Uruguay. Actas de Fisiología 11: 47.
- WHO. 2010. Cambio climático y salud humana. Diversidad Biológica. Publicado en internet, disponible en <https://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/es/> Activo julio de 2020.

CARACTERIZACIÓN *IN SITU* Y EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD PARA CARACTERES MORFOMÉTRICOS DE POBLACIONES SILVESTRES DE *B. crispa*.

INTRODUCCIÓN

La conservación y el uso sostenible de los recursos fitogenéticos son fundamentales para satisfacer las necesidades alimentarias y de salud que presenta la creciente población mundial. Es así, que los programas de mejoramiento fitogenético públicos y privados tienen entre otros objetivos, la generación de materiales superiores a los existentes en productividad y calidad, adaptados a las diferentes condiciones ambientales regionales del país. Dichos materiales necesitan ser caracterizados y evaluados para ser utilizados en los programas de mejoramiento. La caracterización y evaluación de germoplasma comprende aspectos, morfométricos, agronómicos, bioquímicos, moleculares, de tolerancia al estrés biótico y abiótico; y varían según la especie y la finalidad de los estudios (PAEM, 2013).

En nuestro país se manifiesta un creciente grado de concientización de la sociedad acerca de la necesidad de la conservación y el uso sustentable de los recursos fitogenéticos. Argentina posee germoplasma nativo de especies de importancia regional y mundial. Existen numerosas especies nativas que constituyen una importante fuente de productos vegetales, las que son utilizadas tradicionalmente con aplicaciones específicas tales como las plantas medicinales. Estos recursos presentan potencial económico y son objeto de una constante extracción de material vegetal a partir de poblaciones naturales para su uso (Clausen *et al.*, 2008).

En Córdoba se encuentra muy difundida la comercialización de especies aromáticas y medicinales, siendo las serranías del centro y noroeste la zona donde adquiere mayor relevancia la explotación de estos recursos vegetales (Ojeda, 2004).

A nivel gubernamental y de legislación, en nuestro país y en Córdoba se han iniciado acciones tendientes a la preservación y manejo de especies vegetales medicinales y aromáticas nativas. Se está procurando la puesta en cultivo en zonas áridas y semiáridas del país. Para esto se plantea la necesidad de lograr cantidad, calidad y continuidad en la producción; siendo entonces muy importante la caracterización, manejo y mejoramiento de las especies nativas (Ojeda, 2004). En este sentido se puede citar como referencia a la Ley Provincial 10.280 (2015), que declara de interés provincial a las actividades de cultivo, cosecha, producción, industrialización y comercialización de hierbas aromáticas y medicinales en los Departamentos San Javier, San Alberto, Pocho, Minas y Cruz del Eje de la provincia de Córdoba, Argentina.

Como sucede con todos los organismos vivos que se desarrollan en condiciones naturales, las poblaciones de individuos que conforman una especie vegetal están bajo una continua interacción dinámica de adaptación con los factores particulares en los que se desarrollan dichas poblaciones (Hidalgo, 2003). Los estudios de diversidad (entendida como la variabilidad entre y dentro de poblaciones de una especie) pueden ser llevados a cabo utilizando caracteres morfométricos y bioquímicos de tipo cualitativos y cuantitativos, con mayor o menor influencia del ambiente en su expresión fenotípica. Los estudios de variabilidad dentro y entre poblaciones silvestres de especies nativas, constituyen la base para la domesticación de la especie (Mast, 1975; Ojeda, 2004).

La variabilidad contenida en el genoma de una especie puede ser agrupada en dos grandes clases: (1) la que se expresa en características visibles y que conforman el fenotipo, y (2) la que no se expresa en características visibles y que en general se refiere a los procesos o productos internos de la planta. En relación con el fenotipo, los caracteres que lo conforman corresponden en su gran mayoría a la descripción morfológica de la planta y su arquitectura. Pueden ser de tipo cualitativo o cuantitativo, e incluyen algunos de los

caracteres botánicos-taxonómicos más otros que no necesariamente identifican la especie, pero que son importantes desde el punto de vista de necesidades agronómicas, de mejoramiento genético, de mercado y de consumo. La variabilidad que se expresa en caracteres visibles se denomina fenotípica y dentro de ella se encuentran las características botánicas-taxonómicas, las morfo agronómicas y las evaluativas como respuesta a factores bióticos y abióticos. La variabilidad que no se expresa en características requiere para su identificación el uso de técnicas especiales de laboratorio que en la actualidad se refieren principalmente a marcadores moleculares (Hidalgo, 2003).

La utilización de estadísticos simples permite estimar y describir el comportamiento de diferentes grupos de individuos en relación con cada carácter que se evalúa. Los más comunes son el promedio, la media aritmética, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV), que se utilizan en el análisis de datos cuantitativos. Estos se deben realizar antes de cualquier análisis multivariado, ya que proporcionan una idea general de la variabilidad del germoplasma.

Considerando que el estudio de la variabilidad de una especie a nivel de sus poblaciones permite conocer ciertas características de importancia para introducirlas eficazmente a cultivo y asegurar un manejo sustentable, se planteó el objetivo de “Caracterizar *in situ* y evaluar variabilidad morfológica en poblaciones silvestres de *B. crispa*”.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal:

Se trabajó con poblaciones silvestres de carqueja proveniente de la zona de distribución natural de la especie en la provincia de Córdoba. En cada población se evaluaron 40 plantas, 20 pies masculinos y 20 pies femeninos. Las plantas se seleccionaron al azar en la población considerando una distancia mínima de 1 m entre plantas, ya que la especie además de reproducirse sexualmente también lo hace por rizomas (Chaves, 2012).

Recurriendo a información de herbarios, material bibliográfico específico, informantes claves y a la experiencia de trabajos previos con la especie, se localizaron poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* Spreng en la provincia de Córdoba. De ellas, para el presente trabajo de tesis se seleccionaron cuatro: Villa del Parque (31°49'14,7''S, 64°30'17,8''O, 827 ms.n.m), Puesto Pedernera (31°36'21,2''S, 64°41'14,5''O, 1515 ms.n.m), Tala Cañada (31°21'57,4''S, 64°57'11,5''O, 1342 ms.n.m) y San Gerónimo (31°20'02,3''S, 64°55'50,7''O, 1486 ms.n.m). Las poblaciones identificadas como San Gerónimo y Tala Cañada se encuentran en el Departamento Pocho, a una distancia de la Ciudad de Córdoba de 118 km y 131 km, respectivamente. La población identificada como Puesto Pedernera se encuentra en el Departamento Punilla a 71 km de la Ciudad de Córdoba; mientras que la población de Villa del Parque se localiza en el Departamento Santa María y dista 65 km de la Ciudad de Córdoba. En la Fig. 2.1 se representa la localización de las poblaciones en la provincia de Córdoba, en tanto que la Fig.2.2 ilustra cada uno de los sitios de evaluación.



Figura 2.1. Ubicación de las poblaciones silvestres de *B. crispa* en la provincia de Córdoba, Argentina

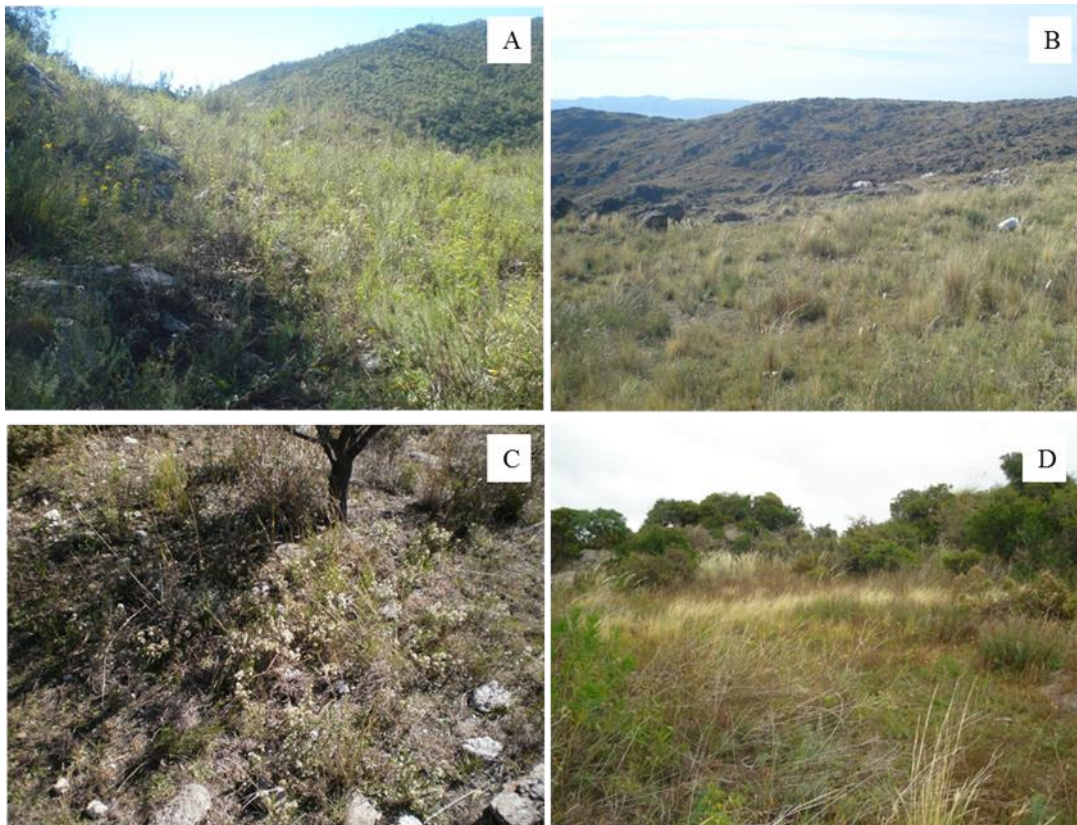


Figura 2.2. Sitios de muestreo de poblaciones silvestres de *B. crispa*. A-Villa del Parque; B-Puesto Pedernera; C-Tala Cañada y D-San Gerónimo.

Caracterización edafoclimática:

En cada población se recolectó una muestra compuesta de suelo, de la profundidad de crecimiento de las raíces. El análisis físico-químico fue acorde a lo realizado por Chaves (2012). Se usaron los registros, tomados del Servicio Meteorológico Nacional (SMN) (<https://www.smn.gob.ar/>), de temperatura máxima y mínima media del mes enero y del mes de julio, además de la precipitación media anual (mm). La información provista por el SMN corresponde a un promedio calculado en el período 1981 – 2010. Se recurrió a esta información por la imposibilidad de contar con datos provenientes de estaciones meteorológicas en cada una de las poblaciones.

Caracteres morfométricos:

Los caracteres morfométricos evaluados fueron altura de planta (cm), ancho de ala (cm), longitud de entrenudo (cm), longitud de inflorescencia femenina (cm) y número de aquenios por capítulo (Chaves *et al.*, 2010). Para realizar las mediciones, al trabajo de Chaves *et al.* (2010) se le realizaron modificaciones para luego poder repetirlas en el ensayo bajo un mismo ambiente. La manera de realizar cada medición fue la siguiente:

-En ambos sexos se midió (Fig. 2.3):

Altura de planta (cm): medida desde la base de la planta hasta el extremo de la rama más alta.

Longitud de entrenudo (cm): se midieron todos los entrenudos de la rama más alta, considerando desde la base hasta el extremo de la rama, y con dichos valores se calculó la longitud de entrenudo promedio.

Ancho de ala (cm): a los 10 centímetros de altura de la rama más alta, se midió el ancho de las tres alas y se promediaron las mediciones.

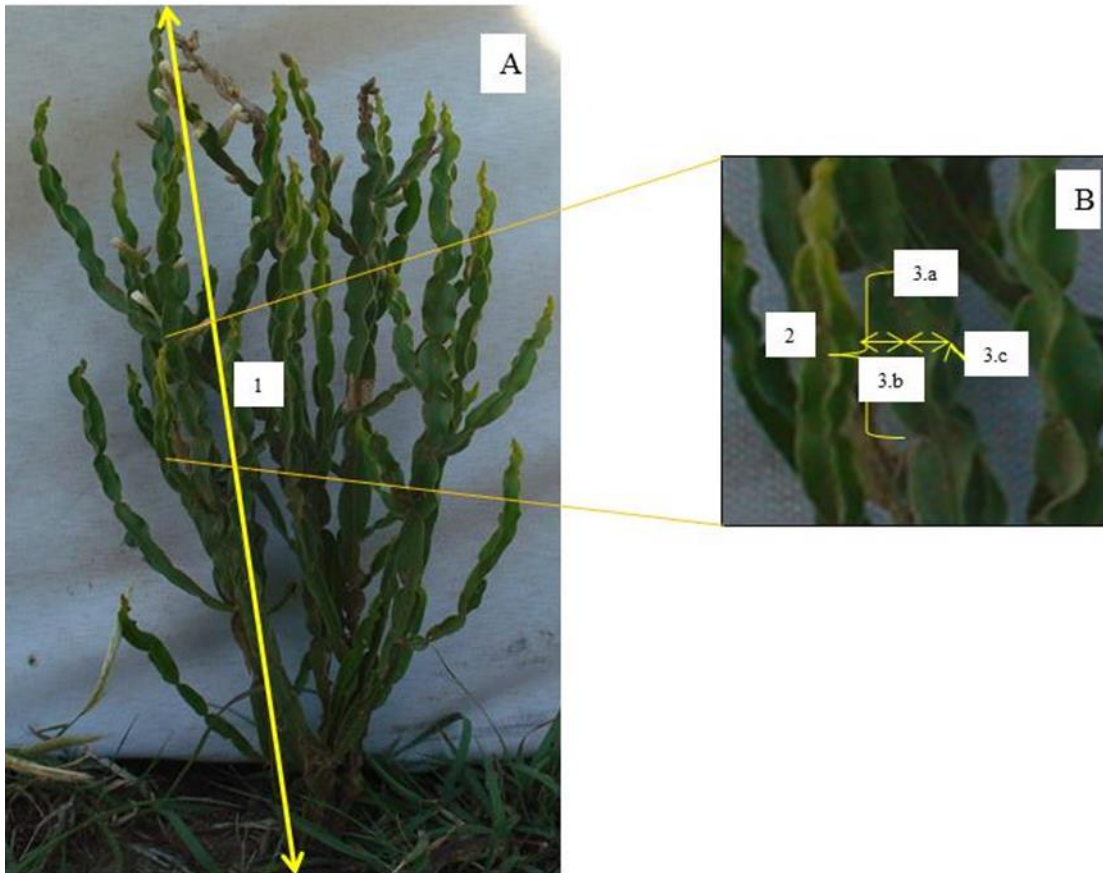


Figura 2.3. A. -Ejemplar silvestre de *B. crispa*. 1: Altura; B. Detalle de la ramificación más alta del ejemplar A.- 2: longitud de 1 entrenudo; 3.a, 3.b y 3.c: ancho de ala a los 10 cm.

-Solamente en las hembras se midió (Fig.2.4):

Longitud de inflorescencia femenina (cm): se consideraron cinco inflorescencias terminales de cada planta evaluada.

Número de achenios por capítulo: se contabilizaron los achenios de cada una de las inflorescencias femeninas usadas para medir longitud de inflorescencia femenina.

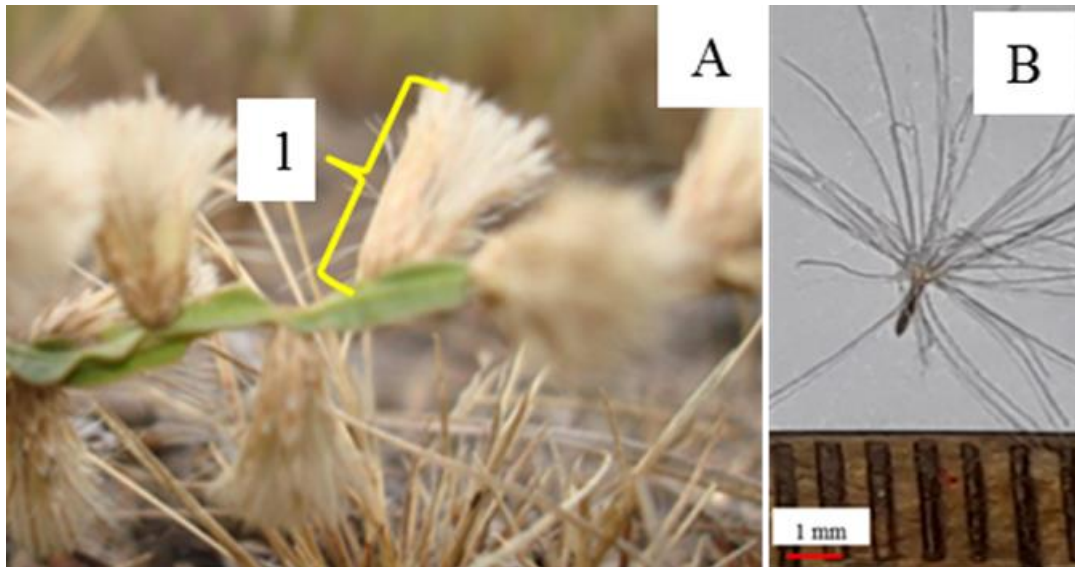


Figura 2.4. A-Inflorescencia femenina de *B. crisper* silvestre, 1-Longitud de inflorescencia femenina. B-Aquenio maduro de *B. crisper*.

Análisis Estadístico:

Los resultados de los ensayos fueron analizados con el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017). Se utilizó estadística descriptiva para caracterizar las poblaciones a través de las variables medidas. Para el análisis de variabilidad se emplearon Análisis de Componentes Principales y ANAVA. Se usó la prueba DGC a posteriori para comparar medias ($\alpha=0,05$) (Di Rienzo *et al.*, 2002).

RESULTADOS

Al ser una especie es diclino dioica (Cabrera, 1963) se herborizó un ejemplar femenino y otro masculino de cada una de las poblaciones, los que fueron depositados en el herbario ACOR (Facultad de Ciencias Agropecuarias dependiente de la Universidad Nacional de Córdoba –F.C.A.- U.N.C.-). Los ejemplares fueron incorporados a la colección LMC con los números (834 3.1; 907 2.1; 907 3.1; 907 4.1; 908 2.1; 908 3.1; 908 4.1 y 908 5.1).

Para describir el suelo de las poblaciones, se realizaron los análisis físicos-químicos de suelo en el Laboratorio de Suelos y Aguas (LABSA) –F.C.A.- U.N.C.-. El resultado de estos análisis se presenta resumido en las Tablas 2.1 y 2.2.

Tabla 2.1. Resultados del análisis químico del suelo de las cuatro poblaciones de *B. crispa* evaluadas.

Población	MO	C	pH	CE
Villa del parque	12,41	7,20	6,3	0,4
Puesto Pedernera	8,11	4,70	5,7	0,4
Tala Cañada	8,90	5,16	6,0	0,6
San Gerónimo	7,31	4,24	6,0	0,5

MO: Materia Orgánica (%); C: Carbono Orgánico (%); CE: Conductividad eléctrica (dS/m)

Tabla 2.2. Resultados del análisis físico del suelo de las cuatro poblaciones de *B. crispa* evaluadas.

Población	Arena muy gruesa (%)	Arena media (%)	Arena muy fina (%)	Limo (%)	Arcilla (%)
Villa del Parque	4,1	20,1	10,1	25,6	9,0
Puesto Pedernera	11,9	48,1	0,1	1,4	6,6
Tala Cañada	20,5	24,5	0,0	16,8	10,8
San Gerónimo	6,5	27	6,6	18,8	10,0

De acuerdo con estos resultados, las poblaciones evaluadas crecen en suelos con pH levemente ácidos y sin problemas de salinidad. Los valores de Materia Orgánica (MO) y de Carbono (C) en los cuatro sitios son superiores a los valores medios, de 5.8% y 3% respectivamente, reportados por Wilson (2017) para la región. El elevado porcentaje de MO de Villa del Parque podría ser atribuido a que el suelo muestreado es muy superficial con elevada cobertura de material en descomposición. El suelo donde crecen las poblaciones de Villa del Parque, Tala Cañada y San Gerónimo presenta textura franco-arenosa; mientras que el de la población de Puesto Pedernera presentó textura arenosa.

En la Tabla 2.3 se presentan los registros de temperaturas medias mínimas y máximas para los meses de julio y enero, además de la precipitación media anual de los departamentos donde crecen las poblaciones.

Tabla 2.3. Registros climáticos, por departamento, donde se ubican las poblaciones evaluadas

Población	Departamento	A	B	PPMA
Villa del Parque	Santa María	29°/18°	18°/4°	141
Puesto Pedernera	Punilla	32°/18°	18°/5°	121,1
Tala Cañada	Pocho	32°/18°	18° /5°	121,1
San Gerónimo	Pocho	32°/18°	18° / 5°	121,1

A: Temperatura máxima y mínima media del mes enero (° C). B: Temperatura máxima y mínima media del mes de julio (° C). PPMA: Precipitación media anual (mm).

Para caracterizar a las poblaciones silvestres y evaluar variabilidad entre ellas, se presentan en la Tabla 2.4 las medidas resumen de las variables cuantitativas medidas *in situ* a los individuos muestreados en cada una de las poblaciones y el resultado del ANAVA con su correspondiente significancia estadística (DGC, $p \leq 0,05$).

Tabla 2.4. Medidas resumen de cinco caracteres morfométricos medidos en poblaciones silvestres de *B. crispera*. Valores medios con significancia estadística (DGC $p \leq 0,05$).

Medidas resumen	Altura (cm)				Ancho de ala (cm)				Longitud entrenudo (cm)				Longitud inflorescencia femenina (cm)				Aqueños/capítulo			
	PP	SG	VP	TC	PP	SG	VP	TC	PP	SG	VP	TC	PP	SG	VP	TC	PP	SG	VP	TC
media	20,56(a)	25,28(b)	24,08(b)	24,9(b)	0,2(b)	0,23(b)	0,15(a)	0,25(b)	1,06(a)	1,26(b)	1,28(b)	1,32(b)	0,98(b)	0,99(b)	0,81(a)	1,02(b)	75,2(b)	81(c)	53,4(a)	70,15(b)
DE	4,59	7,49	4,56	6,37	0,06	0,05	0,04	0,13	0,31	0,36	0,47	0,63	0,18	0,15	0,28	0,15	13,98	14,06	9,84	9,55
CV	22,31	29,62	18,93	25,6	28,52	22,95	23,49	53,95	29,45	28,39	36,91	48,19	18,49	15,34	34,43	14,74	18,58	17,36	18,43	13,61
Mín	14	12	13	16	0,10	0,13	0,1	0,1	0,47	0,68	0,4	0,47	0,7	0,7	0,5	0,7	54	53	36	55
Máx	29	50	37	39	0,33	0,33	0,23	0,67	1,63	2,6	2,03	3,6	1,4	1,3	1,5	1,2	92	97	78	92

PP=Puesto Pedernerra; SG=San Gerónimo; VP= Villa del Parque y TC= Tala Cañada. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (DGC, $p \leq 0,05$)

La población Puesto Pedernera (PP) es significativamente diferente (DGC, $p \leq 0,05$) y de menor altura media, respecto a las poblaciones San Gerónimo (SG), Villa del Parque (VP) y Tala Cañada (TC). Para este carácter, la población de VP es la que presentó más uniformidad entre los individuos muestreados. Al analizar los resultados para el carácter ancho de ala, se encontró que las poblaciones difieren estadísticamente (DGC, $p \leq 0,05$), siendo en VP donde se registraron los menores valores para esta variable. Es destacable el valor que el coeficiente de variación (CV) asume en la población de TC, ya que nos demuestra una variación importante dentro de esta población para este carácter. Para la longitud entrenado, PP nuevamente difiere estadísticamente (DGC, $p \leq 0,05$) de las restantes poblaciones; siendo en promedio sus plantas de menor longitud entrenado. También se observa que el CV para TC es superior al del resto de las poblaciones, lo cual demuestra mayor variación dentro de la población para este carácter. Para la longitud de inflorescencia femenina VP presentó el menor valor medio y difirió estadísticamente (DGC, $p \leq 0,05$) de PP, TC y SG. Para este carácter, VP tuvo mayor variación entre sus individuos. Por último, el número de aquenios por capítulo presentó diferencias estadísticamente significativas (DGC, $p \leq 0,05$) entre las poblaciones. Siendo VP la que menor número promedio de aquenios presentó y SG la de mayor número promedio de aquenios por capítulo, mientras que PP y TC, tuvieron valores medios para esta variable, pero mayores a VP y menores a SG.

Debido a que para hacer la caracterización de las poblaciones y evaluar variabilidad entre ellas se empleó más de un carácter cuantitativo, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con tres objetivos: a) conocer si existe correlación entre las variables usadas en la evaluación, b) cómo es el comportamiento de las poblaciones respecto a esas variables y c) poder explicar, en el caso de existir, las diferencias entre las poblaciones. Como puede observarse en el biplot del ACP (Fig. 2.5), con las dos primeras componentes se explica el 95,6 % de la variabilidad total entre las poblaciones, para los caracteres morfométricos considerados.

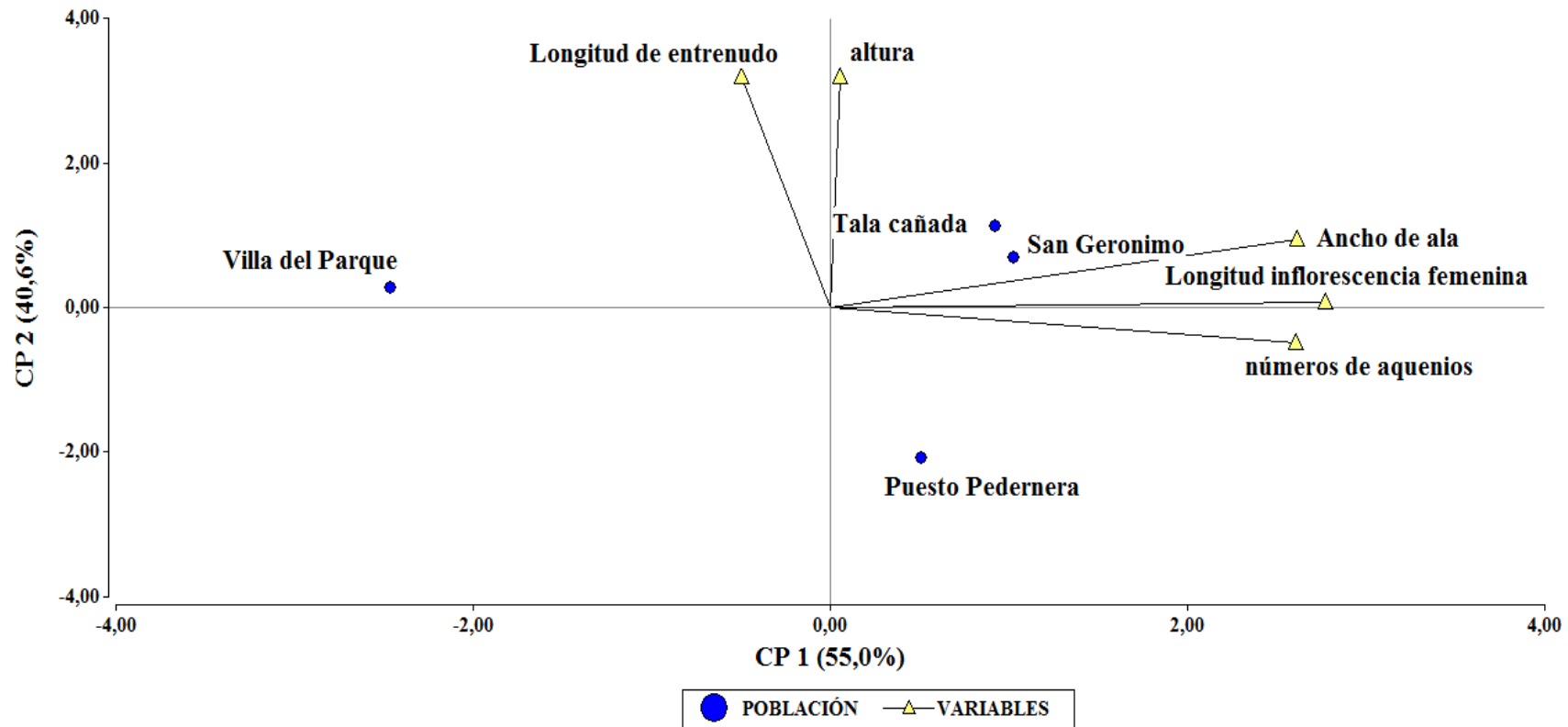


Figura 2.5. Representación de la variabilidad, usando variables morfológicas, entre poblaciones silvestres de *B. crispa*, empleando ACP.

A nivel de CP1 las variables con mayor valor discriminante son ancho de ala, longitud de inflorescencia y número de aquenios, que explican el 55 % de la variabilidad existente entre las poblaciones en estudio. Así, las poblaciones de Tala Cañada, San Gerónimo y Puesto Pedernera, que muestran los mayores valores para las tres variables, se diferencian de la población de Villa del Parque, que registra los menores para las variables mencionadas. A nivel de la CP2, las variables con mayor valor discriminante son la longitud de entrenudo y la altura, que explican un 40,6 % de la variabilidad observada, diferenciando a la población de Puesto Pedernera (que muestra los menores valores para ambas variables) del resto de las poblaciones.

DISCUSIÓN

Para el uso y aprovechamiento sustentable de plantas aromáticas y medicinales nativas es importante su cultivo, para poder proveer de suficiente materia prima y aliviar la presión sobre las poblaciones silvestres con las que actualmente se cubre su demanda de mercado. Así es posible ofrecer para la venta un producto de calidad, homogéneo en sus caracteres organolépticos y con buenos rendimientos. Para lograr tal cultivo es necesario avanzar sobre la caracterización, manejo y mejoramiento de las especies nativas (Ocaño, 2017).

Los valores encontrados, al realizar la caracterización de las poblaciones silvestres de *B. crispera*, para los caracteres altura de planta, ancho de ala, longitud entrenudo y número de aquenios por capítulo se encuentran dentro de los valores citados en las descripciones botánicas de la especie y trabajos previos de caracterización (Cabrera, 1963; Ariza Espinar, 1973 y 2005; Giuliano, 2000; Barboza *et al.*, 2006; Müller, 2006; Chaves *et al.*, 2010; Chaves, 2012). Al igual que Chaves (2012), se encontró que la longitud de inflorescencia femenina supera a los valores citados en las descripciones de la especie (Cabrera 1963; Giuliano, 2000; Müller, 2006).

En cuanto a la descripción del suelo donde crecen las poblaciones silvestres evaluadas, los resultados coinciden con los encontrados por Chaves (2012) al caracterizar los suelos de poblaciones silvestres de *B. crispera* de la provincia de Córdoba; siendo estos suelos superficiales, preponderantemente arenosos, levemente ácidos, sin problemas de salinidad y con buen contenido de materia orgánica.

La variabilidad encontrada dentro y entre las poblaciones evaluadas es esperable en poblaciones silvestres de especies nativas, ya que los individuos que las conforman se desarrollan en interacción dinámica con los factores particulares de los sitios de crecimiento (Hidalgo, 2003, Ojeda, 2004; Amujoyegbe *et al.*, 2012). Esta variación natural permite a las poblaciones adaptarse a diferentes micro-ambientes permitiendo su supervivencia a lo largo del tiempo (Liébana *et al.* 2017).

Al realizar la caracterización y evaluación de poblaciones silvestres de *B. crispa* de la provincia de Córdoba, distintas a las evaluadas en el presente trabajo, se ha demostrado previamente la existencia de variabilidad entre las poblaciones evaluadas para los caracteres morfométricos considerados y entre las condiciones ambientales en que prosperan dichas poblaciones (Chaves, 2012; Chaves *et al.*, 2014), como se ha observado también en el presente estudio. También existen antecedentes de caracterización y evaluación de variabilidad realizados con otras especies aromáticas y medicinales nativas presionadas y con demanda de mercado. Se encontró variabilidad, para caracteres morfométricos y entre las condiciones ambientales de crecimiento, entre poblaciones silvestres de la provincia de Córdoba de “tomillito de las sierras” (*Hedeoma multiflorum* Benth.) (Liébana, 2011; Liébana *et al.*, 2017); “suico” (*Tagetes minuta* L.) (Massuh, 2007), “peperina” (*Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling) (Ojeda, 2004). Lo mismo ocurre entre poblaciones silvestres de “peperina” y de “incayuyo” (*Lippia integrifolia* (Griseb.) Hieron.) de distintas provincias argentinas (Ojeda, 2004; Brunetti, 2017). Todos los estudios aquí citados se han realizado con el objetivo de recabar la información básica para conocer la variabilidad del material de partida para la domesticación y el inicio de programas de mejoramiento genético vegetal (Allard, 1980; Cubero Salmerón, 2014), que actualmente se encuentran en distinto grado de avance. Los individuos de las cuatro poblaciones silvestres de *B. crispa* evaluadas mostraron variabilidad para los caracteres considerados, por lo que con germoplasma de las poblaciones evaluadas es posible comenzar un programa de mejoramiento genético vegetal en la especie para caracteres agronómicos y bioactivos.

CONCLUSIONES

- Se caracterizaron, empleando caracteres morfométricos, cuatro poblaciones silvestres de “carqueja” situadas en la zona de sierras de la provincia de Córdoba.
- Los valores encontrados en los caracteres morfométricos en las poblaciones evaluadas fueron acordes a los citados en la descripción botánica de la especie, salvo la longitud de inflorescencia femenina.
- Se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones para todos los caracteres evaluados, siendo el número de aquenios por capítulo el carácter que tuvo más variabilidad entre las poblaciones.
- Se caracterizó el suelo de los sitios de crecimiento de las poblaciones silvestres evaluadas, siendo estos suelos superficiales, preponderantemente arenosos, levemente ácidos, sin problemas de salinidad y con buen contenido de materia orgánica.
- Con los cinco caracteres morfométricos considerados se determinó la existencia de variabilidad entre las poblaciones y dentro de cada población. Este dato cobra importancia ya que esta variabilidad es la base a partir de la cual se podrá comenzar, una vez domesticada, un programa de selección y mejoramiento en la especie tanto para caracteres agronómicos y como para su bioactividad.

BIBLIOGRAFÍA

- Allard R.W. 1980. Principios de la mejora genética de las plantas. Omega, Barcelona, España, 498 pp.
- Amujoyegbe, B. J.; Agbedahunsi, J. M. y Amujoyegbe, O. 2012. Cultivation of medicinal plants in developing nations: means of conservation and poverty alleviation. *Int. J. Med. Arom. Plants* 2 (2): 345-353.
- Ariza Espinar, L. 1973. Las especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central. *Bol. Acad. Nac. Ci. Córdoba* 50: 232.
- Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 139 pp.
- Barboza, G.E., Cantero J.J., Nuñez C.O. y L. Ariza Espinar. 2006. Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina). Pteridofitas y Antofitas silvestres o naturalizadas. Gráficamente, Córdoba, Argentina, 1264 pp.
- Brunetti P.C. 2017. Estudios en *Lippia integrifolia* "Incauyuyo" orientados a su domesticación y mejoramiento genético. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba, 116 pp.
- Cabrera A.L. 1963. Tomo 4: Compuestas. En: Flora de la provincia de Buenos Aires. INTA, Buenos Aires, 443 pp.
- Chaves, A.G., Torres, L.E., Massuh, Y., Brunetti, P., Ocaño, S.F., Castillo, N.E., Bustos, J.A. y Ojeda, M.S. 2010. Phenotypic variability of four wild populations of *Baccharis crispa* Spreng. Mountains area of the Province of Córdoba, Argentina. *Molecular Medicinal Chemistry*.
- Chaves, A.G. 2012. Caracterización fenotípica de poblaciones silvestres de carqueja (*Baccharis crispa* Spreng.) de la zona de Sierras de la Provincia de Córdoba. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Córdoba. 60 pp.
- Chaves, A.G., Brunetti, P.C., Massuh, Y., Ocaño, S.F., Torres, L.E., y Ojeda, M.S. 2014. Variabilidad entre poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* Spreng. de la Provincia de Córdoba, Argentina. *Phyton, International Journal of Experimental Botany* 83: 145-153.
- Clausen A.M., Ferrer M.E. y Formica M.B. 2008. Situación de los recursos fitogenéticos en la Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina. 57 pp.
- Cubero Salmerón J.I. 2014. Introducción a la mejora genética vegetal. 3ra Ed. Mundiprensa. Madrid, España 602 pp.
- Di Rienzo, J.A.; A.W. Guzmán and F. Casanoves, 2002. A Multiple Comparisons Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environment Statistics*, 7 (2): 1-14.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Giuliano D.A. 2000. *Asteraceae*, Tribu III. Astereae parte A, Subtribu c. Baccharinae. Flora fanerogámica argentina. *Proflora/CONICET* 66: 3-73.
- Hidalgo R. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. En: Franco T. L. e Hidalgo R. (eds.). 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización

- Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia pp 2 – 26.
- Liébana, C. 2011. Caracterización citogenética de poblaciones de (*Hedeoma multiflora* Benth.) tomillito de las sierras. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 36 pp.
- Liébana, C.; Torres, L. E. and A. Ordóñez. 2017. Cytogenetic characterization of three populations of *Hedeoma multiflorum* Benth. (Lamiaceae) native from Córdoba, Argentina. *Cytologia* 82 (3): 297-301.
- Mast H. 1975. The organization and work of UPOV. *Seed Sci Thecnol* 3: 377-386.
- Massuh, Y. 2007. Comparación entre poblaciones de *Tagetes minuta* de la provincia de Córdoba, una especie aromática promisoría. Tesina de grado. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, 54 pp.
- Müller J. 2006. Systematic of *Baccharis* (Compositae-Asterae) in Bolivia, including an overview of the genus. *Systematic Botany Monographs*. Vol. 76: 1-341.
- Ocaño S.F. 2017. Generación de una población de “peperina” *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, mejorada por sanidad, rendimiento y calidad de aceites esenciales. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Córdoba, 131 pp.
- Ojeda M.S. 2004. Caracterización de poblaciones y avances en la domesticación de peperina *Minthostachys mollis* (Kunt). Griseb. Tesis Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 134 pp
- PAEM 2013.: Plan de acción estratégico para fortalecer la conservación y el uso de los recursos fitogenéticos mesoamericanos para la adaptación de la agricultura al cambio climático. Ramirez M. (Coord.). Bioversity International, Roma, Italia 68 pp.
- Wilson, M.G. (Ed.). (2017). Manual de indicadores de calidad de suelo para las ecoregiones de Argentina. Entre Ríos, Argentina: Ediciones INTA. 294 pp. Publicado en Internet. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/manual_ics_final.pdf
Activo: julio 2020.

VARIABILIDAD EN LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y VIRUCIDA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS Y ACUOSO CALIENTE OBTENIDOS DE POBLACIONES SILVESTRES DE *B. crispa*

INTRODUCCIÓN

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) advierte que la aparición de nuevos virus y síndromes asociados a ellos, los cambios en los patrones epidemiológicos, la ausencia de vacunas para virus huérfanos y la creciente resistencia a los medicamentos antivirales son factores que conforman un escenario para la emergencia y re emergencia de virus con potencial epidémico y pandémico. Por ello, las enfermedades virales representan un gran reto para la Salud Pública (PAHO, 2013). Además, las infecciones virales son una de las principales causas de muerte en el mundo (Vahidnia *et al.*, 2017), afectan a un gran número de individuos en cortos períodos de tiempo y tienen altos niveles de morbilidad y mortalidad (Simoni *et al.*, 2018). Por lo que el desarrollo de nuevos y mejores compuestos antivirales es vital y deseable (Abad *et al.*, 1999a).

Mundialmente se ha comenzado a buscar en las hierbas medicinales el tratamiento de las enfermedades virales, ya que son relativamente más accesibles, económicas y tienen menos posibilidades de toxicidad y resistencia. Estudios recientes han revelado que una gran variedad de plantas medicinales tienen efecto antiviral (Akram *et al.*, 2018).

Las infecciones virales causadas por herpes virus y chikungunya virus ocasionan en la población altos niveles de morbilidad, pudiendo convertirse en infecciones crónicas, provocar discapacidad y en casos extremos la muerte del individuo enfermo (WHO, 2017a y b).

Los herpes virus son los virus con genoma ADN más importantes en las patologías orales y adquieren especial relevancia cuando infectan a sujetos con VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) o con cuadros de inmunodepresión (Bascones-Martínez y Pousa-Castro, 2011). Hay dos tipos de virus del herpes simple: de tipo 1 (HSV-I) y de tipo 2 (HSV-2). El HSV-I se transmite principalmente por contacto de boca a boca mientras que el HSV-2 se transmite por vía sexual; ambos causan infecciones faciales y genitales que duran toda la vida. El HSV-I es un virus neurotrópico que causa principalmente infecciones orales, desde leves como los herpes labiales, hasta graves como la meningoencefalitis (WHO, 2017b). En el año 2012 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaba que 3.700 millones de personas menores de 50 años (el 67 % de la población mundial) tenían infección por HSV-I. La prevalencia estimada de la infección era más elevada en África (87 %) y más baja en las Américas (40 %-50 %). Se calcula que la mayoría de las infecciones genitales por HSV-I ocurren en las Américas, Europa y el Pacífico Occidental, donde el HSV-I sigue adquiriéndose hasta bien entrada la edad adulta (WHO, 2012). Los medicamentos antivirales, como el Aciclovir (ACV), el famciclovir y el valaciclovir, son los más eficaces para las personas infectadas por HSV-I. Sin embargo, aunque pueden reducir la intensidad y frecuencia de los síntomas, no curan la infección. Además, el mayor inconveniente que está presentando el ACV y sus derivados es la aparición de resistencia en pacientes que llevan siendo tratados con estos compuestos largos periodos de tiempo, principalmente inmunocomprometidos. Por ello, el estudio de nuevos antiherpéticos con diferentes mecanismos de acción, está a la orden del día (Praena y López-Guerrero, 2019).

El virus chikungunya (CHIKV) es un virus ARN que se transmite de una persona a otra por la picadura de la hembra infectada de mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. Aunque rara vez causa la muerte, puede causar dolor articular crónico y discapacidad en algunas personas. Provoca la aparición súbita de fiebre, acompañada de dolores articulares, dolores musculares, de cabeza, náuseas, cansancio y erupciones cutáneas. Los dolores articulares suelen ser muy debilitantes, pero generalmente desaparecen en pocos días, aunque también pueden durar semanas (WHO, 2017a). El virus puede causar una enfermedad aguda, subaguda o crónica. Las complicaciones graves no son frecuentes, pero en personas mayores la enfermedad puede contribuir a la muerte. Hasta el momento no

existe un tratamiento específico ni una vacuna disponible para prevenir la infección de este virus (Kantor, 2018). En el año 2016 se notificó el primer brote de fiebre Chikungunya en Argentina. La mayoría de los casos autóctonos confirmados mediante pruebas de laboratorio se registraron en la provincia de Salta y Jujuy (Boletín Epidemiológico, 2016). Todos los casos confirmados dieron positivo para el virus chikungunya mediante RCP-RT (transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa) (WHO, 2016).

Teniendo en cuenta la situación actual de las infecciones por HSV y CHIKV, la importancia del control de estas infecciones mantiene vigente la necesidad de la búsqueda de nuevas drogas con actividad antiviral capaces de inhibir la replicación de estos virus. Una estrategia exitosa es la búsqueda de nuevas moléculas activas a partir de fuentes naturales como las plantas (Visintini Jaime, 2014).

Extractos acuosos y orgánicos de numerosas especies del género *Baccharis* han demostrado actividad antiherpética (Abad *et al.*, 1999a; Abad *et al.*, 1999b; Zanon *et al.*, 1999, Montahana *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2011; Visintini Jaime, 2014; Simoni *et al.*, 2018; Venturi *et al.*, 2018). En este sentido, los antecedentes en el estudio de potencial antiviral de la especie sugieren que *Baccharis crispa* Spreng podría tener actividad antiviral asociada al contenido de ácidos cafeilquínicos que posee (Palacios *et al.*, 1999). Rivarola *et al.* (2009), encontraron que concentraciones subtóxicas de extractos acuosos y orgánicos de *B. crispa* inhiben a los virus Herpes Simple Tipo 1 (HSV-I) y Encefalitis Equina Venezolana (VEEV), enfatizando en la necesidad de continuar esta línea de investigación para mejorar el conocimiento y validación de las propiedades antivirales de la especie.

El estudio de la potencial bioactividad de la especie es por un lado un aporte importante para revalorizar y promover su conservación; por otro lado, los resultados contribuyen al avance en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas para el tratamiento de infecciones virales a partir de fuentes naturales. Además, la evaluación de la variabilidad en la bioactividad entre poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* Spreng. de la provincia de Córdoba es clave para iniciar su domesticación, ya que este proceso opera sobre la base de

la variabilidad de las poblaciones de la especie, en estado silvestre, que se desea domesticar (Casas y Parra, 2016)

En base a lo expuesto se planteó el siguiente objetivo: “Evaluar la variabilidad, para la actividad antiviral y virucida, de extractos orgánicos y acuoso caliente obtenidos de poblaciones silvestres de *B. crista* de la provincia de Córdoba, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Material Vegetal

Se recolectó material vegetal (parte aérea), manteniendo la identificación de origen, de las poblaciones silvestres incluidas en el estudio de variabilidad para caracteres morfométricos. Las poblaciones fueron identificadas como: Villa del Parque (VP), San Gerónimo (SG), Puesto Pedernera (PP) y Tala Cañada (TC). Las muestras de material vegetal se secaron a temperatura ambiente, protegidas de la luz solar y del polvo hasta peso constante. Una vez secas se trituraron utilizando un molino de cuchillas con tamiz n° 6 (Retsch KG 5657 HANN, Germany).

Extractos Orgánicos

Para la obtención de los extractos se seleccionó un método de extracción continuo con solventes de polaridad creciente que consiste en la maceración del material vegetal con un determinado disolvente, que va extrayendo los componentes más solubles (Villar del Fresno, 1999). Las muestras de material vegetal pesaron 40 g (peso seco). Este proceso se realizó con un extractor Soxhlet (Figmay) (Fig. 3.1).

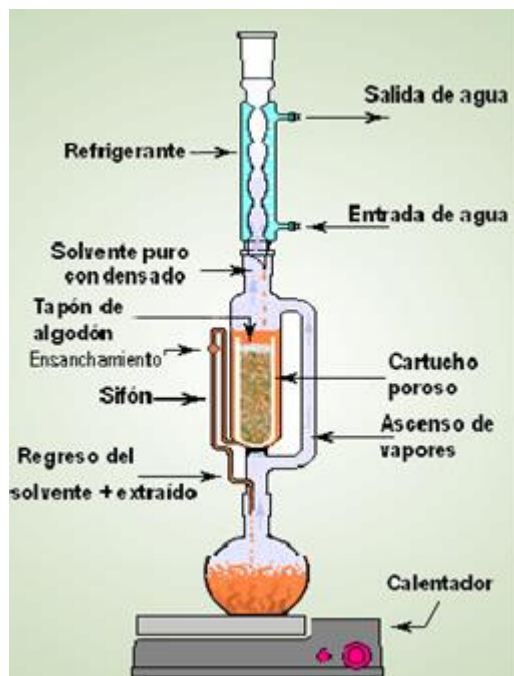


Figura 3.1. Esquema de un extractor Soxhlet ([Soxhlet_mechanism2.gif](#) por Tomasz Dolinowski esta licenciado bajo CC0 1.0)

Antes de comenzar con la extracción el material vegetal fue sometido a una maceración con hexano para extraer grasas y clorofila. Se empleó una relación de material vegetal/solvente de 1:2 (p/v) por 48 h, renovando el solvente a las 24 h. Posteriormente se comenzó la extracción, utilizando el extractor Soxhlet; con cloroformo (CHCl_3) capaz de extraer sustancias poco polares y luego con Etanol (EtOH), que extrae los compuestos más polares. El material vegetal estuvo en contacto con cada solvente hasta su agotamiento. Una vez descartado el residuo vegetal, se procedió a la concentración de los extractos a presión reducida y a temperaturas moderadas, entre 30 – 40 °C, utilizando un rotavapor (Büchi R110).

Extractos Acuosa

Para la obtención del extracto acuoso caliente, se utilizó otra fracción de partes aéreas secas y molidas de *B. crista* (40 g). Al material vegetal se le agregó cantidad suficiente de agua para cubrirlo (aproximadamente 500 mL) y se calentó por una hora a 85 °C (decocción). Una vez obtenido el extracto acuoso, fue sometido a una liofilización

(Liofilizador Labconco LYPH LOCK 6); proceso que permite la eliminación de agua mediante la congelación rápida de la muestra, seguida de la sublimación del agua, a presión reducida y temperaturas inferiores a 0°C (-50 °C). Una vez obtenidos los extractos orgánicos y acuosos se calculó el rendimiento (%) (g de extracto/100 g de materia seca).

BIOACTIVIDAD *IN VITRO*: VARIABILIDAD PARA ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y ACTIVIDAD VIRUCIDA

Línea Celular

Se emplearon cultivos de la línea celular Vero clon 76 [riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops L.*)], mantenidas en estufa (Sanyo, Incu Safe MCO 17 AC) con atmósfera húmeda conteniendo 5 % CO₂ a 37 °C. Para cada ensayo se preparó una suspensión celular que contenía 2x10⁵ cél/mL, a partir de la cual se sembraron las distintas placas de cultivo. Se emplearon monocapas de 24 h de incubación en placas de 96 pocillos para la evaluación de la citotoxicidad y de 48 h de incubación en placas de 24 pocillos para la evaluación de la actividad antiviral y virucida. La incubación se realizó en Medio de Crecimiento (MC), el cual estaba compuesto por Medio Esencial Mínimo (MEM) con aminoácidos no esenciales modificado por Dulbecco, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina (3 g/L) y sulfato de gentamicina (50 µg/mL) como antibiótico (ATB).

Muestras para Ensayos Biológicos

Se prepararon soluciones stock en dimetil sulfóxido (DMSO) de cada extracto, en una concentración de 100 mg/mL. Las diluciones preparadas a partir de estas soluciones madres se realizaron con Medio de Mantenimiento (MM), el que estuvo compuesto por MEM con aminoácidos no esenciales modificado por Dulbecco, suplementado con 2% de SFB, 1% L-glutamina y 50 µg/mL de ATB.

Evaluación de la Citotoxicidad

La citotoxicidad se evaluó a través del efecto de los extractos sobre la viabilidad celular (VC) aplicando el método de captación de Rojo Neutro (RN) (Borenfreund y Puerner, 1985). Este método se basa en la capacidad de las células viables de incorporar el RN como marcador supravital. Este colorante catiónico penetra las membranas celulares por difusión pasiva, concentrándose en organelas con membrana (lisosomas y endosomas). En consecuencia, la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables (Repetto *et al.*, 2008). Se siguió este protocolo realizándole algunas modificaciones. Para esto, se usaron monocapas de células Vero de 24 h de crecimiento en placas de 96 pocillos, a las que se les eliminó el medio de crecimiento (MC) y se le agregó MM nuevo conteniendo 15 concentraciones de cada extracto entre 10 µg/mL a 1000 µg/mL (Lingua *et al.*, 2018), por triplicado. Se dejaron cultivos de células con MM solo, como control celular (CCe). Los cultivos celulares se observaron diariamente en microscopio óptico invertido para detectar la aparición de alteraciones en la morfología celular hasta la aplicación del colorante. Al cabo de 72 h de incubación, el medio fue removido y se agregó durante 3 h, una solución de RN (50 µg/mL en MEM). Posteriormente, el colorante contenido en los lisosomas y endosomas de las células se extrajo con una solución de agua - etanol - ácido acético (50:49:1) durante 15 min en agitación continua a temperatura ambiente. La densidad óptica (DO) del colorante extraído se obtuvo mediante un lector de microplacas (BioTek ELx800) realizando las lecturas a 540 nm. Los porcentajes de viabilidad celular se determinaron en base a los valores obtenidos de los CCe, tomados como 100 % de viabilidad, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = [\text{D.O (t)} \times 100] / \text{D.O(c)}$$

- D.O (t), densidad óptica del cultivo tratado.
- D.O (c), densidad óptica del cultivo control.

A partir de los valores obtenidos con esta fórmula, se confeccionaron curvas de viabilidad, en las cuales se graficaron las concentraciones de los extractos ($\mu\text{g/mL}$) vs. porcentaje de viabilidad celular (% VC). A partir de estos gráficos se determinaron los valores de concentración que provocan daño celular evidente al 50 % de los cultivos tratados (concentración citotóxica media, CC_{50}) y aquellos que provocan daño celular evidente al 10% de los cultivos tratados, también denominada máxima concentración no citotóxica (MCNC).

Cepas Virales Estudiadas

Como modelos virales de experimentación se eligieron virus que están totalmente caracterizados y son de uso corriente en investigación en el laboratorio de Arbovirus del Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella (InViV, FCM-UNC). Los sistemas virales elegidos como modelos fueron:

A) virus ARN: Chikungunya (CHIKV) (Alfavirus-Arbovirus) genotipo Asiático-americano

B) virus ADN: Herpes Simple Tipo 1 (HSV-I) (Herpes virus) cepa KOS.

Determinación del Título del Stock Viral

La titulación de los stocks de virus utilizados se realizó siguiendo la técnica de unidades formadoras de placas (UFP) bajo agarosa en células Vero (Earley *et al.*, 1967). A partir de cada stock se calcularon las diluciones correspondientes para tener 100 UFP en los ensayos posteriores.

Evaluación de la Actividad Antiviral *in vitro*

El objetivo de este ensayo fue evaluar de manera general si los extractos empleados a concentraciones sub tóxicas poseían la capacidad de actuar sobre alguno de

los modelos virales en estudio. En este sentido, la actividad antiviral de un producto puede ser medida mediante su capacidad para reducir el número de UFP, con respecto al control viral (Del Barrio *et al.*, 2008). Las monocapas fueron infectadas con 100 UFP de cada modelo viral. Luego de 1 h de incubación a 37 °C con atmósfera del 5 % de CO₂, se lavó con una solución salina de fosfatos estéril (PBS) para eliminar las partículas virales que no fueron capaces de ingresar a la célula y se cubrió la monocapa con medio semisólido constituido por partes iguales de agarosa al 1 % y MEM de doble concentración, conteniendo dosis decrecientes a partir de la CC₁₀ de cada extracto a evaluar, por triplicado. Se incluyeron: controles virales (CVir: células infectadas sin tratar), control de extractos (Cext: células tratadas a la CC₁₀ y sin infectar), controles celulares (CCe: células sin infectar y sin tratar) y control positivo (Aciclovir) para el caso del HSV-I; mientras que no se incluyó un control positivo contra CHIKV debido a que hasta el momento no existe un antiviral efectivo para este virus. Seguidamente las células se incubaron a 37 °C con atmósfera del 5 % de CO₂ durante 2 (HSV-I) y 3 días (CHIKV). Posteriormente, las monocapas de células se fijaron con formol al 10 % durante 2 h y las placas de lisis se revelaron con una solución de cristal violeta al 1 %. De esta manera, el número de placas fue cuantificado y obtenido el porcentaje de inhibición (% I) de cada extracto, en base a los valores obtenidos en los controles virales (CVir) (100 %).

Evaluación de la Acción Virucida *in vitro*

El objetivo de este ensayo fue determinar si los extractos tienen capacidad para inactivar las partículas virales antes que las mismas ingresen a la célula hospedadora (capacidad virucida). La acción inactivante directa de un producto sobre las partículas virales puede ser evaluada mediante el tratamiento de suspensiones virales de título conocido. El efecto virucida conlleva una disminución brusca en el título infectivo residual de la suspensión con respecto a los controles no tratados (Del Barrio y Parra, 2000; Fernández Romero *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; Del Barrio *et al.*, 2008). Se determinó el efecto directo de cada extracto para inactivar las partículas virales, utilizando la prueba de reducción de UFP bajo agarosa en células Vero. Para ello, se mezclaron 100 µL del stock de cada modelo viral con 100 µL de una concentración de extracto que

corresponde a su CC_{50} . Esta mezcla se incubó 1 h a 37 °C. Posteriormente, a partir de cada mezcla se realizaron diluciones seriadas (factor 10) y cada dilución fue agregada por duplicado sobre una capa confluyente de células y tras 1 h de incubación a 37 °C con atmósfera húmeda de 5 % CO_2 para permitir el ingreso del virus a la célula hospedadora (absorción viral), se agregó una solución semisólida constituida por partes iguales de agarosa al 1 % y MEM de doble concentración. Luego del período de incubación necesario para cada virus, las células fueron fijadas con formol al 10 % durante 2 h y las placas de lisis se revelaron con una solución de cristal violeta al 1 %. Se cuantificó número de placas y se obtuvo el % I de cada extracto en base a los valores obtenidos en los controles virales (CVir) (100%).

Análisis Estadístico

Los valores de CC_{50} , y CC_{10} se obtuvieron a partir de las curvas de dosis-respuesta generadas a partir de un análisis de regresión no lineal (Sigmoidal Origin, $R^2 > 0.9$), empleando el programa OriginPro 8.6. Los valores se expresaron (media \pm error estándar) de 3 experimentos diferentes. Para evaluar la variabilidad en la citotoxicidad y en actividad antiviral y virucida entre las poblaciones y dentro de las poblaciones entre sus extractos, se realizaron análisis de la varianza (ANAVA). Para dicho análisis se ajustó un modelo bifactorial, el cuál se presenta a continuación:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde Y_{ijk} representa la respuesta de la k -ésima repetición en el i -ésimo nivel del factor “extracto” y j -ésimo nivel del factor “población”, μ representa la media general, α_i es el efecto que produce el i -ésimo nivel del factor “extracto”, β_j es el efecto del j -ésimo nivel del factor “población”, δ_{ij} es el efecto de la interacción para la combinación de los niveles i del factor “extracto” y j del factor “población” y ε_{ijk} es el error aleatorio asociado a la observación ijk -ésima con $\sim N(0, \sigma^2)$. Para determinar la significancia estadística se aplicó la prueba a posteriori DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) con un α de 0,05. Para la

realización del análisis estadístico se utilizó el software estadístico *InfoStat* (Di Rienzo *et al.*, 2017)

RESULTADOS

RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS

Se obtuvieron los extractos clorofórmico (ECHCl₃), etanólico (EEtOH) y el acuoso caliente (EAc) de cada población en estudio (VP, TC, PP y SG). Los extractos de las cuatro poblaciones tuvieron un rendimiento promedio de 9,4 %. El extracto clorofórmico de Tala Cañada duplicó el rendimiento promedio, siendo de 20 %. El Extracto Acuoso de la población Villa del Parque fue de un poco menos de la mitad del rendimiento promedio, 3,7%. El resto de los extractos obtenidos presentaron rendimientos cercanos al promedio (Tabla 3.1).

Tabla. 3.1. Rendimiento (% p/p) de extractos orgánicos y acuoso caliente obtenidos de cuatro poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* Spreng. de la provincia de Córdoba.

Extracto	Población	Rendimiento (% peso/peso)
Clorofórmico (ECHCl ₃)	Villa del Parque	10,8
	Tala Cañada	20
	San Gerónimo	9,2
	Puesto Pedernera	8,3
Etanólico (EEtOH)	Villa del Parque	8,4
	Tala Cañada	7,9
	San Gerónimo	7,9
	Puesto Pedernera	6,8
Acuoso Caliente (EAc)	Villa del Parque	3,7
	Tala Cañada	9
	San Gerónimo	8,2
	Puesto Pedernera	12,5
Rendimiento Promedio		9,4

EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

Del control diario de los cultivos celulares para la determinación de los efectos citopáticos se observó que los extractos generaron diferentes tipos de alteraciones celulares (Tabla 3.2). En todos los casos el grado de afección fue dependiente de la concentración. Los extractos etanólicos (EEtOH) y clorofórmicos (ECHCl₃) de todas las poblaciones fueron los primeros en actuar sobre la línea celular (24 h); mientras que los extractos acuosos (EAc) recién comenzaron a producir alteraciones a partir de las 48 h. En general, a las 72 h todas aquellas concentraciones que ya habían sido tóxicas desprendieron las monocapas.

Tabla 3.2. Efectos citopáticos producidos por los extractos sobre monocapas de células Vero, observadas a las 24 y 48 h post-inoculación.

Extractos	Observaciones	
	24 h.	48 h.
ECHCl₃	Redondeamiento celular	Desprendimiento de la monocapa
EEtOH	Retracción de las membranas	Desprendimiento de la monocapa
EAc	Sin efecto aparente	Redondeamiento celular

En la Fig. 3.2 se muestran los efectos citopáticos (ECP) observados respecto a una monocapa control, la cual sólo contenía medio de mantenimiento (Fig. 3.2-D). Se observaron tres tipos de efectos citopáticos: el plegamiento de la monocapa de células sobre si misma debido a la pérdida de adhesión al sustrato (Fig. 3.2-A); la retracción de la membrana (Fig. 3.2-B) y el redondeamiento de las células (Fig. 3.2-C).

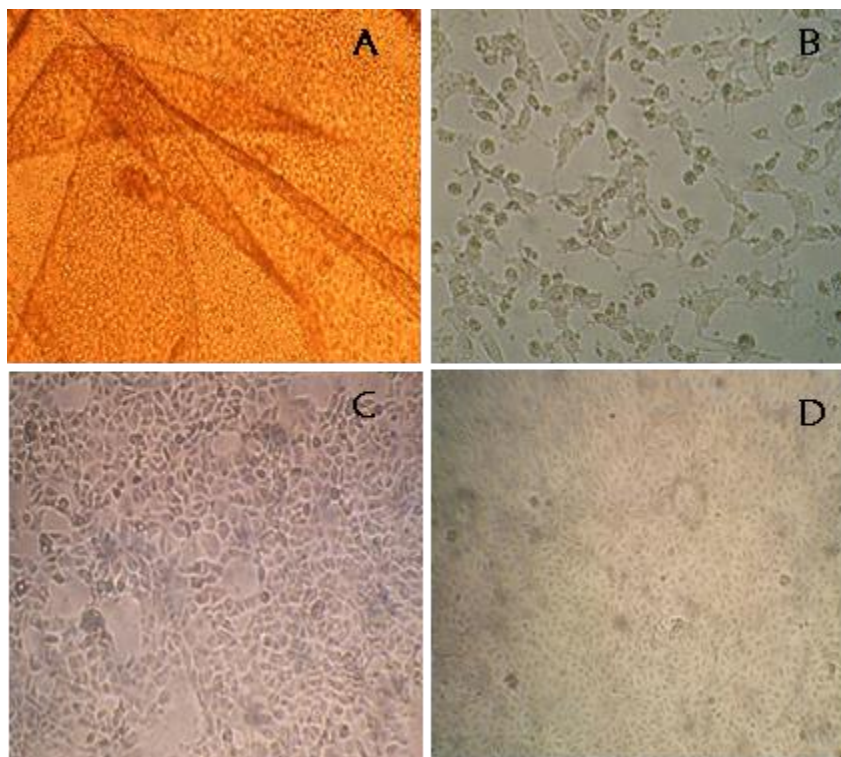
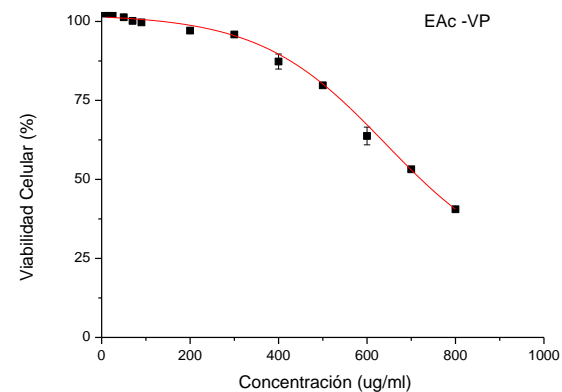
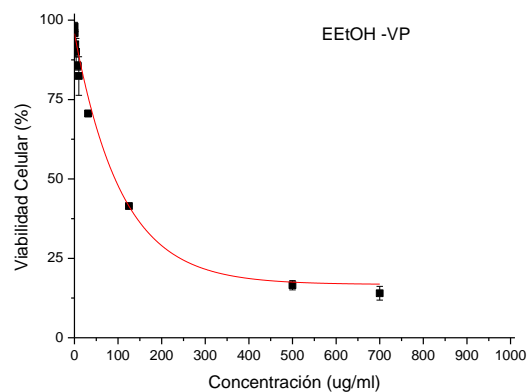
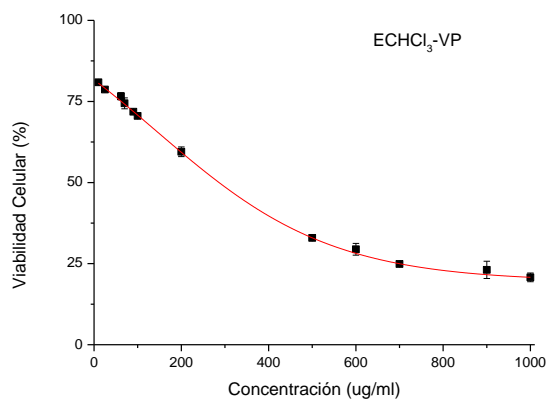


Figura 3.2. Efectos citopáticos observados sobre células Vero. **Figura A:** Desprendimiento de la monocapa celular producido por los extractos EEtOH. **Figura B:** Retracción de las membranas celulares generado por los extractos ECHCl₃. **Figura C:** Redondeamiento celular observado para los extractos EAc. **Figura D:** corresponde al control celular (CCe) (40 X).

A partir de los resultados de la evaluación de viabilidad celular por el método de captación del rojo neutro (RN) se confeccionaron las curvas de viabilidad celular (Fig. 3.3), y por regresión se estimó el valor de concentración que provoca daño celular al 50 % de las células Vero tratadas (Concentración Citotóxica media, CC₅₀) y el valor de concentración que provoca un 10 % de daño celular (CC₁₀ o MCNC) (Tabla 3.3). Este procedimiento se realizó para cada uno de los extractos evaluados.

Población Villa del Parque



Población Tala Cañada

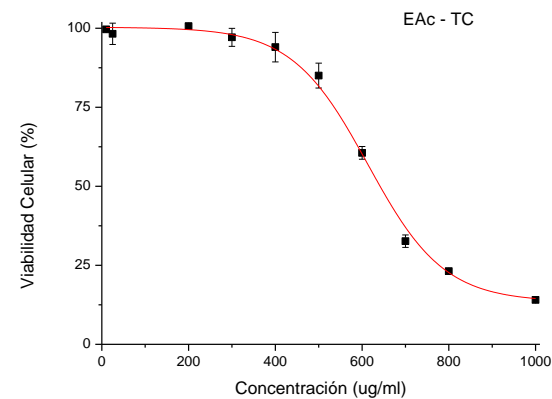
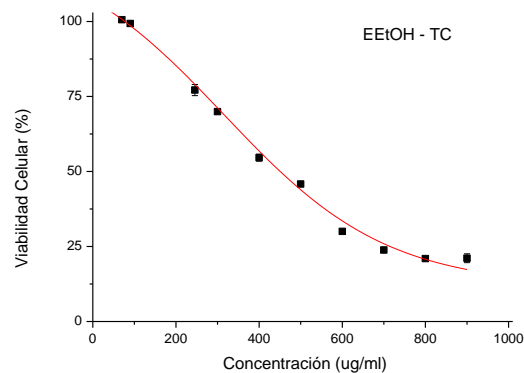
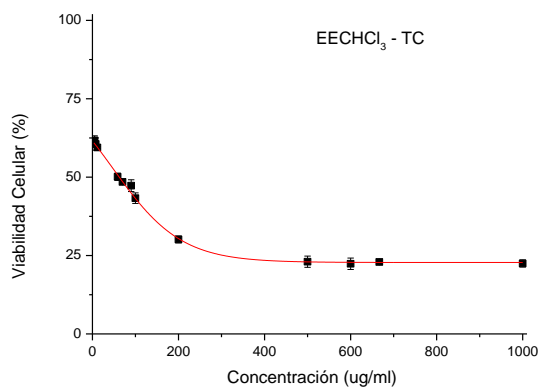
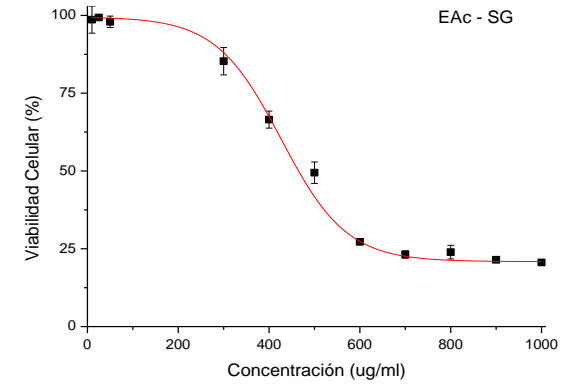
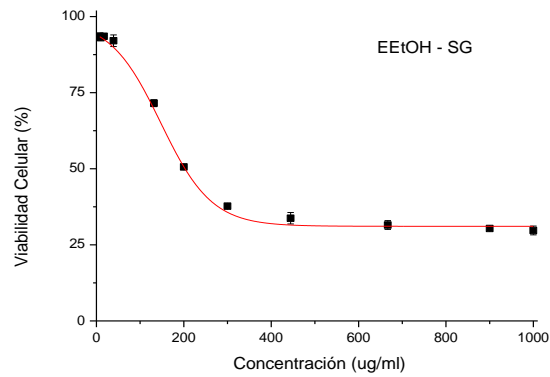
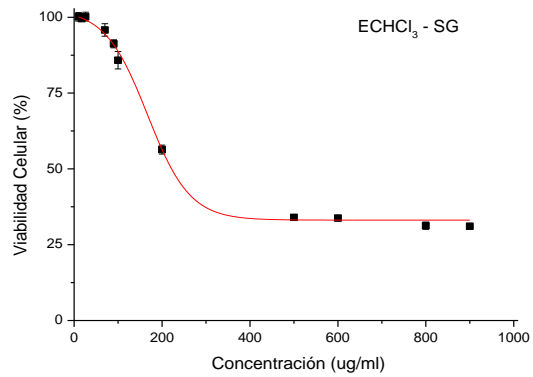


Figura 3.3. Curvas de viabilidad celular obtenidas al evaluar el efecto de extractos orgánicos (clorofórmico y etanólico) y acuoso caliente, sobre células VERO, de cuatro poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* Spreng. de la provincia de Córdoba, Argentina.

Población San Gerónimo



Población Puesto Pedrera

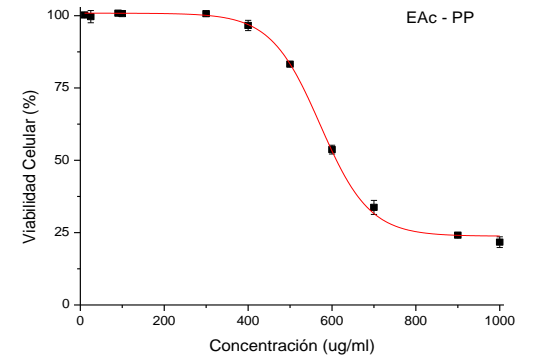
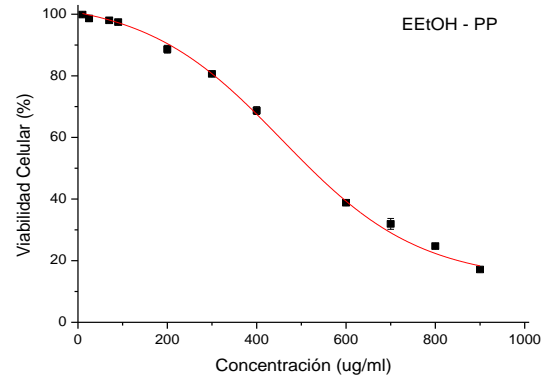
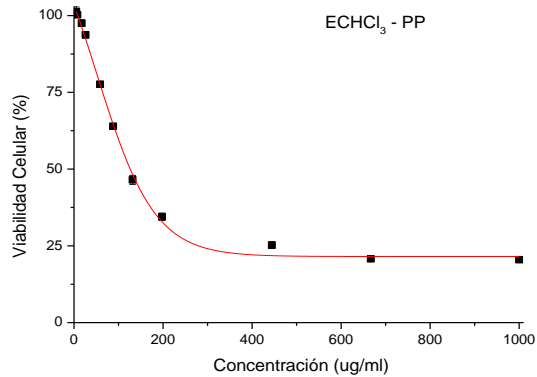


Figura 3.3. (Continuación) Curvas de viabilidad celular obtenidas al evaluar el efecto de extractos orgánicos (clorofórmico y etanólico) y acuoso caliente, sobre células VERO, de cuatro poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* Spreng. de la provincia de Córdoba, Argentina

Tabla 3.3. Valores promedio de concentración citotóxica 50 (CC₅₀) y de concentración citotóxica 10 (CC₁₀) y variabilidad dentro y entre poblaciones para cada extracto sobre células Vero. Citotoxicidad obtenida por el método colorimétrico captación de RN.

Población	Extractos	CC ₅₀ (µg/mL)	CC ₁₀ (µg/mL)
Villa del Parque	ECHCl ₃	318,53 ± 16,6 (d) (B)	90,46 ± 5,6 (c) (B)
	EEtOH	92,44 ± 7,2 (a) (A)	8,26 ± 0,6 (a) (A)
	EAc	670,5 ± 25,4 (d) (C)	396,86 ± 9,9 (b) (C)
Tala Cañada	ECHCl ₃	104,4 ± 4,6 (b) (A)	34,97 ± 2,9 (a) (A)
	EEtOH	256,22 ± 5,3 (c) (B)	153,15 ± 6,05 (c) (B)
	EAc	617,83 ± 17,8 (c) (C)	483,37 ± 12,2 (c) (C)
San Gerónimo	ECHCl ₃	149,68 ± 9,8 (c) (A)	82,14 ± 5,7 (b) (A)
	EEtOH	157,46 ± 3,4 (b) (A)	79,43 ± 6,8 (b) (A)
	EAc	407,16 ± 12,8 (a) (B)	279,68 ± 17,8 (a) (B)
Puesto Pedernera	ECHCl ₃	94,83 ± 1,6 (a) (A)	36,95 ± 2,4 (a) (A)
	EEtOH	571,96 ± 10,3 (d) (B)	297,12 ± 2,17 (d) (B)
	EAc	573,41 ± 2,3 (b) (B)	415,87 ± 11,09 (b) (C)

Los valores se expresan como promedio de tres experimentos independientes ± desviación estándar. Letras minúsculas distintas marcan diferencias significativas entre poblaciones considerando el tipo de extracto (DGC, p≤0,05). Letras mayúsculas distintas marcan diferencias significativas dentro de cada población entre sus extractos (DGC, p≤0,05)

De manera general, los extractos acuosos de las cuatro poblaciones fueron los menos tóxicos. Los extractos clorofórmicos resultaron más tóxicos que los restantes, salvo el obtenido de material vegetal recolectado en la población Villa del Parque. De esta población el extracto etanólico tuvo efecto citotóxico a concentraciones más bajas. Se encontraron diferencias significativas (p≤0,05) en la citotoxicidad (CC₅₀ y CC₁₀) de los tres extractos probados dentro de cada población, excepto entre los extractos clorofórmico y etanólico de la población San Gerónimo para ambas concentraciones. También se encontró variabilidad en el efecto citotóxico entre las poblaciones por tipo de extracto (p≤0,05) para la CC₅₀. Considerando la CC₁₀ no se encontraron diferencias significativas en el efecto citotóxico del extracto acuoso de las poblaciones Villa del Parque y Puesto Pedernera, como así tampoco el extracto clorofórmico de las poblaciones Tala Cañada y Puesto Pedernera. Cabe destacar que al evaluar la interacción entre los factores “extracto” y

“población” también fue significativa (p -valor $\leq 0,05$), indicando que los factores no actúan independientemente (ANEXO I).

Determinación Del Título Del Stock Viral

Siguiendo la metodología propuesta por Earley *et al.* (1967) se obtuvieron los títulos de los stocks para los virus:

- ✓ Virus Herpes Simple Tipo I (HSV-I): 25×10^6 UFP/mL
- ✓ Virus Chikungunya (CHIKV): 3×10^8 UFP/mL

VARIABILIDAD EN LA BIOACTIVIDAD *IN VITRO*

El Análisis de la Varianza muestra que existen diferencias significativas (DGC, $p \leq 0,05$) entre los extractos evaluados dentro de cada población y entre las poblaciones por tipo de extracto evaluado (Tabla 3.4) Además, la interacción entre los factores “extracto” y “población” también fue significativa (p -valor $\leq 0,05$), indicando que los factores no actúan independientemente (ANEXO I).

A continuación se presentan los resultados de la variabilidad en la actividad antiviral y virucida entre poblaciones y dentro de cada población.

Variabilidad entre Poblaciones en Actividad Antiviral y Virucida

En la Tabla 3.4 se muestra el efecto de los extractos, como porcentaje de inhibiciones de HSV-I y CHIKV, al ser aplicados al cultivo celular una vez que el virus infectó a la célula (actividad antiviral) y aplicados a las partículas virales antes que ingresen a la célula hospedadora (actividad virucida). Los extractos que causaron porcentajes de inhibición inferiores al 50 % se consideraron sin actividad (Konigheim, 2012).

Tabla. 3.4. Variabilidad I para actividad antiviral y virucida de extractos orgánicos y acuosos caliente, obtenidos de material vegetal recolectado de poblaciones silvestres de *Baccharis crispera* de la provincia de Córdoba, frente a HSV-I y CHIKV.

Extracto	Población	Actividad Antiviral		Actividad Virucida	
		% Inhibición HSV-I ± D.E	% Inhibición CHIKV ± D.E	% Inhibición HSV-I ± D.E	% Inhibición CHIKV ± D.E
EChCl3	Villa del Parque	17,6(a) (A) ±1,87	45,7(a) (B) ± 1,10	27,71 (c) (A) ±0,40	0,17(a) (A) ± 0
	Tala Cañada	41,3(b) (B) ±0	59,4(b) (C) ± 2,46	0 (a) (A) ±0	0 (a) (A) ± 0
	San Gerónimo	48,3(c) (A) ±1,82	67,0(c) (A) ±0,54	13,52 (b) (A) ± 1,25	24,04 (b) (A) ± 0,13
	Puesto Pedernera	55,2(d) (A) ±0,27	81,6(d) (B) ± 0,69	40,76 (d) (A) ± 0,36	37,34 (c) (A) ± 0,18
EEtOH	Villa del Parque	32,5(a) (B) ±3,56	35,9(a) (A) ± 2,60	41,43 (b) (B) ± 0,2	26,07 (a) (C) ± 0,2
	Tala Cañada	57,6(b) (C) ±1,56	48,4(b) (B) ± 1,01	27,30 (a) (B) ± 0,19	23,86 (a) (B) ± 0,13
	San Gerónimo	61,6(b) (B) ±2,41	63,5(c) (A) ± 5,69	28,14 (a) (B) ± 0,21	36,43 (b) (C) ± 0,15
	Puesto Pedernera	78,7(c) (B) ±3,34	79,0(d) (B) ± 0,91	66,29 (c) (C) ± 2,31	60,02 (c) (B) ± 1,47
EAc	Villa del Parque	19,4(a) (A) ±0	35,8(b) (A) ± 0,45	28,14(b) (A) ± 0,21	12,53 (a) (B) ± 0
	Tala Cañada	32,2(b) (A) ±0,73	27,8(a) (A) ± 0,91	41,02 (c) (C) ± 0,38	36,22 (c) (C) ± 0,14
	San Gerónimo	40,9(b) (A) ±4,62	57,9(c) (A) ± 0,59	14,13 (a) (A) ± 0,4	35,48 (b) (B) ± 0,12
	Puesto Pedernera	56,2(c) (A) ± 4,74	74,0(d) (A) ± 2,60	56,01 (d) (B) ± 1,2	36,60 (d) (A) ± 0,19

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición respecto de los controles virales (100 %). Letras minúsculas distintas marcan diferencias significativas entre poblaciones considerando el tipo de extracto (DGC, $p \leq 0,05$). Letras mayúsculas distintas marcan diferencias significativas dentro de cada población entre sus extractos (DGC, $p \leq 0,05$) (). Porcentajes de inhibición $\geq 50\%$, considerados extractos con actividad (Konigheim, 2012).

Al evaluar la variabilidad para la actividad antiviral, se determinó que existen diferencias significativas entre las poblaciones para cada tipo de extracto evaluado (DGC, $p \leq 0,05$), tanto sobre HSV-I como sobre CHIKV. Se destaca la población de Puesto Pedernera (PP) porque sus extractos tuvieron el mayor porcentaje de inhibición sobre ambos virus; siendo bioactivos los tres tipos de extractos evaluados. En contraposición, los extractos de la población de Villa del Parque (VP) no fueron bioactivos sobre HSV-I y CHIKV. Los extractos de las poblaciones de Tala Cañada (TC) y San Gerónimo (SG), presentaron una actividad moderada y variable, en cuanto al tipo de extracto que presentó inhibición. El extracto etanólico (EEtOH) de las poblaciones PP, TC y SG resultó ser el que mejor actúa sobre el HSV-I, mientras que el extracto clorofórmico (ECHCl₃), de las mismas poblaciones resultó ser el más activo frente a CHIKV. Al evaluar los extractos acuosos, el de PP tuvo actividad moderada contra HSV-I, mientras que para CHIKV mostró mayor actividad, situación similar a la detectada con los otros dos extractos. Por último, la población SG fue moderadamente activo contra CHIKV.

Al evaluar la variabilidad entre las poblaciones, para la actividad virucida, se encontró que existen diferencias significativas entre las poblaciones para cada tipo de extracto evaluado (DGC, $p \leq 0,05$) tanto sobre HSV-I como sobre CHIKV. En general, la actividad virucida encontrada (cuantificada como % de inhibición), fue menor que la actividad antiviral. Solo los extractos etanólico y acuoso de la población de PP presentaron inhibición superior al 50 %. El primer tipo de extracto fue activo sobre HSV-I y CHIKV; mientras que el acuoso solamente, y con actividad moderada, sobre HSV-I.

Variabilidad para Actividad Antiviral y Virucida dentro de cada población entre sus extractos

Se realizaron análisis de la varianza para conocer si entre los 3 tipos de extractos evaluados, dentro de cada población, había diferencias significativas (DGC, $p \leq 0,05$), por un lado en la actividad antiviral, y por otro en la actividad virucida. Todas las poblaciones mostraron variabilidad en el porcentaje de inhibición (% I), considerando las dos actividades frente a HSV-I y CHIKV (Tabla 3.4).

La población de TC fue la que presentó más variabilidad al considerar la actividad antiviral contra HSV-I y CHIKV, a pesar de no ser la población con mayor potencial bioactivo. Respecto a la población PP, al realizar el análisis de la varianza para determinar la variabilidad del efecto inhibitorio antiviral entre sus extractos contra HSV-I se encontró que el extracto etanólico difiere significativamente del extracto clorofórmico y del acuoso caliente, mostrando mayor efecto inhibitorio. Contra CHIKV el efecto antiviral de los extractos clorofórmico y etanólico no difirieron significativamente, pero ambos si lo hicieron del acuoso caliente. Al considerar la actividad virucida, el efecto inhibitorio del extracto etanólico frente a HSV-I fue significativamente mayor del acuoso caliente, que presentó un % I cercano al 50 %, y del clorofórmico, que no tuvo efecto virucida por tener un % I menor de 50 %. También se encontró variabilidad en el efecto virucida de los extractos de PP contra CHIKV. El efecto inhibitorio del extracto etanólico fue significativamente superior al efecto de los extractos clorofórmico y acuoso caliente, quienes causaron inhibición inferior al 50 %.

DISCUSIÓN

El valor predictivo de los estudios de citotoxicidad se basa en que cuando se afectan funciones celulares básicas y, comunes a todas las células, la determinación del daño celular es una medida aproximada de la toxicidad general de un compuesto determinado (Repetto y Repetto Khun, 2009). A partir de la cuantificación de la citotoxicidad, se determina el valor de concentración que provoca daño celular evidente al 50 % de los cultivos tratados (concentración citotóxica media, CC_{50}). La obtención de este valor nos permite posteriormente emplear intervalos de concentración no-tóxicos o sub-tóxicos en los ensayos de actividad antiviral (Konigheim, 2012). Este intervalo va entre la CC_{50} , empleada para ensayos de actividad virucida, y la máxima concentración no citotóxica o CC_{10} , empleada en ensayos de actividad antiviral

En el género *Baccharis* se han reportado evaluaciones de citotoxicidad de extractos orgánicos y acuosos, para la determinación de concentraciones citotóxicas para la realización de ensayos antivirales. Así, en *B. genistelloides* recolectada en Ecuador, la CC_{10} del extracto hidroalcohólico fue de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (Taopanta Iza, 2018); los extractos acuoso caliente y etanólico de la misma especie recolectada en Bolivia tuvieron una CC_{10} de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, al ser evaluados empleando la línea celular Vero (Abad *et al.*, 1.999a). Simoni *et al.* (2018), determinaron que la CC_{10} de extractos hidroalcohólicos de ejemplares femeninos y masculinos de *B. dracunculifolia* fue de 250 $\mu\text{g/mL}$ y de 125 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Monthana *et al.*, (2004) encontraron que el extracto hidroalcohólico de *B. erioclada* fue más citotóxico que el acuoso caliente, siendo sus CC_{10} de 500 $\mu\text{g/mL}$ y de 1250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, y que la CC_{10} del extracto hidroalcohólico de *B. uncinella* fue de 1250 $\mu\text{g/mL}$. Entre las especies evaluadas también se encontraban *B. articulata* y *B. trimera*, los extractos acuosos calientes de ambas especies presentaron valores de citotoxicidad (CC_{10}) mayores a 1000 $\mu\text{g/mL}$; mientras que los hidroalcohólicos presentaron el mismo valor de CC_{10} , 250 $\mu\text{g/mL}$. En Argentina, el extracto etanólico de *B. articulata*, de la provincia de Córdoba, tuvo una CC_{10} de 2.200 $\mu\text{g/mL}$ sobre células Vero (Zanon *et al.*, 1999). En otros estudios realizados para evaluar la citotoxicidad del extracto acuoso de *B. articulata* de Córdoba, la CC_{10} fue de 600 $\mu\text{g/mL}$ (Torres *et al.*,

2011). Al igual que en otras especies del género, los valores de CC_{10} obtenidos en los resultados de esta tesis, al evaluar la citotoxicidad de los extractos clorofórmico, etanólico y acuoso caliente, presentaron variación en este valor al comparar el mismo tipo de extracto entre poblaciones. Más aún, se ha encontrado variación dentro de cada población entre sus extractos. Lo mismo pasa con el valor de CC_{50} de los extractos orgánicos y acuoso de las poblaciones silvestres evaluadas. Para el género *Baccharis*, el antecedente encontrado de CC_{50} es del extracto acuoso frío de *Baccharis articulata*, obtenido de material recolectado de poblaciones silvestres de Córdoba; en él se reporta una CC_{50} de 150 $\mu\text{g/mL}$ al ser evaluada la citotoxicidad *in vitro* empleando linfocitos humanos como cultivo celular (Cariddi *et al.*, 2010). Al comparar este resultado con los valores de CC_{50} encontrados para los extractos acuosos de *B. crispa* evaluados, se observa que son menos citotóxicos que los de *B. articulata*, ya que los valores de CC_{50} asumieron valores por encima del doble que lo citado para *B. articulata*. La variabilidad encontrada entre y dentro de las poblaciones evaluadas en los valores de CC_{10} y CC_{50} demuestra la importancia de considerar material vegetal de la misma especie de distinta procedencia para la realización de estudios de bioactividad. La variabilidad observada se debe a que los principios activos, cantidad y presencia, responsables de las propiedades biológicas, dependen fundamentalmente de factores ambientales que imperan en el lugar donde la planta se ha desarrollado y de la respuesta adaptativa de distintos genotipos a su ambiente (Ratera y Ratera, 1980); por lo que es de esperar que la calidad de un producto de origen vegetal con destino terapéutico esté definida en una primera instancia por el genotipo y posteriormente por su interacción con el ambiente (Chaves, 2012).

Siguiendo el criterio que define que sustancias con $CC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$ son consideradas citotóxicas (Geran *et al.*, 1972, citado de Cariddi *et al.*, 2010), los extractos de *B. crispa* evaluados pueden ser considerados no citotóxicos. En general, el orden de más tóxico a menos tóxico de los extractos fue clorofórmico, etanólico y acuoso; con excepción de los extractos de la población de Villa del Parque, en que el orden de toxicidad fue etanólico, clorofórmico y acuoso.

Considerando la actividad antiherpética, evaluada *in vitro*, en el género se ha demostrado actividad antiviral del extracto etanólico de *B. articulata* contra *Herpes suis virus* (Zanon *et al.*, 1999, Torres *et al.*, 2011). Este virus está estrechamente relacionado con HSV-I. Los extractos acuoso caliente y etanólico de *B. genistelloides*, mostraron ser activos para el control de HSV-I y para el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Abad *et al.*, 1999a). El extracto acuoso de *B. trinervis* demostró actividad antiviral *in vitro* contra HSV-I en un rango de concentraciones de 50 a 200 µg/mL. Este extracto presentó un porcentaje de inhibición de 100 % sin producir efectos citotóxicos (Abad *et al.*, 1999b). Extractos hidroalcohólicos de *B. dracunculifolia*, elaborados con ejemplares masculinos y femeninos fueron activos frente a Herpes Virus equino (EqHVS-1), con porcentajes de inhibición de 68,4 % y 78,1 % respectivamente (Simoni *et al.*, 2018). Monthana *et al.*, (2004) demostraron actividad antiherpética en especies del género *Baccharis* nativas del sur de Brasil, frente a Herpes Simple Tipo I (HSV-I) cepa Kos. Los extractos hidroalcohólico y acuoso caliente de *B. erioclada* y el extracto hidroalcohólico de *B. uncinella* fueron bioactivos. También se incluyeron las especies *B. articulata* y *B. trimera*, aunque sus extractos no fueron bioactivos frente HSV-I. Rivarola *et al.* (2009), encontraron que concentraciones subtóxicas de extractos acuosos y orgánicos de *B. crispa* inhiben al virus Herpes Simple Tipo I (HSV-I) y Encefalitis Equina Venezolana (EEV). De la misma manera que en otras especies del género, los extractos orgánicos y acuoso de las poblaciones evaluadas mostraron actividad antiviral contra HSV-I. Al igual que lo observado con la citotoxicidad la actividad antiviral presentó variabilidad entre y dentro de las poblaciones. Tal es así que por ejemplo, los extractos de la VP no fueron activos contra HSV-I, mientras que los tres tipos de extractos de PP presentaron actividad antiviral. El extracto etanólico presentó el mejor potencial bioactivo para el control de HSV-I *in vitro*. La actividad antiviral observada podría estar asociada al contenido de ácidos cafeoilquínicos: clorogénico, isoclorogénico y cafeico descritos en la especie (Palacios *et al.*, 1999; Alonso y Desmarchelier, 2006). En cuanto a la actividad virucida, evaluada mediante una inactivación de las partículas virales por contacto directo, de extractos de plantas del género, el extracto acuoso caliente de *B. articulata* demostró actividad virucida (inhibición 80%) contra *Herpes suis virus* (Torres *et al.*, 2011). El extracto acuoso de *B. gaudichaudiana* demostró que fue capaz de inhibir la replicación de

HSV-I (Visintini Jaime, 2014). También el extracto acuoso de *B. anómala* presentó actividad virucida contra HSV-I (Venturi *et al.*, 2018). De las poblaciones de *B. crispa* evaluadas, solo PP demostró actividad virucida. Los extractos etanólico y acuoso caliente fueron los responsables de esta actividad. De estos dos extractos, la actividad del etanólico fue significativamente superior al del acuoso caliente. Además de encontrar potencial bioactivo contra HSV-I, se encontró variabilidad en la inhibición que causan los extractos entre y dentro de las poblaciones evaluadas.

Para CHIKV no hay antecedentes relacionados con la búsqueda de compuestos bioactivos, con actividad antiviral y virucida, de origen natural provenientes de especies del género *Baccharis*. Los resultados demuestran que los extractos evaluados de *B. crispa* poseen potencial antiviral y virucida contra CHIKV. Al igual que con la citotoxicidad y la actividad antiviral contra HSV-I hubo variabilidad en la respuesta de los extractos entre y dentro de las poblaciones. En cuanto a la actividad virucida, solo el extracto etanólico demostró capacidad para inhibir al virus. La información generada relacionada al uso de la especie con potencial para el control de CHIKV, es un avance a la búsqueda de compuestos antivirales de origen natural novedosos.

En general los extractos de las cuatro poblaciones mostraron mejor potencial bioactivo antiviral que virucida frente a HSV-I y CHIKV. Al analizar el efecto antiviral de los extractos dentro de cada población se observó mayor efecto inhibitor sobre CHIKV que sobre HSV-I. Dentro de cada población los extractos orgánicos causaron mayor inhibición que los acuosos en la actividad antiviral contra HSV-I y CHIKV.

La domesticación opera con base en el manejo de la variabilidad que generalmente existe dentro de las poblaciones de las especies que interesa domesticar (Casas y Parra, 2016). Por esta razón es importante conocer si el germoplasma de *B. crispa* evaluado, que es con el que se está iniciando la domesticación, cuenta con variabilidad en los caracteres morfométricos y los relacionados con su bioactividad que se propusieron evaluar. Documentar si una planta medicinal aromática está en proceso de domesticación no es tarea fácil ya que cuentan con una gran variación morfológica y en la concentración de

metabolitos secundarios (Carrillo Galván *et al.*, 2016). La mayoría de los trabajos concernientes a estas plantas están enfocados a encontrar compuestos activos que puedan ser utilizados en la industria farmacéutica para el tratamiento de alguna enfermedad (Lewis, 2003; Duke *et al.*, 2002). Se requiere comprobar si la domesticación provoca cambios en la concentración de los metabolitos secundarios entre las plantas cultivadas vs. silvestres, responsables de su actividad biológica (Usai *et al.*, 2015). Esto es así ya que existen antecedentes que en varias especies de plantas domesticadas se han perdido metabolitos secundarios que siguen presentes en las plantas silvestres (Chávez Pesqueira, 2017). En relación a lo expuesto se ha demostrado la existencia de variabilidad entre y dentro de las poblaciones evaluadas en el efecto de los extractos orgánicos y el acuoso, el considerar su citotoxicidad, su actividad antiviral y su actividad virucida. Se requiere continuar con el estudio de bioactividad del germoplasma silvestre cultivado en un mismo ambiente y en la determinación de los compuestos responsables de la bioactividad observada

CONCLUSIONES

- Las poblaciones silvestres de *B. crispera* evaluadas demostraron potencial actividad antiviral *in vitro* sobre los virus HSV-I y CHIKV.
- Los extractos clorofórmicos, etanólicos y acuosos evaluados mostraron potencial actividad antiviral, pero hubo diferencias entre el potencial inhibidor de los distintos tipos de extractos dentro de cada población y entre las poblaciones estudiadas.
- Los extractos evaluados demostraron mayor potencial antiviral que virucida.
- Considerando que los extractos que causaron porcentajes de inhibición < 50 % no son bioactivos se concluye que de la población Villa del Parque no presentó actividad antiviral y virucida; y que los extractos de la población Puesto Pedernera fueron los que mejor respuesta bioactiva tuvieron. San Gerónimo y Tala Cañada tuvieron una respuesta moderada.
- Entre los extractos de Tala Cañada se observó la mayor variabilidad considerando el porcentaje de Inhibición Antiviral sobre HSV-I y CHIK-V
- Salvo la inhibición en la actividad virucida del extracto clorofórmico de la población de Tala Cañada, el resto de los extractos de las poblaciones evaluadas presentaron inhibición distinta de cero. Por esta razón y considerando que los principios activos responsables de las propiedades bioactivas dependen el genotipo y de su interacción con el ambiente donde se desarrolla un individuo, sería conveniente evaluar la respuesta de estas poblaciones cultivadas en un mismo ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad M.J., Bermejo P., Gonzales E., Iglesias I., Irurzun A. y Carrasco L. 1999a. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology* 32: 499-503.
- Abad M.J., Bermejo P., Sanchez Palomino S., Chiriboga X. and Carrasco L. 1999b. Antiviral activity of some South American Medicinal Plants. *Phytotherapy Research* 13: 142-146.
- Akram M., Mahmood Tahir I., Ali Shah S.M., Mahmood Z., Altaf A., Ahmad K., Munir N., Daniyal M., Nasir S. and Mehboob H. 2018. Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis and coxsackievirus: A systematic review. *Phytotherapy research* 32: 811-822.
- Alonso J. y Desmarchelier C. 2006. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. 1ª ed. Fitociencia, Buenos Aires, Argentina, 680pp.
- Bascones-Martínez A. y Pousa-Castro X. 2011. Herpesvirus. *Av. Odontoestomatol* 27 (1): 11-24.
- Boletín epidemiológico. 2016. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia. Secretaria de Promoción y programas sanitarios. N° 298 – SE 8 – Febrero de 2016. Publicado en internet. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/boletin-integrado-de-vigilancia-n298-se8.pdf> Activo julio de 2020.
- Borenfreund E. and Puerner J.A. 1985. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*, 24 (2-3): 119-124.
- Cariddi L.N., Escobar F.M., Sabini M.C., Torres C.V., Zygadlo J.L and Sabini L.I. 2010. First approaches in the study of cytotoxic and mutagenic damage induced by cold aqueous extract of *Baccharis articulata* on normal cells. *Molecular Medicinal Chemistry* 21: 4-7.
- Carrillo Galván G., Bye R.A. y Erguiarte L.E. 2016. Domesticación de plantas medicinales aromáticas. En: Domesticación en el continente americano. Historia y perspectiva del manejo de los recursos genéticos en el Nuevo Mundo. Casas A., Torres Guevara J. y Parra F. (eds). México pp 692 - 713
- Casas A. y Parra F. 2016. La domesticación como proceso evolutivo. En: Domesticación en el continente americano. Historia y perspectiva del manejo de los recursos genéticos en el Nuevo Mundo. Casas A., Torres Guevara J. y Parra F. (eds). México pp 126 – 152.
- Chaves A.G. 2012. Caracterización fenotípica de poblaciones silvestres de carqueja (*Baccharis crispa* Spreng.) de la zona de Sierras de la Provincia de Córdoba. Tesis Magíster en Ciencias Agropecuarias. Mención producción Vegetal. Universidad Nacional de Córdoba. 60 pp.
- Chávez Pesqueira M. 2017. Síndromes de domesticación en plantas. Desde el Herbario CICY, 9: 79–83.
- Del Barrio G., Álvarez Rodríguez Á.L., Valdés García S.M. y Parra Fernández F. 2008. Metodología de pesquisa preclínica de actividad anti-herpesvirus a partir de productos naturales. *Revista Cubana de Farmacia* 42(2), 0-0.

- Del Barrio G. y Parra F. 2000. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. Journal of ethnopharmacology 72(1-2) 317-322.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C.W. 2017. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infoStat.com.ar>
- Di Rienzo J.A., Guzmán A.W. and Casanoves F. 2002. A Multiple Comparisons Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. Journal of Agricultural, Biological, and Environment Statistics, 7 (2): 1-14.
- Duke J.A., Bogenschutz-Godwin M., duCellier J. y Duke P.A. 2002. Handbook of medicinal spices. 2da. Ed. CRC Press LLC. Boca Raton, FL. 870 pp.
- Earley E., Peralta P.H. and Johnson K.M. 1967. A plaque neutralization method for arboviruses. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 125(3): 741-747.
- Fernández Romero J.A., Del Barrio G., Romeu Alvarez B., Gutierrez Y., Valdés V.S. and Parra F. 2003. *In vitro* antiviral activity of *Phyllanthus orbicularis* extracts against herpes simplex virus type 1. Phytotherapy Research 17(8): 980-982.
- Geran R.I., Greenberg N.H., McDonald M.M., Schumacher A.M. and Abbot B.J. 1972. Protocol for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. Cancer Chemoteraphy Reports 3: 1-103.
- Kantor I.N. 2018. Dengue, Zika, Chikungunya y El Desarrollo De Vacunas. Medicina 78: 23-28
- Konigheim B.S. 2012. Prospección de productos naturales con potencial actividad antiviral obtenidos a partir de especies nativas de género *Larrea* (tesis doctoral). Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina, 299 pp.
- Lewis W. H. (2003). Medical botany: plants affecting human health. 2da. Ed. New Jersey. 812 pp.
- Lingua G., Aguilar J.J., Chaves A.G., Ojeda M.S., Torres L.E., Contigiani M.S. y Konigheim B.S. 2018. Bioactividad de extractos de *Baccharis crispa* Spreng. (*Asteraceae*), frente a los virus Chikungunya y Herpes simple tipo I. JIC. 3 de octubre de 2018. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Monthana J.A., Moellerke P., Bordignon S.A.L., Schenkel E.L. and Roehle P.M. 2004. Antiviral activity of brasilian plant extracts. Acta Far.Bonaerense 23 (29): 183-186.
- Palacios P.S., Wilson E.G. y Debenedetti S.L. 1999. Análisis por HPLC de ácidos cafeilquínicos presentes en tres especies de *Baccharis*. Dominguezia 15(1): 39-46.
- PAHO. 2013. Enfermedades virales. Publicado en internet. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7927:2013-enfermedades-virales&Itemid=39407&lang=en Activo julio de 2020.
- Praena B. y López-Guerrero J.A. 2019. Nuevas y posibles alternativas a los antiherpéticos actuales. Virología 22 (3): 3-4.
- Ratera E.L. y Ratera M.O. 1980. Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina, 190 pp.
- Repetto G., del Peso A. and Zurita J.L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nat. Protoc 3 (7), 1125-1131.
- Repetto M y Repetto Khun G. 2009. Toxicología Fundamental. Díaz de Santos y Enpses-Mercie Group Sevilla, España, 620 pp.

- Rivarola M.E, Boris A.S, Chaves G., Konigheim B., Aguilar J.J. y Contigiani M. 2009. Evaluación de la actividad antiviral de *Baccharis crispa* Spreng. XI Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología. 2 al 4 de Diciembre. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Simoni I.C., Aguiar B., Martineli de Araujo Navarro A., Martins Parreira R., Bittencourt Fernandes M.J., Frankland Sawaya A.C.H. and FÁvero O.A. 2018. *In vitro* antiviral activity of propolis and *Baccharis* sp. extracts on animal herpesviruses. *Arq. Inst. Biol.* 85:1-7.
- Taopanta Iza T.B. 2018. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. Trabajo de titulación Bioquímica Farmacéutica. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba, Ecuador, 84 pp.
- Torres C.V., Domínguez M.J., Carbonari J.L., Sabini M.C., Sabini L.I. y Zanon S.M. 2011. Study of Antiviral and Virucidal Activities of Aqueous Extract of *Baccharis articulata* against *Herpes suis* virus. *Natural Product Communications* 6 (7): 994-994.
- Usai M., Mulas M. y Marchetti M. 2015. Chemical composition of essential oils of leaves and flowers from five cultivars of myrtle (*Myrtus communis* L.). *Journal of Essential Oil Research* 27(6), 465–476.
- Vahidnia F., Stramer S., Kessler D., Shaz B., Leparc G. and Krysztof D. 2017. Recent viral infection in US blood donors and health-related quality of the life (HRQOL) Quality of life research 26 (2): 349-357.
- Venturi C.R., De Loreto Bordignon S.A., Roehle P.M., Montanha J.A., Cibulski S.P. and Gosman G. 2018. Chemical analysis and antiviral activity evaluation of *Baccharis anómala*. *Natural Product Research* 32 (16): 1960-1962.
- Villar del Fresno A.M. 1999. *Farmacognosia general*. Síntesis S.A, Madrid, España, 336 pp.
- Visintini Jaime M.F. 2014. Actividad antiviral de plantas medicinales argentinas de la familia *Asteraceae*. Identificación de compuestos bioactivos y caracterización del mecanismo de acción. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 182 pp.
- WHO. 2012. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections. Publicado en internet, disponible en https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75181/9789241503839_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y Activo diciembre de 2019.
- WHO. 2016. Fiebre chikungunya — Argentina. Publicado en internet, disponible en <https://www.who.int/csr/don/14-march-2016-chikungunya-argentina/es/> Activo julio 2020.
- WHO. 2017a. Chikungunya. Publicado en internet, disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya> Activo julio 2020.
- WHO. 2017b. Virus del herpes simple. Publicado en internet, disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus#vhs1> Activo julio 2020.

- Yang C.M., Cheng H.Y., Lin T.C., Chiang L.C. and Lin C.C. 2005. Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection *in vitro*. *Antiviral Research* 67(1): 24-30.
- Zanon S.M., Ceriatti F.S., Rovera M., Sabini L.J. y Ramos B.A. 1999. Search for Antiviral Activity of Certain Medicinal Plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 41: 59-62.

PROPAGACIÓN SEXUAL Y ASEXUAL DE LA ESPECIE

Baccharis crispa Spreng.

INTRODUCCIÓN

En la provincia de Córdoba la explotación de la flora nativa para uso medicinal se realiza a través de la extracción directa del monte natural, lo cual ha llevado a reducciones drásticas en las poblaciones silvestres de estas especies (Reinoso *et al.*, 2019). En este sentido, Barboza *et al.* (2009) afirman que *Baccharis crispa* Spreng. se encuentra amenazada y que si su demanda pudiera ser satisfecha a partir de fuentes cultivadas se aliviaría la presión de recolección a la que son sometidas sus poblaciones silvestres.

Los estudios sobre la multiplicación de germoplasma de poblaciones vegetales naturales, junto con la evaluación de su variabilidad, constituyen la base para su posterior domesticación y manejo (Jaramillo y Baena 2000). Por un lado, manejando la germinación se puede reproducir y rescatar especies vegetales amenazadas (Araóz *et al.*, 2016). Por el otro, ajustar un método adecuado de multiplicación asexual permite la multiplicación rápida y de bajo costo de germoplasma de interés, manteniendo las características de interés agronómico y farmacológico de las plantas producidas (De Bona *et al.*, 2005a).

La calidad de una semilla está definida por sus características genéticas, físicas, fisiológicas y sanitarias, determinando su valor para la siembra y el almacenamiento (Marcos Filho, 2005). La germinación estándar es la prueba aplicada para determinar el potencial de germinación de un lote de semillas. Se define germinación de semillas, en condiciones de laboratorio, a la emergencia y desarrollo de las plántulas normales, de modo tal que sus estructuras esenciales sean capaces de desarrollar una futura planta bajo condiciones favorables (ISTA, 2014).

Estudios de multiplicación sexual realizados con especies nativas del género han demostrado fotoblastismo positivo (Ferreira *et al.*, 2001; Carvalho *et al.* 2005; Garcia *et al.*, 2006), que tienen distintos requerimientos de temperatura para germinar y que en general, tienen bajo porcentaje de germinación asociado a un alto porcentaje de semillas vacías (Ferreira *et al.*, 2001; Davies, 2004; Araóz *et al.*, 2012). Con referencia a *B. crispa* son muy pocos los antecedentes registrados hasta el momento. Los porcentajes de germinación reportados al evaluar la respuesta germinativa a lo largo de 18 meses desde la recolección de la semilla no superan el 47 % (Sosa y Fernández, 2000). Heiden (2005) demostró que a 25°C y en presencia de luz se favorece la germinación, reportando en estas condiciones un porcentaje de germinación del 40 %. Por su parte Araóz *et al.* (2016) evaluaron la respuesta germinativa de semillas provenientes de una población silvestre de la provincia de Córdoba y observaron valores inferiores a 30% de poder germinativo.

Entre las especies del género *Baccharis*, conocidas como carquejas, *Baccharis trimera* y *Baccharis articulata* registran la mayor cantidad de antecedentes relacionados con la multiplicación asexual. Habiéndose evaluado el porcentaje de enraizamiento en función del tipo de estaca, del estado fenológico de la planta madre, del tipo de sustrato y de la aplicación de fitohormonas (De Bona *et al.*, 2004; De Bona *et al.*, 2005 a; De Bona *et al.*, 2005 b; Sousa *et al.*, 2006, Carvalho *et al.*, 2007). Para *B. crispa* se ha reportado un único antecedente (Céspedes de Zárate *et al.*, 2011). En él se informa un porcentaje de prendimiento de 54 % de estacas obtenidas *in situ* de plantas de poblaciones silvestres.

A raíz de los escasos reportes existentes relacionados a la propagación de la especie *B. crispa*, y dado que esta información es básica para iniciar su domesticación, se planteó como uno de los objetivos del presente trabajo de tesis realizar estudios de propagación sexual (por semillas) y asexual (por estacas) de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

MULTIPLICACIÓN SEXUAL

Material vegetal:

Se trabajó con aquenios de *Baccharis crispa* Spreng., recolectados en junio de 2014 en el paraje San Gerónimo, Dto. Pocho, Córdoba, Argentina (31°21'57,4'' S y 64°57'11,5'' O). De aquí en adelante se empleará el término semilla, aunque la unidad de dispersión es el fruto semilla: aquenio (Fig. 4.1 B). Se registró el porcentaje de plántulas normales (PN) (Fig. 4.1 C-D), por ser considerado equivalente al porcentaje de germinación (ISTA, 2014). Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis de Semillas, Investigación, Docencia y Servicio (LASIDYS) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (F.C.A.), Universidad Nacional de Córdoba (U.N.C.), de acuerdo con el protocolo propuesto por Aráoz *et al.* (2016), realizando el registro y las mediciones de plántulas normales una vez por semana.

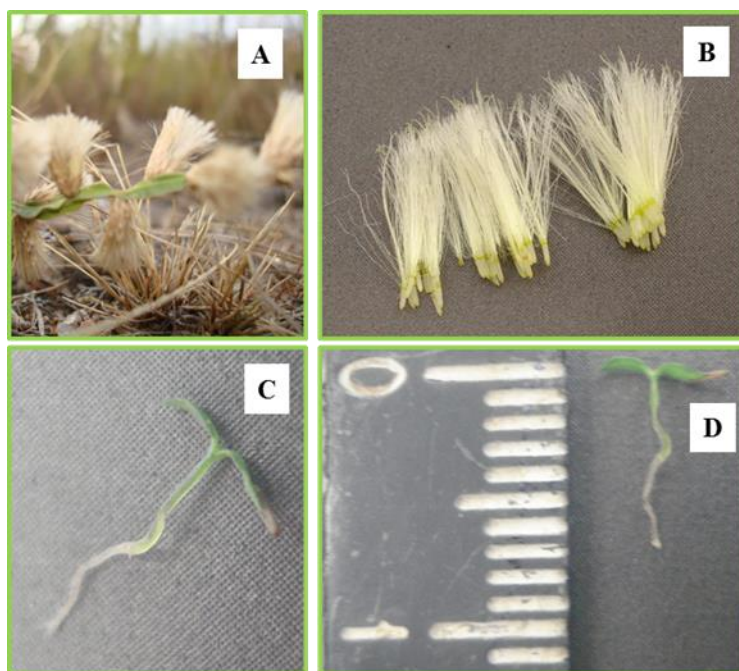


Figura. 4.1. A. Aquenios maduros en inflorescencia femenina. B. Aquenios de *Baccharis crispa* Spreng. C y D. Plántulas normales de *B. crispa*

Determinación de semillas llenas:

Del *pool* de semillas, se tomaron 50 que conservaban restos de inflorescencia y 50 sin restos de inflorescencia (este procedimiento se realizó tres veces). Empleando lupa y bisturí, a cada semilla se le realizó un corte longitudinal para observar la presencia de embrión. El resultado se expresó como porcentaje (%) de semillas con restos florales con embrión y porcentaje (%) de semillas sin restos florales con embrión. A partir del resultado obtenido se determinó qué tipo de semillas seleccionar para la realización de los ensayos de germinación.

Desinfección del material:

Previo a la siembra, las semillas se desinfectaron en dos etapas: I) durante un minuto en una solución de alcohol al 70 % (v/v), luego se realizó un enjuague con 100 mL de agua destilada; II) durante diez minutos en una solución hipoclorito de sodio (lavandina comercial) 10 % (v/v), seguido de dos enjuagues con 100 mL de agua destilada cada uno.

Ensayos de Germinación:

Los ensayos se realizaron en cámara de cría, usando bandejas con papel absorbente humedecido. De cada tratamiento se sembraron cuatro repeticiones de 30 semillas seleccionadas cada uno.

1) Ensayos realizados con semillas sin almacenar (tiempo cero o recién cosechadas): Para probar la respuesta germinativa de las semillas se utilizaron los siguientes tratamientos pregerminativos:

-Ácido Giberélico (AG₃). Antes de sembrar y por única vez, el papel se humedeció con una solución con una concentración de 500 ppm.

-Nitrato de potasio (NO_3K): Antes de sembrar y por única vez, el papel se humedeció con una solución al 0.2 %.

-Calor: las semillas se colocaron en estufa a 35°C por siete días. Luego de este período de tiempo se desinfectaron y se colocaron en las bandejas con papel humedecido con agua destilada.

-Frío: las semillas fueron desinfectadas y se colocaron en las bandejas con papel humedecido con agua destilada. Las bandejas se colocaron en heladera a 7°C por siete días.

-Escarificación: cada semilla, utilizando lupa y bisturí, fue cortada a la altura del vilano. Este procedimiento se realizó antes de la desinfección y siembra en bandejas con papel humedecido con agua destilada.

-Testigo: se sembraron semillas desinfectadas en bandejas con papel humedecido con agua destilada.

Para evaluar la respuesta a la exposición a la luz, los tratamientos mencionados se realizaron tanto con exposición al fotoperiodo de la cámara de cría (cubriendo las bandejas con bolsas transparentes), como en oscuridad total (cubriendo las bandejas con papel de aluminio y bolsas negras). En este último caso, se contabilizaron plántulas normales al concluir el tiempo de ensayo. Todos los tratamientos fueron probados en cámara de cría con temperaturas alternas ($20\text{-}30^\circ\text{C}$) y con temperatura constante de 20°C . En ambos casos con fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad.

En cada uno de los tratamientos se registró el número/porcentaje de plántulas normales y, con el fin de describirlas en cuanto a su vigor, a cada plántula normal se le midió peso fresco (g), longitud de plántula (mm), longitud de raicilla (mm) y longitud de hipocótilo (mm).

De acuerdo a los resultados obtenidos y considerando solo los tratamientos de mejor respuesta germinativa, se delinearón los ensayos posteriores.

2) Con semillas almacenadas en recipientes herméticos a temperatura ambiente, se realizaron ensayos de germinación a los seis; 12 y 18 meses de almacenamiento. Estos ensayos se condujeron en cámara de cría con temperaturas alternas de 20-30 °C y con fotoperíodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad. Los tratamientos germinativos probados fueron: Ácido Giberélico, Calor, Frío y Testigo.

Análisis Estadístico:

Los resultados de los ensayos fueron analizados con el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017). Para la variable plántulas normales se ajustó un modelo lineal generalizado, con distribución binomial y enlace *logit*. Se usó la prueba DGC a posteriori para comparar medias ($\alpha=0,05$) (Di Rienzo *et al.*, 2002). Para las variables cuantitativas registradas en las plántulas normales se utilizó ANAVA y para determinar la significancia estadística se aplicó la prueba a posteriori DGC, con un α de 0,05.

MULTIPLICACIÓN ASEXUAL

Material Vegetal:

A partir de plantas generadas de semillas recolectadas en junio de 2014 en San Gerónimo, se obtuvieron las estacas para llevar a cabo los ensayos de multiplicación asexual. Debido a la morfología de la planta, las estacas tuvieron una longitud variable. No obstante, se tomó como criterio de preparación del ensayo que cada estaca debía tener cinco nudos, dos de los cuales se enterraban, quedando tres nudos por encima del sustrato. Los ensayos se llevaron a cabo en invernadero con condiciones controladas de humedad, a temperatura ambiente y régimen de luz natural (Fig. 4.2). Se emplearon bandejas germinadoras de 72 celdas cada una (volumen de celda=55 cc³). La cantidad de tratamientos, el tipo de estaca, el número de estacas y la cantidad de repeticiones se definió

en base al tipo de suelo donde crecen las poblaciones silvestres y a la cantidad de material vegetal disponible para la realización de los ensayos.

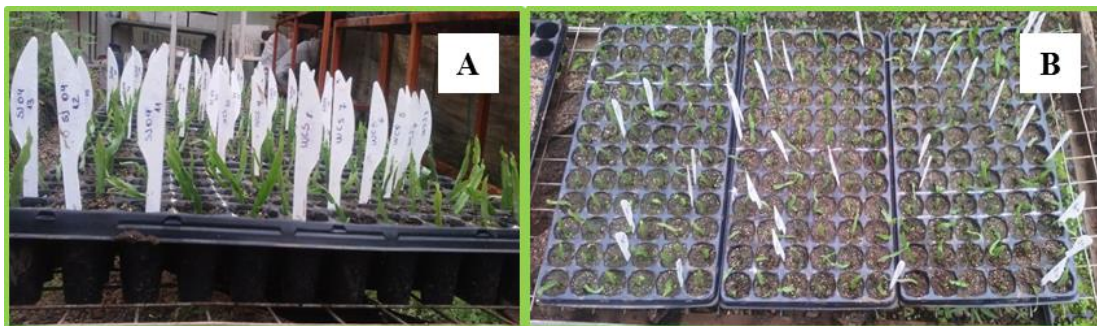


Figura. 4.2. A y B. Estacas de *B. crispata* en bandejas al inicio del ensayo.

Respuesta a distintos sustratos:

Se evaluó el prendimiento de estacas en tres tipos distintos de sustrato: I) arena, II) arena + tierra (1:1) y III) arena + tierra + vermiculita (1:1:1). Para definirlos se consideró el tipo de suelo en el que crecen las poblaciones silvestres. Se realizaron tres repeticiones de 25 estacas cada uno. El ensayo se condujo desde noviembre de 2015 a febrero de 2016. Las variables medidas fueron: prendimiento promedio (estacas que emitieron raíces y brotes) (%), mortandad promedio (%), longitud promedio de raíz (cm), altura inicial (cm) y altura final (cm) de las estacas. Con este dato se analizó el crecimiento promedio de las estacas (cm) y se determinó si la altura inicial tiene correlación con el crecimiento de las estacas.

Respuesta a la aplicación de fitohormona en estacas apicales e internodales:

Las hormonas probadas fueron ANA –Sigma Aldrich-(0.1%) y un fitorregulador de marca comercial Fertifox (ANA 0.1 % + inertes y coadyuvantes). Los dos nudos que se entierran, de cada estaca, se sumergieron por 30 min en las soluciones antes mencionadas. También se realizó un tratamiento testigo, sumergiendo las estacas por 30 min en agua corriente antes de ser plantadas. Los tratamientos se realizaron con estacas apicales e internodales. De cada tratamiento se realizaron dos repeticiones de 36 estacas cada uno. El

ensayo se condujo desde noviembre de 2016 a febrero de 2017 y las variables medidas fueron: prendimiento promedio (estacas que emitieron raíces y brotes) (%), mortandad promedio (%), longitud promedio de raíz (cm), altura inicial (cm) y altura final (cm) de las estacas. Con este dato se analizó el crecimiento promedio de las estacas (cm) y se determinó si la altura inicial tiene correlación con el crecimiento de las estacas.

Análisis Estadístico:

Los resultados de los ensayos fueron analizados con el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017). Para las variables porcentaje de prendimiento promedio y porcentaje mortandad promedio se ajustó un modelo lineal generalizado, con distribución binomial y en lace *logit*. Para las variables longitud promedio de raíz y crecimiento de estaca se utilizó ANAVA. En todos los casos, se usó la prueba DGC a posteriori para comparar medias ($\alpha=0,05$) (Di Rienzo *et al.*, 2002). Para determinar si la altura inicial de la estaca influye sobre el crecimiento se realizó un análisis de correlación, empleando el coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

MULTIPLICACIÓN SEXUAL

Determinación de semillas llenas

Se observaron diferencias estadísticamente significativas (DGC, $p \leq 0,05$) en la proporción de semillas llenas (con embrión) entre las semillas con restos florales y sin restos florales (Fig. 4.3) evaluadas.

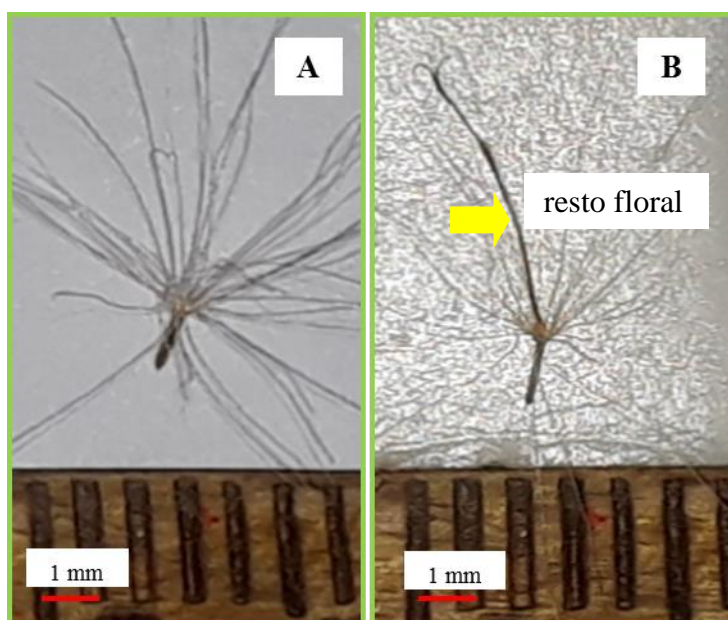


Figura. 4.3. A. Aquenio de *B. crispa* sin resto floral, B. Aquenio de *B. crispa* con resto floral (estilo-estigma).

En la Fig. 4.4 puede observarse que el 65 % de las semillas sin restos florales estaban llenas, mientras que sólo el 29 % de las semillas con restos florales presentaron embrión. A partir de este resultado se definió el criterio de seleccionar las semillas sin restos florales para ser evaluadas en los ensayos de germinación siguientes. La selección se realizó observando en lupa las semillas previamente al inicio de cada ensayo, descartando las que presentaban restos florales.

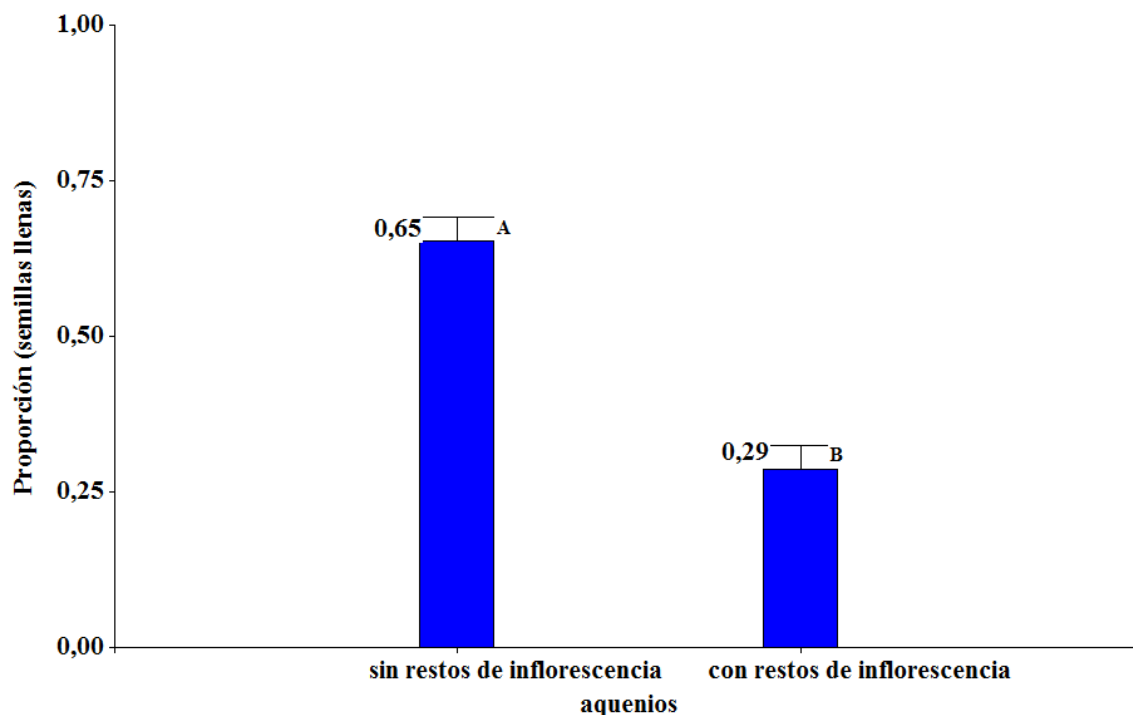


Figura. 4.4. Proporción de semillas llenas sin restos de inflorescencia vs. semillas llenas con restos de inflorescencia. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (DGC, $p \leq 0,05$).

Ensayos de Germinación

No se registró germinación en condiciones de luz y de oscuridad en la cámara de cría de 20 °C continuos. En la cámara de 20-30 °C no se registró germinación en oscuridad, pero si en las semillas expuestas al fotoperíodo de la cámara de cría.

A continuación, se detallan los resultados de los ensayos de germinación conducidos en cámara de cría con temperaturas alternas de 20-30 °C y fotoperíodo de 8 h de luz y 16 de oscuridad.

1) Primer ensayo con semillas recién recolectadas o tiempo cero: el porcentaje más alto de germinación se obtuvo con el tratamiento testigo (38 %), el cual no presentó

diferencias significativas (DGC, $p \leq 0,05$) con los tratamientos Calor, Frío, Ácido Giberélico y Nitrato de Potasio. La escarificación presentó el menor porcentaje de germinación (13 %), siendo solo este tratamiento diferente estadísticamente al resto (Fig. 4.5).

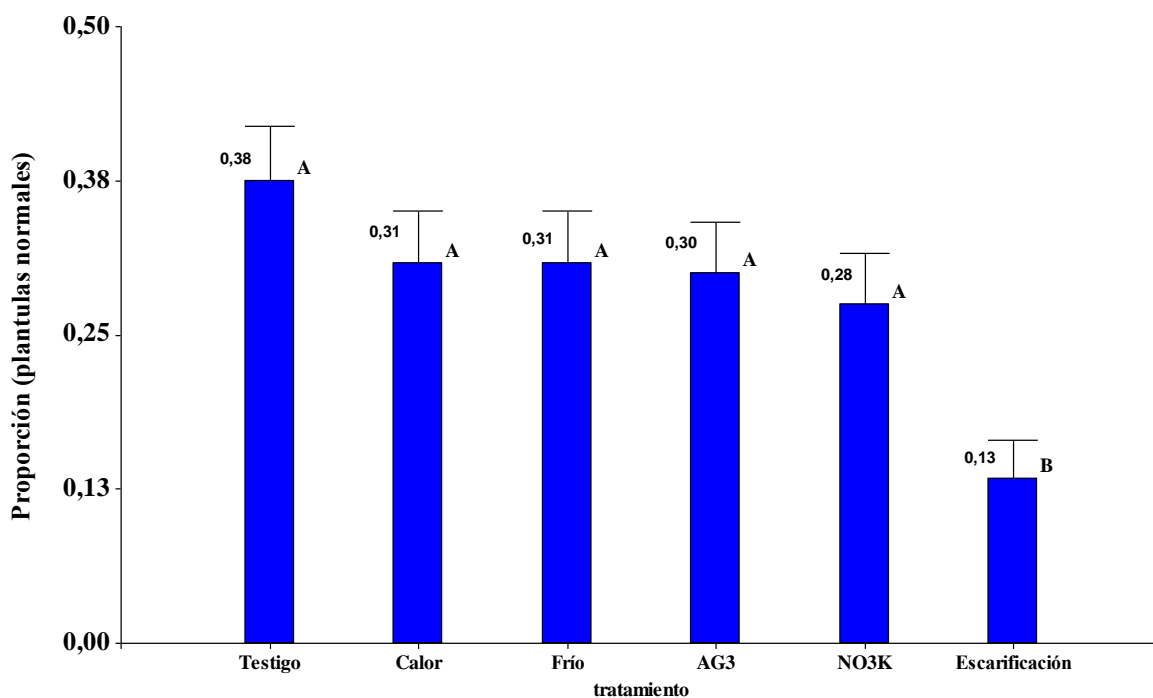


Figura.4.5. Respuesta germinativa (expresada como proporción de plántulas normales) de *B. crispera* frente a 6 tratamientos, empleando semillas recién recolectadas. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (DGC, $p \leq 0,05$).

Los resultados presentados en la Fig. 4.5 indicarían que posiblemente la especie no posee dormición, ya que la mejor respuesta se obtuvo con el testigo (38 %).

A partir de estos resultados se seleccionaron los tratamientos a probar para evaluar si había cambios en la respuesta germinativa en función al tiempo de almacenamiento. Se decidió dejar de lado, como tratamiento pre-germinativos, la escarificación (por la dificultad de realizar el corte del vilano sin dañar el embrión) y el Nitrato de Potasio (debido al alto costo del producto y a que no mejora significativamente el porcentaje de germinación).

Además, a partir de la observación de las plántulas normales fue posible tipificar la germinación de la especie (Barceló Coll *et al.*, 2007; ISTA, 2014) como grupo B.2.1.1.1: B-arbusto, 2-dicotiledónea, 1-germinación epígea, 1-sin enlongación del epicótilo (durante el ensayo) y 1-raíz primaria esencial.

2) Evaluación de la respuesta germinativa de semillas almacenadas por 6, 12 y 18 meses: tal como se observa en la Tabla 4.1, en las semillas con 6 meses de almacenamiento el testigo fue el tratamiento que mostró mayor porcentaje de plántulas normales. En semillas almacenadas durante 12 meses, el porcentaje de plántulas normales fue mayor cuando las semillas fueron pretratadas con AG₃, no obstante, no difirió significativamente del testigo. En semillas almacenadas durante 6 y 12, el tratamiento con frío fue el único que presentó un % PN significativamente inferior al resto de los tratamientos. Finalmente, en semillas almacenadas durante 18 meses, los resultados de los tratamientos frío y calor fueron significativamente menores que los obtenidos con el testigo y el AG₃ (que además no difirieron entre ellos).

Tabla 4.1. Porcentaje de plántulas normales (% PN) de *B. crispata*, obtenidas con semillas almacenadas por 6, 12 y 18 meses, en respuesta a diferentes tratamientos germinativos.

%PN			
Meses de almacenamiento			
	6	12	18
TESTIGO	36 % A	35 % A	31% A
AG ₃	28 % A	41% A	28 % A
Calor	32 % A	38 % A	4 % B
Frío	16 % B	20 % B	11 % B

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

Se seleccionó al tratamiento testigo para analizar si los porcentajes de plántulas normales diferían significativamente al comparar el comportamiento de esta variable en los ensayos realizados con semillas almacenadas por 0, 6, 12 y 18 meses. En la Fig. 4.6 se resume el resultado de este análisis y se observa que no existen diferencias estadísticamente

significativas para el porcentaje de plántulas normales encontradas en los tiempos evaluados.

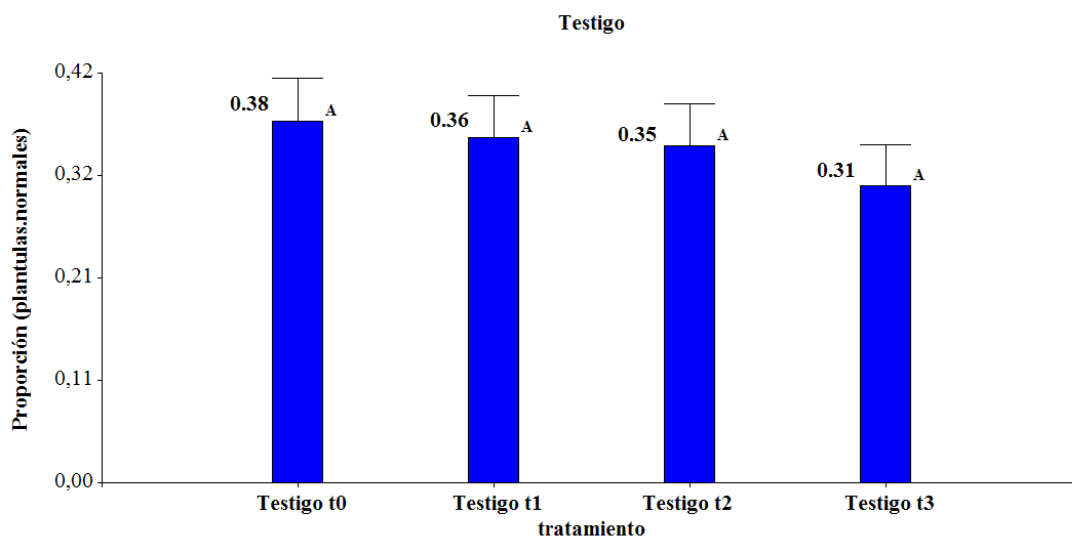


Figura. 4.6. Proporción de plántulas normales, obtenidas al realizar ensayos de germinación con semillas almacenadas por distinto tiempo, obtenidas con el tratamiento testigo. (Testigo t0: 0 mes de almacenamiento; Testigo t1: 6 meses de almacenamiento, Testigo t2: 12 meses de almacenamiento y Testigo t3: 18 meses de almacenamiento). Letras distintas indicarían diferencias estadísticamente significativas (DGC, $p \leq 0,05$).

Estos resultados avalan lo expresado anteriormente referido a que la especie no posee dormición, ya que ni el tiempo de almacenamiento ni la aplicación de tratamientos para provocar la ruptura de dormición mejoran significativamente el porcentaje de plántulas normales obtenidas respecto al tratamiento testigo. Además, se comprobó que las semillas de carqueja no pierden viabilidad luego de 18 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.

Para determinar el vigor de las plántulas de *B. crispera* se midieron variables relativas al tamaño de las plántulas obtenidas con distintos tratamientos pre-germinativos y se evaluó si estas mediciones diferían entre tratamientos (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Valores promedio de variables relativas al desarrollo de plántulas de *B. crispera* obtenidas en respuesta a cuatro tratamientos pre-germinativos.

Tratamiento	Peso fresco de plántula (g)	Longitud de plántula (mm)	Longitud de raicilla (mm)	Longitud de hipocótilo (mm)
Testigo	1,01 (b)	4,63 (a)	2,02 (a)	2,61 (a)
AG3	0,66 (a)	8,14 (c)	2,88 (b)	5,26 (c)
Frío	0,69 (a)	4,60 (a)	2,20 (a)	2,40 (a)
Calor	0,80 (a)	6,71 (b)	3,26 (b)	3,45 (b)

Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas (DGC, $p \leq 0,05$)

Se observó que las plántulas obtenidas con el tratamiento testigo fueron las de mayor peso fresco respecto a las obtenidas con los demás tratamientos. No obstante, mostraron menor longitud de plántula, de raicilla y de hipocótilo, al igual que las plántulas provenientes de semillas tratadas con frío. Las plántulas obtenidas a partir de las semillas tratadas con AG₃ fueron las de mayor longitud de plántula y de hipocótilo, pero fueron las más livianas y presentaron aspecto ahilado y debilitado; las plántulas obtenidas con el tratamiento calor fueron semejantes a las obtenidas con AG₃. Por esta razón se infiere que las plántulas obtenidas con el tratamiento testigo fueron las de mayor vigor. Cabe destacar que hasta el momento no hay registro de evaluación del vigor en la especie *B. crispera*.

MULTIPLICACIÓN ASEXUAL

Con el objetivo de evaluar la respuesta de la especie *B. crispera* a la propagación asexual, se midió el porcentaje de prendimiento y mortandad de estacas de distinta longitud en diferentes sustratos, así como también la longitud de la raíz principal, y se estimó el crecimiento (diferencia entre la longitud inicial y final de la estaca), al cabo de 90 días de cultivo. Los valores promedios de las variables medidas y estimadas, en cada sustrato, se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Resultados de un ensayo conducido para evaluar el prendimiento de estacas de distinta longitud de *B. crispera* en distintos sustratos.

Sustrato	Prendimiento (%)	Mortandad (%)	Longitud de raíz principal (cm)	Crecimiento (cm)
Arena	21 (a)	31 (a)	4,89 (a)	3,4 (a)
Arena +Tierra	34 (a)	24 (a)	3,95 (a)	3,29 (a)
Arena + Tierra +Vermiculita	20 (a)	27 (a)	5,74 (a)	3,96 (a)

Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas (DGC, $p \leq 0,05$)

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sustratos evaluados para ninguna de las variables analizadas. En general, los porcentajes de prendimiento fueron bajos, mostrando el sustrato de arena + tierra un porcentaje de prendimiento superior, aunque no significativo respecto a los otros dos sustratos.

Para evaluar si la longitud inicial de la estaca (medida como la porción superficial) influye en el crecimiento de las mismas se realizó un Análisis de Correlación, empleando el coeficiente de Pearson y usando como variable la altura inicial y el crecimiento promedio de las estacas (por sustrato). Los resultados de este análisis determinaron que la correlación entre la altura inicial y el crecimiento al final del ensayo es de 0,24. Este valor de correlación fue significativo ($p=0,002$); sin embargo, aunque se correlacionan positivamente, esta correlación es débil.

En la Tabla 4.4 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la respuesta a la aplicación de fitohormonas sobre estacas apicales e internodales de distinta longitud.

Tabla 4.4. Resultados del ensayo conducido para evaluar el efecto de la aplicación de fitohormonas sobre el prendimiento de estacas apicales e internodales, de distinta longitud.

Tratamiento	Prendimiento (%)	Mortandad (%)	Longitud de raíz (cm)	Crecimiento (cm)
ANA apical	17 (a)	82 (a)	9,48 (a)	5,26 (a)
ANA internodal	15 (a)	83 (a)	10,29 (a)	7,09 (a)
Fertifox apical	7 (a)	93 (a)	13,07 (a)	16,09 (b)
Fertifox internodal	4 (a)	90 (a)	15,74 (a)	12,61 (a)
Testigo apical	18 (a)	82 (a)	8,88 (a)	10,00 (a)
Testigo internodal	15 (a)	33 (b)	8,81 (a)	7,77 (a)

Letras distintas significan diferencias estadísticamente significativas (DGC, $p \leq 0,05$)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para las variables porcentaje de prendimiento y longitud de raíz. Los porcentajes de prendimiento fueron bajos y se observó un valor de mortandad elevado, siendo el tratamiento testigo internodal diferente estadísticamente (DGC, $p \leq 0,05$) por presentar el menor porcentaje de mortandad (33 %) entre los tratamientos probados. En cuanto al crecimiento, el mayor valor de esta variable se observó en estacas apicales tratadas con Fertifox, valor que fue significativamente mayor que el observado en el resto de los tratamientos.

En todos los ensayos realizados se observó que las estacas que al cabo de tres meses no prendieron y permanecían verdes, terminaban muriendo sin generar raíces.

Por último, para evaluar si la longitud de la estaca, (medida como la porción superficial de la misma) influye en el crecimiento se realizó un Análisis de Correlación, utilizando el coeficiente de Pearson y las variables altura inicial y crecimiento promedio de las estacas (por sustrato). Los resultados de este análisis determinaron que la correlación, entre la altura inicial y el crecimiento al final del ensayo, fue de 0.08. Este valor de correlación no fue significativo ($p=0.52$). Es decir que no se encontró correlación entre la longitud de estaca y el crecimiento que tuvo cada estaca al finalizar el ensayo.

DISCUSIÓN

La calidad física de un lote de semillas comprende entre otros aspectos la proporción de semillas vacías (Gold *et al.*, 2004). Entre las especies del género *Baccharis* comercializadas como carqueja, *B. trimera* presenta un alto porcentaje de semillas vacías (Davies, 2004; Aráoz *et al.*, 2012). En *B. crispa*, Aráoz *et al.* (2016) encontraron un 70 % de semillas vacías, justificando este porcentaje en la heterogeneidad en la maduración de las semillas que caracteriza a la familia *Asteraceae*. Sosa y Fernández (2000), al evaluar la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas de *B. crispa*, afirman que se deben descartar las semillas que no presentan restos de estilo-estigma por considerárselas estériles. A partir de estos antecedentes y asumiendo un elevado porcentaje de semillas vacías en la especie, se evaluó si las semillas sin restos florales estaban llenas o vacías. Los resultados encontrados indican que, a la inversa de lo reportado por Sosa y Fernández (2000), las semillas sin restos florales presentaron en mayor proporción embrión (65 %) al ser comparadas con las semillas que presentaron resto de estilo estigma (29 %).

Estudios realizados con especies nativas del género *Baccharis*, para evaluar respuesta germinativa, demostraron fotoblastismo positivo en *Baccharis retusa* DC y *Baccharis trimera* Less. DC (García *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2001). Heiden (2005) informa que la especie *B. crispa* presenta fotoblastismo positivo; por lo que el resultado de la evaluación del fotoblastismo es acorde a lo citado para el género y la especie.

Los antecedentes relacionados a la temperatura de germinación, en cámara de cría, indican que en otras especies del género con temperaturas superiores a los 25 °C se obtiene mayor respuesta germinativa (Ferreira *et al.*, 2001; Aráoz *et al.*, 2012; Aráoz *et al.*, 2016). El germoplasma de *B. crispa* evaluado se comportó de acuerdo a lo encontrado para otras especies, ya que solo se obtuvo germinación en la cámara de 20-30 °C. En cuanto al porcentaje de germinación en el género, la bibliografía indica porcentajes de germinación bajos (Ferreira *et al.*, 2001; Carvalho *et al.* 2005; Heiden, 2005; Aráoz *et al.*, 2012; Aráoz *et al.*, 2016). El más alto corresponde a *B. trimera*., 52 %, empleando semillas sembradas inmediatamente luego de su recolección a temperatura ambiente y régimen de luz natural

(Davies, 2004). Para la especie *B. crispera* Sosa y Fernández (2000) citan porcentajes de germinación promedio de 47%, Heiden (2005) 40% y Aráoz *et al.* (2016), además de evaluar porcentaje de germinación estudiaron la posible dormición en la especie. Estos autores informan que la especie posee dormición, ya que los mejores porcentajes de germinación fueron los encontrados al realizar escarificado mecánico (corte con bisturí del vilano) y al aplicar AG₃, 28 y 27 % respectivamente. Reportan además, que estos valores difirieron estadísticamente con tratamiento testigo (20 %). Los porcentajes de germinación encontrados son acordes a los bajos porcentajes encontrados para el género y la especie, siendo menores los encontrados por Sosa y Fernández (2000) y ligeramente mayores a los citados por Aráoz *et al.* (2016). En cuanto al resultado relacionado a una posible dormición en la especie difiere respecto a lo reportado por Aráoz *et al.* (2016), ya que el mejor porcentaje de germinación se obtuvo con aquellas semillas que se sembraron sobre papel humedecido con agua destilada sin recibir ningún pretratamiento germinativo (38 %). Al evaluar el porcentaje de germinación a lo largo del tiempo de almacenamiento, hasta los 18 meses, el germoplasma no perdió viabilidad. Situación contraria a lo citado para *B. trimera*, que al año de almacenamiento el porcentaje de germinación disminuyó de 52 % a 37 % (Davies, 2004).

Por otro lado, a partir de la observación de las plántulas normales se realizó la tipificación de la germinación de la especie siguiendo los criterios de Barceló Coll *et al.*, (2007) e ISTA (2014). Se arribó a la misma clasificación que la realizada por Aráoz *et al.* (2016) para la especie.

B. crispera, tiene la particularidad de presentar raíces gemíferas que le confieren la capacidad de generar rizomas (Ariza Espinar, 1973). Por esta razón, la multiplicación por división de matas es un método de propagación plausible de ser empleado. Sin embargo, la multiplicación por división de matas no es recomendable para generar plantas con destino de cultivo, ya que conduce a la acumulación de enfermedades sistémicas bacterianas, virósicas y fúngicas (Torres, 2011).

Existen antecedentes de multiplicación asexual en el género. Entre estos, *B. trimera* en fenofase reproductiva y vegetativa responde mejor empleando estacas basales, siendo mayor el porcentaje de enraizamiento cuando las estacas provienen de plantas en fenofase vegetativa (superior a 90 %), al evaluar el tipo de sustrato se demostró que no influye en el enraizamiento (De Bona *et al.*, 2005a, Sousa *et al.*, 2006, Carvalho *et al.*, 2007). En *B. trimera* y *B. articulata* se demostró que no mejoró el porcentaje de enraizamiento al aplicar auxinas –ANA e IBA- (De Bona *et al.*, 2005 b). Los resultados a los que se arribó en esta tesis indican que el tipo de sustrato no influye en el prendimiento, como así tampoco el uso de la fitohormona ANA, de acuerdo a lo citado para otras especies del género. En cuanto al tipo de estaca, apical o internodal, en *B. articulata* se obtuvo mayor porcentaje de enraizamiento empleando estacas apicales (38,4 %) (De Bona *et al.*, 2005 a), contrariamente a los resultados encontrados para *B. crispera* ya que el tipo de estaca no influyó en el porcentaje de enraizamiento. Para *B. crispera* se ha encontrado un único antecedente de multiplicación asexual (Céspedes de Zárate *et al.*, 2011). En él se informa un porcentaje de prendimiento de 54 % de estacas obtenidas *in situ* de plantas de poblaciones silvestres, aunque no se aclara sustrato empleado, tipo de estaca (basal, media o apical), uso de hormonas, estado fenológico de las plantas de las que se obtienen las estacas, como así tampoco el tamaño de estaca. El porcentaje de prendimiento obtenido en los distintos ensayos realizados es inferior a lo citado para la especie y el género.

Dada la dificultad para propagar la especie, la cual se ve reflejada en los bajos porcentajes de germinación y en bajo prendimiento cuando es multiplicada por estacas, se requiere continuar con estudios tendientes a mejorar la multiplicación sexual y asexual. Esto es así ya que para comenzar con el mejoramiento y posterior selección, basada en caracteres agronómicos y bioactivos, es necesario primero realizar la comparación de genotipos diversos obtenidos por medio de propagación sexual en una población de base genética amplia (Allard, 1980; Martínez Moreno y Solís Martel, 2010; Cubero Salmerón, 2014). Una vez identificados individuos de interés, éstos se deben propagar asexualmente para garantizar el mantenimiento de las características que los destacaron y continuar con una evaluación clonal (Cubero Salmerón, 2014).

CONCLUSIONES

MULTIPLICACIÓN SEXUAL

- La especie no presenta mecanismos de dormición física o fisiológica, ya que no respondió favorablemente a los tratamientos probados para romper potenciales dormiciones. Además, al evaluar la germinación de semillas de hasta 18 meses de almacenamiento, los porcentajes de germinación no mejoraron.
- La calidad fisiológica de las semillas se conservó a lo largo de 18 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.
- El uso de reguladores de crecimiento (ácido giberélico y nitrato de potasio), la aplicación de frío, calor y la escarificación mecánica no promovió la germinación de las semillas.
- *B. crispera* posee un alto porcentaje de semillas vacías y bajo porcentaje de germinación en comparación con otras especies del género *Baccharis*.
- Se recomienda no realizar ningún tratamiento a las semillas previo a ser sembradas, ya que los resultados demostraron que la siembra sin pretratamiento germinativo permite obtener los mejores porcentajes de germinación. Además, las plántulas normales obtenidas de semillas sembradas sin la aplicación de pretratamiento fueron más vigorosas que las obtenidas con el resto de los tratamientos.

MULTIPLICACIÓN ASEXUAL

- La especie presentó bajo prendimiento y elevada mortandad, al ser multiplicada por estacas, en comparación con otras especies del género *Baccharis*.
- El mejor porcentaje de prendimiento se obtuvo usando un sustrato suelto con aporte de materia orgánica (tierra + arena) para realizar la multiplicación.
- El tamaño inicial de las estacas no influye en el crecimiento de las mismas.
- De realizar multiplicación por estacas, se recomienda hacerlo con un elevado número de estacas (teniendo en cuenta el bajo porcentaje de prendimiento) provenientes de porciones medias de las ramas.
- La especie no responde, mejorando el prendimiento de estacas, a la aplicación de la fitohormona ANA para estimular el enraizamiento.
- Es necesario continuar con estudios de propagación, por ejemplo, usando cultivo *in vitro*, ya que la especie tiene bajo porcentaje de germinación y de prendimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Allard R.W. 1980. Principios de la mejora genética de las plantas. Omega, Barcelona, España, 498 pp.
- Aráoz S., Joseau M.J., Meehan A, Hernández R., Agüero C., Pomares A., Bustos N., Rodríguez E. y Lamas E. 2012. Aspectos de la calidad de las semillas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (*Asteraceae*) para su domesticación. V Jornadas Integradas de Investigación y Extensión. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Aráoz S., Joseau M.J., Meehan A. y Hernández R. 2016. Calidad física y fisiológica de semillas de *Baccharis crispa* Sprengel y *Baccharis salicifolia* Ruiz & Pav. para su domesticación. *Quebracho*, 24(1,2):59-69.
- Ariza Espinar L. 1973. Las especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central. *Bol. Acad. Nac. Ciencias. Córdoba, Argentina* 50: 232 pp.
- Barboza G.E., Cantero J.J., Núñez C., Pacciaroni A. and Ariza Espinar L. 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana* 34 (1-2): 7-365.
- Barceló Coll J., Nicolás Rodrigo G., Sabater García B., Sánchez Taméz R. 2007. Fisiología Vegetal. Pirámide, Madrid España, 566 pp.
- Carvalho R.I., Giublin L.M., Ripka M., Wachowicz C.M., Nolasco M.A., Scheffer M.C. and Radomski M.I. 2005. Pre-chilling and temperature to the germination of *Baccharis trimera* seeds. *Scientia Agraria* 6(1-2): 79-84.
- Carvalho R.I., Nolasco M.A., Carvalho T., Ripka M., Giublin L.M., Negrello M. and Scheffer M.C. 2007. Rooting of *Baccharis trimera* cuttings according to diferente substrates and stem positions on male and female plants. *Scientia Agraria, Curitiba* 8 (3): 269-274.
- Céspedes de Zárate C.I., González Zalema G. and Delmás de Rojas G. 2011. Acclimation of *Baccharis crispa* Spreng. “jaguarete ka'a” and *Baccharis trimera* (Less.) DC species “jaguarete ka'a” with threat range, used in folk medicine, Paraguay. *Rojasiana* 10(2): 63-79.
- Cubero Salmerón J.I. 2014. Introducción a la mejora genética vegetal. 3ra Ed. Mundi-prensa. Madrid, España 602 pp.
- Davies P. 2004. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Fichas técnicas de cultivo (8). Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay, 259 pp.
- De Bona C.M., Biasi L.A., Zanette F. y Nakashima T. 2005a. Estaquia de três espécies de *Baccharis*. *Ciência Rural*, 35(1): 223-226.
- De Bona C.M., Biasi L.A., Zanette F. y Nakashima T. 2005b. Propagação por estaquia de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., *Baccharis trimera* (Less.) A.P. de Candolle e *Baccharis stenocephala* Baker com uso de auxinas. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu* 7 (2): 26-31.
- De Bona C.M., Biasi L.A., Zanette F. y Nakashima T. 2004. Propagation of three species of *Baccharis* using different cutting legths. *Ciências Agrárias, Londrina*, 25(3):179-184.

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C.W. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Di Rienzo J.A., Guzmán A.W and Casanoves F. 2002. A Multiple Comparisons Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environment Statistics*, 7(2): 1-14.
- Ferreira A.G., Cassol B., Taylor da Rosa S.G., Sales da Silveira T., Stival A.L. e Silva A.A. 2001. Germinação de sementes de *Asteraceae* nativas do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 15 (2): 231-242.
- García L.C, De Vasconcellos Barros F e Lemos Filho J.P. 2006. Comportamento germinativo de duas espécies de canga ferrífera: *Baccharis retusa* DC. (*Asteraceae*) e *Tibouchina multiflora* Cogn. (Melastomataceae). *Acta Bot. Bras.* 20(2): 443-448.
- Gold K., León-Lobos P. y Way M. 2004. Manual de recolección de semillas de plantas silvestres para conservación a largo plazo y restauración ecológica. Boletín INIA N° 110. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi, La Serena, Chile, 65pp.
- Heiden G. 2005. O gênero *Baccharis* L. seção Caulopterae DC. (*Asteraceae*) no Rio Grande do Sul. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas Universidade Federal de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, 238 pp.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2014. Rules for seed testing. Basserdorf, Switzerland.
- Jaramillo S. y Baena M. 2000. Conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Material de capacitación. International Plant Genetic Resources Institute. Italia, 210 pp:
- Marcos Filho J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fundação de Ciências Agrarias Luis de Queiroz, Piracicaba, Brasil, 495 pp.
- Martínez Moreno F. y Solís Martel I. 2010. Mejora vegetal para ingeniería agronómica. Secretariado de publicaciones Universidad de Sevilla. Sevilla, España, 284 pp.
- Reinoso E., Oliva M.M., Pavicich G., Beoletto V., Carezzano M. E., Marioli J.M., Paletti Rovey M.F., Pimentel Betancourt D., Sabini M.C., Moliva M., Menis Candela F. y Sotelo .J. 2019. Una farmacia en el monte. 2019. Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba, Córdoba, Argentina, 80 pp.
- Sosa L.R. y Fernández E.A. 2000. Germinación y desarrollo de plántulas de *Baccharis crispa* Spreng. (*Asterceae*) en la provincia de San Luis (Argentina). *Phyton: Revista Internacional de Botánica Experimental* 66: 149-154.
- Sousa L.A., Sacramento L.V.S e Ming L.C. 2006. Propagação por estaquia de três acessos de *Baccharis trimera* em fenofase reproductiva. *Rev. Bras.Pl. Med., Botucatu* 8 (4): 189-192.
- Torres L.E. 2011. Caracterización y evaluación germoplasma de orégano proveniente de las principales zonas de producción de Argentina. Tesis Doctoral, Escuela para Graduados, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 123 pp.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE GERMOPLASMA DE POBLACIONES SILVESTRES EN UN MISMO AMBIENTE DE CULTIVO.

INTRODUCCIÓN

La OMS ha proporcionado claras y precisas directrices para la conservación de las plantas medicinales (PM). Aconseja la realización de estudios básicos sobre los conocimientos tradicionales del empleo de plantas en la asistencia sanitaria, basados en una correcta identificación de la PM, su distribución y evaluación de su abundancia; estudios de conservación *in situ* y *ex situ* y estudios relacionados con la utilización de las PM a través del cultivo o de la recolección sostenible como fuentes de suministro (WHO, 2003; 2010).

La introducción al cultivo de especies medicinales silvestres se ha transformado en una necesidad para asegurar el abastecimiento continuo de material vegetal. La domesticación de plantas silvestres, ya sean éstas medicinales o aromáticas, implica un mejoramiento en la calidad de la materia prima, que permite una estandarización en el contenido de principios activos y poblaciones homogéneas de plantas necesarias para su producción, procesamiento y utilización. En este sentido la domesticación se refiere a llevar a una especie no domesticada, que anteriormente solamente crecía en ambientes naturales, al cultivo bajo el cuidado del hombre (Allard, 1980; Davies, 2004). En cuanto a plantas se refiere, la domesticación es un método de mejora en el sentido que proporciona, cuando se hace con éxito, tipos domésticos que son superiores a los que se tenían anteriormente en los ambientes naturales (Allard, 1980).

El proceso de domesticación tiene varias etapas que incluyen caracterizar poblaciones de la especie en diferentes ambientes, recolectar germoplasma, evaluar

principios activos, producir plantines, propagar a campo y seleccionar las de mayor interés, ya sea por la producción de materia seca o la concentración de principios activos (Ojeda y Karlin, 2015).

Los elementos claves para llevar con éxito un programa de mejora son que la especie esté domesticada; la existencia de variabilidad del material de partida y la elección del método adecuado de selección (Martínez Moreno y Solís Martel, 2010).

Las principales ventajas del cultivo de PM en relación a la recolección silvestre son: 1) la optimización del rendimiento y alta calidad del producto, 2) la correcta identificación del material vegetal, 3) la reducción de variabilidad genética y fenotípica, 4) la reducción o ausencia de contaminantes, 5) la reducción de la variabilidad en extractos y 6) la disponibilidad en cantidad de material sin generar problemas ambientales asociados a la extracción desde poblaciones silvestres (Amujoyegbe *et al*, 2012).

Con la premisa que las plantas de una especie silvestre puestas en cultivo responderán de manera distinta a como lo hacen en su ambiente natural de crecimiento (Cubero Salmerón, 2014) y que se desconoce el comportamiento de *B. crispa* sometida a condiciones de cultivo, se planteó el objetivo de evaluar la respuesta de germoplasma de *B. crispa*, proveniente de poblaciones silvestres, en un mismo ambiente de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Siembra a período de rusticación

La evaluación del germoplasma se realizó en el Centro de Investigación Desarrollo y Transferencia de Plantas Aromáticas y Medicinales (C.I.De.T.P.A.M). Se llevó a cabo en el invernadero y las parcelas de investigación adaptativa que el Centro dispone en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

Los plantines con los que se conformó la población variable se generaron con semillas (aquenios) cosechadas de las poblaciones silvestres estudiadas en los capítulos de evaluación de variabilidad *in situ*. Se realizó la siembra sobre un sustrato compuesto por tierra, vermiculita y compost de lombriz (70:20:10), en una cama de germinación en invernadero. Se sembró a mano, en línea y de manera superficial. De acuerdo con los resultados del Capítulo 4, no se aplicó ningún tratamiento pre germinativo a las semillas, ni fueron tratadas con fitohormonas. Se realizó una única siembra en el mes de junio de 2017.

A los cinco meses de la siembra (noviembre de 2017) las plantas fueron trasplantadas (Fig. 5.1), manteniendo su identificación, a bolsas de plantín de 0,3 L, quedando en invernadero hasta el mes de marzo de 2018.



Figura 5.1. Planta de *B. crispa* al momento del trasplante a bolsín de 0,3 L, a los cinco meses desde la siembra.

En marzo de 2018, las plantas se trasladaron a bolsas de plantín de 2 L (Fig. 5.2). El sustrato utilizado para rellenar las bolsas de plantín estuvo compuesto por tierra, vermiculita y compost de lombriz (70:20:10).



Figura 5.2. Planta de *B. crisper* al momento del trasplante a bolsín de 2 L, a los 9 meses desde la siembra

Una vez trasladadas se les realizaron las siguientes mediciones a las plantas:

- Altura de planta (cm): medida sobre la ramificación más larga de la planta.
- Número de ramificaciones: contabilizadas a los 10 cm de altura.
- Ancho de ala (cm): se midió, a los 10 cm de altura, el ancho de las tres alas de la ramificación más larga.

Rusticación

Habiendo realizado estas mediciones cada planta se cortó a los 10 cm y se contabilizó el número de estacas apicales que se obtuvo de cada planta. Para ser contabilizadas las estacas debieron tener al menos cinco nudos. Este criterio fue tomado en los ensayos de propagación asexual, las estacas debían tener cinco nudos porque se enterraban, quedando tres nudos por encima del sustrato. Las plantas fueron trasladadas a

un rusticatorio, para su aclimatación, hasta el momento del trasplante a campo. Allí se les realizaron las siguientes mediciones:

- Crecimiento al mes (cm): medido sobre la rama más larga.
- Crecimiento a los seis meses (cm): medido sobre la rama más larga.
- Número de ramificaciones: contabilizadas a los 10 cm.

Trasplante a cosecha

En octubre de 2018, se trasplantaron 50 plantas a un ensayo a campo con diseño completamente aleatorizado, con un marco de plantación de 20 cm entre plantas y de 30 cm entre hileras. Antes del trasplante se registró la altura de cada planta (cm). Los objetivos de la parcela generada fueron por un lado evaluar la respuesta del germoplasma de *B. crisper* en un mismo ambiente y por otro obtener semillas, a partir del libre cruzamiento, con las que se espera poder conformar la población de base genética amplia (Massuh, 2014, Massuh *et al.*, 2017). Una vez establecida la parcela, se midió la altura de planta (cm) al mes y a los dos meses del trasplante, medida tomada siempre sobre la rama más larga.

A los dos meses del trasplante también se registró:

- Ancho de ala (cm): se midió, a los 10 cm de altura, el ancho de las tres alas de la ramificación más larga.
- Longitud entrenudo (cm): se obtuvo el promedio de todas las longitudes entrenudos en la rama más alta.
- Número de ramificaciones: contabilizadas a los 10 cm de altura.
- Estructura de planta: presencia de eje principal y aspecto laxo o compacto de mata.

La cosecha se realizó en el mes de mayo de 2019. Los cortes de las plantas se realizaron a 15 cm del suelo para favorecer el rebrote. La cosecha se realizó por planta, acondicionando la planta cosechada en bolsas de papel con su correspondiente identificación. Se mantuvieron en una habitación a temperatura ambiente, protegidas del sol y del polvo por dos semanas. Previo a la cosecha, se registró la altura de planta (cm)

(medida sobre la rama más larga). Post-cosecha de midieron y estimaron los siguientes caracteres cuantitativos:

-Peso fresco (PF) de planta (g. pl⁻¹).

-Peso seco (PS) de planta (g. pl⁻¹).

-Relación PS/PF.

Análisis Estadístico:

Los resultados fueron analizados con el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017). Se utilizó estadística descriptiva para caracterizar la población, generada a partir de germoplasma recolectado *in situ*, a través de las variables medidas. También se evaluó variabilidad en dicha población. Para el análisis de variabilidad se empleó Análisis de Componentes Principales.

RESULTADOS

De los 50 individuos implantados en el ensayo a campo, 42 de ellos sobrevivieron hasta la cosecha, siendo el porcentaje de mortandad de 16%. Los datos presentados a continuación corresponden a las mediciones realizadas sobre las plantas que culminaron el período de evaluación a campo.

Inicio del período de rusticación

La Tabla 5.1 resume los resultados de las mediciones realizadas a las plantas de la nueva población de *B. crispa* (generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres), momento del trasplante en envases de 2 L.

Tabla 5.1 - Medidas resumen de cuatro caracteres evaluados en una nueva población de *B. crispa* generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres

Medidas resumen	Altura de planta (cm)	Ancho de ala (cm)	N° de Ramificaciones	N° de estacas apicales
Media	42,30	0,27	5,67	4,6
D.E.	12,47	0,11	3,72	4,74
C.V.	29,49	42,29	65,64	81,43
Mín.	17	0,10	1	0
Máx.	62	0,57	19	19

D.E.=desvío estándar; C.V.= coeficiente de variación; Mín.=mínimo y Máx.=máximo.

Considerando que el C.V. es una medida relativa de la magnitud de la variabilidad de los caracteres estudiados; al observar los C.V. de los caracteres evaluados (Tabla 5.1) se puede inferir que dichos caracteres presentaron variabilidad entre los individuos de la población en estudio. Para visualizar la variación se presenta en las Fig. 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6 los valores de cada uno de los individuos para los caracteres medidos en ellos, además de tener como referencia para su interpretación el valor medio de cada carácter. Cabe aclarar que el valor mínimo del número de estacas apicales “0” se debe a que la planta considerada tenía solo un tallo principal y de la porción apical, por encima de los 10 cm de corte, no se obtuvo una estaca de al menos 5 nudos.

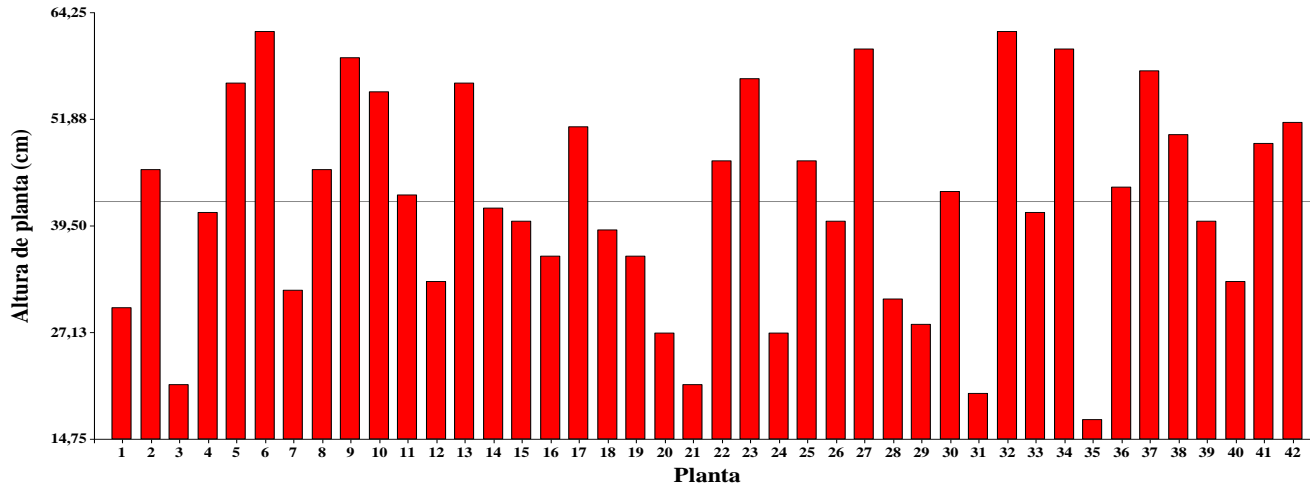


Figura 5.3. Altura de planta (cm) de los individuos de la población de *B. crista*, generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.

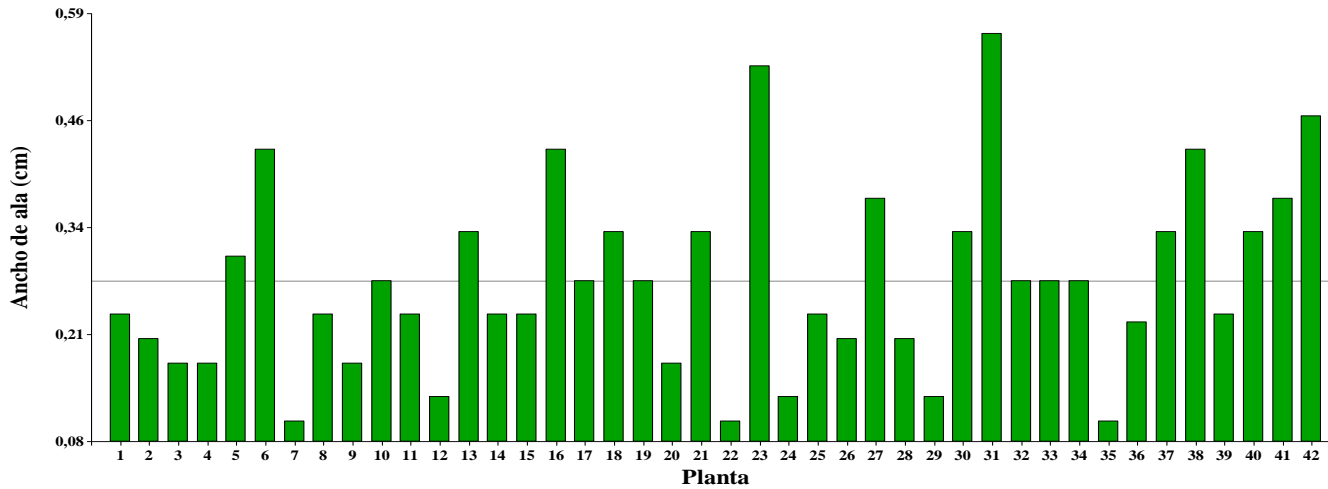


Figura 5.4. Ancho de ala (cm) de los individuos de la población de *B. crista*, generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.

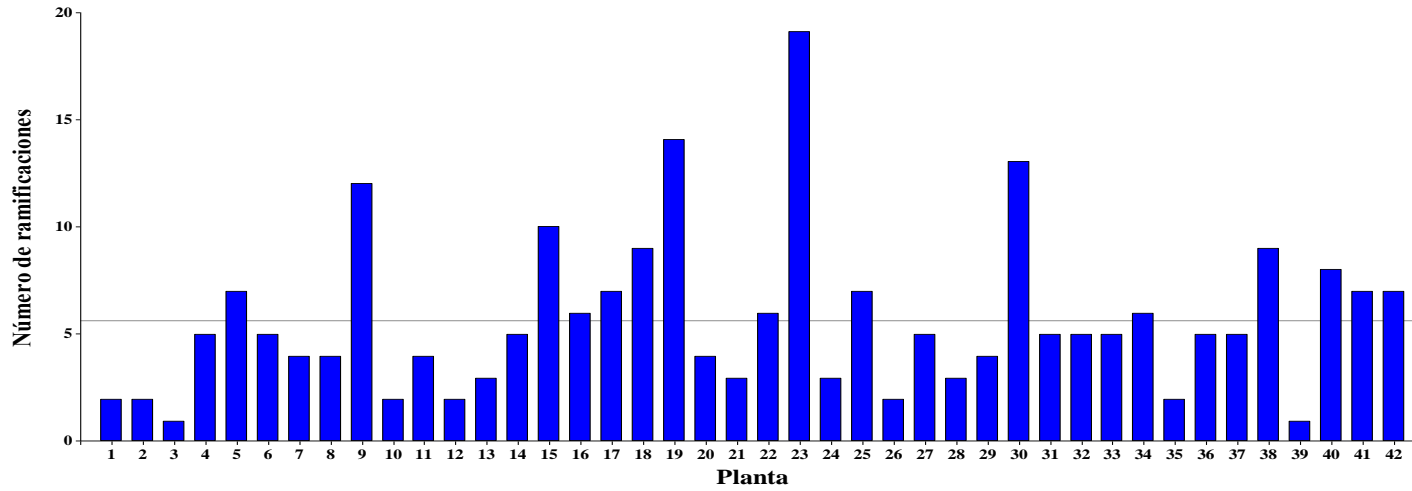


Figura 5.5. Número de ramificaciones de los individuos de la población de *B. crispa*, generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.

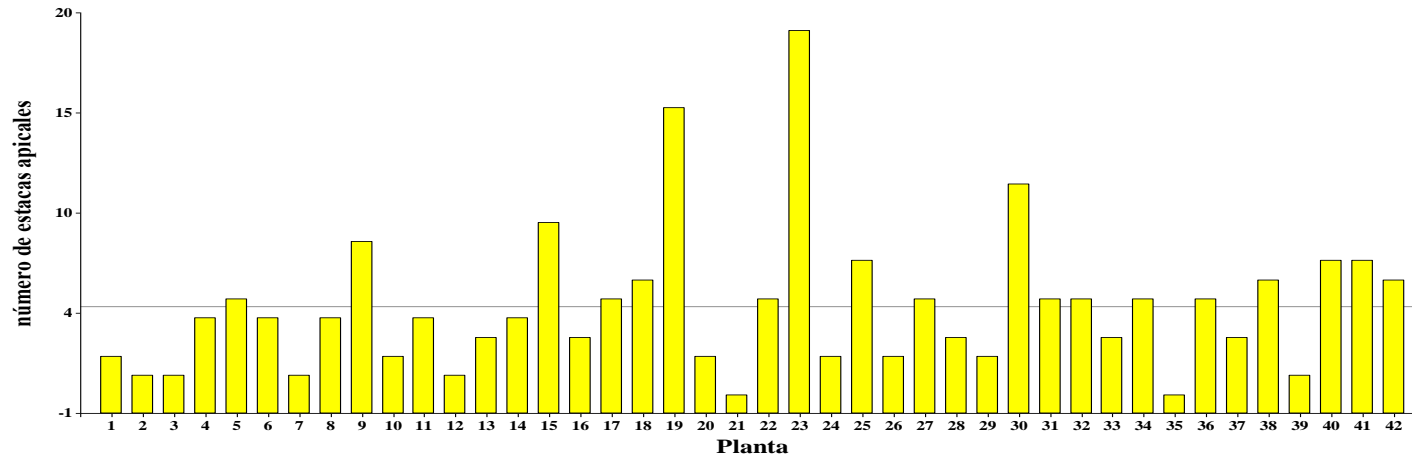


Figura 5.6. Número de estacas apicales obtenidas de los individuos de la población de *B. crispa*, generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.

Para cada carácter evaluado, hay individuos que están por encima y por debajo del valor medio en la población. Se destacan las plantas 5, 23, 30, 38, 41 y 42 por presentar valores superiores al valor medio en los cuatro caracteres.

Rusticación

Las medidas resumen de las variables cuantitativas a través de las cuales se evaluaron las plantas durante la rusticación se presentan resumidas en la Tabla 5.2. La altura inicial de todas las plantas en el período de rusticación fue de 10 cm, ya que, en el momento del trasplante a macetas de 2 L, marzo de 2018, se cortaron las plantas para que todas tengan la misma altura inicial.

Tabla 5.2 - Medidas resumen de cuatro caracteres evaluados en una nueva población de *B. crispa* generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres durante su rusticación

Medidas resumen	Crecimiento al mes (cm)	Crecimiento a los seis meses (cm)	Número de ramificaciones a los seis meses	Altura al trasplante (cm)
Media	7,52	10,48	12,45	20,76
D.E.	4,47	5,26	6,22	5,28
C.V.	59,48	50,17	49,92	25,44
Mín.	0	1	4	11
Máx.	19	22	28	32

D.E.=desvío estándar; C.V.= coeficiente de variación; Mín.=mínimo y Máx.=máximo. n=42

De la misma manera que ocurrió con las mediciones realizadas al inicio de la rusticación, los caracteres evaluados presentaron variabilidad entre los individuos de la población en estudio (Fig. 5.7, 5.8, 5.9 y 5.10). Durante este período las plantas continuaron creciendo y se mantuvieron verdes aún durante el invierno (Fig. 5.11), generando nuevos brotes.

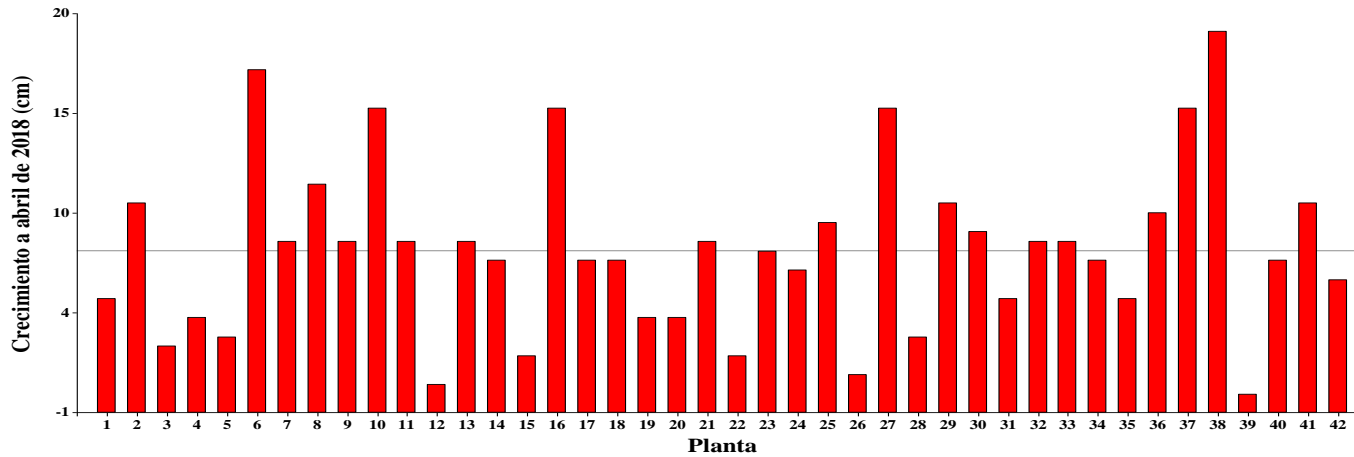


Figura 5.7. Crecimiento en altura (cm) de los individuos de la población de *B. crispa*, generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres, al cabo de un mes en rusticación. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.

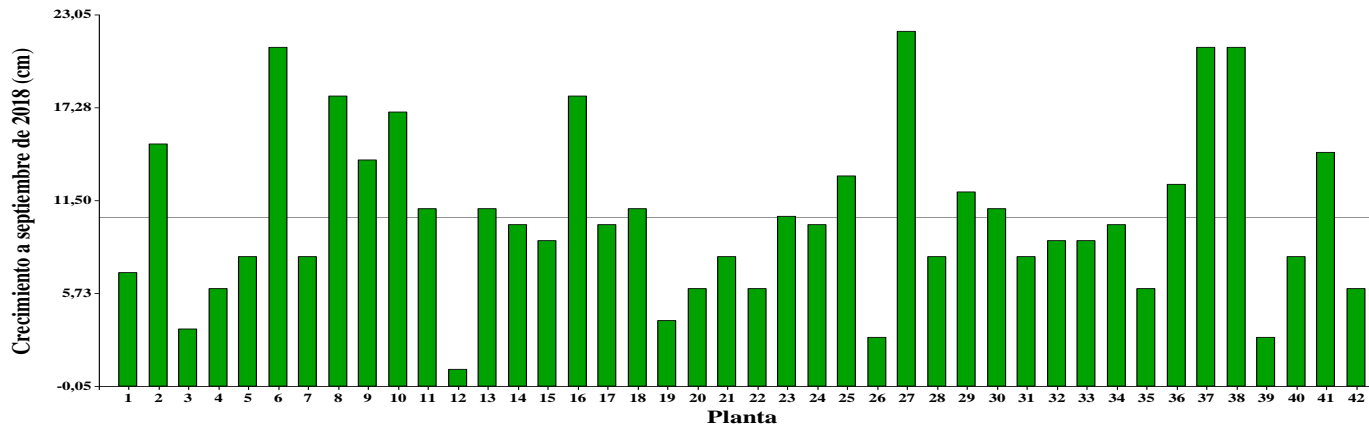


Figura 5.8. Crecimiento en altura (cm) de los individuos de la población de *B. crispa*, generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres, al cabo de seis meses en rusticación. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.

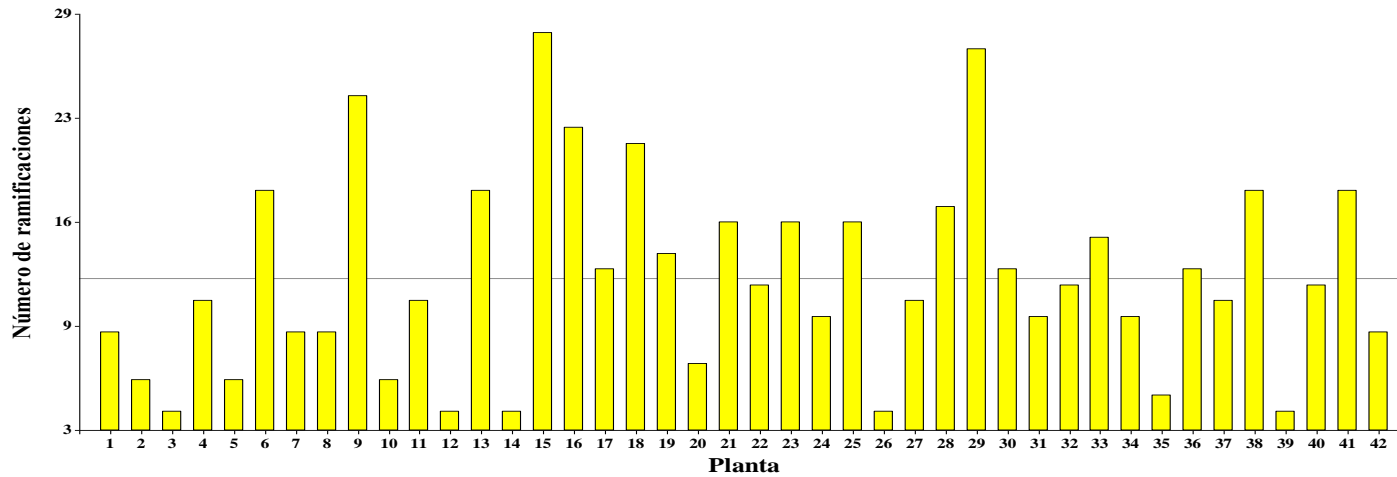


Figura 5.9. Número de ramificaciones de los individuos de la población de *B. crispa*, generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres, al cabo seis meses en rusticación. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.

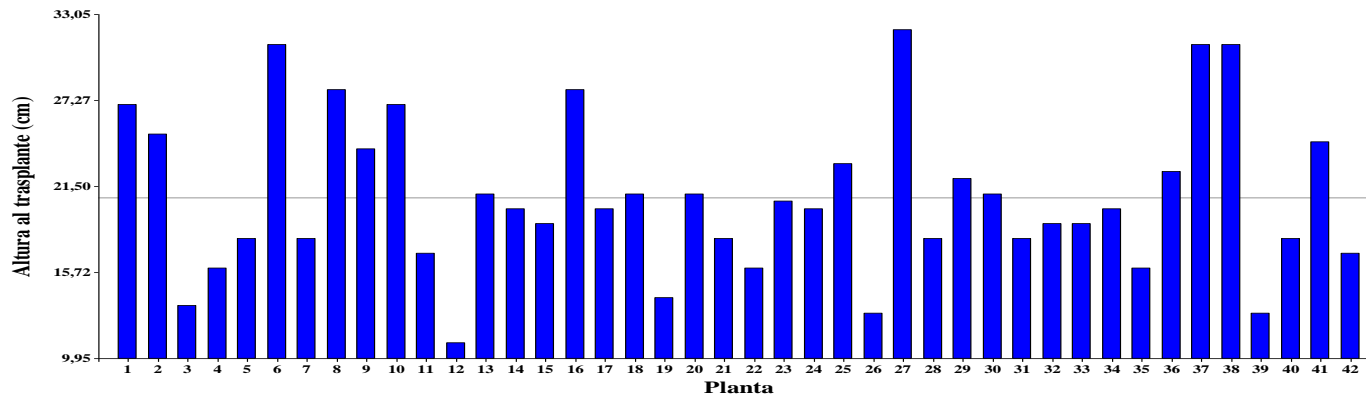


Figura 5.10. Altura al trasplante de los individuos de la población de *B. crispa*, generada a partir de germoplasma de poblaciones silvestres. La línea que atraviesa transversalmente el gráfico representa el valor medio del carácter en la población.



Figura 5.11. Plantas de *B. crisper* durante su rusticación, correspondientes a julio de 2018.

Trasplante a cosecha

La información presentada a continuación corresponde a las observaciones y mediciones realizadas sobre plantas de *B. crisper*, obtenidas de germoplasma de las poblaciones silvestres, que fueron evaluadas en un mismo ambiente en el periodo comprendido entre octubre de 2018 (fecha en que se realizó el trasplante) y mayo de 2019 (fecha en que se realizó la cosecha).

Se realizó la caracterización de las plantas mediante caracteres cualitativos y cuantitativos. Los caracteres cualitativos generalmente corresponden a características morfológicas que pueden emplearse como descriptores, ya que son características poco influenciadas por el ambiente; mientras que los caracteres cuantitativos están relacionados directamente con la producción de biomasa de las plantas y muestran influencia del ambiente sobre su expresión. También se llevó un registro quincenal de la fenología durante el ensayo. El 80 % de las plantas se mantuvieron en fase vegetativa con activo crecimiento durante el ensayo hasta la cosecha (Fig. 5.12). El 20 % de las plantas que entró en fase reproductiva durante el período de evaluación, lo hizo tardíamente desde el mes de abril. Los ejemplares femeninos florecieron antes que los masculinos, ambos pies con escasa producción de inflorescencias; por lo que no fue posible recolectar semillas en el ciclo de evaluación.



Figura 5.12. Parcela de *B. crispa* al momento de la cosecha, mayo de 2019.

Durante este período se observaron diferencias de tipo cualitativo en el material evaluado. El borde de las alas se presentó, en algunas plantas, con ondulaciones bien marcadas, mientras que en otras el borde de las alas era liso. Hubo plantas con un tallo principal y aspecto de mata laxa, y otras en las que aparecían un conjunto de tallos desde su base, formando matas compactas. Además, se observaron plantas con nervaduras violáceas y otras con nervaduras verdes. (Fig. 5.13).

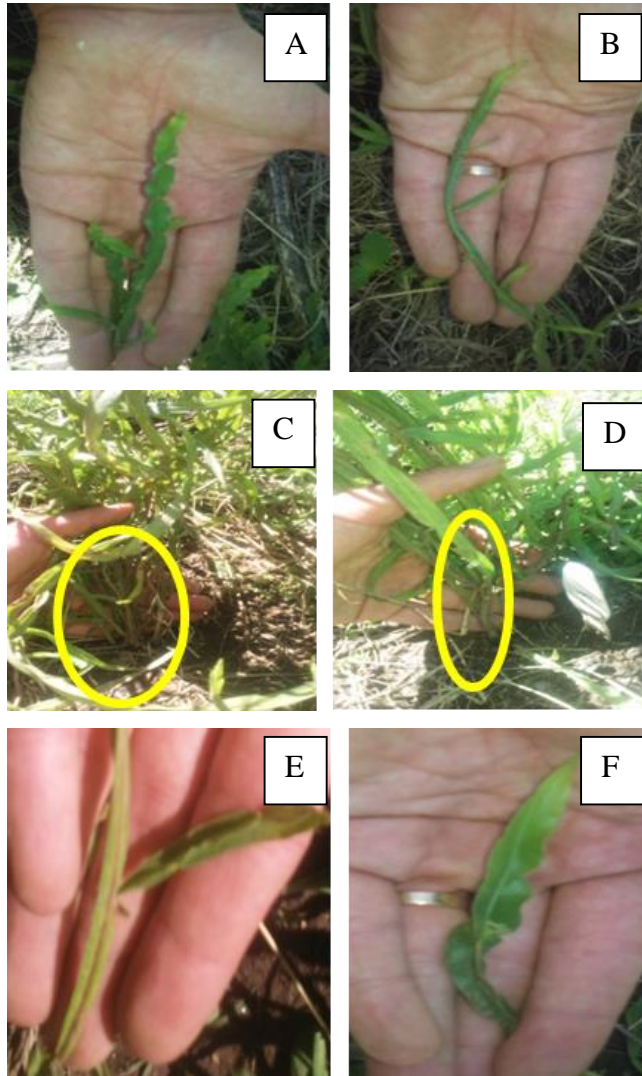


Figura 5.13. Caracteres cualitativos diferenciales observados en plantas de *B. crisper*, provenientes de germoplasma silvestre, evaluadas en un mismo ambiente: A. borde de ala ondulado y B. borde de ala liso; C. planta con varios tallos desde la base y D. planta con un solo tallo principal; E. nervadura del tallo violáceo y F. nervadura del tallo verde pálido.

Además de mantenerse en activo crecimiento vegetativo durante el ensayo, las plantas, cubrieron el espacio entre y dentro de las filas, emitiendo brotes generados desde los rizomas que caracterizan la especie (Fig. 5.14).



Figura 5.14. Rebrote de *B. crisper* generados desde rizomas.

En la Tabla 5.3 se presentan las medidas resumen de los caracteres cuantitativos utilizados para evaluar la respuesta de germoplasma silvestre en un mismo ambiente. Entre estos caracteres se encuentran algunos de los citados en las descripciones botánicas de la especie a partir de especímenes de la especie caracterizados *in situ*, tales como la altura de planta, el ancho de ala y la longitud entrenudo, además de caracteres asociados a la producción de biomasa de las plantas.

Tabla 5.3. Medidas resumen de caracteres cuantitativos utilizados para la evaluación de germoplasma silvestre de *B. crisper* en un mismo ambiente

VARIABLES	Media	D.E	C.V.	Mín.	Máx.
Altura noviembre de 2018 (cm)	37,45	5,66	15,12	23,00	50,00
Crecimiento a noviembre de 2018 (cm)	16,69	5,94	35,62	3,50	29,00
Altura diciembre de 2018 (cm)	43,62	7,2	16,5	31,00	60,00
Crecimiento a diciembre de 2018 (cm)	22,86	6,72	29,40	11,00	34,00
Ancho de ala (cm)	0,44	0,12	25,92	0,23	0,67
Longitud entrenudo (cm)	3,06	0,64	20,79	1,80	4,20
Número de ramificaciones	16,76	8,44	50,36	2	31
Altura mayo 2019 (cm)	69,29	10,99	15,86	49,00	98,50
P.F. (g. pl ⁻¹)	138,47	95,45	95,45	14,40	384,72
P.S. (g. pl ⁻¹)	58,33	40,48	40,48	1,22	166,52
P.S./P.F.	0,57	0,08	13,70	0,44	0,83

D.E.=desvío estándar; C.V.= coeficiente de variación; Mín.=mínimo y Máx.=máximo. n=42

Todos los caracteres cuantitativos evaluados mostraron variación entre los individuos evaluados. Esta información es indicadora de que la nueva población posee variabilidad y que sería posible la recolección de germoplasma generado de la fecundación cruzada entre los individuos que la componen, para dar inicio a una segunda etapa de evaluación del germoplasma con el objetivo de conformar una población de base genética amplia.

Al realizar evaluaciones previas a la conformación de una población base de un programa de selección y mejoramiento, el uso de Análisis de Componentes Principales (ACP) es una herramienta útil para analizar los datos que se generan de la caracterización y evaluación preliminar del germoplasma con el fin de conocer la relación existente entre las variables cuantitativas consideradas y la variabilidad entre las accesiones. También permite seleccionar las variables cuantitativas de mayor valor discriminante para limitar el número de mediciones en evaluaciones de germoplasma posteriores (Hidalgo, 2003). En este sentido, se aplicaron ACP a los datos obtenidos para visualizar la variabilidad entre las plantas evaluadas. En un primer análisis se redujo la cantidad de variables, seleccionando las de mayor peso en la explicación de la variabilidad observada. Se seleccionaron las variables: peso seco (P.S.), relación P.S./P.F., altura de planta al mes del trasplante (noviembre 2018), altura de planta a los dos meses del trasplante (diciembre de 2018), altura de planta a los siete meses del trasplante (mayo 2019) y longitud de entrenudo. En la Fig. 5.15 se presenta el gráfico biplot generado del ACP realizado con las variables seleccionadas. Con las dos primeras componentes es posible explicar el 68,7% de la variación total entre los individuos de *B. crisper* evaluados a través de caracteres cuantitativos. Se puede observar por un lado que la altura de las plantas y la longitud de entrenudo tienen una asociación positiva con el rendimiento, evaluado como peso seco de planta; y por el otro, este grupo de variables se relacionan negativamente con la relación PS/PF. La ausencia de un patrón de dispersión entre los individuos en el espacio del biplot, es también un indicio de que existe variabilidad entre los individuos evaluados considerando caracteres cuantitativos.

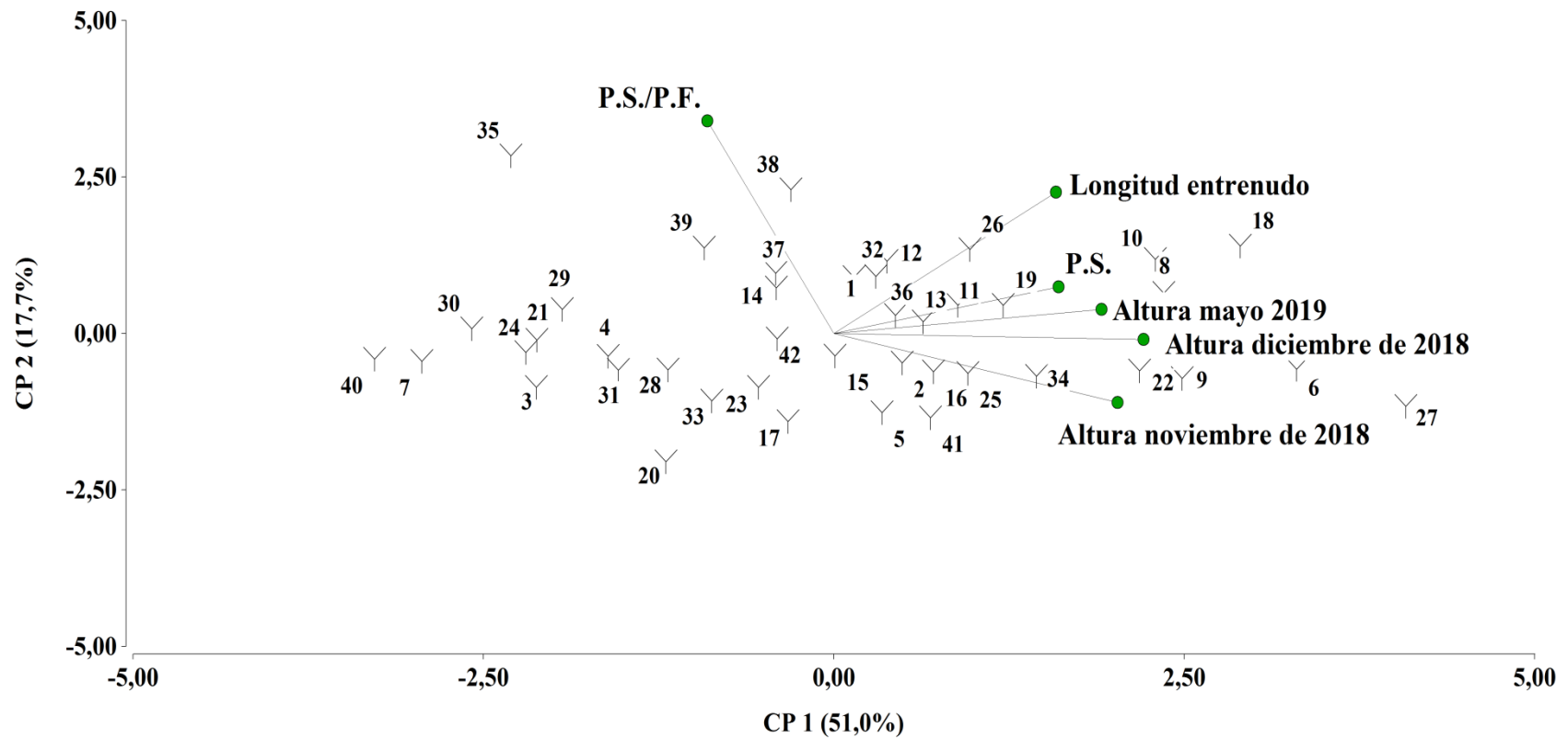


Figura 5.15. Variabilidad entre individuos de *B. crispa*, según los dos primeros ejes de un Análisis de Componentes Principales, evaluados a través de caracteres cuantitativos discriminatorios. Y=planta evaluada; CP1= componente principal 1; CP2= componente principal 2; P.S./P.F.= relación entre el peso seco y el peso fresco de planta; P.S.= peso seco de planta.

DISCUSIÓN

De las especies medicinales nativas con demanda de mercado, *B. crispera* es una planta de interés económico y social en la Argentina (Cantero *et al.* 2019). El abastecimiento del mercado proviene del acopio de material silvestre recolectado indiscriminadamente de ambientes naturales, sin ningún tipo de control en cuanto al cuidado del recurso, lo cual ha provocado una disminución preocupante de este tipo de recurso (Barboza *et al.*, 2009). Por esta razón se orientó este estudio a la caracterización y evaluación de variabilidad *in situ*, a la determinación de las condiciones de manejo que permitan su domesticación y a evaluar el comportamiento de la especie en cultivo.

En los trabajos de caracterización botánica se cita como características distintivas de la especie la altura, entre 15 a 45 cm, y que posee ramas provistas de tres alas, de 0,2 a 0,6 cm de ancho, con borde ondulado (Ariza Espinar, 1973, 2005; Barboza *et al.*, 2006, Müller, 2006). En trabajos previos realizados para caracterizar poblaciones silvestres de la especie, estas características distintivas tuvieron valores medios acordes a las citas de los trabajos botánicos (Chaves, 2012; Chaves, 2015). El valor encontrado al evaluar plantines en maceta para la altura fue de 42,30 cm y para el ancho de ala de 0,27 cm, encontrándose entre los rangos citados para la especie como característicos. En las plantas evaluadas en un mismo ambiente el ancho de ala fue de 0,44 cm, manteniéndose dentro de los valores citados, pero la altura promedio de las plantas fue de 69,29 cm, superando en poco más del 50 % el límite superior de altura citado para esta especie. Los trabajos que incorporan la longitud de entrenudo como carácter útil en la caracterización de plantas de la especie, citan como promedio de este carácter un valor de 1,59 cm. Este valor en esos trabajos se determinó a partir de plantas silvestres de *B. crispera* (Chaves, 2012; Chaves, 2015). El valor de longitud de entrenudo de las plantas en cultivo ha duplicado lo citado para ejemplares silvestres, siendo de 3,06 cm. En este trabajo se ha realizado el registro del número de ramificaciones a los 10 cm de las plantas, en todas las instancias en que fue medido los individuos evaluados presentaron variabilidad para este carácter, por lo que debería ser incluido en estudios posteriores para conocer su heredabilidad y así decidir si es un buen

carácter para seleccionar plantas tendiendo al aumento del rendimiento de biomasa cosechada.

Aunque la familia *Asteraceae* cuenta con un gran número de especies medicinales, sólo algunas responden positivamente al cultivo. En muy pocas se ha documentado que existe evolución bajo selección y manejo humano (Blanckaert *et al.*, 2012, citado por Carrillo Galvez *et al.*, 2015). Al evaluar la respuesta al cultivo de “romerillo amarillo” (*Solidago chilensis* Meyen var. *Chilensis*)- planta nativa de Argentina utilizada por sus propiedades medicinales-, Barrientos (2017) determinó que las condiciones de cultivo influyeron sobre las características morfométricas y en la producción de biomasa de las plantas cultivadas con relación a las plantas silvestres. El proceso de domesticación genera cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos entre las poblaciones silvestres y las cultivadas (Guillén, 2010). A estos cambios se los conoce como Síndrome de Domesticación (Colunga-García Marín y Zizumbo-Villarreal, 2008; Chávez Pesqueira, 2017).

En trabajos previos de caracterización de poblaciones silvestres de la especie estos caracteres presentaron un valor medio para la altura de 22,46 cm, para el ancho de ala de 0,27 cm y para la longitud entrenudo de 1,59 cm (Chaves, 2012; Chaves, 2015). Al realizar la caracterización y la evaluación de variabilidad del germoplasma *in situ*, el valor promedio en las poblaciones silvestres de altura fue de 23,71 cm, el de ancho de ala 0,21 cm y el de la longitud entrenudo 1,23 cm. Estos mismos caracteres medidos en la población evaluada en un mismo ambiente tuvieron un valor promedio de 69,29 cm (altura), 0,44 cm (ancho de ala) y de 3,06 cm (longitud de entrenudo), llegando en casos extremos a encontrar plantas de casi un metro de altura, 0,67 cm de ancho de ala y de 4,2 cm de longitud entrenudo. Estas diferencias morfométricas observadas entre las plantas de carqueja de las poblaciones silvestres y la cultivada podrían atribuirse a los cambios que se manifiestan en especies en proceso de domesticación (Guillén, 2010). Si bien la especie se encuentra en una etapa inicial del proceso de domesticación, es importante recordar que la domesticación es un proceso evolutivo que tiene lugar gradualmente en el tiempo y hay toda clase de grados y estadios de condiciones intermedias (Krapovickas, 2011). Por lo que

las diferencias observadas entre las poblaciones silvestres y la cultivada podrían atribuirse al mencionado síndrome de domesticación (Colunga-García Marín y Zizumbo-Villarreal, 2008; Chávez Pesqueira, 2017)

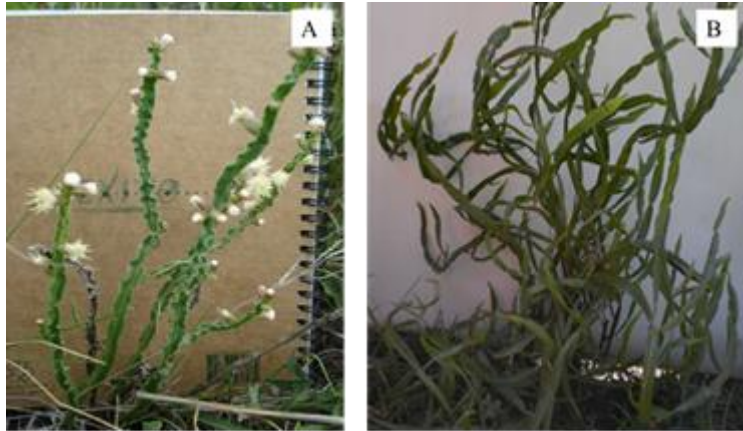


Figura 5.16. A. Ejemplar silvestre, pie masculino, de *B. crispa* de la población San Gerónimo (marzo 2014). B. Ejemplar de *B. crispa* en parcela experimental (marzo 2018).

En cuanto a la fenología, la bibliografía informa que *B. crispa* es una especie perenne, que rebrota en primavera, florece a fines del verano y fructifica en otoño (Alonso y Desmarchelier, 2006; Chaves, 2015). Durante la evaluación del germoplasma silvestre de carqueja realizada en un mismo ambiente, solo el 20 % de las plantas evaluadas florecieron, la floración de pies masculinos y femeninos no fue sincronizada y la floración se retrasó hasta el mes de abril. Además de esta característica en la floración, en la parcela de cultivo se observó que las plantas cubrieron el espacio entre y dentro de las líneas con rebrotes generados desde los rizomas (Fig. 5.16). Según Carrillo *et al.* (2016), en algunos casos los cultivos que se propagan vegetativamente invierten más energía en su propagación vegetativa y suelen destinar menos recursos a su reproducción sexual, por lo tanto este comportamiento puede ocasionar una disminución en la fertilidad. En este sentido McKey *et al.* (2010), afirman que en algunas plantas pueden producirse compensaciones particularmente complejas entre la reproducción sexual y la reproducción clonal. Esta característica es un componente importante del síndrome de domesticación de plantas que pueden propagarse vegetativamente (Meyer y Purugganan, 2013).

El material comercializado y consumido por el mercado corresponde a la parte aérea seca de las plantas cosechadas a partir de poblaciones silvestres (Barboza *et al.*, 2009; Martínez, 2015; Chaves *et al.*, 2015; Paván *et al.*, 2017; Cantero *et al.*, 2019). Conocer el rendimiento en biomasa de las plantas sometidas a cultivo es importante ya que es el producto comercializable. No se han encontrado antecedentes previos de rendimiento de plantas de *B. crispa* cultivadas; sí lo hay para una especie del mismo género y de estructura similar, *Baccharis trimera* (Less) DC. Esta especie es cultivada, citándose rendimientos promedios de 251 g de materia seca por planta en un solo corte en parcelas de cultivo en Uruguay (Davies, 2004) y de 35 g planta promedio cuando se realizan entre dos y tres cortes por ciclo de cultivo en Brasil (Andrião *et al.*, 2010). Se ha encontrado un antecedente de cultivo de *B. crispa* conducido en invernadero en maceta, se registró en estas condiciones un rendimiento promedio de 6,78 g.pl⁻¹ (Moreno Pizani, 2017). También hay antecedentes de cultivo de *B. trimera* en invernadero, en macetas, este estudio cita que el rendimiento de materia seca promedio por planta es de 6,91 g.pl⁻¹ (Capra *et al.*, 2014). Los datos de rendimiento de plantas cultivadas aportados en esta tesis, indican rendimiento promedio por planta de 58,33 g, realizándose un solo corte a los siete meses del trasplante a campo. Es un primer dato, se requiere avanzar en más de un ciclo de cultivo y evaluar la respuesta a distinta frecuencia de corte.

Durante el proceso de la domesticación y mejoramiento genético, las plantas silvestres son sometidas al principio a algún tipo de manejo (Davies, 2004). La caracterización y evaluación de una especie silvestre *ex situ*, como comienzo de un proceso de cultivo, requiere de una población inicial que represente su variabilidad natural (Massuh, 2014; Massuh *et al.*, 2017). Esta población es conocida como población de base genética amplia (Allard, 1980; Cubero Salmeron, 2014). Para seleccionar es imprescindible disponer de la variabilidad que se encuentra en poblaciones o genotipos previamente adaptados, ya que la variabilidad genética de cada especie en estado silvestre no puede utilizarse directamente (Rimieri, 2017).

Hasta aquí se ha descrito el comportamiento de germoplasma silvestre de *B. crispa* en un mismo ambiente, cultivado, en un período inicial de su proceso de domesticación. Al

evaluarlo, todas las variables cuantitativas medidas en él han mostrado variabilidad en distinta medida y también se han observado características cualitativas diferenciales entre los individuos evaluados. Dentro de la nueva población, generada a partir de germoplasma de las poblaciones silvestres evaluadas *in situ*, también se ha demostrado la existencia de variabilidad empleando caracteres discriminantes. Esta nueva población, entendida como un conjunto heterogéneo de individuos que pertenecen a la misma especie biológica y que viven en un momento y en un medio geográfico determinado (Martínez Moreno y Solís Martel, 2010), tiene capacidad para cruzarse e intercambiar alelos unos con otros. Como ya se ha mencionado *B. crispa* es una especie dioica, con reproducción sexual y asexual por medio de rizomas (Ariza Espinar, 1973, 2005; Barboza *et al.*, 2006). De aquí se desprende que el mecanismo de reproducción sexual es la alogamia, por lo que es posible generar a partir de las semillas que se recolecten de la población evaluada la población de base genética amplia para comenzar a seleccionar y mejorar la especie. Esto ya se ha hecho con éxito con la peperina, el suico y el incayuyo, especies aromáticas y medicinales nativas presionadas y con demanda de mercado (Ojeda, 2004; Massuh, 2014; Brunetti, 2017, Massuh *et al.*, 2017; Ocaño, 2017).

CONCLUSIONES

A partir de germoplasma recolectado de las poblaciones silvestres de la provincia de Córdoba, se logró conformar una población de acuerdo a las condiciones de multiplicación desarrolladas en el Capítulo 4.

El conjunto de individuos generado fue caracterizado en varias etapas, que concluyeron con la cosecha a campo. Para dicha caracterización se emplearon caracteres cuantitativos y cualitativos. A partir de la descripción de estos caracteres en la población se determinó que existe variabilidad entre los individuos que conforman la nueva población.

A partir de la comparación de poblaciones silvestres y la población cultivada en un mismo ambiente, se determinó que los rasgos morfométricos evaluados se expresaron de manera diferente entre las condiciones silvestre y cultivada

Se aporta el primer dato correspondiente al rendimiento de plantas cultivadas, siendo el rendimiento promedio de 58,33 g.pl⁻¹. Este dato es de suma importancia para conocer el rendimiento de la especie cuando es cultivada, como alternativa de la extracción de material vegetal a partir de poblaciones silvestres.

BIBLIOGRAFÍA

- Allard R.W. 1980. Principios de la mejora genética de las plantas. Omega, Barcelona, España, 498 pp.
- Alonso J. y Desmarchelier C. 2006. Plantas medicinales. Bases Científicas para su aplicación primaria de la salud. Corpus, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 748 pp.
- Amujoyegbe B.J., Agbedahunsi J.M. and Amujoyegbe O.O. 2012. Cultivation of medicinal plants in developing nations: means of conservation and poverty alleviation. *Int. J. Med. Arom. Plants* 2 (2): 345-353.
- Andrião M.M., dos Santos Pereira F.C., Espagnoli M.I., Martins G. e do Sacramento L.V. 2010. Estimativas de custo de produção e rentabilidade de plantas medicinais: carqueja cultivada no município de Cajuru, Estado de São Paulo. *Informações Econômicas* 40 (2) 16-26.
- Ariza Espinar L. 1973. Las especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central. *Boln. Acad. Nac. Ci. Córdoba* 50: 175-305.
- Ariza Espinar L. 2005. Pródromo de la flora fanerogámica de Argentina central. Familia *Asteraceae* Tribu *Asterae*. Museo Botánico. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. 139 pp.
- Barboza G.E., Cantero J.J., Núñez C, Pacciaroni A, Espinar L.A. 2009. Medicinal plants: a general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native argentine Flora. *Kurtziana* 34(1-2):7-365.
- Barboza G.E., Cantero J.J., Nuñez C.O. y Ariza Espinar L. 2006. Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina). Pteridofitas y Antofitas silvestres o naturalizadas. Gráficamente, Córdoba, Argentina, 1264 pp.
- Barrientos G.N. 2017. Estudios agronómicos para la domesticación de *Solidago chilensis* var. *chilensis* (*Asteraceae*), especie nativa de interés medicinal. Trabajo final de grado. Universidad Nacional de Luján. 59 pp.
- Blanckaert I., Paredes-Flores M., Espinosa-García F. J., Piñero D. y Lira R. (2012). Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59: 557- 573.
- Brunetti P.C. 2017. Estudios en *Lippia integrifolia* “Incauyuyo” orientados a su domesticación y mejoramiento genético. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba, 116 pp.
- Cantero J.J., Núñez C.O., Bernardello G., Amuchástegui, A. Mulko, J., Brandolín P., Palchetti M.V., Iparaguirre J., Virginil N. y Ariza Espinar L. 2019. Las plantas de interés económico de Argentina. UniRío. Río Cuarto, Argentina, 936 pp (e-book Isbn: 978-987-688-332-0)

- Capra R.S.; Gratão A.S.; Freitas G.B.; Leite M.N. Preparados homeopáticos e ambiente de cultivo na produção e rendimento de quercetina em carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.]. *Rev. bras. plantas med*, 16 (3): 566– 573.
- Carrillo Galván G., Bye R.A. y Erguiarte L.E. 2016. Domesticación de plantas medicinales aromáticas. En: *Domesticación en el continente americano. Historia y perspectiva del manejo de los recursos genéticos en el Nuevo Mundo*. Casas A., Torres Guevara J. y Parra F. (eds). México pp 692 – 713.
- Chaves A.G. 2012. Caracterización fenotípica de poblaciones silvestres de carqueja (*Baccharis crispa* Spreng.) de la zona de Sierras de la Provincia de Córdoba. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Córdoba. 60 pp.
- Chaves A.G. 2015. Carqueja. En *Plantas Aromáticas y Medicinales. Modelos para su Domesticación, Producción y Usos Sustentables*. Ojeda M.S. y Karlin U.O.T. (Eds.). Editorial de la UNC, Córdoba, pp 63-71.
- Chávez Pesqueira M. 2017. Síndromes de domesticación en plantas. Desde el Herbario CICY, 9: 79–83.
- Colunga-García Marín P. y Zizumbo-Villarreal D. (2008). El origen de la agricultura, la domesticación de plantas y el establecimiento de corredores biológico-culturales en Mesoamérica. *Geografía Agrícola* 41, 81–113.
- Cubero Salmerón J.I. 2014. *Introducción a la mejora genética vegetal*. 3ra Ed. Mundiprensa. Madrid, España 602 pp.
- Davies P. 2004. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Serie FPTA-INIA 11. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Uruguay, 261 pp.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Guillén F. 2010. El proceso de domesticación en las plantas. *Revista Casa del Tiempo*. UAM. 3 EPOCA 4 (28): 66-70.
- Hidalgo R. 2003. Variabilidad Genética y Caracterización de Especies Vegetales. En Franco T. L. e Hidalgo R. (eds.). 2003. *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia, pp 2-26.
- Krapovickas A. 2011. Sembrar, plantar, cultivar, domesticar. *Bondplandia* 20 (2): 419 – 426.
- Martínez G.J. 2015. Las plantas medicinales en la medicina tradicional de las Sierras de Córdoba. Un recorrido por la cultura campesina de Paravachasca y Calamuchita. De todos los mares, Córdoba, Argentina 210 pp.
- Martínez Moreno F. y Solís Martel I. 2010. *Mejora vegetal para ingeniería agronómica*. Secretariado de publicaciones Universidad de Sevilla. Sevilla, España, 284 pp.
- Massuh Y. 2014. Estudio de caracteres morfométricos y bioquímicos en suico (*Tagetes minuta* L.). Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Córdoba. 143 pp.

- Massuh Y., Torres L.E., Ocaño S.F., Brunetti P., Chaves A.G., Zygadlo, J.A. y Ojeda M.S. 2017 Generación y caracterización de una población de *Tagetes minuta* de base genética amplia - Obtención de individuos selectos. *Phyton* 86: 214-223.
- McKey D., Elias M., Pujol B. and Duputié A. 2010. The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New Phytologist* 186: 318–332.
- Meyer R.S., y Purugganan M.D. (2013). Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature Reviews. Genetics* 14 (12): 840–852.
- Moreno Pizani M.M., 2017. Manejo da irrigação e produtividade da água na cultura da carqueja (*Baccharis crispa* Spreng.). Tesis de Doctorado. Universidade de São Paulo 96 pp.
- Müller J. 2006. Systematic of *Baccharis* (Compositae-Asterae) in Bolivia, including an overview of the genus. *Systematic Botany Monographs*. Vol. 76: 1-341.
- Ocaño S.F. 2017. Generación de una población de “peperina” *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, mejorada por sanidad, rendimiento y calidad de aceites esenciales. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Córdoba, 131 pp.
- Ojeda M.S. 2004. Caracterización de poblaciones y avances en la domesticación de peperina *Minthostachys mollis* (Kunt). Griseb. Tesis Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 134 pp
- Ojeda M.S. y Karlin U.O.T. 2015. Introducción a los yuyos. En *Plantas Aromáticas y Medicinales. Modelos para su Domesticación, Producción y Usos Sustentables*. Ojeda M.S. y Karlin U.O.T. (Eds.). Editorial de la UNC, Córdoba, pp 16.
- Paván M.F., Furlan V., Caminos S, Ojeda M.S. 2017. Las personas y las plantas medicinales en el noroeste de Córdoba, Argentina. Reconocimiento y valoración de los recursos naturales locales *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 16 (1) 78-87.
- Rimieri P. 2017. La diversidad genética y la variabilidad genética: dos conceptos diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético vegetal. *Journal of Basic and Applied Genetics* 28 (2): 7-13.
- WHO. 2003. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Publicado en internet, disponible en <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42870/9243546279.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Activo julio de 2020.
- WHO. 2010. Cambio climático y salud humana. Diversidad Biológica. Publicado en internet, disponible en <https://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/es/> Activo julio de 2020.

CONCLUSIONES GENERALES

En la provincia de Córdoba las poblaciones silvestres o naturales de *Baccharis crispa* Spreng. experimentan grave erosión genética por su demanda comercial y porque no se cultiva. Se debe reconocer que la recolección no es la única causa de la erosión genética; el desmonte a tala rasa que exige la ampliación de la frontera agrícola y otras prácticas como la roza a fuego intencional para proveer pasto al ganado, que deviene en incendios arrasadores, tienen efectos a menudo permanentes sobre la composición florística y la diversidad vegetal de los ambientes de crecimiento; junto a la urbanización incontrolada que ocurre en grandes áreas de interés turístico como nuestros paisajes serranos.

Para aliviar la presión sobre las poblaciones silvestres es necesario cubrir la demanda con material proveniente de cultivo y paralelamente educar en el uso sostenible de las poblaciones silvestres para evitar su desaparición. En este trabajo se realizó la caracterización y la evaluación de variabilidad morfológica y de la bioactividad potencial de poblaciones silvestres de la especie en las serranías de Córdoba; la determinación de las condiciones adecuadas para su domesticación y la descripción del comportamiento de la especie en un mismo ambiente. Estas actividades permitieron conocer aspectos del manejo de la especie desconocidos hasta el momento y encontrar nuevas utilidades para despertar el interés para cultivo. Se reunió el germoplasma con el que se ha iniciado el proceso de domesticación y con el que se dará inicio a un programa de selección y mejoramiento por caracteres agronómicos y bioactivos.

El trabajo se desarrolló bajo la siguiente hipótesis y objetivos, que delinearon las actividades desarrolladas para verificar la hipótesis planteada.

Hipótesis:

Cuando el germoplasma silvestre de *B. crisper* es cultivado y evaluado en un mismo ambiente se expresan diferencias morfológicas y agronómicas entre los individuos cultivados y éstos también responden de manera distinta a como lo hacen sus congéneres en la naturaleza.

Objetivo General:

Evaluar la variabilidad morfológica y la variabilidad en la bioactividad de poblaciones silvestres de *Baccharis crisper* Spreng. y generar las metodologías para domesticar y conformar una población variable de la especie.

Objetivo Específicos:

Determinar la existencia de variabilidad morfológica en poblaciones silvestres de *B. crisper*

Evaluar la variabilidad en la bioactividad, actividad antiviral y virucida, de extractos orgánicos y acuoso caliente obtenidos de poblaciones silvestres de *B. crisper*

Realizar estudios de propagación sexual y agámica

Evaluar la respuesta de germoplasma proveniente de poblaciones silvestres en un mismo ambiente

Se presentan las conclusiones a las que se arribaron en el desarrollo de cada objetivo específico:

Caracterización *in situ* y evaluación de la variabilidad para caracteres morfométricos de poblaciones silvestres de *B. crispera*.

Se caracterizaron cuatro poblaciones silvestres de *B. crispera* de las serranías de la provincia de Córdoba. Se trabajó con poblaciones de lugares donde la recolección de esta hierba medicinal es una práctica común de los pobladores locales. La caracterización de las poblaciones se llevó a cabo utilizando variables morfológicas empleadas en descripciones botánicas y trabajos previos de caracterización de la especie. Se encontró que las variables morfológicas evaluadas asumieron valores dentro del rango de los ya descritos, salvo la longitud de inflorescencia femenina. A través de la descripción del suelo donde crecen las poblaciones evaluadas se determinó que las poblaciones crecen en suelo suelto, sin problemas de salinidad y con pH levemente ácido. Con los caracteres evaluados se demostró la existencia de variabilidad dentro y entre las poblaciones estudiadas.

Variabilidad en la bioactividad de extractos orgánicos y acuoso caliente obtenidos de poblaciones silvestres de *B. crispera*

Con material proveniente de las cuatro poblaciones evaluadas en la caracterización morfológica, se obtuvieron los extractos orgánicos clorofórmico y etanólico, y el acuoso caliente de cada una de ellas. A estos extractos se les evaluó la citotoxicidad *in vitro*, describiendo el efecto citopático producido por cada uno de ellos y determinando las CC₂₀ y la CC₅₀ para la valoración de la actividad antiviral y virucida de cada uno de ellos. De manera general se encontró que los extractos acuosos fueron menos citotóxicos que los orgánicos, dentro de los orgánicos el extracto clorofórmico fue más citotóxico que el extracto etanólico. La actividad antiviral y virucida se evaluó frente a un virus ARN: Chikungunya (CHIKV) (Alfavirus-Arbovirus) genotipo Asiático-americano y un virus ADN: Herpes simplex tipo 1 (HSV-I) (Herpes virus) cepa KOS. Las poblaciones evaluadas tuvieron actividad antiviral y virucida, excepto la población de Villa del Parque. Los extractos evaluados presentaron mayor potencial inhibitorio en actividad

antiviral, comparado con la actividad virucida de ambos modelos virales. Se determinó la existencia de variabilidad dentro y entre las poblaciones evaluadas tanto para la actividad antiviral y la actividad virucida.

Propagación sexual y asexual de la especie *B. crispa*.

Con germoplasma recolectado de las poblaciones silvestres se realizaron los ensayos de propagación sexual y asexual. Se determinó que la especie no presenta mecanismos de dormición, ya que no responde mejorando el porcentaje de germinación cuando se le aplican a las semillas tratamientos pre germinativos para la ruptura de posibles dormiciones física y fisiológica. Hasta los 18 meses de almacenamiento, las semillas no perdieron viabilidad. El germoplasma presentó un porcentaje de germinación promedio de 40 %, empleando semillas sin restos de inflorescencia. Esta característica está asociada a la presencia de embrión. El porcentaje de germinación es bajo a pesar de la selección de las semillas. Esta característica sumada a que la especie posee un alto porcentaje de semillas vacías, es la causa de la dificultad encontrada en la reproducción sexual de la especie. En lo que respecta a la reproducción asexual por estacas se determinó que el germoplasma tiene bajo porcentaje de prendimientos (< 20 %), por lo que se recomienda contemplar en futuras líneas de investigación la multiplicación *in vitro*. Con las evaluaciones realizadas se concluye que es difícil propagar la especie sexual y asexualmente, por lo que es recomendable continuar investigando alternativas para su multiplicación.

Evaluación de la respuesta de germoplasma proveniente de poblaciones silvestres en un mismo ambiente.

Con germoplasma silvestre de *B. crispa*, recolectado en las Sierras de Córdoba, se logró armar una población de individuos a los que se les evaluó la respuesta en un mismo ambiente de cultivo, considerando caracteres agronómicos cualitativos y cuantitativos. Entre estos últimos se consideraron caracteres evaluados en las poblaciones silvestres *in situ*. Con estos datos se contrastó en comportamiento *in situ* y *ex situ*. Con la información

recabada de las plantas en cultivo se demostró la existencia de variabilidad dentro de la nueva población. En relación a la caracterización de esta población se determinó que los individuos que la componen superaron los valores de los caracteres evaluados citados en la bibliografía, también fueron superiores a los obtenidos de la evaluación *in situ* de las poblaciones de dónde provino el germoplasma usado para su conformación. Se generaron los primeros datos de rendimiento (g.pl^{-1}) y caracteres de plantas asociados a la especie en una condición de cultivo. Por último, se encontró variabilidad entre los individuos evaluados considerando todos los caracteres analizados, sean cuantitativos y cualitativos; por lo que a partir de las semillas que se recolecten en la parcela de cultivo se generará la población de base genética amplia.

Por lo expuesto hasta aquí se concluye que se comprobó la hipótesis planteada en esta tesis, demostrando la existencia de variabilidad morfométrica entre y dentro de las poblaciones silvestres y que considerando dichos caracteres, la población variable de la especie respondió de manera distinta respecto a las poblaciones silvestres. También se demostró la existencia de variabilidad en la capacidad antiviral entre y dentro de las poblaciones silvestres. Además se ajustaron metodologías de multiplicación y manejo que permitieron iniciar con el proceso de domesticación y se conformó una población variable de *B. crispa*.

Futuras líneas de investigación

1) Evaluar la citotoxicidad y la actividad antiviral *in vitro* de los extractos obtenidos a partir de las plantas de *B. crispa* evaluadas en un mismo ambiente de cultivo. Comparar los resultados obtenidos con la bioactividad encontrada con los extractos de las poblaciones silvestres.

2) Realizar el perfil químico de los extractos evaluados y determinar los compuestos responsables de la bioactividad encontrada.

3) Realizar la caracterización molecular de la población evaluada en un mismo ambiente y determinar si la variabilidad fenotípica encontrada se corresponde con variabilidad molecular.

4) Estudiar el efecto del proceso de domesticación a nivel molecular, determinando si hay cambio en las frecuencias alélicas entre las poblaciones silvestres y la .cultivada.

5) Ajustar un protocolo de multiplicación *in vitro* para la obtención de plantas.

6) Recolectar semillas en la parcela evaluada. Con esas semillas conformar una población de base genética amplia la cual será el punto de partida para comenzar a seleccionar en ella individuos sobresalientes por rendimiento de materia seca y por bioactividad.

7) Determinar la heredabilidad de los caracteres cuantitativos evaluados, a partir de la descomposición de la varianza ambiental obtenida al realizar evaluación clonal del germoplasma. Seleccionar en base a este parámetro los mejores caracteres para realizar selección.

ANEXO I

Cuadros de ANAVA para citotoxicidad, actividad antiviral y virucida evaluadas en función del tipo de extracto y de la población de origen del material vegetal con el que se obtuvo el extracto.

Variable: CC₅₀

N = 36 R² = 1 R² aj = 1 CV = 1,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1727354,32	11	157032,21	8119,22	<0,0001
Extracto	1095483,04	2	547741,52	28320,52	<0,0001
Población	155476,56	3	51825,52	2679,60	<0,0001
Extracto*Población	476394,73	6	79399,12	4105,27	<0,0001
Error	83,37	24	19,34		
Total	7210,82	35			

Se consideran significativos los p-valor < 0,05

Variable: CC₁₀

N = 36 R² = 1 R² aj = 1 CV = 2,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	922764,81	11	83887,71	2782,55	<0,0001
Extracto	718658,50	2	359329,25	11918,91	<0,0001
Población	58164,71	3	19388,24	643,11	<0,0001
Extracto*Población	145941,61	6	24323,60	806,81	<0,0001
Error	723,55	24	30,15		
Total	<u>923488,36</u>	35			

Se consideran significativos los p-valor < 0,05

Variable: % inhibición HSV-actividad antiviral

N = 24 R² = 0,99 R² aj= 0,98 CV = 5,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	7127,44	11	647,95	93,26	<0,0001
Extracto	1907,12	2	953,56	137,25	<0,0001
Población	5059,67	3	1686,56	242,75	<0,0001
Extracto*Población	160,65	6	26,77	3,85	0,0224
Error	83,37	12	6,95		
Total	7210,82	23			

Se consideran significativos los p-valor < 0,05

Variable: % inhibición CHIKV-actividad antiviral

N = 24 R² = 0,99 R² aj= 0,98 CV = 3,87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	6945,01	11	631,36	132,71	<0,0001
Extracto	846,49	2	423,24	88,96	<0,0001
Población	5644,43	3	1881,48	395,47	<0,0001
Extracto*Población	454,10	6	75,68	15,91	<0,0001
Error	57,09	12	4,76		
Total	7002,10	23			

Se consideran significativos los p-valor < 0,05

Variable: % inhibición HSV-actividad virucida

N = 24 R² = 1 R² aj= 1 CV = 2,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	7508,04	11	682,55	900,51	<0,0001
Extracto	1740,34	2	870,17	1148,05	<0,0001
Población	4586,90	3	1528,97	2017,22	<0,0001
Extracto*Población	1180,80	6	196,80	259,65	<0,0001
Error	9,10	12	0,76		
Total	7517,14	23			

Se consideran significativos los p-valor < 0,05

Variable: % inhibición CHIKV-actividad virucida

N = 24 $R^2 = 1$ $R^2_{aj} = 1$ CV = 1,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	6460,47	11	587,32	2996,16	<0,0001
Extracto	1905,03	2	952,51	4859,20	<0,0001
Población	3564,94	3	1188,31	6062,12	<0,0001
Extracto*Población	990,50	6	165,08	842,16	<0,0001
Error	2,35	12	0,20		
Total	6462,82	23			

Se consideran significativos los p-valor < 0,05